

Aus dem Bereich der Anatomie und Zellbiologie

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

**Immunhistochemischer Nachweis
des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC3
in Leber und Gallenblase des Menschen**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät der

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von Nele Leonie Kaul

geboren am 27.09.1998 in Worms

Tag der Verteidigung: 29.02.2024

Betreuer: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

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

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

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dieter Bruns

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Zusammenfassung	9
3	Summary	12
4	Einleitung	15
4.1	Anatomie von Leber und Gallenblase	15
4.1.1	Makroskopische Anatomie der Leber.....	15
4.1.2	Makroskopische Anatomie der Gallenblase	16
4.1.3	Mikroskopische Anatomie der Leber	17
4.1.4	Mikroskopische Anatomie der Gallenblase.....	20
4.2	Physiologie und wichtige Funktionen von Leber und Gallenblase	22
4.3	TRP-Kanäle	25
4.3.1	TRP-Kanäle	25
4.3.2	TRPC-Kanäle	28
4.3.3	TRPC3-Kanäle	32
4.4	Fragestellungen der Arbeit	47
5	Material und Methodik	48
5.1	Material und Geräte.....	48
5.1.1	Chemikalien.....	48
5.1.2	Verbrauchsmaterial.....	49
5.1.3	Geräte	50
5.1.4	Substanzen für die Immunhistochemie.....	51
5.2	Probenmaterial	52
5.2.1	Ethikvotum	52
5.2.2	Probenkollektiv der Körperspender*innen	53
5.2.3	NEP-Fixierung der Körperspender*innen	55
5.2.4	Entnahmestellen der Gewebeproben	57
5.3	Weiterverarbeitung der Proben.....	63
5.3.1	Allgemeine Arbeitsschritte der Untersuchungen der Gewebeproben	63

5.4	Färbung der Proben	69
5.4.1	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	69
5.4.2	Immunhistochemische Färbung.....	77
5.4.3	Peptidinkubation (Spezifitätsnachweis)	95
6	Ergebnisse	97
6.1	Auswertung des Lebergewebes	100
6.2	Auswertung des Gallenblasengewebes.....	103
6.3	Auswertung der Proben von Körperspenderin 22/23	106
6.4	Vergleich zwischen Gewebe von Leber und Gallenblase	108
6.5	Gesamtauswertung	112
7	Diskussion	114
7.1	Diskussion von Material und Methoden.....	114
7.1.1	Probenkollektiv	114
7.1.2	Fixierung der Körperspender*innen.....	115
7.1.3	Pathologien der Proben.....	116
7.1.4	Einfluss der Dicke der Gewebeschnitte.....	117
7.1.5	Verwendeter Antikörper.....	118
7.2	Diskussion der Ergebnisse.....	119
7.2.1	Auswertung der Ergebnisse.....	119
7.2.2	Einordnung der Ergebnisse.....	121
7.3	Zusammenfassung und Perspektive der Ergebnisse	124
8	Literaturverzeichnis.....	125
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	135
9.1	Abbildungsverzeichnis	135
9.2	Tabellen- und Diagrammverzeichnis	136
10	Publikationen.....	137
11	Danksagung	138
12	Curriculum Vitae.....	140
13	Anhang	141

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Å	Ångström
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ARD	Ankyrin-Repeat-Domäne
ATP	Adenosintriphosphat
CCE	Capacitative calcium entry
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CKD	Chronische Nierenerkrankung
cm	Centimeter
CRIB	Calmodulin/IP3 receptor binding domain
CTD	C-terminale Domäne
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECD	Extracellular domain
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFPE	Formalin fixation and paraffin embedding
G	Gauge
GPCR	G-protein-coupled receptor
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H₂O₂	Wasserstoffperoxid

HCAEC	Human coronary artery endothelial cell
HEK293-cells	Human embryonic kidney 293-cells
HIER	Heat induced epitop retrival
HRP	Horseradish peroxidase
ICRAC	Calcium release activated calcium currents
IHC	Immunhistochemie
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KG	Körpergewicht
l	Liter
LC	Lobus caudatus
LD	Linker-Domäne
LHDd	Lobus hepatis dexter, Facies diaphragmatica
LHDv	Lobus hepatis dexter, Facies visceralis
LHSd	Lobus hepatis sinister, Facies diaphragmatica
LHSv	Lobus hepatis sinister, Facies visceralis
LIC	Light induced current
Lig.	Ligamentum
LQ	Lobus quadratus
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger ribonucleid acid
Mwk	Moonwalker
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis

NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol
NGS	Normal goat serum
NOMPC	no mechanoreceptor potential C
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Pondus hydrogenii
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKG	Proteinkinase G
PLCβ	Phospholipase C β
PLCγ	Phospholipase C γ
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
ROCE	Receptor operated calcium entry
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOC	Store operated channel
SOCE	Store operated calcium entry
STIM	Stromal interaction molecule
TMD	Transmembrandomäne
TRP	Transient receptor potential
TRPC	Transient receptor potential canonical/classical
TRPC3	Transient receptor potential canonical/classical 3
TRPM	Transient receptor potential melastin
V.	Vena
Gcoll	Gallenblase, Collum
Gcorp	Gallenblase, Corpus
GF	Gallenblase, Fundus
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

Vv.	Venae
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

2 Zusammenfassung

Hintergrund: Schon seit mehreren Jahrzehnten sind die TRP-Kationenkanäle (transient receptor potential), mit ihrer Unterfamilie der TRPC-Proteine, Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Eine Mutation des TRP-Proteins der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* führte ursprünglich zur Entdeckung der Kanäle, die vor allem für Calcium-Ionen permeabel sind.

Für einige dieser Proteine konnte in weiterführenden Arbeiten bereits Korrelation zu pathologischen Prozessen und Erkrankungen hergestellt werden. Zusammenhänge zu kardiovaskulären Erkrankungen und karzinogenen Prozessen wurden schon für Mitglieder der TRPC-Subfamilie beschrieben. Insbesondere das in dieser Arbeit untersuchte Protein TRPC3 scheint in Verbindung mit dem Ovarial-Karzinom und der spinocerebellären Ataxie, die zu den neurodegenerativen Krankheiten gezählt wird, zu stehen.

Um Korrelation und/oder Kausalität zwischen der Expression eines Ionenkanals oder der Mutation eines solchen mit pathologischen Prozessen in Verbindung zu bringen, bedarf es natürlich zunächst der Antwort auf die grundlegende Forschungsfrage, in welchem Gewebe dieser Ionenkanal exprimiert wird. Der Nachweis des TRPC3-Proteins konnte bisher über Analysen der Genexpression bei Menschen und Nagetieren für viele Organe erbracht werden. Die Datenlage zu immunhistochemischen Nachweisen von TRPC3 in menschlichem Gewebe ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings spärlich. Die Leber, die eines der beiden Organe ist, die für diese Arbeit untersucht wurden, spielt als eine der Hauptverdauungsdrüsen eine entscheidende Rolle in unserem Stoffwechsel. Sie synthetisiert essentielle Substanzen und metabolisiert körpereigene und körperfremde Stoffe. Im Zusammenspiel mit der Gallenflüssigkeit und der Gallenblase als deren Speicherort, ist sie unerlässlich für einen funktionierenden Stoffwechsel. Für diese Funktionen sind Signaltransduktionsprozesse und Ionenkonzentrationsänderungen, an welchen auch Calcium maßgeblich beteiligt ist,

zwangsläufig von Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war es daher, den nicht-selektiven Kationenkanal TRPC3 mittels immunhistochemischer Methodik in Leber und Gallenblase nachzuweisen.

Methoden: Für diese Arbeit wurden bei acht Körperspender*innen (n=8) des anatomischen Institutes Homburg Proben von Leber und Gallenblase entnommen. Die Körperspender*innen wurden mit Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol (NEP) fixiert. Pro Körperspender*in sollten neun Gewebeproben (n=9) entnommen werden, sechs davon in der Leber (n=6) und drei davon in der Gallenblase (n=3). Bei drei der Körperspender*innen konnte keine Probenentnahme in der Gallenblase erfolgen, da diese höchstwahrscheinlich durch einen früheren operativen Eingriff entfernt wurde. Die Probenentnahmestellen orientierten sich an der makroskopischen Anatomie der Organe. Anschließend wurden die Proben histologisch aufgearbeitet. Dabei wurde das entnommene Gewebe in Paraffin eingebettet und die so entstandenen Blöcke wurden im Anschluss geschnitten. Danach erfolgte eine Färbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin, um die Qualität der geschnittenen Proben beurteilen zu können. Entsprechende Qualitätskriterien waren unter anderem ein vollständiger Gewebeschnitt ohne Risse und möglichst keine Epithelabschilferungen. Anschließend wurden Proben anhand dieser Qualitätsmerkmale für die immunhistochemische Färbung ausgewählt, mit welcher TRPC3 nachgewiesen werden sollte. Für diese Arbeit wurde das Verfahren der indirekten Immunhistochemie angewendet, wobei ein gegen TRPC3 gerichteter Knockout-validierter Primärantikörper und ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet wurden. Das Enzym des Sekundärantikörpers war die horseradish peroxidase (HRP), welche im Deutschen unter dem Namen Meerrettichperoxidase bekannt ist. Bei dem chromogenen Substrat, welches durch das Enzym umgesetzt wurde, handelte es sich um 3,3'-Diaminobenzidin (DAB).

Ergebnisse: Das Ergebnis der Laborarbeit war eine deutlich, positive Färbereaktion der Gewebeproben von Leber und Gallenblase. In den Analysen zeigten sich die Proben des Lebergewebes zu den Proben des Gallenblasengewebes weitestgehend gleich stark gefärbt. Somit konnte die Expression von TRPC3 in Leber und Gallenblase des Menschen nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Mit dieser Arbeit konnte der nicht-selektive Kationenkanal TRPC3 in humanem Gewebe von Leber und Gallenblase nachgewiesen werden. Damit wird das Wissen über die Expression von TRPC3 beim Menschen erweitert und kann als Ansatzpunkt für fortführende wissenschaftliche Arbeit bezüglich der umfangreichen Thematik der TRPC- und insbesondere TRPC3-Proteine dienen. Im Hinblick auf die Funktion scheint es naheliegend, dass der nicht-selektive Kationenkanal auf zellulärer Ebene durch seine Calcium-Permeabilität zum physiologischen Gleichgewicht der Ionenkonzentrationen beiträgt. Jenes Gleichgewicht ist von grundlegender Bedeutung für die Funktionsfähigkeit einer Zelle, ob im Rahmen der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Weiterleitung von Signalen oder genereller Metabolisierungsfunktionen einer Zelle. Der Sachverhalt, dass einige Arbeiten auf einen Zusammenhang zwischen einer Veränderung der Expression von TRPC3 und des strukturverwandten Proteins TRPC6 und karzinogener Prozesse deuten, lässt vermuten, dass auch für Leber und Gallenblase eine solche Korrelation bestehen könnte. In diesem Zusammenhang sind noch weitere Nachforschungen notwendig.

3 Summary

Background: TRP-cation channels (transient receptor potential), with their subfamily of TRPC proteins, have been the subject of intensive scientific research for several decades. A mutation of the TRP protein in the fruit fly *Drosophila melanogaster*, originally led to the discovery of the primarily calcium-permeable channels. For some of these proteins, correlations to pathological processes and diseases have already been established in further work. For example, connections to cardiovascular diseases and carcinogenic processes have been described, specifically for channels of the TRPC subfamily. Thus far, a connection with ovarian carcinoma and spinocerebellar ataxia, which is a neurodegenerative disease, has been established for TRPC3 in particular.

In order to establish a correlation and/or causality between the expression or mutation of ion channels with pathological processes, an answer to the fundamental research question, in which tissue the ion channel that is discussed is expressed, is of course required first. To date, the TRPC3 channel has been detected for many organs by analyzing gene expression in humans and rodents. The data on immunohistochemical detection of TRPC3 in human tissue is currently sparse. As one of the main digestive glands, the liver plays a crucial role in our metabolism. It synthesizes essential substances and metabolizes endogenous and exogenous substances. In interaction with the bile and the gallbladder the liver is essential for a functioning metabolism. Signal transduction processes and changes in ion concentration, in which calcium is also significantly involved, are of crucial importance for these functions. The aim of this work was therefore to detect the non-selective cation channel TRPC3 in the liver and gallbladder using immunohistochemical methods.

Methods: For this work, liver and gallbladder samples were obtained from eight body donors (n=8) of the Anatomical Institute Homburg. The body donors were fixated with nitrite pickling salt-ethanol-polyethylene glycol fixation (NEP). In total, nine tissue samples (n=9) were taken

from each body donor, six of them in the liver (n=6) and three of them in the gallbladder (n=3). In three of the body donors, it was not possible to take a sample from the gallbladder, as it was most likely removed by a previous surgical procedure. With regard to the sampling points, orientation was based on the macroscopic anatomy of the organs. After the removal the samples were processed histologically, therefore they were embedded in paraffin and the resulting blocks were cut afterwards. Subsequently, the tissue sections were stained with hematoxylin-eosin, in order to be able to assess the quality of the sectioned samples. Corresponding quality criteria included a complete tissue section without tears and no epithelial desquamation. Based on these quality characteristics, samples were then selected for the immunohistochemical staining, with which TRPC3 was to be detected. Indirect immunohistochemistry was used for this work, using a knockout-validated primary antibody directed against the TRPC3 channel and an enzyme-linked secondary antibody. The enzyme coupled to the secondary antibody was horseradish peroxidase (HRP). The chromogenic substrate that was converted by the enzyme was 3,3'-diaminobenzidine (DAB).

Results: The result of this work was a clearly positive staining reaction in the tissue samples from the liver and gallbladder. In the analysis, the liver tissue samples were mostly stained with the same intensity compared to the tissue samples of the gallbladder. Thus, the expression of TRPC3 in human liver and gallbladder could be detected.

Conclusion: With this work, the non-selective cation channel TRPC3 could be detected in human liver and gallbladder tissue. This expands the knowledge about the expression of TRPC3 in human tissue and can serve as a starting point for further scientific work on the extensive topic of TRPC-, and TRPC3-proteins in particular. In terms of function, it appears that, due to its calcium permeability, the non-selective cation channel contributes to the physiological balance of ion concentrations at cellular levels. The balance of the various ions involved at cellular level is fundamental to the functioning of a cell, whether in maintaining the resting

membrane potential, the transmission of signals or the cell's metabolic function in general. Furthermore, some work on TRPC3 indicates a change in the expression pattern in the context of carcinogenic processes in the ovary. The extent to which the expression of the non-selective cation channel TRPC3 correlates with pathological processes in the liver and gallbladder remains open at this point and requires further investigation.

4 Einleitung

Die Fragestellung, die dieser Dissertation zugrunde liegt, ist, ob der nicht-selektive Kationenkanal TRPC3 mittels immunhistochemischer Methodik in postmortalem Gewebe von Leber und Gallenblase des Menschen nachweisbar ist.

Da die Kenntnisse der Anatomie der beiden Organe, die in dieser Arbeit untersucht wurden, die Grundlage für zahlreiche Arbeitsschritte sind und somit untrennbar mit der Auswertung der Proben verbunden sind, werde ich zuerst auf die Anatomie eingehen. Anschließend werden die TRP-Proteine mit ihrer Unterfamilie der TRPC-Proteine und insbesondere TRPC3 erläutert.

4.1 Anatomie von Leber und Gallenblase

An dieser Stelle soll auf den makroskopischen und mikroskopischen Aufbau der Gewebe eingegangen werden, die für diese Arbeit untersucht wurden. Dies ist sowohl die Voraussetzung für eine gute Orientierung während der Probenentnahme als auch für ein hinreichendes Verständnis der Gewebeschnitte und der darauf aufbauenden Beurteilung der mikroskopierten Schnittbilder.

4.1.1 Makroskopische Anatomie der Leber

Die Leber befindet sich im rechten Oberbauch unterhalb des Zwerchfells. Mit Ausnahme eines kleinen Feldes, der Area nuda, liegt das Organ vollständig intraperitoneal. Ihre konkave Seite, die den anderen Bauchorganen zugewandt ist, wird auch Facies visceralis genannt. Die konvexe Seite der Leber ist dem Zwerchfell zugewandt und wird auch als Facies diaphragmatica bezeichnet. Die oben erwähnte Area nuda, wird vom Ligamentum coronarium hepatis begrenzt und bezeichnet die Region um die Vena cava inferior. In der Literatur werden zwei verschiedene Ansätze zur Einteilung der Leber beschrieben. Die funktionelle Gliederung orientiert sich an den Ästen der Pfortader und teilt die Leber in acht Segmente, die durch Verästelungen der portalen Trias (Arterie, Vene und Gallengang) perfundiert werden (Schünke et al., 2018). Die morphologische Gliederung, die Grundlage für die Probenentnahme dieser

Arbeit war, unterteilt die Leber in vier Leberlappen (Lobus hepatis sinister, Lobus hepatis dexter, Lobus caudatus und Lobus quadratus) sowie die Leberpforte zwischen Lobus quadratus und Lobus caudatus, in welche Gefäße ein- und austreten.

Die Gefäßversorgung der Leber weist Parallelen zu der der Lunge auf. Auch die Leber wird von Vasae privatae und Vasae publicae perfundiert. Die Vasae privatae, welche der Arteria hepatica propria entstammen, dienen der Eigenversorgung der Leber mit Sauerstoff, die Vasae publicae, die wiederum der Vena portae hepatis entspringen, dienen dem ganzen Körper, indem sie - unter anderem - Nährstoffe, die bei der Verdauung aus dem Magen-Darm-Trakt aufgenommen wurden, zur Verstoffwechselung der Leber zuführen. Der venöse Abfluss beider Kreisläufe läuft über die Vena cava inferior.

Die vegetative Innervation der Leber erfolgt sympathisch über das Ganglion coeliacum. Bei einer überwiegenden Aktivität des sympathischen Anteils des vegetativen Nervensystems wird der Gallefluss gehemmt und der Glykogenabbau gefördert. Die parasympathische Innervation erfolgt über den Nervus vagus, wodurch der Gallefluss gesteigert und die Glykogensynthese gefördert wird. Sensibel wird der Peritonealüberzug der Leber und die Glisson-Kapsel vom rechten Nervus phrenicus (Ramus phrenicoabdominalis) innerviert, weshalb Erkrankungen, die zu einer Kapseldehnung der Leber führen, schmerzhaft sein können (Aumüller et al., 2020).

4.1.2 Makroskopische Anatomie der Gallenblase

Die Gallenblase ist ein birnenförmiges Hohlorgan mit einem Fassungsvermögen von etwa 70 ml. Sie liegt komplett intraperitoneal, an der Facies visceralis der Leber, in der Fossa vesicae biliaris. Makroskopisch wird sie in Collum, Corpus und Fundus unterteilt (Schünke et al., 2018).

Die Gallenblase wird über die Arteria cystica arteriell versorgt, die ein Ast der Arteria hepatica dextra ist. Der venöse Abfluss der Gallenblase erfolgt über die Venae cysticae, die in die Venae portae münden.

Die Innervation der Gallenblase läuft über den Plexus hepaticus (sensibel, sympathisch und parasympathisch). Zusätzlich dazu laufen, wie auch bei der Leber, Schmerzfasern aus dem rechten Nervus phrenicus des Plexus cervicalis zur Gallenblase. Interessanterweise können über einen viszerokutanen Reflexbogen Schmerzen der Gallenblase in die rechte Schulter übertragen werden, da Nervenfasern der inneren Organe im Rückenmark mit somatischen Nervenfasern der Dermatome zusammenlaufen und im zentralen Nervensystem eine strikte Differenzierung nicht mehr möglich ist (Aumüller et al., 2020).

4.1.3 Mikroskopische Anatomie der Leber

Die Leber wird von einer Kapsel aus Bindegewebe, der sogenannten Glisson-Kapsel, umgeben. Das Bindegewebe dieser Kapsel dient auch als Grundlage für den histologischen Aufbau. Bindegewebige Ausläufer der Kapsel ziehen in das Innere der Leber und bilden im Schnittbild die Glisson-Felder, in denen wiederum Abzweigungen der Gallengänge, der Pfortader und der Leberarterie verlaufen.

Zur weiteren Beschreibung des mikroskopischen Aufbaus der Leber gibt es verschiedene Ansätze. Das Zentralvenen-Läppchen ist einer dieser Ansätze und gleichzeitig auch der geläufigste. Es hat einen sechseckigen Grundriss um eine mittige Zentralvene. Grundlage dieses Aufbaus ist die Flussrichtung des Mischblutes in den Sinusoiden in Richtung Zentralvene. Dieses Blut setzt sich aus arteriellem, sauerstoffreichem Blut der Äste der Arteria hepatica propria und dem nährstoffreichen Blut aus den Ästen der Venae portae hepatis zusammen. Der Azinus ist ein anderes, rautenförmiges Konzept des mikroskopischen Aufbaus der Leber. Drei verschiedene Zonen der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bilden zwei einander gegenüberliegende Azini. Dabei ist Zone 1, jene Zone mit dem höchsten Sauerstoff- und Nährstoffgehalt und Zone 3, die mit dem geringsten. Eine dritte Möglichkeit der Einteilung der hepatozellulären Struktur ist das Portalläppchen. Auch dieses hat einen sechseckigen Grundriss. Jener orientiert sich allerdings um eine zentral liegende Glisson-Trias. Die Glisson-Trias

besteht aus Ästen des Ductus hepatis communis, der Venae portae hepatis und der Arteria hepatica propria. Diese Einteilung hat vor allem historischen Stellenwert und ist heute kaum noch gebräuchlich (Ulfig †, 2019). Sie soll an dieser Stelle der Vollständigkeit wegen jedoch erwähnt sein.

Hepatozyten (Leberzellen) sind auf den vielseitigen Stoffwechsel der Leber spezialisiert und haben daher zahlreiche Zellorganellen. Sie besitzen einen polyploiden Zellkern und zeichnen sich durch eine polare Bauweise aus. Der basolaterale Anteil der Membran ist in Richtung der mit Mischblut gefüllten Sinusoide gerichtet und wird daher auch Blutpol genannt. Durch ein komplexes System und Zusammenspiel mehrerer Transmembranproteine werden an dieser Seite unterschiedliche Stoffe aufgenommen und andere sezerniert. Der apikale Anteil der Phospholipidmembran, der Gallepol, grenzt an die Gallekanäle, wohin die Galle sezerniert wird. Interzellulär wird durch tight junctions (Zell-Zell-Verbindungen) die Polarität, die durch die diverse Proteinausstattung gewährleistet wird, aufrechterhalten; durch gap junctions stehen benachbarte Hepatozyten miteinander in Verbindung und können Ionen und kleinere Moleküle austauschen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Die aneinander gelegenen Hepatozyten sind in Balken angeordnet. Mit ihrer Seitenfläche bilden sie eine Spaltseite des Disse-Raums. Dieser, auch perisinusoidaler Raum genannte Spalt, wird von der anderen Seite mit diskontinuierlichem Endothel ausgekleidet. Durch die großen Poren der flachen Endothelzellen können Moleküle diffundieren und Substanzen, die die Hepatozyten sezernieren, gelangen in die Blutbahn. Auf der anderen Seite kleiden die Endothelzellen die Lebersinusoide aus. Dies sind Kapillare mit weitem Lumen und dünner Wand. Durch die Sinusoide zwischen den Hepatozyten-Balken fließt Mischblut aus Einflüssen der Verästelungen der Vena portae hepatis und der Arteria hepatica propria. An den jeweiligen Rückseiten von zwei aneinander liegenden Hepatozyten befinden sich die Canaliculi biliferi, die intralobulären Ausführungsgänge. Die Galle, die von den Hepatozyten sezerniert wird, kann dann in Richtung

Glisson-Trias, mit den darin befindlichen interlobulären Ausführungsgängen, abfließen. Neben den Hepatozyten gibt es noch weitere Zellen, die in den Sinusoiden und/oder dem Disse-Raum ansässig sind. Eine dieser Zellarten sind die Kupffer-Zellen, die den Endothelzellen aufliegen und deren Fortsätze bis in den Disse-Raum reichen können. Die Kupffer-Zellen sind leberspezifische Makrophagen und zählen zum mononukleären Phagozytosesystem. Zu ihren Aufgaben gehört die Phagozytose - also endozytotische Aufnahme mit anschließender intrazellulärer Hydrolyse - von Bakterien, Fremdpartikeln und beschädigten oder gealterten Blutzellen. Darüber hinaus befinden sich innerhalb der Sinusoide die Ito-Zellen. Sie enthalten große Lipidtropfen, in denen sie das im Darm aufgenommene Vitamin A speichern können. Zusätzlich sind Ito-Zellen, die auch als perisinusoidale Zellen bezeichnet werden, an der Produktion des intralobulären Bindegewebes beteiligt sind (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Folgende Grafik verbildlicht den komplexen mikroskopischen Aufbau des Lebergewebes.

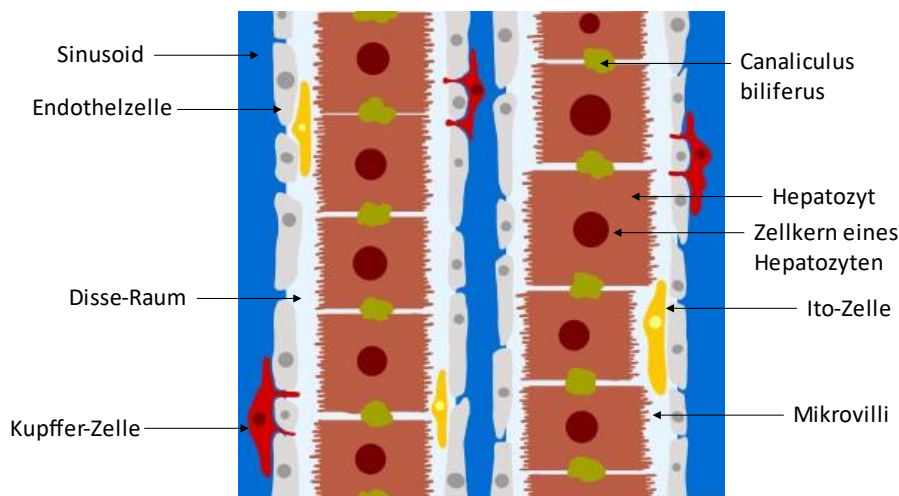


Abbildung 1: Schematisches Modell eines Leberzellbälkchens

4.1.4 Mikroskopische Anatomie der Gallenblase

Der mikroskopische Wandaufbau der Gallenblase (Vesica biliaris) ist eng an den dreischichtigen Wandbau des gastrointestinalen Systems angelehnt. Äußerlich ist die Gallenblase bedeckt von der Tunica serosa, welche durch eine Tunica adventitia nur in jenem Bereich ersetzt wird, in dem die Gallenblase direkt an der Leber anliegt. Die Tela subserosa liegt der Tunica serosa auf und ist als bindegewebige Schicht für eine gute Verschieblichkeit der Tunica serosa und Tunica muscularis verantwortlich. Weiter nach intern schließt sich die Lamina muscularis an. Sie besteht aus glatten Muskelzellen, welche scherengitterartig angeordnete Züge haben. Die dadurch ermöglichte Kontraktionsfähigkeit der Gallenblase ist sehr wichtig für die Ausschüttung der Galle in den Ductus cysticus im Rahmen der Verdauung. Auf die genannte Muskelschicht folgt die Tunica mucosa der Gallenblase. Diese besteht aus der Lamina epithelialis, aufgebaut aus einschichtigem Zylinderepithel mit Mikrovilli, und einer gut vaskularisierten, bindegewebigen Lamina propria. Die Mikrovilli der Lamina epithelialis, welche unflexible Fortsätze der apikalen Zellmembran darstellen, fungieren dabei im Sinne einer Oberflächenvergrößerung, wodurch das Epithel seiner resorbierenden Funktion gerecht werden kann. Hierdurch wird der Galle Wasser entzogen und die Galle somit konzentriert (siehe auch: 4.2 Physiologie und wichtige Funktionen von Leber und Gallenblase). Zusätzlich haben die Epithelzellen auch sekretorische Funktion. Sie sondern Muzine (Schleimstoffe) ab, welche das Epithel der Gallenblase und der Gallenwege vor der Galle schützen (Wennemuth, 2017).

Ein interessantes Unterscheidungsmerkmal der Gallenblase von anderen Teilen des gastrointestinalen Traktes ist das Fehlen einer Lamina muscularis mucosae. Diese Gewebeschicht besteht aus glatten Muskelzellen und kommt ausschließlich in der Tunica mucosa des Ösophagus und des Magen-Darm-Traktes vor.

Ein weiteres charakteristisches Wiedererkennungsmerkmal der Gallenblase ist die zu Falten aufgeworfene Tunica mucosa. Durch diese Falten bilden sich die typischen, tiefen Rokitansky-Aschoff-Krypten (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Folgende Grafik verbildlicht den mikroskopischen Wandaufbau der Gallenblase.

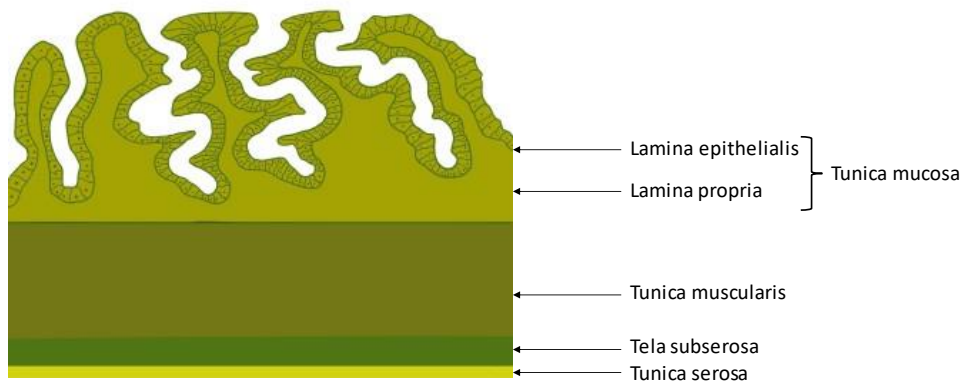


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wandaufbaus der Gallenblase

Anmerkung: Dieses Schema stellt den Teilausschnitt der Gallenblase dar, der sich auf der der Bauchhöhle zugewandten Seite befindet, daher werden die beiden äußeren Schichten von Tela subserosa und Tunica serosa gebildet.

4.2 Physiologie und wichtige Funktionen von Leber und Gallenblase

Nachdem im letzten Kapitel die mikroskopische Anatomie von Leber und Gallenblase beschrieben wurde, soll in diesem Kapitel nun auf die Physiologie und die damit einhergehenden Funktionen der beiden Organe eingegangen werden.

Das Zusammenspiel von Leber und Gallenblase ist für einen funktionierenden Stoffwechsel von enormer Bedeutung. Die Leber ist die größte Drüse des menschlichen Körpers und erfüllt eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen. Eine jener Funktionen ist die Biotransformation. Über diesen Prozess metabolisiert die Leber endogene Stoffe, die beispielsweise beim Abbau von Erythrozyten anfallen. Auch exogene Stoffe, die dem Körper also von außen zugeführt wurden, wie beispielsweise Medikamente oder Noxen (Behrends et al., 2021), werden über die Biotransformation verstoffwechselt. Lipophile (fettlösliche) Substanzen, die nur schwer ausgeschieden werden können, werden im Rahmen der Metabolisierungsprozesse der Leber an hydrophile (wasserlösliche) Substanzen gekoppelt und können anschließend über den Urin eliminiert werden.

Darüber hinaus verstoffwechselt die Leber die einzelnen Bestandteile der von uns aufgenommenen Nahrung. Sie baut im Rahmen umfangreicher biochemischer Prozesse Kohlenhydrate (Glykolyse) und Fettsäuren (beta-Oxidation) ab und kann, sofern der Körper dies benötigt, über die Gluconeogenese auch wieder neue Glucosemoleküle synthetisieren (Heinrich et al., 2014). Des Weiteren synthetisiert die Leber Ketonkörper, welche als wichtige Energielieferanten für unser Gehirn dienen und verschiedene Plasmaproteine wie Albumin, Proteine des Blutgerinnungssystems oder auch Akute-Phase-Proteine, die im Rahmen von Entzündungen ausgeschüttet werden. Weitere Aufgaben der Leber sind die Herstellung von Erythropoetin und Thrombopoetin. Auch wichtige Reaktionsschritte der Synthese der Schilddrüsenhormone Thyroxin, Triiodthyronin und des Vitamin-D₃-Stoffwechsels finden unter Beteiligung der Leber statt (Pape et al., 2019).

Durch die im vorherigen Abschnitt genannten Prozesse der Glykolyse und Gluconeogenese ist die Leber auch entscheidend an der Glucosehomöostase beteiligt. Angehoben wird der Blutzuckerspiegel durch Glykogenolyse, Gluconeogenese und den Abbau von Insulin. Wohingegen durch die Synthese von Glykogen und den Vorgang der Glykolyse der Blutzuckerspiegel gesenkt werden kann (Heinrich et al., 2014).

Die Verbindung zwischen Leber und Gallenblase im hepatobiliären System wird dadurch geschaffen, dass die Leber die Galle synthetisiert, welche anschließend in der Gallenblase gespeichert wird und bei Bedarf in das Verdauungssystem abgegeben werden kann. Zusätzlich wird die Galle nach ihrer Ausschüttung durch die Hepatozyten noch modifiziert. So werden durch die Epithelzellen der Gallengänge zunächst osmotisch wirksame Substanzen wie Bicarbonat sezerniert, woraufhin Wasser entsprechend des osmotischen Gefälles passiv folgt. In der Gallenblase wird in der interdigestiven Phase der Wasseranteil der Galle durch Entzug von Natriumchlorid erniedrigt, wodurch die Galle stark eingedickt und ihr Volumen vermindert wird (Rassow & Netzer, 2016).

Die Galle besteht zu einem großen Anteil aus Wasser und zu etwa 10%-15% aus den Gallesäuren, die der Fettverdauung und Fettresorption dienen. Weitere Bestandteile sind Cholesterin, Phospholipide und Abbauprodukte des Hämoglobins, welche der Galle ihre charakteristische gelb-grünliche Farbe verleihen. Zu den Hauptfunktionen der Galle gehört das Mitwirken bei der Verdauung von Fetten. Die Galle bildet gemischte Mizellen, in denen Monoglyceride, Triglyceride und Cholesterin von den Gallesäuren eingeschlossen und somit für die Verdauungsenzyme des Pankreas leichter zugänglich gemacht werden. Verschiedene Reize können die Sekretion der Galle steigern. Das Hormon Cholecystokin, welches bei der Verdauung von Fetten von den I-Zellen des Duodenum und Jejunum gebildet wird, führt zu Kontraktionen der Gallenblase und stellt somit einen Ausschüttungsreiz für die Galle dar.

Auch eine Erhöhung der Aktivität des Nervus vagus wirkt stimulierend auf die Ausschüttung der Galle.

Nur ein geringer Teil der Gallensäuren wird mit den Fäzes vom Körper ausgeschieden. Der größte Teil wird im terminalen Ileum wieder resorbiert. Dafür werden die Gallensäuren sekundär aktiv über einen Natrium-Symporter ins Blut aufgenommen. Wie auch Nahrungsbestandteile, die vom Darm aufgenommen wurden, gelangen die Gallensäuren anschließend über die Pfortader wieder zurück zur Leber und können erneut in die Canaliculi biliferi sezerniert werden. Dieser Zyklus wird enterohepatischer Kreislauf genannt und wiederholt sich mehrmals am Tag. Die Effizienz dieses Kreislaufs ermöglicht einen niedrigeren Anteil neu synthetisierter Gallensäuren pro Tag (Behrends et al., 2021).

4.3 TRP-Kanäle

Nachdem im letzten Kapitel die Grundlagen der Thematik dieser Dissertation geschildert wurden, soll in diesem Kapitel auf den Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit eingegangen werden.

Schon seit mehreren Jahrzehnten wird Forschung rund um das Vorhandensein, die Regulationsmechanismen und mögliche Beteiligung der TRP-Kanäle an pathologischen Prozessen betrieben. Noch immer sind viele Fragen ungeklärt. Dieses Kapitel soll – mit Fokus auf TRPC3 - einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung liefern.

4.3.1 TRP-Kanäle

Die TRP-Kanäle sind eine Superfamilie von 28 transmembranären Proteinen, die nicht-selektive Ionenkanäle für mono- und divalente Kationen darstellen. Es sind mindestens sieben Unterfamilien der TRP-Kanäle bekannt, denen ihre Struktur und Permeabilität für Kationen gemein ist (Ramsey et al., 2006).

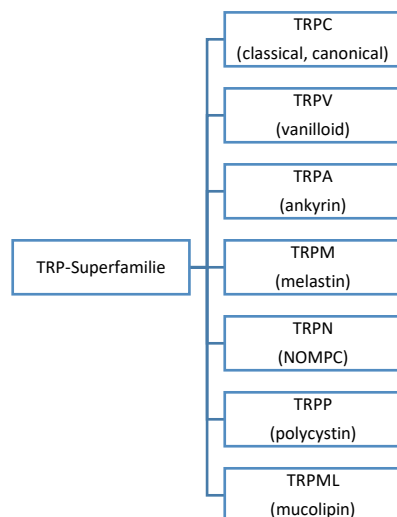


Abbildung 3: Übersicht über die TRP-Subfamilien

Die Funktionen vieler TRP-Kanäle sind bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Beim Menschen scheinen die TRP-Kanäle eine wichtige Rolle in der sensorischen Erkennung der Umwelt zu haben. Sie sind unter anderem beteiligt an der Wahrnehmung von Temperatur, Druck, Schmerz, Pheromonen und Geschmack (Song & Yuan, 2010). Bei Insekten sind die TRP-Kanäle an der visuellen Wahrnehmung beteiligt – dieser Sachverhalt hat ursprünglich auch zur Entdeckung der vielfältigen Kanäle geführt und wird im Folgenden beschrieben.

Erste Hinweise auf das Vorhandensein der TRP-Kanäle wurden schon im Jahr 1969 geliefert. Bei Experimenten mit einer Mutantenart der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckten die Forschenden Veränderungen im Elektretinogramm, die auf einen Defekt der Lichtreiz-verarbeitenden Signaltransduktionskaskade hindeuteten. Die Photorezeptoren der Mutantenart reagierten auf einen andauernden Lichtreiz mit einer transienten Änderung des Rezeptorpotenzials, wobei die Wildtypfliege mit einer für den Zeitraum des Lichteinfalls anhaltenden Änderung des Rezeptorpotenzials reagierte (Cosens & Manning, 1969). Das im Jahr 1969 durchgeführte Experiment wurde sechs Jahre später wieder aufgegriffen. Die Forschenden um Minke gaben der *Drosophila* Mutante, deren Elektretinogrammausschlag trotz anhaltenden Lichteinfalls vorübergehend war, damals den Namen transient receptor potential mutant (Minke et al., 1975). Die Photorezeptoren von Fruchtfliegen umfassen Rhodopsin, einen lichtsensiblen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, welcher zu einer Aktivierung der Phospholipase C führt, was wiederum über mehrere Zwischenschritte einen Einstrom von Calciumionen bedingt. Dieser Einstrom wird auch als lichtinduzierter Strom (light-induced current, LIC) bezeichnet und ist wesentlich für die visuelle Signaltransduktion. Die naheliegende Vermutung, die transiente Änderung des Rezeptorpotenzials könne auf einen Mangel an Sehpigment zurückzuführen sein, konnte widerlegt werden (Minke, 1982). Rund zehn Jahre später konnte der Zusammenhang zwischen einem Calciumeinstrom und den TRP-Proteinen bewiesen werden, mit der Erkenntnis, dass es sich bei den TRP-Proteinen um Ionenkanäle handeln muss (Hardie & Minke, 1992). 1985 gelang es Montell ein DNA-

Fragment zu identifizieren und das TRP-Gen zu isolieren (Montell et al., 1985). Ein weiterer Meilenstein in der Entdeckung der TRP-Kanäle wurde im Jahr 1989 geliefert. Damals war es den Forschenden möglich, das TRP-Gen auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms zu lokalisieren (Wong et al., 1989) und das Gen für das TRP-Protein zu klonieren, wobei auch klar wurde, dass das TRP-Protein durchaus strukturelle Ähnlichkeit zu bereits entdeckten Ionenkanälen, die permeabel für Natrium und Calcium sind, aufweist (Zhu et al., 1996, Montell & Rubin, 1989). Das TRP-Protein konnte in diesem Zusammenhang als ein transmembranäres Protein, bestehend aus 1275 Aminosäuren, beschrieben werden (Montell & Rubin, 1989). Heute hat man verstanden, dass eine Spontanmutation im TRP-Gen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu einem dysfunktionalen Proteinprodukt führte, was wiederum den Abbruch des Calciumeinstroms bedingte und somit in einer transienten Änderung des Rezeptorpotenzials resultierte (Minke, 2010).

Den Unterfamilien der TRP-Superfamilie ist gemeinsam, dass sie aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), einer porenbildenden, rekursiv in der Plasmamembran verlaufenden Schleife zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6 sowie intrazellulären Amino (NH₂) - und Carboxyltermini (COOH) aufgebaut sind (Nilius, 2007). Sie unterscheiden sich in der Sequenz der DNA, die für die Gene der Proteine codiert, und damit einhergehend auch in der Aminosäuresequenz, die das Transmembranprotein aufbaut. Alle TRP-Kanäle sind durchlässig für Kationen. Die Valenz der Ionen, für die der Kanal permeabel ist, differenziert die Kanäle jedoch untereinander (Venkatachalam & Montell, 2007). So sind, bis auf TRPM4 und TRPM5, alle TRP-Kanäle für Calcium-Ionen (divalent) durchlässig. Durch die beiden genannten Kanäle können jedoch nur monovalente Ionen, wie beispielsweise Natrium-Ionen, diffundieren (Nilius, 2007).

4.3.2 TRPC-Kanäle

Da der Ionenkanal, der für diese Arbeit untersucht wurde zur Unterfamilie der TRPC-Kanäle gehört, soll dieser Untergruppierung im folgenden Kapitel besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Die Namensgebung der TRPC-Subfamilie kommt durch ihre sequenzielle Ähnlichkeit hinsichtlich des TRP-Gens der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zustande. Aufgrund der ausgeprägten Homologie zum TRP-Protein der Fruchtfliege steht das „C“ im Namen der Kanäle für classical oder canonical (klassisch) (Chen et al., 2020).

Die TRPC-Unterfamilie umfasst sieben Kanäle (TRPC1-7), welche aufgrund der Homologie ihrer Aminosäuresequenz und ihrer funktionellen Ähnlichkeit untereinander in vier Gruppen (TRPC1, TRPC4/5, TRPC3/6/7, TRPC2) untergliedert werden (Clapham et al., 2001). Dabei zeichnen sich die TRPC-Kanäle durch ein vielfältiges Vorkommen in tierischen und menschlichen Zellen aus (Wang et al., 2020). Die calciumpermeable Kanalfamilie wird über einen rezeptorvermittelten Signalweg, an den das Enzym Phospholipase C gekoppelt ist, aktiviert (Harteneck et al., 2000). Kontrovers wird diskutiert, ob die TRPC-Kanäle, auch sogenannte store-operated channels (SOCs) sein könnten. Das würde bedeuten, dass eine Depletion der intrazellulären Calciumspeicher mit einer Aktivierung der Kanäle und einem konsekutiven Calciumeinstrom in die Zelle einhergehen würde (Salido et al., 2009).

Bezüglich des Aufbaus des Ionenkanals finden sich in der Literatur viele Hinweise darauf, dass mehrere TRPC-Proteine homo- oder heteromere Komplexe bilden, wodurch die Kanalpore entsteht. Dabei werden verschiedene Kombinationen von Kanaluntereinheiten beschrieben (Strubing et al., 2003).

Im Folgenden werden die Mitglieder der TRPC-Familie kurz vorgestellt. TRPC3 wird als Gegenstand dieser Dissertation gesondert und umfangreich dargestellt.

TRPC1 ist ein Kanal mit sehr breitem Vorkommen, dessen Expression im ZNS, den Ovarien, den Hoden und im Herzen nachgewiesen werden konnte (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995). Der Expression im Herzen wurde unter anderem 2007 erneut Aufmerksamkeit geschenkt, als Forschende herausfanden, dass TRPC1 ein bedeutender Regler in der Entwicklung kardialer Hypertrophie ist (Ohba et al., 2007). In einer anderen Studie konnte TRPC1 als dehnungsaktivierter Ionenkanäle in Zellen von Wirbeltieren identifiziert werden (Maroto et al., 2005). Bei dieser Kanalform wird durch Dehnung der Durchmesser der Kanalpore erhöht, wodurch die Permeabilität für die entsprechenden Ionen steigt.

TRPC2 bildet beim Menschen eine Ausnahme, da es sich hierbei um ein Pseudogen handelt - aus dem zugrunde liegenden DNA-Anschnitt kann also kein funktionales Protein kodiert werden (Wang et al., 2020). Bei Nagetieren, wie beispielsweise Ratten oder Mäusen, dagegen konnte das TRPC2-Protein nachgewiesen werden (Liman et al., 1999). TRPC2 scheint eine tragende Rolle bei biologischen Vorgängen, wie der Wahrnehmung verschiedener Geschlechter über sensorische Aktivierung des Riechorgans zu spielen (Stowers et al., 2002). Aus der beeinträchtigten Erkennung von Pheromonen resultiert auch ein verändertes soziales Verhalten. Eine Studie konnte zeigen, dass TRPC2 bei Mäusen wichtig ist, um männliche Pheromone zu erkennen, die entscheidend sind im Hinblick auf Aggressivität und Wahl der Sexualpartner (Leypold et al., 2002). Überdies konnte auch ein Zusammenhang zwischen TRPC2 und der Akrosomenreaktion von Spermien nachgewiesen werden (Jungnickel et al., 2001). Bei besagter Reaktion verschmelzen Spermien- und Akrosomenmembran. Dadurch werden proteolytische Enzyme freigesetzt werden, die ein Eindringen des Spermiums in die Eizelle ermöglichen. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Befruchtung einer Eizelle (Ulfig & Brand-Saberi, 2017).

Auch **TRPC4** konnte bei Nagetieren in Knochen, Herz, Plazenta und Prostata nachgewiesen werden (Riccio et al., 2002). Weitere Nachweise des Kanals konnten für kortikolimbische Regionen des Gehirns (Fowler et al., 2007), Eierstöcke und Hoden, Niere, Nebenniere, Lunge und Kleinhirn erbracht werden (Garcia & Schilling, 1997). Ferner wird dem Kanal Bedeutung bei angemessenem angstbezogenem Verhalten zugesprochen. Experimente an Mäusen zeigten nach einer Ablation von TRPC4 eine Verringerung des Angstniveaus der angeborenen Angst (Riccio et al., 2014).

TRPC5 konnte unter anderem im zentralen Nervensystem von Nagetieren nachgewiesen werden (Fowler et al., 2007) und scheint auch im Rahmen von neuronalen Lernvorgängen und neuronaler Signalweiterleitung von Bedeutung zu sein (Bröker-Lai et al., 2017). Interessanterweise stellte sich heraus, dass TRPC5-Kanäle, indem sie als aortale Barorezeptoren fungieren, auch in den komplexen Regulationsmechanismen der Blutdruckstabilisierung involviert sind (Lau et al., 2016). Ergänzend dazu hat TRPC5 Bedeutung bei der endothelabhängigen Kontraktion der Arteriae carotis bei Mäusen (Liang et al., 2019). Sowohl die Blutdruckregulation als auch die Funktionsfähigkeit des Gefäßendothels fallen bei der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten ins Gewicht.

TRPC6 konnte im menschlichen Skelettmuskel sowohl bei Formalin- als auch bei NEP-fixierten Körperspender*innen nachgewiesen werden (Servello, 2021) und wird ähnlich wie TRPC4 im Gehirn, in plazentarem Gewebe, Herz, Lunge, Pankreas und Niere exprimiert. Dies konnte in einer Arbeit gezeigt werden, die humane mRNA untersuchte (Riccio et al., 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Expression von TRPC6 im Gehirn von Ratten in Regionen, wie der Substantia nigra und dem Hippocampus hervorheben (Chung et al., 2006; Giampà et al., 2007). Ferner konnte gezeigt werden, dass TRPC6 an der Genese hereditärer Erkrankungen beteiligt ist und Mutationen von TRPC6 konnten als Ursache für die fokal-segmentale Glomerulosklerose beschrieben werden. Diese Erkrankung der Niere kann im

Erwachsenenalter zu einem nephrotischen Syndrom, einhergehend mit Proteinurie, Hypalbuminämie und Ödemen, führen. In den meisten Fällen resultiert diese Glomerulopathie unweigerlich im Nierenversagen (Winn et al., 2005).

TRPC7 konnte mittels cDNA-Untersuchungen in humanem Gewebe von Niere und Gehirn, insbesondere der Hypophyse detektiert werden (Riccio et al., 2002). Bei Mäusen wurden hohe Expressionsraten des Proteins in Augen, Herz und Lunge dokumentiert. In anderen Organen, wie beispielsweise Milz und Hoden konnte ebenfalls ein Nachweis über das Vorkommen erbracht werden. Hier fiel die Expressionsrate jedoch geringer aus (Okada et al., 1999; Wang et al., 2020).

4.3.3 TRPC3-Kanäle

Bis auf TRPC3 wurden in den vorrausgehenden Abschnitten alle der TRPC-Subfamilie angehörigen, Kanäle vorgestellt. In diesem Kapitel geht es nun explizit und ausführlich um TRPC3, den Forschungsgegenstand dieser Arbeit.

4.3.3.1 Aufbau

Durch kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen von TRPC3, mit einer Auflösung von 3,3 Å (Ångström), konnten zahlreiche erkenntnisbringende Informationen gewonnen werden, die auch heute noch für ein besseres Verständnis des Proteins und seiner Funktionen sorgen (Fan et al., 2018).

TRPC3 ist grundlegend betrachtet ein transmembranäres Protein. Die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, die dieses Protein aufbaut, besteht aus 836 Aminosäuren. Durch Wechselwirkungen zwischen den Peptidketten der Aminosäuren entsteht die Sekundärstruktur, im Fall von TRPC3, eine reine α -Helix (Fan et al., 2018). Innerhalb des Proteins lagern sich die Sekundärstrukturen, bedingt durch diverse Wechselwirkungen der Seitenketten der Aminosäuren untereinander, zur Tertiärstruktur zusammen. Dabei spielen Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte, Disulfidbrücken, aber auch Ionenbindungen eine Rolle. Formen schließlich mehrere Untereinheiten ein Protein, so spricht man von der Quartärstruktur dieses Proteins. TRPC3 ist – wie alle Vertreter der TRPC-Subfamilie – aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) aufgebaut. Dabei ist zu differenzieren, dass die S3-Helix fast doppelt so lang ist, wie bei anderen Vertretern der TRPC-Familie, beispielsweise TRPC4 und TRPC5. Vier TRPC-Proteine lagern sich schließlich zu einem Tetramer zusammen und bilden den Ionenkanal (Fan et al., 2018).

Betrachtet man die Struktur von TRPC3 zunächst vom N-Terminus in Richtung des C-Terminus, fallen als erstes Ankyrin-Repeat-Strukturen ins Auge. Dabei umfasst eine Ankyrin-Repeat-Domäne (ARD) vier Ankyrin-Repeat-Paare. Ankyrine sind als Proteine Bestandteil des

Zytoskeletts und bestehen aus einer sich wiederholenden Abfolge von Aminosäuren, was auch zu ihrer Namensgebung beigetragen hat. Sie sind essentiell an der Aufrechterhaltung der Struktur von TRPC3 beteiligt, denn eine Studie konnte zeigen, dass TRPC3 bei einer Deletion der Ankyrin-Repeat-Struktur intrazellulär akkumuliert (Wedel et al., 2003). Auf die ARD folgen neun Linker-Domänen (LD), die das Verbindungsstück zwischen ARD und den Transmembrandomänen (TMD) herstellen. Vor der S1-Transmembrandomäne, aber schon in der Zellmembran, befindet sich eine prä-S1-Domäne, die - an einen Ellenbogen erinnernd - Teil einer Lipidbindungsstelle (Lipid1) ist. Sie besteht aus zwei Helices, die nur zu Hälfte in der Membran eingelagert sind (half transmembrane helices, half TM1/half TM2). Dabei steht half TM1 in Verbindung mit der neunten Linker-Domäne, half TM2 stellt über besagte prä-S1-Domäne Verbindung mit der S1-Domäne her. Nun folgen die sechs Transmembrandomänen, die jeweils über Linker (Verbindungsstücke) konnektiert sind, welche sich außerhalb der Zellmembran befinden. Zwischen S1 und S2 konnte eine Glykosylierungsstelle identifiziert werden. Diese steht in enger struktureller Nachbarschaft zur P-loop, was laut Fan et al. darauf hindeuten könnte, dass dadurch die Aktivität des Kanals beeinflusst werden kann (Fan et al., 2018). Die lange S3-Helix ist zusätzlich mit einer verhältnismäßig großen, extrazellulär verlaufenden Schleife an die S4-Helix angebunden. Zwischen S5 und S6 befindet sich die Poren-Domäne, die P-loop. In Richtung C-Terminus schließen sich an die S6-Domäne noch die TRP-Domäne an, sowie die C-terminale Domäne (CTD), welche aus zwei Segmenten besteht, die im 90°-Winkel zueinanderstehen. Interessanterweise enden die Ankyrin-Wiederholungen des N-Terminus an der Stelle der intrazellulären Domäne, an der auch bei der CTD die Schnittstelle zwischen den beiden Segmenten ist (Fan et al., 2018). Diese Domänen werden auch als coiled-coil bezeichnet. Ein Begriff der eine lineare, dreidimensionale Struktur beschreibt, bei der sich mindestens zwei Einzelhelices erneut umeinanderwinden und so eine Helix mit größerem Radius bilden (Pauling & Corey, 1953). Eine ähnliche Struktur konnte auch bei TRPM4 und TRPM8 nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde auch die

Vermutung geäußert, diese Domänen könnten als Ligandenbindungsstellen von Nutzen sein (Winkler et al., 2017; Yin et al., 2018).

Die namensgebende Struktur – die TRP-Domäne – schließt sich, wie bereits erwähnt, an die S6-Domäne an. Diese Domäne besteht strukturell aus zwei Helices. Die erste Helix (TRP helix) windet sich an der intrazellulären Seite parallel zur Zellmembran entlang, die zweite Helix (TRP re-entrant helix) verläuft, wie der Name schon sagt, zurück in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Die TRP-Helix steht dabei in nahem Kontakt zu dem S4-S5-Linker und der Lipidbindungsstelle 1 (lipid 1) (Fan et al., 2018). In diesem Bereich des Proteins sind auch die EWKFAR-Sequenz und eine hochkonservierte prolinreiche Aminosäuresequenz lokalisiert, welche gemeinsam die TRP-Box bilden. Des Weiteren scheint auch eine Bindungsstelle für Calmodulin oder IP₃, die CRIB(calmodulin/IP₃ receptor binding)-Domäne an dieser Stelle verortet zu sein (Vazquez, Wedel, Aziz, et al., 2004).

Die Ionenpore von TRPC3 dient nicht nur als Tor für Kationen, sondern sie stellt gleichzeitig auch eine Art Selektivitätsfilter dar. Die Reste der Aminosäuren der P-loop und des extrazellulären Endes von S6 generieren ein negatives elektrostatisches Umfeld, welches als Filtersystem für Kationen wirkt. Auch intrazellulär wird ein ähnlicher Mechanismus fortgesetzt, denn Reste der Aminosäuren der C-terminalen Domäne (CTD) und ARD halten diese negative Partialladung aufrecht, wodurch die Kationen in das Zytoplasma weitergeleitet werden (Fan et al., 2018).

Bei der Analyse von TRPC3 konnten neben dem generellen Aufbau des Proteins auch besondere strukturelle Merkmale identifiziert werden, wie beispielsweise die zuvor erwähnten Lipidbindestellen (lipid-binding site, lipid 1/lipid 2) an der intrazellulären Seite und eine extrazelluläre Domäne (extracellular domain, ECD) zwischen den Verbindungsstücken der Transmembrandomänen (Fan et al., 2018). Formgebende Komponente einer der Lipidbindungsstellen (lipid 1) stellt die prä-S1-Domäne dar, welche eine kurze, horizontal an

der Innenseite der Zellmembran verlaufenden α -Helix ist. Durch Zug der prä-S1-Domäne an S1 bildet sich zwischen half TM1, der prä-S1-Helix und S1 eine hydrophobe Tasche. Diese dezente Änderung der räumlichen Struktur impliziert auch die Interaktion der Lipidbindungsstelle mit S4 und dem S4-S5-Linker, denn auch diese strukturellen Bestandteile sind an der Bindung des Lipids beteiligt. Es wird vermutet, dass diese Lipidbindungsstelle eine wichtige Funktion im Hinblick auf die Aktivierung des Kanals hat (Fan et al., 2018). Eine zweite Lipidbindungsstelle (lipid 2) konnte zwischen der P-loop und S6 nachgewiesen werden. Diese bildet eine Vielzahl von hydrophoben Wechselwirkungen mit der Poren-Domäne aus und spielt daher vermutlich eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Struktur dieser. Eine weitere Besonderheit stellt die lange S3-Domäne dar, die sich in den Extrazellularraum streckt und Teil der Extrazellulardomäne (ECD) ist. Darüber hinaus sind noch der S1-S2-Linker und der S3-S4-Linker an der Formgebung dieser Domäne, die nah an der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran liegt, beteiligt. Fan et al. nahmen 2018 an, dass es sich bei der ECD um einen Sensor für externe Stimuli, welche die Funktion des Kanals beeinflussen, handeln könnte (Fan et al., 2018).

Die folgende Abbildung veranschaulicht die Struktur von TRPC3:

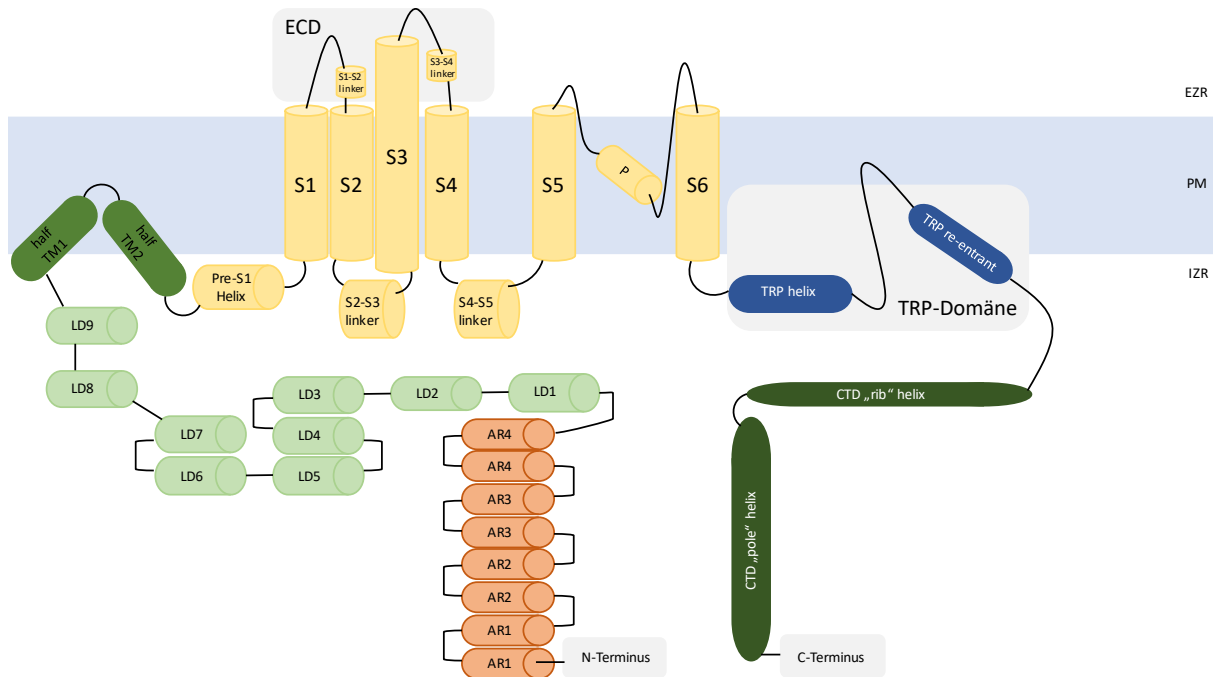


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von TRPC3

Anmerkung: Eine ausführliche Erläuterung der Grafik ist den vorausgehenden Textabschnitten zu entnehmen. EZR = Extrazellulärraum, PM = Plasmamembran, IZR = Intrazellulärraum, ECD = Extrazellulärdomäne, AR1-4 = Ankyrin-Repeat-Domäne 1-4, LD1-9 = Linker-Domäne 1-9, half TM1 und half TM2 bilden den pre-S1-elbow (prä-S1-Ellenbogen), S1-6 = Transmembrandomäne 1-6, P = Poren-Domäne, CTD = C-terminale Domäne

4.3.3.2 Vorkommen

Mittlerweile konnte bereits ein vielfältiges Vorkommen von TRPC3 bestätigt werden.

Bei Nagetieren wie Ratten und Mäusen konnte TRPC3 beispielsweise in Niere, Herz (Goel, Sinkins, et al., 2007; Goel, Zuo, et al., 2007) und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Hartmann et al., 2008) nachgewiesen werden.

Bei Versuchen mit humaner cDNA erfolgte der Nachweis von TRPC3 in zahlreichen Organen. Zu den Organen, in denen TRPC3 nachgewiesen werden konnte, zählen Gehirn, Ovarien, Kolon, Lunge, Prostata, Plazenta, Hoden und Dünndarm. Interessanterweise überstieg dabei die im Gehirn nachgewiesene Expression jene der untersuchten peripheren Organe (Zhu et al., 1996). 2002 ergänzten weitere Untersuchungen diesen Sachverhalt, wobei mRNA mittels Northern Blot untersucht wurde. Hierbei konnte eine Expression von TRPC3 in Herz, Muskelgewebe, Milz, Pankreas, Fettgewebe und Magen dargelegt werden (Riccio et al., 2002). Auch im hepatobiliären System konnte die Genexpression von TRPC3 über RNA-Analysen schon nachgewiesen werden (Jang et al., 2012; Riccio et al., 2002).

Bei einer genaueren Untersuchung des Vorkommens von TRPC3 im zentralen Nervensystem wurde erneut bestätigt, dass TRPC3 im zentralen Nervensystem stärker als in peripherem Gewebe exprimiert wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch innerhalb des zentralen Nervensystems Unterschiede bezüglich der Expressionsquantität bestehen. Eine besonders starke Expression konnte in Hypophyse, Kleinhirn, Nucleus caudatus und Putamen detektiert werden (Riccio et al., 2002). Wenige Jahre später konnte ergänzend dazu gezeigt werden, dass TRPC3 bei Mäusen innerhalb des Kleinhirns von Purkinje-Zellen exprimiert wird (Hartmann et al., 2008).

4.3.3.3 Funktion, Signaltransduktion und Regulation

Um ihre Funktion als Ionenkanäle zu erfüllen und somit Bestandteil der Signaltransduktionsprozesse zu sein, bilden TRPC3-Proteine Tetramere, was bedeutet, dass sich vier Untereinheiten zu einem Ionenkanal zusammenlagern. Dabei bilden entweder vier TRPC3-Untereinheiten ein Homomer oder TRPC3 bildet mit TRPC6 und/oder TRPC7 ein Heteromer. Wie bereits eingangs erwähnt, bilden diese drei Proteine innerhalb der TRPC-Subfamilie eine Untergruppe. Dies ist zurückzuführen auf die 70-80%ige Übereinstimmung der Aminosäuren, die sie aufbauen und die Aktivierung durch DAG (Diacylglycerin), die den Proteinen gemeinsam ist (Hofmann et al., 1999). Die nicht-selektiven Kationenkanäle zeichnen sich durch eine besonders gute Permeabilität für das bivalente Ion Calcium aus, weisen aber auch eine, wenngleich geringere, Permeabilität für monovalente Kationen auf (Hofmann et al., 1999).

In den folgenden Abschnitten soll nun auf die Signaltransduktionskaskade, in welche TRPC3 eingebunden ist, eingegangen werden, wie auch auf die Regulation von TRPC3. Grundsätzlich kann TRPC3 über Rezeptoren aktiviert werden, man spricht in diesem Fall von rezeptorgesteuertem Calcium-Einstrom (receptor operated calcium entry, ROCE). Ein weiterer Mechanismus, durch den TRPC3 aktiviert wird, ist wahrscheinlich die Depletion interner Calcium-Speicher. Kanäle, die auf diese Art aktiviert werden, nennt man speicherabhängige Kanäle (store-operated channel, SOC). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von store-operated calcium entry (SOCE) oder kapazitivem Calciumeinstrom (capacitative calcium entry, CCE). Eine Zuordnung von TRPC3 zu SOCE wird seit mehreren Jahren kontrovers diskutiert und die Rolle von TRPC3 ist hierbei noch nicht vollständig aufgeklärt (Wang et al., 2020).

TRPC3 kann laut aktuellem Stand der Wissenschaft hinsichtlich seiner Funktion als ROCE über verschiedene Metabolite aktiviert werden. Einer dieser aktivierenden Wege, über welchen wissenschaftlicher Konsens besteht, sind $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

(Dietrich et al., 2005). Die Signalkaskade, welche einer Aktivierung der GPCRs nachgeht, ist folgendermaßen: Das heterotrimere $G_{q/11}$ -Protein, welches aus den drei Untereinheiten α , β und γ besteht, ist von intrazellulärer Seite an den Rezeptor gebunden. Bindet nun ein Ligand von extrazellulärer Seite an den Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung dessen, wodurch die Untereinheiten des G-Proteins dissoziieren und ihrerseits Signalmoleküle aktivieren. Die α -Untereinheit aktiviert dabei die Phospholipase C β (PLC β). Durch die PLC β wiederum wird das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG) gespalten. Bei beiden Spaltprodukten handelt es sich um Second Messenger, welche konsekutiv andere Stoffe aktivieren können. Das hydrophile IP $_3$ diffundiert in Richtung endoplasmatisches Retikulum (ER), an dessen Membran es über den IP $_3$ -Rezeptor und durch einen IP $_3$ -gekoppelten Ionenkanal Calcium aus dem ER in das Zytosol freilässt. Folglich steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration an. DAG dagegen ist lipophil und verbleibt an der Zellmembran. Es aktiviert vermutlich über einen direkten Mechanismus das in der Zellmembran gelegene TRPC3 (Trebak et al., 2003). Unterschiedliche Stellen dieser Transduktionskaskade können in regulatorischem Sinn beeinflusst werden (Pape et al., 2019). Ein weiterer, allerdings sehr ähnlicher Mechanismus der Aktivierung von TRPC3 läuft über Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen, welche wiederum an eine Phospholipase C, in diesem Fall die Phospholipase C γ (PLC γ) gekoppelt sind. Nach der Aktivierung der PLC γ entspricht die Signaltransduktion den zuvor beschriebenen Mechanismen (Chen et al., 2020).

Des Weiteren scheinen Tyrosinkinasen, insbesondere die Tyrosinkinase Src, obligatorisch für die Rezeptor- und DAG-abhängige Funktion von TRPC3 zu sein. In Zellkulturen konnte die Rezeptor- oder DAG-abhängige Aktivierung von TRPC3 durch Inhibition der Tyrosinkinase Scr aufgehoben werden und auch in Zelllinien, in denen die Expression jener Tyrosinkinase gehemmt wurde, war eine Stimulation von TRPC3 nicht mehr möglich (Vazquez, Wedel, Kawasaki, et al., 2004).

Allerdings ist TRPC3 nicht nur in Anwesenheit von DAG aktivierbar. Wie bereits eingangs erwähnt, ist ein weiteres wichtiges Thema rund um die TRPC-Kanäle deren Assoziation bzw. Zuordnung zur Gruppe der store-operated channels (SOCs). Das Besondere am Mechanismus des SOCE ist, dass die Kanäle nicht durch Agonisten aktiviert werden müssen, sondern eine Entleerung interner Calciumspeicher für eine Aktivierung ausreichend ist. Dieser Mechanismus ist sinnvoll, da auf diese Weise die Calciumspeicher, die in viele Signaltransduktionsprozesse involviert sind, wieder aufgefüllt werden können. Der Mechanismus, der diesem Prozess zugrunde liegt, soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

Kommt es zu einer Depletion interner Calcium-Speicher, beispielsweise durch IP₃-vermittelten Calciumausstrom aus dem ER, kann über EF-Hände von STIM-Proteinen (stromal interaction molecule, STIM), welche in der Plasmamembran des ER lokalisiert sind, die Calcium-Konzentration innerhalb des ER gemessen werden. Es sind zwei humane STIM-Proteine bekannt (STIM1 und STIM2). Diese sind durch eine N-terminale Domäne, welche in das Lumen des ER ragt, und eine C-terminale Domäne, welche in das Zytoplasma reicht, gekennzeichnet. Ist die Calcium-Konzentration, welche durch die STIM-Proteine gemessen wurde, zu niedrig, oligomerisieren die STIM-Proteine, wodurch über Protein-Protein-Interaktionen wiederum ORAI-Kanäle aktiviert werden. Diese, aus ORAI-Proteinen aufgebauten, Kanäle werden auch als I_{CRAC} (calcium release activated calcium currents) bezeichnet. Sie sind in der Zellmembran gelegen und ermöglichen einen Calciumeinstrom in die Zelle (Soboloff et al., 2012).

Es scheint, als sei die Zuordnung von TRPC3 zu SOCE und ROCE nicht nur von dem Protein selbst, sondern auch von anderen Faktoren abhängig. Denn die Studienlage zu dieser Thematik zeigt teilweise ambivalente Ergebnisse. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass TRPC3 in einer Zelllinie von HEK293-Zellen (human embryonic kidney 293-cells, HEK 293-cell) nicht über die Erschöpfung von Calcium-Speichern aktiviert werden konnte (Zhu et al., 1998). In

einer weiteren Untersuchung, bei der mit B-Lymphozyten von Hühnern gearbeitet wurde und die internen Calcium-Speicher mittels Thapsigargin leer gehalten wurden, konnte TRPC3 allerdings durch diesen Umstand aktiviert werden (Vazquez et al., 2001). Im Jahr 2015 konnte auch eine Interaktion zwischen TRPC-Kanälen und STIM1 nachgewiesen werden, was die Theorie von TRPC3 als SOCE untermauert (Asanov et al., 2015).

Eine Zuordnung der Kanäle ausschließlich zu einer Kategorie der SOCE oder ROCE scheint nach jetzigem Kenntnisstand nicht möglich und würde vermutlich den umfangreichen Mechanismen der Funktionalität und Regulationsmechanismen der Kanäle nicht gerecht werden. Für weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet bedarf es zusätzlicher Forschungsarbeit.

Der letzte Abschnitt dieses Kapitels erläutert die Möglichkeiten der Hemmung von TRPC3. Zu den Inhibitoren von TRPC3 zählen beispielsweise Pyrazol-Verbindungen. Eine Arbeit aus dem Jahr 2009 konnte zeigen, dass durch direkten Einfluss der Pyrazol-Verbindung Pyr3 der TRPC3-vermittelte Calcium-Einstrom in HEK293-Zellen (human embryonic kidney, HEK) selektiv gehemmt werden konnte (Kiyonaka et al., 2009). Ein in der Zellbiologie weitreichend bekannter Mechanismus der Regulation von Proteinen ist deren Phosphorylierung/Dephosphorylierung durch Kinasen. Auch für TRPC3 konnte ein solcher Regulationsmechanismus nachgewiesen werden. Wird TRPC3 mit PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), einem Aktivator der Proteinkinase C (PKC), inkubiert, konnte TRPC3 anschließend nicht mehr aktiviert werden, was auf eine Inaktivität des Proteins im phosphorylierten Zustand deutet (Trebak et al., 2005). Auch die Proteinkinase G (PKG) kann über Phosphorylierungsvorgänge an den Aminosäure-Resten Threonin (Thr-11) und Serin (Ser-263) die Aktivität von TRPC3 negativ beeinflussen (Kwan et al., 2004).

Folgendes Schema illustriert die einzelnen Schritte der Signaltransduktionskaskade, welche im vorausgegangenen Absatz dargelegt wurden.

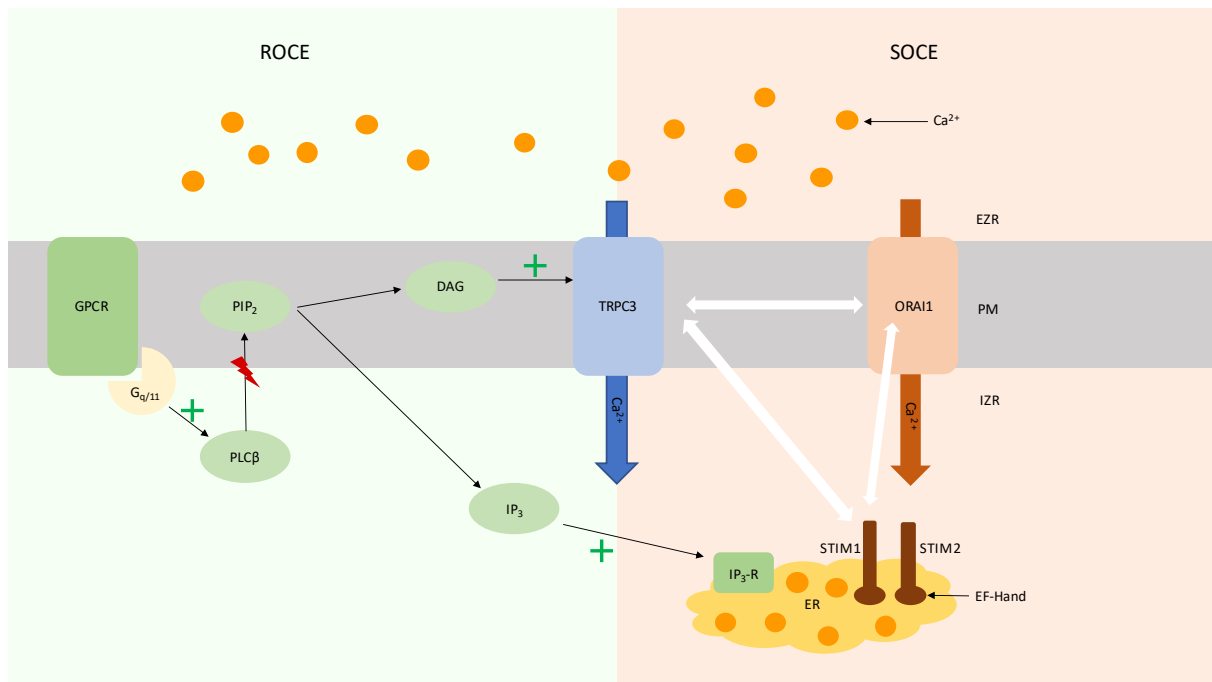


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von TRPC3

Anmerkung: Eine detaillierte Beschreibung der Prozesse der Signaltransduktion, in die TRPC3 eingebunden ist, sind dem vorausgehenden Text zu entnehmen. ROCE = Rezeptor-gesteuerter Calcium-Einstrom, SOCE = Speicher-gesteuerter Calcium-Einstrom, GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor, G_{q/11} = G-Protein q/11, PLCβ = Phospholipase Cβ, PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, DAG = Diacylglycerin, IP₃ = Inositol-1,4,5-triphosphat, IP₃-R = Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor, ER = Endoplasmatisches Retikulum, STIM1 und STIM2 = stromal interaction molecule 1 und 2, EZR = Extrazellulärraum, PM = Plasmamembran, IZR = Intrazellulärraum, ORAI1 = calcium release-activated calcium channel protein 1, grünes Plus = Aktivierung, roter Blitz = Spaltung, weißer Pfeil = Interaktion

4.3.3.4 Relation zu Krankheiten/pathologischen Prozessen

So vielseitig wie das Vorkommen von TRPC3, ist auch die bis jetzt bekannte Relation zu Krankheiten oder pathologischen Prozessen. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über diese Thematik geben.

Die idiopathische pulmonale Hypertonie ist eine Erkrankung, bei der durch eine andauernde Drucksteigerung im Lungenkreislauf eine Zunahme der rechtsventrikulären Nachlast verursacht wird. Dadurch werden Umbauprozesse im Herzen bewirkt, die die Dilatation und Hypertrophie des rechten Ventrikels zur Folge haben. Dieser Zustand des Herzens wird auch als Cor pulmonale bezeichnet. In einer Arbeit um Yu konnte eine erhöhte Expression von TRPC3 und TRPC6 in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien bei Patient*innen mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden. Bei normotensiven Patient*innen oder Patient*innen mit einer pulmonalen Hypertonie auf Basis einer anderen Grunderkrankung (sekundäre pulmonale Hypertonie) konnte dies nicht gezeigt werden (Yu et al., 2004).

Eine weitere Erkrankung, bei der eine Beteiligung von TRPC3 plausibel scheint, ist die spinocerebelläre Ataxie. Sie ist eine Form der hereditären Ataxien und entsteht in den meisten Fällen durch Trinukleotid-Repeat-Mutationen mit einer Wiederholung des Basentriplets CAG. Diese Störung der Bewegungskoordination manifestiert sich meist im 30. - 40. Lebensjahr (Hufschmidt et al., 2017). Im Jahr 2009 wurden Untersuchungen an Mäusen mit zerebellärer Ataxie (moonwalker, Mwk) durchgeführt, die Bewegungs- und Koordinationsdefekte zeigten. Bei diesen Mäusen konnte eine Punktmutation des TRPC3-Kanals (moonwalker mutation, Mwk) nachgewiesen werden, die eine abnormale Öffnung von TRPC3 zur Folge hatte. Darüber hinaus zeigten die Mäuse Defekte bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Purkinje-Zellen (Becker et al., 2009). Purkinje-Zellen sind inhibitorische Neurone der Kleinhirnrinde und stellen die einzigen efferenten Nervenfasern der Kleinhirnrinde dar.

Sie sind aufgrund ihrer hemmenden Funktion wesentlich an der Abstimmung von Bewegungsabläufen beteiligt (Wennemuth, 2017).

Auch bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie scheint eine Beteiligung von TRPC3 plausibel. Die kardiale Hypertrophie (auch hypertrophe Kardiomyopathie) ist eine Verdickung eines oder beider Ventrikel als Reaktion auf eine Druck- oder Volumenbelastung des Herzens. An diesen Umbauprozessen ist das Hormon Angiotensin II beteiligt, welches als Komponente des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks beiträgt. In einer Untersuchung konnte eine Korrelation zwischen der Aktivität von TRPC3, TRPC6 und den Angiotensin II-vermittelten Umbauprozessen bewiesen werden (Onohara et al., 2006). In einem vorausgehenden Abschnitt dieser Arbeit wurden Pyrazol-Verbindungen schon als Inhibitoren von TRPC3 thematisiert. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass die in der Studie verwendete Pyrazol-Verbindung Pyr3 auch einen hemmenden Effekt auf die Hypertrophie des Herzens zu haben scheint. Dafür wurde Mäusen durch einen operativen Eingriff der linke Ausflusstrakt künstlich verengt, was zu einer Volumenbelastung des Herzens führte und in kardialer Hypertrophie resultierte. Die Hypertrophie des Herzens und der Anstieg der ANP-mRNA konnten durch die angewendete Pyrazol-Verbindung reduziert werden (Kiyonaka et al., 2009).

Ein anderes Thema, in welches TRPC3 involviert zu sein scheint, ist Krebs. Eine im Jahr 2009 erschienene Arbeit geht von einer Entwicklungsrolle von TRPC3 bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms aus. Gezeigt werden konnte, dass bei Proben von humanen Ovarialkarzinomen TRPC3 erhöht exprimiert wurde und eine Runterregulierung des Proteins zu einer verminderten Proliferation und Ausbildung des Tumorgewebes führte (Yang et al., 2009). Auch für das eng strukturverwandte Protein TRPC6 konnten bereits Zusammenhänge zu kanzerogen Prozessen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die

Expressionsrate von TRPC6 in Gewebeproben des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich höher war (Wen et al., 2016).

Eine relativ aktuelle Arbeit legt dar, dass TRPC3 im Rahmen der mitochondrialen Calciumhomöostase in Zusammenhang mit der Zellseneszenz von Fibroblasten zu stehen scheint (Farfariello et al., 2022). Die Seneszenz beschreibt einen Zustand, in dem Zellen sich nicht weiter teilen und die Zellproliferation somit zum Erliegen kommt, was Grundlage für die Sterblichkeit einer Zelle ist. In der genannten Arbeit wurde die Theorie aufgegriffen, dass Veränderungen im mitochondrialen Stoffwechsel als Auslöser für Seneszenz fungieren könnten. Farfariello et al. konnten zeigen, dass TRPC3 im Rahmen des mitochondrialen Calcium-Stoffwechsels, vermittelt über die IP_3 -vermittelte Calcium-Freisetzung, als negativer Regulator der Seneszenz dient. Bei einer induzierten Seneszenz konnte – unabhängig vom Auslöser der Seneszenz – eine Runterregulierung von TRPC3 nachgewiesen werden. Hierdurch konnte eine Zunahme proinflammatorischer Prozesse und eine vermehrte Proliferation von Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine Hochregulierung der Expression von TRPC3 ging allerdings mit einer verringerten mitochondrialen Calciumbelastung und einem Abweichen von der seneszenten Zelllaufbahn einher (Farfariello et al., 2022).

Darüber hinaus scheint TRPC3 im Rahmen endothelialer Dysfunktion an der Genese vaskulärer und insbesondere kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt zu sein (Smedlund & Vazquez, 2008). Die Entstehung von Atherosklerose ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Mediatoren und Faktoren. Unter anderem durch die Ansammlung und Ablagerung von Monozyten werden Gefäßinnenwände geschädigt, sodass es zu chronischen Entzündungsprozessen kommt. TRPC3 scheint eine wichtige Rolle in diesem pathophysiologischen Vorgang zu spielen. Für Endothelzellen von Koronararterien (human coronary artery endothelial cells, HCAECs) konnte gezeigt werden, dass die Expression des Zelladhäsionsmoleküls vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), welches eine wichtige

Rolle in der Leukozytenadhäsion spielt, TRPC3-abhängig ist. Bei einer Blockade des Einstroms extrazellulären Calciums, beispielsweise durch Kanalblocker, kam es zu einer merklichen Reduktion der ATP-induzierten VCAM-1-vermittelten Adhäsion von Monozyten. Passend dazu ging eine Hochregulation von VCAM-1 mit einem erhöhten Calcium-Einstrom über eine vermehrte Expression von TRPC3 einher und bei einer Runterregulation von TRPC3 kam es erwartungsgemäß zu einer verminderten Adhäsion von Monozyten (Smedlund & Vazquez, 2008). Eine direkte oder indirekte Runterregulation von TRPC3 könnte nach entsprechender Forschungsarbeit pharmakologisch von Nutzen sein, um in den Prozess der Atherogenese einzugreifen.

Für diese Arbeit hochrelevant ist auch die Beteiligung von TRPC3 an der Entstehung einer Steatosis hepatis bei Mäusen. Dafür wurden Mäuse mit einem gain-of-function für TRPC3 im Vergleich mit nicht-transgenen Mäusen untersucht. Beide Gruppen wurden einer fettreichen Diät unterzogen. Es zeigte sich, dass bei den transgenen Mäusen schon in einem frühen Stadium der Atherosklerose Leberschäden wie Verfettung, Fibrose und eine Erhöhung der Leberenzyme nachweisbar waren (Smedlund et al., 2016). TRPC3 scheint also direkt oder indirekt Einfluss auf die Entstehung einer Steatosis hepatis zu haben. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2015 kam zu dem Schluss, dass die NAFLD (nichtalkoholische Fettlebererkrankung), welche einer NASH (nichtalkoholische Steatohepatitis) vorausgehen kann, das Risiko für Atherosklerose und koronare Herzkrankheit erhöht (Ampuero et al., 2015). TRPC3 scheint also unter anderem in den umfangreichen pathologischen Prozess des Zusammenhanges zwischen NAFLD/NASH (nichtalkoholische Fettlebererkrankung/nichtalkoholische Steatohepatitis) und Atherosklerose eingebunden zu sein. Inwiefern diese Erkenntnis genutzt werden kann, vermag in der Zukunft geklärt werden können.

4.4 Fragestellungen der Arbeit

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln auf die grundlegenden Aspekte dieser Arbeit eingegangen wurde, wird in diesem Abschnitt dargestellt, welche Fragen mit der Durchführung dieser Studie geklärt werden sollen.

Bisher wurde der TRPC3-Kanal in verschiedenen Geweben nachgewiesen, der bisherige wissenschaftliche Stand deutet also, neben der Involvierung in pathologische Prozesse, auf eine weitreichende Expression von TRPC3. Eine erste Arbeit konnte den immunhistochemischen Nachweis für TRPC3-Kanal in postmortalen Gewebeproben der Niere des Menschen erbringen (Coline Diebolt, 2023).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings noch kein direkter Nachweis des Proteins in Leber und Gallenblase erfolgt. Daher soll diese Arbeit auf folgende Fragen Antworten liefern:

- Ist TRPC3 in humanen Gewebeproben der Leber und Gallenblase, welche NEP-fixierten Körperspender*innen entnommen wurden, mittels immunhistochemischer Methodik nachweisbar?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Expression von TRPC3 zwischen Leber und Gallenblase?

In den nächsten Kapiteln dieser Dissertation soll auf das Vorgehen und die verwendeten Materialien des praktischen Teils eingegangen werden.

5 Material und Methodik

Für den praktischen Teil dieser Arbeit, der in den Prosektursälen und dem Labor des Anatomischen Institutes stattfand, wurden eine Reihe von Chemikalien, Materialien und Geräten verwendet. In der Beschreibung der Methodik dieser Studie werden diese erwähnt und sind für ein besseres Verständnis des folgenden Abschnittes hier aufgelistet.

5.1 Material und Geräte

5.1.1 Chemikalien

Die folgende Tabelle ist eine alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie deren jeweiliger Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	Ref.: 700212, Zentr.ChL
Citratpuffer pH 6	Ref.: ab93678, Abcam, Cambridge, Großbritannien
Eosin 0,1%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Eisessig (Essigsäure)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5 -3,7%	Ref.: 27244 Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ImmPACT DAB EqV	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Bestellnummer: SK-4103)
Methylbenzoat 99%	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
NEP-Lösung nach Weigner	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
PBS-Pulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Roti®-Plast Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®fair PBS 7.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 35%	Ref.: 8683.4, Zentr.ChL
Xylol	ZCHL, Universität des Saarlandes, Campus Saarbrücken, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

5.1.2 Verbrauchsmaterial

Die folgende Tabelle ist eine alphabetische Auflistung der Verbrauchsmaterialien sowie deren jeweilige Hersteller.

Material	Hersteller
1,5 ml Reagiergefäße	Ref.: 703224, Zentr. ChL
ACU-Punch®Biopsie-Stanze 8/10mm	Acuderm inc., Fort Lauderdale, USA
Ausgießförmchen	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland
DakoPen, Delimiting Pen	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
Deckgläser 22x22mm / 24x50mm	Zentralmagazin, Universitätsklinikum des Saarlandes, Deutschland
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	MilliQ Reference A+, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Einbettkassetten Macro, weiß	Ref.: M512, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Einbettringe	Ref.: M460, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Filtrierpapiere	Ref.: 534018, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
Histologischer Kleber Roti-Histokitt®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen DB80	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland

Objektträger Microscope Slides	Ref.: 1110022A Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1 – 10µl 20 – 200µl 100 – 1000µl	VWR International, Pennsylvania, USA
PROLENE 1,0 Nahtmaterial	Ethicon US LLC, Cincinnati, USA
Sterile Skalpellklingen Nr. 22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	Ref.: J1800ARLX R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

5.1.3 Geräte

Im Folgenden sind die verwendeten Geräte und deren Hersteller in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Gerätename	Hersteller
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano-em, Zentr. ChL
GFL-Paraffinbad 1052	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Karussell Gewebeeinbeter (Automatic Tissue Processor MTP)	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlanlage für Körperspender*innen	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Kühlplatte MPS/C	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Labor-Abzugshaube Captair®Flex® M321	Erlab®group, Val-de-Reuil Cedex, Frankreich
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Microm RM 2025	Heidelberg Instruments, Heidelberg, Deutschland

Nikon ECLIPSE E200 LED Fotomikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Paraffin Ausgießstation MPS/P1	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin-Dispenser	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Pipette	VWR International, Pennsylvania, USA
Vortex Mixer (Vortexer)	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Wärmeplatte	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wärmeschrank	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Geräte

5.1.4 Substanzen für die Immunhistochemie

Folgende Tabelle listet die Substanzen, die ausschließlich für die immunhistochemische Färbung benötigt wurden.

Verwendeter Antikörper	Hersteller
Kaninchenserum	Ref.: A10547; Life Technologies AG, Carlsbad, USA
Kontrollpeptid für den Spezifitätsnachweis (TRPC3 Blocking Peptide)	Ref.: BLP-CC016 Alomone Labs, Jerusalem, Israel
NGS-Blockierlösung (Normal Goat Serum)	Ref.: G6767-500ML, Sigma Aldrich, Zentr. ChL
Primärantikörper: (Anti-TRPC3 Antibody)	Ref.: ACC-016 Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärantikörper: F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG, HRP	Ref.: A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Substanzen für die Immunhistochemie

5.2 Probenmaterial

Grundlage für die Untersuchungen, die für diese Studie gemacht wurden, sind Gewebeproben, die Körperspender*innen des Anatomischen Institutes entnommen wurden. Diese Proben wurden dann entsprechend der Fragestellung dieser Arbeit weiterverarbeitet. Das folgende Kapitel beschreibt die verschiedenen praktischen Arbeitsschritte, die den Ergebnissen zugrunde liegen. Bis auf die Fixierung der Körperspender*innen wurden alle beschriebenen Arbeitsschritte eigenhändig durchgeführt.

5.2.1 Ethikvotum

Da diese Studie Proben menschlichen Gewebes untersucht, bedarf es der Zustimmung einer Ethikkommission zur Legitimation der Untersuchungen. Folglich wurde ein Ethikvotum der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eingeholt. Die Kennnummer für das vorliegende Ethikvotum zur Untersuchung von Ionenkanälen an Gewebeproben von Körperspender*innen am Anatomischen Institutes des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg lautet 163/20.

5.2.2 Probenkollektiv der Körperspender*innen

Folgende Tabelle legt dar, von welchen Körperspender*innen für diese Arbeit Proben entnommen wurden. Dabei werden Geschlecht, Alter, Geburts-, Sterbe- und Fixierungsdatum sowie das für die Fixation verwendete Volumen berücksichtigt. Das Kollektiv der Spender*innen umfasste ausschließlich weibliche Spenderinnen. Die Anzahl von acht Körperspender*innen (n=8) wurden zu Beginn dieser Arbeit als Grundlage für die Untersuchungen festgelegt. Diese Anzahl wurde auf Basis der Erfahrung aus anderen Arbeiten des Institutes gewählt. In der praktischen Phase der Arbeit wurden Körperspender*innen untersucht, die in diesem Zeitraum am Anatomischen Institut eintrafen. Die Körperspenderinnen dieser Arbeit hatten ein durchschnittliches Alter von 91,4 Jahren. Das geringste Alter betrug dabei 79 Jahre, das höchste Alter 104 Jahre. Bei allen Körperspenderinnen dieser Arbeit betrug das Zeitintervall zwischen Sterbe- und Fixierungsdatum weniger als 60 h, lediglich bei Spenderin 22/19 betrug das Zeitintervall 133 h.

Spenderin	Geschlecht	Gewicht [kg]	Alter in Jahren	Geburtsdatum	Sterbedatum	Fixierungsdatum	Fixationsvolumen [l]
22/19	weiblich	44	89	10.02.1933	08.03.2022	14.03.2022	15
22/23	weiblich	50	90	22.12.1931	28.03.2022	30.03.2022	9,5
22/18	weiblich	48	79	01.01.1943	06.03.2022	07.03.2022	14
22/26	weiblich	62	91	15.10.1930	06.04.2022	07.04.2022	15
22/35	weiblich	98	86	12.08.1935	08.05.2022	10.05.2022	13
22/36	weiblich	44	97	31.07.1924	10.05.2022	12.05.2022	8
22/30	weiblich	36	95	10.05.2022	17.04.2022	19.04.2022	8
22/31	weiblich	42	104	30.06.1917	17.04.2022	19.04.2022	9

Tabelle 5: Übersicht über die in die Studie einbezogenen Körperspender*innen

Den Körperspender*innen wird beim Eintreffen am hiesigen Institut eine Journalnummer zugeordnet, beispielsweise 20/10. Dabei steht die erste Zahl für das Jahr, in dem die Körperspender*innen am Anatomischen Institut konserviert wurden, die jeweils zweite Zahl bezeichnet, um den/die wievielten Körperspender*in es sich dabei in diesem Jahr handelt. Durch diese Journalnummer wird einerseits die Anonymität der verstorbenen Person gewährt, andererseits besteht zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit einer Identitätszuordnung, sodass es nicht zu Verwechslungen kommen kann.

5.2.3 NEP-Fixierung der Körperspender*innen

Nach dem Tod tritt natürlicherweise ein Prozess des Abbaus und Verfalls von Gewebe ein. Um menschliches Gewebe trotz dessen auch nach dem Versterben untersuchen zu können, ist eine Konservierung von großer Bedeutung. Durch den Fixierungsvorgang werden für die Untersuchung des Gewebes ungünstige Veränderungen aufgehalten und das Gewebe kann in meist gutem Zustand erhalten bleiben (Lang, 2012). Neben der bereits etablierten Methode der Formalinfixierung gibt es auch die Möglichkeit der Fixierung mit Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol (Janczyk et al., 2011). Die Formalinfixierung birgt aufgrund ihres allergenen, toxischen und kanzerogenen Potenzials gesundheitliche Risiken bei der Anwendung. Neben nasopharyngealen Krebs wird Formaldehyd auch eine Rolle bei der Entstehung von Leukämie zugeschrieben und es besteht der Verdacht, die Chemikalie könne eine Ursache für die Entstehung von sinonasalem Krebs sein (Cogliano et al., 2005). Nicht außer Acht zu lassen ist darüber hinaus auch die umweltschädliche Wirkung, die Formalin zu haben scheint (Klopfleisch et al., 2013). Dem Fixierungsprozess mit Formalin gegenüber steht die von Weigner etablierte Methode der NEP-Fixierung. Die hierbei verwendete Fixierungslösung besteht aus den drei Komponenten Nitritsalz, Ethanol und Pluriol. Nitritsalz wird auch in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel verwendet. Ethanol wird trotz seines neurotoxischen Potenzials als Trinkalkohol konsumiert und Pluriol konnte bei einmaliger Ingestion keine toxischen Effekte nachgewiesen werden. Des Weiteren traten bei Applikation von Pluriol bei Versuchstieren keine Haut- und Schleimhautreizungen auf (Safety Data Sheet Pluriol (E 600 LS-FLEX 1. Identification Product Identifier Used on the Label Pluriol (E 600 LS-FLEX, n.d.)). Ein weiterer Vorteil der NEP-Fixierung ist der realistische Erhalt des Gewebes und dessen Konsistenz. Dadurch eignet sich diese Fixierungsmethode auch besonders gut für Gewebe, die im Rahmen von Lehrveranstaltungen Verwendung finden, wie Wundnaht- und Operationskurse.

Alle acht der hier untersuchten Körperspender*innen wurden mittels NEP-Fixierung konserviert. Das Vorgehen bei der NEP-Konservierung kann in zwei Teile gegliedert werden, die innere und die äußere Fixierung. Dabei läuft die innere Fixierung folgendermaßen ab: Nach Eintreffen der Körperspender*innen und Kühlung (in der Zeit zwischen Eintreffen und Konservierung) werden die Körperspender*innen zunächst vollständig entkleidet, Schmuck und andere eventuell medizinische Gegenstände, die sich noch am Körper befinden, werden entfernt. Die durchgehende Kühlung ist wichtig für den anschließenden Fixierungsprozess und die nachfolgenden Untersuchungen, da sie autolytische Vorgänge, die nach dem Ableben eintreten, verringert. Als Autolyse beschreibt man den Prozess, bei dem Gewebe durch körpereigene Enzyme abgebaut wird. Insbesondere für die Leber, welche aus sehr enzymreichem Gewebe besteht, ist die Verhinderung der Autolyse von großer Bedeutung (Lang, 2006). Nach dem Eintreffen am Anatomischen Institut wird der Körper gewogen, das Gewicht wird protokolliert und die Kopf- und Körperbehaarung rasiert. Nun wird zur Identifikation noch die bereits erwähnte Journalnummer an den Körperspender*innen angebracht. Der Zugangsweg für die Infusionslösung, die für die innere Fixierung infundiert wird, erfolgt über die A. femoralis. Dafür wird mit dem Skalpell eine Hautinzision am medialen Oberschenkel durchgeführt. Nach Eröffnung der Haut und des Unterhautgewebes wird die A. femoralis freigelegt und diese durch eine, in Flussrichtung des Blutes verlaufende, Inzision für die Infusionskanülen zugänglich gemacht. Als Kanülen werden zwei Venenverweilkanülen verwendet, die kranial und kaudal eingeführt und mittels Arterienklemmen am Verrutschen gehindert werden. Die Injektion der Infusionslösung - im Falle der Körperspenderinnen, denen für diese Arbeit Proben entnommen wurden, handelte es sich um NEP-Fixierlösung - erfolgt über eine Pumpe mit einem Druck zwischen 1,5 bar und 2 bar, was in etwa 110 mmHg bis 150 mmHg entspricht. Einige Gebiete, hierzu zählen die Finger- und Zehenbeeren, die Extremitäten, die Regio glutealis und die Regio nuchae, werden auf diese Weise jedoch nur

verhältnismäßig schlecht von der Infusionslösung perfundiert und daher mit Nachinjektionen über Einmalkanülen (18 G) separat behandelt.

Durchschnittlich werden in etwa 10-15 l Fixationslösung pro Konservierung benötigt. Um die genaue Menge dieser zu dokumentieren, wird die eingelaufene Lösung per Waage abgelesen und in das Fixationsprotokoll eingetragen.

Als zweiten Teil schließt sich nun die äußere Fixierung an. Hierbei wird der Leichnam in eine Wanne mit NEP-Lösung gelegt, um den Fixierungsvorgang abzuschließen. Die Leichname können dann in einem Pharopack-Sarg, wobei es sich um ein luftdichtes Foliensargsystem handelt, in der Kühlanlage des Institutes bei 14°C aufbewahrt werden.

Die Fixierung der Körperspenderinnen, deren Proben für diese Arbeit entnommen wurden, wurde von Mitarbeiter*innen des Anatomischen Institutes übernommen. Alle anderen Schritte der Weiterverarbeitung der Proben wurden eigenständig von mir durchgeführt.

5.2.4 Entnahmestellen der Gewebeproben

Für diese Studie wurden Gewebeproben von Leber und Gallenblase von acht weiblichen Körperspenderinnen entnommen. Zur Entnahme der Proben des Lebergewebes erfolgte die Orientierung an den makroskopischen Strukturen der Organe, die in der Einleitung beschrieben wurden. Um eine möglichst umfassende Analyse zu ermöglichen, wurden Proben jeweils von medial und lateral sowie ventral (Facies diaphragmatica) und dorsal (Facies visceralis) entnommen. Für eine genaue Reproduzierbarkeit erfolgte die Probenentnahme immer möglichst an denselben Stellen.

Von folgenden Leberstrukturen wurde eine Probe entnommen:

- Lobus hepatis dexter (Facies visceralis), im Folgenden abgekürzt mit **LHDv**
- Lobus hepatis sinister (Facies visceralis), im Folgenden abgekürzt mit **LHSv**
- Lobus hepatis dexter (Facies diaphragmatica), im Folgenden abgekürzt mit **LHDd**
- Lobus hepatis sinister (Facies diaphragmatica), im Folgenden abgekürzt mit **LHSd**
- Lobus caudatus, im Folgenden abgekürzt mit **LC**
- Lobus quadratus, im Folgenden abgekürzt mit **LQ**

Die folgenden Grafiken veranschaulichen dies noch einmal.

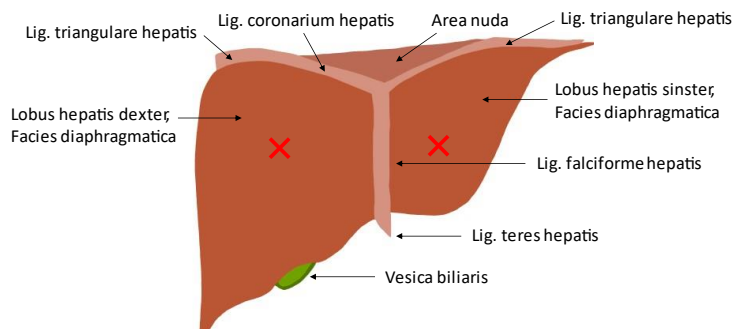


Abbildung 6: Entnahmestellen der Gewebeproben der Leber, Facies diaphragmatica

Anmerkung: Lig. = Ligamentum; Das rote Kreuz kennzeichnet die jeweiligen Entnahmestellen.

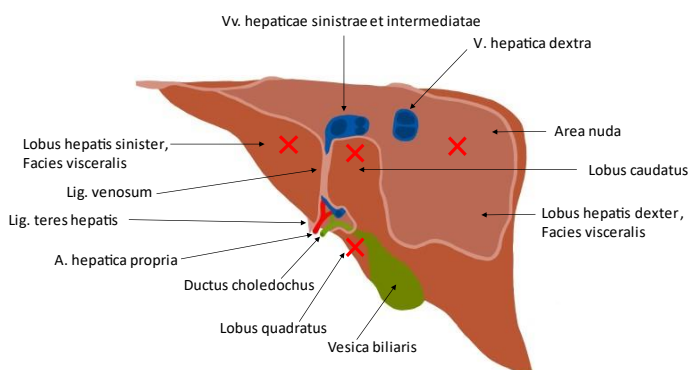


Abbildung 7: Entnahmestellen der Gewebeproben der Leber, Facies visceralis

Anmerkung: Lig. = Ligamentum, V. = Vena, A. = Arteria, Vv. = Venae;
Das rote Kreuz kennzeichnet die jeweiligen Entnahmestellen.

Von folgenden Strukturen der Gallenblase wurde eine Probe entnommen:

- Gallenblase, **Fundus**, im Folgenden abgekürzt mit **GF**
- Gallenblase, **Corpus**, im Folgenden abgekürzt mit **Gcorp**
- Gallenblase, **Collum**, im Folgenden abgekürzt mit **Gcoll**

Die folgende Grafik veranschaulicht dies noch einmal.

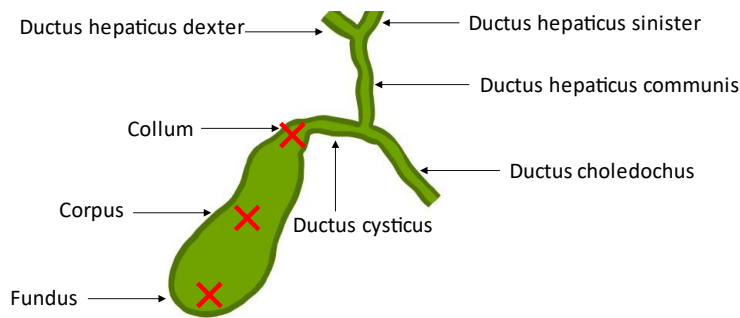


Abbildung 8: Entnahmestellen der Gewebeproben, Gallenblase

Anmerkung: Das rote Kreuz kennzeichnet die jeweiligen Entnahmestellen.

In drei Fällen konnten keine Proben der Gallenblase entnommen werden, da die Körperspenderinnen zum Entnahmezeitpunkt keine Gallenblase mehr hatten. Höchstwahrscheinlich wurde diese aufgrund einer Erkrankung der Gallenblase zu Lebzeiten der jeweiligen Körperspenderin entfernt. Diese Gegebenheit war zu erwarten, da die Cholecystektomie, also eine operative Entfernung der Gallenblase, eine der häufigsten Operationen in Deutschland ist (Lünse et al., 2022). Laut dem deutschen Ärzteblatt werden jährlich etwa 175 000 solcher Operationen durchgeführt (Gutt et al., 2020). Daher ist es nicht überraschend, dass auch ein Teil der Körperspender*innen, die ihre Körper dem Anatomischen Institut zur Verfügung stellen, keine Gallenblase mehr hat.

5.2.4.1 Probenentnahme

Der folgende Abschnitt schildert die Entnahme der Proben. Zunächst wurde eine etwa 20-25 cm lange Inzision von medial nach lateral im Verlauf des rechten Rippenbogens gemacht. Nun wurde zuerst die Haut und anschließend das subkutane Fettgewebe von den Faszien der darunter liegenden Bauchmuskulatur abpräpariert. Im nächsten Schritt konnte die Fascia abdominalis superficialis mit dem darunter liegenden Musculus obliquus externus abdominis scharf durchtrennt und stumpf durch die Fasern des Musculus obliquus internus abdominis präpariert werden. Schließlich wurden die Muskelfasern des Musculus transversus abdominis, die Aponeurose und die Muskelfasern des Musculus rectus abdominis durchtrennt bzw. von ihren Ansatzstellen an den Cartilagines costalis (Rippenknorpel) gelöst. Im Anschluss daran wurde, je nach Ausmaß der Lebergröße, der kaudale Rand der Leber und teilweise auch der Fundus der Gallenblase unter dem Rippenbogen sichtbar. Je nach Körperdimension und Lage der Leber wurde der Schnitt nach lateral und/oder medial noch erweitert, sodass der kaudale Leberrand der Facies diaphragmatica ausreichend einsehbar war. Hierauf folgte durch stumpfe Präparation die Ablösung und Mobilisation der Leber von den sie umgebenden Bandstrukturen, sodass sie weitestgehend aus der Körperhöhle mobilisiert werden konnte und somit von allen Seiten gut einsehbar war. Sofern die Gallenblase für eine Probenentnahme noch nicht ausreichend mobilisierbar und einsehbar war, wurde durch scharfe Präparation der ventralen ligamentären und vaskulären Strukturen mehr Sicht geschaffen. Unter anderem wurden hierfür das Ligamentum hepatogastricum und die Inhaltsstrukturen des Ligamentum hepatoduodenale mit A. hepatica propria, die V. portae hepatis und Ductus choledochus abgesetzt. Hierdurch konnte die Leber mit Gallenblase weiter nach kaudal luxiert werden. In manchen Fällen war es notwendig, die Vena cava inferior komplett abzusetzen, um somit eine Entnahme der Leber und Gallenblase en bloc zu ermöglichen. Die Entnahme der Gewebeproben aus den jeweiligen Organteilen wurde entweder mit einem Skalpell oder einer Biopsiestanze durchgeführt. Es wurden zwei Biopsiestanzen mit unterschiedlicher Größe verwendet (80 mm und 100 mm).

Ob die Probenentnahme mit einem Skalpell oder der Biopsiestanze erfolgte, wurde in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Organgewebes gewählt. Bei besonders weichem Gewebe wurde ein Teil des Organs mit dem Skalpell reseziert, bei eher hartem, derbem Gewebe konnte die Probenentnahme mit der Biopsiestanze erfolgen.

Die Probenentnahme des weichen und dünneren Gallenblasengewebes erfolgte ausschließlich mit dem Skalpell. Dafür wurde die Gallenblase zunächst von der Leber mobilisiert und anschließend ein Teil des entsprechenden anatomischen Abschnittes mit dem Skalpell exzidiert.

Nach der Entnahme der Proben wurden die Organe wieder in ihre anatomische Lage gebracht und die Körperhöhlen mit Nahtmaterial ordnungsgemäß und sauber verschlossen. Etwaige Blutflecke auf der Haut wurden sorgfältig entfernt, um die Spenderinnen dieser Arbeit nach der Entnahme der Proben pietätvoll zurückzulassen.

Die folgende Tabelle verdeutlicht der Übersicht wegen, welche Proben entnommen werden konnten.

	LHDv	LHDd	LHSv	LHSd	LC	LQ	GF	Gcorp	Gcoll
22/19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22/23	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22/18	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
22/26	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22/35	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
22/36	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22/30	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
22/31	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabelle 6: Übersicht über die entnommenen Proben

Anmerkung: Die grünen Häkchen kennzeichnen die Proben, die entnommen werden konnten.

Alle Gewebestücke wurden direkt im Anschluss an die Entnahme in Einbettkassetten gelegt, welche zuvor genau mit Journalnummer und Abkürzung der jeweiligen Gewebeprobe beschriftet wurden. Die folgende Abbildung stellt eine solche Einbettkassette mit Beschriftung schematisch dar.

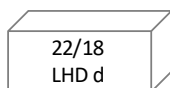


Abbildung 9: Einbettkassette mit Beschriftung

Anmerkung: Um eine durchgehend einheitliche Kennzeichnung der Proben zu gewährleisten, wurden auch die Objektträger nach diesem System beschriftet. Im Fall des obigen Beispiels handelt es sich um eine Probe des Lobus hepatis dexter der Facies diaphragmatica von Spender*in mit der Journalnummer 22/18.

5.3 Weiterverarbeitung der Proben

Die Weiterbehandlung der Proben erfolgte direkt im Anschluss an die Entnahme, da sonst mit Austrocknung und Verfall des Gewebes zu rechnen wäre, was eine qualitative histologische Ausarbeitung und Färbung der Proben erschweren bis unmöglich machen würde.

5.3.1 Allgemeine Arbeitsschritte der Untersuchungen der Gewebeproben

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Arbeitsschritte des praktischen Teils dieser Arbeit.

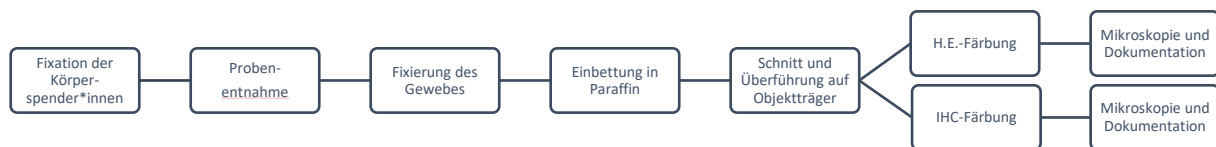


Abbildung 10: Arbeitsschritte der Untersuchung der Gewebeproben

5.3.1.1 Entwässerung und Paraffineinbettung

Das Gewebe konnte in dem Zustand, in dem es nach der Probenentnahme war, noch nicht zum Schneiden verwendet werden. Zu diesem Zeitpunkt füllte die Fixierflüssigkeit die Hohlräume des Gewebes aus. Diese Flüssigkeit muss allerdings aus dem Gewebe verdrängt und durch ein Einbettungsmedium ersetzt werden. Für diese Arbeit wurde die Paraffineinbettung nach vorausgegangener Formalinfixierung verwendet, was ein Standardverfahren der histologischen Probenaufarbeitung darstellt (Lang, 2006).

Die beschrifteten Einbettkassetten mit den Proben wurden nach der Entnahme in ein mit 3,5%iger Formalinlösung befülltes Behältnis überführt, wodurch eine direkte Konservierung der Proben gewährleistet werden konnte. Die Proben blieben dann über Nacht in der Formalinlösung und wurden bei 4°C gekühlt gelagert. Durch das Formalin werden die Proteine des Gewebes vernetzt. Dabei denaturieren sie zwar, die Sekundärstruktur bleibt allerdings erhalten. Die Antigene, die später als Target für die Immunhistochemie dienen sollen, werden also nicht geschädigt (Lang, 2006). Am jeweils nächsten Tag konnten die Proben in PBS-

Lösung umgefüllt werden, wo sie für mindestens 24 h wieder in der Kühlung gelagert wurden. PBS-Lösung wird unter anderem als Pufferlösung in der Biochemie, Zell- und Molekularbiologie verwendet, da sie eine isotone Salzlösung und somit nicht schädlich für humane Zellen ist. Anschließend wurden die Proben für drei Stunden zur Wässerung unter fließendes Leitungswasser und für weitere drei Stunden in 70%iges 2-Propanol gestellt. Hierdurch wird das Formalin aus dem Gewebe entfernt. Wird dieser Schritt nicht durchgeführt, kann es zu Niederschlägen von Formalinpigment kommen, was sich negativ auf die anschließenden Untersuchungen auswirken kann.

Die eigentliche Einbettung der Proben in Paraffin erfolgte im Karussell-Gewebeeinbeter. Dieser Automat ermöglicht ein automatisches Überführen der Proben in verschiedene Flüssigkeiten, in denen die Proben unterschiedlich lang verweilen. Nach einer visuellen Kontrolle der Flüssigkeiten auf Verunreinigungen werden die Einbettkassetten in den Korb des Einbettkarussells umgefüllt, der Korb wird mittels Bajonettverschlusses in das Gestell des Automaten eingehängt, anschließend senkt sich der Korb mit den darin befindlichen Proben in die erste Flüssigkeit ab. Der weitere Verlauf, also der Wechsel zwischen den einzelnen Stationen des Einbettautomaten, funktioniert ab diesem Zeitpunkt voll automatisch und bedarf keiner äußeren personellen Einwirkung.

Die folgende Tabelle stellt die Flüssigkeiten und die jeweilige Verweildauer der Proben im Einbettautomaten dar.

Station im Einbettautomat	Dauer der Station	Funktion der Station	Flüssigkeit der Station
1	3 h	Entwässerung (=Dehydrierung)	70% 2-Propanol
2	1,5 h		80% 2-Propanol
3	1,5 h		90% 2-Propanol
4	1,5 h		100% 2-Propanol
5	1,5 h		100% 2-Propanol
6	1,5 h	Klären (=Clearing)	Methylbenzoat
7	1,5 h		Methylbenzoat
8	1,5 h		Methylbenzoat
9	2 h	Infiltration	Paraffin
10	2 h		Paraffin
Gesamtdauer des Einbettprogramms	17 h und 30 min		

Tabelle 7: Übersicht über den Ablauf der Einbettung in Paraffin im Einbettautomat

Anmerkung: h = Stunde

Die ersten fünf Stationen des Einbettautomaten stellen eine aufsteigende Alkoholreihe dar, wodurch den Proben Wasser und Fixierlösung entzogen werden. Die Entwässerung ist wichtig, da Formalin hydrophil und Paraffin, in das die Proben eingebettet werden sollen, hydrophob ist. Durch die aufsteigende Alkoholreihe wird das Wasser aus den Proben verdrängt und die Proben sind für das flüssige Paraffin zugänglich. Das Methylbenzoat dient dem Klären („Clearing“) der Proben. Es ist gut mit Alkohol und auch mit Paraffin mischbar und ist für die Proben somit ein optimales Übergangsmedium (Lang, 2006). Die letzten Stationen im Einbettautomat beinhalten flüssiges Paraffin. Hier wird das Gewebe mit Paraffin infiltriert, sodass das Paraffin die Hohlräume des Gewebes ausfüllt.

Ausgehend von der letzten Station des Automaten können die Proben im nächsten Schritt in Paraffinblöcke eingebettet werden. Dabei wurde an der Paraffin-Ausgießstation zunächst der Boden der Ausgießförmchen mit Paraffin bedeckt, sodass die Probe mit Pinzetten während einer ersten Anhärtung des Paraffins in die gewünschte Position gebracht werden konnte. Die folgende Tabelle erläutert, wie die Gewebeproben des jeweiligen Organs innerhalb der Ausgießförmchen ausgerichtet wurden, sodass bei dem späteren Schneidevorgang das gewünschte Schnittbild entstehen würde.

Ausrichtung der Proben der Gallenblase	Die Proben der Gallenblase wurden so ausgerichtet, dass die später angefertigten Gewebeschnitte Querschnitte durch die Wandschichten darstellen würden. Das Gewebe wurde also vertikal in den Ausgießförmchen positioniert.
Ausrichtung der Proben der Leber	Die Proben des Lebergewebes wurden vertikal mit der Außenseite (Facies diaphragmatica/ Facies visceralis) auf den Boden der Ausgießförmchen gestellt, sodass die später angefertigten Gewebeschnitte Querschnitte durch den internen Teil der Gewebeprobe darstellen würden.

Tabelle 8: Ausrichtung der Gewebeproben in den Ausgießförmchen bei der Paraffineinbettung

Anschließend wurde das Förmchen mit Paraffin aufgefüllt und zum Aushärten auf eine Kühlplatte mit einer Temperatur von -2,5°C überführt. Nachdem die Paraffinblöcke vollständig ausgehärtet waren, konnten sie vorsichtig aus der Ausgießform gelöst werden und anschließend bis zum Schnittprozess im Kühlschrank gelagert werden.

5.3.1.2 Schneiden der Paraffinblöcke

Die in den Paraffinblöcken fixierten Proben wurden im nächsten Arbeitsschritt geschnitten und auf Objektträger befestigt. Dieser Schritt ist die eigentliche Grundlage, um die Proben später färben und beurteilen zu können. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden am Mikrotom geschnitten, an dem Schnittpräparate in unterschiedlicher Dicke angefertigt werden können. Dafür wurden die Paraffinblöcke in einen Schraubstock eingespannt. Über eine Handkurbel fährt der Block dann entlang der darunter eingespannten Klinge. Die so entstandenen Schnitte konnten nun mit einem angefeuchteten Pinsel in ein Wasserbad überführt werden. Das Wasserbad hat eine Temperatur von 37°C und dient der Entfaltung und Glättung der Schnitte. Im Wasserbad konnte schon eine erste Qualitätsprüfung dahingehend stattfinden, ob eventuell Risse oder Falten im Präparat entstanden sind. Hatte sich der Schnitt vollständig entfaltet und wies eine sehr gute Qualität auf, konnte er auf den Objektträger überführt werden. Insgesamt wurden pro Gewebepreparat zehn Schnitte angefertigt. Fünf davon wurden auf normale Objektträger überführt, die anderen fünf auf speziell beschichtete Objektträger (SuperFrost® Plus Objektträger), welche später im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden. Die Objektträger wurden ebenfalls vor der Verwendung mit der Journalnummer und der Probenbezeichnung beschriftet. Die Überführung auf den Objektträger erfolgte, indem der jeweilige Objektträger schräg unter das zu überführende Präparat gehalten wurde. Dabei galt es insbesondere darauf zu achten, dass der untere Rand des Objektträgers nicht mit dem Boden des Wasserbades in Berührung kam, da sonst Wasserblasen von diesem aufstiegen und sich zwischen Präparat und Objektträger ansammelten. Auch auf die Vermeidung von Falten und Knicken war ein großes Augenmerk zu legen. Hinsichtlich der Ausrichtung des Präparates galt es jene zu finden, die der Einspannung des Paraffinblockes im Schraubstock des Mikrotoms entsprach. Gelang eine fehlerfreie Übertragung des Gewebeschnittes auf den Objektträger, wurde dieser auf Zellstofftüchern abgeklopft, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Anschließend wurde der Objektträger mit dem darauf

befindlichen Schnitt auf eine Heizplatte gelegt, die ebenfalls auf eine Temperatur von 37°C eingestellt war. Dadurch, dass die Objektträger in diesem ersten Trockenschritt horizontal gelagert wurden, konnte ein Ver- oder Abrutschen der Präparate, die zu diesem Zeitpunkt lediglich adhäsiv am Objektträger befestigt waren, verhindert werden. Nach dem Antrocknen der Schnitte, wurden diese über Nacht in einem Inkubationsschrank aufbewahrt. Jener war ebenfalls auf 37°C temperiert. Mindestens 12 Stunden sollten die Präparate dort aushärten und trocken, bevor sie dann gefärbt werden konnten. Die anschließenden Färbungen sind Inhalt der folgenden Kapitel.

Fehlerquellen für ungeeignete Schnitte waren beispielsweise eine stumpfe Klinge, welche daher in regelmäßigen Abständen gewechselt wurde; Paraffinablagerungen auf der Klinge, welche mit Alkohol einfach entfernt werden konnten oder auch eine zu hohe Temperatur der Blöcke. Je kühler das Paraffin, desto sauberer konnte der Schnitt durch den Block erfolgen. Daher wurden die Blöcke unmittelbar bis zu ihrem Schnitt in der Kühlung gelagert. Beim Schneidevorgang wurde darauf geachtet, Schnitte aus der Mitte des Präparates zu gewinnen, dadurch konnten sehr saubere Schnittflächen und wenige Präparationsartefakte erzielt werden. Die Schnitte, die für diese Untersuchung angefertigt wurde, hatten der Reproduzierbarkeit wegen alle eine Dicke von 7µm.

5.4 Färbung der Proben

5.4.1 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

5.4.1.1 Hintergrund der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die geschnittenen Präparate konnten im nächsten Arbeitsschritt mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt werden. Dies ist eine in der Histologie sehr häufig verwendete Routine-Färbmethode, da sie einfach in der Anwendung ist und eine sehr gute Aussagekraft über die grundlegenden Qualitätsmerkmale eines histologischen Schnittes bietet (Wennemuth, 2017). Qualitätsmerkmale, auf die die Proben schon ohne Färbung untersucht werden konnten, waren kleine Risse, Knicke oder Falten. An diesen Stellen ist durch die Überlappung des Gewebes beim späteren Mikroskopieren keine gute Beurteilung der Probe möglich. Durch den Färbevorgang können auch kleinere Qualitätsmängel wie Abrasionen oder Epithelablösungen, welche beim Schneidevorgang, aber auch bei der Paraffinfixierung entstehen können, sichtbar gemacht werden. Auch diese Qualitätsmängel würden eine adäquate Auswertung des Probenmaterials beeinträchtigen. Die Qualitätsprüfung der Proben ist ein wichtiger Schritt, bevor die immunhistochemische Färbung durchgeführt wird. Denn durch das gezielte immunhistochemische Färben qualitativ hochwertiger Schnitte wird verhindert, dass eine unnötig große Menge Antikörper verwendet werden muss. Auf diese Weise kann eine möglichst effiziente und ressourcenschonende Arbeitsweise umgesetzt werden.

5.4.1.2 Prinzip der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden zwei verschiedene Farbstoffe (Hämatoxylin und Eosin) kombiniert, die unterschiedliche Zellstrukturen anfärben. Prinzipiell ist Hämatoxylin farblos, durch Oxidation entsteht jedoch der eigentliche Farbstoff Hämatoxylin. Dennoch hält sich in der Literatur die Bezeichnung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, weshalb diese Namensgebung auch in dieser Arbeit verwendet wird. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der saure bzw. basophile Gewebestrukturen dunkellila bis blau anfärbt. Hierzu zählen unter

anderem Zellkerne, mit den darin befindlichen Strukturen wie Desoxyribonukleinsäure-Bestandteilen, Ribosomen und raues endoplasmatisches Retikulum. Hämatoxylin färbt bei niedrigem pH-Wert ($\text{pH} < 3$) zunächst rot-braun. Die eigentliche Lila-Blaufärbung des Hämatoxylins kommt erst durch eine Erhöhung des pH-Wertes zustande, beispielsweise durch die Verwendung von Leitungswasser. Diesen Vorgang nennt man auch Bläuen.

Der zweite Farbstoff, der bei dieser Färbung Verwendung findet, ist das Eosin. Dieser saure Farbstoff färbt basische bzw. acidophile Zellbestandteile ein. Hierdurch werden kollagene Fasern und Zytoplasma rötlich gefärbt. Dem Eosin werden vor dem Färbedurchgang zwei Tropfen Eisessig hinzugefügt. Dies führt über eine Ansäuerung des Eosins zum gewünschtem pH-Wert und dem damit einhergehenden Färbeergebnis (Lang, 2012).

Die H.E.-Färbungen wurde gemäß dem Protokoll durchgeführt, das im Labor des Institutes für Anatomie und Zellbiologie in Homburg bereits etabliert war. Folgende Schilderung der Durchführung beruht auf Basis jenes Protokolls.

5.4.1.3 Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um das Gewebe dem Färbvorgang überhaupt erst zugänglich zu machen, werden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Dies geschieht, indem die Schnitte dreimal fünf Minuten in dem Lösungsmittel Xylol verweilen. Anschließend folgt die Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe mit zweimal fünf Minuten in 100% 2-Propanol und je einmal fünf Minuten in 90% 2-Propanol und 80% 2-Propanol. Von dem 80% 2-Propanol ausgehend wird der Objektträgerhalter mit den darin befindlichen Proben direkt für acht Minuten in das im Vorfeld gefilterte Hämatoxylin nach Ehrlich überführt. Anschließend wird die überschüssige Farbe durch Spülen in destilliertem Wasser entfernt und die Schnitte werden für zwölf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Bevor die Schnitte für zweieinhalb Minuten mit Eosin gefärbt werden, werden sie erneut für etwa 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült und nach dem Färben mit Eosin in 90% 2-Propanol so lange gedippt, bis die gewünscht

Farbintensität erreicht ist. Hierauf werden die Schnitte zweimal fünf Minuten in 100% 2-Propanol getaucht und dann nochmal dreimal fünf Minuten in Xylol gegeben. In einem letzten Schritt erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit dem Roti-Histokitt und die anschließende Aushärtung unter dem Abzug über Nacht.

5.4.1.4 Ausgewählte Abbildungen der H.E.-Färbungen

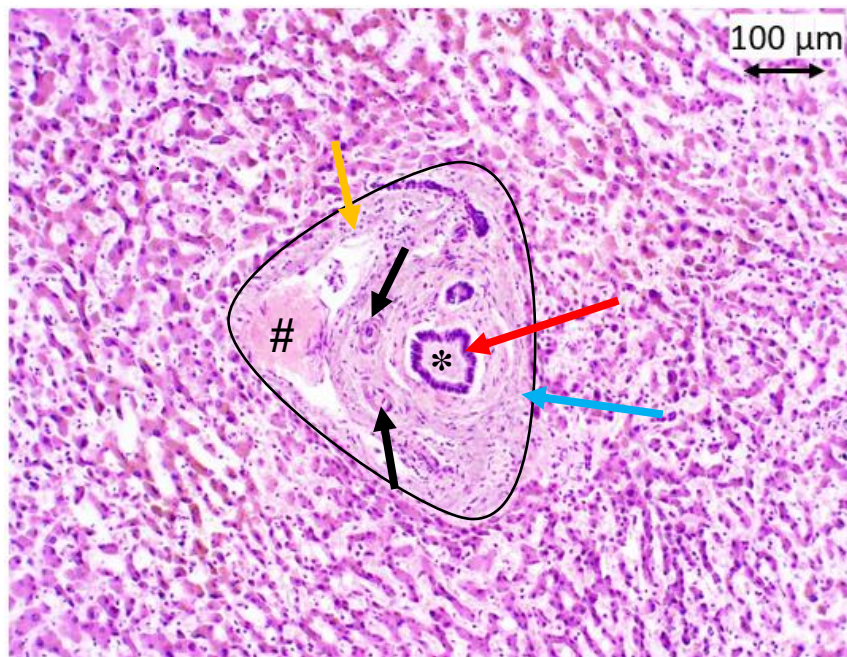


Abbildung 11: HE-Färbung Spenderin 22/30 LHDd in 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 11 zeigt eine HE-Färbung der Leber des Lobus hepatis dexter der Facies diaphragmatica. In der Mitte des Bildes ist ein periportales Feld angeschnitten, in dem Äste der portalen Trias verlaufen. Das periportale Feld ist schwarz umfahren. Eindeutig zu identifizieren ist die Vena interlobularis anhand ihres relativ großen, unregelmäßigen Lumens mit den darin befindlichen Erythrozyten. Des Weiteren sieht man Anschnitte der Ductus biliferi interlobares, welche anhand ihres isoprismatischen Epithels und den runden Zellkernen zu erkennen sind. Die Arteria interlobaris ist von schmalere Kaliber, hat ein rundes Lumen und eine ausgeprägte Tunica media. Um die Glisson-Trias sind Hepatozytenbälkchen mit Lebersinusoiden zu erkennen.

= Lumen der Vena interlobularis mit Erythrozyten

* = Lumen des Ductus biliferus interlobaris

Schwarzer Pfeil = A. interlobularis

Roter Pfeil = Prismatisches Gewebe des Gallengangs

Hellblauer Pfeil = Bindegewebe

Orangener Pfeil = Endothelzelle

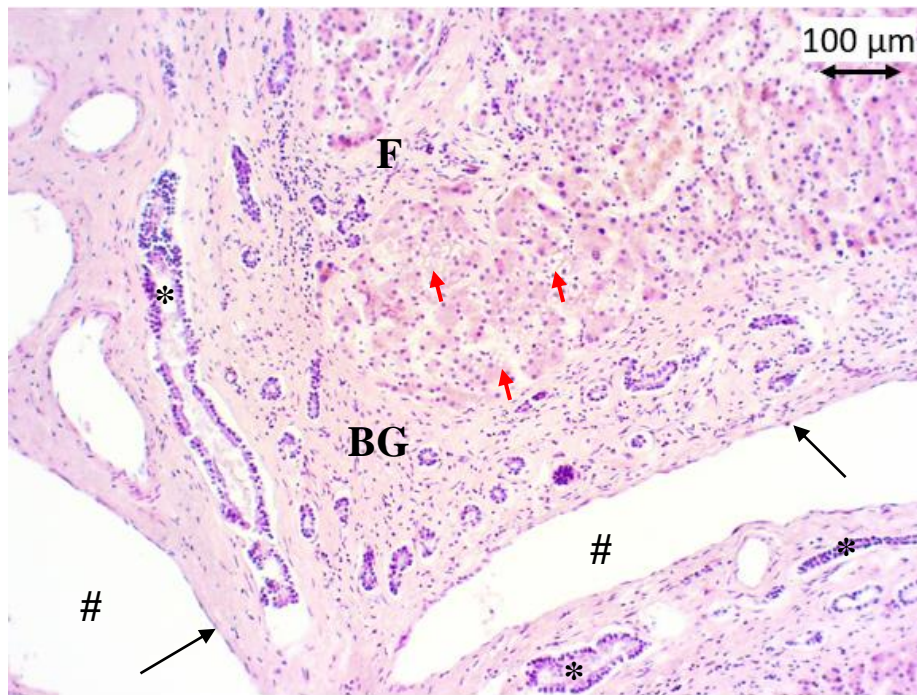


Abbildung 12: HE-Färbung Spenderin 22/31 LHDd 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 12 zeigt die HE-Färbung einer Probe des Lobus hepatis dexter der Facies diaphragmatica. Längs angeschnitten ist ein Periportalfeld, im unteren linken Bildrand sind großlumige Gefäße zu sehen. Vom Kaliber und der Wand der Gefäße zu beurteilen, handelt es sich hierbei am ehesten um Venen im Längsschnitt. Darüber hinaus sind auch Gallengänge im Längsschnitt getroffen, hier kann man besonders schön das prismatische Epithel der Kanäle sehen. In der Vorgeschichte dieser Körperspenderin ist als Grunderkrankung eine Herzinsuffizienz bekannt, entsprechend sind die Sinusoide in dieser Probe gestaut und die Architektur der Leberläppchen verändert. An etlichen Stellen sind Einlagerungen von Fettvakuolen erkennbar, die Struktur der Hepatozyten sieht allgemein aufgelockert aus, man spricht auch von Steatosis. Zusätzlich traten bereits Fibrosierungsvorgänge des Lebergewebes ein, ersichtlich an dem eingelagerten Bindegewebe zwischen den Hepatozyten.

= Vena interlobularis, mehrfach angeschnitten

* = Ductus biliferus interlobularis

BG = Bindegewebe des Periportalfeldes

F = Fibrosierung

Schwarzer Pfeil = Endothel der Vene

Roter Pfeil = Fetteinlagerungen

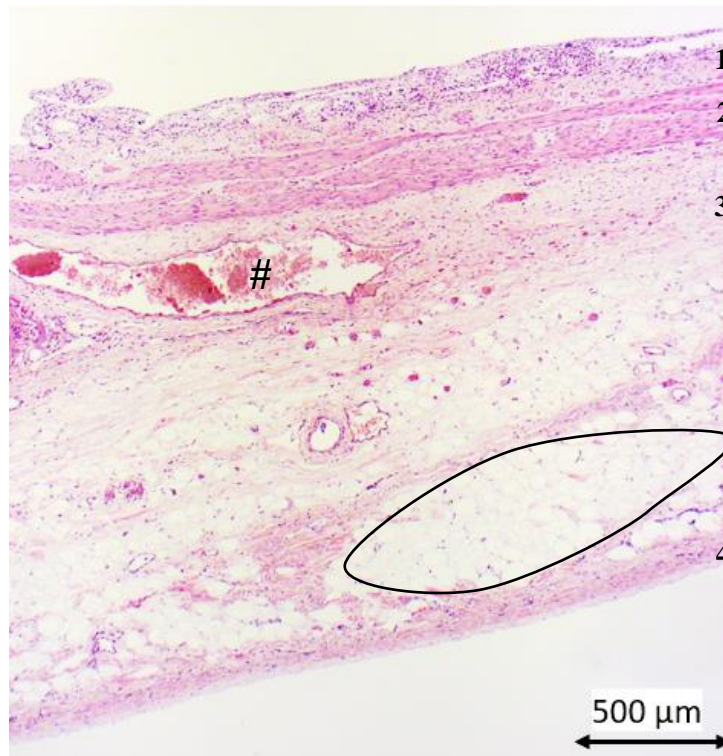


Abbildung 13: HE-Färbung Spenderin 22/19 GF 4x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 13 zeigt einen HE-gefärbten Querschnitt durch die Schichten des Fundus der Gallenblase. Erkennbar ist der charakteristische Wandaufbau der Gallenblase aus Tunica mucosa, bestehend aus Lamina epithelialis und Lamina propria, Tunica muscularis und Tela subserosa mit aufliegender Tunica serosa. Die Innenschicht der Gallenblase scheint chronisch entzündet gewesen zu sein. Darauf deuten die vielen Lymphozyten sowie die Architekturveränderungen der Tunica mucosa. Das einschichtig zylindrische Epithel der Lamina epithelialis ist kaum zu erkennen und die Falten der Schleimhaut sind verstrichen. In der Tela subserosa sind Anschnitte kräftiger Gefäße zu erkennen sowie viele eingelagerte Adipozyten (Fettzellen). Die schwarze Umrandung kennzeichnet die Einlagerung von Adipozyten.

1 = Tunica mucosa; 2 = Tunica muscularis; 3 = Tela subserosa; 4 = Tunica serosa

= Anschnitt eines großkalibrigen venösen Gefäßes

Schwarze Umrandung = Fetteinlagerungen

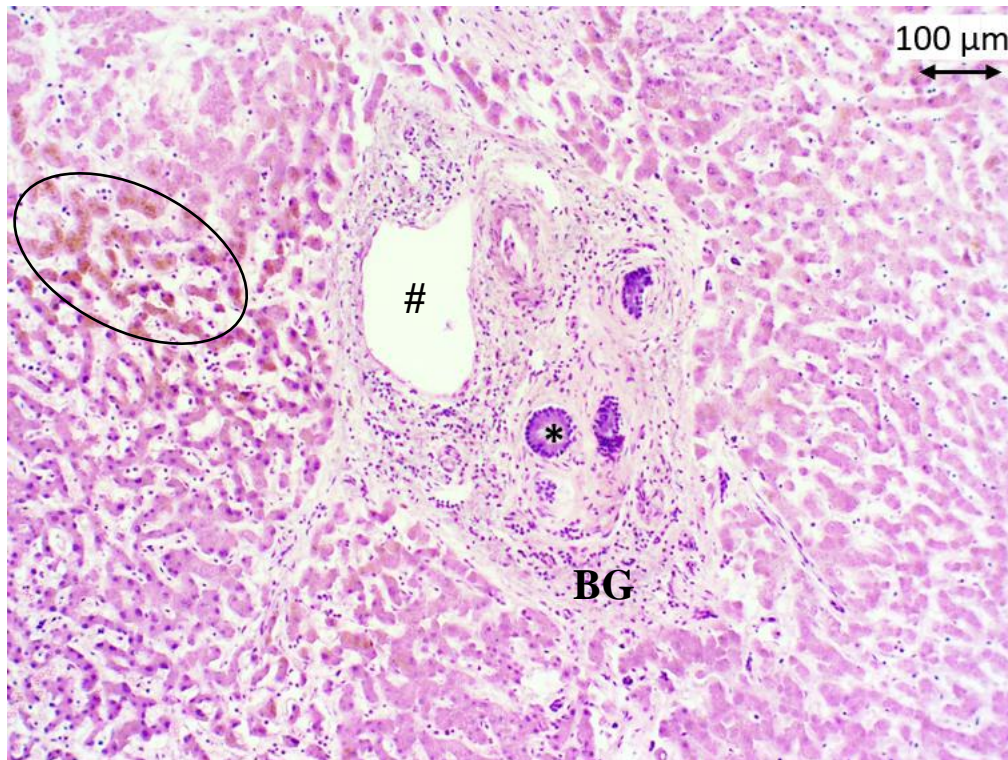


Abbildung 14: HE-Färbung Spenderin 22/31 LHDd 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 14 zeigt eine HE-gefärbte Probe des Lobus hepatis dexter der Facies diaphragmatica. Im Zentrum des Bildes ist ein Periportalfeld mit angeschnittener Vene und Gallekanälchen sichtbar. Darum sind die zu Balken angeordneten Hepatozyten in dieser Vergrößerung schön zu erkennen. Im linken, mittleren Teil des Bildes sind Ablagerungen von Lipofuscin zu erkennen. Bei diesem altersentsprechenden Befund handelt es sich um Abbauprodukte des Fettstoffwechsels.

= Vena interlobularis, mehrfach angeschnitten

* = Ductus biliferus interlobularis

BG = Bindegewebe des Periportalfeldes

Schwarze Umrandung = Lipofuscin-Ablagerungen

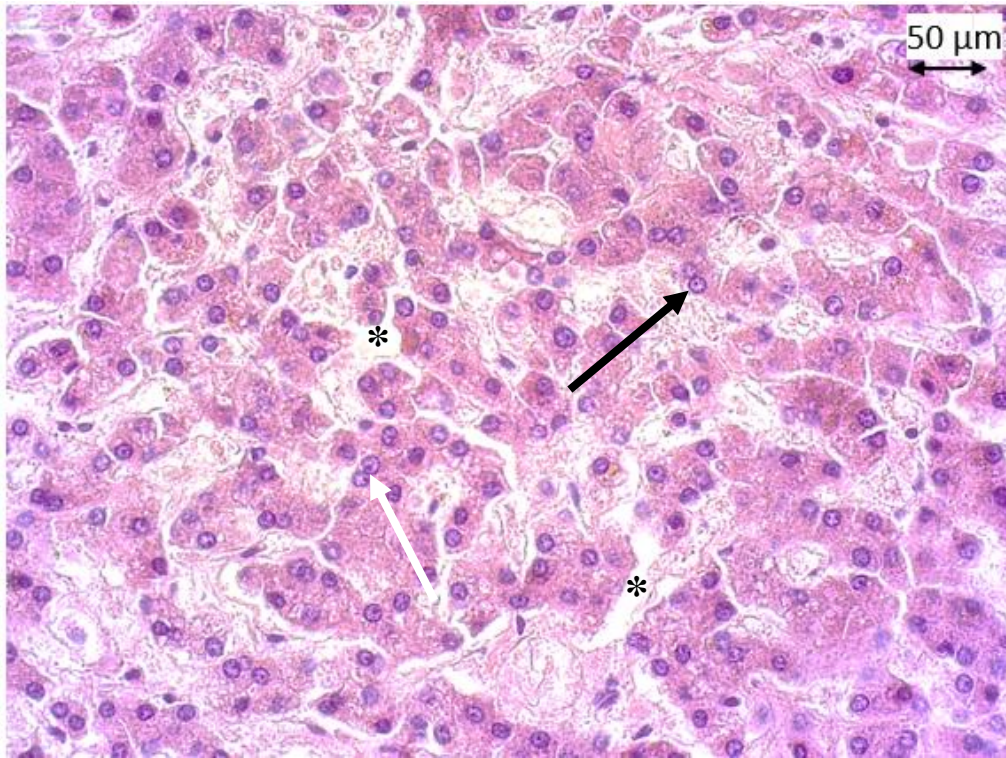


Abbildung 15: HE-Färbung Spenderin 22/31 LHDd 40x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 15 zeigt eine HE-gefärbte Probe des Lobus hepatis dexter der Facies diaphragmatica. Zu sehen sind die zu Balken angeordneten Hepatozyten und die dazwischen liegenden Sinusoide. Innerhalb der Hepatozyten sieht man den Nucleus, teilweise ist auch der Nucleolus angeschnitten.

* = beispielhaft gekennzeichnete Sinusoide

Schwarzer Pfeil = Nucleus

Weißer Pfeil = Nucleolus

5.4.2 Immunhistochemische Färbung

Um den Nachweis der TRPC3-Kanäle für diese Arbeit erbringen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, bei dem Antigene aufgrund der Affinität zwischen einem Antikörper und dem Epitop eines Antigens nachgewiesen werden können. Mit Hilfe eines Detektionssystems, welches mit dem Antikörper konjugiert ist, kann das Antigen sichtbar gemacht werden (Hantschke & Palmedo, 2016).

Insgesamt wurden 20 Gewebeschnitte (Positivkontrollen) für die immunhistochemischen Färbungen ausgewählt. Dabei wurden bei jedem Präparat jene Gewebeschnitte ausgewählt, die die beste Qualität aufwiesen. In den Objektträgerhalterungen, die für die Färbungen verwendet wurden, ist Platz für zehn Objektträger. Da bei jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle mitgeführt wurde, wurden drei Durchgänge immunhistochemischer Färbungen gemacht. Die Objektträger wurden zuvor entsprechend ihrer Zugehörigkeit zur Positiv- oder Negativkontrolle im Vorfeld mit einem Plus für die Positivkontrolle und einem Minus für die Negativkontrolle beschriftet.

5.4.2.1 Protokoll

Das Protokoll für die immunhistochemische Färbung war am hiesigen Institut bereits etabliert und wurde von mir übernommen. Die Dauer der Einwirkung der DAB-Färbelösung wurde dabei durch die verschiedenen Färbdurchgänge hinweg, individuell für das Gewebe von Leber und Gallenblase, optimiert.

5.4.2.2 Hintergrund und Prinzip der Immunhistochemischen Färbung

Hintergrund der immunhistochemischen Färbung sind die Affinität zwischen dem Paratop des Antikörpers und dem Epitop - also einer bestimmten Sequenz von Aminosäuren - des Antigens, sowie die Bindung zwischen Primär- und Sekundärantikörper und die, durch das Enzym indizierte, Farbreaktion.

Der Primärantikörper, der in diesem immunhistochemischen Verfahren Anwendung findet, wurde dem Serum immunisierter Versuchstiere entnommen. Dafür wurde den Versuchstieren zuvor ein Antigen zugeführt, gegen welches die Tiere dann Antikörper bildeten. Ein Vorteil von polyklonalen Antikörpern, die auch für diese Arbeit als Primärantikörper verwendet wurden, gegenüber monoklonalen Antikörpern, ist, dass sie an mehrere Epitope des Antigens binden können, da sie von unterschiedlichen Plasmazellen stammen. Selbst wenn ein Teil des Antigens durch die Fixierung beschädigt oder unzugänglich sein sollte, kann der Antikörper das Antigen trotzdem durch Bindung an ein anderes Epitop des Antigens detektieren und es kommt nicht zu einem falsch-negativen Ergebnis (Köpke & Simon, 2018).

Man unterscheidet in der Immunhistochemie die direkte von der indirekten Immunhistochemie. Bei der direkten Methode der Immunhistochemie ist das Enzym, welches das Substrat für die Farbreaktion umsetzt, direkt an den Primärantikörper gebunden. Für diese Arbeit wurde die indirekte Immunhistochemie verwendet, bei der ein Sekundärantikörper eingesetzt wird, an welchen ein Enzym gekoppelt ist. Verabreicht man Versuchstieren Primärantikörper, die selbst antigene Wirkung haben, bildet das Tier gegen den Primärantikörper Sekundärantikörper. Diese Sekundärantikörper binden dann mit ihrer Fab-Region spezifisch an die Fc-Region des Primärantikörpers und führen, nachdem das Substrat hinzugegeben wurde, welches von dem gekoppelten Enzym umgesetzt werden kann, zu einer Farbreaktion (Lang, 2006). Das Substrat, welches für diese Arbeit verwendet wurde, war 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Das Enzym, welches das DAB umsetzt, war die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP). Ein richtig-positives Ergebnis, welches einer nachgewiesenen Expression von TRPC3 entspricht, zeigt sich in Form einer braunen Farbreaktion.

Folgendes Schema verbildlicht die indirekte Immunhistochemie, welche in dieser Arbeit angewendet wurde:

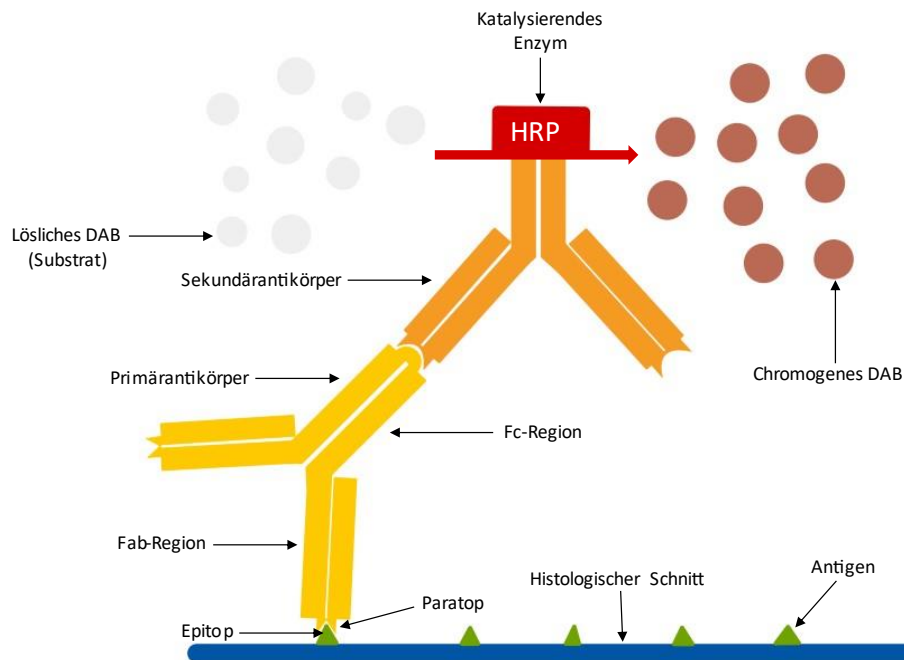


Abbildung 16: Schematische Darstellung der indirekten Immunhistochemie

Anmerkung: HRP = horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase), DAB = 3,3'-Diaminobenzidin

5.4.2.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Vor der eigentlichen Durchführung muss kontrolliert werden, ob alle verwendeten Materialien in ausreichender Menge vorhanden und alle Geräte funktionsfähig sind. Ebenso wichtig ist die Überprüfung der Alkoholreihe, da auch hier Verunreinigungen die komplikationslose Färbung behindern und optimale Ergebnisse beeinträchtigen würden.

Schritt 1 – Entparaffinierung und Rehydrierung

Bevor die zu färbenden Objektträger den eigentlichen Färbeschritten unterzogen werden können, erfolgte zunächst, ähnlich der H.E.-Färbung, die Entparaffinierung und Rehydrierung, um das Gewebe den im weiteren Verlauf verwendeten Lösungen zugänglich zu machen. Denn durch den Fixierungsprozess kommt es zu Denaturierungen von Proteinen, wodurch die Antigene, die Ziel des Primärantikörpers sind, zunächst verdeckt werden. Um jene Denaturierungsprozesse reversibel zu machen, verwendet man Hitze und gewebe natürliche pH-Werte. Hierfür ist Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6 geeignet.

Gemäß dem Protokoll verweilen die Schnitte zuerst dreimal fünf Minuten in Xylol. Dieses Lösungsmittel dient der Entparaffinierung. Darauf folgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mittels zweimal fünf Minuten in 100%igem 2-Propanol und jeweils fünf Minuten in 90%igem 2-Propanol, 80%igem 2-Propanol, 70%igem 2-Propanol. Im Unterschied zu den H.E.-Färbungen wurden die Schnitte jetzt noch für fünf Minuten in destilliertem Wasser gespült, um Alkoholreste zu entfernen, die den pH-Wert des Puffers, in den die Schnitte anschließend kommen würden, verändern könnten. Eine solche Veränderung des pH-Wertes könnte zu unerwünschten Ergebnissen führen, da der pH-Wert in Kombination mit Wärme ausschlaggebend für die vollständige Demaskierung der Antigene, an die der Antikörper bindet, ist. Dies ist von hoher Relevanz für den kompletten weiteren Verlauf der Immunhistochemie (IHC).

Schritt 2 - Demaskierung

Bei der Fixierung von Gewebeproben kommt es, wie bereits erwähnt, meist zu Veränderungen der Proteinstruktur, sodass die Antigene, die mit dem Primärantikörper detektiert werden sollen, für diesen nicht mehr zugänglich sind. Durch das HIER-Verfahren (heat induced epitope retrieval), bei dem entparaffinierte Schnitte in einem Puffer (hier verwendeter Puffer: Citratpuffer mit pH 6) erhitzt werden, wird die Maskierung des Gewebes rückgängig gemacht und die Antigen-Strukturen werden wieder freigelegt, wodurch eine Bindung zwischen Epitop und Antikörper möglich gemacht wird (Hantschke & Palmedo, 2016).

Als nächstes wurden die Schnitte zur beschriebenen Demaskierung der Antigene für eine Stunde in eine Hitzekammer in Citratpuffer gestellt. Für das Ansetzen des Citratpuffers werden 5 ml Citratpuffer nochmal mit 495 ml destilliertem Wasser verdünnt und anschließend zum Aufwärmen in die Hitzekammer gegeben. Nach Ablauf der Stunde in der Hitzekammer mussten die Schnitte zunächst für ihre Weiterverwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur mit geöffnetem Deckel wieder abkühlen.

Nach etwa 15 Minuten konnte dann das NGS (normal goat serum) bereitgestellt werden. Dieses wird eingefroren im Gefrierschrank gelagert und benötigt eine Weile um aufzutauen. Für eine maximal gute Qualität der Produkte ist es sinnvoll, die Zeit, in der das NGS auftaut, so kurz wie möglich zu halten. Nach Ablauf der 30 Minuten Abkühldauer wurden die Schnitte mindestens eine Minute in PBS gewaschen, um überschüssige Reste des Citratpuffers abzuspielen. Das PBS ist, wie bereits zuvor erklärt, eine isotonische Basislösung und stellt damit ein gutes Milieu für die Objektträger dar, die nicht mehr austrocknen dürfen. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurde zu Beginn der Immunhistochemie eine Feuchtekammer vorbereitet, in der die Schnitte verweilen sollten. Im Anschluss daran wurden die Objektträger mit einer Pinzette einzeln aus der in PBS befindlichen Halterung herausgenommen und die überschüssige Flüssigkeit wurde abgeklopft. Schließlich wurden die Gewebeproben auf den

Objektträgern mit einem speziellen Fettstift, dem DakoPen (Ref.: S200230-2), umrandet. Dies ist wichtig, da durch die Umrandung mit dem Fettfilm eine Barriere entsteht. Die Flüssigkeiten, die in den folgenden Schritten auf das Gewebe pipettiert werden, können somit nicht mehr von dem Objektträger herunterlaufen. Einerseits hat das den Vorteil, dass das Gewebe über Nacht nicht austrocknet und die Inkubation gut ablaufen kann, andererseits erhöht dieser Arbeitsschritt auch die Effizienz des Vorgangs, da so die Menge der verwendeten Antikörperlösungen reduziert werden kann, was wirtschaftlich von Vorteil ist.

Schritt 3 – Blockierung

Ist das Gewebe durch die Entparaffinierung und Demaskierung für die Immunreaktion zugänglich und wurde durch den Fettstift eine Begrenzung für die Flüssigkeiten geschaffen, werden die Schnitte mit der Blockierlösung behandelt. Hierdurch werden Antigene blockiert, an die der Primärantikörper unspezifisch binden würden. Bei der Blockierlösung handelt es sich um Serum von Ziegen (normal goat serum, NGS), welches unspezifisch-bindende Antikörper enthält. Etwa 120-140 µl Blockierlösung, abhängig von der Größe der Gewebeprobe, wurden auf alle Schnitte pipettiert, anschließend verweilten die Schnitte für eine Stunde in der Feuchtekammer.

Schritt 4 - Primärantikörper

Etwa zehn Minuten vor Ablauf der 60 Minuten konnte der Primärantikörper bereitgestellt werden, da auch dieser tiefgefroren gelagert wird. Bei dem für die Positivkontrollen verwendeten TRPC3-Antikörper handelte es sich um aus Kaninchen gewonnene IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50. Dieser Antikörper bindet mit seiner Fab-Region an das Epitop des Antigens. Für die Negativkontrolle wurde nicht-immunes Kaninchenserum verwendet. Es enthält viele Antikörper, die unspezifisch binden können, jedoch nicht auf den TRPC3-Kanal passen. Das Kaninchenserum wird in einer 1:500 Verdünnung benötigt, wofür 50 µl Kaninchenserum mit 24950 µl (24,95ml) PBS zusammengeführt wurden.

Anschließend wurden die beiden Flüssigkeiten mit dem Vortexer mechanisch gemischt, was eine gleichmäßige Verteilung beider Komponenten gewährleistet. Der verwendete Primärantikörper war im Lieferumfang bereits 1:50 verdünnt und wurde nicht weiter verdünnt. Nach Ablauf der 60-minütigen Inkubation mit NGS in der Feuchtekammer wurden die Objektträger wieder auf Papiertüchern abgeklopft um, das NGS zu entfernen. Als nächstes wurde der Primärantikörper auf die Positivkontrollen und das Kaninchenserum auf die Negativkontrolle pipettiert. Hierbei haben sich im Laufe der Durchgänge in Abhängigkeit von der Größe der Gewebeproben 110 – 130 µl Flüssigkeit als ausreichend erwiesen. Die Gewebeproben der Leber benötigten im Vergleich zu den schmalen Gewebeproben der Gallenblase tendenziell etwas mehr Flüssigkeit. Während der beschriebenen Arbeitsschritte galt es besondere Vorsicht walten zu lassen, da beim Pipettieren oder Abklopfen unter keinen Umständen kleine Spritzer des Primärantikörpers auf die Negativkontrolle kommen durften, da dies ein falsch positives Ergebnis zur Folge hätte. Bevor die Gewebe anschließend in der Feuchtekammer über Nacht inkubiert wurden, galt es zu prüfen, ob das Gewebe ausreichend mit Flüssigkeit bedeckt und die Umrandung mit dem Fettstift nach wie vor intakt war, sodass es über Nacht nicht zu einer Austrocknung des Gewebes kommen würde.

Schritt 5 – Inaktivierung der Peroxidase

An der Umsetzung des Substrates, welches für die Farbgebung sorgt, ist das Enzym Peroxidase beteiligt. Da auch im untersuchten Gewebe endogene Peroxidasen vorkommen, ist es wichtig, diese vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper zu inaktivieren, sodass ein falsch-positives Ergebnis verhindert werden konnte. Am zweiten Tag der IHC wurde der ungebundene Primärantikörper durch zweimal zwei Minuten Waschen in PBS abgespült. Anschließend wurden die endogenen Peroxidasen über den Mechanismus einer kompetitiven Hemmung mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) inaktiviert (Lang, 2012). Auch nach diesem Schritt wurden die Schnitte erneut zweimal für zwei Minuten in PBS gewaschen.

Schritt 6 – Sekundärantikörper

Nach dem Abklopfen des Primärantikörpers von der Positivkontrolle und des Kaninchensерums von der Negativkontrolle wurde auf alle Schnitte der Sekundärantikörper in einer 1:500 Verdünnung pipettiert. Auch hierbei erwiesen sich etwa 130 µl als ausreichend. Nach 60 Minuten wurde der überschüssige Sekundärantikörper durch erneutes zweimaliges Waschen in PBS (je zwei Minuten) entfernt. Bei dem Sekundärantikörper handelte es sich um einen IgG-Antikörper von Ziegen, welcher mit einem Enzym, der HRP (horseradish peroxidase, zu Deutsch: Meerrettichperoxidase), konjugiert wurde. Der Sekundärantikörper bindet mit seiner Fab-Region an die Fc-Region des Primärantikörpers, wodurch das konjugierte Enzym aktiviert und das farbgebende Substrat DAB umgesetzt wird. Das Chromogen DAB wurde unter dem Mikroskop auf die Schnitte pipettiert, während die Zeit bis zur deutlichen Braunfärbung gestoppt wurde. Die Farbreaktion konnte dann durch das Tauchen der Schnitte in PBS gestoppt werden. Für den ersten Durchgang der IHC wurde die Reaktion des Enzyms nach einer Zeit von acht Minuten gestoppt, wobei schon nach einer Zeit von etwa 6 Minuten keine deutliche Verstärkung der Braunfärbung mehr zu sehen war. Im zweiten und dritten Durchgang der IHC wurde dann entsprechend der Zeit des ersten Durchgangs nach 6:30 min. gestoppt.

Schritt 7 - Gegenfärbung

Für eine bessere Abgrenzung der TRPC3-positiven von den TRPC3-negativen Strukturen wurden die Schnitte noch gegengefärbt. Hierzu wurde Hämatoxylin verwendet, was in einer Blaufärbung der TRPC3-negativen Strukturen resultierte.

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte noch in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und konnten zuletzt eingedeckt werden.

5.4.2.4 Negativkontrolle

Bei jedem Färbedurchgang immunhistochemischer Färbungen wird auch eine Negativkontrolle durchgeführt. Um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurde hierbei stets der Schnitt eines Präparates verwendet, welches immunhistochemisch auch als Positivkontrolle gefärbt wurde.

	IHC 1	IHC 2	IHC 3
Positivkontrolle	22/19 LHDd	22/23 Gcoll	22/19 GF
	22/23 LHDd	22/23 LHSd	22/36 GF
	22/18 LHDd	22/23 LHDv	
	22/26 LHDd	22/31 GF	
	22/35 LHDd	22/23 GF	
	22/36 LHDd	22/23 LQ	
	22/30 LHDd	22/26 GF	
	22/31 LHDd	22/23 Gcorp	
	22/23 LC	22/23 LHSv	
Negativkontrolle	22/30 LHDd	22/23 LHSd	22/36 GF
DAB-Zeit	8 min.	6:30 min.	6:30 min.

Tabelle 9: Übersicht über die Färbedurchgänge der Immunhistochemie

Anmerkung: min.= Minute, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin

Für die Negativkontrolle wird an Stelle des Primärantikörpers nicht-immunes Kaninchenserum verwendet. Alle anderen Schritte der Immunhistochemie wurden identisch zu den Positivkontrollen durchgeführt. Wie bereits erläutert, dient die Negativkontrolle der Verifizierung eines positiven Ergebnisses. Bleibt die Negativkontrolle bei einem ansonst positiven Ergebnis ungefärbt, handelt es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um ein richtig-positives Ergebnis. Ist die Negativkontrolle, neben den Positivkontrollen, jedoch auch gefärbt, so ist von einem falsch-positiven Ergebnis auszugehen. Die möglichen Ausgänge der IHC und ihre Ursachen werden im Rahmen der Diskussion im weiteren Verlauf dieser Arbeit erläutert.

5.4.2.5 Ausgewählte Abbildungen der IHC-Färbungen

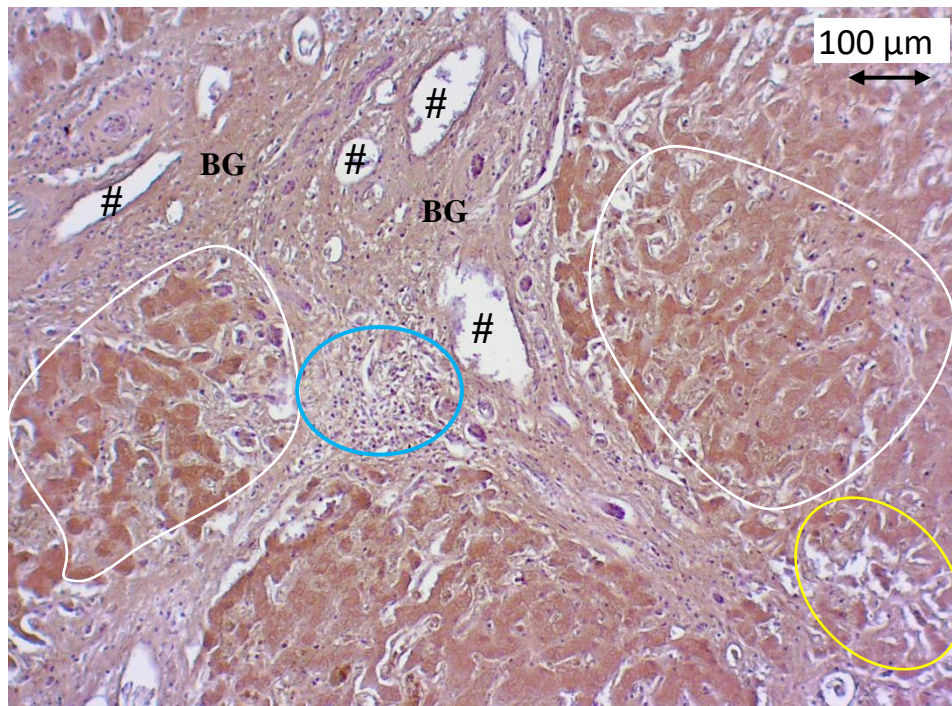


Abbildung 17: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/35 LHDd 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 17 zeigt einen Gewebeschnitt des Lobus hepatis dexter der Facies diaphragmatica. In dem Ausschnitt der Gewebeprobe sind ein Periportalfeld und die zu Balken angeordneten, etwas dunkler gefärbten Hepatozyten angeschnitten. Innerhalb des Bindegewebes des Periportalfeldes finden sich Anschnitte etlicher Gefäße, einige davon sind beispielhaft mit einer Raute gekennzeichnet. Ausgehend von dem Periportalfeld findet sich auch Bindegewebe zwischen den Hepatozyten, was ein Anzeichen für eine Fibrosierung des Lebergewebes ist. Zwei Stellen, in denen sich Bindegewebe zwischen den Hepatozyten befindet, sind beispielhaft weiß umrandet. Darüber hinaus sind die Lebersinusoiden mehrheitlich gestaut und es finden sich Bereiche, in denen bereits autolytische Veränderungen ersichtlich sind (gelb umrandet). Innerhalb des Bindegewebes sind in manchen Bereichen relativ viele Lymphozyten zu sehen, dies könnte auf einen entzündlichen Prozess hinweisen. Einer dieser Bereiche ist beispielhaft blau umrandet.

= Gefäßanschnitt

BG = Bindegewebe des Periportalfeldes

Weißer Umrandung = Fibrosierung

Gelber Umrandung = Autolytische Veränderungen

Blaue Umrandung = Infiltration von Lymphozyten

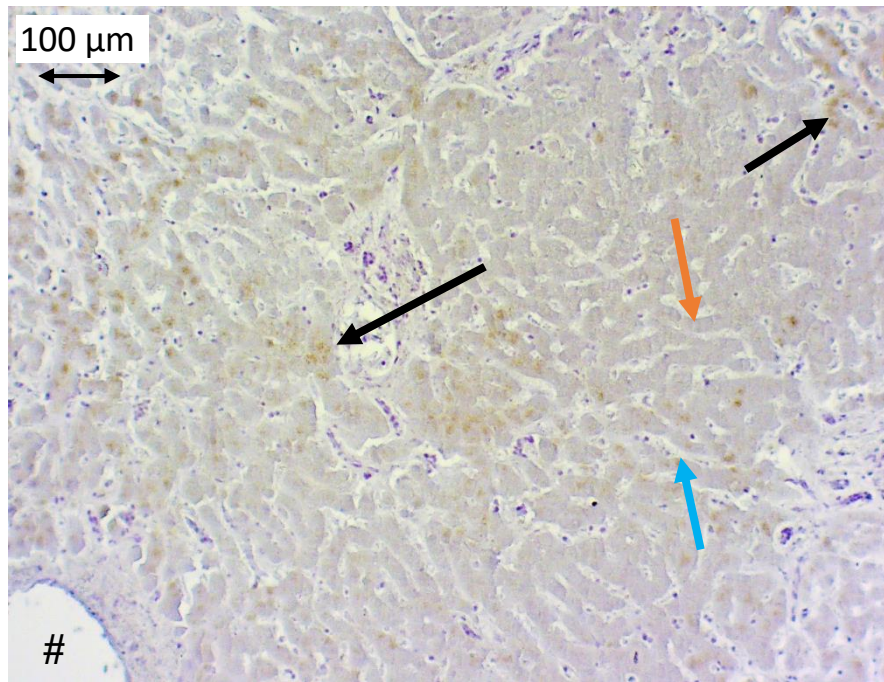


Abbildung 18: IHC 1 Negativkontrolle Spenderin 22/30 LHDd 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 18 zeigt einen Gewebeschnitt des rechten Leberlappens der Facies diaphragmatica. Die Gewebeprobe diente in der IHC als Negativkontrolle und ist entsprechend nicht braun gefärbt. Die schwarzen Pfeile zeigen auf eine dezent rot-bräunliche Granulierung innerhalb der Hepatozyten. Hierbei handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um Lipofuscin und Eisenablagerungen. Lipofuscin ist ein Abbauprodukt des Fettstoffwechsels (siehe auch Abbildung 14). Dies ist ein altersentsprechender Befund. Der Gewebeschnitt weist Zeichen eines chronischen Stauungsprozesses auf, was zu der Herzinsuffizienz passt, die als Grunderkrankung in der Vorgeschichte beschrieben wurde. In der unteren, linken Ecke des Bildes ist das Lumen eines Gefäßes angeschnitten, das mit einer Raute gekennzeichnet ist.

= Gefäßanschnitt

Schwarzer Pfeil = Ablagerung von Lipofuscin und Eisen

Orangener Pfeil = Leberzellbälkchen

Hellblauer Pfeil = Sinusoide

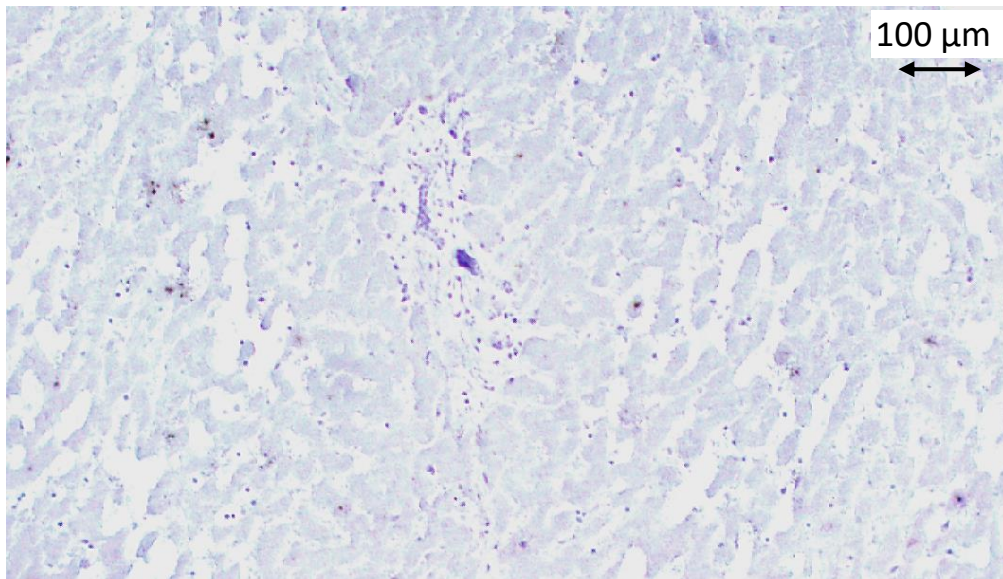


Abbildung 19: IHC 2 Negativkontrolle Spenderin 22/23 LHSd 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 19 zeigt einen Gewebeschnitt des linken Leberlappens der Facies diaphragmatica. Die Gewebeprobe diente in dem zweiten Färbedurchgang der Immunhistochemie als Negativkontrolle. Entsprechend ist die Probe nicht braun gefärbt. Diese Abbildung ist noch eingefügt, um einen Vergleich zu der vorherigen Negativkontrolle zu ermöglichen, bei der durch die Lipofuscin- und Eisenablagerungen ein etwas anderes Farbbild zustanden gekommen ist.

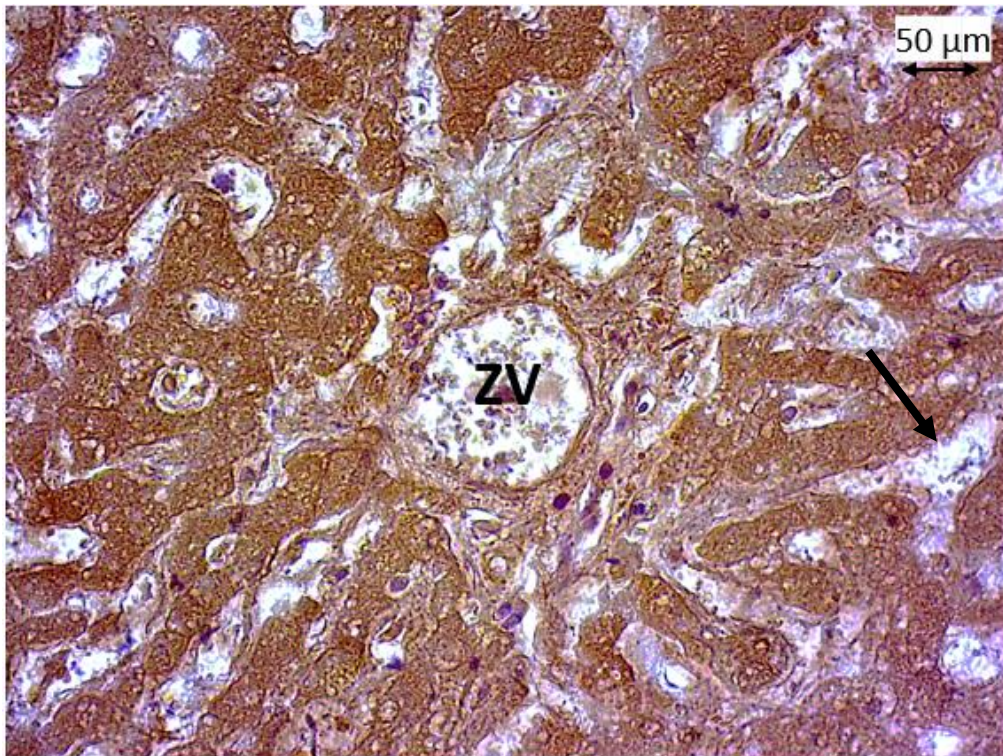


Abbildung 20: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/23 LHSv 40x Vergrößerung

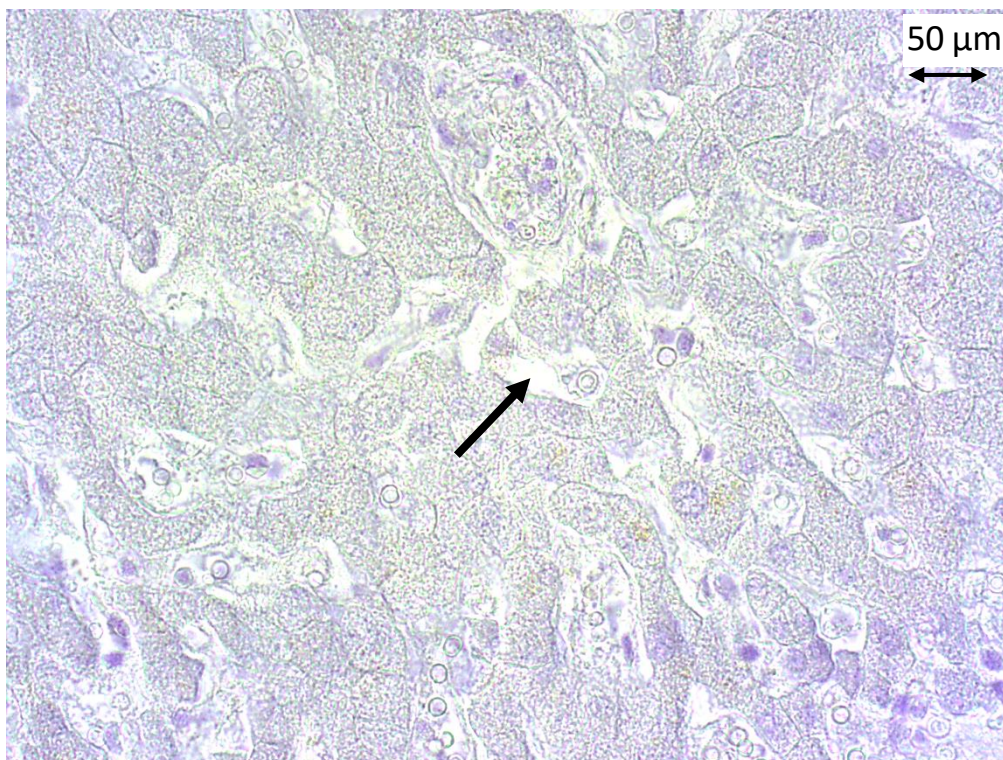


Abbildung 21: IHC 1 Negativkontrolle Spenderin 22/30 LHDd 40x Vergrößerung

Anmerkung zu Abbildung 20 und 21: Abbildung 20 zeigt einen Gewebeschnitt des linken Leberlappens der Facies visceralis, Abbildung 21 zeigt einen Gewebeschnitt des rechten Leberlappens der Facies diaphragmatica. Chronisch gestaute Sinusoide sind in beiden Abbildungen zu erkennen (gekennzeichnet durch einen schwarzen Pfeil). Dies zeigt sich in einer veränderten Architektur der Leberläppchen, wobei es unter anderem zu einer Aufweitung der Lebersinusoiden kommt. Dies kann unter anderem Folge einer unzureichenden Pumpfunktion des rechten Herzens sein, was in einem Rückstau des Blutes resultieren kann. Körperspenderin 22/30 (Abbildung 21) litt an einer Herzinsuffizienz, die ein solches Bild der Leber verursachen kann. Die Zellgrenzen der einzelnen Hepatozyten sind nur noch schwer abgrenzbar. Trotz dieser Pathologien ist die Anordnung der Hepatozyten um die Zentralvene in Abbildung 20 schön erhalten.

Schwarzer Pfeil = gestaute Sinusoide

ZV = Zentralvene

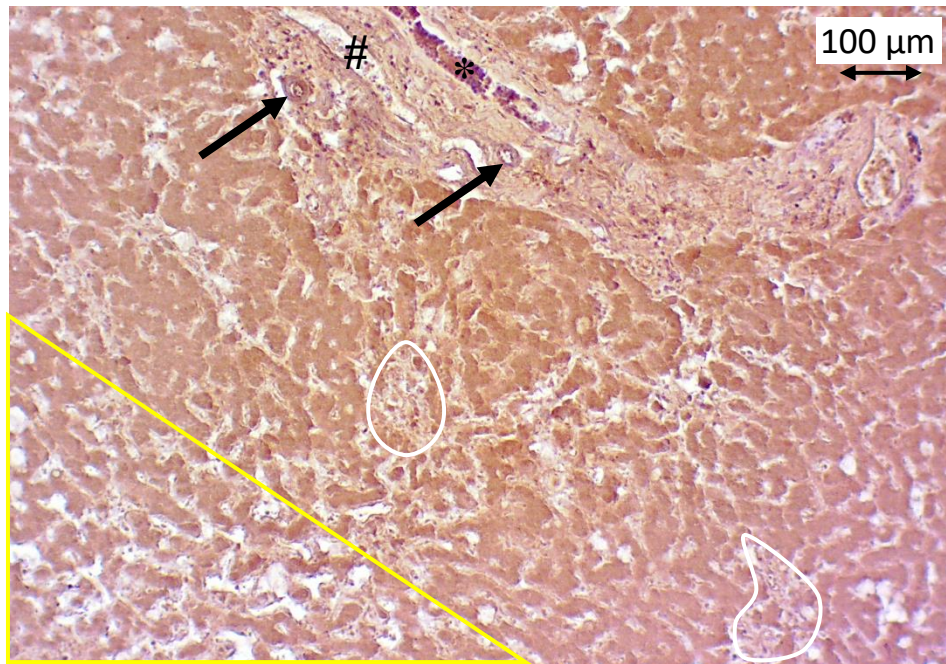


Abbildung 22: IHC 2 Positivkontrolle Spenderin 22/23 LHSv 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 22 zeigt einen Gewebeschnitt des linken Leberlappens der Facies visceralis, der in der IHC als Positivkontrolle verwendet wurde. Zu sehen sind die zu Balken angeordneten Hepatozyten und ein Periportalfeld. Dieses beinhaltet Anschnitte multipler Gefäße, unter anderem eine Vene im Längsschnitt, welche an ihrem relativ großen Lumen und der dünneren Wand zu identifizieren ist. Die schwarzen Pfeile deuten auf Arterien, welche ein kleineres Lumen und eine kräftigere Wanddicke haben. Auch ein interlobulärer Gallenkanal ist im Längsschnitt getroffen, der an dem prismatischen Epithel, dass ihn auskleidet zu erkennen ist. Im unteren linken Teil des Bildes ist ein Bereich zu erkennen, an welchem autolytische Prozesse eingetreten sind, dieser Bereich ist mit einem gelben Dreieck gekennzeichnet. Auch fibrotische Veränderungen lassen sich an diesem Gewebeschnitt erkennen, die beispielhaft weiß umfahren sind.

= Längsschnitt einer Vene

* = Längsschnitt eines interlobulären Gallenkanals

Schwarzer Pfeil = Arterie

Gelbes Dreieck = Autolytische Veränderungen

Weißer Umrandung = Fibrose

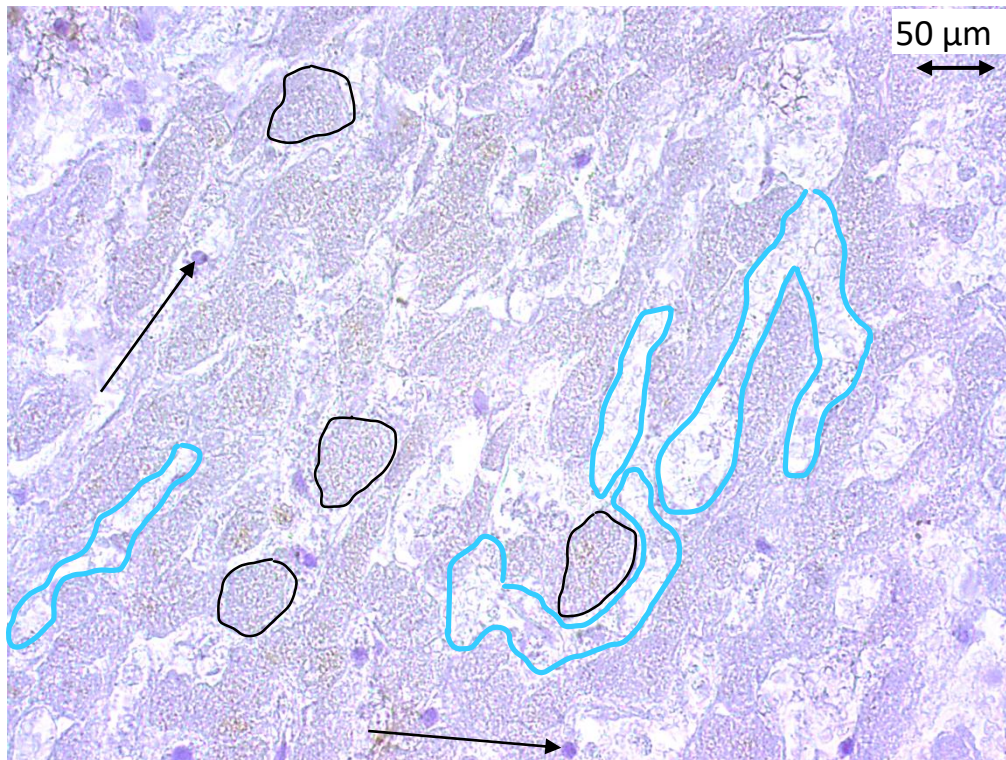


Abbildung 23: IHC 2 Negativkontrolle Spenderin 22/23 LHSd 40 x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 23 zeigt einen Gewebeschnitt der Facies diaphragmatica des linken Leberlappens. Diese Probe wurde als Negativkontrolle für die Immunhistochemie verwendet. Zu sehen sind Hepatozyten, welche beispielhaft schwarz umfahren sind. Mehrheitlich sind die Zellgrenzen nicht mehr eindeutig nachzuverfolgen, was möglicherweise die Folge chronischer Stauung ist. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen Zellkerne. Des Weiteren sind die Sinusoide beispielhaft an manchen Stellen blau umfahren, diese wirken aufgeweitet, was wiederum auf einen chronischen Stauungsprozess, beispielsweise im Rahmen eines gestörten venösen Abflusses, deutet.

Schwarze Umrandung = Hepatozyt

Hellblaue Umrandung = Sinusoide

Schwarzer Pfeil = Zellkern

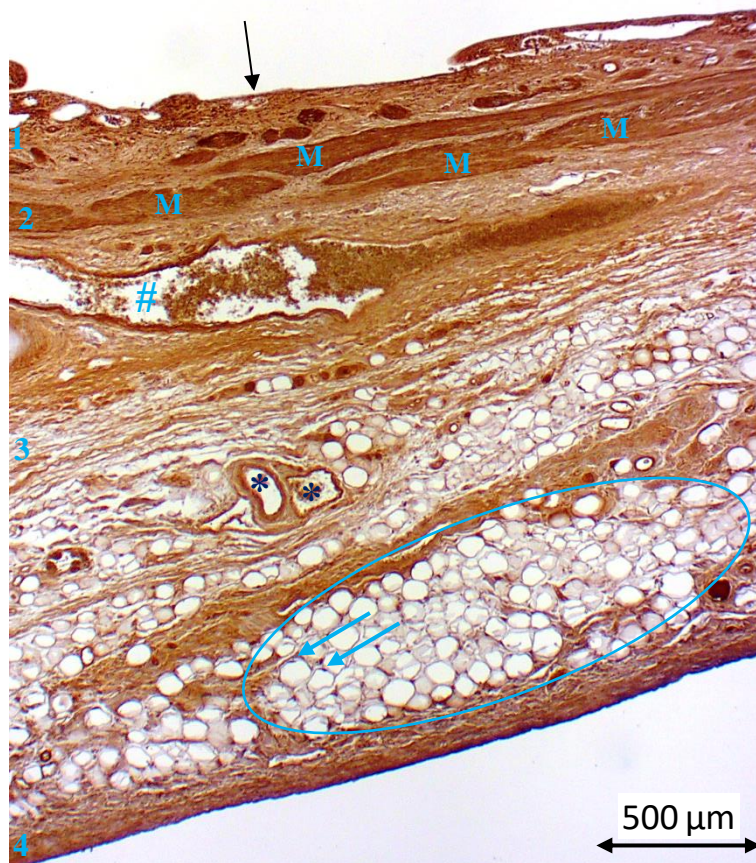


Abbildung 24: IHC 3 Positivkontrolle Spenderin 22/19 GF 4x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 24 zeigt einen Querschnitt durch die Wand des Fundus der Gallenblase. Der schwarze Pfeil deutet auf die Innenschicht der Gallenblase, die Lamina epithelialis, welche Teil der Tunica mucosa ist. Bei dieser Probe der Gallenblase sind die Falten der Schleimhaut komplett verstrichen, die Rokitansky-Aschoff-Krypten sind nicht mehr erkennbar. Dies kann beispielsweise das Bild einer chronischen Entzündung der Gallenblase sein, die chronische Cholezystitis. Die nach innen folgenden Schichten der Gallenblase sind mit Nummern gekennzeichnet. Innerhalb der Tela subserosa findet sich eine Ansammlung von Adipozyten (Fettzellen). Ein Teil dieses Bereichs ist dunkelblau umrandet. Beispielfhaft sind die Zellkerne zweier Adipozyten mit dunkelblauen Pfeilen markiert, diese weisen eine charakteristische Siegelringform auf. Ein großkalibriges Gefäß mit Erythrozyten darin ist mit einer Raute markiert, zwei kleine Gefäße werden durch Sterne identifiziert.

1 = Tunica mucosa; 2 = Tunica muscularis; 3 = Tela subserosa; 4 = Tunica serosa

= Anschnitt eines großkalibrigen venösen Gefäßes

M = Anschnitte der scherenarterartigen Muskelzüge der Tunica muscularis

* = Anschnitte von Gefäßen

Hellblauer Pfeil = Siegelringartiger Zellkern der Adipozyten

Hellblaue Umrandung = Ansammlung von Fettzellen

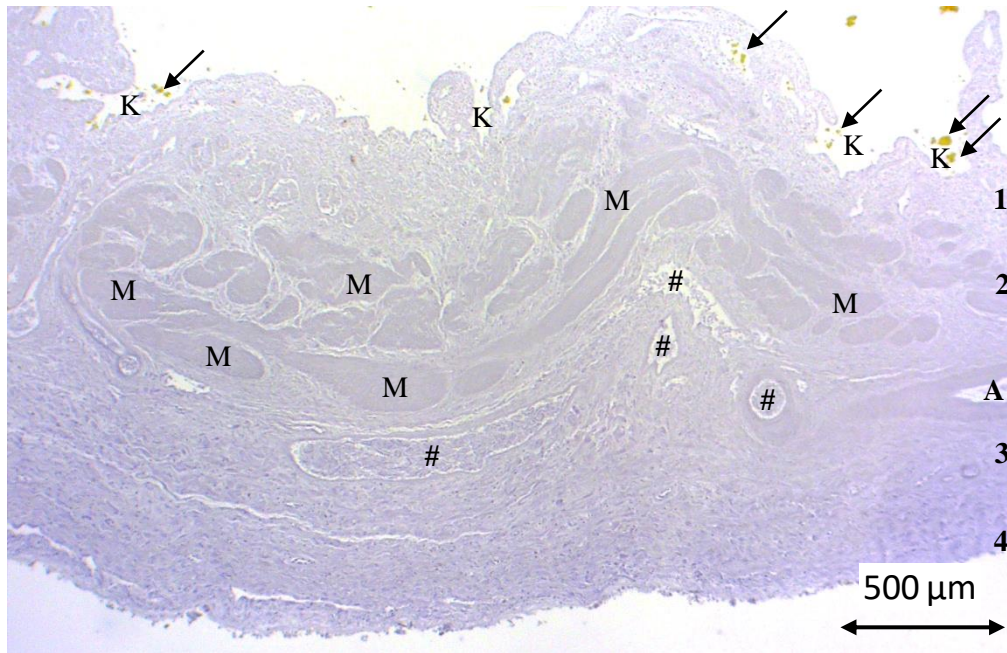


Abbildung 25: IHC 3 Negativkontrolle Spenderin 22/36 GF 4x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 25 zeigt eine Negativkontrolle der Immunhistochemischen Färbung. Die Probe entstammt dem Fundus der Gallenblase. Im Lumen der Gallenblase sind noch Reste der Galle zu erkennen. Sie sind durch kurze schwarze Pfeile gekennzeichnet. Die innerste Schicht der Gallenblase, die Lamina mucosa ist zu Falten aufgeworfen, wodurch sich die charakteristischen Rokitansky-Aschoff-Krypten ausbilden, die mit einem „K“ markiert sind. Die Schichten des Querschnittes der Gallenblase sind von innen nach außen nummeriert. Einige der Muskelzüge, die durch die Tunica muscularis verlaufen, sind beispielhaft mit einem „M“ gekennzeichnet. In der Tela subserosa finden sich etliche Gefäßanschnitte, ein Teil davon ist mit einer Raute gekennzeichnet. Am rechten Rand des Bildes ist eine Arterie angeschnitten, welche an ihrer kräftigen Media zu identifizieren ist.

1 = Tunica mucosa; 2 = Tunica muscularis; 3 = Tela subserosa; 4 = Tunica serosa

A = Arterie

M = Scherengitterartige Muskelzüge der Tunica muscularis

K = Rokitansky-Aschoff-Krypten

Schwarzer Pfeil = Rest von Galle

= Gefäßanschnitte

5.4.3 Peptidinkubation (Spezifitätsnachweis)

Für den Anti-TRPC3-Antikörper, der in dieser Arbeit verwendet wird, wurde einmalig ein Spezifitätsnachweis in Form einer Peptidinkubation durchgeführt. Mit der Peptidinkubation kann nachgewiesen werden, dass der verwendete Primärantikörper spezifisch das zu bindende Antigen identifiziert. Dies funktioniert, indem es zu einer Bindung zwischen dem Kontrollpeptid und dem Primärantikörper kommt. Folglich kann der Primärantikörper mit seiner Fab-Region nur noch vergleichsweise weniger stark an die Antigene des TRPC3-Kanals binden, die Farbreaktion zeigte sich somit schwächer ausgeprägt.

Für die Durchführung der Peptidinkubation wurde zunächst ein Präparat ausgewählt, welches sich als Positivkontrolle mit DAB gut anfärben ließ. Somit kann das positive Ergebnis der Immunhistochemie anschließend mit dem Ergebnis der Peptidinkubation verglichen werden. Das Kontrollpeptid wird im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt, wo nach dem Eintreffen am Institut eine Lagerung für sieben Tage möglich ist. Am Tag vor der Immunhistochemie beginnen die Vorbereitungen für die Peptidinkubation. Dafür werden 40 µg des Kontrollpeptids in einem Reaktionsgefäß mit 20 µl PBS aufgelöst. Unter leichtem Schwenken für etwa zehn Minuten hat sich der Peptidkristall gelöst. In einem nächsten Schritt wurden 130 µl des TRPC3-Primärantikörpers mit dem Kontrollpeptid in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Hier galt es zu beachten, dass ein Endvolumen erreicht wird, mit dem der zu inkubierende Schnitt vollständig bedeckt sein würde. Das Reaktionsgefäß kam anschließend zur Inkubation über Nacht in den Kühlschrank. Bei der IHC, die am nächsten Tag stattfand, wurde dann an Stelle des Primärantikörpers, die inkubierte Lösung auf den Schnitt pipettiert.

Für einen erfolgreichen Spezifitätsnachweis zeigte sich die peptidinkubierte Probe im Vergleich zu der Positivkontrolle deutlich schwächer gefärbt. Die Negativkontrolle, welche zur Validierung der Ergebnisse mitgeführt wurde, zeigte sich als nicht gefärbt.

Die Ergebnisse der Peptidinkubation für den hier verwendeten Antikörper sind dem Anhang zu entnehmen.

6 Ergebnisse

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte manuell an einem Lichtmikroskop. Zuvor wurden Kriterien zur Beurteilung der Schnitte festgelegt, die kategorisieren sollten, wie stark das Farbsignal des jeweiligen Schnittes ausgeprägt ist. Eine erste Auswertung wurde von mir selbst durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte von einer neutralen Person, ohne entsprechende Vorkenntnisse, begutachtet und ausgewertet. Für diese Fremdauswertung wurden einer unabhängigen Person die entsprechenden Beurteilungskriterien ausgehändigt und die Person wurde in die Bedienung des Mikroskops eingewiesen. Folgende Tabelle veranschaulicht die Kriterien für die Zuordnung des Gewebeschnittes zu einer Farbsignalstärke.

Stärke des Farbsignals	Beurteilungskriterien
Kein Farbsignal	Es ist keine Braunfärbung des Gewebes zu erkennen.
Schwaches Farbsignal	Weniger als 50 % des Gewebes sind braun gefärbt.
Mittleres Farbsignal	Mehr als 50 % des Gewebes sind braun gefärbt.
Starkes Farbsignal	Mehr als 90 % des Gewebes sind braun gefärbt.

Tabelle 10: Beurteilungskriterien der Auswertung der IHC-Proben

Für diese Auswertung wurden 20 Gewebeproben einbezogen. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Positivkontrollen. Die Proben wurden in insgesamt drei immunhistochemischen Färbungen bearbeitet, da bei jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle mitgeführt wurde. Für die Auswertung wurde das Schema einer Kreuzauswertung genutzt. Dafür wurden alle LHDd-Proben (Lobus hepatis dexter, Facies diaphragmatica) sowie alle GF-Proben (Gallenblase, Fundus) und alle Proben der Körperspenderin 22/23 ausgewertet. Da nach mehreren Kriterien ausgewertet wurde, sind manche Gewebeproben auch in mehrere Auswertungskategorien einbezogen worden.

Folgende Tabelle veranschaulicht das Auswertungsschema.

	LHDd	LHDv	LHSd	LHSv	LC	LQ	GF	Gcorp	Gcoll
22/19	✓						✓		
22/23	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22/18	✓								
22/26	✓						✓		
22/35	✓								
22/36	✓						✓		
22/30	✓								
22/31	✓						✓		

Tabelle 11: Übersicht über die Proben, die in die Auswertung miteinbezogen wurden.

Ein grün ausgefülltes Feld bedeutet, dass die jeweilige Probe entnommen wurde. Ein Häkchen bedeutet, dass die Probe Bestandteil der Auswertung war.

Bei allen der 20 Proben (Positivkontrollen), die ausgewertet wurden, konnte ein positives Färbesignal in der IHC festgestellt werden. Die Farbintensität variierte dabei zwischen einem starken und mittleren Signal. Für keine der Proben wurde kein oder ein schwaches Signal festgestellt. Alle der drei Negativkontrollen, die mitgeführt wurden, wiesen auch ausschließlich eine deutliche Blaufärbung auf und zeigten somit richtigerweise ein negatives Ergebnis.

Wie bereits erläutert, ist bei einem positiven Ergebnis der Positivkontrollen und einem negativen Ergebnis der Negativkontrollen mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem richtig-positiven Ergebnis auszugehen. Um ein falsch-positives Ergebnis handelt sich womöglich, wenn die Negativkontrolle und die Positivkontrollen braun gefärbt sind. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die verwendeten Antikörper nicht spezifisch binden. Ein solcher Fehler wurde in dieser Arbeit minimiert, da ein Knockout-validierter Antikörper Verwendung fand, für den zusätzlich ein erfolgreicher Spezifitätsnachweis erbracht wurde. Eine weitere Ursache könnte in einer nicht ausreichenden Blockierung der endogenen Peroxidasen liegen. Dies wurde verhindert, indem strikt nach dem bereits etablierten Protokoll agiert wurde.

Ein falsch-negatives Ergebnis würde beispielsweise dadurch bedingt sein, dass die Antigene im Rahmen der vorbereitenden Schritte der IHC nicht ausreichend demaskiert wurden. Somit könnte der Primärantikörper nicht an das entsprechende Antigen binden. Auch Mängel des Primär- und Sekundärantikörpers durch falsche Lagerung oder Verunreinigungen der verwendeten chemischen Substanzen könnten zu einem falsch-negativen Ergebnis führen.

Folgende Tabelle veranschaulicht die möglichen Ergebnisse der IHC im Zusammenhang mit der Expression von TRPC3 in Form einer Vierfeldertafel.

Färbung des Schnittes Expression TRPC3	Braune Färbung	Keine braune Färbung
TRPC3 wird exprimiert	Richtig-positives Ergebnis (Negativkontrolle ist ungefärbt)	Falsch-negatives Ergebnis
TRPC3 wird nicht exprimiert	Falsch-positives Ergebnis (Negativkontrolle ist gefärbt)	Richtig-negatives Ergebnis

Tabelle 12: Vierfeldertafel zu möglichen Ergebnissen der IHC

Eine ausführliche Auswertung der Ergebnisse schließt sich in den folgenden Abschnitten an.

6.1 Auswertung des Lebergewebes

Für die Auswertung des Lebergewebes wurden 13 (n=13) Gewebeproben von allen acht (n=8) Körperspenderinnen einbezogen. Alle diese Gewebeproben wiesen ein positives Signal in der immunhistochemischen Färbung auf. Die Intensität des Signals wurde sowohl in der Eigen- als auch in der Fremdauswertung fast durchgehend der Kategorie „Starkes Signal“ zugeordnet. Lediglich einer Probe wurde ein mittleres Signal zugewiesen. Die Eigenauswertung und die Fremdauswertung lieferten hierbei sehr ähnlich Ergebnisse.

Folgende Tabellen zeigen die Ergebnisse der Auswertung der Lebergewebes.

Eigenauswertung					
Probe	Spender*in	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
LHDd	22/19				X
	22/31				X
	22/18				X
	22/26				X
	22/35			X	
	22/36				X
	22/30				X
LHDv	22/23				X
LHSd					X
LHSv					X
LC					X
LQ					X

Tabelle 13: Eigenauswertung der Proben des Lebergewebes

Fremdauswertung					
Probe	Spender*in	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
LHDd	22/19				X
	22/31				X
	22/18				X
	22/26				X
	22/35				X
	22/36				X
	22/30				X
LHDv	22/23				X
LHSd					X
LHSv					X
LC					X
LQ					X

Tabelle 14: Fremdauswertung der Proben des Lebergewebes

Anmerkung: Das „X“ bedeutet, dass diese Kategorie für die Zuordnung des Schnittes zu einem Farbsignal gewählt wurde.

Das folgende Bild zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Proben des Lebergewebes, die immunhistochemisch gefärbt wurden.

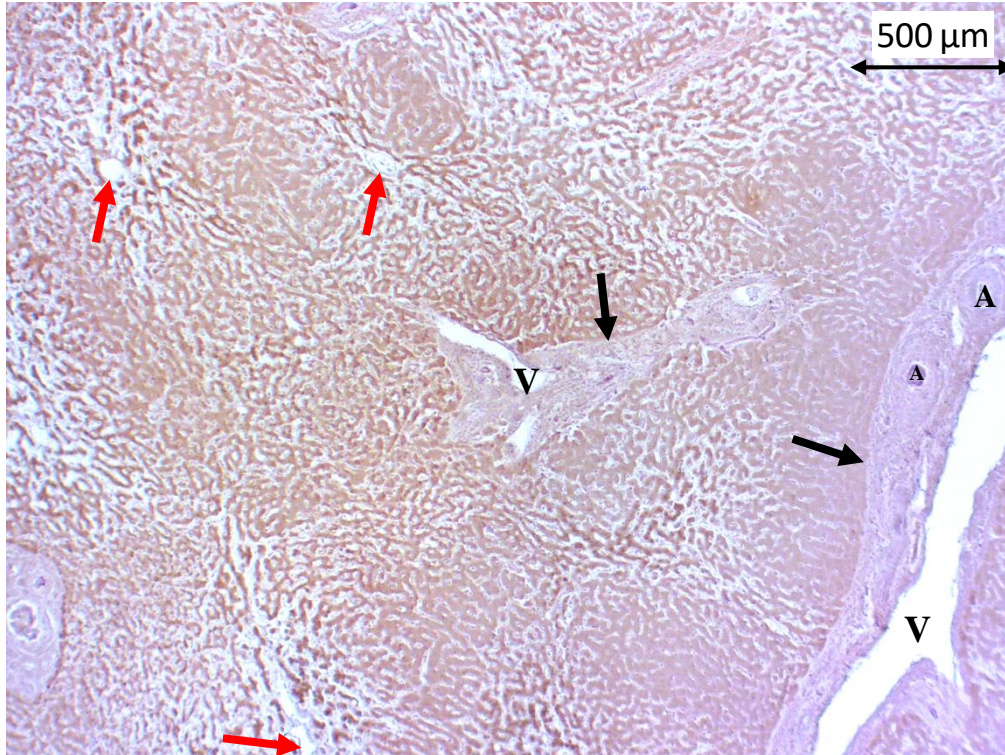


Abbildung 26: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/30 LHDd 4x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 26 zeigt eine Positivkontrolle der IHC. Das dargestellte Gewebe entstammt der Facies diaphragmatica des rechten Leberlappens. Der Schnitt zeigt das Bild einer chronischen Leberstauung, trotz dessen ist die grundlegende Leberarchitektur teilweise noch erhalten. An manchen Stellen ist die sternförmige Architektur um die Zentralvenen allerdings gestört. Ein Teil der Hepatozyten-Balkchen sieht relativ normal aus, in der direkten Umgebung der Zentralvenen sind die Sinusoide allerdings deutlich erweitert. Darüber hinaus sind mehrere angeschnittene periportale Felder zu erkennen, welche durch schwarze Pfeile markiert sind. Anschnitte mehrerer Zentralvenen sind ebenfalls zu erkennen, die durch rote Pfeile gekennzeichnet sind.

Schwarzer Pfeil = Periportalfeld

Roter Pfeil = Zentralvene

V = Vena interlobularis

A = Arteria interlobularis

6.2 Auswertung des Gallenblasengewebes

Für die Auswertung des Gewebes der Gallenblase wurden 7 (n=7) Gewebeproben von fünf (n=5) Körperspenderinnen einbezogen. Jede dieser Gewebeproben zeigte ein positives Signal in der immunhistochemischen Färbung. Die Intensität des Signals wurde entweder der Kategorie „mittleres Signal“ oder der Kategorie „starkes Signal“ zugeordnet. Keiner der Proben wurde kein oder ein schwaches Signal zugeordnet. Die Eigenauswertung und die Fremdauswertung lieferten hierbei ähnliche Ergebnisse. Auf mögliche Gründe für Unterschiede zwischen Eigen- und Fremdauswertung wird im folgenden Kapitel (Diskussion) näher eingegangen.

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Auswertung des Gewebes der Gallenblase.

Eigenauswertung					
Probe	Spender*in	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
GF	22/19				X
	22/31				X
	22/26			X	
	22/36			X	
	22/23			X	
Gcorp					X
Gcoll					X

Tabelle 15: Eigenauswertung der Proben des Gallenblasengewebes

Fremdauswertung					
Probe	Spender*in	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
GF	22/19				X
	22/31			X	
	22/26			X	
	22/36				X
	22/23			X	
Gcorp				X	
Gcoll				X	

Tabelle 16: Fremdauswertung der Proben des Gallenblasengewebes

Anmerkung: Das „X“ bedeutet, dass diese Kategorie für die Zuordnung des Schnittes zu einem Farbsignal gewählt wurde.

Das folgende Bild zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Proben des Gewebes der Gallenblase mit einem positiven Ergebnis in der immunhistochemischen Färbung.

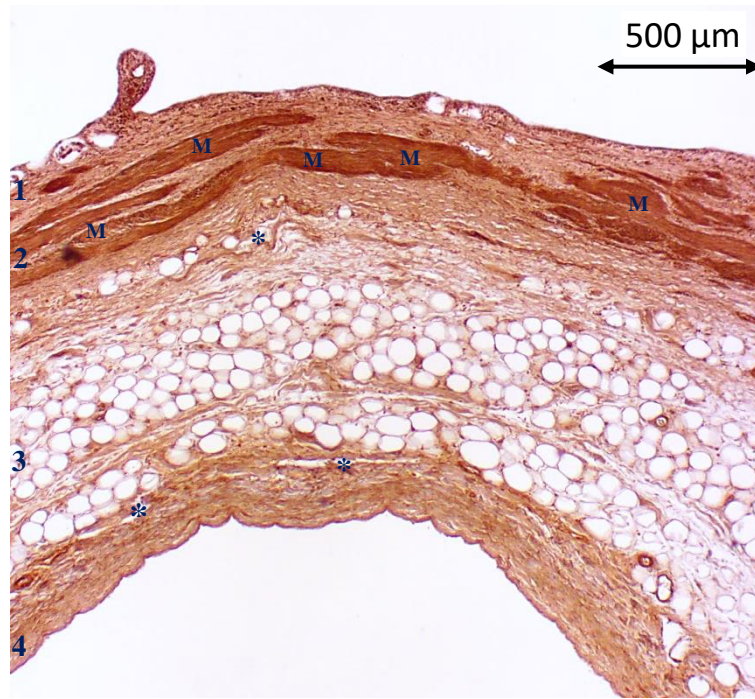


Abbildung 27: IHC 3 Positivkontrolle Spenderin 22/19 GF 4x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 27 zeigt eine Gewebeprobe des Fundus der Gallenblase, welche als Positivkontrolle immunhistochemisch gefärbt wurde. Die Schichten der Gallenblase sind von innen beginnend nummeriert. Die innerste Schicht, die Tunica mucosa ist nicht mehr zu Falten aufgeworfen. Auch die charakteristischen Rokitansky-Aschoff-Krypten sind nicht mehr erkennbar. Die Muskelzüge der Tunica muscularis sind mit einem „M“ identifiziert. Eine massive Ansammlung von Fettzellen durchzieht die Tela subserosa. Wenige kleinkalibrige Gefäße sind zu erkennen, die beispielhaft mit einem Stern gekennzeichnet sind.

1 = Tunica mucosa; 2 = Tunica muscularis; 3 = Tela subserosa; 4 = Tunica serosa

M = Muskelzüge der Tunica muscularis

* = Anschnitte kleiner Gefäße

6.3 Auswertung der Proben von Körperspenderin 22/23

Für die Auswertung der Gewebeproben von Körperspenderin 22/23 wurden alle 9 (n=9) Gewebeproben einbezogen. Dabei waren sechs (n=6) der Proben Lebergewebe und drei (n=3) der Proben Gewebe der Gallenblase. Alle Gewebeproben wiesen ein positives Signal in den immunhistochemischen Färbungen auf. Die Intensität des Signals entsprach durchgehend einem mittleren oder starken Signal. Keiner der Proben wurde kein Signal oder ein schwaches Signal zugeordnet. Die Eigenauswertung und die Fremdauswertung lieferten hierbei – entsprechend der vorherigen Auswertungskategorien – ähnliche Ergebnisse. Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Auswertung der Gewebeproben von Körperspenderin 22/23.

Eigenauswertung				
	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
LHDd				X
LHDv				X
LHSd				X
LHSv				X
LC				X
LQ				X
GF			X	
Gcorp				X
Gcoll				X

Tabelle 17: Eigenauswertung der Gewebeproben der Körperspenderin 22/23

Fremdauswertung				
	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
LHDd				X
LHDv				X
LHSd				X
LHSv				X
LC				X
LQ				X
GF			X	
Gcorp			X	
Gcoll			X	

Tabelle 18: Fremdauswertung der Gewebeproben der Körperspenderin 22/23

Anmerkung: Das „X“ bedeutet, dass diese Kategorie für die Zuordnung des Schnittes zu einem Farbsignal gewählt wurde.

Folgendes Bild ist ein beispielhaft ausgewählter Schnitt der Proben der Körperspenderin 22/23. Zu sehen ist ein deutliches braunes Färbesignal, was bedeutet, dass in der Immunhistochemie ein positives Signal erzielt wurde.

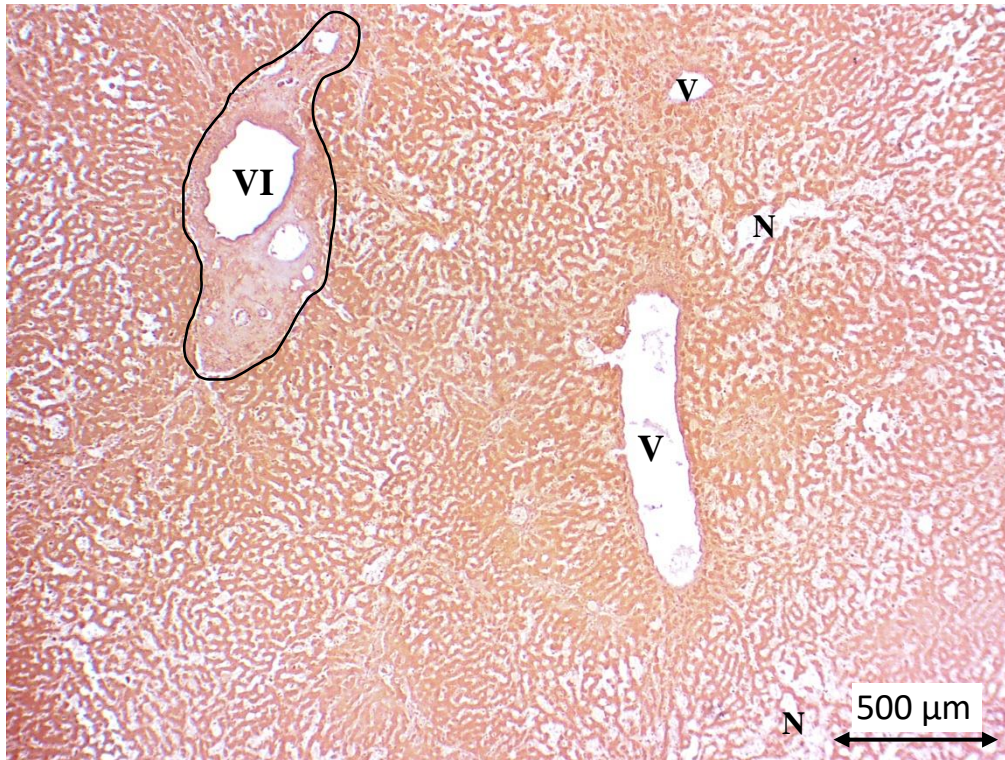


Abbildung 28: IHC 2 Positivkontrolle Spenderin 22/23 LHSv 4x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 28 zeigt eine Positivkontrolle der IHC, welche Gewebe der Facies visceralis des linken Leberlappens darstellt. Die deutliche Braunfärbung des Gewebes ist als positives Ergebnis der IHC zu werten. Ein Periportalfeld ist schwarz umrandet, es beinhaltet die Vena interlobularis, welche entsprechend gekennzeichnet ist. Des Weiteren sind Zentralvenen im Längs- und im Querschnitt getroffen. Insgesamt zeigt dieser Anschnitt des Lebergewebes viele pathologische Veränderungen. An etlichen Stellen sind die Sinusoide chronisch gestaut, sodass nur noch an manchen Stellen die charakteristische Architektur des Lebergewebes erhalten ist. Teilweise finden sich auch Areale, die bereits nekrotische Anteile aufweisen.

Schwarze Umrandung = Periportalfeld

VI = Vena interlobularis

V = Zentralvene

N = Nekrose

6.4 Vergleich zwischen Gewebe von Leber und Gallenblase

Anhand der ausgewerteten Proben ist es möglich, einen Vergleich der TRPC3-Expression zwischen Leber und Gallenblase zu machen. Es wurden dreizehn ($n = 13$) Proben von Gewebe der Leber und sieben ($n = 7$) Proben von Gewebe der Gallenblase analysiert. Insgesamt zeigen die Daten, dass es keinen gravierenden Unterschied hinsichtlich der Expression von TRPC3 zwischen Leber und Gallenblase gibt. Alle Proben zeigten ein deutliches positives Signal in der immunhistochemischen Färbung. Sowohl in der Eigen- als auch der Fremdauswertung wurden nur die Kategorien „mittleres Signal“ und „starkes Signal“ gewählt. Innerhalb dieser beiden Kategorien gibt es leichte Unterschiede, die in der Diskussion der Ergebnisse erläutert werden. Insgesamt gilt es aufgrund mehrerer Faktoren den Vergleich zwischen Gewebe von Leber und Gallenblase differenziert zu betrachten. Näheres hierzu wird im Kapitel Diskussion geschildert.

Eigenauswertung				
	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
Leber	-	-	1	12
Gallenblase	-	-	3	4

Tabelle 19: Vergleich der Proben der IHC zwischen Leber und Gallenblase; Eigenauswertung

Fremdauswertung				
	Kein Signal	Schwaches Signal	Mittleres Signal	Starkes Signal
Leber	-	-	-	13
Gallenblase	-	-	5	2

Tabelle 20: Vergleich der Proben der IHC zwischen Leber und Gallenblase; Fremdauswertung

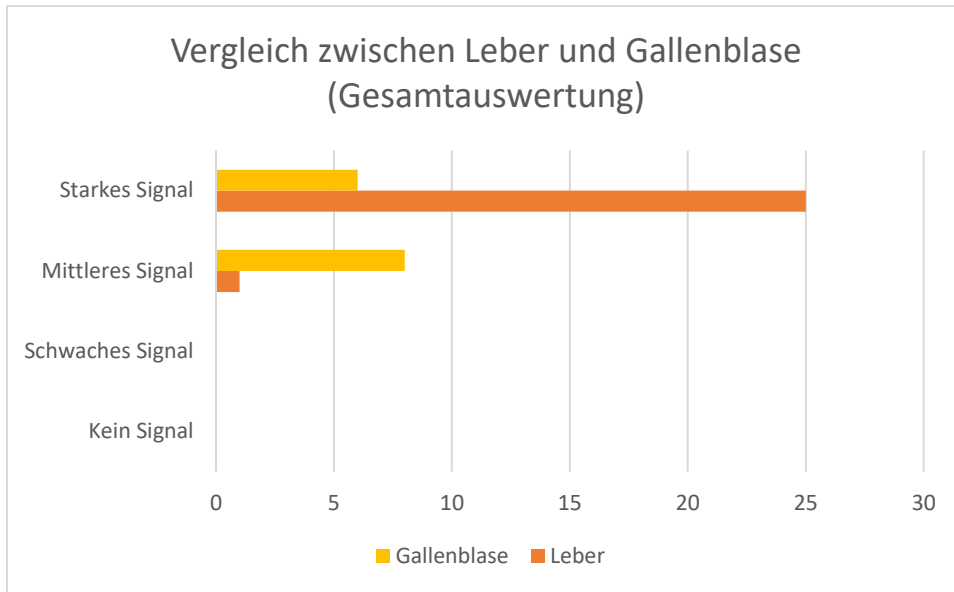


Diagramm 1: Vergleich der Intensität des Farbsignals der IHC (Gesamtauswertung)

Das Diagramm zeigt den Vergleich der Auswertung des Farbsignals der IHC zwischen Leber und Gallenblase in der Gesamtauswertung. Für diese vergleichende Auswertung wurden die beiden getrennten Auswertungen (Eigen- und Fremdauswertung) zusammengelegt. Während auf der x-Achse die Anzahl der Proben aufgetragen ist, zeigt die y-Achse die Stärke des Farbsignals. Die Proben von Leber und Gallenblase sind farblich kodiert (siehe Legende des Diagramms). Insgesamt wurden pro Auswertung (Eigen- und Fremdauswertung) 20 Proben, also insgesamt 40 Proben in die Auswertung miteinbezogen.

Die folgenden beiden Bilder zeigen beispielhaft Gewebeproben von Leber und Gallenblase, die immunhistochemisch gefärbt wurden und ein positives Signal zeigten.

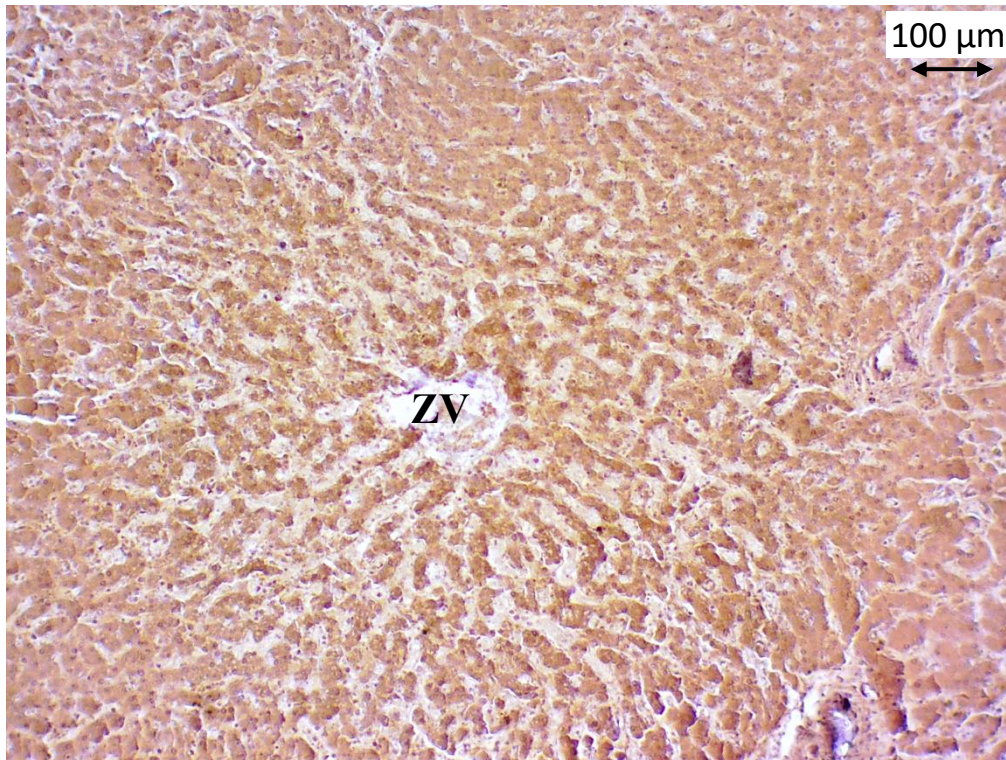


Abbildung 29: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/31 LHDd 10x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 29 zeigt eine Positivkontrolle der Immunhistochemie. Die Gewebeprobe entstammt der Facies diaphragmatica des Lobus hepatis dexter. Das positive Signal in Form der Braunfärbung des Gewebes ist deutlich zu erkennen. Besonders schön zeigt sich in dieser Abbildung die radiäre Anordnung der Hepatozyten-Bälkchen im Bezug zur Zentralvene.

ZV = Zentralvene

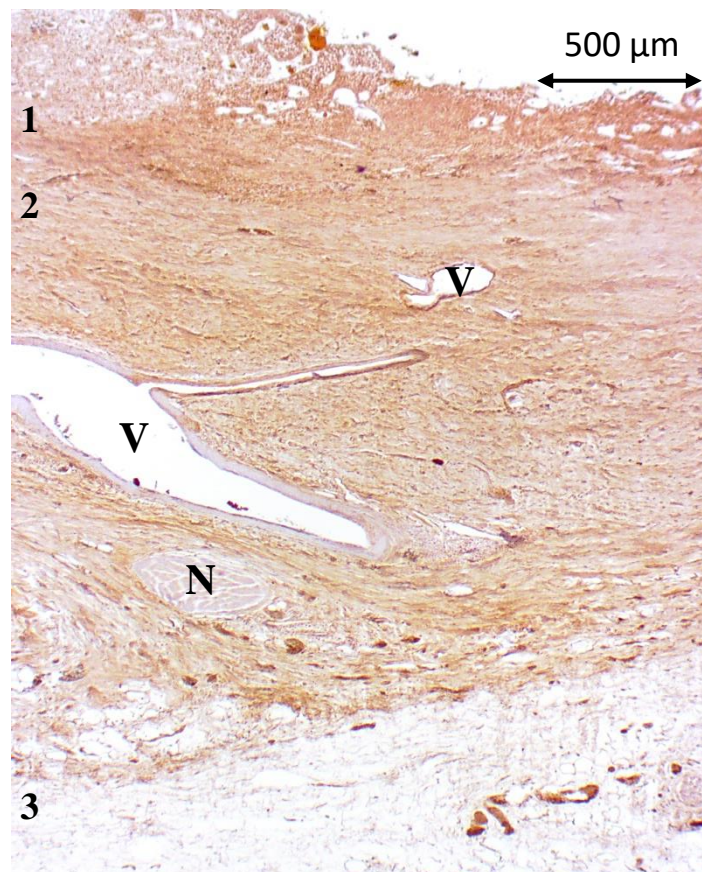


Abbildung 30: IHC 2 Positivkontrolle Spenderin 22/31 GF 4x Vergrößerung

Anmerkung: Abbildung 30 zeigt einen Querschnitt durch die Wand des Fundus der Gallenblase. Die Probe wurde als Positivkontrolle für die IHC verwendet und zeigt entsprechend ihrer Braunfärbung ein positives Färbesignal. Die Schichten der Wand der Gallenblase sind von innen nach außen beschriftet, die äußerste Schicht ist in dieser Abbildung nicht zu sehen. Eine großkalibrige Vene ist im Längsschnitt getroffen, eine etwas kleinere Vene ist rechts darüber im Querschnitt zu sehen. Unterhalb der größeren Vene ist ein Nerv angeschnitten. Insgesamt entspricht dieser Befund dem einer chronischen Entzündung der Gallenblase, der chronischen Cholezystitis. Die Lamina epithelialis ist kaum noch zu erkennen und das eigentlich hochprismatische Epithel wurde im Rahmen des Entzündungsprozesses entsprechend einer Metaplasie umgewandelt. Die Falten der Tunica mucosa sind komplett verstrichen, die Rokitansky-Aschoff-Krypten sind nicht mehr zu identifizieren.

1 = Tunica mucosa; 2 = Tunica muscularis; 3 = Tela subserosa

V = Vene

N = Nerv

6.5 Gesamtauswertung

In Kapitel 3.4 wurden die Fragestellungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, erläutert.

Alle Proben, die als Positivkontrolle in der Immunhistochemie verwendet wurden, wiesen ein positives Signal auf. Damit konnte erstmals der Nachweis von TRPC3 mittels Immunhistochemie in postmortalen Gewebeproben von Leber und Gallenblase des Menschen erbracht werden. Entsprechend der Beurteilungskriterien für die Stärke des Farbsignals wurden die Proben entweder einem mittleren oder einem starken Signal zugeordnet. Die Eigen- und die Fremdauswertung lieferten keine gravierenden Unterschiede, sodass insgesamt von einem schlüssigen Ergebnis gesprochen werden kann.

Darüber hinaus konnte kein gravierender Unterschied der Expression von TRPC3 zwischen den Gewebeproben der Leber und der Gallenblase gezeigt werden. Insgesamt ist das Ergebnis differenziert zu betrachten. Auf mögliche Einflussfaktoren des Ergebnisses wird im Rahmen der Diskussion näher eingegangen.

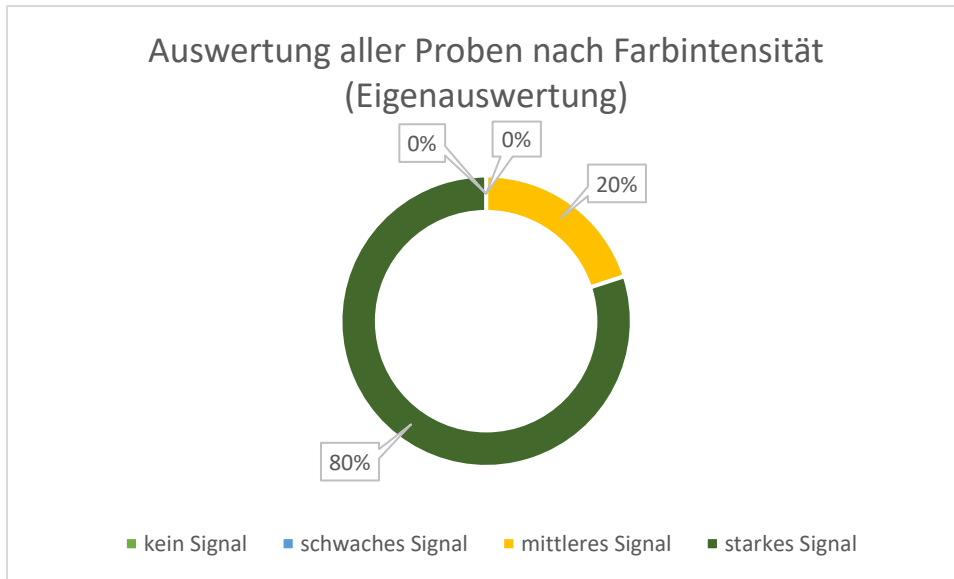


Diagramm 2: Eigenauswertung aller IHC-Proben entsprechend ihres Farbsignal

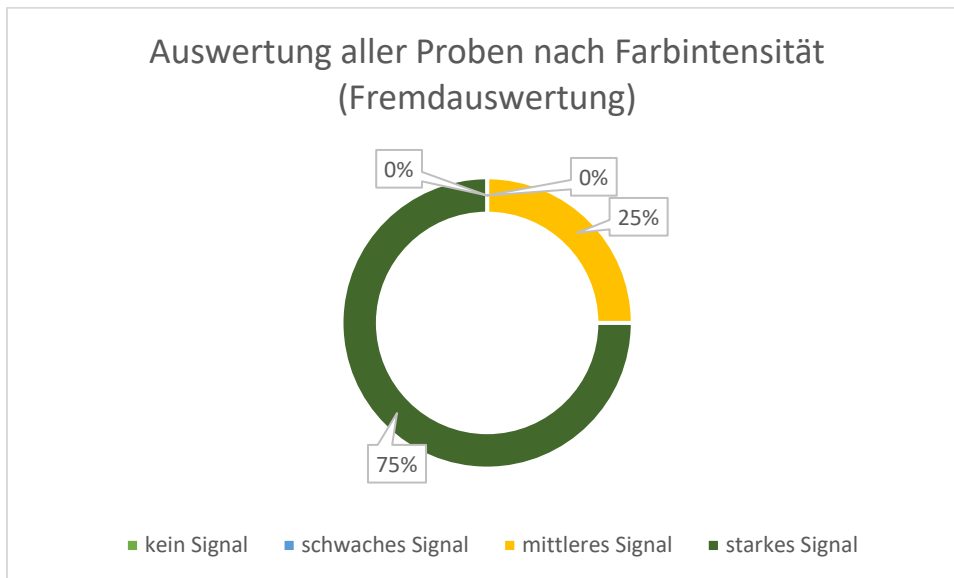


Diagramm 3: Fremdauswertung aller IHC-Proben entsprechend ihres Farbsignals

Dargestellt ist die Gesamtauswertung aller Proben der IHC in der Eigen- und in der Fremdauswertung ohne Unterteilung in Leber und Gallenblase. Der Kreis zeigt die Häufigkeit der Zuteilung einer Farbsignalkategorie in Prozent. Die Farbkategorien sind im Diagramm farblich gegliedert (siehe Legende des Diagramms). Absolute Zahlen: In der Eigenauswertung wurden insgesamt vier Proben ($n = 4$) der Kategorie „mittleres Signal“ und 16 Proben ($n = 16$) der Kategorie „starkes Signal“ zugeordnet. In der Fremdauswertung wurden insgesamt fünf Proben ($n = 5$) der Kategorie „mittleres Signal“ und 15 Proben ($n = 15$) der Kategorie „starkes Signal“ zugeordnet. Die absoluten Zahlen mit Unterteilung in Gewebe der Leber und Gallenblase können dem Kapitel 6.4 Vergleich zwischen Gewebe der Leber und Gallenblase entnommen werden.

7 Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methoden

Insgesamt wurden 63 Gewebeproben entnommen und in Paraffin eingebettet. Von 43 dieser Paraffinblöcke wurden jeweils mindestens 10 Schnitte angefertigt. Von diesen 430 Schnitten wurden dann die besten ausgewählt, um sie mittels H.E.-Färbung auf ihre Qualität beurteilen zu können. Anschließend wurden 20 der H.E.-gefärbten Schnitte ausgewählt und mittels immunhistochemischer Methodik gefärbt (Positivkontrolle). In die finale Auswertung wurden alle dieser 20 Proben (ausschließlich Positivkontrollen) miteinbezogen. Von der Fixierung der Körperspender*innen, über die Aufarbeitung der Proben bis hin zur Färbung der Schnitte, können verschiedene Faktoren Einfluss auf die Ergebnisse haben und finden daher in diesem Kapitel Erwähnung. Dabei soll entsprechend der Chronologie der Arbeitsschritte dieser Doktorarbeit vorgegangen werden.

7.1.1 Probenkollektiv

Für diese Arbeit wurden Proben von Leber und Gallenblase von acht Körperspenderinnen entnommen. Dabei wurde die anatomische Gliederung der Organe berücksichtigt. Alle Körperspenderinnen wurden vor der Entnahme der Proben mit NEP fixiert, was somit Grundlage für eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist. Von Gewebe der Gallenblase konnte nur bei fünf Körperspenderinnen Proben entnommen werden, da drei Körperspenderinnen zum Entnahmezeitpunkt keine Gallenblase mehr hatten. Dadurch wurden allerdings weder die Auswertungskriterien noch das Schema, nach welchem ausgewertet wurde, verändert.

Die Körperspenderinnen dieser Arbeit wiesen ein mittleres Alter von 91,4 Jahren auf. Das geringste Alter betrug 79 Jahre, das höchste Alter 104 Jahre. Die mittlere Zeit zwischen Eintritt des Todes und NEP-Fixierung der Körperspenderinnen betrug 52,4 h.

Das Probenkollektiv für diese Arbeit entstammte rein weiblichen Körperspenderinnen. Bis jetzt gibt es keine Hinweise auf eine geschlechtskorrelierte Verteilung der TRPC-Kanäle. Unter anderem konnte in einer Arbeit, die mittels immunhistochemischer Methodik TRPC6 im Skelettmuskel nachwies, keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden (Servello, 2021).

7.1.2 Fixierung der Körperspender*innen

Nach Eintritt des Todes kommt es zu Veränderungen im menschlichen Körper. Um diesen - für beispielweise Forschungszwecke - entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit Leichname zu fixieren. Bei allen Körperspenderinnen, bei welchen für diese Arbeit Proben entnommen wurde, erfolgte dies mittels NEP-Fixierung nach Weigner (Janczyk et al., 2011). Diese Methode stellt eine Alternative zur Fixierung mit Formalin dar. Bei der Fixierung mit Formalin kommt es zu kovalenten Verbindungen der Proteine. Dies kann für wissenschaftliche Methoden der Zellbiologie, wie beispielsweise der Chromatin-Immunpräzipitation, von Nutzen sein (Sutherland et al., 2008). Bei der Immunhistochemie ist dies allerdings von Nachteil, da der Antikörper durch diese Protein-Verbindungen (cross-linking) nicht an das passende Antigen binden kann (Libard et al., 2019). In einer Untersuchung aus dem Jahr 2013 wurde die herkömmliche Formalinfixierung mit Paraffin-Einbettung (formalin fixation and paraffin embedding, FFPE) mit der NEP-Fixierung nach Weigner verglichen. Unter anderem konnte das Protein CD3 in den NEP-fixierten Proben besser nachgewiesen werden und weitere Untersuchungen zeigten eine bessere Qualität der Immunhistochemie bei den Proben des Gewebes, welches NEP-fixiert wurde (Klopfleisch et al., 2013). Für diese Arbeit wurden alle Körperspenderinnen mittels NEP-Fixierung konserviert. Alle Proben wurden gemäß dem Protokoll übergangsweise in Formalin gelagert, bevor sie eingebettet werden konnten. Inwiefern diese kurze Lagerung die Immunhistochemie beeinträchtigen könnte, bedarf weiterer Analyse.

7.1.3 Pathologien der Proben

Das mittlere Alter der Körperspenderinnen betrug 91,4 Jahre. Mit zunehmendem Alter und durch Erkrankungen kommt es zu Veränderungen im Körper, insbesondere der Organe, die von etwaigen Krankheiten betroffen sind. Die folgende Tabelle zeigt einen Teil der Krankheiten, an denen die Körperspenderinnen, die für diese Arbeit untersucht wurden, litten.

Körperspenderin	Todesursache/Grunderkrankung
22/19	Nierenversagen, Immobilitätssyndrom
22/23	Mesenterialarterienembolie, Verbrauchskoagulopathie, Vorhofflimmern
22/18	Multiorganversagen, Plasmazellleukämie mit Tumoranämie
22/26	Nierenversagen
22/35	Pneumonie, CKD
22/36	Herzinsuffizienz, Karzinom der Mamma
22/30	Multiorganversagen bei akuter Gastroenteritis, Herzinsuffizienz
22/31	Tachyarrhythmia absoluta, Herzinsuffizienz

Tabelle 21: Übersicht über Grunderkrankungen und Todesursachen der Körperspenderinnen

Anmerkung: CKD = chronische Nierenerkrankung

Einige der Körperspenderinnen des Probenkollektivs dieser Arbeit wiesen an Leber und Gallenblase bereits deutliche, makroskopisch erkennbare, pathologische Veränderungen auf. Darüber hinaus kam es höchstwahrscheinlich durch eine primäre Erkrankung eines Organs, sekundär zu Manifestationen an anderen Organen, wie Leber und/oder Gallenblase. Bei einer Herzinsuffizienz (z.B. Körperspenderin 22/36) mit Rückwärtsversagen des rechten Herzens kann es beispielsweise zur Stauungshepatopathie kommen. Chronifiziert ein solcher Stauungszustand sind unter anderem irreversible Organschäden die Konsequenz.

Trotz der Tatsache, dass alle Proben erwartungsgemäß ihrer Grunderkrankung histomorphologisch altersentsprechende Befunde zeigten, konnte eine positive Farbreaktion für TRPC3 in der Immunhistochemie gesehen werden.

7.1.4 Einfluss der Dicke der Gewebeschnitte

Neben der Art der Gewebefixierung ist auch die Dicke der Gewebeschnitte relevant für das Ergebnis der Immunhistochemie (Libard et al., 2019). Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Zusammenhang ist, dass Schnitte mit einer höheren Dicke mehr Proteine (z.B. TRPC3) enthalten, die einen möglichen Bindungspartner für den Primärantikörper darstellen. Zudem könnten in dünneren Schnitten Strukturen oder Zellformationen, die das zu detektierende Antigen tragen, nicht angeschnitten sein. Somit wäre ein falsch-negatives Ergebnis der Immunhistochemie die Konsequenz. Während des Fixierungsvorgangs kommt es zu Denaturierungsprozessen und Quervernetzungen der Proteine untereinander, wodurch die antigene Struktur, die mittels Primärantikörper detektiert werden soll, verdeckt wird (Hantschke & Palmedo, 2016). Durch den Prozess der Demaskierung, welcher durchgeführt wird, bevor der Gewebeschnitt mit dem Antikörper inkubiert wird (siehe auch Kapitel 5.4.2.3: Durchführung der immunhistochemischen Färbungen), wird erreicht, dass ein Großteil der Antigene wieder freigelegt wird.

In dieser Arbeit wurden alle Paraffinblöcke mit einer Schnittdicke von 7 µm geschnitten. Die identische Schnittdicke aller Proben erlaubt eine gute Vergleichbarkeit der Färbeergebnisse der Proben untereinander.

7.1.5 Verwendeter Antikörper

Viele Faktoren der immunhistochemischen Methodik sind ausschlaggebend für ein erwünschtes Ergebnis. Allen voran spielt der verwendete Antikörper eine wichtige Rolle für eine gelungene Durchführung dieses Laborverfahrens. Für diese Arbeit wurde ein Knockout-validierter TRPC3-Antikörper (Ref.: ACC-016) verwendet. Mit der Knockout-Validierung wird die Spezifität des Antikörpers überprüft. Dabei wird der Antikörper mit Zellen oder Gewebe inkubiert, das das Target-Antigen nicht enthält. Kommt es zu einem gewünschten richtig-negativen Ergebnis, wurde die Spezifität bestätigt (Bordeaux et al., 2010). Darüber hinaus fand der verwendete Antikörper zuvor schon mit erwünschtem Ergebnis in einer anderen Arbeit Verwendung (Coline Diebolt, 2023).

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Zielsetzung der Arbeit war es, nach histologischer Aufarbeitung der entnommenen Proben, den nicht-selektiven Kationenkanal TRPC3 in Gewebe von Leber und Gallenblase des Menschen nachzuweisen.

7.2.1 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte visuell auf Basis zuvor festgelegter Kriterien, die die Farbintensität definierten. Anschließend erfolgte zur Validierung der Ergebnisse eine Fremdauswertung durch eine zweite unabhängige Person. Zwischen Eigen- und Fremdauswertung konnten dezente Unterschiede im Hinblick auf die Zuordnung zu einer Kategorie der Stärke des Signals festgestellt werden, was jedoch keine Auswirkungen auf das eigentliche Ziel und Ergebnis der Arbeit hatte, da Eigen- und Fremdauswertung eindeutig für alle Proben ein positives Signal beschrieben. Die Unterschiede zwischen beiden Auswertungen sind höchstwahrscheinlich auf interpersonelle Betrachtungsunterschiede zurückzuführen. Die Auswertung der Proben erfolgte visuell mit einem Lichtmikroskop. Für Eigen- und Fremdauswertung wurde das gleiche Lichtmikroskop verwendet. Die Kriterien für die Beurteilung der Stärke des Farbsignals beinhalteten prozentuale Angaben der gefärbten Fläche. Da die Proben händisch ausgewertet wurden und die Abschätzung der prozentualen Fläche auf eigenem Ermessen beruht, ist es nicht auszuschließen, dass es zu dezenten Diskrepanzen kommen kann. Die Tatsache, dass es nur Abweichungen zwischen zwei Kategorien (mittleres Signal und starkes Signal) gibt und sich die Gesamtauswertungen der Intensität des Farbsignals der IHC nur geringfügig voneinander unterscheiden (siehe Diagramm 2 und Diagramm 3), zeigt, dass die Ergebnisse valide sind.

Ein Vergleich zwischen den Proben des Leber- und denen des Gallenblasengewebes wurde im Rahmen der Erläuterung der Ergebnisse gemacht. Dabei ist anzumerken, dass für die Auswertung fast doppelt so viele Proben des Lebergewebes ($n = 13$) im Vergleich zum

Gallenblasengewebe ($n = 7$) miteinbezogen wurden. Pro Körperspenderin und pro Organ gesehen, wurden mehr Proben der Leber ($n = 6$) als Proben der Gallenblase ($n = 3$) entnommen und zusätzlich fehlten für die Auswertung drei Proben der Gallenblase, da diese nicht entnommen werden konnten. In Anbetracht dieser Kriterien kann der hier erbrachte Vergleich der beiden Organe erste richtungsdeutende Hinweise geben, muss jedoch im Rahmen der genannten Gegebenheiten differenziert betrachtet werden.

Trotz des etablierten Protokolls für die IHC, gibt es viele Faktoren, die Einfluss auf die Ergebnisse nehmen können und somit für ein schwächeres Farbsignal mancher Proben sorgen. Eine nicht ausreichende Demaskierung der Antigene würde beispielsweise die Bindung des Primärantikörpers erschweren und folglich auch die Stärke der Färbung herabsetzen. Ferner können sich Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien oder Geräte negativ auf die IHC auswirken. Nicht auszuschließen wäre ebenfalls, dass Krankheiten, die die Gewebestruktur nachhaltig beeinflussen, einen Effekt auf die Ergebnisse der Immunhistochemie haben können. Eine Arbeit, in der das Vorkommen von TRPC6 im hepatobiliären System untersucht wurde, konnte zeigen, dass Krankheiten, die die Leber betreffen, womöglich die Verteilung von TRPC6 in Leber und Gallenblase beeinflussen können (Walz et al., 2023). Es ist nicht auszuschließen, dass dies auch für TRPC3 zutreffen könnte. An dieser Stelle bedarf es weiterer Nachforschungen.

7.2.2 Einordnung der Ergebnisse

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte der Nachweis von TRPC3 bereits in etlichen Geweben und Organen erfolgen. Dazu gehören bei Nagetieren, genauer gesagt bei Ratten, und anderem das Sammelrohr der Niere und das Herz (Goel, Sinkins, et al., 2007; Goel, Zuo, et al., 2007) sowie die Purkinje-Zellen des Kleinhirns bei Mäusen (Hartmann et al., 2008). Für menschliches Gewebe wurde die Genexpression des Proteins unter anderem mittels cDNA untersucht. Das Ergebnis war eine Expression des TRPC3-Proteins unter anderem in Plazenta, Ovarien, Hoden, Kolon, Lunge, Gehirn, Prostata und Dünndarm (Zhu et al., 1996) (siehe auch: Kapitel 4.3.3.2 Vorkommen).

Mit dieser Arbeit konnte jetzt zum ersten Mal der immunhistochemische Nachweis für TRPC3 in Hepatozyten und Gewebe der Gallenblase des Menschen erfolgen. Dabei wurde, nicht wie bei den bisherigen Arbeiten, die Genexpression untersucht, sondern das Protein wurde antikörpervermittelt detektiert. Das Ergebnis dieser Arbeit wird somit unterstützt und korreliert mit den Untersuchungen, in denen die Genexpression des Proteins im hepatobiliären System (Jang et al., 2012; Riccio et al., 2002) nachgewiesen werden konnten.

Das bisherige Wissen über die Mitwirkung von TRPC3 an der Entstehung von Tumoren ist bezüglich der Erkenntnis, dass dieser Kanal auch in Leber und Gallenblase exprimiert wird, relevant. In der Leber gibt es verschiedene Entitäten von Tumoren. Zu den gutartigen Tumoren gehören unter anderem das hepatozelluläre Adenom und das Leberhämangiom, in die Gruppe der bösartigen Lebertumoren fallen das hepatozelluläre Karzinom oder das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom. Tumoren, die die Gallenblase betreffen können, sind unter anderem das Gallenblasenkarzinom, welches in den meisten Fällen mit Cholelithiasis in Verbindung gebracht werden kann (Piper, 2007). TRPC3 konnte bereits mit der Entstehung des humanen Ovarialkarzinoms in Verbindung gebracht werden (Yang et al., 2009). Ein interessanter Untersuchungsansatz wäre also, inwiefern dies auch für tumoröse und

kanzerogene Prozesse des hepatobiliären Systems zutrifft. TRPC6 ist ein Protein, welches TRPC3 strukturell und funktionell so ähnlich ist, dass die beiden mit TRPC7 in eine Untergruppe ihrer Subfamilie geteilt wurden (siehe Einleitung). Für TRPC6 konnte, neben weiteren kanzerogenen Entitäten, eine Korrelation zum Hepatozellulären Karzinom (HCC) gezeigt werden. Dabei war nicht nur die Expressionsrate von TRPC6 in Gewebe des HCC deutlich höher, die Gewebeproben wurden auch in höhere Klassifikationsstufen der TNM-Klassifikation eingeordnet (Wen et al., 2016). Aufgrund der strukturellen und funktionalen Ähnlichkeit der beiden Proteine ist es nicht abwegig, dass auch für TRPC3 eine Korrelation zu kanzerogenen Prozessen bestehen könnte.

In der Einleitung zu dieser Arbeit fanden bereits die weit verbreiteten Krankheitsbilder NAFLD und NASH Erwähnung. Studien konnten zeigen, dass durch eine Veränderung der Expression von Calcium-Kanälen die intrazelluläre Calcium-Homöostase gestört wird, was wiederum zu ER-Stress (Koo & Han, 2021, Miyagawa et al., 2016) und mitochondrialer Fehlfunktion (Gusdon et al., 2014) führt und schließlich in einer Verschlimmerung der NAFLD resultieren kann. Der Mechanismus, über den dieser Zusammenhang vonstattengeht, ist laut Studienlage wohl folgender: Durch Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten kommt es aufgrund der Lipotoxizität dieser - beispielsweise vermittelt über pro-inflammatorische Zytokine - zu ER-Stress (endoplasmatisches Retikulum, ER) (Koo & Han, 2021). Physiologischer Weise pumpt eine ATPase (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase), die in der Membran des ER liegt, Calcium-Ionen aus dem Cytoplasma zurück in das ER und ist damit verantwortlich für eine hohe Konzentration von Calcium innerhalb des ERs und eine niedrige Konzentration von Calcium im Zytoplasma. Diese Abweichungen von der physiologischen Calcium-Homöostase können oxidativen Stress und eine Hemmung der Autophagie von Lipiden zur Folge haben (Miyagawa et al., 2016). Dies wiederum bedingt eine Progression der NAFLD und NASH. In der Einleitung wurde bereits geschildert, dass es wissenschaftliche Arbeiten gibt, die auf ein Mitwirken von TRPC3 an store-related calcium-signaling deuten. Unter Anbetracht der

Auswirkungen, die eine gestörte Calcium-Homöostase für die Stoffwechselleitungen Leber bedeutet, erscheinen Eingriffe in den Calcium-Haushalt der Hepatozyten ein attraktiver Angriffspunkt für pharmakologische Interventionen zu sein.

Eine Studie aus dem Jahr 2021 hat diesen Sachverhalt untersucht. Mäuse wurden nach einer fettreichen Diät für zehn Tage einer Therapie mit dem Calcium-Kanalblocker Verapamil in einer Dosierung von 25mg/kg KG unterzogen. Die Ergebnisse zeigten, dass durch Verapamil vermehrt Autophagie induziert wurde, was sich hinsichtlich der untersuchten Mäuse in einer Gewichtsreduktion und einer Verbesserung der Leberfunktion und -regeneration zeigte (Lai et al., 2021). Im Gegensatz dazu steht eine Studie, bei der die Wirkung von verschiedenen Medikamenten bei Patient*innen mit Bluthochdruck und NASH untersucht wurde. Unter anderem wurde hierbei auch der Calcium-Kanalblocker Amlodipin betrachtet. Unter einer Therapie mit Amlodipin kam es jedoch nicht zu einer Verbesserung der untersuchten Parameter (beispielsweise Ultraschall-Parameter), die die Steatosis der Leber in der Studie kategorisierten (Fogari et al., 2012).

Abschließend lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass die zellulären Mechanismen, die den Entstehungsprozess der genannten Leberpathologien beeinflussen, komplex sind und die Datenlage zur therapeutischen Nutzung von Calcium-Kanälen und insbesondere Kanäle der TRPC-Familie spärlich ist. Weitere Nachforschungen, die das Wissen auf diesem Gebiet erweitern und zu einem umfassenderen Verständnis beitragen, sind definitiv vonnöten.

7.3 Zusammenfassung und Perspektive der Ergebnisse

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte die Genexpression von TRPC3 unter anderem mittels cDNA-Verfahren nachgewiesen werden. Dabei konnte der Nachweis für verschiedene menschliche Gewebe und auch für Nagetiere erbracht werden (Riccio et al., 2002; Zhu et al., 1996). Auch im hepatobiliären System konnte die Genexpression des Proteins TRPC3 mittels mRNA-Analysen nachgewiesen werden (Jang et al., 2012; Riccio et al., 2002). Bis jetzt gelang jedoch noch kein direkter Nachweis des Proteins mittels immunhistochemischer Methodik in menschlichem Gewebe von Hepatozyten und Gewebe der Gallenblase. Der Nachweis konnte mit dieser Arbeit erbracht werden. Somit unterstützen die Erkenntnisse der Untersuchungen der Genexpression von TRPC3 das Ergebnis dieser Studie.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Vorhandensein von TRPC3 in Hepatozyten und Gallenblasenepithel bewiesen werden konnte. Es ließ sich kein wesentlicher Unterschied in der Expression des Kanals zwischen Leber und Gallenblase feststellen. Die Ergebnisse unterliegen vielen Einflussfaktoren, welche im vorherigen Kapitel erläutert wurden. Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit ist im Rahmen nicht beeinfluss- oder kontrollierbarer Gegebenheiten limitiert und sollte differenziert betrachtet werden. Inwiefern die Expression von TRPC3 mit der Entstehung pathologischer Prozesse im Körper des Menschen in Verbindung gebracht werden kann, ist an dieser Stelle noch offen. Auch etwaige Nutzung von TRPC3 für die Prophylaxe von Krankheiten oder die Nutzung des Proteins als pharmakologischen Angriffspunkt im Sinne der Therapie von Krankheiten, die mit TRPC3 assoziiert sind, steht zu diesem Zeitpunkt noch aus.

Ein nächster Schritt im Rahmen der Forschung um TRPC-Kanäle wurde mit dieser Arbeit getan. Auf diesen können nun sich anschließende Arbeiten aufbauen und zur weiteren Erkenntnis und möglicher Nutzung der Kanäle beitragen.

8 Literaturverzeichnis

1. Ampuero, J., Gallego-Durán, R., & Romero-Gómez, M. (2015). Association of NAFLD with subclinical atherosclerosis and coronary-artery disease: meta-analysis. *Rev Esp Enferm Dig*, 107(1), 10–16.
2. Asanov, A., Sampieri, A., Moreno, C., Pacheco, J., Salgado, A., Sherry, R., & Vaca, L. (2015). Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels. *Cell Calcium*, 57(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.011>
3. Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wennemuth, G., Wolff, W., Wurzing, L. J., & Zilch, H.-G. (2020). Duale Reihe Anatomie. *Duale Reihe Anatomie*. <https://doi.org/10.1055/B-007-170976>
4. Becker, E. B. E., Oliver, P. L., Glitsch, M. D., Banks, G. T., Achilli, F., Hardy, A., Nolan, P. M., Fisher, E. M. C., & Davies, K. E. (2009). A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6706–6711.
5. Behrends, J. C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., & Wischmeyer, E. (2021). Duale Reihe Physiologie. *Duale Reihe Physiologie*. <https://doi.org/10.1055/B000000462>
6. Bordeaux, J., Welsh, A. W., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M. T., Hanna, J. A., Anagnostou, V. K., & Rimm, D. L. (2010). Antibody validation. *Biotechniques*, 48(3), 197–209.
7. Bröcker-Lai, J., Kollwe, A., Schindeldecker, B., Pohle, J., Nguyen Chi, V., Mathar, I., Guzman, R., Schwarz, Y., Lai, A., & Weißgerber, P. (2017). Heteromeric channels formed by TRPC 1, TRPC 4 and TRPC 5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *The EMBO Journal*, 36(18), 2770–2789.
8. Chen, X., Sook, G., Demaree, I. S., White, F. A., & Obukhov, A. G. (2020). Transient receptor potential canonical (TRPC) channels: then and now. *Cells*, 9(9), 1983.
9. Chung, Y. H., Ahn, H. S., Kim, D., Shin, D. H., Kim, S. S., Kim, K. Y., Lee, W. B., & Cha, C. I. (2006). Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Research*, 1085(1), 132–137.

10. Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6), 387–396.
<https://doi.org/10.1038/35077544>
11. Cogliano, V. J., Grosse, Y., Baan, R. A., Straif, K., Secretan, M. B., el Ghissassi, F., Andrae, U., Burge, S., Chhabra, R., Cocker, J., Coggon, D., Conolly, R., Demers, P., Eastmond, D., Faustman, E., Feron, V., Gérin, M., Goldberg, M., Goldstein, B., ... Wolf, D. (2005). Meeting Report: Summary of IARC Monographs on Formaldehyde, 2-Butoxyethanol, and 1-tert-Butoxy-2-Propanol. *Environmental Health Perspectives*, 113(9), 1205–1208.
<https://doi.org/10.1289/EHP.7542>
12. Coline Diebolt. (2023). TRPC3 Kidney. *Scientific Report*, in press.
13. Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216), 285–287.
14. Dietrich, A., Kalwa, H., Rost, B. R., & Gudermann, T. (2005). The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflügers Archiv*, 451, 72–80.
15. Fan, C., Choi, W., Sun, W., Du, J., & Lu, W. (2018). Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3. *ELife*, 7.
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.36852>
16. Farfariello, V., Gordienko, D. V., Mesilmany, L., Touil, Y., Germain, E., Fliniaux, I., Desruelles, E., Gkika, D., Roudbaraki, M., Shapovalov, G., Noyer, L., Lebas, M., Allart, L., Zienthal-Gelus, N., Iamshanova, O., Bonardi, F., Figeac, M., Laine, W., Kluza, J., ... Prevarskaya, N. (2022). TRPC3 shapes the ER-mitochondria Ca²⁺ transfer characterizing tumour-promoting senescence. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28597-x>
17. Fogari, R., Maffioli, P., Mugellini, A., Zoppi, A., Lazzari, P., & Derosa, G. (2012). Effects of losartan and amlodipine alone or combined with simvastatin in hypertensive patients with nonalcoholic hepatic steatosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 24(2), 164–171.
18. Fowler, M. A., Sidiropoulou, K., Ozkan, E. D., Phillips, C. W., & Cooper, D. C. (2007). Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS One*, 2(6), e573.
19. Garcia, R. L., & Schilling, W. P. (1997). Differential Expression of Mammalian TRP Homologues across Tissues and Cell Lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(1), 279–283.

20. Giampà, C., DeMarch, Z., Patassini, S., Bernardi, G., & Fusco, F. R. (2007). Immunohistochemical localization of TRPC6 in the rat substantia nigra. *Neuroscience Letters*, 424(3), 170–174.
21. Goel, M., Sinkins, W. G., Zuo, C.-D., Hopfer, U., & Schilling, W. P. (2007). Vasopressin-induced membrane trafficking of TRPC3 and AQP2 channels in cells of the rat renal collecting duct. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(5), F1476–F1488.
22. Goel, M., Zuo, C.-D., Sinkins, W. G., & Schilling, W. P. (2007). TRPC3 channels colocalize with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and Na⁺ pump in axial component of transverse-axial tubular system of rat ventricle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(2), H874–H883.
23. Gusdon, A. M., Song, K., & Qu, S. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.
24. Gutt, C., Schläfer, S., & Lammert, F. (2020). The treatment of gallstone disease. *Deutsches Arzteblatt International*, 117(9), 148–158. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2020.0148>
25. Hantschke, M., & Palmedo, G. (2016). Immunhistologische Techniken. In L. Cerroni, C. Garbe, D. Metze, H. Kutzner, & H. Kerl (Eds.), *Histopathologie der Haut* (pp. 15–35). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45133-5_2
26. Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron*, 8(4), 643–651.
27. Harteneck, C., Plant, T. D., & Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends in Neurosciences*, 23(4), 159–166.
28. Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H. A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., & Konnerth, A. (2008). TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination. *Neuron*, 59(3), 392–398. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2008.06.009>
29. Heinrich, P., Müller, M., & Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. https://books.google.com/books?hl=de&lr=&id=bswjBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR8&dq=1%C3%B6ffler+petrides+biochemie+und+pathobiochemie&ots=71g_GIU-9N&sig=Bs4x6GopMJNctwvtao4HIp-xtOg

30. Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716), 259–263.
31. Hufschmidt, A., Lücking, C. H., Rauer, S., & Glocker, F. X. (2017). Neurologie compact. *Akt Neurol*, 44, 760.
32. Janczyk, P., Weigner, J., Luebke-Becker, A., Kaessmeyer, S., & Plendl, J. (2011). Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy—A study based on histo- and microbiological analyses. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 193(1), 71–75. <https://doi.org/10.1016/J.AANAT.2010.08.003>
33. Jang, Y., Lee, Y., Kim, S. M., Yang, Y. D., Jung, J., & Oh, U. (2012). Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Archives of Pharmacal Research*, 35, 1823–1830.
34. Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lémos, J. R., & Florman, H. M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology*, 3(5), 499–502.
35. Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., Yoshida, T., Wakamori, M., Mori, E., & Numata, T. (2009). Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5400–5405.
36. Klopfeisch, R., von Deetzen, M., Weiss, A. T., Weigner, J., Weigner, F., Plendl, J., & Gruber, A. D. (2013). Weigners Fixative-An Alternative to Formalin Fixation for Histology With Improved Preservation of Nucleic Acids. *Veterinary Pathology*, 50(1), 191–199. https://doi.org/10.1177/0300985812441031/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0300985812441031-FIG1.JPEG
37. Koo, J. H., & Han, C. Y. (2021). Signaling nodes associated with endoplasmic reticulum stress during NAFLD progression. *Biomolecules*, 11(2), 242.
38. Köpke, L.-G., & Simon, F. (2018). Immunhistochemische Färbungen – Ein möglicher Lösungsweg. *Gefäßchirurgie*, 23(4), 261–263. <https://doi.org/10.1007/s00772-018-0388-6>
39. Kwan, H.-Y., Huang, Y., & Yao, X. (2004). Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8), 2625–2630.

40. Lai, J.-L., Lian, Y.-E., Wu, J.-Y., Wang, Y.-D., & Bai, Y.-N. (2021). Verapamil induces autophagy to improve liver regeneration in non-alcoholic fatty liver mice. *Adipocyte*, 10(1), 532–545.
41. Lang, G. (2006). Immunhistochemie. *Histotechnik: Praxislehrbuch Für Die Biomedizinische Analytik*, 257–294.
42. Lang, G. (2012). *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag.
43. Lau, O.-C., Shen, B., Wong, C.-O., Tjong, Y.-W., Lo, C.-Y., Wang, H.-C., Huang, Y., Yung, W.-H., Chen, Y.-C., & Fung, M.-L. (2016). TRPC5 channels participate in pressure-sensing in aortic baroreceptors. *Nature Communications*, 7(1), 11947.
44. Leypold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F., & Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6376–6381.
45. Liang, C., Zhang, Y., Zhuo, D., Lo, C.-Y., Yu, L., Lau, C.-W., Kwan, Y.-W., Tse, G., Huang, Y., & Yao, X. (2019). Endothelial cell transient receptor potential channel C5 (TRPC5) is essential for endothelium-dependent contraction in mouse carotid arteries. *Biochemical Pharmacology*, 159, 11–24.
46. Libard, S., Cerjan, D., & Alafuzoff, I. (2019). Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 151(1), 91–96. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1742-1>
47. Liman, E. R., Corey, D. P., & Dulac, C. (1999). TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5791–5796.
48. Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). Taschenlehrbuch Histologie. *Taschenlehrbuch Histologie*. <https://doi.org/10.1055/B-006-163361>
49. Lünse, S., Heidecke, C. D., & Partecke, L. I. (2022). Laparoskopische Cholezystektomie. *Zentralblatt Fur Chirurgie - Zeitschrift Fur Allgemeine, Viszeral- Und Gefasschirurgie*, 147(4), 338–342. <https://doi.org/10.1055/A-1546-2709>
50. Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., & Hamill, O. P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nature Cell Biology*, 7(2), 179–185.
51. Minke, B., Wu, C.-F., & Pak, W. L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant. *Nature*, 258(5530), 84–87.

52. Minke, B. (1982). Light-induced reduction in excitation efficiency in the trp mutant of *Drosophila*. *The Journal of General Physiology*, 79(3), 361–385.
53. Minke, B. (2010). The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of Neurogenetics*, 24(4), 216–233.
54. Miyagawa, K., Oe, S., Honma, Y., Izumi, H., Baba, R., & Harada, M. (2016). Lipid-induced endoplasmic reticulum stress impairs selective autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in hepatocytes. *The American Journal of Pathology*, 186(7), 1861–1873.
55. Montell, C., Jones, K., Hafen, E., & Rubin, G. (1985). Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation trp by germline transformation. *Science*, 230(4729), 1040–1043.
56. Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313–1323.
57. Nilius, B. (2007). TRP channels in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(8), 805–812. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.002](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.002)
58. Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., & Ito, H. (2007). Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(3), 498–507.
59. Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., & Imoto, K. (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7: Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27359–27370.
60. Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., & Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*, 25(22), 5305–5316.
61. Pape, H.-C., Kurtz, A., & Silbernagl, S. (2019). *Physiologie* (H.-C. Pape, A. Kurtz, & S. Silbernagl, Eds.). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/B-006-163285>
62. Pauling, L., & Corey, R. B. (1953). Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the α -keratin type. *Nature*, 171, 59–61.

63. Piper, W. (2007). *Innere Medizin*. Springer Berlin Heidelberg.
<https://doi.org/10.1007/978-3-540-33729-4>
64. Ramsey, I. S., Dellings, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 619–647.
65. Rassow, J., & Netzker, D. (2016). Duale Reihe Biochemie, Thieme. *Edited by J. Rassow et al. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.*
66. Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kelsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D., Benham, C. D., & Pangalos, M. N. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, 109(1–2), 95–104.
67. Riccio, A., Li, Y., Tsvetkov, E., Gapon, S., Yao, G. L., Smith, K. S., Engin, E., Rudolph, U., Bolshakov, V. Y., & Clapham, D. E. (2014). Decreased anxiety-like behavior and Gαq/11-dependent responses in the amygdala of mice lacking TRPC4 channels. *Journal of Neuroscience*, 34(10), 3653–3667.
68. *Safety Data Sheet Pluriol® E 600 LS-FLEX 1. Identification Product identifier used on the label Pluriol® E 600 LS-FLEX.* (n.d.).
69. Salido, G. M., Sage, S. O., & Rosado, J. A. (2009). TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(2), 223–230.
70. Schünke, M., Schulte, E., & Schumacher, U. (2018). *PROMETHEUS Innere Organe: LernAtlas Anatomie*. Georg Thieme Verlag.
71. Servello, D. (2021). *Immunhistochemischer Nachweis des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC6 im Skelettmuskelgewebe des Menschen.*
72. Smedlund, K., & Vazquez, G. (2008). Involvement of native TRPC3 proteins in ATP-dependent expression of VCAM-1 and monocyte adherence in coronary artery endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), 2049–2055.
73. Smedlund, K., Dube, P., & Vazquez, G. (2016). Early steatohepatitis in hyperlipidemic mice with endothelial-specific gain of TRPC3 function precedes changes in aortic atherosclerosis. *Physiological Genomics*, 48(8), 644–649.
74. Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 549–565.
75. Song, M. Y., & Yuan, J. X.-J. (2010). Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation*, 99–108.

76. Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C., & Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 295(5559), 1493–1500.
77. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 39014–39019.
78. Sutherland, B. W., Toews, J., & Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein–protein interactions. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(6), 699–715.
79. Trebak, M., Bird, G. S. J., McKay, R. R., Birnbaumer, L., & Putney, J. W. (2003). Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 16244–16252.
80. Trebak, M., Hempel, N., Wedel, B. J., Smyth, J. T., Bird, G. S. J., & Putney, J. W. (2005). Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712. *Molecular Pharmacology*, 67(2), 558–563.
81. Ulfig, N., & Brand-Saberi, B. (2017). *Kurzlehrbuch Embryologie, 3. aktualisierte Auflage*. Stuttgart.
82. Ulfig †, N. (2019). Kurzlehrbuch Histologie. *Kurzlehrbuch Histologie*. <https://doi.org/10.1055/B-006-166358>
83. Vazquez, G., Lievremont, J.-P., St. J. Bird, G., & Putney Jr, J. W. (2001). Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11777–11782.
84. Vazquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M., & Putney Jr, J. W. (2004). The mammalian TRPC cation channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1742(1–3), 21–36.
85. Vazquez, G., Wedel, B. J., Kawasaki, B. T., Bird, G. S. J., & Putney, J. W. (2004). Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40521–40528.
86. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 387–417.
87. Walz, M., Tschernig, T., Schmidt, P., & Federspiel, J. M. (2023). TRPC6-protein expression in the elderly and in liver disease. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 245, 152016.

88. Wang, H., Cheng, X., Tian, J., Xiao, Y., Tian, T., Xu, F., Hong, X., & Zhu, M. X. (2020). TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacology & Therapeutics*, 209, 107497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107497>
89. Wedel, B. J., Vazquez, G., McKay, R. R., Bird, G. S. J., & Putney, J. W. (2003). A calmodulin/inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP3 receptor-independent process. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25758–25765.
90. Wen, L., Liang, C., Chen, E., Chen, W., Liang, F., Zhi, X., Wei, T., Xue, F., Li, G., & Yang, Q. (2016). Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent. *Scientific Reports*, 6(1), 23269.
91. Wennemuth, G. (2017). *Taschenbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
92. Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., & Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9652–9656.
93. Winkler, P. A., Huang, Y., Sun, W., Du, J., & Lü, W. (2017). Electron cryo-microscopy structure of a human TRPM4 channel. *Nature*, 552(7684), 200–204.
94. Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., & Burchette, J. L. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), 1801–1804.
95. Wong, F., Schaefer, E. L., Roop, B. C., LaMendola, J. N., Johnson-Seaton, D., & Shao, D. (1989). Proper function of the *drosophila* trp gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron*, 3(1), 81–94. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90117-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90117-7)
96. Yang, S. L., Cao, Q., Zhou, K. C., Feng, Y. J., & Wang, Y. Z. (2009). Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene*, 28(10), 1320–1328.
97. Yin, Y., Wu, M., Zubcevic, L., Borschel, W. F., Lander, G. C., & Lee, S.-Y. (2018). Structure of the cold-and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science*, 359(6372), 237–241.
98. Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C. V., Landsberg, J. W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D. D., Thistlethwaite, P. A., Rubin, L. J., & Yuan, J. X.-

- J. (2004). Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(38), 13861–13866.
99. Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., & Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Letters*, 373(3), 193–198.
100. Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell*, 85(5), 661–671.
101. Zhu, X., Jiang, M., & Birnbaumer, L. (1998). Receptor-activated Ca^{2+} influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells: evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 133–142.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisches Modell eines Leberzellbälkchens	19
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wandaufbaus der Gallenblase	21
Abbildung 3: Übersicht über die TRP-Subfamilien	25
Abbildung 4: Schematischer Aufbau von TRPC3	36
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von TRPC3	42
Abbildung 6: Entnahmestellen der Gewebeproben der Leber, Facies diaphragmatica	58
Abbildung 7: Entnahmestellen der Gewebeproben der Leber, Facies visceralis	58
Abbildung 8: Entnahmestellen der Gewebeproben, Gallenblase	59
Abbildung 9: Einbettkassette mit Beschriftung	62
Abbildung 10: Arbeitsschritte der Untersuchung der Gewebeproben	63
Abbildung 11: HE-Färbung Spenderin 22/30 LHDd in 10x Vergrößerung	72
Abbildung 12: HE-Färbung Spenderin 22/31 LHDd 10x Vergrößerung	73
Abbildung 13: HE-Färbung Spenderin 22/19 GF 4x Vergrößerung	74
Abbildung 14: HE-Färbung Spenderin 22/31 LHDd 10x Vergrößerung	75
Abbildung 15: HE-Färbung Spenderin 22/31 LHDd 40x Vergrößerung	76
Abbildung 16: Schematische Darstellung der indirekten Immunhistochemie	79
Abbildung 17: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/35 LHDd 10x Vergrößerung	86
Abbildung 18: IHC 1 Negativkontrolle Spenderin 22/30 LHDd 10x Vergrößerung	87
Abbildung 19: IHC 2 Negativkontrolle Spenderin 22/23 LHSd 10x Vergrößerung	88
Abbildung 20: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/23 LHSv 40x Vergrößerung	89
Abbildung 21: IHC 1 Negativkontrolle Spenderin 22/30 LHDd 40x Vergrößerung	89
Abbildung 22: IHC 2 Positivkontrolle Spenderin 22/23 LHSv 10x Vergrößerung	91
Abbildung 23: IHC 2 Negativkontrolle Spenderin 22/23 LHSd 40 x Vergrößerung	92
Abbildung 24: IHC 3 Positivkontrolle Spenderin 22/19 GF 4x Vergrößerung	93
Abbildung 25: IHC 3 Negativkontrolle Spenderin 22/36 GF 4x Vergrößerung	94
Abbildung 26: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/30 LHDd 4x Vergrößerung	102
Abbildung 27: IHC 3 Positivkontrolle Spenderin 22/19 GF 4x Vergrößerung	105
Abbildung 28: IHC 2 Positivkontrolle Spenderin 22/23 LHSv 4x Vergrößerung	107
Abbildung 29: IHC 1 Positivkontrolle Spenderin 22/31 LHDd 10x Vergrößerung	110
Abbildung 30: IHC 2 Positivkontrolle Spenderin 22/31 GF 4x Vergrößerung	111
Abbildung 31: Positivkontrolle der Peptidinkubation	142
Abbildung 32: Peptidinkubierte Probe	143
Abbildung 33: Negativkontrolle der Peptidinkubation	144

Alle schematischen Abbildungen (Abbildung 1-10 und 16) wurden von mir erstellt und auch alle Fotos der mikroskopierten Gewebeschnitten von Leber und Gallenblase wurden von mir gemacht.

9.2 Tabellen- und Diagrammverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	49
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	50
Tabelle 3: Verwendete Geräte	51
Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Substanzen für die Immunhistochemie	51
Tabelle 5: Übersicht über die in die Studie einbezogenen Körperspender*innen	53
Tabelle 6: Übersicht über die entnommenen Proben	62
Tabelle 7: Übersicht über den Ablauf der Einbettung in Paraffin im Einbettautomat	65
Tabelle 8: Ausrichtung der Gewebeproben in den Ausgießförmchen bei der Paraffineinbettung	66
Tabelle 9: Übersicht über die Färbedurchgänge der Immunhistochemie	85
Tabelle 10: Beurteilungskriterien der Auswertung der IHC-Proben	97
Tabelle 11: Übersicht über die Proben, die in die Auswertung miteinbezogen wurden.	98
Tabelle 12: Vierfeldertafel zu möglichen Ergebnissen der IHC	99
Tabelle 13: Eigenauswertung der Proben des Lebergewebes	101
Tabelle 14: Fremdauswertung der Proben des Lebergewebes	101
Tabelle 15: Eigenauswertung der Proben des Gallenblasengewebes	104
Tabelle 16: Fremdauswertung der Proben des Gallenblasengewebes	104
Tabelle 17: Eigenauswertung der Gewebeproben der Körperspenderin 22/23	106
Tabelle 18: Fremdauswertung der Gewebeproben der Körperspenderin 22/23	106
Tabelle 19: Vergleich der Proben der IHC zwischen Leber und Gallenblase; Eigenauswertung	108
Tabelle 20: Vergleich der Proben der IHC zwischen Leber und Gallenblase; Fremdauswertung	108
Tabelle 21: Übersicht über Grunderkrankungen und Todesursachen der Körperspenderinnen	116
 Diagramm 1: Vergleich der Intensität des Farbsignals der IHC (Gesamtauswertung)	 109
Diagramm 2: Eigenauswertung aller IHC-Proben entsprechend ihres Farbsignal	113
Diagramm 3: Fremdauswertung aller IHC-Proben entsprechend ihres Farbsignals	113

10 Publikationen

Kaul, N., Diebolt, C., Meier, C. & Tschernig, T. (2023). Transient receptor potential channel 3 in human liver and gallbladder – An investigation in body donors. *Annals of Anatomy*.

11 Danksagung

Einige Personen haben die Entstehung und den Verlauf dieser Arbeit geprägt und sollen daher an dieser Stelle Erwähnung finden.

Mein außerordentlicher Dank gilt zunächst denjenigen, die ihren Körper der Forschung und Medizin zur Verfügung gestellt haben. Ohne diese besondere Form des beispiellosen Engagements wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen und viele Antworten, die Grundlage wissenschaftlichen Fortschritts sind, wären heute noch verborgen. Hierfür gebühren mein Dank und Respekt.

An nächster Stelle möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, dem Leiter der Prosektur, für das Überlassen des Themas dieser Doktorarbeit danken. Ich danke ihm für die Unterstützung, die konstruktiven Ratschläge, die gleichzeitig das richtige Maß an Freiraum und Hilfestellung boten. Das entgegengebrachte Vertrauen die Räumlichkeiten des Institutes jederzeit nutzen zu können, gab mir die Möglichkeit effizient und selbstbestimmt arbeiten zu können.

Darüber hinaus möchte ich Dr. med. Jan Federspiel, vom Institut für Rechtsmedizin, für die wegweisende Unterstützung bezüglich histopathologischer Fragestellungen zu meinen entnommenen Proben danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Irina Scheck und Katja Schäfer, den Prosekturassistentinnen, für die angenehme Unterstützung im Labor. Sie unterstützen mich vom Beginn meiner Doktorarbeit an bei den praktischen Tätigkeiten. Die Zuversicht, dass ich mich bei jeder Fragestellung an die beiden wenden konnte, hat mir die Arbeit in den Prosektursälen und dem Labor erleichtert. Ihre freundliche, empathische und respektvolle Art werden mir als Beispiel für eine angenehme Arbeitsatmosphäre in Erinnerung bleiben.

Weiterhin danke ich auch Coline Diebolt, die zu dieser Zeit ebenfalls für ihre Promotion am hiesigen Institut war, für die freundliche Bereitstellung der Ergebnisse der Peptidinkubation.

Ebenfalls möchte ich mich bei Nadja Lambrecht und Isabell Czech für das sorgfältige und besonders gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit und ihre zielführende, konstruktive Kritik bedanken.

Ich danke Jonas Gebhardt für seinen fortwährenden Zuspruch, die motivierenden und unterstützenden Worte. Ich danke ihm für seine humorvolle, offenherzige Art, die mich glücklicherweise bei der Arbeit an dieser Promotion begleitet hat.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern Elke und Roland Kaul, denen diese Arbeit auch gewidmet ist, von ganzem Herzen danken. Ich danke ihnen einerseits für die Möglichkeit meinen Wunsch Humanmedizin zu studieren, verwirklichen zu können und andererseits für ihre bedingungslose Unterstützung, ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und dafür, dass ich durch sie die Chance bekommen habe, an dem Punkt zu stehen, an dem ich heute bin.

12 Curriculum Vitae

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

13 Anhang

Die Peptidinkubation erfolgt für den verwendeten Antikörper aus wirtschaftlichen Gründen einmalig und wurde von Coline Diebolt im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

Für die Präparate wurden Schnitte aus Gewebe der Niere verwendet.

Der Antikörper der für die Peptidinkubation verwendet wurde, war identisch mit dem, den ich für meine Proben verwendet habe (Ref.: ACC-016, Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Auch in der Verdünnung (1:50) bestand kein Unterschied.

Die Verwendung der Daten der Peptidinkubation unterliegen ihrer freundlichen Genehmigung.

Abbildungen der Spezifitätskontrolle

Die folgenden drei Abbildungen zeigen die Positivkontrolle, die peptidinkubierte Probe und die mitgeführte Negativkontrolle.

Die erste Abbildung zeigt die Positivkontrolle der Peptidinkubation. Es ist ein deutliches braunes Färbesignal zu sehen, welches TRPC3 nachweist.

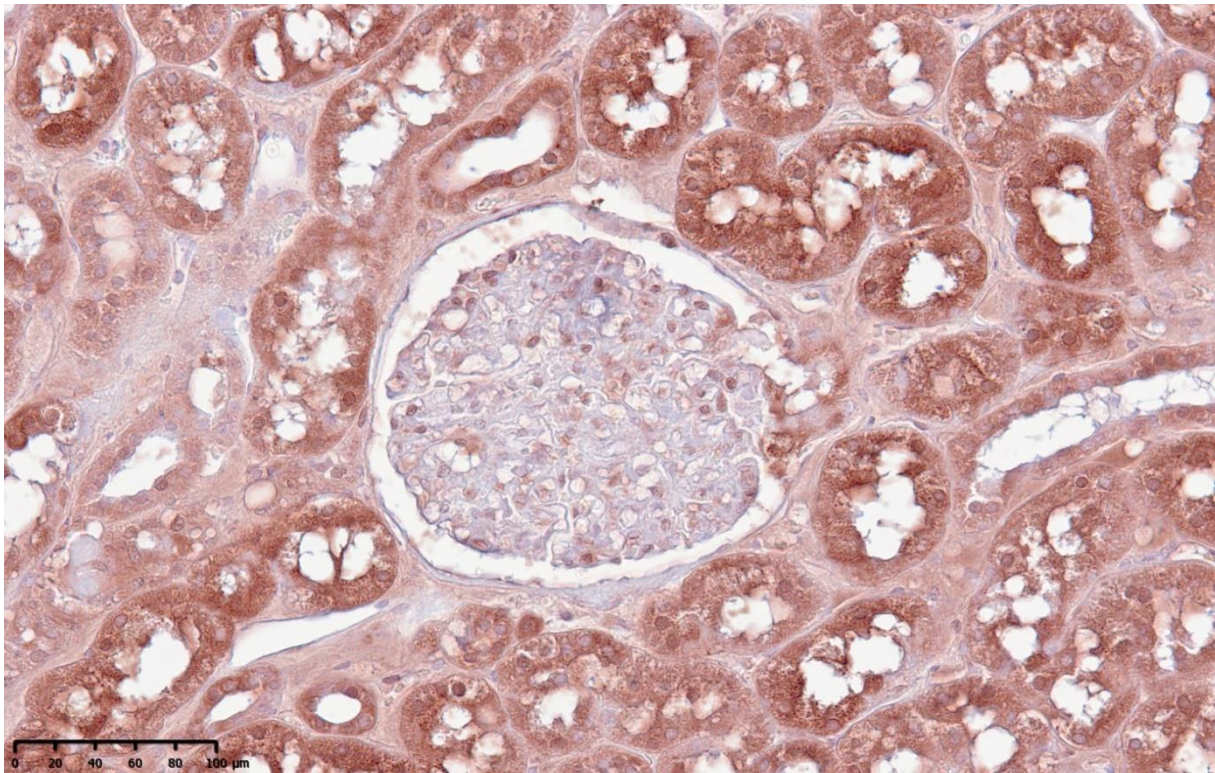


Abbildung 31: Positivkontrolle der Peptidinkubation

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der Probe, welche mit dem Kontrollpeptid inkubiert wurde. Das Färbesignal dieser Gewebeprobe ist deutlich schwächer. Dies beruht darauf, dass das Kontrollpeptid den Primärantikörper bindet. Somit bindet weniger Primärantikörper an das passende Antigen TRPC3. Folglich finden auch weniger Bindungen zwischen dem Primär- und dem Sekundärantikörper statt, wodurch das Farbsignal weniger stark ausfällt. Dieser Sachverhalt charakterisiert einen erfolgreichen Spezifitätsnachweis für TRPC3.

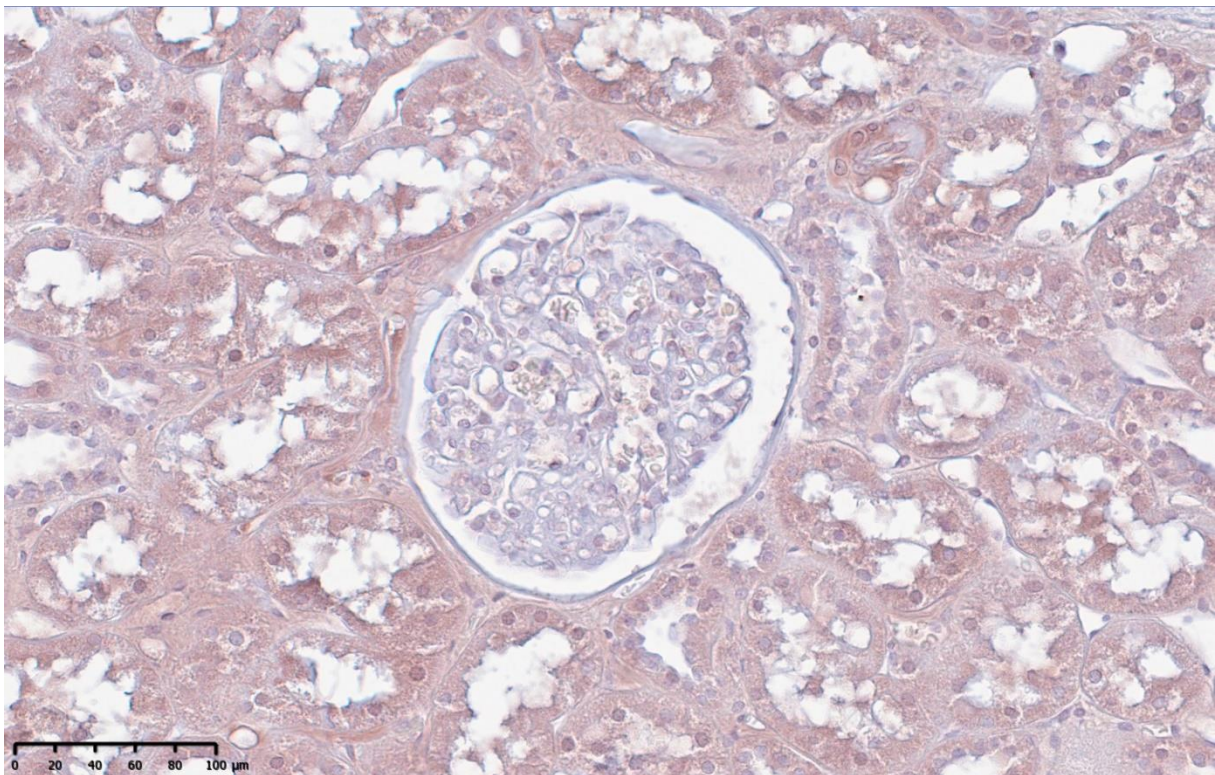


Abbildung 32: Peptidinkubierte Probe

Diese Abbildung zeigt die Negativkontrolle, die im Rahmen der Peptidkontrolle mitgeführt wurde. Es ist eine homogene Blaufärbung des Gewebes zu erkennen, welche ein negatives Ergebnis der Immunhistochemie darstellt.

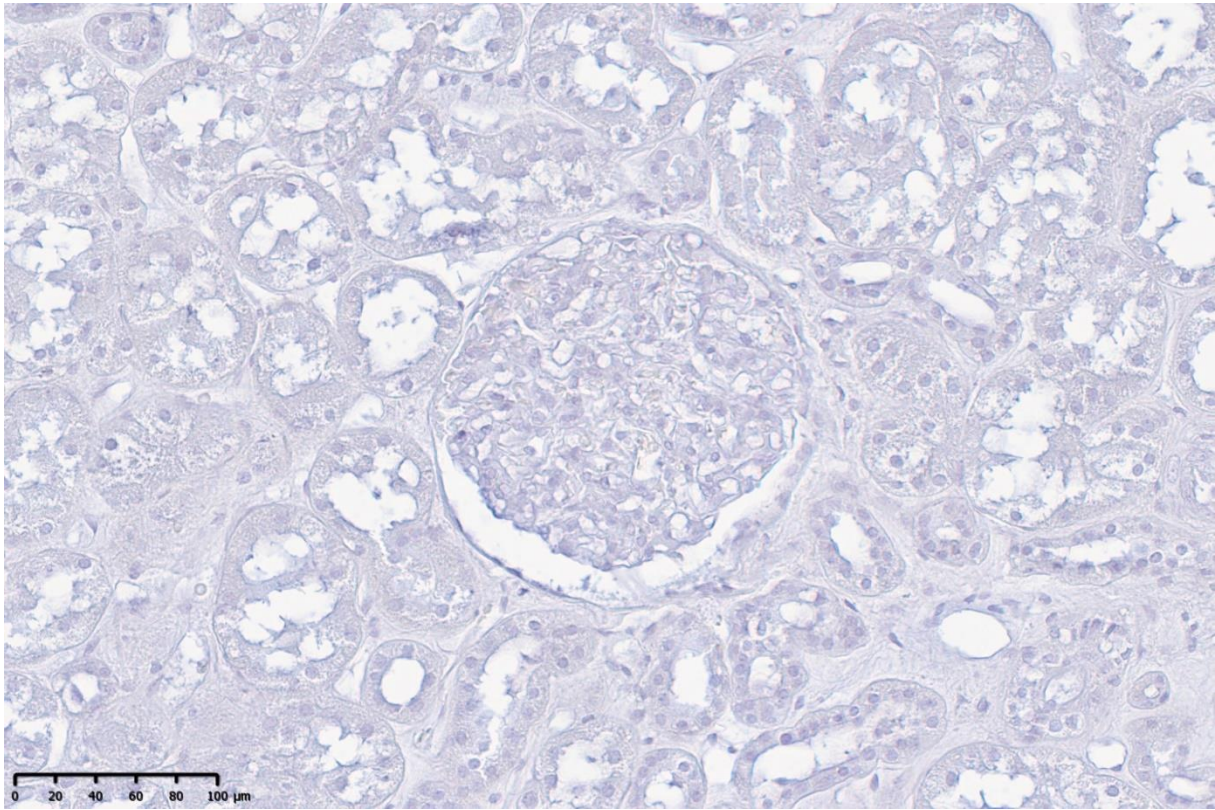


Abbildung 33: Negativkontrolle der Peptidinkubation