

Aus der Fachrichtung  
Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes  
Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

**Versuch der Genexpressionsanalyse  
des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC6  
in der menschlichen Lunge**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2025

Vorgelegt von Miriam Batzel  
Geboren am 29.06.1997 in Bad Honnef

Tag der Promotion: 01.12.2025

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

*Meiner Mutter*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1.2 Methodik .....	1
1.1.3 Ergebnisse und Ausblick .....	2
<b>1.2 Summary.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Introduction and objectives .....	3
1.2.2 Methodology .....	3
1.2.3 Results and outlook .....	4
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 TRP-Kanäle.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 TRPC-Kanäle .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 TRPC6-Kanäle .....</b>	<b>8</b>
2.3.1 Regulation der TRPC6-Kanäle.....	8
2.3.2 TRPC6 und assoziierte Pathologien.....	10
2.3.2.1 TRPC6 und assoziierte Pathologien in der Lunge .....	11
<b>2.4 Das respiratorische System .....</b>	<b>13</b>
2.4.1 Gliederung des respiratorischen Systems.....	13
2.4.2 Aufbau der Lunge.....	13
<b>2.5 Bisherige Erkenntnisse über die TRPC6-Genexpression in der Lunge .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Chemikalien.....	16
3.1.2 Primer .....	17
3.1.3 Kits .....	17
3.1.4 Geräte und Instrumente .....	18
3.1.5 Softwares .....	20
3.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	21
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Probenentnahme .....	23
3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen.....	25



3.2.2.1 Isolation der mRNA .....	25
3.2.2.1 Bestimmung der RNA- Qualität und -Quantität .....	27
3.2.2.2 Bestimmung der RNA- Integrität.....	28
3.2.2.3 Genexpressionsanalyse .....	29
3.2.2.3.1 Reverse Transkription.....	29
3.2.2.3.1.1 Reverse Transkription der Einfach – und Mehrfachkryoschnitte .....	32
3.2.2.3.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	34
3.2.2.3.2.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion der Einfach– und Mehrfachkryoschnitte.....	37
3.2.3 Anfertigung von Kryoschnitten.....	37
3.2.3.1 Anfertigung von Kryoschnitten zur histomorphologischen Darstellung .....	39
3.2.3.2 Anfertigung von Einfach- und Mehrfachkryoschnitten .....	39
3.2.3.3 Anfertigung von Kryoschnitten für die laserbasierte Mikrodissektion.....	39
3.2.4 Histologische Aufarbeitung der Kryoschnitte.....	41
3.2.4.1 Hämatoxylin- Eosin- Färbung.....	41
3.2.4.2 Photomikroskopische Darstellung .....	42
3.2.5 Laserbasierte Mikrodissektion .....	43
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Histologische Darstellung der Gewebeproben .....</b>	<b>44</b>
4.1.1 Körperspender 1, Oberlappen.....	44
4.1.2 Körperspender 2, Unterlappen .....	45
4.1.3 Körperspender 2, Oberlappen.....	46
4.1.4 Körperspender 2, Unterlappen .....	47
4.1.5 Körperspender 3, Oberlappen.....	48
4.1.6 Körperspender 3, Unterlappen .....	49
<b>4.2 RNA-Qualität und -Quantität .....</b>	<b>50</b>
4.2.1 RNA-Qualität und -Quantität der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte .....	51
<b>4.3 RNA-Integrität .....</b>	<b>53</b>
4.3.1 RNA-Integrität der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte.....	55
<b>4.4 Genexpressionsanalyse .....</b>	<b>55</b>
4.4.1 Genexpressionsanalyse der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte.....	57
<b>4.5 Laserbasierte Mikrodissektion .....</b>	<b>60</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Diskussion der Methodik .....</b>	<b>61</b>
5.1.1 Patientenkollektiv.....	61

5.1.2 Probenentnahme .....	61
5.1.3 Molekularbiologische Untersuchungen.....	62
5.1.4 Anfertigung von Kryoschnitten.....	62
5.1.5 Anfertigung von Kryoschnitten und Durchführung der laserbasierten Mikrodissektion.....	63
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
5.2.1 Histologische Darstellung .....	64
5.2.2 RNA-Qualität und -Quantität .....	64
5.2.3 RNA-Integrität.....	65
5.2.4 Diskussion der Genexpressionsanalysen und klinische Einordnung .....	66
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>69</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>78</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	Intrazelluläre Calciumkonzentration
°C .....	Grad Celcius
A <sub>230</sub> .....	Absorptionsmaximum bei 230 Nanometern
A <sub>260</sub> .....	Absorptionsmaximum bei 260 Nanometern
A <sub>280</sub> .....	Absorptionsmaximum bei 280 Nanometern
Abb. ....	Abbildung
ATII .....	Angiotensin II
ATPase .....	Adenosintriphosphatasen
Ca <sup>2+</sup> .....	Calcium
cDNA .....	complementary DNA (Komplementäre DNA)
CIRB .....	Calmodulin- und IP <sub>3</sub> -Rezeptor-Bindedomäne
COOH .....	Carboxygruppe
COPD .....	chronic- obstructive pulmonary disease (Chronisch- obstruktive Lungenerkrankung)
C <sub>q</sub> .....	Quantification cycle (Quantifizierungszyklus)
C <sub>RNA</sub> .....	RNA concentration (RNA-Konzentration)
C <sub>t</sub> .....	Cycle Threshold (Schwellenwertzyklus)
d. h. ....	das heißt
DAG .....	Diacylglycerol
DNA .....	deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
dsDNA .....	double- stranded DNA (Doppelsträngige DNA)
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
Eng. ....	Englisch
ER .....	Endoplasmatisches Retikulum
FSGS .....	Fokal- segmentale Glomerulosklerose
g .....	Gravitationskraft
GAPDH .....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA .....	genomic deoxyribonucleic acid (Genomische Deoxyribonukleinsäure)
GPCRs .....	G- Protein- gekoppelte Rezeptoren
GTC .....	Guanidiniumthiocyanat
GuHCl .....	Guanidinhydrochlorid
H <sub>2</sub> O .....	Wasser
HE .....	Hämatoxylin-Eosin
HPV .....	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
IP <sub>3</sub> .....	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP <sub>3</sub> R .....	Inositol-1,4,5-trisphosphat- Rezeptor

IPAH .....	Idiopathische pulmonal- arterielle Hypertonie
K <sup>+</sup> .....	Kalium
LCM .....	laser capture microdissection (Laserbasierte Mikrodisektion)
LIRE.....	Lung ischaemia-reperfusion-induced oedema (Ischämie- reperfusionsbedingtes Lungenödem)
LMPC .....	(Laserbasierte Mikrodisektion und Druck-Katapultierung (Eng.: pressure catapulting))
M. ....	
.....	Morbus
min.....	Minute
ml .....	Milliliter
mRNA .....	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
Na <sup>+</sup> .....	Natrium
ng .....	Nanogramm
NH <sub>2</sub> .....	Aminogruppe
nm.....	Nanometer
nt .....	Nukleotide
NTC.....	no template control (Negativkontrolle)
PASMCs.....	pulmonary artery smooth muscle cells (Pulmonal- arterielle glatte Muskelzellen)
PCR .....	polymerase chain reaction (Polymerase- Kettenreaktion)
PIP <sub>2</sub> .....	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC .....	Proteinkinase C
PLC .....	Phospholipase C
PMCA .....	Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase (Calcium- ATPase der Plasmamembran)
qPCR .....	Quantitative PCR
RIN.....	RNA Integrity Number (RNA- Integritätswert)
RNA .....	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase .....	Ribonuklease
ROC.....	receptor- operated channel activation (Rezeptorgesteuerte Kanalaktivierung)
rpm .....	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
R <sub>Q</sub> - Wert.....	Relative Quantifizierungswert
rRNA .....	Ribosomale RNA
RT.....	Reverse Transkription
RT-PCR.....	Reverse- Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion
s .....	Sekunden
SERCA.....	Calcium- ATPase des sarkoplasmischen und endoplasmischen Retikulums
SOC.....	store- operated channel activation (Speichergesteuerte Kanalaktivierung)
ssDNA .....	single- stranded DNA (Einzelsträngige DNA)
STIM1 .....	stromal interaction molecule 1 (Stromales Interaktionsmolekül)

TGF- $\beta$ 1 .....	transforming growth factor $\beta$ 1 (Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ 1)
T <sub>m</sub> .....	Schmelztemperatur
TM1–TM6.....	Transmembrane Domäne 1-6
TRP .....	Transient Receptor Potential
UV .....	Ultraviolettstrahlung
vgl.....	vergleiche
WT.....	Wildtyp
z.B. ....	zum Beispiel
$\mu$ g .....	Mikrogramm
$\mu$ l .....	Mikroliter
$\mu$ m .....	Mikrometer

## **1. Zusammenfassung**

### **1.1 Zusammenfassung**

#### **1.1.1 Einleitung und Zielsetzung**

Transient Receptor Potential- Kanäle stellen nicht-selektive Kationenkanäle dar, die sieben Unterfamilien umfassen. Darunter stellt TRPC6 eine Unterfamilie dar. TRPC6 bildet einen homo- oder heterotetrameren, nicht-selektiven Kationenkanal, der insbesondere eine hohe Permeabilität für Calciumionen aufweist. Er ist in zahlreichen Geweben nachweisbar, unter anderem in der Niere, dem Herz, dem Gehirn, der Plazenta, der Muskulatur und der Lunge. Seine Bedeutung zeigt sich nicht nur in physiologischen Prozessen, sondern auch im Kontext pathologischer Veränderungen. So wird TRPC6 zum Beispiel mit glomerulären und kardiovaskulären Erkrankungen, Tumorprogression sowie fibrotischen Umbauprozessen in Verbindung gebracht. In der Lunge konnte TRPC6 unter anderem mit hypoxischer Vasokonstriktion, pulmonaler Hypertonie, der chronisch- obstruktiven Lungenerkrankung, pulmonaler Fibrose und dem Ischämie- reperfusionsbedingten Lungenödem in Verbindung gebracht werden. Trotz dieser klinischen Relevanz ist die Verteilung von TRPC6 in der Lunge bislang nur unvollständig charakterisiert. Frühere Studien konnten zwar die TRPC6-mRNA im Lungengewebe und teils in spezifischen pulmonalen Strukturen nachweisen, ließen jedoch offen, aus welchen anatomischen Regionen das Material stammte. Vor diesem Hintergrund widmet sich die vorliegende Arbeit der systematischen Analyse der TRPC6-mRNA-Expression in verschiedenen Bereichen der menschlichen Lunge. Ziel ist es, die Expression und die Verteilung von TRPC6 im Ober- und Unterlappen zu untersuchen, um Erkenntnisse über mögliche topografischen Expressionsunterschiede zu gewinnen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob sich TRPC6-mRNA in spezifischen pulmonalen Gewebestrukturen, wie beispielsweise Bronchiolen, innerhalb dieser Lungenareale nachweisen lässt.

#### **1.1.2 Methodik**

Es wurden insgesamt sechs Gewebeproben aus den Ober- und Unterlappen von drei Körperspendern entnommen. Um einen allgemeinen Nachweis der TRPC6-mRNA in beiden Lungenlappen zu erbringen, wurde ein Teil der Proben direkt einer Genexpressionsanalyse unterzogen. Der andere Teil der Gewebeproben wurde für die Anfertigung von Einfach- und Mehrfachkryoschnitten verwendet, um erneut eine Genexpressionsanalyse durchzuführen. Zunächst war das Ziel, die minimale Schnittanzahl zu bestimmen, bei der TRPC6-mRNA noch nachweisbar ist. Zusätzlich sollten topografische Unterschiede in der Genexpression untersucht werden. Zur histomorphologischen Darstellung der Gewebeproben wurden Kryoschnitte angefertigt, die einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen wurden. Nachdem der Nachweis erbracht worden war, dass TRPC6-mRNA bis zu einem einzelnen

Kryoschnitt nachweisbar ist, wurden weitere Kryoschnitte für die laserbasierte Mikrodissektion angefertigt. Nachfolgend sollten spezifische pulmonale Gewebestrukturen am Mikroskop identifiziert, mit dem Laser umfahren und anschließend erneut eine Genexpressionsanalyse durchgeführt werden.

### **1.1.3 Ergebnisse und Ausblick**

TRPC6-mRNA konnte in allen Gewebeproben nachgewiesen werden, selbst aus minimalem Ausgangsmaterial bis hin zu einem einzelnen Kryoschnitt. Die Ergebnisse deuten auf eine tendenziell höhere TRPC6-Expression im Oberlappen hin, was auf ein lappenspezifisches Expressionsmuster schließen lassen könnte. Diese Beobachtung könnte pathophysiologisch mit der bevorzugten Beteiligung des Oberlappens bei der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung sowie weiteren lappenspezifischen Lungenerkrankungen in Zusammenhang stehen. Die laserbasierte Mikrodissektion konnte in dieser Arbeit nicht erfolgreich umgesetzt werden, was möglicherweise auf technische Limitierungen wie übermäßige Schnittdicken, verbliebene Einbettmediumreste und das Fehlen einer kontrastverstärkenden Färbung zurückzuführen ist. Dennoch legen die erzielten Nachweise nahe, dass eine TRPC6-Analyse in mikroskopisch kleinen Lungenstrukturen möglich ist. Weiterführende, systematische Untersuchungen mit optimierter Gewebeaufbereitung und größerem Probenumfang sind erforderlich, um das lappenspezifische Verteilungsmuster zu validieren, dessen funktionelle Bedeutung zu evaluieren und TRPC6 als möglichen diagnostischen Marker oder als therapeutischen Ziel weiter zu untersuchen.

## **1.2 Summary**

### **1.2.1 Introduction and objectives**

Transient Receptor Potential Channels are non-selective cation channels that comprise seven subfamilies. TRPC6 is one of these subfamilies. TRPC6 forms a homo- or heterotetrameric, non-selective cation channel with a high permeability for calcium ions. It can be detected in numerous tissues, including the kidney, heart, brain, placenta, muscles and lungs. Its importance is not only evident in physiological processes, but also in the context of pathological changes. For example, TRPC6 is associated with glomerular and cardiovascular diseases, tumour progression and fibrotic remodelling processes. In the lungs, TRPC6 has been associated with hypoxic vasoconstriction, pulmonary hypertension, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis and ischaemia-reperfusion-induced pulmonary oedema. Despite this clinical relevance, the distribution of TRPC6 in the lungs has so far only been incompletely characterised. Earlier studies were able to detect TRPC6 mRNA in lung tissue and in some cases in specific pulmonary structures, but left open the anatomical regions from which the material originated. Against this background, the present study is dedicated to the systematic analysis of TRPC6 mRNA expression in different areas of the human lung. The aim is to analyse the expression and distribution of TRPC6 in the upper and lower lobes in order to gain insights into possible topographical differences in expression. In addition, it will be investigated whether TRPC6 mRNA can be detected in specific pulmonary tissue structures, such as bronchioles, within these lung areas.

### **1.2.2 Methodology**

A total of six tissue samples were taken from the upper and lower lobes of three body donors. In order to provide a general detection of TRPC6 mRNA in both lobes, a portion of the samples were directly subjected to gene expression analysis. The other part of the tissue samples was used for the preparation of single and multiple cryosections to perform gene expression analysis again. The initial aim was to determine the minimum number of sections at which TRPC6 mRNA is still detectable. In addition, topographical differences in gene expression were to be analysed. For histomorphological visualisation of the tissue samples, cryosections were prepared and subjected to haematoxylin-eosin staining. Once it had been demonstrated that TRPC6 mRNA was detectable up to a single cryosection, further cryosections were prepared for laser-based microdissection. Subsequently, specific pulmonary tissue structures were to be identified under the microscope, circled with the laser and then gene expression analysis was to be performed again.



### **1.2.3 Results and outlook**

TRPC6 mRNA could be detected in all tissue samples, even from minimal starting material up to a single cryosection. The results indicate a tendency towards higher TRPC6 expression in the upper lobe, which could suggest a lobe-specific expression pattern. This observation could be pathophysiologically related to the preferential involvement of the upper lobe in chronic obstructive pulmonary disease and other lobe-specific lung diseases. Laser-based microdissection could not be successfully implemented in this work, possibly due to technical limitations such as excessive section thicknesses, residual embedding medium and the lack of contrast-enhancing staining. Nevertheless, the evidence obtained suggests that TRPC6 analysis is possible in microscopically small lung structures. Further systematic studies with optimised tissue preparation and larger sample size are required to validate the lobe-specific distribution pattern, evaluate its functional significance and further investigate TRPC6 as a potential diagnostic marker or therapeutic target.

## 2. Einleitung

### 2.1 TRP-Kanäle

Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle bilden eine große Superfamilie von nicht-selektiven Kationenkanälen, die in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert werden und an essenziellen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Dazu zählen unter anderem die Wahrnehmung physikalischer und chemischer Reize wie Temperatur, Schmerz, mechanischer Stress sowie die Regulation der Kalziumhomöostase und des Zellvolumens. [40][13][54]

Die TRP-Kanal-Superfamilie unterteilt sich in sieben strukturell und funktionell differenzierte Unterfamilien: TRPC (Canonical oder classical), TRPV (Vanilloid- Rezeptor), TRPM (Melastatin), TRPA (ANKTM1), TRPN (*No mechanoreceptor potential C*, NOMPC), TRPML (Mucolipin) und TRPP (Polycystin). [54] Diese sind in Abbildung 1 als phylogenetischer Stammbaum dargestellt.

Der Name der TRP-Kanäle geht auf eine Mutation im *trp*-Gen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurück, bei der ein verändertes visuelles Antwortverhalten auf kontinuierliche Lichteinstrahlung beobachtet wurde – ein transientes, also kurzzeitiges Potenzial, statt einer anhaltenden Depolarisation.[39] Unter den humanen TRP-Kanälen weisen die TRPC-Kanäle die größte strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu diesem ursprünglichen *Drosophila*-TRP-Kanal auf. [53]

Die TRP-Kanäle bestehen aus sechs transmembranen Domänen (TM1–TM6), wobei sich zwischen TM5 und TM6 eine Selektivitäts-Pore befindet, die den eigentlichen Kationenkanal bildet.[14] Weiterhin verfügen TRP- Kanäle über zytoplasmatischen Amino- (NH<sub>2</sub>) und Carboxy- (COOH) termini. [14]

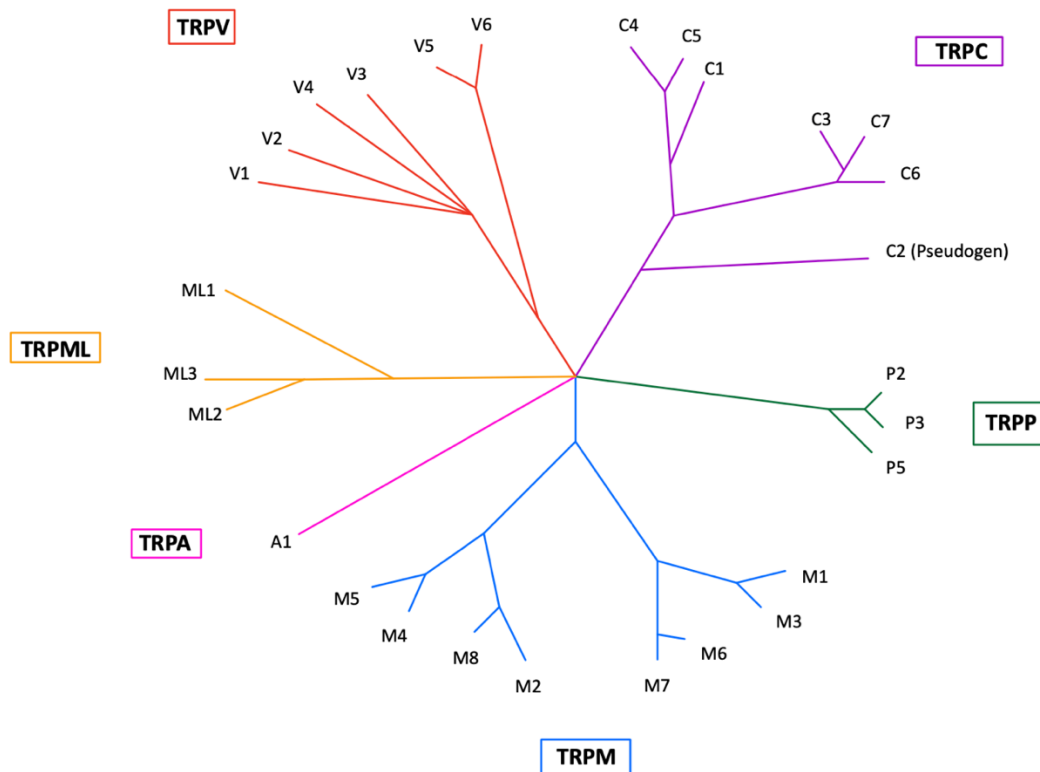


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP- Kanäle (Abbildung modifiziert nach [13])

## 2.2 TRPC-Kanäle

Die TRPC-Familie umfasst sieben Mitglieder (TRPC1–TRPC7), von denen sechs funktionelle Proteine im Menschen exprimieren. TRPC2 stellt in der humanen Genomsequenz ein Pseudogen dar. Dies bedeutet, dass das entsprechende Gen zwar vorhanden, jedoch translational inaktiv ist, und somit nicht zur Synthese eines funktionellen Proteins führt. In anderen Eukaryoten, etwa in Nagetieren, wird TRPC2 hingegen als funktioneller Kanal exprimiert und spielt dort eine Rolle, insbesondere im olfaktorischen System. [53][37]

Strukturell zeichnen sich TRPC-Kanäle durch ihre konservierten, zytoplasmatischen Domänen aus: Der N-Terminus enthält vier Ankyrin-Repeat-Motive sowie eine coiled-coil-Domäne. Der C-Terminus trägt eine ca. 25 Aminosäuren lange, konservierte „TRP-Box“ (EWKFR), eine prolinreiche Sequenz (TRP-Box 2), eine Calmodulin- und IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Bindedomäne (CIRB), sowie eine weitere coiled-coil-Region. [8][20] Die zytoplasmatischen Domänen spielen unter anderem eine Rolle in Protein- Protein-Interaktion sowie in der Zusammenlagerung zu funktionalen Tetrameren und deren Stabilisierung. [20][35] Der schematische Aufbau eines TRPC- Kanals wurde anhand des schematischen Aufbaus eines TRPC6- Kanals in Abbildung 2 dargestellt.

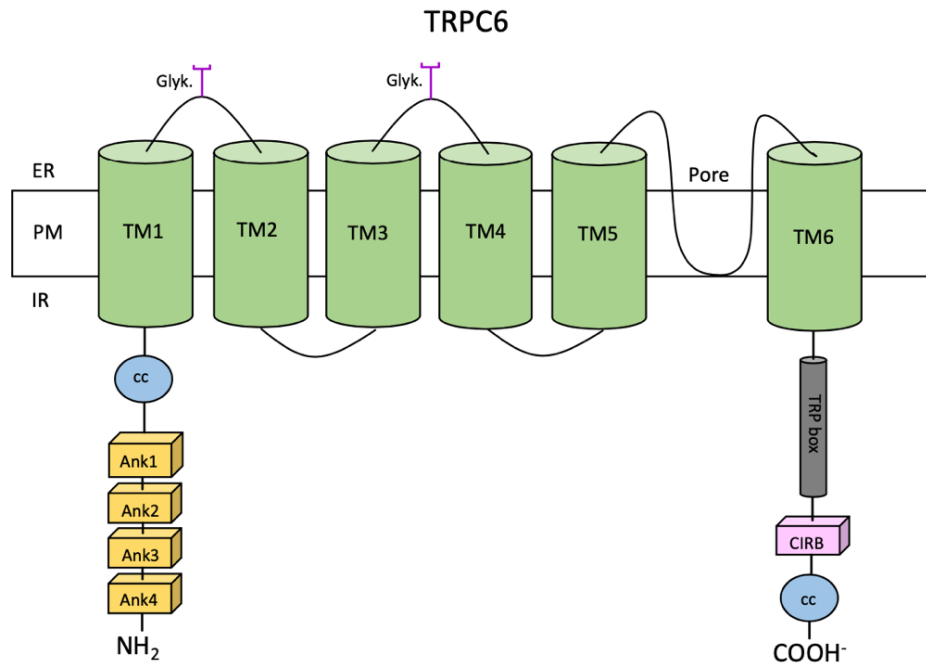
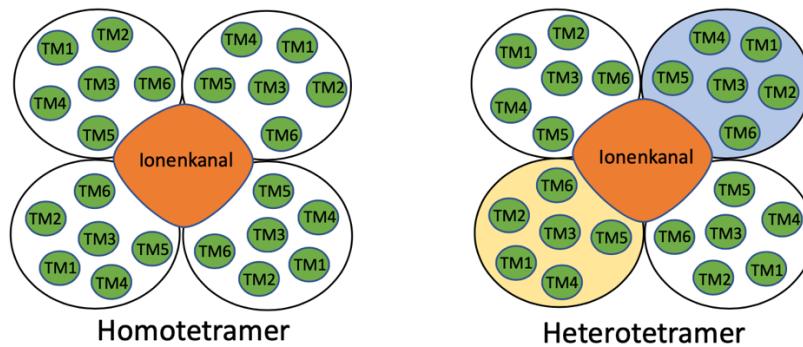


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des TRPC6- Kanals (Abbildung modifiziert nach [20])  
 (ER: Extrazellularraum; PM: Plasmamembran; IR: Intrazellularraum; TM1-6: Transmembranprotein 1-6; cc: coiled- coil Domäne; Ank1-4: Ankyrin 1-4; CIRB: Calmodulin und IP3- Rezeptor- bindende Domäne; Glyk.: Glykolisierungs- Domäne)

Alle TRPC-Kanäle sind in der Lage, sich zu funktionellen Tetrameren zusammenzulagern. Diese bestehen entweder aus vier identischen Untereinheiten (Homotetramere) oder aus unterschiedlichen TRPC-Subtypen (Heterotetramere). [35] Eine schematische Darstellung der Tetramere ist in Abbildung 3 dargestellt. Wie bereits erwähnt, befindet sich zwischen Transmembranprotein 5 und 6 eine Pore, die den eigentlichen Ionenleitweg bildet. Erst jedoch durch die tetramere Anordnung von vier Kanälen entsteht ein funktioneller Ionenkanal. [35] Dies führt dazu, dass auch Kanäle desselben Subtyps unterschiedliche ionenselektive Eigenschaften aufweisen können und unterstreicht die Komplexität der TRPC- Kanäle. [20]



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung eines homo- und heterotetramerschen Ionenkanals (Abbildung modifiziert nach [59][25]) (Jeweils vier Monomere, bestehend aus 6 Transmembranproteinen (TM1-6), bilden einen Kationenkanal. Bei einem Homotetramer bilden vier gleiche Monomere ein Tetramer aus. Bei einem Heterotetramer bilden unterschiedliche Monomere ein Tetramer.)

## 2.3 TRPC6-Kanäle

Der TRPC6-Kanal gehört zur TRPC-Familie und bildet, wie andere TRP-Kanäle auch, einen tetrameren, nicht-selektiven Kationenkanal, der in der Plasmamembran lokalisiert ist. Der Ionenkanal ist durchlässig für eine Vielzahl positiv geladener Ionen, darunter divalente Kationen wie Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) oder monovalente Kationen wie Natrium ( $\text{Na}^+$ ). [30] TRPC6 zeigt jedoch eine signifikant höhere Permeabilität für Calciumionen im Vergleich zu anderen Kationen auf, was auf eine zentrale Rolle in der Regulation der zellulären Calciumhomöostase hinweist. [18][1] Demnach wird eine Dysregulation der TRPC6-Expression oder -Funktion mit mehreren pathophysiologischen Zuständen in Verbindung gebracht, darunter glomerulären Erkrankungen wie der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), der pulmonalen Hypertonie sowie fibrotischer Umbauprozesse in verschiedenen Organen. [20][1]

### 2.3.1 Regulation der TRPC6-Kanäle

Die Regulation der Aktivität von TRPC6-Kanälen ist bislang nicht vollständig erforscht. Als zwei der wichtigsten und am besten untersuchten Aktivierungsmechanismen gelten jedoch die rezeptorgesteuerte Kanalaktivierung (*receptor-operated channel activation*, ROC) und die speichergesteuerte Kanalaktivierung (*store-operated channel activation*, SOC). [56] Beide Mechanismen führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und wirken sich auf die Membranpotenzialverhältnisse aus. Eine schematische Darstellung der Regulation des TRPC6-Kanals ist in Abbildung 4 dargestellt.

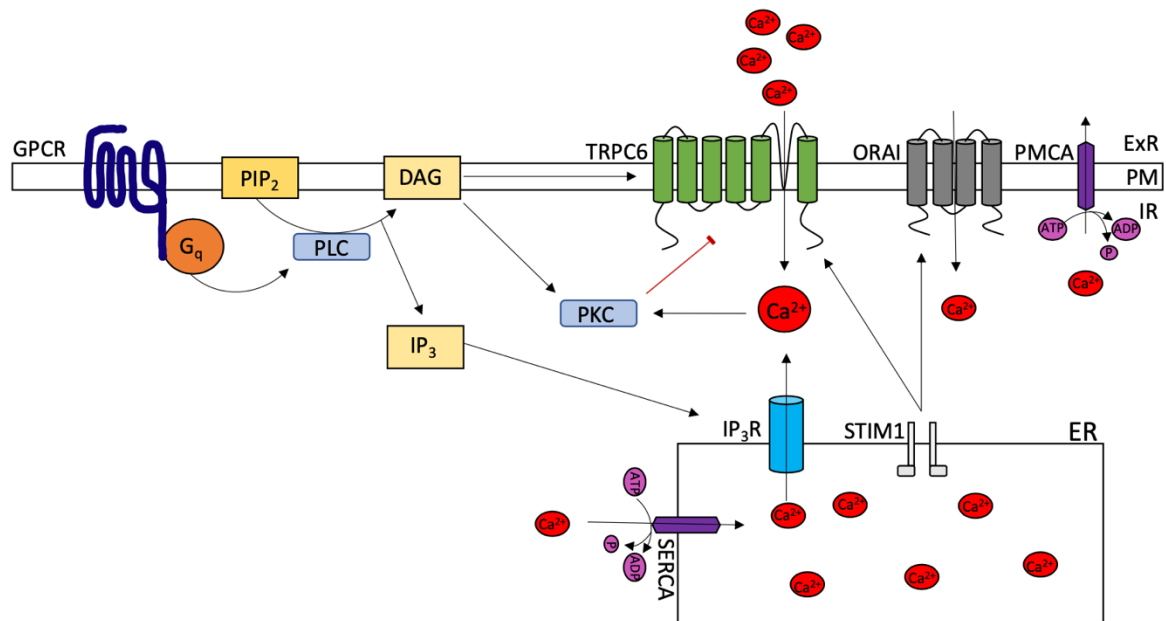
Im Rahmen der ROC erfolgt die Aktivierung von TRPC6 über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Nach Ligandenbindung wird über die Aktivität der Phospholipase C (PLC) das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) hydrolysiert. [1] Dabei entstehen zwei Second Messenger: Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ). [56] DAG aktiviert TRPC6 direkt, was einen Einstrom von extrazellulärem Calcium über die Plasmamembran vermittelt. [47][56] Diese Aktivierung kann sowohl durch endogen gebildetes DAG als auch durch synthetische DAG-Analoga erfolgen. [1][46]

Im Rahmen der SOC bindet das durch PLC gebildete  $\text{IP}_3$  an den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). [56] Dies führt zur Freisetzung von Calcium aus dem ER-Lumen. [56][47]

Der daraus resultierende Abfall der intraluminalen Calciumkonzentration wird durch das im ER lokalisierte Protein STIM1 (stromal interaction molecule 1) detektiert. [61] STIM1 enthält eine Calcium-bindende Domäne im ER-Lumen, die auf Calcium-Depletion reagiert. [61] Die Aktivierung von STIM1 löst zwei zelluläre Prozesse aus: zum einen führt sie zur Aktivierung des Plasmamembranproteins Orai1, das den klassischen SOC-Kanal bildet, und zum anderen zur Heteromerisierung von TRPC6 mit anderen TRPC-Kanälen. [61] Beide Prozesse begünstigen einen anhaltenden Calcium-Einstrom und tragen zur Wiederauffüllung der Calcium-Speicher im ER bei. [56]

Zusätzlich wird TRPC6 durch die Proteinkinase C (PKC) reguliert. Eine DAG-Erhöhung sowie ein Anstieg von ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) aktivieren PKC, welche TRPC6 an spezifischen Serin-/Threoninresten phosphorylieren kann. [8] Diese Phosphorylierung führt zu einer negativen Rückkopplung und hemmt die Kanalaktivität. [8]

Die Wiederherstellung der basalen intrazellulären Calciumkonzentration erfolgt durch aktive Calcium-Transportmechanismen: die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (sarco- /endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA) pumpt Calcium zurück in das ER, während die Calcium-ATPase der Plasmamembran (Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, PMCA) Calcium in den extrazellulären Raum transportiert. [23] Beide Mechanismen tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung der zellulären Calciumhomöostase bei.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Regulation des TRPC6- Kanals (Abbildung modifiziert nach [8][46][12]) (GPCR: G- Protein gekoppelte Rezeptor; Gq: Guaninnucleotide- bindendes Protein; PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC: Phospholipase C; DAG: Diacylglycerol; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat; IP3R: IP3- Rezeptor; PKC: Proteinkinase C; ExR: Extrazellularraum; PM: Plasmamembran; IR: Intrazellularraum; ER: Endoplasmatisches Retikulum; SERCA: Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase; PMCA: Plasmamembran Calcium ATPase; ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; P: abgespaltene Phosphatgruppe)

### 2.3.2 TRPC6 und assoziierte Pathologien

TRPC6 wird im menschlichen Körper nahezu ubiquitär exprimiert. So wurde dessen Expression unter anderem in der Lunge, im Gehirn, in der Niere oder Blutgefäßen festgestellt. [34][9][22][1]

Aufgrund dieser ubiquitären Exprimierung, sowie der zentralen Rolle der TRPC6- Kanäle in der Calciumhomöostase, ist der TRPC6- Kanal bei Dysregulation oder Mutation mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Im Folgenden werden einige assoziierte Pathologien dargelegt.

Eine der am besten untersuchten Erkrankungen in diesem Zusammenhang ist die autosomal- dominante vererbte, fokalsegmentale Glomerulosklerose (FSGS). Dabei handelt es sich um eine chronisch-progrediente Glomerulopathie, bei der Mutationen im TRPC6-Gen zu einer konstitutiven Kanalaktivität führen. [49] Dies resultiert in einem pathologisch erhöhten Calcium-Einstrom in Podozyten, wodurch es zu einem Remodeling des Strukturproteins Aktin kommt und das Aktin-Zytoskelett nachfolgend destabilisiert wird. [22][26] Dies führt zur Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere, was klinisch in einer Proteinurie mündet. [22]

Zunehmend rückt TRPC6 auch in den Fokus der Tumorforschung. In verschiedenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel bei Hirntumoren wie Gliomen, Brustkrebs, Magen-, Leber- oder Prostatakarzinom, konnte eine übermäßige TRPC6-Expression nachgewiesen werden. [29][10] Funktionelle Studien zeigen, dass TRPC6 Prozesse wie Tumorzellmigration, Invasion und Proliferation unterstützt. [29] Darüber hinaus gibt es erste Hinweise, dass eine TRPC6- Überexpression mit Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika assoziiert sein könnte. [41]

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Exprimierung von TRPC6 in der Lunge liegt, wird im Folgenden näher auf TRPC6-assoziierte pulmonale Pathologien eingegangen.

### **2.3.2.1 TRPC6 und assoziierte Pathologien in der Lunge**

TRPC6 spielt eine zentrale Rolle in der akuten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), einem physiologischen Mechanismus zur Optimierung der pulmonalen Ventilations-Perfusions-Verhältnisse. HPV ist eine kompensatorische Reaktion auf akute Hypoxämie, also auf einen verminderten arteriellen Sauerstoffpartialdruck. [48] Der daraus resultierende Sauerstoffmangel führt über eine Akkumulation von DAG zur Aktivierung von TRPC6 und zum Calcium-vermittelten Kontraktionssignal in präkapillären pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (pulmonary artery smooth muscle cells, PAMCs), was eine Gefäßverengung zur Folge hat. [57] Dadurch wird sauerstoffarmes Blut bevorzugt in besser oxygenierte Areale der Lunge umgeleitet, um den Gasaustausch zu optimieren. Im Mausmodell zeigte sich, dass TRPC6-defiziente Tiere keine adäquate HPV-Reaktion ausbilden, während diese in Wildtyp-Mäusen (WT) vollständig erhalten war. [57] Dies unterstreicht die funktionelle Bedeutung von TRPC6 in der akuten pulmonalen Hypoxieantwort. Vor diesem Hintergrund erscheint eine pharmakologische Modulation von TRPC6 als potenzielle therapeutische Option bei akuter Hypoxämie.

Auch in der idiopathischen pulmonal arteriellen Hypertonie (IPAH) ist TRPC6 pathophysiologisch von Bedeutung. Studien konnten eine verstärkte Expression von TRPC6 in PAMCs und im Lungengewebe von IPAH-Patienten nachweisen. [43][60] Funktionell führt dies zu einem erhöhten intrazellulären Calciumspiegel in PAMCs, was einen bedeutenden Stimuli für Kontraktion, Proliferation und Migration dieser Zellen darstellt. [60] Dies resultiert in einer Hypertrophie der Tunica media, einer Lumeneinengung, einem gesteigerten pulmonalen Gefäßwiderstand sowie einem progressiven Anstieg des pulmonalen arteriellen Drucks. [43] Im weiteren Verlauf kann dies zu einer Rechtsherzhypertrophie und letztlich zum Rechtsherzversagen führen. [43] Therapeutisch relevant ist die Beobachtung, dass der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan die Expression von TRPC6 herunterreguliert, was die Proliferation von PAMCs hemmt und somit eine potenzielle Behandlungsstrategie bei der IPAH darstellen könnte. [33]



Weiterhin gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass TRPC6 an der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (chronic- obstructive pulmonary disease, COPD) beteiligt ist. Die COPD ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch persistierende Inflammation, strukturelle Umbauprozesse des Lungengewebes und eine progrediente Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist. [52] Nikotinexposition, insbesondere durch Zigarettenrauch, gilt als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung dieser Erkrankung. [52] In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass Nikotin die Expression von TRPC6 erhöht. [27] Darüber hinaus wurde eine verstärkte TRPC6-Expression in glatten Muskelzellen der Atemwege von COPD-Patienten nachgewiesen. [27] Diese Überexpression könnte im Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferation der Zellen stehen, die wiederum zur Remodellierung der Atemwege beitragen könnte. [27]

Weiterhin konnte in-vivo gezeigt werden, dass TRPC6- defizitäre Fibroblasten eine reduzierte Reaktion auf transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) oder Angiotensin II (ATII) aufweisen und somit die Fibroblast- Myofibroblast- Differenzierung reduziert ist. [16] Die Aktivierung von TRPC6 führt zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle und aktiviert die Proteinphosphatase Calcineurin, welche über nachgeschaltete Signalwege die fibroblastäre Differenzierung vermittelt. [16] Myofibroblasten zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, extrazelluläre Matrixproteine, insbesondere Kollagen, zu synthetisieren und gleichzeitig kontraktile Eigenschaften zu entwickeln. [16] Sie spielen eine wichtige Rolle in der physiologischen Wundheilung. Wird dieser Differenzierungsprozess jedoch nicht adäquat reguliert, kann es zu Störungen der Wundheilung oder zur Entwicklung fibrotischer Prozesse kommen. In diesem Zusammenhang deutet eine Studie darauf hin, dass TRPC6-induzierte Myofibroblastenbildung wesentlich zur Progression pulmonaler Fibrose beiträgt. [28] In einem Mausmodell mit Mäusen mit Bleomycin- induzierter pulmonaler Fibrose konnte gezeigt werden, dass TRPC6-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikant reduzierte pulmonale Kollagensynthese, eine verminderte Kontraktilität von Lungenfibroblasten sowie eine bessere Lungenfunktion aufwiesen. [28] Diese Ergebnisse geben Hinweise auf die potenzielle Bedeutung von TRPC6 als pathophysiologischer Mediator in der fibrotischen Umstrukturierung der Lunge.

Darüber hinaus scheint TRPC6 eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des ischämie-reperusionsbedingten Lungenödems (Lung ischaemia-reperfusion-induced oedema, LIRE) zu spielen, welches häufig im Rahmen von Lungentransplantationen oder Lungenembolien auftritt. [58] Bei der Reperfusion führt ein TRPC6-vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in pulmonale Endothelzellen zur Aktivierung der Aktin-Myosin-Kontraktion, was die Bildung interendothelialer Lücken und damit eine gesteigerte Gefäßpermeabilität zur Folge hat. [55] Dies begünstigt die Extravasion von Flüssigkeit und Plasmaproteinen in das Interstitium und damit Ödembildung In TRPC6-defizienten Mäusen war diese

Permeabilitätssteigerung nicht nachweisbar, was auf die zentrale Bedeutung des Kanals in der Entstehung von LIRE hinweist. [58] Da LIRE mit erhöhter Abstoßungsrate, Morbidität und Mortalität nach Lungentransplantation assoziiert ist, erscheint die pharmakologische Inhibition von TRPC6 als potenzielle therapeutische Strategie. [58]

## **2.4 Das respiratorische System**

### **2.4.1 Gliederung des respiratorischen Systems**

Das respiratorische System lässt sich sowohl funktionell als auch anatomisch in definierte Abschnitte unterteilen. Funktionell erfolgt die Einteilung in eine luftleitende und eine gasaustauschende Region. Die luftleitende Region umfasst die Strukturen von den Nasenvorhöfen über den Pharynx und Larynx, die Trachea sowie die Bronchien bis zu den terminalen Bronchiolen. In diesem Abschnitt wird die Atemluft befeuchtet, erwärmt und von Partikeln gereinigt, ohne dass ein Gasaustausch stattfindet. Die gasaustauschende Region beginnt mit den respiratorischen Bronchiolen und erstreckt sich über die Alveolargänge bis hin zu den Alveolen, wo der eigentliche Gasaustausch zwischen Luft und Blut erfolgt. Anatomisch wird das respiratorische System in ein oberes und ein unteres respiratorisches System gegliedert. Zum oberen respiratorischen System zählen die extrathorakal gelegenen Strukturen: Nasenhöhle, Pharynx und Larynx. Das untere respiratorische System umfasst die intrathorakalen Strukturen: Trachea, Bronchien, Bronchiolen sowie die Alveolen als funktionelle Endstruktur des Gasaustauschs. [50][51]

### **2.4.2 Aufbau der Lunge**

Die menschliche Lunge besteht aus zwei asymmetrisch geformten Lungenflügeln. Der rechte Lungenflügel gliedert sich in drei Lappen (*Lobus superior, medius et inferior*), während der linke, aufgrund der kardialen Lage, nur aus zwei Lappen (*Lobus superior et inferior*) besteht. Auf Höhe der Carina tracheae teilt sich die Trachea in einem dichotomen Verzweigungsmuster in den rechten und linken Hauptbronchus. Beide Hauptbronchien treten gemeinsam mit den Arteriae und Venae pulmonales sowie Nervenfasern am medial gelegenen Hilus pulmonis in die Lunge ein. Der rechte Hauptbronchus ist mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 2,2 cm sowie einem Abgangswinkel von etwa 20–30° im Vergleich zur Trachea kürzer, steiler und weiter als der linke Hauptbronchus. [51] Letzterer weist eine Länge von ca. 5 cm sowie einen Abgangswinkel von etwa 40–60° auf. [51] Die Hauptbronchien verzweigen sich weiter in Lobärbronchien (*Bronchi lobares*): rechtsseitig in drei, linksseitig in zwei, entsprechend der jeweiligen Lappenanzahl. Diese unterteilen sich wiederum segmental in Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*): zehn auf der rechten und in der Regel acht auf der linken Seite. [6] Die Verzweigungen setzen sich fort bis hin zu den terminalen Bronchiolen

(*Bronchioli terminales*), welche das Ende des luftleitenden Systems markieren. [51] In diesem Abschnitt erfolgt kein Gasaustausch; vielmehr dient er der Erwärmung, Befeuchtung und Reinigung der Atemluft. [31] Anschließend beginnt das gasaustauschende System, das sich aus den respiratorischen Bronchiolen (*Bronchioli respiratorii*), Alveolargängen (*Ductuli alveolares*) und den Alveolarsäcken (*Sacculi alveolares*) zusammensetzt. Die Alveolarsäcke sind dicht von Kapillarnetzen umgeben und bilden die funktionelle Einheit des Gasaustauschs. [51] Der Tracheobronchialbaum weist insgesamt 21 bis 25 Verzweigungen auf, eine schematische Darstellung der tracheobronchialen Aufzweigung findet sich in Abbildung 4. Die Lunge ist von zwei serösen Häuten, der Pleura, umgeben. Die Pleura visceralis bedeckt die Lungenoberfläche und ist über den Pleuraspalt, der eine geringe Menge Flüssigkeit enthält, von der Pleura parietalis getrennt. Letztere kleidet die Innenseite der Thoraxwand, das Zwerchfell sowie das Mediastinum aus. Histologisch besteht die Pleura aus Mesothel. [50]

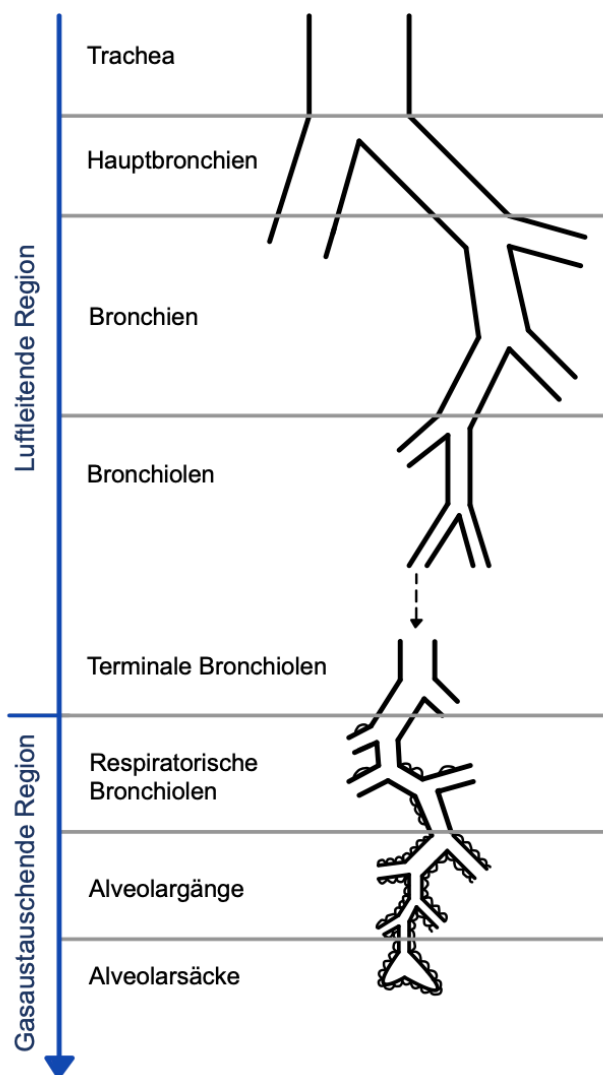


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Tracheobronchialbaums (Abbildung modifiziert nach [51])

## **2.5 Bisherige Erkenntnisse über die TRPC6-Genexpression in der Lunge**

Erste Hinweise auf die Expression von TRPC6-mRNA im humanen Lungengewebe wurden bereits im Jahr 2002 mittels RT-PCR erbracht. [45] In der Folge konnte die Expression in mehreren Studien in der glatten Muskulatur der Atemwege sowie im Bronchialepithel nachgewiesen werden. [15][27][60] So konnte in einer Studie von Corteling et al. die TRPC6- mRNA- Expression in glatter Atemwegsmuskulatur als auch im Bronchialepithel nachgewiesen werden. Weiterführend konnte die intraepitheliale Lokalisation mittels Konfokalmikroskopie weiter spezifiziert werden: so konnte TRPC6 in apikalen, als auch basalen Zellen, nachgewiesen werden. [15] Weitere Studien bestätigten die Expression von TRPC6 in glatter Atemwegsmuskulatur. Dabei wurden zusätzlich unterschiedliche Expressionsniveaus in Probenmaterial verschiedener Spendergruppen beobachtet: so war die Genexpression in COPD- oder IPA- Patienten deutlich höher als bei Nicht- COPD-Patienten oder bei normotensiven Patienten. [27][60] Darüber konnte die TRPC6-mRNA in humanen Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden. [24]

## **2.6 Zielsetzung der Arbeit**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, ist TRPC6 in zahlreiche physiologische, aber auch pathologische Prozesse der Lunge involviert. Aufgrund dieser hohen klinischen Relevanz gilt TRPC6 zunehmend als potenzielles Ziel pharmakologischer Interventionen.

Die Expression von TRPC6 im humanen Lungengewebe wurde, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, bereits vor über zwei Jahrzehnten erstmals mittels RT-PCR aus pulmonaler RNA nachgewiesen. Nachfolgend konnten wenige weitere Strukturen identifiziert werden, welche TRPC6- Genexpression aufweisen.

In bisherigen Studien blieb jedoch unklar, aus welchen anatomischen Regionen das untersuchte Gewebe stammte. Ein systematischer Vergleich verschiedener pulmonaler Lokalisationen erfolgte bislang nicht. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Lokalisation der TRPC6-mRNA in der menschlichen Lunge differenziert zu untersuchen. Im Mittelpunkt steht deshalb der Nachweis von TRPC6-mRNA in Ober- und Unterlappen sowie der versuchsweise Nachweis in spezifischen anatomischen Gewebestrukturen. Damit soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der topographischen Verteilung von TRPC6 in der Lunge geleistet werden.

Die zentralen Fragestellungen lauten:

- Ist TRPC6-mRNA im Ober- und Unterlappen der menschlichen Lunge nachweisbar?
- Bestehen Unterschiede in der Genexpression zwischen beiden Lungenarealen?
- Ist es möglich, spezifische Lungengewebe (Bronchialwand, Bronchiolen, Arterien, Venen, Alveolen, Pleura) auf TRPC6 mRNA hin zu untersuchen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
70%-/ 80%-/ 90%-/ 100%- Isopropanol	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Aqua dest	Unbekannt
ROTI®Histokitt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin 0.1%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RNase- freies Wasser	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

### 3.1.2 Primer

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer

<b>Zielgen</b>	<b>Primer</b>	<b>Länge des Amplikons</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>
GAPDH	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay	95 bp	QT00079247	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
β- Aktin	Hs_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay	146 bp	QT00095431	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
TRPC6	Hs_TRPC6_1_SG QuantiTect Primer Assay	99 bp	QT00037660	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

### 3.1.3 Kits

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
miRNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

### 3.1.4 Geräte und Instrumente

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte und Instrumente

Geräte und Instrumente	Hersteller
AF 100 Eiswürfelbereiter	Scotsman Ice Srl, Mailand, Italien
Axiocam 506 color Mikroskopiekamera	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Centrifuge 5417R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Chirurgische Pinzette	Unbekannt
DM1000 LED Systemmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Eppendorf Research® plus Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Färbekästen	Unbekannt
Froster Labo Labor-Gefrierschrank	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland
HERAfreeze™ Gefrierschrank	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Herasafe™ KS 18 Zellkulturbank	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Inkubator	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kryostat CM3050 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Kühlanlage für Köperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Küvette	Unbekannt
LABEX® Laborkühlschrank	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland
MikroCam SP 5.1	Bresser GmbH, Rhede, Deutschland

Mikroskopstativ Axio Observer 7	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Micro Star 17 Mikrozentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nadelhalter	Unbekannt
NanoDrop® 2000 Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Objektträgerkasten	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
PALM® MicroBeam System Laser Mikrodissektion (RoboStage II)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Präparierschere	Unbekannt
Premiere® Slide Warmer XH-2002	C&A Scientific, Sterling, Virginia, USA
Rippenschere	Unbekannt
Skalpell	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
TissueLyser LT	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Wundspreizer	Unbekannt



### 3.1.5 Softwares

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Softwares

Software	Hersteller
AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 Software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Bioanalyzer 2100 Expert Software (B.02.11.SI824)	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
MikroCamLab II Software	Bresser GmbH, Rhede, Deutschland
NanoDrop® 2000 / 2000c Operating Software, version 1.6	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
StepOne™ Software v2.2	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zotero 2	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, George Mason University, Fairfax, Virginia, USA

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
AdhesiveCap 200 opaque PCR- Gefäß	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
CELLSTAR® Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Edelstahlkügelchen 7 mm	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes -Reaktionsgefäße	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Filterpapier	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Glaseinsatz 70mm, pol.	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Invitrogen™ Antihafte, RNase-freie Mikrozentrifugenröhrchen	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Kimtech® Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional™, Rosewell, Georgia, USA
MembraneSlide NF 1.0 PEN	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
MultiGuard™ Filterspitzen	Sorenson™ BioScience, Inc., Salt Lake City, Utah, USA
Nahtmaterial	Unbekannt
Petrischalen	Unbekannt
Pinsel	Faber-Castell Aktiengesellschaft, Stein, Deutschland
peqGOLD SafeGuard™ Filterspitzen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schmalband- Einwegklingen Typ 819	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Skalpellklinge	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland

SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Inc., Torrance, Kalifornien, USA

### 3.2 Methoden

Insgesamt untergliederte sich der Arbeitsablauf in die in Abbildung 6 dargestellte Schritte.

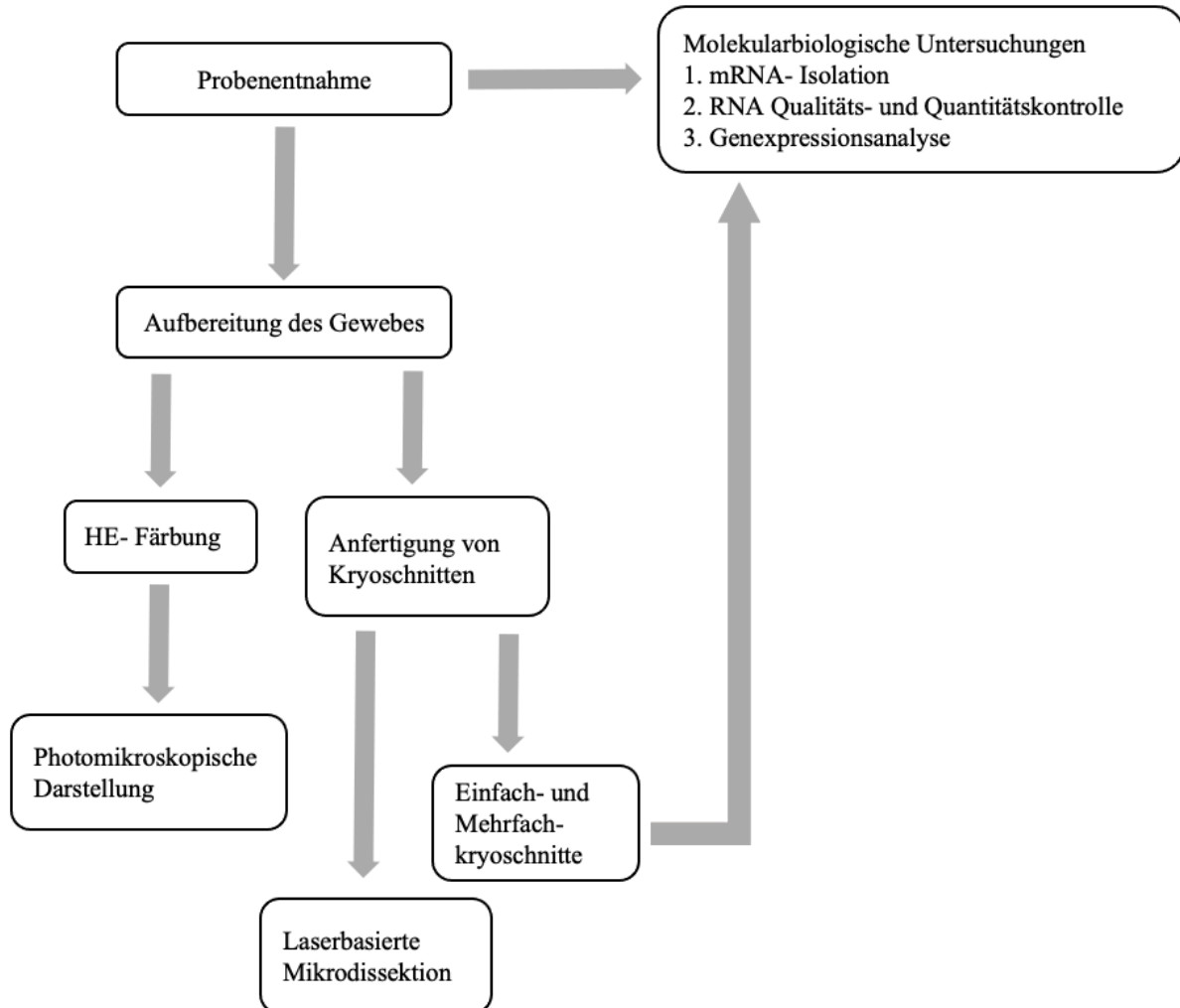


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs

#### 3.2.1 Probenentnahme

Insgesamt wurden sechs Gewebeproben von insgesamt drei Körperspendern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes entnommen. Die Verwendung der Proben beruht auf der Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland, mit der Zulassungsnummer 163/20. Die Gewebeproben wurde aus der Lunge der Körperspender entnommen, sie erfolgte jeweils aus dem Ober- und Unterlappen des rechten Lungenflügels. Die Probenentnahme erfolgte in einem post- mortem- Intervall zwischen 12- 24 Stunden. Die Körperspender waren zuvor nicht fixiert worden. Weitere Informationen zu den Körperspendern sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Bei der Probeentnahme waren stets Augen- und

Mundschutz, sowie Handschuhe zu tragen. Die Probenentnahme erfolgte von der rechten Thoraxhälfte. Auf der 4. oder 5. Rippe wurde, nach vorheriger Hautdesinfektion und je nach Konstitution des Körperspenders, ein circa 5- 10 cm langer Hautschnitt von der vorderen bis zur mittleren Axillarlinie gesetzt. Es folgte eine Freilegung der Rippe mittels stumpfer Präparierschere oder manueller Aufpräparation. Danach wurde entlang des oberen Rippenrandes stumpf in die Tiefe präpariert, bis die Pleura parietalis zu tasten war. Die Pleura wurde durchstoßen, der Präparierkanal stumpf oder mechanisch mittels Präparierschere aufgeweitet. Etwaige Verwachsungen der Pleura wurden meist stumpf abgelöst. Die Rippen cranial und caudal des Präparierkanals wurden mittels Rippenschere durchtrennt, um das Fenster zur Probenentnahme zu vergrößern. Dieses Fenster konnte nun mittels Wundspreizer am medialen und lateralen Wundrand weiter vergrößert und aufgehalten werden. Mithilfe einer chirurgischen Pinzette konnte dann Gewebe des rechten Ober- und Unterlappens gegriffen und mit einer chirurgischen Schere abgeschnitten werden. Pro Lappen wurden jeweils zwei Proben entnommen und auf Petrischalen zurechtgeschnitten. Die zurechtgeschnittenen Proben wurden daraufhin in Kryoröhrchen gelegt und sofort bei -80° eingefroren, um fortschreitende RNA- Degradation zu verhindern. Nach der Probeentnahme wurde der Wundspreizer entfernt und die durchtrennten Rippenfragmente im Körperspender belassen. Die durch die Probeentnahme entstandene Wunde wurde mittels fortlaufender Sub- und Intrakutannaht verschlossen. Ziel war es, die Probeentnahme so minimal- invasiv wie möglich zu halten, um den Körperspender für weitere Lehr- und Forschungszwecke verwenden zu können.

Tabelle 7: Informationen zu den Körperspendern

<b>Nummer des Körperspenders</b>	<b>Alter in Jahren</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Todesursache laut Todesschein</b>	<b>Komorbiditäten</b>
1	87	Männlich	Generalisiertes Organversagen	M. Alzheimer
2	61	Männlich	Intrazerebrale Blutung bei hypertensiver Krise	Arterielle Hypertonie
3	85	Weiblich	Kardio-pulmonales Versagen	Herzinsuffizienz, Koronare Herzkrankheit, Nierenversagen, Diabetes mellitus Typ 2

### 3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

#### 3.2.2.1 Isolation der mRNA

Es erfolgten zwei RNA- Isolationen. Diese erfolgten mithilfe des miRNeasy Mini Kits der Firma Qiagen, wobei dessen Herstellerprotokoll befolgt wurde. Eine vereinfachte, schematische Darstellung der Isolationsschritte ist in Abbildung 7 dargestellt.

Im Folgenden wird die erste RNA- Isolation beschrieben, es handelt sich dabei um die RNA- Isolation direkt von den zuvor entnommenen Gewebeproben.

Die Gewebeproben wurden der – 80°C Gefriertruhe entnommen, zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Zur Gewebeauftrennung und -homogenisierung wurden anschließend 700 µl QIAzol® Lysis Reagent sowie Edelstahlkügelchen hinzugegeben und die Probe anschließend für 5 Minuten bei 50 Hz im TissueLyser homogenisiert. Das homogenisierte Zelllysate wurden dann bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Dann wurden 140 µl Chloroform hinzugefügt und weitere drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zeit wurde jede Probe zweimal gevortext, um die Komponenten zu durchmischen. Danach folgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4°C. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 525 µl 100% Ethanol gegeben und durch Auf- und Abpipettieren durchgemischt. Daraufhin wurden die Proben abpipettiert, auf eine RNeasy® Mini-Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen gegeben und bei Raumtemperatur bei 9000 x g für 15 s zentrifugiert. Der unten im Sammelröhrchen gesammelte Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt aus abpipettieren, auf die RNeasy® Mini-Säule pipettieren, zentrifugieren und Durchfluss verwerfen wurde dann mit dem restlichen Probenvolumen wiederholt. Um eine Verunreinigung der RNA durch DNA zu verhindern, wurde dann ein DNase- Verdau auf den Reinigungssäulen durchgeführt. Zum Schluss erfolgten mehrere Waschschrte zur Entfernung von Pufferresten und Salzen von der an die Säule gebundenen RNA: es folgte die Hinzugabe von 700 µl Buffer RWT auf die RNeasy® Mini Säule und eine weitere Zentrifugation bei 8000 x g für 15 s. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde 500 µl Buffer RPE auf die RNeasy® Mini-Säule gegeben, wieder bei 9000 x g für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss dann verworfen. Die Hinzugabe von 500 µl Buffer RPE auf die RNeasy® Mini-Säule wurde dann wiederholt, die Zentrifugation erfolgte dann aber für 2 Minuten bei 9000 x g. Der Durchfluss wurde dann wieder verworfen. Abschließend wurde die RNeasy® Mini-Säule auf ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen gegeben, 30 µl RNase- freies Wasser auf die Säulenmembran pipettiert und bei 9000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Das Eluat beinhaltete die isolierte RNA, diese wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gefroren, um weitere RNA- Degradierung zu verhindern.

Bei der zweiten RNA- Isolation handelt es sich um die Gewinnung von RNA der Einfach- und Mehrfachkryoschnitte.

Die Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur auf Eis aufgetaut und mittels Vortexer mit dem bereits hinzugefügten QIAzol® Lysis Reagenz durchmischt. Danach wurden sie für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Hinzugabe von 130 µl Chloroform und weitere drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, in der Zeit wurde jede Probe zweimal gevortext, um die Komponenten zu durchmischen. Danach folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000 x g bei 4°C zur Phasentrennung. Nachfolgend wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 450 µl 100% Ethanol gegeben und durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Der restliche Vorgang entspricht dem der oben beschriebenen ersten RNA-Isolation.

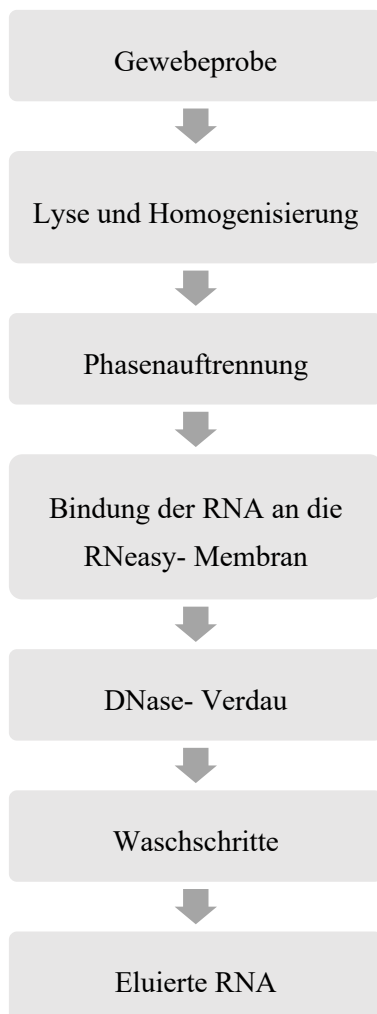


Abbildung 7: Vereinfachte, schematische Darstellung der mRNA- Isolation (Abbildung modifiziert nach [62])

### 3.2.2.1 Bestimmung der RNA- Qualität und -Quantität

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit wurde die eluierte RNA mit dem NanoDrop® Spektrophotometer analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der NanoDrop® 2000 / 2000c Operating Software, Version 1.6.

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. [63] Daher wird zur Quantifizierung der RNA-Konzentration die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Berechnung der RNA-Konzentration ( $C_{\text{RNA}}$ ) erfolgt nach der Formel:

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Konversionsfaktor}$$

Dabei stellt  $A_{260}$  die gemessene Absorption bei 260 nm dar, der Verdünnungsfaktor berücksichtigt eine mögliche Verdünnung der Probe, und der Konversionsfaktor beträgt für RNA 40 µg/ml, da eine Absorption von einer Einheit bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. [32]

Zur Beurteilung der Reinheit der Probe wird das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) sowie zu 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) berechnet. Liegt das Verhältnis dabei über 1,8, kann die Probe generell als rein angesehen werden. Bei einer Probenkontaminierung kommt es zu einer Verminderung des  $A_{260}/A_{280}$ - oder  $A_{260}/A_{230}$ - Ratios, welche nachfolgende enzymatische oder spektroskopische Analysen negativ beeinflussen könnte. [63] Zu beachten ist, dass die Aussagekraft dieser Verhältnisse durch externe Faktoren, wie niedrige RNA-Konzentrationen (unter 20 ng/µl) oder Schwankungen im pH-Wert der Messlösung, limitiert sein kann. [63] Solche Bedingungen können die Absorptionsmessung verfälschen und zu einer fehlerhaften Interpretation der Reinheit führen. Das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis dient dabei insbesondere als Indikator für Proteinkontaminationen, die ebenfalls Licht bei 280 nm absorbieren. Das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis gibt Aufschluss über Verunreinigungen durch eine breitere Palette von Kontaminanten, die bei 230 nm absorbieren, einschließlich Salze, Detergenzien und organische Verbindungen. [32]

Zu Beginn der Messungen wurde der obere und untere Messplatz des Spektrophotometers mit Präzisionswischtüchern gesäubert. Es folgte eine einmalige Kalibrierung des Geräts, dafür wurde 1 µl Leerlösung auf den unteren Messplatz aufgetragen, der Gerätearm herabgesenkt und die Messung gestartet. Nach erfolgter Kalibrierung wurden die Messplätze erneut mit Präzisionswischtüchern gereinigt, 1 µl der zu untersuchenden Probe auf den unteren Messplatz aufgetragen, der Gerätearm erneut abgesenkt und die Messung gestartet. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde nach jeder erfolgten Messung der Messplatz mit Präzisionswischtüchern gereinigt. Um weitere RNA-Degradierung zu vermeiden, befand sich die eluierte RNA stets auf Eis. Zusätzlich wurden allzeit Handschuhe getragen.



### 3.2.2.2 Bestimmung der RNA- Integrität

Im nächsten Schritt wurde die Integrität der gewonnen RNA bestimmt, da diese aufgrund des ubiquitären Vorhandenseins von RNasen post- mortem schnell degradiert. Hierfür wurde der Bioanalyzer 2100 und das RNA 6000 Nano Kit der Firma Agilent Technologies verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen.

Das Prinzip des Bioanalyzers beruht auf dem der Kapillar- Elektrophorese. Dabei werden die Kapillaren eines Chips mit einem Gel-Farbstoff-Gemisch und entsprechende Kavitäten des Chips mit einer RNA- Leiter, einem RNA-Marker und den zu untersuchenden RNA- Proben befüllt. Der Farbstoff bindet an die RNA, die anschließend durch die Anlage eines elektrischen Felds und der Gelpolymermatrix ihrer Größe und Ladung nach aufgetrennt wird. [64] Die evozierten Fluoreszenzsignale werden mithilfe des Bioanalyzers gemessen, mithilfe der Bioanalyzer 2100 Expert Software ausgewertet und in Elektropherogrammen und virtuellen Gelbanden ausgedrückt. Die RNA- Leiter mit bekannter Größe dient dabei als interner Standard. Im Elektropherogramm wird die RNA- Nukleotidgröße im Verhältnis zu den gemessenen Fluoreszenzsignalen dargestellt und gibt damit Aufschluss über die Längenverteilung der RNA-Fragmente und damit über die RNA- Integrität. Größere Fragmente entsprechen dabei einer höheren Anzahl an Nukleotiden. Neben einem anfänglichen Peak des RNA-Markers sollten hier auch Fluoreszenz- Peaks der ribosomalen RNA (rRNA)- Fragmente 18S und 28S zu sehen sein, da die rRNA einen Großteil der Gesamt- RNA darstellt. [5] Ein rRNA- Ratio  $[28s / 18s]$  von 2 steht dabei für eine gute RNA- Qualität. [5] Weiterhin wird ein RNA- Integritätswert (RNA Integrity Number, RIN) berechnet, mithilfe derer ebenfalls die Qualität der RNA beschrieben wird. Eine vollständig intakte RNA erhält dabei einen RIN von 10, während eine vollständig degradierte, fragmentierte RNA einen RIN von 1 erhält. [5]

Für die Durchführung wurde eine bereits für zwei Minuten bei 70°C denaturierte RNA- Leiter auf Eis aufgetaut und das RNA- Farbstoffkonzentrat für 30 min auf Raumtemperatur erwärmt. Währenddessen wurde für die Herstellung des Gel- Farbstoff- Gemischs die RNA- Gelmatrix in einen Filter für Zentrifugenröhrchen pipettiert und dann bei 1500 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Von dem entstandenen Durchfluss wurden dann 65 µL in RNase- freie Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. Das RNA- Farbstoffkonzentrat wurde dann kurz gevortext, runterzentrifugiert und 1 µL zu der gefilterten Gelmatrix hinzugefügt. Das Gel- Farbstoff- Gemisch wurde dann gevortext und bei 13000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nachfolgend wurden 9 µL des Gel- Farbstoff- Gemischs in das davor vorgesehene Well des Chips pipettiert und dieser mithilfe der Chip- Priming- Station 30 s geladen. Dabei wird das Gel- Farbstoff- Gemisch unter Druck in die Mikrokapillaren des Chips gepresst. Nachfolgend wurden weitere insgesamt 18 µL des Gel- Farbstoff- Gemischs in die davor vorgesehen Wells des Chips pipettiert. Abschließend wurden je 5 µL RNA- Marker, dann je 1 µL RNA- Leiter und schlussendlich

je 1  $\mu\text{L}$  der RNA- Probe in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Der vollständig geladene Chip wurde nun vorsichtig bei 2400 rpm gevortext, in den Bioanalyzer eingesetzt und die Messung gestartet.

### **3.2.2.3 Genexpressionsanalyse**

Folgend wurde eine zweistufige, quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (two-step qRT-PCR) durchgeführt. Zunächst wurde die isolierte mRNA durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA, complementary DNA) transkribiert. Im anschließenden Schritt erfolgte die quantitative PCR (qPCR) unter Verwendung der synthetisierten cDNA.

#### **3.2.2.3.1 Reverse Transkription**

Im ersten Schritt erfolgte die Transkription der mRNA in cDNA. Dafür wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Alle Reaktionen wurden auf Eis durchgeführt, um weitere RNA-Degradation zu verhindern. Eine schematische Darstellung des Ablaufs der cDNA- Synthese ist in Abbildung 8 dargestellt.

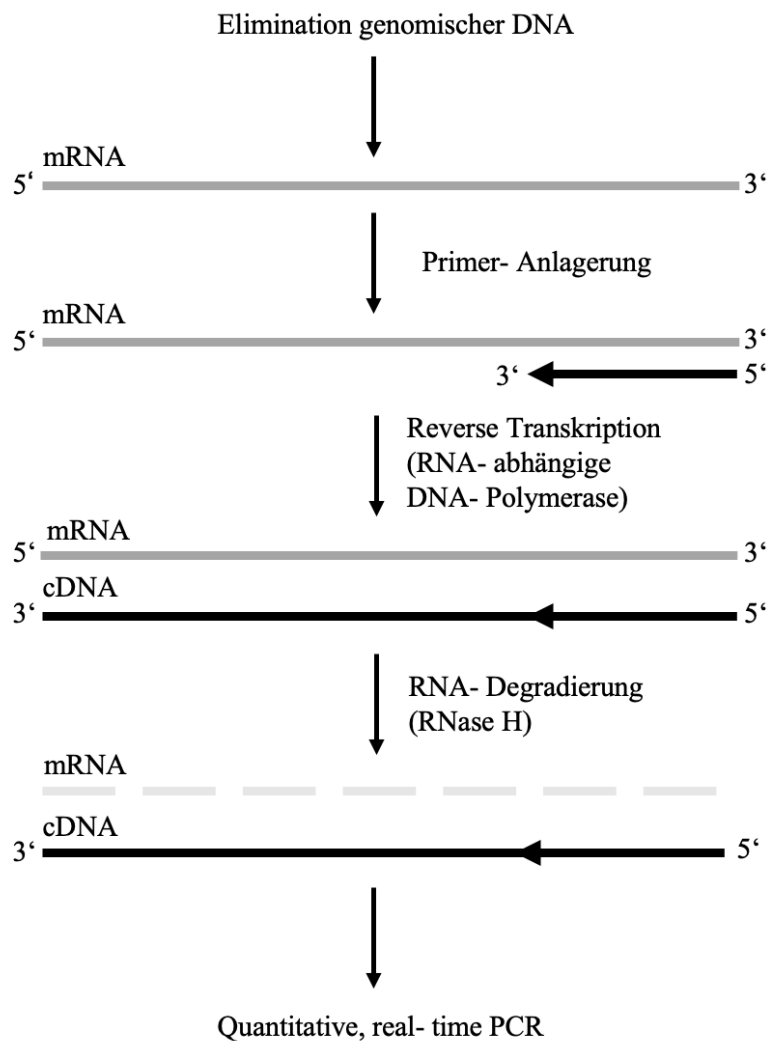


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs der cDNA- Synthese (Abbildung modifiziert nach [65])

Zur Vermeidung von Kontamination durch genomische DNA (gDNA) wurde zunächst eine gDNA-Eliminationsreaktion durchgeführt. Hierfür wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Reagenzien in Reaktionsröhrchen pipettiert. Jedes Röhrchen enthielt 1 µg total RNA, dafür wurde die erforderliche Menge zuerst von ng/µl auf µg umgerechnet (Beispiel: Probe 1 OL: 1 µg = 1000 ng; 1000 ng/455,3 ng/µl = 2,2 µl). Das totale Reaktionsvolumen pro Röhrchen betrug insgesamt 14 µl. Der angefertigte Mix wurde anschließend für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und danach auf Eis gelagert.

Tabelle 8: Komponenten der gDNA- Eliminationsreaktion

	1 OL	1 UL	2 OL	2 UL	3 OL	3 UL
gDNA Wipeout Buffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
1 µg mRNA	2,20 µl	2,60 µl	1,37 µl	1,70 µl	2,29 µl	1,17 µl
RNase- freies Wasser	9,80 µl	9,40 µl	10, 63 µl	10,30 µl	9,71 µl	10,83 µl
<b>Totales Reaktionsvolumen</b>	<b>14 µl</b>	<b>14 µl</b>	<b>14 µl</b>	<b>14 µl</b>	<b>14 µl</b>	<b>14 µl</b>

Anschließend wurde ein Master-Mix für die Reverse Transkription (RT) vorbereitet. Die in Tabelle 9 aufgeführten Komponenten wurden sorgfältig in jeweils ein Reaktionsröhrchen pipettiert. Zum Abschluss wurde in jedes Reaktionsröhrchen 14 µl der zuvor durchgeführten gDNA-Eliminationsreaktion, die die eluierte mRNA enthält, hinzugefügt. Der Master-Mix wurde dann für 15 Minuten bei 42°C inkubiert, um die Aktivität der reversen Transkriptase zu ermöglichen. Um die Aktivität der reversen Transkriptase zu stoppen, erfolgte eine Inkubation der Reaktionsröhrchen für 3 Minuten bei 95°C. Nach dieser Inkubation war die cDNA in den Reaktionsröhrchen synthetisiert. Die Röhrchen wurden auf Eis gelagert und unmittelbar für die anschließende qPCR verwendet.

Tabelle 9: Komponenten des Master Mixes

	Volumen pro Reaktion
Quantiscript® Reverse Transkriptase	1 µl
Quantiscript® RT Puffer	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
gDNA- Eliminationsreaktion	14 µl
<b>Totales Reaktionsvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe der reversen Transkriptase angefertigt. Diese diente dem Nachweis, dass die verwendeten Proben ohne die Umwandlung in cDNA durch Reverse Transkription keine genomische DNA enthalten, die das Ergebnis verfälschen könnte. Die Negativkontrollen wurden mit Proben durchgeführt, die die höchsten (Gewebeprobe 3 Unterlappen) und

die niedrigsten (Gewebeprobe 1 Unterlappen) Mengen an total RNA enthielten. Die entsprechenden Komponenten sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Komponenten der Negativkontrolle

	<b>Volumen pro Reaktion</b>
H <sub>2</sub> O	1 µl
Quantiscript® RT Puffer	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
gDNA- Eliminationsreaktion	14 µl
<b>Totales Reaktionsvolumen</b>	<b>20 µl</b>

### 3.2.2.3.1.1 Reverse Transkription der Einfach – und Mehrfachkryoschnitte

Die Reverse Transkription der RNA aus Einfach- und Mehrfachkryoschnitten fand ähnlich der in Abschnitt 3.2.2.3.1. beschriebenen RT statt. Es wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Um weitere RNA-Degradierung zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Ein wesentlicher Unterschied bestand in der notwendigen RNA-Verdünnung bei Proben mit fünf oder mehr Kryoschnitten. Diese zeigten teils sehr hohe RNA-Konzentrationen, sodass eine direkte Verwendung in der RT-Reaktion nicht praktikabel war. Wie im Herstellerprotokoll angegeben, sollten 100 ng RNA pro Reaktion eingesetzt werden. Bei hochkonzentrierten Proben, wie z. B. 2 UL 20 mit einer RNA-Konzentration von 1028,9 ng/µl, würde das erforderliche Volumen nur 0,10 µl betragen. Solche Kleinstmengen lassen sich jedoch nicht präzise pipettieren und bergen ein erhöhtes Fehlerpotenzial. Aus diesem Grund wurden die betreffenden Proben vor der Reverse Transkription standardisiert verdünnt. Zur Anwendung kamen 1:5 sowie respektiv 1:10 und 1:20- Verdünnungen, je nach Anzahl der Kryoschnitte der Probe. Dafür wurde jeweils 2 µl RNA abpipettiert und mit 8 (1:5) bzw. 18 (1:10) oder 38 (1:20) µl RNase- freiem Wasser verdünnt. Beispiel: Die Probe 1 OL 5 hatte eine RNA-Konzentration von 153,9 ng/µl. Nach 1:5-Verdünnung betrug die effektive Konzentration 30,78 ng/µl, sodass für 100 ng RNA 3,25 µl der verdünnten Probe eingesetzt wurden. Die angewandten Verdünnungen sowie die berechneten Volumina sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Verdünnungsreihen

<b>Probe</b>	<b>RNA- Konzentration in ng/µl</b>	<b>1:5/ 10/ 20- Verdünnung</b>	<b>100 ng RNA</b>
1 OL 1	26,9	-	3,72
1 UL 1	9,7	-	10,31
2 OL 1	22,1	-	4,52
2 UL 1	42	-	2,38
3 OL 1	12,6	-	7,94
3 UL 1	30,6	-	3,27
1 OL 5	153,9	30,78	3,25
1 UL 5	98,2	19,64	5,09
2 OL 5	106,2	21,24	4,71
2 UL 5	277,9	55,58	1,80
3 OL 5	87,4	17,48	5,72
3 UL 5	211	42,2	2,37
1 OL 10	376,3	37,63	2,66
1 UL 10	208,5	20,85	4,80
2 OL 10	248,9	24,89	4,02
2 UL 10	448,4	44,84	2,23
3 OL 10	175,2	17,52	5,71
3 UL 10	498,9	49,89	2,00
1 OL 20	639,7	31,99	3,13
1 UL 20	516,7	25,84	3,87
2 OL 20	398,4	19,92	5,02
2 UL 20	1028,9	51,45	1,94
3 OL 20	355,3	17,77	5,63
3 UL 20	859,6	42,98	2,33

Um Verunreinigung durch genomische DNA vorzubeugen, wurde zuerst ein Mix für eine gDNA-Eliminationsreaktion angesetzt. Dazu wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Komponenten in jeweils ein Reaktionsröhrchen pipettiert. Das totale Reaktionsvolumen pro Röhrchen betrug dabei 14 µl.

Tabelle 12: Komponenten der gDNA- Eliminationsreaktion

Probe	gDNA Wipeout Buffer	100 ng RNA	RNase- freies Wasser	Totales Reaktionsvolumen
1 OL 1	2 µl	3,72	8,28 µl	14 µl
1 UL 1	2 µl	10,31	1,69 µl	14 µl
2 OL 1	2 µl	4,52	7,48 µl	14 µl
2 UL 1	2 µl	2,38	9,62 µl	14 µl
3 OL 1	2 µl	7,94	4,06 µl	14 µl
3 UL 1	2 µl	3,27	8,73 µl	14 µl
1 OL 5	2 µl	3,25	8,75 µl	14 µl
1 UL 5	2 µl	5,09	6,91 µl	14 µl
2 OL 5	2 µl	4,71	7,29 µl	14 µl
2 UL 5	2 µl	1,80	10,20 µl	14 µl
3 OL 5	2 µl	5,72	6,28 µl	14 µl
3 UL 5	2 µl	2,37	9,63 µl	14 µl
1 OL 10	2 µl	2,66	9,34 µl	14 µl
1 UL 10	2 µl	4,80	7,20 µl	14 µl
2 OL 10	2 µl	4,02	7,98 µl	14 µl
2 UL 10	2 µl	2,23	9,77 µl	14 µl
3 OL 10	2 µl	5,71	6,29 µl	14 µl
3 UL 10	2 µl	2,00	10,00 µl	14 µl
1 OL 20	2 µl	3,13	8,87 µl	14 µl
1 UL 20	2 µl	3,87	8,13 µl	14 µl
2 OL 20	2 µl	5,02	6,98 µl	14 µl
2 UL 20	2 µl	1,94	10,06 µl	14 µl
3 OL 20	2 µl	5,63	6,37 µl	14 µl
3 UL 20	2 µl	2,33	9,67 µl	14 µl

Die weiteren Schritte zur reversen Transkription entsprachen dem in Abschnitt 3.2.2.3.1 beschriebenen Vorgehen.

### 3.2.2.3.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Abschließend wurde eine quantitative PCR (qPCR) zum indirekten Nachweis der TRPC6-mRNA durchgeführt, wobei die cDNA als Zielprodukt gemessen wurde. In der quantitativen, sogenannten „Real-Time“ PCR lagern sich interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe in die entstehenden doppelsträngigen PCR-Produkte (dsDNA) ein, die anschließend mit Licht bestrahlt wird. Die entstehenden Fluoreszenzsignale werden in Echtzeit erfasst und sind proportional zur Menge an cDNA.

Der  $C_t$ -Wert (Threshold Cycle) oder  $C_q$ -Wert (Quantification Cycle) bezeichnet die Anzahl der Zyklen, in denen die Fluoreszenzintensität einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Ein niedriger  $C_t / C_q$ -Wert deutet auf eine größere Menge an genetischem Material hin, da dieser Schwellenwert früher erreicht wird.

Die qPCR umfasst die folgenden Schritte: Zunächst erfolgt eine einmalige, initiale Aktivierung der HotStarTaq® DNA-Polymerase für 5 Minuten bei 95°C. Es folgt die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA zu einzelsträngiger cDNA (ssDNA) für 5 Sekunden bei 95°C, gefolgt von der Primer-Hybridisierung und der anschließenden Verlängerung der einzelsträngigen cDNA durch die HotStarTaq® DNA-Polymerase bei 60°C für 10 Sekunden, wobei ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (SYBR® Green I) eingebaut wird. Dieser Zyklus wird 35 bis 40-mal wiederholt. Der allgemeine Ablauf der qPCR-Zyklen ist in Abbildung 9 veranschaulicht.

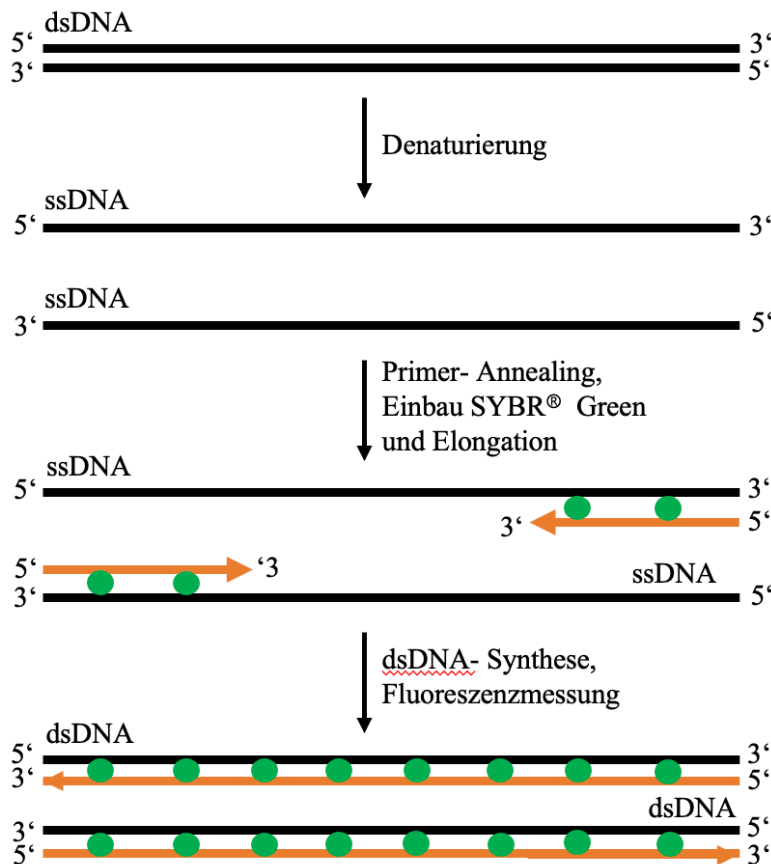


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Ablaufs der qPCR (Abbildung modifiziert nach [2])



Da interkalierende Farbstoffe in der qPCR unspezifisch sind und sich an beliebige DNA oder Primer-Dimere binden können, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte, wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität zu überprüfen. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich erhöht und die Veränderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen, da die dsDNA bei einer bestimmten Temperatur denaturiert, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird und das Fluoreszenzsignal abnimmt. [66] Der Punkt des Signalabfalls, die Schmelztemperatur ( $T_m$ ), ist aufgrund der spezifischen Länge und Basenzusammensetzung jedes Genprodukts charakteristisch. [66]

Für die relative Quantifizierung der TRPC6-cDNA wurden zwei „*Haushaltsgene*“ als Referenzgene verwendet: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und  $\beta$ -Aktin. GAPDH ist ein zentrales Enzym der Glykolyse und kommt in verschiedenen intrazellulären Strukturen wie Mitochondrien und Zellkern vor. [36]  $\beta$ -Aktin, eine Isoform des Aktin-Proteins, ist ein Hauptbestandteil des kontraktile Apparats und spielt eine Schlüsselrolle in der Bildung des Zytoskeletts sowie der Zellbewegung. [36] Unter der Annahme einer konstitutiven Expression und fehlender Regulierung dienen diese „*Haushaltsgene*“ als interne Referenz zur Quantifizierung des Zielgens TRPC6.

Zur weiteren Analyse kann der  $\Delta C_t$ -Wert ( $C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$ ) berechnet werden, um das Zielgen im Verhältnis zum Referenzgen innerhalb derselben Probe zu normalisieren. Ein höherer  $\Delta C_t$ -Wert deutet auf eine geringere Expression des Zielgens hin. Im Falle zweier Referenzgene gilt:  $\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - ((C_{t \text{ Referenzgen 1}} + C_{t \text{ Referenzgen 2}}) / 2)$ . Weiterhin kann der Relative Quantifizierungswert ( $R_Q$ ) ( $2^{-\Delta \Delta C_t}$ , dabei ist  $\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Testprobe}} - \Delta C_{t \text{ Referenzprobe}}$ ) ermittelt werden. Dieser Wert vergleicht die Genexpression zwischen der Testprobe und einer Referenzprobe und zeigt den relativen Unterschied in der Expression. Ein  $R_Q$ -Wert  $> 1$  weist auf eine erhöhte Expression in der Testprobe hin, während ein  $R_Q$ -Wert  $< 1$  eine reduzierte Expression anzeigt. [44]

Für die Durchführung der qPCR wurde das Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit sowie das QuantiTect® Primer Assay für das TRPC6- sowie das für GAPDH- und  $\beta$ -Aktin- Gen der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Ein Reaktionsansatz, der in Tabelle 13 aufgeführt ist, wurde vorbereitet und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Für jedes Zielgen wurden pro Probe zwei Wells der 96-Well-Platte befüllt. Um eine mögliche Probenkontamination auszuschließen, wurde für jedes Gen (TRPC6, GAPDH,  $\beta$ -Aktin) eine Negativkontrolle (No Template Control, NTC) vorbereitet. Diese Kontrollen enthielten keine cDNA und wurden stattdessen mit 2  $\mu$ l  $H_2O$  ersetzt. Abschließend wurde die Platte mit der Folie verschlossen. Zur Homogenisierung der PCR-Ansätze wurde die Platte kurz gevortext und schließlich in das PCR-Gerät eingesetzt. Die PCR wurde mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System durchgeführt, und die Daten wurden mit der StepOne™ Software v2.2 analysiert.

Tabelle 13: Komponenten des qPCR- Ansatzes

	Volumen pro Reaktion
QuantiTect® SYBR® Green PCR MasterMix	12,5 µL
Primer	2,5 µL
cDNA	2 µL
H <sub>2</sub> O	8 µL
<b>Totales Reaktionsvolumen</b>	<b>25 µL</b>

Da die Anzahl der Gewebeproben zu gering für eine aussagekräftige statistische Analyse war, wurde in dieser Arbeit auf eine statistische Auswertung verzichtet.

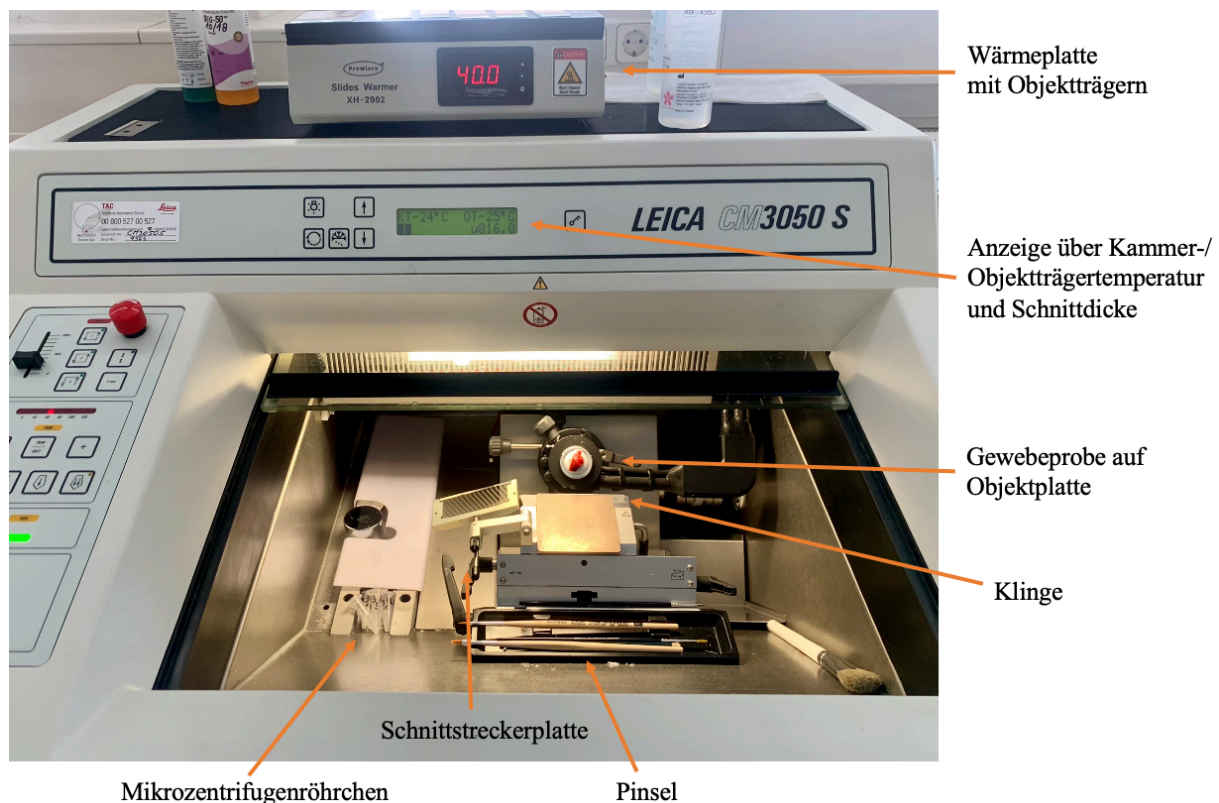
#### **3.2.2.3.2.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion der Einfach– und Mehrfachkryoschnitte**

Für die qPCR der cDNA der Einfach- und Mehrfachkryoschnitten wurde erneut das Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit und das QuantiTect® Primer Assay für das TRPC6- Gen der Firma Qiagen verwendet. Als interner Referenzgenstandard diente GAPDH, wobei die entsprechenden Primer ebenfalls durch das QuantiTect® Primer Assay der Firma Qiagen bezogen wurden. Die Reaktionen wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt, der Reaktionsansatz entsprach dem in Tabelle 13 aufgeführten Ansatz. Zum Ausschluss von Probenkontamination erfolgte auch hier der Ansatz einer Negativkontrolle, bei der anstelle der cDNA 2 µl RNase-freies Wasser zugegeben wurden. Alle Reaktionen wurden in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Jede cDNA-Probe wurde als technisches Duplikat gemessen, d. h. zwei Wells pro Probe befüllt. Die weiteren Schritte der qPCR erfolgten analog zu Abschnitt 3.2.2.3.2.

#### **3.2.3 Anfertigung von Kryoschnitten**

Im ersten Schritt wurde der Kryostat vorbereitet. Eine Übersicht über den Arbeitsplatz am Kryostaten ist in Abbildung 10 veranschaulicht. Der Kryostat wurde entriegelt, das Kammerlicht eingeschaltet und die Kammer- sowie Objektträgertemperatur auf -25 °C eingestellt. Zur Minimierung der Kontamination und RNA-Degradierung der Gewebeproben wurden alle Oberflächen und Instrumente, die mit den Proben in Kontakt kommen, mit 80%-Isopropanolol desinfiziert. Zudem wurden stets Handschuhe und ein chirurgischer Mundschutz getragen. Anschließend wurde eine neue Klinge eingelegt und die Schnittstreckplatte positioniert. Auch Pinsel, die zum Justieren der Kryoschnitte und z.B. zum Überführen der Schnitte in Mikrozentrifugenröhrchen benötigt werden, wurden in die Kammer gelegt.

Dabei wurde darauf geachtet, dass die zuvor desinfizierten Pinselhaare stets frei lagen, um eine mögliche Probenkontamination zu verhindern. Alle Utensilien sowie der Kryostat selbst wurden nun auf die eingestellte Temperatur von  $-25^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass alle mit den Kryoschnitten in Kontakt kommenden Utensilien im Kryostat vorkühlen, da die Schnitte andernfalls an den Instrumenten haften und eine Weiterverarbeitung nicht möglich wäre. Anschließend wurde die Gewebeprobe auf Eis zum Kryostaten transportiert. Ziel war es, die Gewebeprobe nur so kurz wie nötig außerhalb der  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefriertruhe zu halten, um RNA-Degradierung zu minimieren. Im nächsten Schritt wurde eine Objektplatte aus dem Kryostaten entnommen und sparsam mit Einbettmedium versehen. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde die Gewebeprobe auf die Objektplatte aufgelegt. Die Gewebeprobe haftete dadurch fest an der Objektplatte, war jedoch nicht vollständig vom Einbettmedium umschlossen. Dieser Schritt ist für die Anfertigung von Kryoschnitten für die laserbasierte Mikrodisektion (vgl. Abschnitt 3.2.5) von Bedeutung. Die Objektplatte wurde dann in aufrechter Position in die Schnellgefrierleiste des Kryostaten gestellt, wo einige Minuten gewartet wurde, bis das Einbettmedium vollständig erhärtet war. Nachdem das Einbettmedium erhärtet war, wurde die Objektplatte in den Objektkopf eingespannt und zur Klinge hin ausgerichtet. Im Anschluss erfolgte das Trimmen der Gewebeprobe mit einer Schnittdicke von  $30\text{ }\mu\text{m}$  bis zur gewünschten Schnittebene. Diese sollte möglichst gleichmäßig sein, um die Herstellung von Kryoschnitten mit annähernd identischen Abmessungen zu gewährleisten.



**Abbildung 10:** Übersicht über den Arbeitsplatz am Kryostaten

### **3.2.3.1 Anfertigung von Kryoschnitten zur histomorphologischen Darstellung**

Für die histomorphologische Darstellung der Gewebeproben wurde eine Lungenübersichtsaufnahme durch Kryoschnitte angefertigt. Zusätzlich zu den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Schritten wurde eine Wärmeplatte eingeschaltet und auf 40 °C erhitzt. Adhäsiv beschichtete Objektträger wurden beschriftet und auf die vorgeheizte Wärmeplatte platziert. Nach dem Trimmen der Gewebeproben auf die gewünschte Schnittebene wurde die Schnittdicke auf 14 bis 16 µm reduziert. Für jede Gewebeprobe wurden insgesamt zwei Objektträger bestückt, wobei Kryoschnitte mit einer Dicke von 14 µm und 16 µm auf die Objektträger aufgebracht wurden. Anschließend wurden diese auf der Wärmeplatte getrocknet. Nach dem Trocknen erfolgte die Aufbewahrung der Objektträger in einem Objektträgerkasten. Bis zur Färbung (siehe Abschnitt 3.2.4.1) wurden die Objektträger im Kühlschrank aufbewahrt.

### **3.2.3.2 Anfertigung von Einfach- und Mehrfachkryoschnitten**

Im nächsten Schritt wurde eine verschiedene Anzahl an Kryoschnitten der Gewebeproben in Mikrozentrifugenröhrchen gegeben, um zu ermitteln, bis zu welcher Schnittmenge TRPC6 mRNA nachweisbar ist. Ziel war es, nachzuweisen, dass die TRPC6 in einem singulären Schnitt nachzuweisen ist, bevor eine laserbasierte Mikrodissektion der Schnitte durchgeführt wird. Zusätzlich zu den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Schritten wurden Mikrozentrifugenröhrchen beschriftet und in die Kammer des Kryostaten eingelegt. Nach dem Trimmen der Gewebeproben bis zur gewünschten Schnittebene wurde die Schnittdicke auf 16 µm reduziert, und die Kryoschnitte wurden angefertigt. Für jede Gewebeprobe wurden vier Mikrozentrifugenröhrchen mit jeweils 20, 10, 5 und 1 Kryoschnitt befüllt. Die befüllten Mikrozentrifugenröhrchen wurden auf Eis gelagert, und es wurden unter einer Abzugshaube jeweils 600 µl QIAzol® Lysis Reagent in jedes Röhrchen pipettiert. Dies stellte bereits den ersten Schritt der RNA- Isolation dar (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Abschließend wurden sowohl die Gewebeproben, als auch die Mikrozentrifugenröhrchen, bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.2.3.3 Anfertigung von Kryoschnitten für die laserbasierte Mikrodissektion**

Die Anfertigung der Kryoschnitte für die laserbasierte Mikrodissektion (Eng.: *laser capture microdissection*, LCM) erfolgte gemäß dem in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Verfahren, jedoch unter Verwendung eines modifizierten Protokolls zur RNA-Extraktion aus laserbasiert mikrodisezierten Gefrierschnitten. [67] Hierbei kamen membranbeschichtete Objektträger zum Einsatz, die die Integrität des gelaserten Areals sicherstellen sollten. Die Gewebeschnitte haften an der Membran des Objektträgers, sodass beim Lasern eines spezifischen Areals auch die Membran bearbeitet wird, was die

Stabilität des Areal unterstützt. Da die Membranbeschichtung jedoch hydrophobe Eigenschaften aufweist, wurden die Objektträger vor der Herstellung der Kryoschnitte für 30 Minuten unter einer UV-Lampe einer Zellkulturbank (Herasafe™ KS 18, Thermo Scientific™, Langenselbold, Deutschland) bestrahlt, um die Hydrophilie zu erhöhen und die Adhäsion der Kryoschnitte zu verbessern. [68] Zum Anfertigen der Kryoschnitte wurde auf 4°C gekühltes 70%-Isopropanol, in zuvor mit 80%-Isopropanol gereinigten Färbekästen, auf Eis gelagert und zum Kryostaten transportiert. Der Kryostat wurde gemäß den Vorgaben in Abschnitt 3.2.3 vorbereitet, wobei alle erforderlichen Einstellungen vorgenommen und stets Handschuhe sowie ein chirurgischer Mundschutz getragen wurden. Die in die Kammer eingelegten Utensilien sowie der Kryostat selbst wurden auf -25°C heruntergekühlt. Die membranbeschichteten, UV-behandelten Objektträger wurden ebenfalls in den Kryostaten eingelegt und heruntergekühlt. Anschließend wurde eine einzelne Gewebeprobe auf Eis zum Kryostaten transportiert, während die restlichen Gewebeproben in der Kühlung verblieben, um RNA-Degradierung zu minimieren. Der Boden der Gewebeprobe war bereits durch die vorherige Anfertigung von Kryoschnitten (siehe Abschnitt 3.2.3.) mit Einbettmedium umhüllt. Eine Objektplatte wurde aus dem Kryostaten entnommen, sparsam mit Einbettmedium versehen und die Gewebeprobe mithilfe einer chirurgischen Pinzette aufgelegt. Ziel war es, dass ausschließlich der bereits eingebettete Probenboden in das frisch aufgetragene Einbettmedium eingehüllt wird, während die Kryoschnitte frei von Einbettmedium bleiben. Diese Vorgehensweise war notwendig, da das Einbettmedium die Laserbearbeitung bei der LCM stören und die Proben somit unbrauchbar machen würde. Obwohl das Einbettmedium theoretisch durch einen zusätzlichen Waschschriff mit kaltem, RNase-freiem Wasser entfernt werden könnte, erwies sich die Adhäsion der Gewebeschnitte auf den UV-behandelten Objektträgern als unzureichend. In der Praxis schwammen die Gewebeschnitte von den Objektträgern, weshalb es notwendig war, dass die Schnitte frei von Einbettmedium waren, um sie in der LCM verwenden zu können. Nachdem das Einbettmedium erhärtet war, die Objektplatte ausgerichtet wurde und die Gewebeproben bis zur gewünschten Schnittebene getrimmt waren, wurde die Schnittdicke auf 16 µm reduziert. Die Wahl einer Schnittdicke von 16 µm beruhte auf der Annahme, dass dies die maximale Gewebedicke darstellt, die sowohl mikroskopisch ausgewertet werden kann, als auch für den Laser der LCM geeignet ist. Zudem war in den vorangegangenen molekularbiologischen Untersuchungen festgestellt worden, dass die RNA-Degradierung in den Gewebeproben bereits weit fortgeschritten war. Für den Nachweis der TRPC6 mRNA in der LCM war daher eine größere Menge Gewebe erforderlich. Dünnere Schnitte unter 14 µm waren aufgrund der Zersplitterung durch luftgefüllte pulmonale Räume schwierig herzustellen. Zum Aufbringen der Gewebeschnitte auf den gekühlten Objektträger wurde die Rückseite des Objektträgers an der vorgesehenen Stelle mit einem Finger erwärmt. Der bestückte Objektträger verblieb anschließend für fünf Minuten im Kryostaten zum Trocknen. Um RNase-Aktivität zu minimieren, folgten Schritte zur Gewebehydrierung: Zunächst wurde der Objektträger drei Minuten in eisgekühltem 70%-Isopropanol gebadet, anschließend mehrfach in eisgekühltem 100%-Isopropanol getaucht. Abschließend wurde der Objektträger für 6–7 Minuten an der Luft getrocknet. Zur Aufbewahrung

wurden die Objektträger paarweise Rücken an Rücken in 50 ml Falconröhrchen gelegt, luftdicht verschlossen und bei -80°C gelagert.

### **3.2.4 Histologische Aufarbeitung der Kryoschnitte**

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die zuvor angefertigten Kryoschnitte (siehe Abschnitt 3.2.3.1.) einer standardisierten Färbung unterzogen und lichtmikroskopisch dargestellt. Ziel war die Darstellung der Gewebemorphologie sowie die Beurteilung zellulärer und struktureller Merkmale mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Die Durchführung der HE- Färbung sowie die photomikroskopische Darstellung werden in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

#### **3.2.4.1 Hämatoxylin- Eosin- Färbung**

Um die in Abschnitt 3.2.3.1 angefertigten Kryoschnitte adäquat darstellen zu können wurde eine HE-Färbung angeschlossen. Die HE- Färbung beruht auf der unterschiedlichen Affinität zellulärer Strukturen zu sauren bzw. basischen Farbstoffen. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie Zellkerne aufgrund ihrer DNA-Inhalte blau-violett, da es in seiner oxidierten Form als basischer Farbstoff wirkt. [38] Eosin ist ein saurer Farbstoff, der azidophile Strukturen wie Zytoplasma, extrazelluläre Matrix und Proteine rosa bis rot anfärbt. [38] Die HE-Färbung ermöglicht so eine differenzierte Darstellung der Gewebemorphologie und stellt eine Standardfärbemethode in der Histopathologie dar.

Die HE- Färbung wurde nach einem hausintern etablierten Protokoll durchgeführt. Dieses ist in Tabelle 14 dargelegt.

Zur Fixierung wurden die Kryoschnitte in 100 % 2-Propanol für 5 min in eine auf -20 °C vorgekühlte Küvette überführt und im -20 °C Gefrierschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in destilliertem Wasser für 2 min zur Entfernung von Alkoholorückständen.

Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für 5 min in gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser zur Entfernung überschüssigen Farbstoffs wurden die Präparate unter schwach fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Wasserstrahl die Schnitte nicht direkt trifft, um mechanisches Ablösen der Gewebeschnitte zu vermeiden. Es folgte ein weiterer Waschschrift in destilliertem Wasser. Die Gegenfärbung erfolgte durch ein 10-sekündiges Eintauchen in gefiltertes Eosin (0,1 %), dem zuvor 2 Tropfen 0,1 %ige Essigsäure zugesetzt wurden. Überschüssiger Farbstoff wurde durch ein abschließendes Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Zur Entwässerung der Gewebeschnitte wurde eine aufsteigende Alkoholreihe gemäß dem vorher definierten Protokoll durchgeführt und im Anschluss in Xylol (VWR International, Darmstadt, Deutschland) geklärt.

Abschließend erfolgte die Eindeckung der gefärbten Objektträger mit einem Einschlussmedium (ROTI®Histokitt, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter einem Abzug. Die Aushärtung des Einschlussmediums erfolgte bei Raumtemperatur. Nach Aushärtung wurden die Objektträger bis zur photomikroskopischen Auswertung in einem Objektträgerkasten gelagert.

Tabelle 14: Protokoll der HE- Färbung

	<b>Medium</b>	<b>Zeit</b>
<b>Fixierung</b>	100% 2- Propanol bei -20 °C	5 Minuten
<b>Spülen</b>	Destilliertes Wasser	2 Minuten
<b>Hämatoxylin-Färbung</b>	Hämatoxylin nach Ehrlich	5 Minuten
<b>Spülen</b>	Destilliertes Wasser	Bis alle Farbreste entfernt sind
<b>Bläuen</b>	Fließendes Leitungswasser	10 Minuten
<b>Spülen</b>	Destilliertes Wasser	1x eintauchen
<b>Eosin- Färbung</b>	Eosin (0.1%)	10 Sekunden
<b>Spülen</b>	Destilliertes Wasser	Bis alle Farbreste entfernt sind
<b>Entwässern</b>	80% 2- Propanol	3 Minuten
	90% 2- Propanol	6 Minuten
	100% 2- Propanol	5 Minuten
	100% 2- Propanol	5 Minuten
	Xylol	5 Minuten
	Xylol	5 Minuten
	Xylol	5 Minuten

### 3.2.4.2 Photomikroskopische Darstellung

Die photomikroskopische Auswertung erfolgte mithilfe eines Mikroskops, an dem eine Mikroskopkamera montiert ist. Diese überträgt das Bild an eine Aufnahme- und Bildbearbeitungssoftware auf dem Computer.

### 3.2.5 Laserbasierte Mikrodissektion

Die LCM wurde unter Verwendung des PALM® MicroBeam Systems in Kombination mit einem Mikroskop sowie einer Mikroskopiekamera und der dazugehörigen Software durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht eine präzise Isolierung spezifischer Zell- oder Gewebestrukturen unter mikroskopischer Kontrolle. Zu Beginn wurden die bei  $-80\text{ °C}$  gelagerten Falcon-Röhrchen, in denen sich die Objektträger befanden, aus der Gefriertruhe entnommen und auf Eis aufgetaut. Um die Integrität der RNA während des gesamten Präparationsprozesses zu gewährleisten, war es entscheidend, die Bildung von Kondenswasser auf den Objektträgern strikt zu vermeiden. Da RNA unter trockenen Bedingungen für mehrere Stunden stabil bleibt und RNasen unter diesen Bedingungen weitestgehend inaktiv sind, wurden die Objektträger bis zum vollständigen Temperatúrausgleich auf Raumtemperatur in den verschlossenen Röhrchen belassen. Im Anschluss wurden sterile Sammelröhrchen in die dafür vorgesehene Halterung des LCM-Mikroskops eingesetzt. Die Mikrodissektion basiert auf dem Prinzip der sogenannten Laserbasierte Mikrodissektion und Druck-Katapultierung (Eng.: *laser microdissection and pressure catapulting*, LMPC). Dabei erfolgt das präzise Heraustrennen des Zielgewebes mittels eines fokussierten UV-Lasers. Der ausgeschnittene Bereich wird anschließend durch einen einzelnen, fokussierten Laserimpuls berührungslos in ein Sammelgefäß katapultiert. Diese Technik reduziert das Risiko einer Probenkontamination und verhindert mechanische Schäden oder Verluste der Gewebeprobe, wie sie bei manueller Entnahmeverfahren auftreten könnten. Nachdem die Sammelröhrchen eingesetzt waren, wurden die Objektträger in die Halterung des Mikroskops eingelegt. Die Systemparameter wie Vergrößerung, Fokus und Laserintensität wurden anschließend individuell auf die jeweiligen Probenbedingungen abgestimmt. Im weiteren Verlauf wurden Lungenstrukturen, wie z.B. Bronchiolen unter mikroskopischer Kontrolle identifiziert und manuell mit dem Laser umfahren, um sie für die nachfolgende molekularbiologische Analyse gezielt zu isolieren.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Histologische Darstellung der Gewebeproben

#### 4.1.1 Körperspender 1, Oberlappen

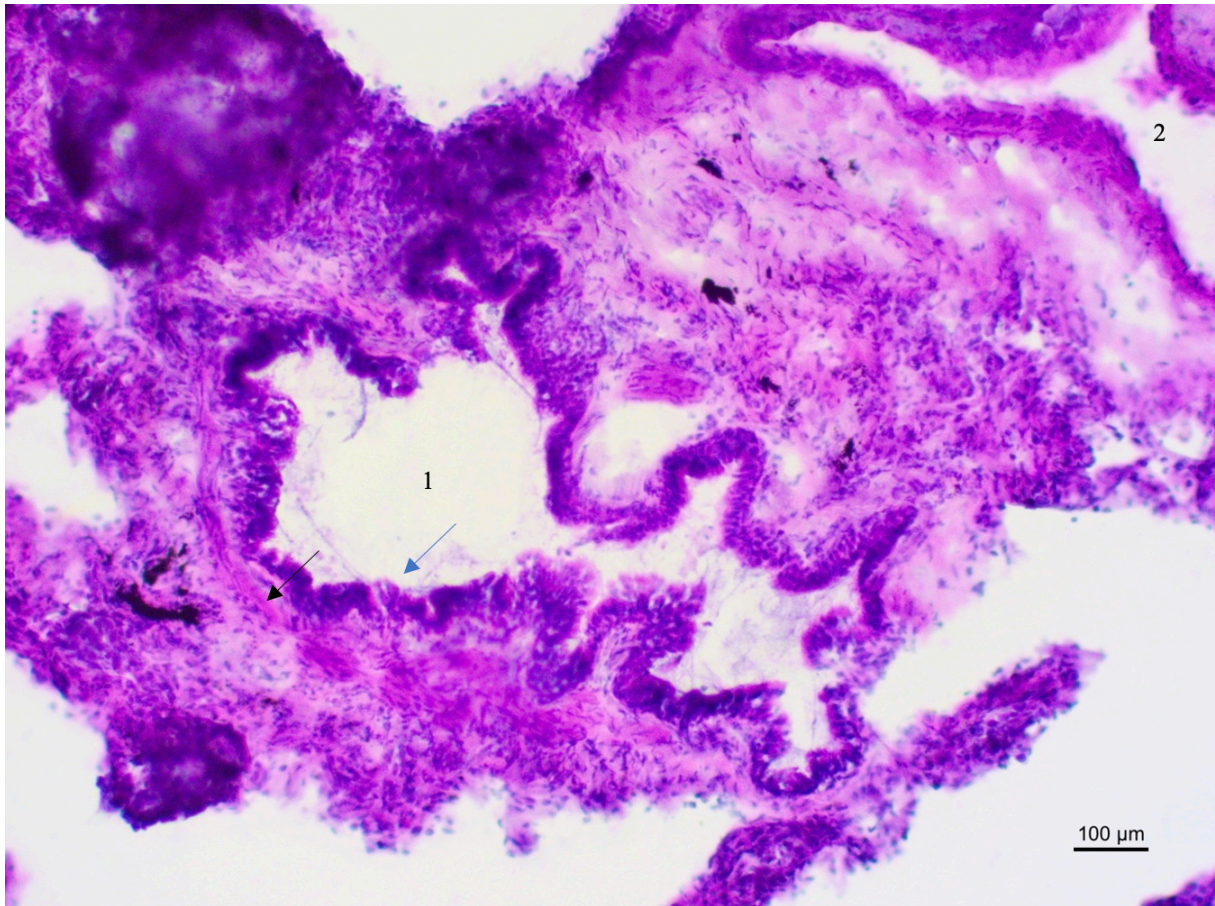


Abbildung 11: Bronchiole in HE- Färbung, Schnittdicke 16 µm, 10- fache Vergrößerung

(1: Lumen des Bronchiolus; 2: Gefäßlumen; schwarzer Pfeil: begleitende glatte Muskulatur; blauer Pfeil: Flimmerepithel)

#### 4.1.2 Körperspender 2, Unterlappen

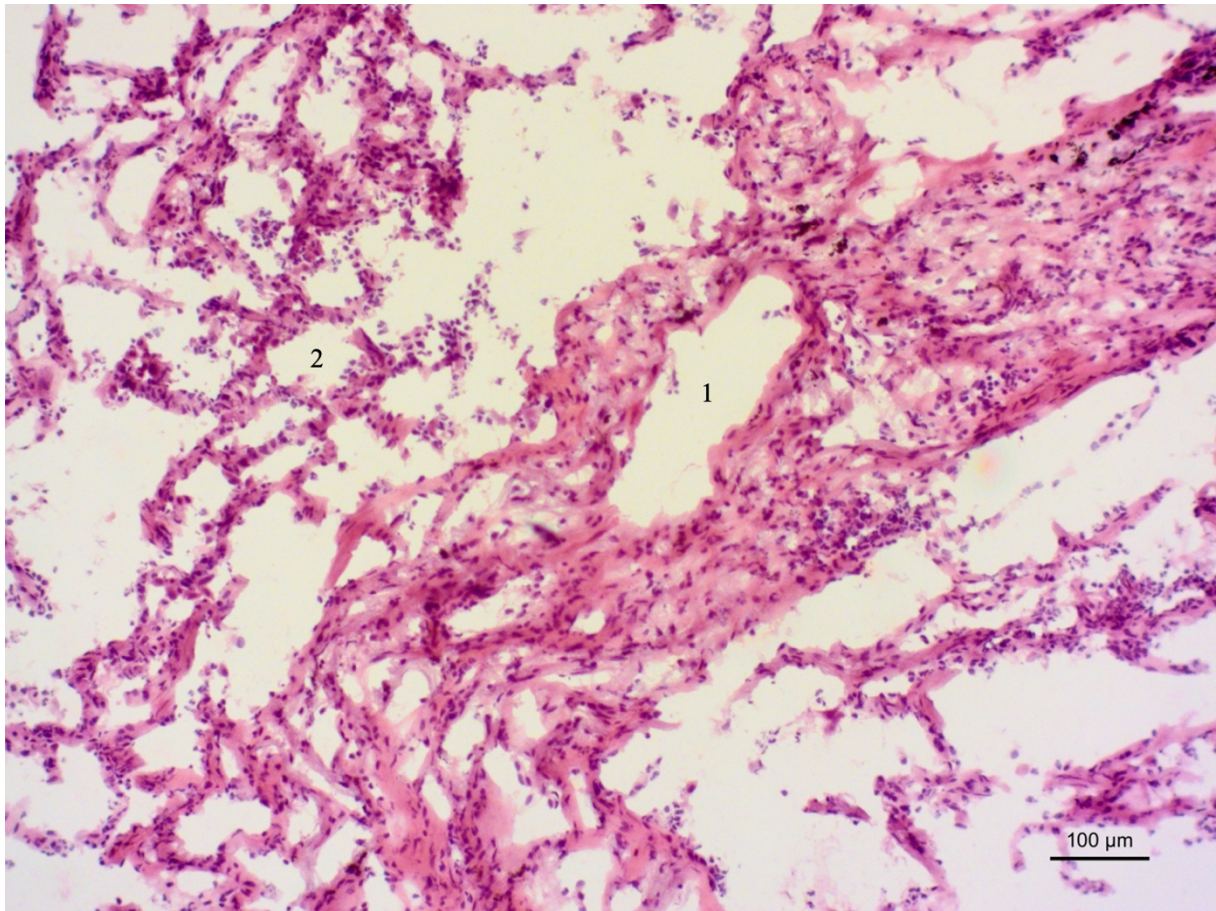


Abbildung 12: Alveolen sowie Blutgefäß umgeben von einer Bindegewebssepte in HE- Färbung, Schnittdicke 14 µm, 10- fache Vergrößerung

*(1: Gefäßlumen; 2: Alveolus)*



#### 4.1.3 Körperspender 2, Oberlappen

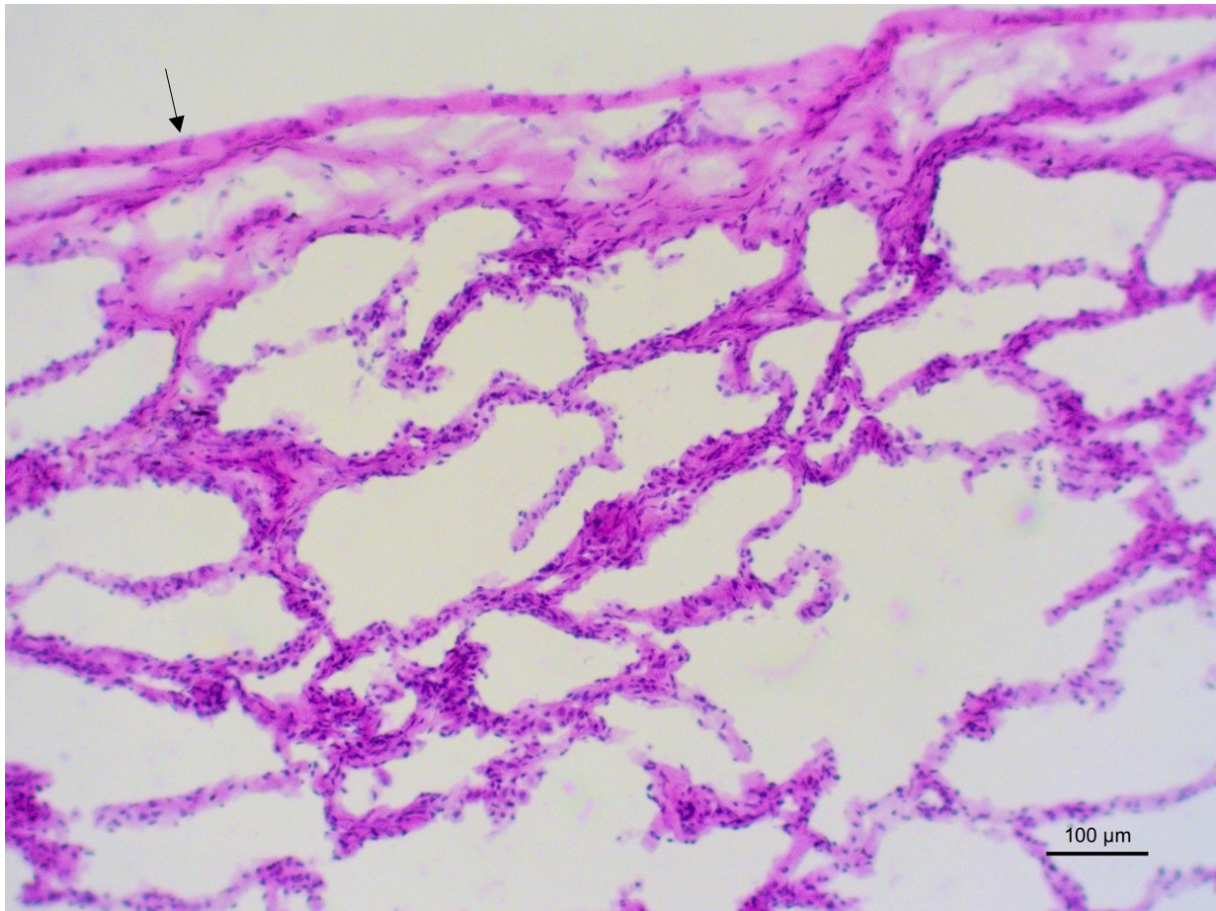


Abbildung 13: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe, HE-Färbung, Schnittdicke 16 µm, 10- fache Vergrößerung

*(Pfeil: Pleura pulmonalis; darunter subpleurales Bindegewebe sowie Alveolen)*

#### 4.1.4 Körperspender 2, Unterlappen

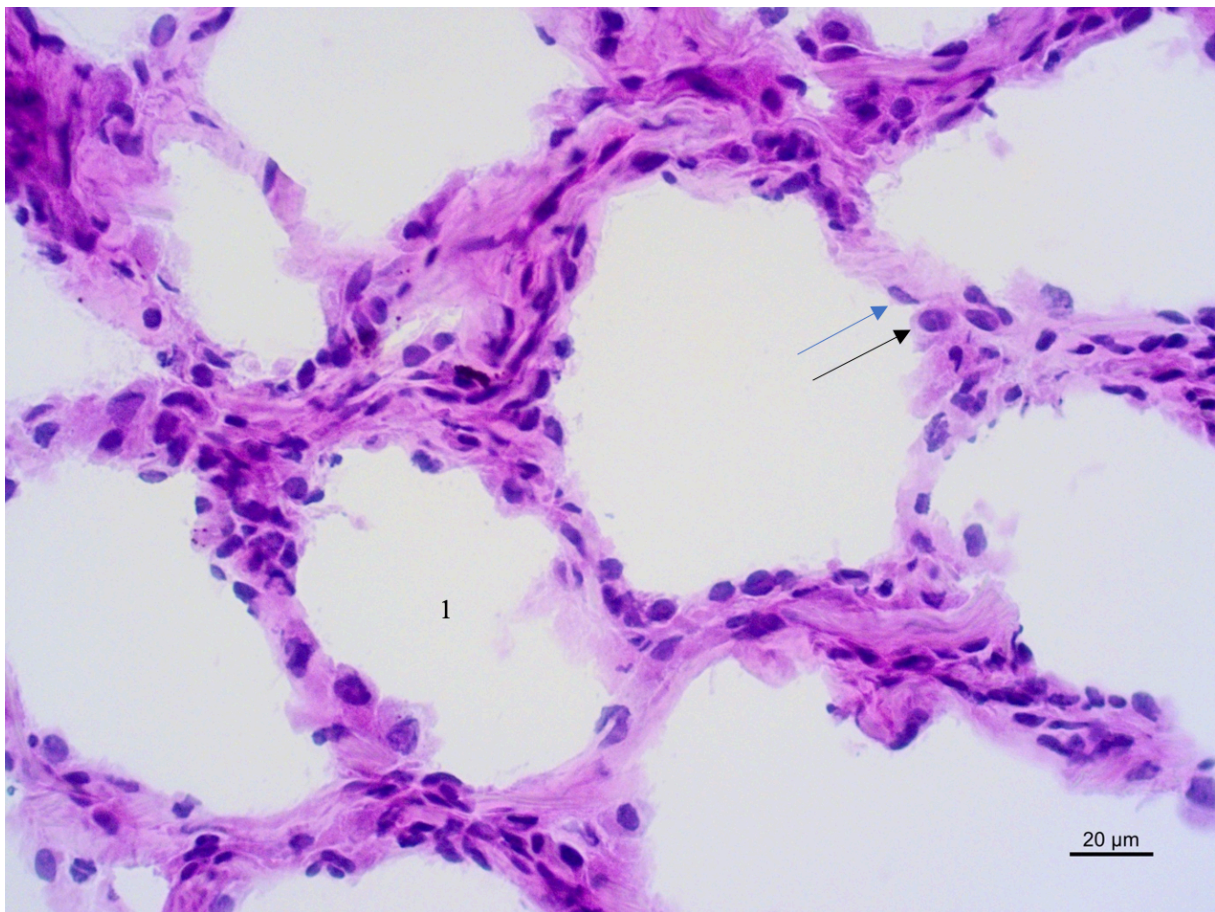


Abbildung 14: Alveolen mit Typ I und II Pneumozyten, HE- Färbung, Schnittdicke 14 μm, 40- fache Vergrößerung

*(1: Alveolus; Schwarzer Pfeil: Typ II Pneumozyt; Blauer Pfeil: Typ I Pneumozyt)*



#### 4.1.5 Körperspender 3, Oberlappen

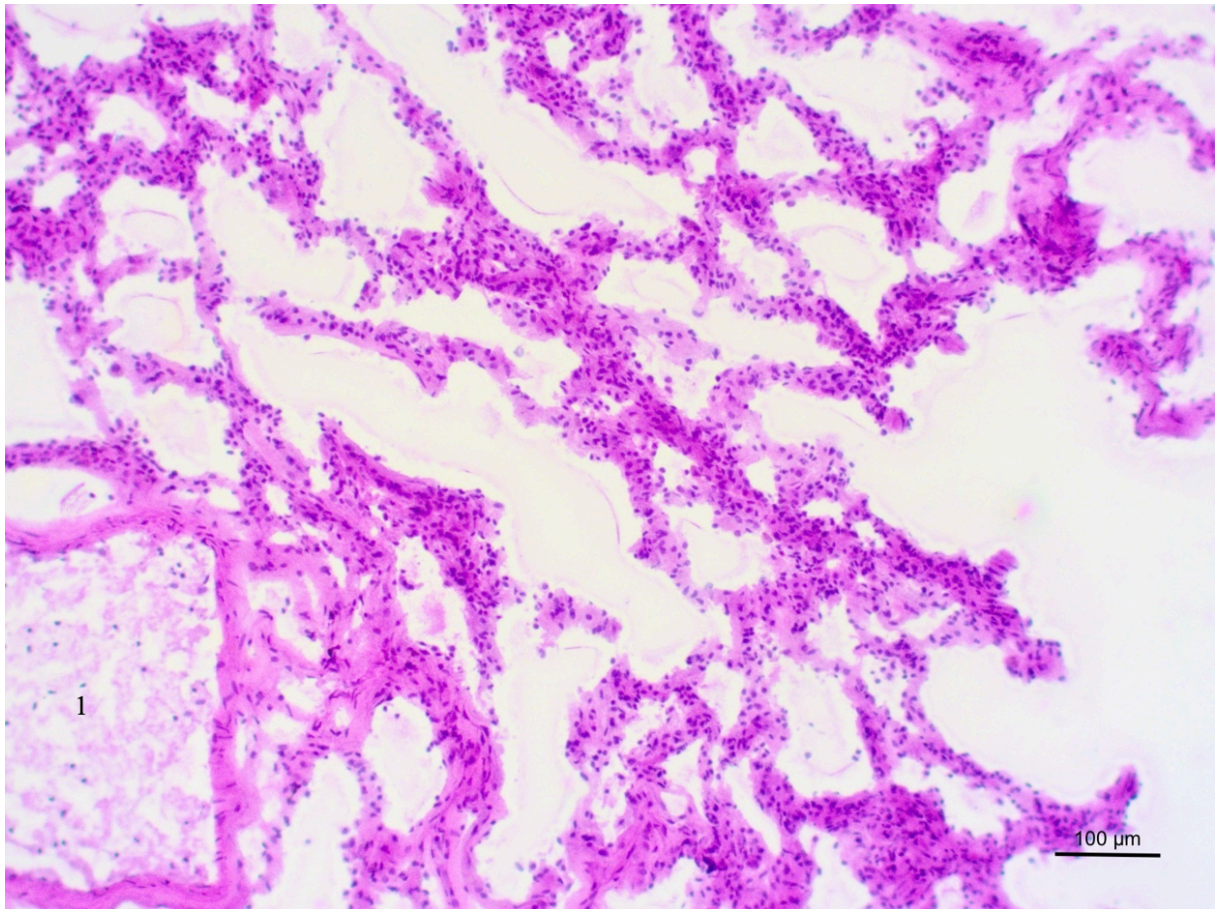


Abbildung 15: Gefäß und Alveolen in HE- Färbung, Schnittdicke 16 µm, 10- fache Vergrößerung  
(1: Gefäß)

#### 4.1.6 Körperspender 3, Unterlappen

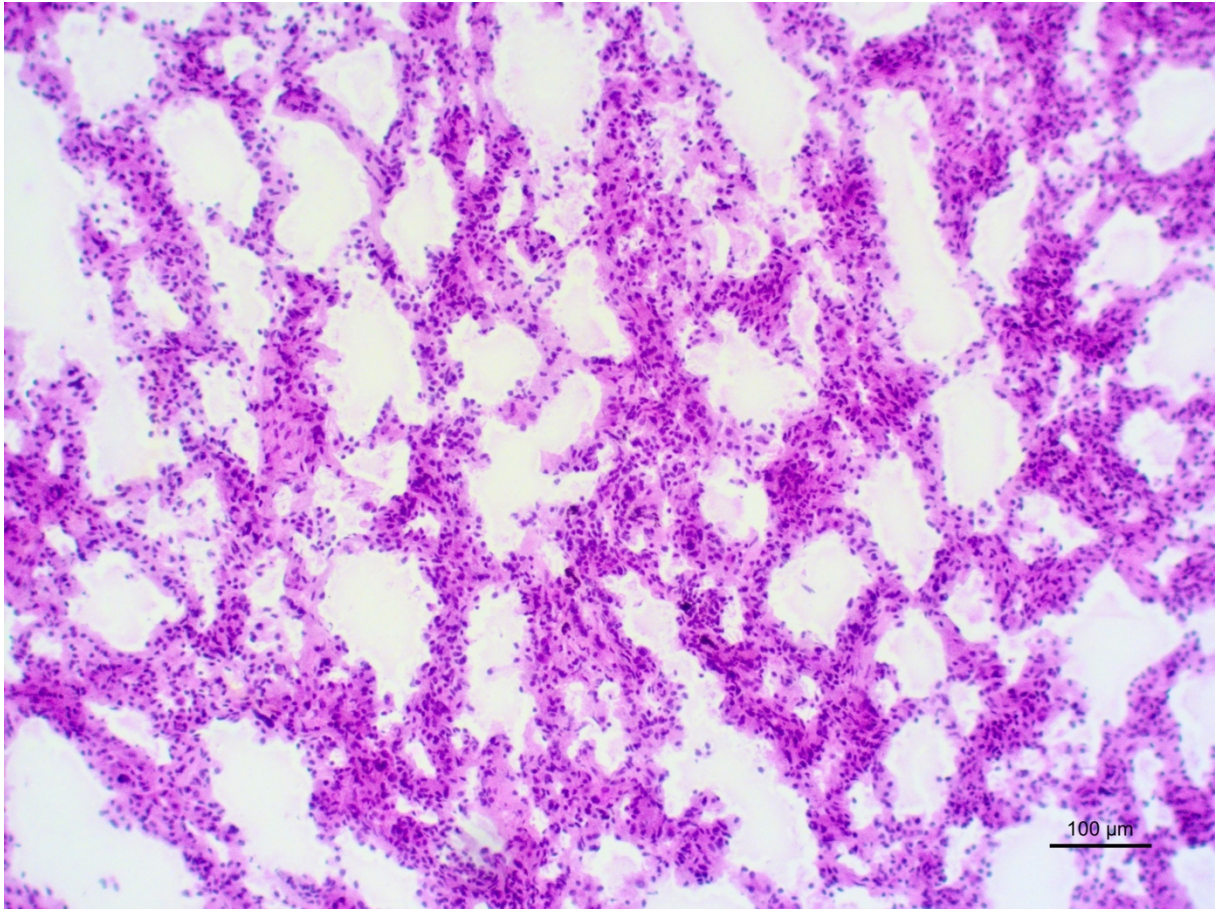


Abbildung 16: Alveolen in HE- Färbung, Schnittdicke 16 µm, 10- fache Vergrößerung

## 4.2 RNA-Qualität und -Quantität

Die Quantifizierung und Reinheitsanalyse der extrahierten RNA erfolgte mittels NanoDrop®-Spektrophotometrie. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Die Nukleinsäurenkonzentrationen zeigen insgesamt hohe RNA-Ausbeuten in den analysierten Lungengewebeproben, mit einem Mittelwert von 576,08 ng/μl. In den Proben des ersten und zweiten Körperspenders war die RNA-Konzentration im Oberlappen (455,3 ng/μl bzw. 732,4 ng/μl) höher als im jeweiligen Unterlappen (385,5 ng/μl bzw. 588,6 ng/μl). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Körperspender 3 eine erhöhte RNA-Konzentration im Unterlappen (857,6 ng/μl) im Vergleich zum Oberlappen (437,1 ng/μl).

Die Reinheit der RNA wurde anhand der  $A_{260}/A_{280}$ - und  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnisse bewertet. Der  $A_{260}/A_{280}$ -Ratio lag bei allen Proben über dem Grenzwert von 1,8, mit einem Mittelwert von 2,09. Dieser liegt nahe am Idealwert von 2,1 für reine RNA, sodass eine hohe Reinheit der eluierenden RNA angenommen werden kann. Die  $A_{260}/A_{230}$ -Ratios lagen hingegen im Mittel bei 1,41, auch wenn einzelne Proben (z. B. 2 UL: 1,77; 3 UL: 1,86) nahe am akzeptierten Schwellenwert von  $\geq 1,8$  lagen.

Diese Ergebnisse belegen insgesamt eine erfolgreiche RNA-Extraktion mit hoher Ausbeute und überwiegend guter Reinheit, die für weiterführende molekularbiologische Analysen geeignet ist.

Tabelle 15: Ergebnisse NanoDrop® Spektrophotometer

Probe	Nukleinsäuren- konzentration in ng/μl	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> / A <sub>230</sub>
1 OL	455,3	9,23	11,38	5,52	2,06	1,23
1 UL	385,5	8,83	9,64	4,59	2,1	1,09
2 OL	732,4	14,89	18,31	8,77	2,09	1,23
2 UL	588,6	8,29	14,71	6,98	2,11	1,77
3 OL	437,1	8,29	10,93	5,27	2,07	1,32
3 UL	857, 6	11,50	21,44	10,16	2,11	1,86

(1: erster Körperspender; 2: zweiter Körperspender; 3: dritter Körperspender; OL: Oberlappen; UL: Unterlappen)

#### 4.2.1 RNA-Qualität und -Quantität der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte

Weiterhin wurde die RNA-Isolation aus abnehmenden Mengen von Lungengewebe (20, 10, 5 und 1 Kryoschnitt) durchgeführt, um zu evaluieren, bis zu welcher minimalen Schnittanzahl eine RNA-Qualität und -Quantität erreicht wird, die eine nachfolgende Detektion der TRPC6 mRNA erlaubt. Diese Untersuchung erfolgte zur Abschätzung, ob eine laserbasierte Mikrodissektion, bei der nur sehr geringe Gewebemengen zur Verfügung stehen, durchführbar sein könnte.

Die Ergebnisse der RNA-Quantifizierung mittels NanoDrop®-Spektrophotometrie sind in Tabelle 16 dargestellt. Mit einer mittleren RNA-Konzentration von 284,72 ng/μl und einem Medianwert von 209,75 ng/μl zeigen die Proben insgesamt eine hohe RNA-Ausbeute. Einzelne Gewebeschnitte lieferten durchschnittlich 23,98 ng/μl RNA, wobei die Konzentration im Mittel bei 20,53 ng/μl im Oberlappen und 27,43 ng/μl im Unterlappen lag. Bei fünf Gewebeschnitten stieg die durchschnittliche RNA-Konzentration auf 155,77 ng/μl (Mittelwert: OL 115,77 ng/μl; UL 195,7 ng/μl). Zehn Gewebeschnitte ergaben im Mittel 326,04 ng/μl (Mittelwert: OL 266,8 ng/μl; UL 385,27 ng/μl), während bei zwanzig Schnitten durchschnittlich 633,2 ng/μl (Mittelwert: OL 464,67 ng/μl; UL 801,73 ng/μl) gemessen wurden.

Insgesamt zeigten die Proben aus dem Unterlappen eine höhere RNA-Konzentration als jene aus dem Oberlappen. Betrachtet man Körperspender 1 jedoch alleinig, so kann man über alle Schnittmengen hinweg durchgängig höhere RNA-Konzentrationen im Oberlappen feststellen. Im Gegensatz dazu wiesen die Proben der Körperspender 2 und 3 in allen Schnittgruppen eine höhere RNA-Ausbeute im Unterlappen auf.

Die Beurteilung der RNA-Qualität erfolgte anhand der Absorptionsverhältnisse  $A_{260}/A_{280}$ - und  $A_{260}/A_{230}$ . Das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis lag in sämtlichen Proben über dem Schwellenwert von 1,8 (Mittelwert 2,04, Median 2,05), was auf eine geringe Proteinverunreinigung und insgesamt gute RNA-Qualität hinweist. Auch bei niedriger RNA-Konzentration, wie etwa in Einzelschnitten, wurde dieser Wert erreicht (z. B. Probe 1 UL 1: 9,7 ng/μl;  $A_{260}/A_{280} = 1,92$ ). Im Gegensatz dazu fiel das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis bei 54,17 % der Proben unter den Referenzwert von 1,8 (Mittelwert 1,53, Median 1,71), was auf mögliche Verunreinigungen schließen lässt. Besonders betroffen waren hiervon Proben mit geringer Schnittanzahl.



**Tabelle 16:** Ergebnisse NanoDrop® Spektrophotometer der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte

Probe	Nukleinsäuren- konzentration in ng/μl	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> / A <sub>230</sub>
1 OL 1	26,9	0,51	0,67	0,35	1,94	1,33
1 UL 1	9,7	1,10	0,24	0,13	1,92	0,22
1 OL 5	153,9	4,14	3,85	1,90	2,03	0,93
1 UL 5	98,2	2,89	2,45	1,22	2,02	0,88
1 OL 10	376,3	5,63	9,41	4,57	2,06	1,67
1 UL 10	208,5	2,98	5,21	2,55	2,04	1,75
1 OL 20	639,7	9,58	15,99	7,66	2,09	1,67
1 UL 20	516,7	6,69	12,92	6,42	2,01	1,93
2 OL 1	22,1	0,45	0,55	0,28	2	1,22
2 UL 1	42	1,05	1,05	0,51	2,05	1
2 OL 5	106,2	1,40	2,66	1,31	2,03	1,9
2 UL 5	277,9	3,37	6,95	3,38	2,06	2,06
2 OL 10	248,9	3,07	6,22	3,03	2,05	2,03
2 UL 10	448,4	5,81	11,21	5,49	2,04	1,93
2 OL 20	398,4	4,86	9,96	4,86	2,05	2,05
2 UL 20	1028,9	11,96	25,72	12,51	2,06	2,15
3 OL 1	12,6	0,54	0,31	0,14	2,25	0,58
3 UL 1	30,6	0,50	0,76	0,37	2,06	1,54
3 OL 5	87,4	1,11	2,19	1,054	2,07	1,97
3 UL 5	211	3,85	5,27	2,55	2,06	1,37
3 OL 10	175,2	5,54	4,38	2,11	2,07	0,79
3 UL 10	498,9	6,78	12,47	6,29	1,98	1,84
3 OL 20	355,3	4,93	8,88	4,32	2,06	1,8
3 UL 20	859,6	10,53	21,49	10,51	2,05	2,04

(1: erster Körperspender; 2: zweiter Körperspender; 3: dritter Körperspender; OL: Oberlappen; UL: Unterlappen; 1-20: Anzahl der Kryoschnitte)

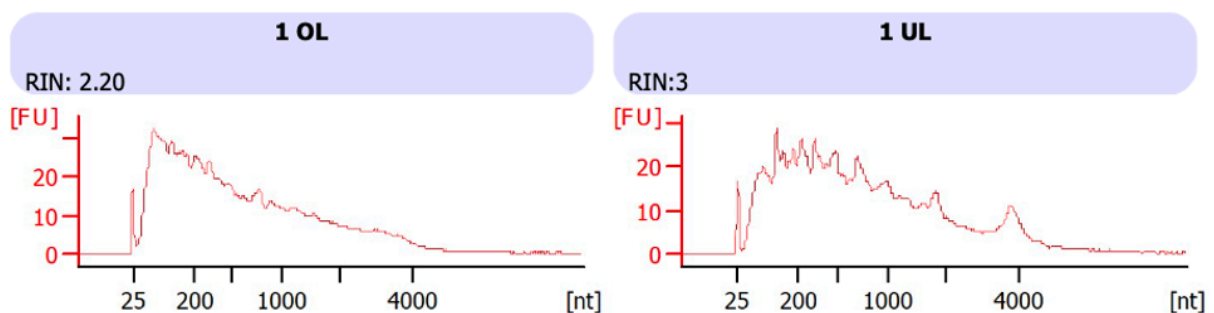
### 4.3 RNA-Integrität

Die Analyse der RNA-Integrität erfolgte mittels Bioanalyzer 2100. Ziel der Untersuchung war die Beurteilung der strukturellen Qualität der eluierten RNA. Entsprechenden Ergebnisse sind beispielhaft in Abbildung 17 und 18 dargestellt.

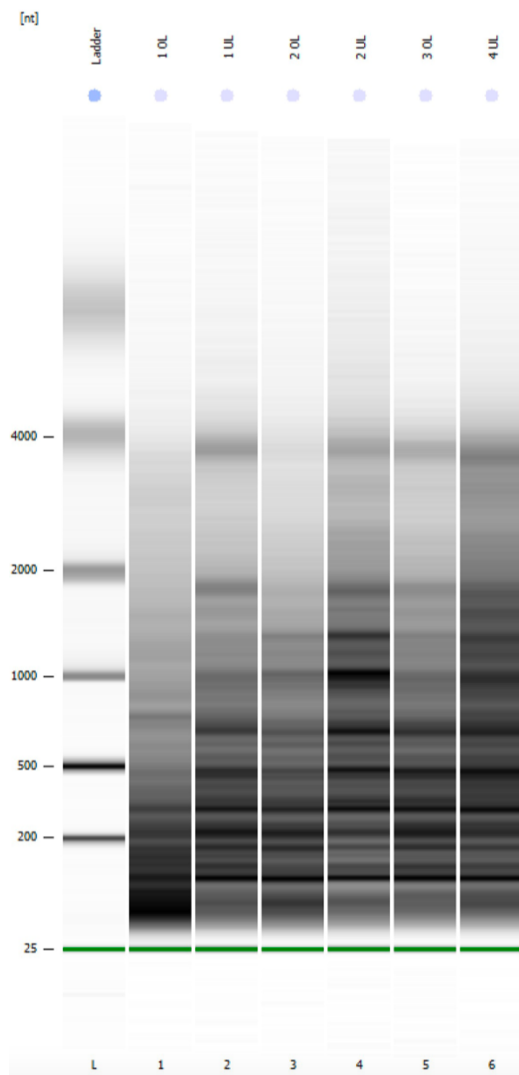
Die RIN lag in den untersuchten Gewebeproben im Mittel bei 2,6. Der niedrigste Wert wurde im Oberlappen des ersten Körperspenders mit einer RIN von 2,2 gemessen, der höchste im Unterlappen desselben Spenders mit einem RIN von 3,0 (vgl. Abb. 16). Insgesamt zeigte sich, dass die RNA-Integrität im Unterlappen tendenziell höher war als im Oberlappen (durchschnittlicher RIN: 2,83 vs. 2,4). Diese Beobachtung wird auch durch die elektrophoretischen Auftrennungen bestätigt (vgl. Abb. 17), in denen die RNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge sichtbar gemacht werden.

Zusätzlich wurde das Verhältnis der ribosomalen RNA-Untereinheiten 28S zu 18S (28S/18S-Ratio) ermittelt, dass in einem Bereich zwischen 0 bis 1 und somit unter dem idealen Referenzwert von ~2 für intakte RNA lag. Dies untermauert die Einschätzung einer fortgeschrittenen Fragmentierung.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die isolierte RNA in allen Gewebeproben bereits deutlich degradiert war. Die niedrigen RIN-Werte und 28S/18S-Verhältnisse sprechen für eine insgesamt geringe RNA-Integrität, was bei der Interpretation nachfolgender Expressionsanalysen berücksichtigt werden muss.



**Abbildung 17:** Elektropherogramme (Abbildung generiert mittels 2100 Expert Software (B.02.11.SI824), Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) (Beispielhafte Darstellung zweier Elektropherogramme mit dem höchsten und niedrigsten RIN. In den Elektropherogrammen generierte Fluoreszenzsignale (FU) wurden in Bezug zur Nukleotidgröße (nt) gesetzt und erlauben Rückschlüsse auf das Fragmentierungsmuster der RNA. 1: erster Körperspender; OL: Oberlappen; UL: Unterlappen; FU: Fluoreszenzsignale; nt: Nukleotidgröße)



**Abbildung 18:** Virtuelle Gelbanden (Abbildung generiert mittels 2100 Expert Software (B.02.11.SI824), Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) (Auftrennung der RNA nach Nukleotidgröße und Darstellung als virtuelle Gelbanden. Die Bandenmuster zeigen eine breite Verteilung kleiner RNA-Fragmente ( $<1000$  nt), was auf eine fortgeschrittene RNA-Degradation hinweist. Eine klare 28S- und 18S-rRNA-Bandenstruktur ist nicht erkennbar, was mit den niedrigen RIN-Werten übereinstimmt. Die Marker-Spur (Ladder) dient als Referenz für die Fragmentgrößen (nt). 1: erster Körperspender; 2: zweiter Körperspender; 3: dritter Körperspender; OL: Oberlappen; UL: Unterlappen; nt: Nukleotidgröße)

#### 4.3.1 RNA-Integrität der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte

Die höchste RNA-Integrität wurde mit einem RIN von 3,5 im Einzelkryoschnitt des Unterlappens des zweiten Körperspenders festgestellt. Die stärkste Degradation zeigte sich im entsprechenden Oberlappenschnitt desselben Spenders mit einem RIN von 1,8. Im Einzelkryoschnitt des Unterlappens von Körperspender 1 konnte aufgrund unzureichender Signale kein RIN berechnet werden.

Insgesamt zeigten die Einzelschnitte eine durchschnittliche RIN von 2,46, mit einem Mittelwert von 2,03 im Oberlappen und 2,90 im Unterlappen. Die Fünfer-Schnittgruppen wiesen eine durchschnittliche RIN von 2,68 auf (Oberlappen: 2,73; Unterlappen: 2,63). Die Zehner-Schnitte zeigten im Mittel eine RIN von 2,60, mit Mittelwerten von 2,63 im Oberlappen und 2,57 im Unterlappen. Die Zwanziger-Schnittgruppen lagen bei einer mittleren RIN von 2,47 (Oberlappen: 2,57; Unterlappen: 2,37).

In allen Proben wurde ein stark reduziertes oder nicht detektierbares rRNA-Verhältnis (28S/18S) im Bereich von 0,0 bis maximal 0,7 festgestellt. Dies deutet auf eine weitgehende Degradation der 28S rRNA hin.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl der RIN als auch das rRNA-Verhältnis unabhängig von der Schnittanzahl oder der anatomischen Lokalisation (Ober- vs. Unterlappen) durchgängig niedrige Werte aufweisen. Die vorliegenden Daten belegen eine fortgeschrittene RNA-Degradation in allen untersuchten Gewebeproben.

#### 4.4 Genexpressionsanalyse

Es erfolgte die quantitative Analyse der TRPC6-Expression durch eine RT-qPCR. Die Ergebnisse der Ziel- und Referenzgene sind in Tabelle 17 dargestellt und in Abbildung 19 visualisiert.

TRPC6 mRNA war in allen untersuchten Gewebeproben nachweisbar. Die durchschnittlichen  $C_t$ -Werte lagen im Oberlappen bei 27,21 und im Unterlappen bei 27,28, was auf eine vergleichbare Expression des Zielgens in beiden Lungenlappen hinweist. Die berechneten  $\Delta C_t$ -Werte lagen im Schnitt bei 3,82 im Oberlappen und bei 4,04 im Unterlappen. Damit ergibt sich lediglich moderate Unterschiede zwischen den anatomischen Lokalisationen. Bei Betrachtung der  $R_Q$ -Werte ergibt sich mit einem mittleren  $R_Q$  von 0,961 im Oberlappen und einem mittleren  $R_Q$  von 0,624 im Unterlappen eine tendenziell höhere TRPC6-Expression im Oberlappen. Trotz interindividueller Schwankungen deutet dies auf eine geringfügig stärkere Expression in den proximaleren Lungenabschnitten hin. Aufgrund der begrenzten Probenzahl ist dieser Unterschied jedoch mit Vorsicht zu interpretieren.

Die Negativkontrollen zeigten keine Amplifikation, sodass keine  $C_t$ -Werte bestimmt werden konnten. Dies spricht für die Abwesenheit von Kontaminationen sowohl in der reversen Transkription als auch in der qPCR-Amplifikation.

Weiterhin wurden die endogenen Kontrollgene GAPDH und  $\beta$ -Aktin analysiert. GAPDH war in allen Proben exprimiert, mit mittleren  $C_t$ -Werten von 23,85 im Oberlappen und 23,86 im Unterlappen. Während die Negativkontrollen ohne eine Reverse Transkriptase für GAPDH ebenfalls keine Amplifikation zeigten, war die NTC mit einem  $C_t$ -Wert von 32,04 schwach positiv. Dies deutet auf eine mögliche geringe Hintergrundkontamination in dieser Kontrollgruppe hin.

Die  $C_t$ -Werte für  $\beta$ -Aktin lagen im Mittel bei 22,43 im Oberlappen und 21,93 im Unterlappen. In keiner der Negativkontrollen wurde eine Amplifikation detektiert.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse die erfolgreiche Detektion von TRPC6 mRNA in allen Gewebeproben sowie die zuverlässige Expression der Referenzgene. Die  $R_q$ -Werte weisen auf eine leicht stärkere Expression im Oberlappen hin. Die Negativkontrollen zeigen keine Hinweise auf relevante Kontaminationen, sodass die Daten als valide anzusehen sind.

Tabelle 17 : Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Probe	$C_t$ TRPC6	$C_t$ GAPDH	$C_t$ $\beta$ - Aktin	$\Delta C_t$	$R_q$
1 OL	28,39	25,55	23,26	3,99	1
2 OL	27,55	23,65	23,15	3,30	1,61
3 OL	25,71	22,36	20,89	4,09	0,93
1 UL	27,30	23,65	22,22	4,36	0,77
2 UL	27,32	24,26	21,91	4,23	0,84
3 UL	27,23	23,68	21,66	4,56	0,67
NTC	0	32,04	0	-	-
1 OL RT-	0	0	0	-	-
3 OL RT-	0	0	0	-	-

(1: erster Körperspender; 2: zweiter Körperspender; 3: dritter Körperspender; OL: Oberlappen; UL: Unterlappen)

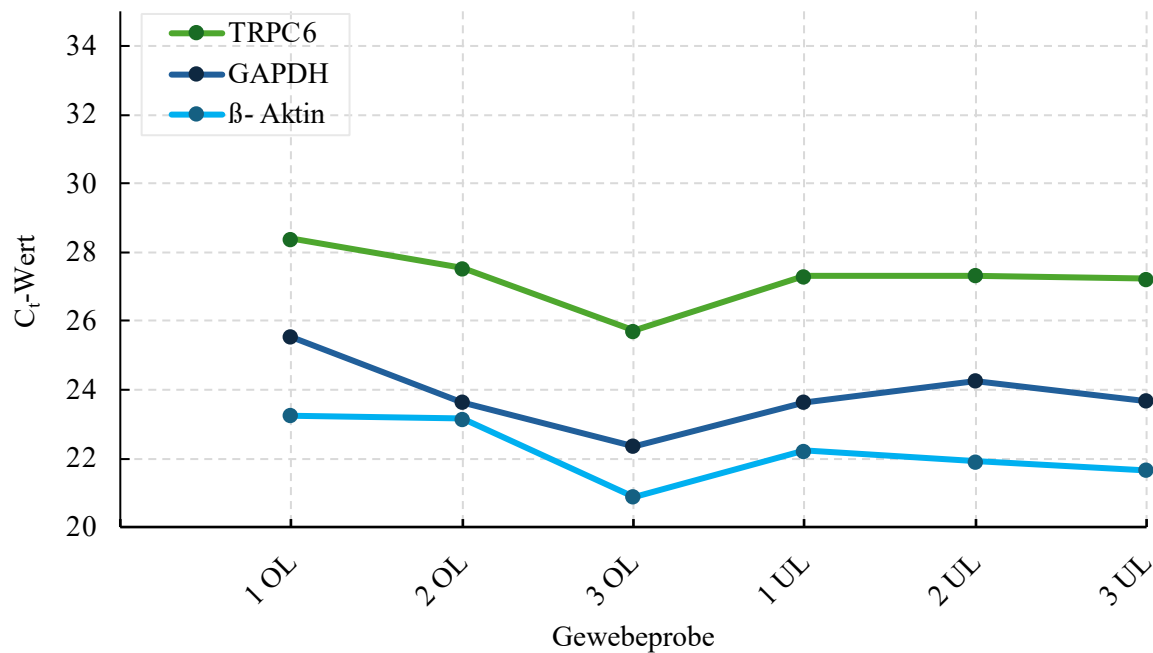


Abbildung 19: Veranschaulichung der  $C_t$ -Werte für TRPC6, GAPDH und  $\beta$ -Aktin

#### 4.4.1 Genexpressionsanalyse der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte

Es erfolgte eine erneute RT-qPCR zur Untersuchung der TRPC6-Expression in Einzel- und Mehrfachkryoschnitten. Die Normalisierung erfolgte über das endogene Referenzgen GAPDH. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 zusammengefasst und in Abbildung 20 visualisiert.

TRPC6 mRNA war in allen untersuchten Gewebeproben detektierbar. Selbst bei nur einem Kryoschnitt lag der  $C_t$ -Wert in einem detektierbaren Bereich, sodass auch unter stark limitierter Gewebemenge eine zuverlässige qPCR-Messung möglich war. Die detaillierte Betrachtung der TRPC6- $C_t$ -Werte nach Schnittanzahl ergab folgende Werte:

Tabelle 18:  $C_t$ -Werte nach Anzahl der Kryoschnitte und Lappenlokalisation

Anzahl Kryoschnitte	$C_t$ Oberlappen	$C_t$ Unterlappen	$\emptyset C_t$
1	28,74	29.84	29.29
5	28.61	29.66	29.13
10	28.59	30.23	29.41
20	28.58	29.23	28.90

Die  $C_t$ -Werte der Proben des Lungenunterlappens lagen über alle Schnittgruppen hinweg über denen der Lungenoberlappen, was die Tendenz einer höheren TRPC6-Expression im Oberlappen bestätigt.

Die durchschnittlichen  $\Delta C_t$  -Werte lagen im Oberlappen bei 2,73 und im Unterlappen bei 3,07, was ebenfalls auf eine tendenziell stärkere TRPC6-Expression im Oberlappen hinweist. Auch die daraus berechneten durchschnittlichen  $R_Q$ -Werte zeigten mit 0,91 im Oberlappen gegenüber 0,74 im Unterlappen eine leicht höhere relative Expression in den cranialen Lungenabschnitten.

Die  $R_Q$ -Werte reichen beispielhaft von 0.37 (1 UL 1) zu 1.05 (2 UL 1) und zeigen demnach hohe interindividuelle Schwankungen auf. Trotz dieser interindividuellen Schwankungen bleibt der Mittelwertvergleich zwischen Ober- und Unterlappen konsistent mit der zuvor beobachteten Verteilung. Zusammenfassend belegen die Ergebnisse die erfolgreiche Detektion von TRPC6 mRNA in allen Gewebeproben, selbst bei minimaler Probenmenge in Form eines Einzelkryoschnitts. Die tendenziell höhere Expression im Oberlappen stimmt mit den Ergebnissen der ersten Genexpressionanalyse in Abschnitt 4.4 überein.

Tabelle 19: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte

<b>Probe</b>	<b>C<sub>t</sub> TRPC6</b>	<b>C<sub>t</sub> GAPDH</b>	<b>ΔC<sub>t</sub></b>	<b>R<sub>Q</sub></b>
1 OL 1	27.94	25.30	2.64	1
1 UL 1	30.38	26.30	4.08	0.37
1 OL 5	27.97	25.45	2.43	1.15
1 UL 5	30.18	26.8	3.38	0.60
1 OL 10	28.10	25.76	2.34	1
1 UL 10	30.22	26.87	3.35	0.50
1 OL 20	28.09	25.22	2.87	0.69
1 UL 20	30.09	27.16	2.92	0.67
2 OL 1	29.23	26.97	2.26	1.30
2 UL 1	28.88	26.31	2.57	1.05
2 OL 5	29.20	27.15	2.05	1.50
2 UL 5	28.96	26.68	2.28	1.28
2 OL 10	29.20	26.84	2.36	0.99
2 UL 10	28.81	26.39	2.43	0.94
2 OL 20	28.97	26.88	2.09	1.19
2 UL 20	28.43	26.87	1.57	1.70
3 OL 1	29.07	25.38	3.69	0.43
3 UL 1	30.27	26.21	4.06	0.37
3 OL 5	28.68	25.05	3.63	0.50
3 UL 5	29.86	25.78	4.08	0.27
3 OL 10	28.47	25.27	3.20	0.55
3 UL 10	31.66	28.73	2.92	0.67
3 OL 20	28.69	25.48	3.21	0.55
3 UL 20	29.19	25.97	3.22	0.54

(1: erster Körperspender; 2: zweiter Körperspender; 3: dritter Körperspender; OL: Oberlappen; UL: Unterlappen)



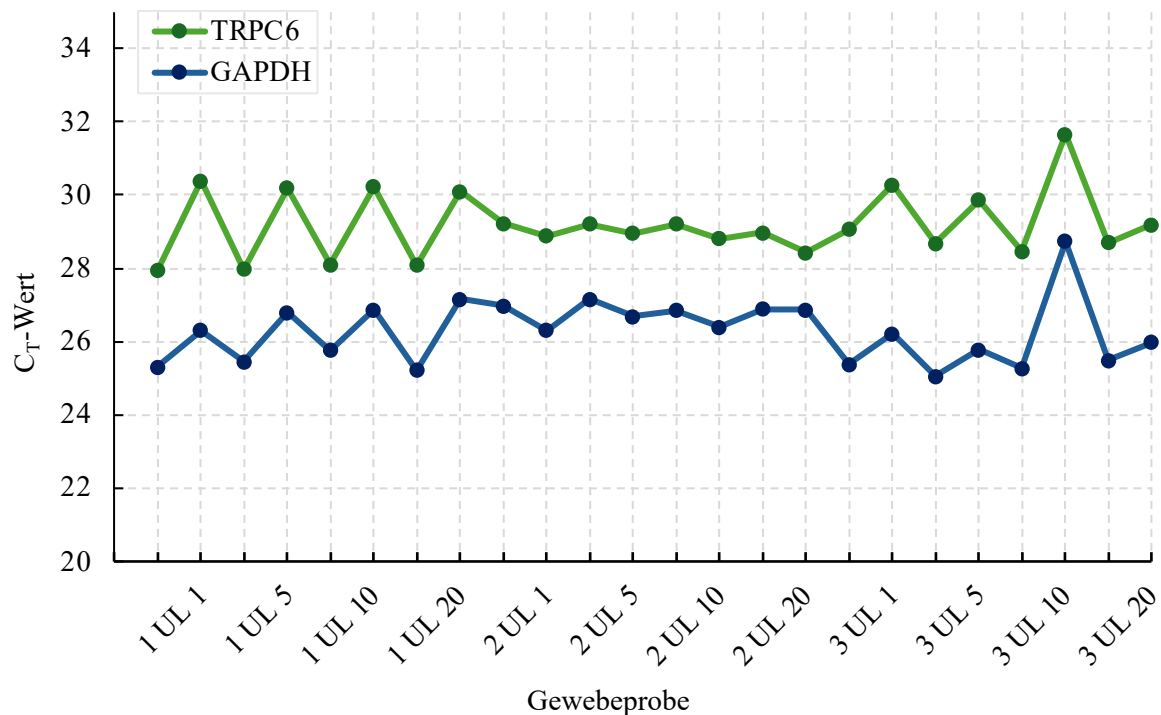


Abbildung 20: Veranschaulichung der  $C_t$ -Werte für TRPC6 und GAPDH

#### 4.5 Laserbasierte Mikrodissektion

Die Durchführung der LCM erwies sich als nicht erfolgreich. Trotz wiederholter Justierung der Laserintensität sowie Anpassung der Zielgrößen konnte das Gewebe weder zuverlässig geschnitten noch in die Sammelgefäße katapultiert werden. Unter 5-facher Vergrößerung waren vereinzelt Ansätze von Schnitten erkennbar, jedoch zeigte sich die Schnittführung als insgesamt unvollständig und nicht reproduzierbar. Zudem konnte an den Schnittkanten das Auftreten eines bräunlichen Rands beobachtet werden. Weiterhin gestaltete es sich durch eine fehlende Kontrastfärbung schwierig, Zielstrukturen visuell zu identifizieren und diese mit dem Laser präzise zu umfahren.

## **5. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von TRPC6-mRNA im Ober- und Unterlappen der menschlichen Lunge sowie die Untersuchung potenzieller topographischer Unterschiede in der Expression. Der Nachweis der TRPC6-mRNA konnte erfolgreich erbracht werden. Darüber hinaus wurde geprüft, ob ein spezifischer Nachweis aus distinkten Lungengewebsanteilen möglich ist. Diese Fragestellung konnte jedoch nicht bestätigt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit traten zudem mehrere kritische Aspekte auf, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

### **5.1 Diskussion der Methodik**

#### **5.1.1 Patientenkollektiv**

Die Gewebeproben stammten von drei nicht vorselektierten Körperspendern, aus denen insgesamt sechs Proben gewonnen wurden. Die geringe Anzahl an Spendern stellt eine zentrale Limitation dieser Arbeit dar. Zudem wiesen die Körperspender zum Teil multiple Vorerkrankungen auf, wodurch eine potenziell pathologiebedingte Veränderung der TRPC6-Expression nicht ausgeschlossen werden kann. Eine differenzierte Berücksichtigung solcher Einflussfaktoren erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. Aufgrund der eingeschränkten Probenzahl bietet die Studie lediglich einen deskriptiven Überblick über eine mögliche topographische Verteilung der TRPC6-mRNA-Expression in der Lunge. Eine statistische Auswertung wurde daher nicht vorgenommen, könnte jedoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

#### **5.1.2 Probenentnahme**

Die Probenentnahme erfolgte in einem post- mortem Intervall von 12 bis 24 Stunden. Da RNA im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA einzelsträngig vorliegt und RNasen ubiquitär vorkommen, unterliegt RNA postmortal einer raschen Degradation. [42] Ein kürzeres postmortales Intervall war organisatorisch schwer umzusetzen, da die Körperspender zunächst in die Prosektur der Universität des Saarlandes überführt werden mussten und die Gewebeentnahme durch mich vor Ort zu erfolgen hatte. Die Probenentnahme selbst erfolgte standardisiert aus dem Ober- und Unterlappen der Lunge. Aufgrund der weichen Gewebestruktur war eine Entnahme mittels Biopsiestanze nicht möglich, stattdessen wurde eine chirurgische Schere verwendet. Die Durchführung gestaltete sich jedoch mitunter herausfordernd, da konstitutionelle Unterschiede zwischen den Körperspendern bestanden und der Zugang zur Lunge möglichst schonend erfolgen musste, um den Körperspender für die nachfolgende Fixierung sowie für Lehr- und Forschungszwecke zu erhalten. Zusätzlich wiesen die entnommenen Gewebeproben unterschiedliche Formen und Größen auf. Zwar wurde versucht, die Proben nach Entnahme auf

einheitliche Dimensionen zuzuschneiden, dies konnte jedoch nicht vollständig erreicht werden. Diese Heterogenität ist insbesondere bei der Herstellung und Auswertung von Einfach- und Mehrfach-Kryoschnitten zu berücksichtigen.

### **5.1.3 Molekularbiologische Untersuchungen**

Die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten standardisiert und gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller. Darüber hinaus wurde die Durchführung von einer in Genexpressionsanalysen erfahrenen Fachperson begleitet, wodurch eine fehlerarme Anwendung der Methoden zur molekularbiologischen Aufarbeitung der Gewebeproben gewährleistet werden konnte.

### **5.1.4 Anfertigung von Kryoschnitten**

Bei der Anfertigung der Kryoschnitte wurde, analog zu den molekularbiologischen Untersuchungen, konsequent darauf geachtet, die Gewebeproben während des gesamten Prozesses gekühlt zu halten, um fortschreitende RNA-Degradation weitestgehend zu vermeiden. So wurde der Arbeitsplatz am Kryostaten stets vorbereitet und gesäubert, bevor die auf Eis gelagerten Proben zum Gerät gebracht wurden. Kurze Phasen ohne Kühlung, beispielsweise beim Überführen der Probe auf das OCT-Medium auf dem Objektträger, ließen sich jedoch technisch bedingt nicht vollständig vermeiden und könnten zu einer fortschreitenden RNA-Degradation beigetragen haben.

Im Rahmen der histomorphologischen Analyse erwies sich die Herstellung von Kryoschnitten mit einer Dicke unter 14 µm als nicht durchführbar. Bei geringerer Schnittdicke kam es aufgrund der luftgefüllten pulmonalen Räume wiederholt zu mechanischer Instabilität: Die Gewebeproben zersprangen oder rollten sich auf, was eine Übertragung auf den Objektträger unmöglich machte. Nach mehrfacher Anpassung und Justierung der Schnittparameter stellte sich eine Dicke von 14 µm als niedrigste reproduzierbare Schnittdicke heraus, bei der verwertbare Kryoschnitte erzielt werden konnten. Dennoch traten auch bei dieser Dicke häufig bereits makroskopisch sichtbare Gewebedefekte auf, weshalb ein erheblicher Anteil der Schnitte verworfen werden musste, was wiederum zu einem erhöhten Probenverbrauch führte.

Ein wesentlicher limitierender Faktor bei der Anfertigung von Kryoschnitten zur Schwellenwertanalyse der TRPC6-mRNA war die Heterogenität der Gewebeproben hinsichtlich Größe und Form. Trotz standardisierter Vorbereitung durch sofortiges Zurechtschneiden nach der Entnahme und sorgfältiges Trimmen zur Angleichung der Schnittebene konnte keine vollständige Homogenität erreicht werden. Dies hatte zur Folge, dass bei identischer Schnittanzahl (z. B. 1, 5, 10 oder 20 Kryoschnitte) unterschiedliche Gewebemengen pro Probe vorlagen. Eine quantitative Vergleichbarkeit der Proben war somit nur relativ möglich.

### 5.1.5 Anfertigung von Kryoschnitten und Durchführung der laserbasierten Mikrodissektion

Die Anfertigung der Kryoschnitte für die LCM erfolgte im letzten Schritt der Arbeit, nachdem der erfolgreiche Nachweis erbracht worden war, dass TRPC6-mRNA bis hin zu einem singulären Kryoschnitt detektierbar ist. Da, wie bereits in den methodischen Abschnitten erläutert, die Herstellung von Schnitten unterhalb von 14 µm aufgrund der luftgefüllten pulmonalen Strukturen technisch nicht zuverlässig möglich war und die TRPC6-Expression nur in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte, wurde für die LCM eine Schnittdicke von 16 µm gewählt. Diese stellte einen Kompromiss zwischen struktureller Integrität der Schnitte, mikroskopischer Darstellbarkeit und ausreichender RNA-Ausbeute aus kleinsten Lungenkompartimenten dar. Bei der Durchführung der LCM konnte das Gewebe Justierung der Laserintensität sowie Anpassung der Zielgrößen nicht weder zuverlässig geschnitten noch in die Sammelgefäße katapultiert werden. Möglicherweise waren die Gewebeschnitte für die LCM zu dick, wodurch der Laser nicht vollständig durchdringen konnte.

Zum Zeitpunkt der LCM-Schnittanfertigung waren die verwendeten Gewebeproben bereits in OCT eingebettet, da sie bereits für die vorherigen Schnittanfertigungen genutzt wurden. Zwar wurde bei der initialen Einbettung darauf geachtet, dass ausschließlich der Probenboden Kontakt mit dem Einbettmedium hatte, jedoch ist ein kapillarer Eintrag von OCT über die alveolären Strukturen in das Gewebe nicht auszuschließen. Ein solcher Eintrag könnte ebenfalls zur Behinderung der LCM geführt haben.

Ein zentrales Problem stellte die unzureichende Adhäsion der Gewebeschnitte an den Objektträgern dar, obwohl diese zuvor UV- bestrahlt worden waren, um die Hydrophilie zu erhöhen. Ein zusätzlicher Waschschritt zur Entfernung überschüssigen OCTs war aufgrund der geringen Haftung nicht möglich, da sich die Gewebeschnitte beim Kontakt mit Wasser regelmäßig vom Träger lösten. Dies führte zu einer möglichen Kontamination der Schnitte mit Einbettmedium, was die Qualität der Kryoschnitte für die nachfolgende LCM beeinträchtigte. So war bei der Durchführung der LCM das Auftreten eines bräunlichen Rands beobachtet worden. Nach Rücksprache mit der Firma Zeiss ein Indikator für OCT-Kontamination. Diese Rückstände könnten die Energieübertragung des Lasers behindert haben.

Ein weiterer limitierender Faktor war die eingeschränkte visuelle Identifikation und gezielte Umfahrung der Zielstrukturen. Aufgrund der unzureichenden Haftung wurde auf eine Färbung der Schnitte verzichtet, um zusätzliche Belastungen des Gewebes zu vermeiden. Infolgedessen gestaltete sich die morphologische Orientierung, etwa zur Identifikation bronchiolärer Strukturen, unter dem LCM-Mikroskop als erschwert.

Diese methodischen Einschränkungen verdeutlichen, dass die Herstellung geeigneter Kryoschnitte für die LCM ein hochsensibler Prozess ist, der durch verschiedene technische Faktoren beeinflusst wird.

Für zukünftige Arbeiten erscheint es sinnvoll, frische, bislang nicht vollständig in OCT eingebettete Gewebeproben zu verwenden, um das Eindringen des Einbettmediums in das Gewebe zu vermeiden.

Ebenso sollte die Vorbehandlung der Objektträger weiter optimiert werden, etwa durch alternative Beschichtungen wie Poly-L-Lysine 0.1%, um die Adhäsion der Schnitte zu verbessern. [21]

Zudem könnte der Einsatz RNA-kompatibler Färbemethoden (z. B. mittels Cresyl- Violett) die mikroskopische Orientierung erleichtern, ohne die molekularbiologische Qualität zu beeinträchtigen. [67]

Schließlich ist zu erwägen, die LCM-Schnittanfertigung bereits in einem früheren Arbeitsstadium durchzuführen, bevor der Gewebeblock durch vorangegangene Schnitte in seiner Struktur und Qualität beeinflusst wird.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

Es ist darauf hinzuweisen, dass die vorliegende Arbeit auf einem beschreibenden, semiquantitativen Ansatz basiert und in ihrer Aussagekraft entsprechend begrenzt ist. Sie kann erste thematische Einordnungen liefern, ersetzt jedoch keine fundierte statistische Analyse. Diese könnten potenziell Thema zukünftiger Studien sein.

### **5.2.1 Histologische Darstellung**

Die histologische Darstellung der Gewebeproben war grundsätzlich möglich. Aufgrund der gewählten Schnittdicken von 14 µm bzw. 16 µm kam es jedoch vereinzelt zu einer Überlagerung von Gewebestrukturen, wodurch einzelne morphologische Details nicht klar abgegrenzt werden konnten. Darüber hinaus zeigte sich, dass bestimmte pulmonale Strukturen, wie beispielsweise Bronchiolen, ausschließlich in der Gewebeprobe des ersten Körperspenders identifiziert werden konnten. Diese Beobachtung weist auf die interindividuelle anatomische Variabilität sowie auf eine mögliche unzureichende Probertiefe hin. Um strukturelle Vielfalt der untersuchten Gewebe zu erhöhen, erscheint es für zukünftige Arbeiten sinnvoll, pro Körperspender mehrere Gewebeproben aus unterschiedlichen Arealen und Tiefen eines Lungenlappens zu entnehmen. Dadurch könnten spezifische Strukturen häufiger erfasst und analysiert sowie topographische Unterschiede verlässlicher abgebildet werden.

### **5.2.2 RNA-Qualität und -Quantität**

In beiden RNA-Isolationen wurde eine insgesamt hohe RNA-Ausbeute erzielt, begleitet von durchweg guten  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnissen ( $>1,8$ ), was auf eine geringe Proteinverunreinigung und damit auf eine grundsätzlich gute RNA-Reinheit hinweist. Im Gegensatz dazu lagen die  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnisse in

einem Großteil der Proben unterhalb des häufig als Referenz genannten Schwellenwerts von 1,8. Dies war insbesondere bei Proben mit geringer Schnittanzahl zu beobachten.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis stark von der Nukleinsäurekonzentration abhängt. [69] Bei niedrigen Konzentrationen wirken sich selbst geringfügige Kontaminationen deutlich auf das Verhältnis aus. [32] Literaturangaben zufolge steigt die Variabilität dieses Werts signifikant bei Konzentrationen unterhalb von 10 ng/μl, teils sogar schon ab 50 ng/μl. [32][63] Dementsprechend sollte das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis stets im Kontext der gemessenen Konzentration interpretiert werden.

Weiterhin kann ein erniedrigtes  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis auf die Anwesenheit von Substanzen hindeuten, die im Bereich von 230 nm absorbieren. Hierzu zählen unter anderem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), nicht-ionische Tenside, Proteine, Phenol sowie chaotrope Verbindungen wie Guanidiniumthiocyanat (GTC) und Guanidinhydrochlorid (GuHCl). [32] In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass der im Rahmen der RNA-Isolation verwendete QIAzol® Lysis Reagent phenol- und guanidinhaltig ist. Bereits geringe Mengen dieser Substanzen, insbesondere GTC, können das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis deutlich reduzieren. [69]

Es existiert jedoch kein einheitlich definierter unterer Grenzwert für das  $A_{260}/A_{230}$ - oder auch das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis, unterhalb dessen eine RNA-Probe als ungeeignet gelten würde. [69] Zusätzlich scheint ein reduziertes  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis nur äußerst geringe Auswirkungen auf die Effizienz und Genauigkeit der qRT-PCR zu haben. [11][69] In einer Untersuchung konnte beispielsweise keine signifikante Korrelation zwischen dem  $A_{260}/A_{230}$ -Wert und der Anzahl potenzieller qPCR-Inhibitoren nachgewiesen werden.[11]

Vor diesem Hintergrund wurden potenzielle Kontaminationen im Bereich um 230 nm als methodisch tolerabel eingestuft und alle RNA-Proben für die weitere Analyse verwendet.

### 5.2.3 RNA-Integrität

Die isolierte RNA wies insgesamt eine fortgeschrittene Degradation auf, was sich in niedrigen RIN-Werten und einem verminderten rRNA-Verhältnis widerspiegelte. Diese verminderte Integrität ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die postmortale Probenentnahme zurückzuführen, bei der es durch die verzögerte Gewebeerarbeitung zu enzymatischer Degradation der RNA durch endogene RNasen kommt (vgl. Abschnitt 5.1.2).

Eine verminderte RNA-Integrität kann die Effizienz der reversen Transkription und die anschließende PCR-Amplifikation beeinträchtigen. Dies äußert sich typischerweise in einer reduzierten Zahl amplifizierbarer Zielsequenzen und entsprechend erhöhten  $C_t$ -Werten.

Um potenzielle Verzerrungen durch RNA-Fragmentierung zu kompensieren, wurden die gemessenen  $C_t$ -Werte gegen stabile endogene Referenzgene (GAPDH,  $\beta$ -Aktin) normalisiert. Diese Normalisierung erlaubt eine vergleichbare Auswertung der Expressionsniveaus auch bei unterschiedlichem RNA-Ausgangszustand. [3]

Trotz dieser methodischen Korrektur sollte die eingeschränkte RNA-Integrität bei der Interpretation der qPCR-Ergebnisse berücksichtigt werden, insbesondere im Hinblick auf quantitative Vergleiche zwischen Proben. Für zukünftige Arbeiten wäre es demnach sinnvoll, das postmortale Intervall, soweit logistisch möglich, auf unter 12 Stunden zu begrenzen, um die RNA-Integrität zu verbessern und damit die Aussagekraft molekularbiologischer Analysen weiter zu erhöhen.

#### **5.2.4 Diskussion der Genexpressionsanalysen und klinische Einordnung**

Der molekulargenetische Nachweis von TRPC6 aus Lungengewebe konnte bereits mehrfach erbracht werden. [15][27][45][60] Besonders hervorzuheben ist hierbei die Arbeit von Corteling et al. aus dem Jahr 2004, in der TRPC6-mRNA mittels RT-PCR sowohl in der glatten Muskulatur der Atemwege als auch im Bronchialepithel nachgewiesen wurde. [15] Weitere Studien bestätigten die Expression in glatter Atemwegsmuskulatur. [27][60] Allerdings bleibt in den genannten Studien unklar, aus welcher anatomischen Lokalisation das Lungengewebe stammt, sodass keine Aussagen zu möglichen regionalen Expressionsunterschieden getroffen werden kann. Die vorliegende Arbeit stellt nach aktuellem Kenntnisstand die erste Untersuchung dar, die gezielt mögliche Expressionsunterschiede zwischen Ober- und Unterlappen der menschlichen Lunge untersucht.

Es konnte TRPC6-mRNA in allen Gewebeproben bis hin zu einem singulären Kryoschnitt nachgewiesen werden. Die berechneten  $C_t$ - und  $R_Q$ -Werte zeigen eine tendenziell höhere TRPC6-Expression im Oberlappen als im Unterlappen menschlicher Lunge. So beträgt der mittlere  $R_Q$ -Wert im Unterlappen 0.81, während der  $R_Q$ -Wert im Oberlappen bei 1.04 liegt. Obwohl die Probenanzahl begrenzt ist, deutet dieser Unterschied auf eine leicht höhere Genexpression in proximalen Lungenabschnitten hin. Die Ergebnisse sollten jedoch aufgrund der geringen Probenanzahl und hoher Ergebnisvariabilität zwischen den einzelnen Körperspendern als Hinweis gewertet werden und sollte in weiterführenden Untersuchungen mit größerem Probenumfang validiert werden.

Auch wenn die laserbasierte Mikrodisektion in dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, erscheint eine LCM-gestützte Analyse kleinster pulmonaler Strukturen mit anschließender Genexpressionsanalyse grundsätzlich realistisch. Der erfolgreiche Nachweis von TRPC6-mRNA bis hin zu einem einzelnen Kryoschnitt legt nahe, dass, unter Berücksichtigung der in Abschnitt 5.1.5

diskutierten methodischen Limitationen, die Durchführung entsprechender Analysen möglich sein könnte. Diese Annahme wird durch die Arbeit von Corteling et al. gestützt, in der TRPC6-mRNA bereits in verschiedenen pulmonalen Strukturen nachgewiesen werden konnte. [15] Im Unterschied zum hier verfolgten Ansatz erfolgte der Nachweis dort jedoch nicht aus Kryoschnitten, sondern auf Basis von Genexpressionsanalysen aus Zellkulturen, was die direkte Vergleichbarkeit einschränkt. [15]

Im Rahmen der akuten HPV scheint TRPC6 eine entscheidende Funktion einzunehmen. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass TRPC6-defiziente Mäuse keine adäquate HPV-Reaktion ausbilden, während diese in WT-Mäusen vollständig erhalten war. [57] Es konnte gezeigt werden, dass eine akute Hypoxie zu einer Akkumulation von DAG führt, welches TRPC6-abhängige, calciumvermittelte Signale in PSMCs auslöst und so eine rasche Gefäßkontraktion induziert. [57] Dieser Mechanismus dient der Umverteilung des Blutflusses in besser belüftete Lungenabschnitte und trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung eines effizienten Ventilations-Perfusions-Verhältnisses bei. Passend dazu konnte in einer Arbeit von Leidinger et al. TRPC6 immunhistochemisch in pulmonalen Gefäßstrukturen nachgewiesen werden, was die Präsenz des Kanals im pulmonalen Gefäßbett bestätigt. [34] Vor dem Hintergrund, dass der obere Lungenlappen unter physiologischen Bedingungen besser belüftet ist als der untere, erscheint die in dieser Arbeit beobachtete tendenziell höhere TRPC6-Expression im Oberlappen besonders interessant. Sie könnte auf eine regionale Modulation der HPV hinweisen, bei der TRPC6 eine verstärkte Kontraktilität der PSMCs in stärker belüfteten Lungenarealen ermöglicht. Eine solche Verteilung wäre funktionell sinnvoll, um den Blutfluss gezielt in gut belüftete Lungenareale zu steuern und eine optimale Sauerstoffaufnahme sicherzustellen. Klinisch ist diese Beobachtung vor allem bei Erkrankungen von Relevanz, in denen die HPV dysreguliert ist, etwa wie bei der pulmonalen Hypertonie. In solchen Fällen könnte TRPC6 als potenzielles Ziel einer pharmakologischen Modulation dienen, um die vasokonstriktive Reaktion gezielt zu beeinflussen. [19]

Eine regional erhöhte TRPC6-Expression im Oberlappen ist auch im Kontext der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) von besonderem Interesse. Es ist dokumentiert, dass die nikotinassoziierte COPD in vielen Fällen bevorzugt die oberen Lungenabschnitte betrifft. [4] Dies wird auf die anatomisch bedingte, bessere Ventilation des Oberlappens zurückgeführt, die dazu führt, dass inhalative Noxen wie Zigarettenrauch bevorzugt in diesen Bereich gelangen und dort vermehrt Gewebeschäden verursachen. [42] Darüber hinaus konnte in einer Studie aus dem Jahr 2020 gezeigt werden, dass Zigarettenrauch die TRPC6-Expression in glatten Muskelzellen der Atemwege signifikant erhöht. [27] Eine entsprechende TRPC6-Überexpression wurde auch im Lungengewebe von COPD-Patienten nachgewiesen, insbesondere in der glatten Bronchialmuskulatur. [27] Darüber hinaus wurde TRPC6 immunhistochemisch sowohl in den Bronchioli als auch im Bronchialepithel nachgewiesen und konnte molekularbiologisch im Bronchialepithel sowie in der glatten Bronchialmuskulatur bestätigt werden. [15][34] Auch wenn die genaue Funktion von TRPC6 in den Bronchioli bislang nicht vollständig geklärt



ist, deutet seine Lokalisation auf eine mögliche Beteiligung an der Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion sowie an der Regulation lokaler Entzündungsprozesse in den tiefen Atemwegen hin. Unterstützt wird diese Annahme durch tierexperimentelle Studien, in denen die Inhalation des Gases Ozon bei TRPC6-defizienten Mäusen zu einer signifikant reduzierten Neutrophilenrekrutierung und einer abgeschwächten Atemwegsinflammation führte. [7] Darüber hinaus wurde in einer Studie aus dem Jahr 2023 TRPC6 als potenzieller diagnostischer Biomarker für COPD identifiziert, was die klinische Relevanz weiter unterstreicht. [17] Ergänzend zeigen Daten, dass TRPC6 auch in alveolären Makrophagen von COPD-Patienten verstärkt exprimiert wird, was auf eine Beteiligung an der entzündlichen Immunantwort innerhalb der alveolären Kompartimente hinweist. [24] Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte TRPC6-Expression im Oberlappen könnte möglicherweise mit der bevorzugten Manifestation nikotinassoziierter COPD in den oberen Lungenabschnitten in Zusammenhang stehen. Es ist denkbar, dass die verstärkte Exposition gegenüber inhalativen Noxen in besser ventilierten Lungenarealen eine lokal erhöhte TRPC6-Expression begünstigt, die wiederum zur Verstärkung lappenbezogener Entzündungs- und damit einhergehender Remodelingprozesse beiträgt. Vor diesem Hintergrund erscheint TRPC6 als potenzieller regionaler Modulator der COPD-Pathogenese und sollte in zukünftige diagnostische und therapeutische Forschungsansätze miteinbezogen werden.

## **6. Zusammenfassung und Ausblick**

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass TRPC6-mRNA in allen untersuchten Proben nachweisbar war, selbst bei minimaler Probenmenge in Form eines einzelnen Kryoschnitts. Diese Daten belegen die prinzipielle Eignung auch kleinster Gewebereinheiten für eine zuverlässige TRPC6-Analyse mittels RT-qPCR. Die tendenziell höhere Expression im Oberlappen könnte auf eine mögliche lappenspezifische Regulation von TRPC6 hindeuten. Dies könnte zur Modulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion beitragen und pathophysiologisch zur bevorzugten Beteiligung des Oberlappens bei COPD und anderen lappenspezifischen Lungenerkrankungen beitragen. Zukünftige Studien sollten daher insbesondere die zelltypspezifische Expression und Funktion von TRPC6 insbesondere unter hypoxischen und entzündlichen Bedingungen untersuchen. Weiterführende, systematische Untersuchungen mit größerem Probenumfang sind erforderlich, um die funktionelle Bedeutung dieser Verteilung zu evaluieren und TRPC6 als möglichen diagnostischen Marker oder als therapeutischen Ziel weiter zu untersuchen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abdinghoff J, Servello D, Jacobs T, Beckmann A, Tschernig T (2022) Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry. *Biomed Rep* 16:42
2. Adams G (2020) A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist* 42:
3. Antonov J, Goldstein D, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt H, Jaggi R (2005) Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 85:1040–50
4. Armstrong DA, Nymon AB, Ringelberg CS, Lesseur C, Hazlett HF, Howard L, Marsit CJ, Ashare A (2017) Pulmonary microRNA profiling: implications in upper lobe predominant lung disease. *Clin Epigenetics* 9:56
5. Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. 4
6. Chaudhry R, Omole AE, Bordoni B (2025) *Anatomy, Thorax, Lungs*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470197/>
7. Chen Q-Z, Zhou Y-B, Zhou L-F, Fu Z-D, Wu Y-S, Chen Y, Li S-N, Huang J-R, Li J-H (2019) TRPC6 modulates adhesion of neutrophils to airway epithelial cells via NF- $\kappa$ B activation and ICAM-1 expression with ozone exposure. *Exp Cell Res* 377:56–66
8. Chen X, Sooch G, Demaree IS, White FA, Obukhov AG (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* 9:1983
9. Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, Pattisapu JV, Kyriazis GA, Sugaya K, Bushnev S, Lathia JD, Rich JN, Chan SL (2010) Receptor Channel TRPC6 Is a Key Mediator of Notch-Driven Glioblastoma Growth and Invasiveness. *Cancer Res* 70:418–427
10. Chinigò G, Castel H, Chever O, Gkika D (2021) TRP Channels in Brain Tumors. *Front Cell Dev Biol* 9:617801
11. Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S (2008) Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer* 8:350

12. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387–396
13. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524
14. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Rev* 57:427–450
15. Corteling RL, Li S, Giddings J, Westwick J, Poll C, Hall IP (2004) Expression of Transient Receptor Potential C6 and Related Transient Receptor Potential Family Members in Human Airway Smooth Muscle and Lung Tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:145–154
16. Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkentin JD (2012) A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev Cell* 23:705–715
17. Dhong K-R, Lee J-H, Yoon Y-R, Park H-J (2023) Identification of TRPC6 as a Novel Diagnostic Biomarker of PM-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease Using Machine Learning Models. *Genes* 14:284
18. Dietrich A, Gudermann T (2014) TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance. *Handb Exp Pharmacol* 222:157–188
19. Dietrich A (2019) Modulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels as Therapeutic Options in Lung Disease. *Pharmaceuticals* 12:23
20. Dryer SE, Reiser J (2010) TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol - Ren Physiol* 299:F689–F701
21. Eberle FC, Hanson JC, Killian JK, Wei L, Ylaya K, Hewitt SM, Jaffe ES, Emmert-Buck MR, Rodriguez-Canales J (2010) Immunoguided Laser Assisted Microdissection Techniques for DNA Methylation Analysis of Archival Tissue Specimens. *J Mol Diagn JMD* 12:394–401
22. Englisch CN, Röhricht D, Walz M, Junker K, Beckmann A, Meier C, Paulsen F, Jung M, Tschernig T (2022) TRPC6 Is Found in Distinct Compartments of the Human Kidney. *Int J Transl Med* 2:156–163
23. Estacion M, Li S, Sinkins WG, Gosling M, Bahra P, Poll C, Westwick J, Schilling WP (2004) Activation of Human TRPC6 Channels by Receptor Stimulation \*. *J Biol Chem* 279:22047–22056

24. Finney-Hayward TK, Popa MO, Bahra P, Li S, Poll CT, Gosling M, Nicholson AG, Russell REK, Kon OM, Jarai G, Westwick J, Barnes PJ, Donnelly LE (2010) Expression of Transient Receptor Potential C6 Channels in Human Lung Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:296–304
25. Firth AL, Remillard CV, Yuan JX-J (2007) TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1772:895–906
26. Hall G, Wang L, Spurney RF (2020) TRPC Channels in Proteinuric Kidney Diseases. *Cells* 9:44
27. Hao Q, Zhao K, Xie R, Wei J, Gu W, Fei Z (2020) Core Role of TRPC6 Channels in Regulating Airway Re-modelling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2020.01.16.908699
28. Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S, Weber J, Klee S, Jia J, Zwicklenpflug W, Flockerzi V, Storch U, Yildirim AÖ, Gudermann T, Königshoff M, Dietrich A (2017) Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1863:560–568
29. Jardin I, Diez-Bello R, Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Smani T, Rosado JA (2018) TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure. *Cancers* 10:331
30. Keck M, Hermann C, Lützel K, Gudermann T, Konrad DB, Mederos y Schnitzler M, Storch U (2024) Photoswitchable TRPC6 channel activators evoke distinct channel kinetics reflecting different gating behaviors. *iScience* 27:111008
31. Khan YS, Lynch DT (2022) *Histology, Lung*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534789/>
32. Koetsier G A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. 8
33. Kunichika N, Landsberg JW, Yu Y, Kunichika H, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX-J (2004) Bosentan Inhibits Transient Receptor Potential Channel Expression in Pulmonary Vascular Myocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1101–1107
34. Leidinger G, Flockerzi F, Hohnneck J, Bohle RM, Fieguth A, Tschernig T (2022) TRPC6 is altered in COVID-19 pneumonia. *Chem Biol Interact* 362:109982
35. Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, Bousquet SM, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, Boulay G (2006) Identification of Two Domains Involved in the Assembly of Transient Receptor Potential Canonical Channels \*. *J Biol Chem* 281:30356–30364

36. Lin J, Redies C (2012) Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol* 222:369–376
37. Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction. *Neuron* 40:551–561
38. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. 6. Auflage edition. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
39. Minke B, Parnas M (2006) Insights on TRP Channels from In Vivo Studies in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* 68:649–684
40. Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2005:re3
41. Mukhopadhyay D, Goel HL, Xiong C, Goel S, Kumar A, Li R, Zhu LJ, Clark JL, Brehm MA, Mercurio AM (2023) The calcium channel TRPC6 promotes chemotherapy-induced persistence by regulating integrin  $\alpha 6$  mRNA splicing. *Cell Rep* 42:113347
42. Nemec SF, Bankier AA, Eisenberg RL (2013) Upper Lobe–Predominant Diseases of the Lung. *Am J Roentgenol* 200:W222–W237
43. Pousada G, Balóira A, Valverde D (2015) Molecular and clinical analysis of TRPC6 and AGTR1 genes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* 10:1
44. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013) An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 3:71–85
45. Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 109:95–104
46. Rohacs T (2013) Regulation of Transient Receptor Potential channels by the phospholipase C pathway. *Adv Biol Regul* 53:341–355
47. Schaefer M, Urban N (2013) TRP-Kanäle: vielseitige zelluläre Sensoren und Effektoren. *BIOSpektrum* 19:143–145
48. Sommer N, Strielkov I, Pak O, Weissmann N (2015) Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Respir J* 47:288–303

49. Talbot BE, Vandorpe DH, Stotter BR, Alper SL, Schlondorff JS (2019) Transmembrane insertases and N-glycosylation critically determine synthesis, trafficking, and activity of the nonselective cation channel TRPC6. *J Biol Chem* 294:12655–12669
50. Tomashefski J, Farver C (2009) *Anatomy and Histology of the Lung*.
51. Tu J, Inthavong K, Ahmadi G (2013) *The Human Respiratory System*.
52. Uwagboe I, Adcock IM, Lo Bello F, Caramori G, Mumby S (2022) New drugs under development for COPD. *Minerva Med* 113:471–496
53. Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1742:21–36
54. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP Channels. *Annu Rev Biochem* 76:387–417
55. Villalta PC, Townsley MI (2013) Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability. *Pulm Circ* 3:802–815
56. Wang H, Cheng X, Tian J, Xiao Y, Tian T, Xu F, Hong X, Zhu MX (2020) TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacol Ther* 209:107497
57. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19093–19098
58. Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Mederos y Schnitzler M, Brandes RP, Grimminger F, Meissner M, Freichel M, Offermanns S, Veit F, Pak O, Krause K-H, Schermuly RT, Brewer AC, Schmidt HHHW, Seeger W, Shah AM, Gudermann T, Ghofrani HA, Dietrich A (2012) Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia–reperfusion induced oedema in mice. *Nat Commun* 3:649
59. Woudenberg-Vrenken TE, Bindels RJM, Hoenderop JGJ (2009) The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5:441–449
60. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX-J (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13861–13866

61. Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 9:636–645
62. All insights start with the sample: Your comprehensive guide for isolating top-quality RNA - QIAGEN. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=19988eb0-6df5-4d26-8435-33efe98197da&lang=en>
63. Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios (2012) Thermo Fisher T123– Technical Bulletin, Nanodrop Lite. URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
64. Agilent 2100 Bioanalyzer System 2100 Expert Software User's Guide.
65. EN QuantiTect Reverse Transcription Handbook PDF | PDF | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction | Reverse Transcriptase. URL: <https://www.scribd.com/document/330662367/EN-QuantiTect-Reverse-Transcription-Handbook-pdf>
66. Schmelzkurve - Labster Theory. URL: <https://theory.labster.com/melting-curve-de/>
67. [https://www.gu.se/sites/default/files/2020-05/ZEISS\\_LCM\\_Protocol\\_RNA\\_Frozen\\_0212.pdf](https://www.gu.se/sites/default/files/2020-05/ZEISS_LCM_Protocol_RNA_Frozen_0212.pdf).  
URL: [https://www.gu.se/sites/default/files/202005/ZEISS\\_LCM\\_Protocol\\_RNA\\_Frozen\\_0212.pdf](https://www.gu.se/sites/default/files/202005/ZEISS_LCM_Protocol_RNA_Frozen_0212.pdf)
68. [https://cfim.ku.dk/equipment/light-microscopes/palm/Zeiss\\_labprotocol\\_RNAhandling.pdf](https://cfim.ku.dk/equipment/light-microscopes/palm/Zeiss_labprotocol_RNAhandling.pdf). URL: [https://cfim.ku.dk/equipment/light-microscopes/palm/Zeiss\\_labprotocol\\_RNAhandling.pdf](https://cfim.ku.dk/equipment/light-microscopes/palm/Zeiss_labprotocol_RNAhandling.pdf)
69. von Ahlfen S, Schlumpberger M (2010) Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *Qiagen Gene Expression Newsletter* 15:7–8.



## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP- Kanäle.....	6
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des TRPC6- Kanals .....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines homo- und heterotetramerischen Ionenkanals .....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Regulation des TRPC6- Kanals .....	10
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Tracheobronchialbaums .....	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs .....	23
Abbildung 7: Vereinfachte, schematische Darstellung der mRNA- Isolation .....	26
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs der cDNA- Synthese.....	30
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Ablaufs der qPCR .....	35
Abbildung 10: Übersicht über den Arbeitsplatz am Kryostaten .....	38
Abbildung 11: Bronchiole in HE- Färbung.....	44
Abbildung 12: Alveolen sowie Blutgefäß umgeben von einer Bindegewebssepte in HE- Färbung .....	45
Abbildung 13: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe in HE-Färbung.....	46
Abbildung 14: Alveolen mit Typ I und II Pneumozyten in HE- Färbung .....	47
Abbildung 15: Gefäß und Alveolen in HE- Färbung .....	48
Abbildung 16: Alveolen in HE- Färbung.....	49
Abbildung 17: Elektropherogramme.....	53
Abbildung 18: Virtuelle Gelbanden .....	54
Abbildung 19: Veranschaulichung der C <sub>t</sub> - Werte für TRPC6, GAPDH und $\beta$ - Aktin .....	57
Abbildung 20: Veranschaulichung der C <sub>t</sub> - Werte für TRPC6 und GAPDH.....	60

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	16
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer .....	17
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Kits .....	17
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte und Instrumente .....	18
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Softwares .....	20
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 7: Informationen zu den Körperspendern .....	24
Tabelle 8: Komponenten der gDNA- Eliminationsreaktion .....	31
Tabelle 9: Komponenten des Master Mixes.....	31
Tabelle 10: Komponenten der Negativkontrolle.....	32
Tabelle 11: Verdünnungsreihen .....	33
Tabelle 12: Komponenten der gDNA- Eliminationsreaktion .....	34
Tabelle 13: Komponenten des qPCR- Ansatzes .....	37
Tabelle 14: Protokoll der HE- Färbung.....	42
Tabelle 15: Ergebnisse NanoDrop® Spektrophotometer.....	50
Tabelle 16: Ergebnisse NanoDrop® Spektrophotometer der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte.....	52
Tabelle 17 : Ergebnisse der Genexpressionsanalyse.....	56
Tabelle 18: C <sub>t</sub> – Werte nach Anzahl der Kryoschnitte und Lappenlokalisation .....	57
Tabelle 19: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Einzel- und Mehrfachkryoschnitte.....	59

## **10. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, für die Vergabe des spannenden Themas dieser Arbeit sowie für seine stets konstruktiven Ideen, seine Geduld und das Vertrauen in meine Fähigkeiten. Lieber Thomas, danke für alles.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch den Körperspenderinnen und Körperspendern. Ohne ihre selbstlose Entscheidung zur zweckgebundenen Körperspende wären diese Arbeit, die medizinische Forschung sowie die hochwertige Ausbildung von Medizinstudierenden in dieser Form nicht möglich.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Nicole Ludwig für ihre engagierte und kompetente Unterstützung beim molekularbiologischen Teil dieser Arbeit. Liebe Nicole, danke für deine Geduld, deine Erklärungen und deinen unermüdlichen Einsatz. Ohne dich wäre die erfolgreiche Durchführung der Molekularbiologie kaum denkbar gewesen.

Weiterhin danke ich Herrn Peter Seiler herzlich für seine anschaulichen Erklärungen und die Demonstration der Thorakotomie zur erfolgreichen Durchführung der Probenentnahme.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Irina Scheck und Herrn Ronny Dollwett für ihre tatkräftige organisatorische Unterstützung und ihre Hilfestellungen bei allen Fragen rund um die Probenentnahme.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Fischer danke ich herzlich für ihre Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der laserbasierten Mikrodissektion.

Mein Dank gilt auch Herrn Janis Hübschen für die Durchführung der Schnittfärbung.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie von Herzen. Meiner Mutter, meiner Schwester und meinem Bruder danke ich für ihre beständige Ermutigung und Begleitung auf meinem Weg. Meiner Mutter gilt mein besonderer Dank: Ihre Unterstützung hat mir das Studium der Humanmedizin überhaupt erst ermöglicht. Diese Arbeit ist ihr gewidmet.

## **11. Lebenslauf**

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

