

Aus dem Anatomischen Institut
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Immunhistochemischer Nachweis der nicht- selektiven Kationenkanäle TRPC5 und TRPM7 im Lungengewebe des Menschen

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

vorgelegt von Frederik Umlauf
geb. am 02.04.2000 in Düsseldorf

Tag der Promotion:	07.06.2024
Dekan:	Prof. Dr. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Tschernig
	Prof. Dr. Veit Flockerzi

Frederik Umlauf

Universität des Saarlandes

Institut für Anatomie

Kirrberger Straße 100, Geb. 61

66424 Homburg/Saar, Deutschland

E-Mail: frederik.umlaut@outlook.de

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis.....	V
2	Zusammenfassung.....	1
3	Abstract.....	2
4	Einleitung.....	3
4.1	Entdeckung der TRP-Kanäle.....	3
4.2	Überblick: TRP-Kanäle.....	4
4.3	Einteilung in Untergruppen und ihre Besonderheiten.....	5
4.3.1	TRPC.....	5
4.3.1.1	TRPC5.....	5
4.3.2	Direkte Nachweise von TRPC5 in der Lunge.....	8
4.3.3	TRPM.....	9
4.3.3.1	TRPM7.....	9
4.3.4	Direkter Nachweis von TRPM7 in der Lunge.....	11
4.3.5	TRPM7 und TRPC5 in Alveolarmakrophagen.....	12
4.4	Aufbau der Lunge.....	12
4.5	Fragestellung.....	16
5	Material und Methoden.....	17
5.1	Material und Geräte.....	18
5.2	Probenmaterial.....	21
5.2.1	Ethik.....	21
5.2.2	Körperspender.....	21
5.2.3	Fixierung der Körperspender.....	22
5.2.4	Probenentnahme.....	24
5.2.5	Probenverarbeitung.....	25
5.3	Färbungen.....	27
5.3.1	HE-Färbung.....	27
5.3.1.1	HE-Färbung: Durchführung.....	27
5.3.2	Immunhistochemische Färbung.....	31
5.3.2.1	Bindungsstellen der verwendeten Antikörper.....	33
5.3.2.2	IHC-Färbung: Protokoll.....	35
5.3.2.3	Teil 1.....	37
5.3.2.4	Teil 2.....	37
5.4	Aufnahme der Bilder und Auswertungsmethode.....	42
6	Ergebnisse.....	43
6.1	Nachweis von TRPC5 und TRPM7 in der Lunge.....	45

6.2	Vergleich der Strukturen der Lunge	54
7	Diskussion.....	56
7.1	Einordnung der Ergebnisse	56
7.1.1	Bezug auf aktuelle Forschung für TRPC5	56
7.1.2	Bezug auf aktuelle Forschung für TRPM7	57
7.2	Methodenkritik.....	58
7.2.1	Immunhistochemie.....	58
7.2.2	Spenderkollektiv	58
7.2.3	Entnahme und Verarbeitung der Proben	59
7.3	Zusammenfassung und Perspektive.....	59
8	Abbildungsverzeichnis	61
9	Tabellenverzeichnis.....	62
10	Literaturverzeichnis	63
11	Publikationen.....	74
12	Danksagung.....	75
13	Lebenslauf	76

1 Abkürzungsverzeichnis

Adenosintriphosphat	ATP
Alpha Kinase Domäne	α K
Amino-terminal	N-terminal
Ankyrin like repeat	ANK
Arteria	A.
Arteriae	Aa.
Barium	Ba
beziehungsweise	bzw.
Blei	Pb
Brustwirbelkörper	BWK
Cadmium	Cd
Calcium	Ca
Calmodulin	CaM
Calmodulin binding site	CaMB
Calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding domain	CIRB
Carboxy-terminal	C-terminal
Chronische Nierenkrankheit	CKD
circa	ca.
Coiled-coil-domain	CCD
Diaminobenzidintetrahydrochlorid	DAB
Diacylglycerol	DAG
destilliert	dest.
Drosophila melanogaster	D. melanogaster
Endoplasmatischen Retikulum	ER
englisch	engl.
fokale segmentale Glomerulosklerose	FSGS
Glandulae	Gll.
Hämatoxylin-Eosin	HE
Heat-induced epitope retrieval	HIER
Horseradish peroxidase	HRP
Immunhistochemie	IHC
Inositol 1,4,5-trisphosphate	IP ₃

Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	IP ₃ R
insbesondere	insb.
Kobalt	Co
Magnesium	Mg
Mangan	Mn
Melastatin homology regions	MHR
messenger RNA	mRNA
Natrium	Na
Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol	NEP
Nickel	Ni
normal goat serum	NGS
Phosphate buffered saline	PBS
PDZ-binding sequence	PDZB
Phospholipase C	PLC
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	PIP ₂
PSD-95/DLG-A/ZO-1	PDZ
Serin	Ser
Stickstoffmonoxid	NO
Store operated calcium	SOC
Store operated calcium entry	SOCE
stromal interaction molecule 1	STIM1
Strontium	Sr
Threonin	Thr
transient receptor potential box	TRPB
transient receptor potential channel ankyrin	TRPA
transient receptor potential channel canonical	TRPC
transient receptor potential channel melastatin	TRPM
transient receptor potential channel mukolipin	TRPML
transient receptor potential hannel polycystin	TRPP
transient receptor potential channel vanilloid	TRPV
transient receptor potential	TRP
Vena	V.
Venae	Vv.
Zentrales Nervensystem	ZNS
Zink	Zn
zum Beispiel	z. B.

2 Zusammenfassung

Hintergrund: Transient receptor potential (TRP) -Kanäle sind schon seit langer Zeit bekannt, allerdings wird ihre genaue Rolle als ungerichteter Kationenkanal immer noch erforscht. TRPC5 und TRPM7 sind Teil dieser Superfamilie. Diese beiden Kanäle haben ein großes funktionelles Spektrum, von der Regulation der Kationenkonzentrationen bis hin zur Temperaturwahrnehmung oder diversen Funktionen im zentralen Nervensystem. Es wurde schon in mehreren Publikationen gezeigt, dass TRPC5 und TRPM7 an der Genese von diversen Pathologien beteiligt sind, darunter Krebs, Hypertonie oder andere vaskuläre Erkrankungen. TRPC5 und TRPM7 wurden außerdem in vielen Organen und Gewebetypen nachgewiesen. Auch in der Lunge konnten TRPC5 und TRPM7 schon in einigen Zelllinien nachgewiesen werden. Jedoch wurde bis dato noch keine Übersicht darüber geschaffen, in welchen Teilen der Lunge diese Proteine vorkommen. Aus diesem Grund möchte ich in dieser Arbeit einen immunhistochemischen Nachweis von TRPC5 und TRPM7 in der menschlichen Lunge erbringen.

Methoden: Um TRPC5 und TRPM7 in der Lunge nachzuweisen, nutze ich eine immunhistochemische Färbung. Proben aus Lungen von Körperspendern wurden entnommen. Die immunhistochemische Färbung wurde mit Primärantikörpern durchgeführt, die sich gegen TRPC5 oder TRPM7 richteten. Sekundärantikörper mit horseradish peroxidase konnten so an diese binden. Zur Probe wurde dann Diaminobenzidintetrahydrochlorid als Chromogen gegeben. Zellen, an denen sich TRPC5 oder TRPM7 befanden, zeigten daraufhin ein Farbsignal. Unter einem Lichtmikroskop wurden diese Proben dann genauer analysiert.

Ergebnisse: Pleura, subpleurales Bindegewebe, Gefäße, Gewebe des Alveolarseptums, Pneumozyten vom Typ 1 und Typ 2 sowie Alveolarmakrophagen wiesen ein mäßig bis starkes Farbsignal für TRPC5 und TRPM7 auf.

Schlussfolgerung: Meine Experimente deuten darauf hin, dass TRPC5 und TRPM7 ubiquitär in der Lunge vorhanden sind. In mehreren Studien konnte bereits die Beteiligung von TRPC5 und TRPM7 in pathologischen Prozessen in der Lunge nachgewiesen werden. Die Zusammenfassung meiner Ergebnisse und jener vergangener Studien legt nahe, dass TRPC5 und TRPM7 möglicherweise eine wichtigere Rolle in der menschlichen Lunge spielen könnten als bisher angenommen.

3 Abstract

Background: Transient receptor potential (TRP) channels have been known for a long time, but their exact role as an undirected cation channel is still being investigated. TRPC5 and TRPM7 are part of this superfamily. These two channels have a wide functional spectrum that ranges from the regulation of cation concentrations to temperature perception as well as various functions in the central nervous system. It has already been shown in several publications that TRPC5 and TRPM7 are involved in the genesis of various pathologies. These include cancer, hypertension and other vascular diseases. TRPC5 and TRPM7 have also been detected in many organs and tissue types. TRPC5 and TRPM7 have also been detected in several cell lines in the lung. However, no overview of the parts of the lung in which these proteins occur has been given so far. For this reason, in this thesis, I would like to provide immunohistochemical evidence of TRPC5 and TRPM7 in the human lung.

Methods: I used immunohistochemical staining to detect TRPC5 and TRPM7 in the lungs. Samples were taken from lungs of body donors. The immunohistochemical staining was performed with primary antibodies directed against TRPC5 or TRPM7, which secondary antibodies in conjunction with horseradish peroxidase were able to bind to. Diaminobenzidine tetrahydrochloride was then added to the sample as a chromogen. As a result, cells on which TRPC5 or TRPM7 were present showed a color signal. Light microscopy was used for further analysis.

Results: Pleura, subpleural connective tissue, vessels, alveolar septum tissue, type 1 and type 2 pneumocytes, and alveolar macrophages showed a moderate to strong staining signal for TRPC5 and TRPM7.

Conclusion: My experiments indicate that TRPC5 and TRPM7 are ubiquitously present in the human lung. Previous studies show that TRPC5 and TRPM7 may be involved in the development of pathologies in the human lung. The combination of my results and previous research suggests that TRPC5 and TRPM7 in the human lung might be more important than previously assumed.

4 Einleitung

Die Ionenkanäle der TRP-Familie sind seit ihrer Entdeckung in den 1970er Jahren Gegenstand der Forschung. Obwohl schon viel über ihr Vorkommen, ihren Aufbau und ihre Funktion bekannt ist, stehen noch viele offene Fragen über die Kationenkanäle im Raum. Zwei Mitglieder der TRP-Familie sind TRPC5 und TRPM7, sie konnten bereits in unterschiedlichsten Organen nachgewiesen werden, in denen sie oft wichtige Funktionen wahrnehmen. Im Bezug auf das Vorkommen von TRPC5 und TRPM7 in der menschlichen Lunge sind noch nicht alle Aspekte geklärt.

Im folgenden Abschnitt möchte ich zunächst auf die historischen Aspekte der Entdeckung von TRP-Kanälen eingehen. Im weiteren Verlauf werde ich mich dann mit dem Aufbau und der Funktion von TRP-Kanälen befassen und auf die Untergruppen der TRP-Superfamilie und ihre Besonderheiten zu sprechen kommen. Dabei lege ich ein besonderes Augenmerk auf die Mitglieder TRPC5 und TRPM7. Ich möchte außerdem auf den makroskopischen und mikroskopischen Aufbau der Lunge eingehen. Zum Schluss will ich meine Forschungsfragen präsentieren, denen ich in dieser Arbeit nachgehen werde.

4.1 Entdeckung der TRP-Kanäle

Im Jahr 1969 veröffentlichten die Autoren Cosens und Manning eine Arbeit über ein abnormales Elektretinogramm, das sie während ihrer Arbeit mit einem Mutanten der Fruchtfliegenart *Drosophila melanogaster* erstellten. Die Mutanten fielen auf, weil sie in Umgebungslicht mit hoher Intensität erblindeten (Cosens and Manning 1969). Die im Elektretinogramm aufgezeichnete Aktivität der Photorezeptoren zeigt, dass die Reaktion der Mutanten auf den Lichtreiz schnell abflachte, während sie beim Wildtyp über eine längere Zeit aufrechterhalten blieb (Hardie 2011). Die Mutante wurde zunächst als Cosens Manning Mutation bezeichnet. Später konnte das beobachtete Phänomen auf ein mutiertes Gen in der Linie der *D. melanogaster* zurückgeführt werden, welches einen Kationenkanal kodiert, der besonders leitfähig für Ca^{2+} -Ionen ist (Minke 2010). Der Kationenkanal wurde später nach dem transienten Verlauf des initial erstellten ERGs benannt..

In den folgenden Jahren identifizierte man viele weitere Kanäle, die eine ähnliche Aminosäurenstruktur aufwiesen (Minke 2010). Sie reihten sich in die neu entstandene TRP-Superfamilie ein, die heute 28 Mitglieder zählt, von denen 27 auch beim Menschen exprimiert werden. Bezogen auf ihre strukturellen Ähnlichkeiten können die Mitglieder in sechs Subfamilien unterteilt werden. Hierzu zählen TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPA (ankyrin), TRPML (mukolipin) und TRPP (polycystin) (Ramsey, Delling, and Clapham 2006).

4.2 Überblick: TRP-Kanäle

TRP-Kanäle sind Transmembranproteine und Kationenkanäle, die generell besonders durchlässig für Ca^{2+} und Na^{+} -Ionen sind. Da die extrazelluläre Konzentration von Kationen höher als die intrazelluläre Konzentration ist, führt die Öffnung eines TRP-Kanals zum Einstrom der Kationen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle (Ramsey, Delling, and Clapham 2006). Der Einstrom von Kationen verändert die Membranspannung der Zellen, sodass erregbare Zellen (insb. Nervenzellen) erregt werden können. Aber auch in nicht erregbaren Zellen sind die eingeströmten Kationen in der Lage, weitere Signalkaskaden in Gang zu setzen, indem sie z. B. als Second Messenger fungieren (Ramsey, Delling, and Clapham 2006; H. Wang et al. 2020). TRP-Kanäle sind multimodal aktivierbar, das bedeutet, dass sie durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden können. Nach Ramsey et al. können diese Stimuli in drei Arten unterteilt werden (Ramsey, Delling, and Clapham 2006).

TRP-Rezeptoren können einerseits über G-Proteine und den daran gekoppelten Phospholipase C Signalweg aktiviert werden, andererseits kann die Aktivierung durch die Bindung eines exogenen oder endogenen Liganden vermittelt werden. Zwei Beispiele für derartige Liganden sind Purinnukleotide oder Ionen. Auch direkte Stimuli können als Öffnungsreiz für TRP-Kanäle fungieren. Hierzu zählen mechanische Reize, Temperaturänderungen, pH-Veränderungen oder Spannungsveränderungen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die genannten Öffnungsreize (Ramsey, Delling, and Clapham 2006). Ein prominentes Beispiel für die multimodale Aktivierbarkeit von TRP-Kanälen ist TRPV1. Dieser kommt unter anderem im Mundraum vor und wird durch hohe Temperaturen aktiviert. Der Rezeptor kann jedoch auch durch Capsaicin, einen Reizstoff, der z. B. in Chilis vorkommt, aktiviert werden. Bei Aktivierung wird in beiden Fällen, egal ob durch den Ligand Capsaicin oder durch die direkte Aktivierung (hohe Temperatur), das Gefühl von Hitze oder Schärfe vermittelt (F. Yang and Zheng 2017; Frias and Merighi 2016).

TRP-Kanäle sind Transmembranproteine, die weitestgehend in der Zellmembran zu finden sind. Die Transmembrandomäne besteht aus einem symmetrischen Tetramer, wovon sich jedes Monomer aus sechs hydrophilen α -Helices (S1-S6) zusammensetzt. Die TRP-Kanäle können Hetero- und Homomere bilden. Je nach Kombination können die Eigenschaften variieren (Ramsey, Delling, and Clapham 2006). Die Helices S5 und S6 bilden dabei die Porenregion. Diese Porenregion diktiert die Ionenselektivität des Kanals. S1-S4 dienen dem Rezeptor als Spannungssensoren (Diver et al. 2022). Die Amino (N)- und Carboxy (C)-terminalen Enden der Aminosäurekette ragen in das Zytosol der Zelle hinein (Venkatachalam and Montell 2007). Während sich die Transmembrandomänen der einzelnen TRP-Kanäle wenig unterscheiden, sind das N- und C-terminale Ende der Kanäle oft sehr verschieden. Die

Enden können je nach Kanal Enzymdomänen, Ligandenbindungsstellen oder andere Bausteine enthalten (Diver et al. 2022).

Öffnungsreize	Beispiele
rezeptorvermittelt	<ul style="list-style-type: none"> • G-Proteine • Tyrosinkinaseweg
ligandenaktiviert	<ul style="list-style-type: none"> • Kationen (Mg^{2+}, Ca^{2+}) • Exogen (Capsaicin) • Endogen (Anadamide)
direkt	<ul style="list-style-type: none"> • Spannungsaktiviert • Temperatur • Mechanisch (Druck, Zug, etc.) • pH-Wert

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Öffnungsreize (Nilius and Voets 2004; Ramsey, Delling, and Clapham 2006)

4.3 Einteilung in Untergruppen und ihre Besonderheiten

Wie bereits erwähnt, werden die TRP-Kanäle einer von sechs Gruppen zugeordnet. Dazu gehören TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPML und TRPP. Im Folgenden möchte ich besonders auf zwei dieser Untergruppen, TRPC und TRPM, genauer eingehen.

4.3.1 TRPC

TRPC1 ist der erste TRP-Kanal, der in Säugetieren nachgewiesen werden konnte. Außerdem teilen die Mitglieder dieser Familie eine 30-40%ige Übereinstimmung mit den TRP-Kanälen, die zuerst in *D. melanogaster* entdeckt wurden. Aus diesen Gründen erhielt die Subfamilie den Beinamen "canonical" (engl. canonical= anerkannt/vorschriftsmäßig) (Ramsey, Delling, and Clapham 2006; H. Wang et al. 2020). Derzeit besteht die TRPC Subfamilie aus sieben Mitgliedern, die in vier Gruppen aufgeteilt werden können: TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 und TRPC3/C6/C7. Von diesen sieben Mitgliedern werden allerdings nur sechs im Menschen exprimiert, TRPC2 ist im humanen Genom ein Pseudogen (Miller 2014; Löff et al. 2011). Die Zuordnung zur jeweiligen Gruppe beruht auf ihrer Aminosäuresequenz und funktionellen Ähnlichkeiten (H. Wang et al. 2020). Da ich mich im weiteren Verlauf meiner Arbeit besonders TRPC5 widmen werde, möchte ich diesen Rezeptor nun vorstellen.

4.3.1.1 TRPC5

Wie die anderen TRP-Kanäle ist auch TRPC5 ein Tetramer mit jeweils sechs Transmembrandomänen und einem C- und N-terminalen Ende (Zholos 2014). Am N-Terminus befinden sich vier ankyrin-like repeats, auf die eine sog. "coiled-coil-domain" (CCD) folgt (Zholos 2014; H. Wang et al. 2020). Weiter in C-terminaler Richtung folgt eine Bindungsstelle für Calmodulin (CaM), auch calmodulin binding site (CaMB) genannt. Dieser

Abschnitt befindet sich unmittelbar vor der ersten Transmembranhelix (S1). S5 und S6 bilden, wie bei allen anderen TRP-Kanälen auch, die Porenregion. Direkt neben S6 und am Anfang des C-terminalen Endes befindet sich die TRP-Box (González-Ramírez et al. 2017). Dies ist eine höchst konservative Region, welche aus einer bestimmten Aminosäureabfolge (EWKFAR) besteht (Venkatachalam and Montell 2007). Auf diese Region folgen zwei weitere CaMBs, wobei die erste auch als CaM and IP₃R-binding site (CIRB) bezeichnet wird, weil diese an einem IP₃-Rezeptor (IP₃R) bindet. Zwischen diesen beiden Stellen befindet sich erneut eine CCR (J. Tang et al. 2001; Zholos 2014). Am C-terminalen Ende von TRPC5 befindet sich dann schließlich eine PDZB. Diese Region ist besonders wichtig für die Interaktion mit Stützproteinen (Y. Tang et al. 2000). Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau von TRPC5.

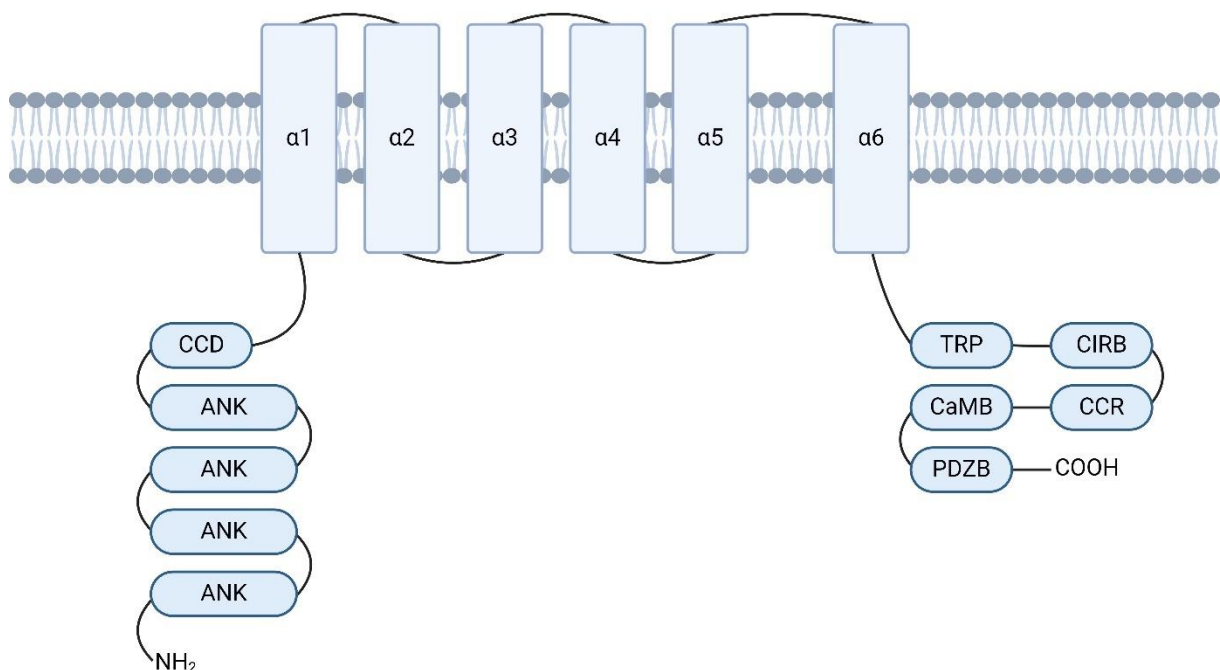


Abbildung 1: Schematische Darstellung von TRPC5 (1). „NH₂“ stellt das N-terminale Ende und „COOH“ das C-terminale Ende dar. CCD: coiled-coil-domain. ANK: ankyrin-like-repeat. α 1-6: Transmembrandomänen 1-6. TRP: TRP-Box. CIRB: calmodulin-and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding domain. CaMB: Calmodulin-binding-site. PDZB: PDZ-binding sequence. Modifiziert nach Zholos et al. und Tang et al. (Zholos 2014; J. Tang et al. 2001). Erstellt mithilfe von BioRender.com.

Wie ich bereits im vorangegangenen Teil erläutert habe, kann TRPC5 als Kationenkanal Kationen entlang ihres elektrochemischen Gradienten leiten. Im Besonderen zählen dazu Na⁺ und Ca²⁺ (Ramsey, Delling, and Clapham 2006; Zholos 2014). Um Ionen leiten zu können, müssen sich TRPC5-Kanäle jedoch zunächst öffnen. Neben der Möglichkeit einer spontanen

Öffnung will ich hier die wichtigsten Regulationsmechanismen für TRPC5 näher erläutern (Yamada et al. 2000). Ein Öffnungsreiz für TRPC5 kann besonders über den Gq/11-Proteine- und Tyrosinkinaseweg, der die nachgeschaltete PLC aktiviert, vermittelt werden. PLC spaltet PIP_2 in IP_3 und DAG. TRPC5 wird indirekt über das Spaltprodukt IP_3 aktiviert. IP_3 sorgt über den am endoplasmatischen Retikulum gelegenen IP_3 -R für einen Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol (Mikoshihba 2015). TRPC5 wird über eine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert (Zholos 2014). Dieser Mechanismus wird als receptor operated channel activation (ROC) bezeichnet (Tsunoda 1998; Zholos 2014).

Die Aktivierung von TRPC5 als sog. store operated channel (SOC) ist derzeit sehr umstritten (Zholos 2014). Dennoch möchte ich kurz den Mechanismus hinter dem store operated calcium entry (SOCE) erläutern und aufzeigen, welche Rolle TRPC5 dabei spielen könnte. SOCE wurde zunächst von Putney Jr. vorgeschlagen (Putney 1986). Die SOC sollen sich öffnen, wenn der intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher zur Neige geht, und somit den intrazellulären Speicher wieder füllen (Prakriya and Lewis 2015). Es gibt tatsächlich Hinweise darauf, dass TRPC5 durch STIM1 reguliert und somit als SOC genutzt wird (H. Wang et al. 2020). STIM1 sitzt hierbei in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und fungiert als Ca^{2+} -Sensor (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005).

PIP_2 konnte sowohl als Aktivator, als auch als Inhibitor von TRPC5 identifiziert werden (Trebak et al. 2009). CaM hat ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf TRPC5. Es bindet an der CaMB, die sich am C-Terminus befindet (M. X. Zhu 2005). TRPC5 kann über Dehnung der Membran und über Kälte ($25\text{-}37^\circ\text{C}$) direkt aktiviert werden (Gomis et al. 2008; Zimmermann et al. 2011). Außerdem möchte ich noch einige Liganden erwähnen, die TRPC5 aktivieren (Zholos 2014). Dazu gehören neben dem bereits erwähnten Ca^{2+} auch Protonen, Pb^{2+} und einige Lanthanoide (Semtner et al. 2007; Sukumar and Beech 2010; Jung et al. 2003). Auch reduziertes Thiothredoxin und Stickstoffmonoxid (NO) können TRPC5 aktivieren (S.-Z. Xu et al. 2008). Die Aktivierung durch NO ist dabei besonders wichtig in Gefäßzellen (Yoshida et al. 2006).

TRPC5 wurde bereits in mehreren Gewebearten nachgewiesen. Hier hat es teilweise wichtige Funktionen. Im folgenden Abschnitt möchte ich einen groben Überblick über das Vorkommen von TRPC5 und dessen Funktion geben. Gleichzeitig möchte ich auf die Pathophysiologien eingehen, die mit TRPC5 in Verbindung gebracht wurden.

TRPC5 findet man besonders häufig in Zellen des ZNS (Zholos 2014). Hier ist es mitunter am neuronalen Wachstum beteiligt (Kaczmarek, Riccio, and Clapham 2012). Zudem konnte TRPC5 im Gehirn außerdem mit Epilepsie in Verbindung gebracht werden (Tai et al. 2011). In sensorischen Nervenendungen und in Odontoblasten ist TRPC5 möglicherweise nicht nur an der Temperaturwahrnehmung, sondern auch an der Schmerzwahrnehmung beteiligt (Kashio

and Tominaga 2022; Bernal et al. 2021). Sadler et al. konnten in ihren Experimenten an Nagetieren nachweisen, dass die Aktivierung von TRPC5 die Schmerzwahrnehmung verstärkt (Sadler et al. 2021). TRPC5 kommt ebenfalls in Zellen des kardiovaskulären Systems vor (S.-L. Du et al. 2021). Hier könnte es eine Rolle bei Atherosklerose, Myokardischämie, Herzinsuffizienz, Hypertonie und Herzrhythmusstörungen spielen (S.-L. Du et al. 2021). Auch in der Niere konnte TRPC5 nachgewiesen werden. Bei der chronischen Nierenkrankheit (CKD) und fokal segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) könnte die Hemmung von TRPC5 sogar nierenprotektiv wirken, da sie Proteinurie vermindert und die Viabilität von Podozyten erhöht (Sharma and Hopkins 2019). TRPC5 könnte ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Resistenzen in Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika spielen. Ma et al. konnten nachweisen, dass die Regulation von TRPC5 in Krebszellen zu einer verminderten Expression von p-Glykoproteinen führt (Ma et al. 2014). Diese sind multidrug-resistance-transporter, die Chemotherapeutika aus der Zelle befördern können. TRPC5 stellt somit ein pharmakologisches Ziel für die Therapie von Chemotherapeutikaresistenz dar (Gaunt, Vasudev, and Beech 2016). Auch zur Angiogenese, die wichtig ist, um einen wachsenden Tumor mit Nährstoffen zu versorgen, konnte ein Beitrag von TRPC5 nachgewiesen werden (Antigny, Girardin, and Frieden 2012).

4.3.2 Direkte Nachweise von TRPC5 in der Lunge

TRPC5 konnte bereits in Lungen von Mäusen durch immunhistochemische Methoden nachgewiesen werden. Lembrechts et al. haben gezeigt, dass der Rezeptor in Neuroepithelkörperchen vorkommt und dort für die Mechanosensitivität wichtig ist (Lembrechts et al. 2012). Auch White et al. konnten in ihren Studien TRPC5-mRNA mittels RT-PCR und das Protein durch Western Blot in Kulturen von glatten Muskelzellen aus den menschlichen Atemwegen nachweisen (White et al. 2006). TRPC5 wurde ebenfalls in glatten Muskelzellen aus venösen und arteriellen Lungengefäßen von Ratten gefunden. In den entsprechenden Arbeiten wurde der Nachweis jedoch nur indirekt mittels RT-PCR erbracht (Peng et al. 2010; Lu et al. 2008). Auch in den glatten Muskelzellen der Atemwege von Meerschweinchen konnte die mRNA von TRPC5 nachgewiesen werden (Ong et al. 2003).

4.3.3 TRPM

Die TRPM-Subfamilie besteht aus acht Mitgliedern, die in vier Gruppen aufgeteilt werden. Die Mitglieder sind TRPM1/M3, TRPM2/M8, TRPM4/M5 und TRPM6/M7 (Jimenez et al. 2020). Die Gruppeneinteilung wurde anhand ihrer Ähnlichkeit in der CCD, ihrer C-Termini und ihrer Ionenleitfähigkeit getroffen (Mederos y Schnitzler et al. 2008). Der Name der Gruppe wurde aufgrund ihrer Struktur ausgewählt. Alle Mitglieder der TRPM-Subfamilie imponieren mit vier sog. melastatin-homology-regions (MHR), an ihren N-Termini (Jimenez et al. 2020). TRPM2, -6 und -7 sind einzigartig in der Gruppe der Kationenkanäle. Sie besitzen neben ihrer Ionenleitfähigkeit auch eine Kinasedomäne (Ramsey, Delling, and Clapham 2006). Deshalb werden sie im angloamerikanischen Sprachgebrauch auch als „Chanzyme“ bezeichnet (engl. channel = Kanal; enzyme = Enzym) (Rios et al. 2020). Mit dem zuletzt genannten Mitglied, TRPM7, möchte ich mich im folgenden Abschnitt nun näher befassen.

4.3.3.1 TRPM7

Wie die anderen Mitglieder der TRP-Superfamilie ist TRPM7 grundsätzlich als Tetramer mit jeweils sechs Transmembrandomänen aufgebaut. Die N- und C-terminalen Enden zeigen ins Zytosol der Zelle (Jimenez et al. 2020). Am C-Terminus von TRPM7 befinden sich die für die TRPM-Subfamilie charakteristischen MHR. Vor der ersten Transmembrandomäne liegt die sog. Prä-S1-Region (Jimenez et al. 2020). Auch in TRPM7 sind die Domänen S1-S4 die Spannungssensoren und S5-S6 bilden die Porenregion. Hinter dem C-Terminus befindet sich die hochkonservative TRP-Box und eine CCD (Venkatachalam and Montell 2007; Fleig and Chubnov 2014). Weiter in Richtung C-Terminus befindet sich eine serin- und threonin- reiche Domäne sowie die Kinasedomäne von TRPM7 (Jimenez et al. 2020). Der Enzymteil von TRPM7 kann durch Caspasen vom Ionenkanal abgespalten werden. Dieser Vorgang kann zusätzlich den Ionenkanal stimulieren und somit die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen (Desai et al. 2012). Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau von TRPM7.

Genauso wie die anderen TRP-Kanäle ist auch TRPM7 ein Kationenkanal (Ramsey, Delling, and Clapham 2006; Fleig and Chubnov 2014). Der Kanal ist besonders durchlässig für zweiwertige Kationen. Dazu gehören Zink (Zn^{2+}), Nickel (Ni^{2+}), Barium (Ba^{2+}), Kobalt (Co^{2+}), Mangan (Mn^{2+}), Strontium (Sr^{2+}), Kadmium (Cd^{2+}), Calcium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}) (Monteilh-Zoller et al. 2003). Die Kinasedomäne von TRPM7 kann Serin/Threonin-Reste von Proteinen phosphorylieren. Sie benötigt dafür Mg^{2+} als Cofaktor (Ryazanova et al. 2004). Die Kinase kann so unter anderem TRPM7 autophosphorylieren. Außerdem wurden myelin-basic-protein und Histonen als Substrate identifiziert (Ryazanova et al. 2004; Krapivinsky et al. 2014). Die Regulation von TRPM7 geschieht über verschiedene Prozesse. Dabei scheint die Regulation über die intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration einen hohen Stellenwert einzunehmen (Fleig and Chubnov 2014). Das freie, intrazelluläre Mg^{2+} hat hierbei einen inhibitorischen

Effekt auf TRPM7 (Nadler et al. 2001). Die Regulation durch ATP war zunächst umstritten (Fleig and Chubakov 2014). Runnels et al. stellten die Behauptung auf, dass reines ATP TRPM7 aktiviert (Runnels, Yue, and Clapham 2001). Nadler et al. hingegen zeigten, dass ATP, welches an Mg^{2+} gebunden ist, eher einen inhibitorischen Effekt ausübt (Nadler et al. 2001). Da ATP intrazellulär meist als Konjugat mit Mg^{2+} vorkommt, ist also von einer inhibitorischen Funktion auszugehen (Fleig and Chubakov 2014). Die inhibitorische Wirkung von Mg^{2+} und an ATP gebundenem Mg^{2+} wird dabei anscheinend durch die Bindung an separaten Stellen in der Struktur von TRPM7 vermittelt (Fleig and Chubakov 2014). Wie andere TRP-Kanäle wird auch TRPM7 durch an G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert (Fleig and Chubakov 2014). Oancea et al. zeigten, dass Scherkräfte an Membranen von glatten Gefäßmuskelzellen zum vermehrten Einbau von TRPM7 in die Zellmembran führen (Oancea, Wolfe, and Clapham 2006). Dieser Fund deutet auch auf eine mögliche Regulation durch mechanische Kräfte hin. Auch das Zellvolumen beeinflusst die Aktivität von TRPM7. Dabei ist jedoch noch nicht sicher, wie genau dieser Prozess funktioniert (Fleig and Chubakov 2014). Der extrazelluläre pH-Wert hat ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf TRPM7 (Fleig and Chubakov 2014).

Nachdem ich nun kurz die Funktion und einige regulatorische Mechanismen beschrieben habe, möchte ich jetzt zusammenfassen, in welchem Gewebe TRPM7 vorkommt und an welchen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der Rezeptor beteiligt ist. Es wird angenommen, dass TRPM7 ubiquitär exprimiert wird (Fleig and Chubakov 2014). In Mäusen konnte es besonders in interstitiellen Organen, im kardiovaskulären System, sowie in der Lunge, der Niere, dem Gehirn und den Hoden nachgewiesen werden (Kunert-Keil et al. 2006; Jang et al. 2012; Hu et al. 2021). Dabei befindet sich die höchste Konzentration von TRPM7 nicht in der Zellmembran, sondern in intrazellulären Vesikeln (Abiria et al. 2017). Wie bereits erwähnt, kann die Kinasedomäne proteolytisch abgespalten werden und in den Zellkern wandern. Dort ist sie in der Lage, mit Histonen zu interagieren (Krapivinsky et al. 2014). TRPM7 scheint eine große Rolle bei der Homöostase des Mg^{2+} -Haushalts in Zellen zu spielen (Fleig and Chubakov 2014). Auch an der Aufnahme von Mg^{2+} über den Darm ist TRPM7 beteiligt (Ryazanova et al. 2010). TRPM7 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Resorption von Mg^{2+} aus dem Harn in der Niere. Durch TRPM7 können Mg^{2+} -Ionen in die renalen Zellen gelangen. Der Resorptionsprozess findet hierbei vor allem im distalen Konvolut der Niere statt. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass sich hier viele TRPM7-Rezeptoren befinden (de Baaij 2023). Da TRPM7 auch am Prozess der Zellproliferation und -migration beteiligt ist, wird davon ausgegangen, dass TRPM7 mit der Genese von Krebs assoziiert sein könnte (Hardy et al. 2023; Ji et al. 2022). Abgesehen von der Pathogenese von neoplastischen Erkrankungen geht man in der Forschung davon aus, dass TRPM7 auch in die Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten wie arterieller Hypertonie, fibrotischen Umbauprozessen des Herzens oder Vorhofflimmern verwickelt ist (Q. Liu et al. 2023; J. Du et

al. 2010). So zeigt Rios et al. die antiinflammatorische und antifibrotische Rolle von TRPM7 im kardiovaskulären System auf (Rios et al. 2020). Außerdem wird TRPM7 in Kardiomyozyten benötigt, um die kardiale Autonomie und somit die Herztätigkeit zu gewährleisten (Sah et al. 2013). Des Weiteren konnte Sun et al. in ihren Experimenten zeigen, dass die Hemmung von TRPM7 im Rattenhypocampus für ein vermehrtes Überleben von Neuronen nach einer ischämischen Attacke sorgt (Sun et al. 2009).

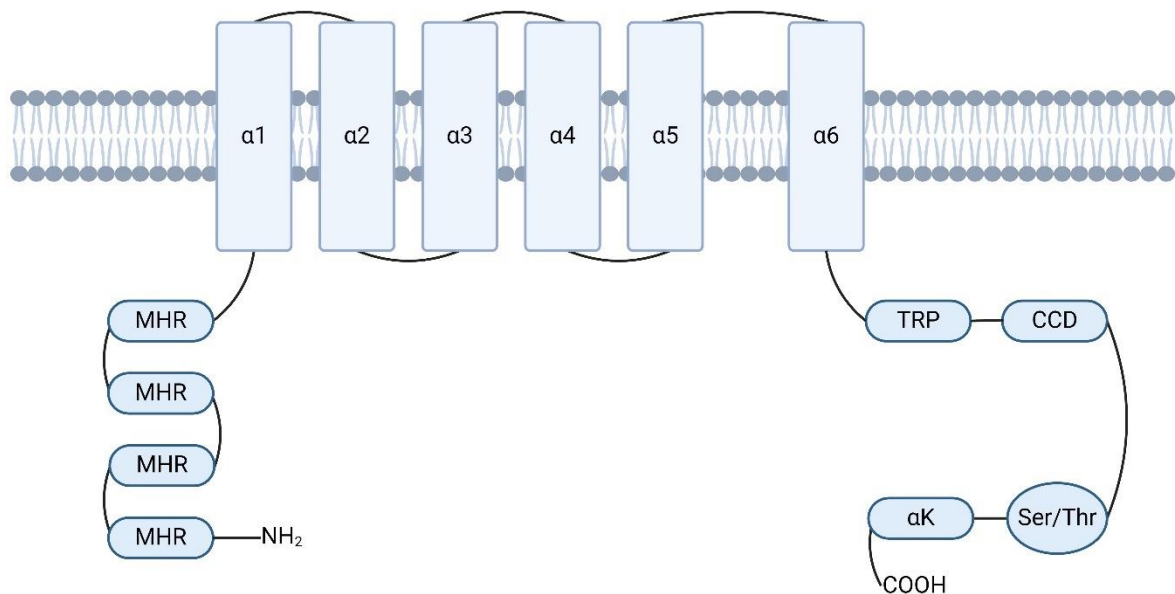


Abbildung 2: Schematische Darstellung von TRPM7 (1). „NH₂“ stellt das N-terminale Ende und „COOH“ das C-terminale Ende dar. CCD: coiled-coil-Domäne. MHR: melastatin homology region. α 1-6: Transmembrandomäne 1-6. TRP: TRP-Box. Ser/Thr: Serin Threonin-Domäne. αK: Kinase-Domäne. Modifiziert nach Jimenez et al. und Fleig and Chubakov (Jimenez et al. 2020; Fleig and Chubakov 2014). Erstellt mithilfe von BioRender.com.

4.3.4 Direkter Nachweis von TRPM7 in der Lunge

TRPM7 konnte in MRC5-Zellen nachgewiesen werden. Diese sind Fibroblasten aus einem humanen Embryo. Eine Hemmung des Kanals bewirkt in dieser Zelllinie die Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten (Yu et al. 2013). Auch in Kulturen von humanen Bronchialepithelzellen der 16-HBE-Linie gelang der Nachweis mithilfe des Western Blot Verfahrens (K. Liu et al. 2018). Li et al. konnten in ihrer Arbeit einen Nachweis von TRPM7 mittels Immunhistochemie und Western Blot in Alveolarmakrophagen aus Ratten erbringen (J. Li et al. 2018). In glatten Muskelzellen der Atemwege von Ratten konnte TRPM7 ebenfalls mittels Western Blot und Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Lin et al. 2016). Auch in

WI-38 Zellen, einer Linie von humanen Fibroblasten aus Lungengewebe konnte TRPC5 durch Western Blot nachgewiesen werden (Wei et al. 2009). Außerdem zeigten Yang et al., dass TRPM7 und dessen mRNA in Pulmonalarterien von Ratten exprimiert werden. Hier wurde der Nachweis mittels Immunhistochemie und RT-PCR erbracht (C.-W. Yang et al. 2018).

4.3.5 TRPM7 und TRPC5 in Alveolarmakrophagen

TRPM7 konnten bereits in den Alveolarmakrophagen von Ratten nachgewiesen werden (J. Li et al. 2018). TRPC5 wurde bisher noch nicht in Alveolarmakrophagen nachgewiesen. Jedoch wurde TRPC5 bereits in anderen Makrophagentypen untersucht. Tao et al. zeigte, dass TRPC5 wahrscheinlich die Polarisation von Makrophagen der Raw 264.7 Linie in einen proinflammatorischen Phänotyp fördert (Tao et al. 2020). Die Arbeitsgruppe um Pereira et al. liefert weitere Hinweise auf die Funktion von TRPC5 in Makrophagen. Ihre Publikation zeigte eine mögliche protektive Rolle von TRPC4/TRPC5-Komplexen auf Makrophagen bei Sepsis (Pereira et al. 2018).

4.4 Aufbau der Lunge

Nachdem ich im vorangegangenen Abschnitt die theoretischen Grundlagen zu den Kanälen TRPM7 und TRPC5 erläutert habe, möchte ich mich nun mit der Lunge befassen. Zunächst werde ich mich mit der makroskopischen Anatomie beschäftigen. Später werde ich ein besonderes Augenmerk auf die mikroskopische Anatomie legen. Das Verständnis der mikroskopischen Anatomie bildet die Basis für die spätere Auswertung meiner Versuche. Weitere Informationen zu diesem Thema können den Abbildungen 3 und 4 entnommen werden.

Die Lunge besteht aus dem linken und rechten Lungenflügel. Während sich der linke Lungenflügel aus einem oberen und einem unteren Lungenlappen zusammensetzt, findet sich im rechten Lungenflügel ein weiterer Mittellappen. Die oberen und unteren Lungenlappen sind durch die Fissura horizontalis voneinander getrennt. In der rechten Lunge grenzt diese den Oberlappen vom Mittellappen ab. Der Mittellappen wird vom Unterlappen durch die Fissura obliqua begrenzt. Zum Thorax hin ist die Lunge mit der Pleura visceralis überzogen. Diese besteht aus einem einschichtigen Epithel, dem Mesothel und einer bindegewebigen Subserosa mit Anteilen von elastischen Fasern (Aumüller et al. 2010). Die Pleura sorgt für eine atemmechanische Kopplung mit dem Thorax. Dadurch weitet sich die Lunge immer dann, wenn sich der Thorax weitet. Die elastische Rückstellkraft der Lunge sorgt beim Entspannen der Atemmuskulatur für ein Zusammenziehen der Lunge. Dieser „Blasebalgmechanismus“ stellt den Grundstein der Atemmechanik dar (Aumüller et al. 2010). Auf der medialen Seite befindet sich der Lungenhilus. An dieser Stelle schlägt die Pleura visceralis in die Pleura parietalis um, die die Lungenhöhle von innen auskleidet. Außerdem treten hier das Bronchialsystem, die Lungenarterien und die Lungenvenen aus der Lunge aus bzw. in die

Lunge ein. Das Bronchialsystem entspringt der Trachea. Diese teilt sich etwa auf Höhe des 4. Brustwirbelkörpers (BWK) in die zwei Hauptbronchien auf. Die Hauptbronchien teilen sich mehrere Male dichotom, erst in Lappenbronchien, dann in Segmentbronchien, danach Subsegmentbronchien und schließlich in die Bronchioli terminalis und Bronchioli respiratorii auf. Zum Schluss enden sie in den Sacculi alveolares (Aumüller et al. 2010).

Funktionell lassen sich in der Lunge ein luftleitendes Bronchialsystem und ein gasaustauschendes Alveolarsystem unterscheiden. Histologisch lassen sich die Bronchien in drei Schichten unterteilen. Die Lamina epithelialis kleidet die Bronchien von innen aus. Sie besteht aus respiratorischem Flimmerepithel, Becherzellen und neuroendokrinen Zellen. Darunter befindet sich die Lamina propria, die aus Fibroblasten, Immunzellen, elastischen Fasern, Blutgefäßen und den Gll. bronchiales besteht (Aumüller et al. 2010). Zusammen bilden Laminae epithelialis und propria die Tunica mucosa. Die Tunica fibromusculocartilaginea umgibt die Tunica mucosa. Sie besteht aus der glatten Muskulatur der Tunica fibromuscularis und den Knorpelspangen aus hyalinem Knorpel und elastischen Fasern. Außen befindet sich die Tunica adventitia. Diese enthält Blutgefäße und Nervenbahnen, welche von Bindegewebe umgeben sind (Aumüller et al. 2010). Die Bronchioli weisen grundsätzlich einen ähnlichen Aufbau auf, allerdings lassen sich die Schichten untereinander schlechter abgrenzen, je weiter distal sich diese im Bronchialbaum befinden. Im distalen Abschnitt sind weder Drüsen noch Knorpel zu finden. In den Bronchioli terminalis sind dann keine Becherzellen mehr vorhanden, stattdessen lassen sich Keulenzellen im Epithel nachweisen. Die Bronchioli respiratorii ähneln in ihrem Aufbau den Bronchioli terminalis. Sie enden in den Sacculi respiratorii, welche sich aus gasaustauschenden Alveolen zusammensetzen. In den Wänden der Bronchioli respiratorii sind an manchen Stellen ebenfalls Alveolen zu finden. Die dünne Wand der Alveolen grenzt nach außen an ein Geflecht aus Kapillaren. In den Alveolen sind drei Zelltypen besonders präsent. Die Typ-I-Pneumozyten bilden als flache Epithelzellen den Großteil der Alveolaroberfläche. Sie bilden zusammen mit dem Kapillarendothel und der gemeinsamen Basallamina die Blut-Luft-Schranke. Diese ist sehr dünn (ca. 0,6 µm) und erlaubt somit den Austausch von Gasen zwischen Luft und Blut (Lüllmann-Rauch and Asan 2019). Pneumozyten vom Typ II hingegen imponieren als kubische, vakuolenhaltige Zellen. Eine wichtige Aufgabe der Typ-II-Pneumozyten ist es, das sogenannte Surfactant zu produzieren. Diese Substanz wird auch als Antiatelektasiefaktor bezeichnet. Er setzt die Oberflächenspannung des in der Alveole enthaltenen Wassers herab und verhindert so, dass die Alveolen kollabieren und nicht mehr belüftet werden können (Aumüller et al. 2010). Alveolarmakrophagen sind ebenfalls auf der Innenseite der Alveole zu finden. Sie entstammen entwicklungsbiologisch nicht der Lunge. Dennoch besitzen sie die Fähigkeit, sich in der Lunge zu teilen und sich somit zu vermehren. Sie sind wesentlich an der immunologischen Abwehr der Lunge beteiligt. Unter anderem können sie Pathogene und Fremdkörper phagozytieren (Lüllmann-Rauch and Asan 2019;

Aumüller et al. 2010). Zwischen den Alveolen liegt das interalveoläre Bindegewebe. Dieses besteht aus Fibroblasten, Kollagen und elastischen Fasern. Hier können auch Lymphgefäße gefunden werden.

Die Blutversorgung der Lunge lässt sich in die Bronchialgefäße und die Lungengefäße unterteilen. Bronchialarterien versorgen das Lungengewebe mit Sauerstoff. Sie entspringen entweder aus der Aorta thoracica oder den Aa. intercostales posteriores und werden dann als Rr. bronchiales bezeichnet. Sie verlaufen entlang des peribronchialen Bindegewebes. Der Abfluss des sauerstoffarmen Blutes führt in die V. azygos und V. hemiazygos. Aus dem Truncus pulmonalis entspringen die Lungenarterien, die zusammen mit den Bronchien zu den Alveolen ziehen. Von hier fließt das oxygenierte Blut über die in dem interlobulären Bindegewebe gelegenen Lungenvenen in die Vv. pulmonales in den linken Vorhof des Herzens (Aumüller et al. 2010).

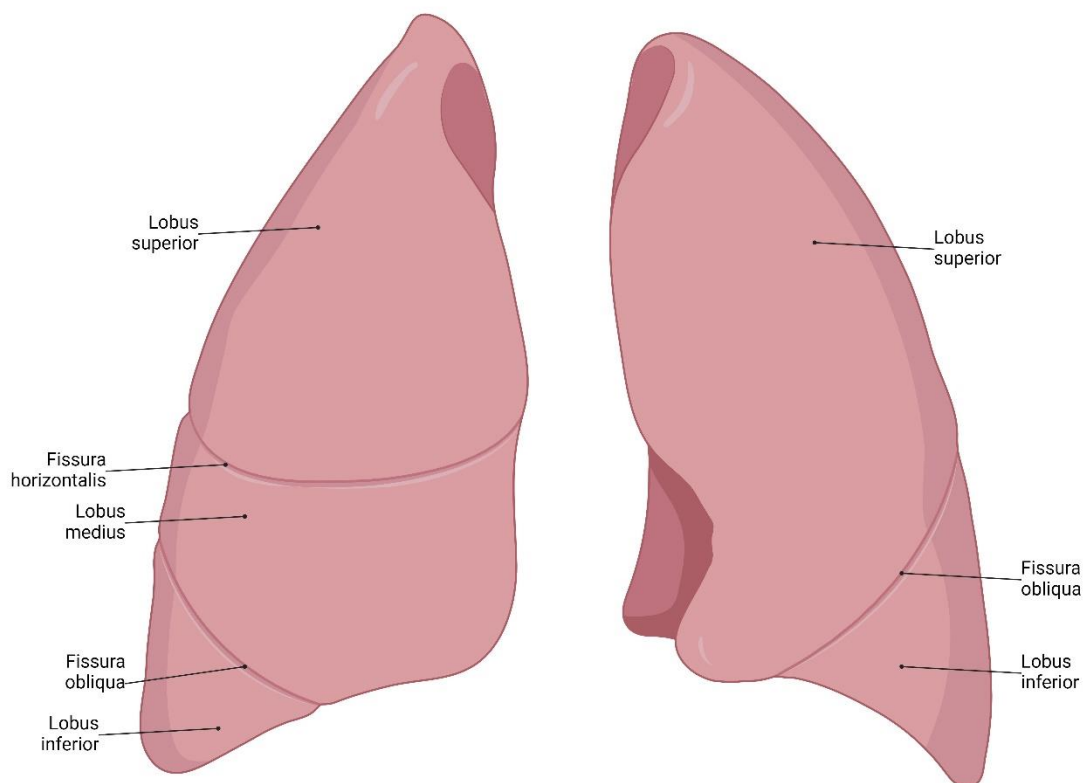


Abbildung 3: Lungenflügel. Erstellt mithilfe von BioRender.com.

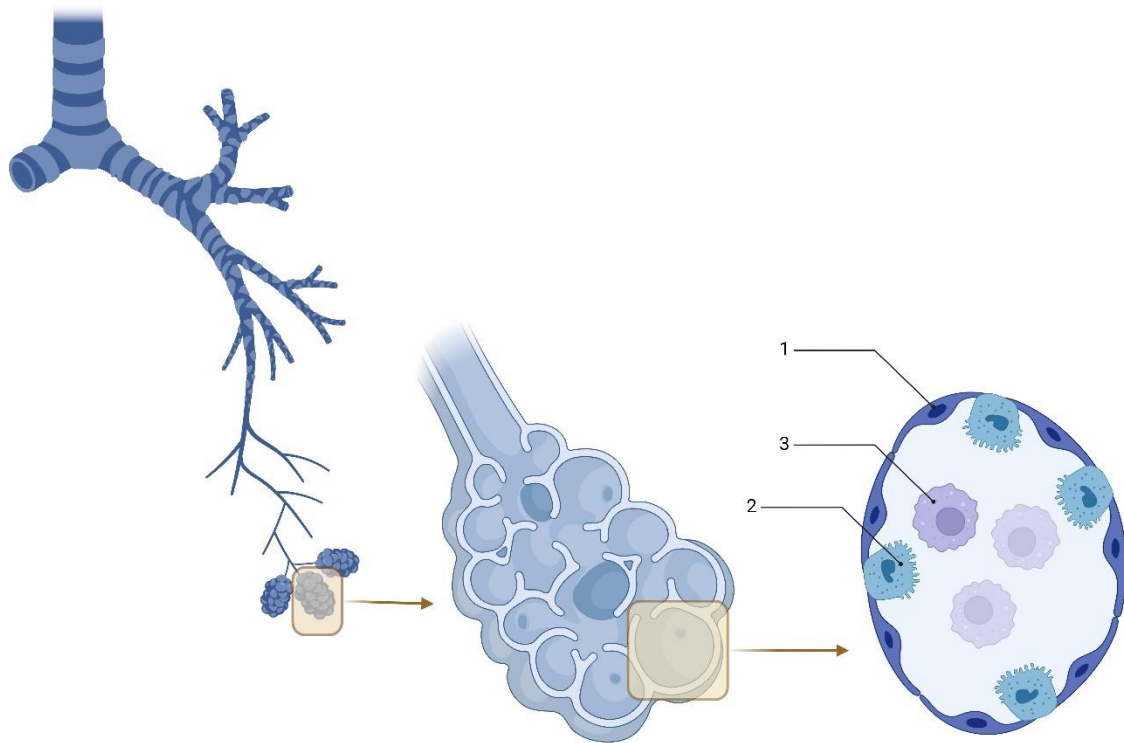


Abbildung 4: Endabschnitt des Bronchialbaums. Schematische Darstellung des Bronchialbaums, eines Sacculus alveolaris und einer Alveole im Querschnitt. 1 = Pneumozyt Typ II, 2 = Pneumozyt Typ II, 3 = Alveolarmakrophage. Erstellt mithilfe von BioRender.com.

4.5 Fragestellung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Stand der Forschung zu TRPC5 und TRPM7 bezüglich ihres Vorkommens lückenhaft ist. TRPC5 und TRPM7 konnten zwar in einigen Zelllinien der Lunge nachgewiesen werden, allerdings hat bisher keine Forschungsgruppe einen Überblick über das Vorkommen von TRPC5 und TRPM7 in der menschlichen Lunge geschaffen. Des Weiteren wurden für viele Arbeiten Zellkulturen oder nicht humane Zellen verwendet, obwohl TRPC5 und TRPM7 vielfältige Funktionen in der Physiologie der Lunge einnehmen. Um das Vorkommen von TRPC5 und TRPM7 in der Lunge weiter zu ergründen, möchte ich für meine Arbeit folgende Forschungsfragen formulieren und beantworten:

- I. Lässt sich TRPC5 und TRPM7 durch eine immunhistologische Färbung in der menschlichen Lunge nachweisen?
- II. In welchen histologischen Strukturen der Lunge werden TRPC5- und TRPM7-Proteine exprimiert?
- III. Kann TRPC5 in humanen Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden?

5 Material und Methoden

Um die Forschungsfragen zu beantworten, die ich in der Einleitung erarbeitet habe, habe ich Proben aus den Lungen von Körperspendern entnommen und diese immunhistochemisch gefärbt. So konnte ich diese später mikroskopisch betrachten und auswerten. Im Rahmen dieser Experimente habe ich verschiedene Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Lösungen und Antikörper verwendet. In diesem Abschnitt möchte ich deshalb eine Übersicht über die von mir verwendete Material geben. Im Folgenden möchte ich dann auf die ethischen Rahmenbedingungen sowie den Prozess der Probenentnahme, der Aufbereitung, der Färbung und der Auswertung eingehen.

5.1 Material und Geräte

Geräte	Hersteller
Kühlanlage für Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Karussell Gewebeeinbeter MTP	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin Ausgießstation MPS/P1	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlplatte MPS/C	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin-Dispenser	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2025	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
GFL Paraffinbad 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
VWR Heizplatte W10 für Histologie-Objektträger	Kunz Instruments, Sandelsgatan, Schweden
digitaler VWR INCU-Line IL 56 Inkubator	VWR International, Pennsylvania, USA
Wärme-/Trockenschrank VT6025	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Labor-Abzugshaube Captair®Flex® M321	Erlab®group, Val-de-Reuil Cedex, Frankreich
UHP Einkanalpipette 20 – 200µl 100 – 1000µl	VWR International, Pennsylvania, USA
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vortexer-Vortex Mixer	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Nikon ECLIPSE E200 LED Fotomikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan

Tabelle 2: Übersicht der genutzten Geräte.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
sterile Skalpellklingen Nr.22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Discofix® Drei-Wege-Hahn	Ref.: 4095111, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bovivet Einmalkanülen 14G 2,1x60mm	Kruuse, Langeskov, Dänemark
ACU-Punch®Biopsie-Stanze 8/10mm	Acuderm inc., Fort Lauderdale, USA
Einbettkassetten Macro, weiß	Ref.: M512, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
PROLENE 1,0 Nahtmaterial	Ethicon US LLC, Cincinnati, USA
Einbettringe	Ref.: M460, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
ROTI®Plast Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen Surgipath® DB80 LX	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R.Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Filterpapiere	Ref.: 534018, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
histologischer Kleber ROTI-Histokitt®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 22x22 mm / 24x50 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAKOPen Fettstift	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 20 – 200 µl 100 – 1000 µl	VWR International, Pennsylvania, USA
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR®Tubes 15 ml Zentrifugenröhrchen 50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht der genutzten Verbrauchsmaterialien.

Lösungen, Chemikalien und Antikörper	Hersteller
Formalinlösung nach Basler	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
ROTI®Fair 10x PBS 7.4	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
2-Propanol 97%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Methylbenzoat 99%	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
Xylol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin 0,1%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
100x Citratpuffer pH 6.0	Abcam (ab93678)
NGS-Blockierlösung	Merck KGaA, Deutschland
Kaninchenserum	Ref.: A10547; Life Technologies AG, Carlsbad, USA
Wasserstoffperoxid 35%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ImmPACT® DAB EqV	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Bestellnummer: SK-4103)
Primärantikörper: Anti-TRPC5 Antibody	Ref.: ACC-020; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Primärantikörper: Anti-TRPM7 Antibody	Ref.: ACC-047; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärantikörper: F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP	Ref.: A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA

Tabelle 4: Übersicht der genutzten Lösungen und Chemikalien.

5.2 Probenmaterial

Das Probenmaterial für meine Experimente wurde aus den Lungen von Körperspendern des Instituts für Anatomie der Universität des Saarlandes entnommen. Damit die Proben untersucht werden können, müssen sie mehrere Arbeitsschritte durchlaufen. Dazu gehören nach der Entnahme die Fixierung, die Einbettung, das Schneiden und schließlich die Färbung der Probe. Im folgenden Kapitel möchte ich genauer auf den Prozess der Probenentnahme eingehen. Zunächst möchte ich jedoch kurz auf die ethischen Belange Bezug nehmen und auf die Körperspender an sich zu sprechen kommen.

5.2.1 Ethik

Da für meine Experimente menschliches Gewebe als Probenmaterial verwendet wurde, war es notwendig, die Erlaubnis der zuständigen Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes einzuholen. Unter der Zustimmungsnummer 163/20 erlaubte diese die Untersuchung von Ionenkanälen in Geweben von Körperspendern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie.

5.2.2 Körperspender

Die Forschung an menschlichen Körpern stellt einen wichtigen Grundstein der modernen, evidenzbasierten Medizin dar. Auch für angehende Mediziner ist der Kursus der Anatomie, dessen Höhepunkt die Präparation von Körperspendern darstellt, unverzichtbar. Gerade deshalb ist es sehr wichtig, dass es Menschen gibt, die ihre sterblichen Überreste der Forschung und Lehre spenden. Bei der Arbeit mit Körperspendern kann man schnell vergessen, dass hinter jeder Identifikationsnummer eine Person, ein Schicksal und Angehörige stehen. Aus diesem Grund möchte ich die folgenden Zeilen nutzen, um den Weg zu beschreiben, den diese Personen genommen haben, um Körperspender zu werden.

Voraussetzung für die Körperspende ist zunächst die freiwillige Entscheidung zur Spende, entsprechend des Rechts auf Selbstbestimmung. Gleichzeitig müssen die Körperspender zum Zeitpunkt der Vereinbarung erwachsen sein. Der Wohnort der Spender sollte sich im Einzugsbereich des Anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes befinden und die Finanzierung der Körperspender sollte gesichert sein (Beerdigungskosten, etc.). Wenn jemand an einer Körperspende interessiert ist, kann sich dieser potenzielle Spender zunächst im Rahmen einer Besichtigung das Anatomische Institut anschauen. Bei diesem Besichtigungstermin werden die Einzelheiten zur Körperspende geklärt. Nachdem die Voraussetzungen zur Körperspende erfüllt wurden und die Person der Spende zugestimmt hat, wird der Körperspender nach seinem Ableben und einer unauffälligen amtlichen Leichenschau in das Anatomische Institut überstellt. Der Körperspender kann seine Bereitschaft zur Spende jederzeit widerrufen.

5.2.3 Fixierung der Körperspender

Um den natürlichen Verwesungsprozess des Körperspenders zu stoppen, muss dieser zunächst fixiert werden. Alle Körperspender, von denen die verwendeten Proben stammen, wurden nicht wie herkömmlich mit Formalin, sondern mit NEP fixiert. Diese Fixierungsmethode ist im Vergleich günstiger, umweltfreundlicher und stellt ein geringeres gesundheitliches Risiko für das Personal dar, welches mit den Körperspendern arbeitet (Janczyk et al. 2011). Die Verwendung der NEP-Fixierung verbessert ebenfalls die Farberhaltung der Körperspender (Thiel 1992). Auch die Qualität der immunhistologischen Präparate kann durch die NEP-Fixierung verbessert werden, da die Proteine im Gewebe in geringerem Maße denaturieren (Klopfleisch et al. 2013). Die Vorgehensweise der Fixierung möchte ich im folgenden Abschnitt genauer erklären.

Nach dem Versterben wird der Körperspender in das Anatomische Institut gebracht und entkleidet. Nachdem der Körperspender einer zweiten Leichenschau unterzogen wurde, kann dieser für die Fixierung vorbereitet werden. Zunächst wird das Gewicht des Körperspenders dokumentiert und alle von außen sichtbaren Gegenstände, wie z. B. Schmuck oder andere körperfremde Materialien, die sich beim Tod des Körperspenders im oder am Körper befunden haben, entfernt. Wertgegenstände werden später an die Hinterbliebenen zurückgegeben. Der Körperspender wird dann rasiert und mit einer Journalnummer markiert. Die Journalnummer ermöglicht die Identifikation und dient ebenfalls zur Anonymisierung des Körperspenders. Nach der Vorbereitung kann nun die Fixierung beginnen. Dazu wird als erstes mit einem Skalpell ein Hautschnitt am rechten Bein, im Trigonum femoris, gesetzt. Dann wird die A. femoralis dargestellt. Eine weitere Inzision der A. femoralis in Laufrichtung ermöglicht dann das Einführen von zwei Kanülen. Über die Kanülen wird nun die NEP-Lösung in den Körper gepumpt. Da einige kleinere Gefäße durch Blutgerinnsel okkludieren, erreicht die NEP-Lösung jedoch nicht alle Bereiche des Körperspenders. Die Regio glutealis, Regio nuchae und die Finger- und Zehenbeeren müssen mit einer Kanüle punktiert werden, um die NEP-Lösung zu injizieren. Nach der inneren Fixierung folgt die äußere Fixierung. Hierzu wird der Körperspender für mehrere Tage bis Wochen in ein Bad aus NEP- und Formalin-Lösung gelegt. Nach diesem Zeitraum ist die Fixierung abgeschlossen und der Körperspender kann für Lehr- und Forschungszwecke verwendet werden (Aumüller et al. 2010). In Tabelle 5 habe ich die Identifikationsnummer der Spender, von denen ich die Proben entnommen habe, ihr Alter, ihr Geschlecht und die Todesursache aufgelistet.

Identifikationsnummer	Alter	Geschlecht	Todesursache
23/17	83	M	metastasiertes Prostatakarzinom
23/18	92	M	Pneumonie
23/20	81	W	obere gastrointestinale Blutung
23/22	81	M	Multiorganversagen
23/25	79	W	Herzinsuffizienz
23/26	72	M	Multiorganversagen

Tabelle 5: Übersicht über die Spenderdaten.

5.2.4 Probenentnahme

Die Probenentnahme fand, wie zuvor erwähnt, an sechs durch NEP fixierten Körperspendern statt. Die Körperspender wurden vor der Probenentnahme für einen chirurgischen Lehrkurs verwendet. Um die Proben aus der Lunge zu entnehmen, musste zunächst ein Zugangsweg in den Thorax geschaffen werden. Nach einem Hautschnitt entlang der Linea mediana anterior wurde das Sternum dargestellt. Danach erfolgte eine mediane Sternotomie mithilfe einer Handsäge. Kaudal des Sternums wurden Haut, subkutanes Fettgewebe und Pleura parietalis eröffnet. Durch die Verwendung eines chirurgischen Spreizhakens war es nun möglich, den Thorax zu öffnen und Proben der Lunge zu entnehmen. Von den Körperspendern wurden jeweils vier Lungenproben mit einer Größe von ca. 1cm³ entnommen. Nach manueller Mobilisierung der Lunge wurde der Probenblock mithilfe einer Pinzette und einem Skalpell aus der Lunge gewonnen. Hierbei versuchte ich den Gewebeschaden, in Form von Zerreißungen und Quetschungen, den der Probenblock bei der Entnahme erleidet, so gering wie möglich zu halten. Bei allen Körperspendern entnahm ich aus denselben Bereichen periphere und zentrale Proben. Jeweils eine aus dem apikalen Teil des rechten und linken Lungenoberlappens und eine aus dem rechten Lungenunterlappen. Diese Proben entsprachen den peripheren Anteilen der Lunge. Proben aus zentralen Anteilen der Lunge wurden aus dem hilusnahen Bereich der Lunge entnommen. Zusätzlich entnahm ich eine Probe aus dem Herzmuskelgewebe eines Körperspenders, die später als Kontrolle für die IHC-Färbung genutzt wurde. Nach der Probenentnahme wurde der Thorax wieder verschlossen und vernäht. Die Proben wurden in Kassetten verstaut und zur späteren Identifikation beschriftet. Die Kassetten lagerten dann über Nacht bei 4°C in einer 3,5 - 3,7%-igen Formalinlösung. In Tabelle 6 sind die Entnahmeorte sowie die absolute Anzahl der entnommenen Proben aufgelistet.

Entnahmeort	Seite	Anzahl der Proben
Lungenoberlappen, Segmentum apicale	Rechts	6
Lungenoberlappen, Segmentum apicale	Links	6
Lungenunterlappen, Segmentum basale laterale	Rechts	6
hilusnaher Bereich	Rechts	6
Herzmuskel	Links	1

Tabelle 6: Übersicht über die entnommenen Proben.

5.2.5 Probenverarbeitung

Nach der Probenentnahme begann die Verarbeitung. Die Probenkassetten wurden aus dem Formalinbad in eine PBS-Lösung übertragen. Hier verblieben sie für 24 Stunden. Nach dem PBS-Bad wurden die Proben für ca. drei Stunden mit fließendem Leitungswasser gespült. Diesem Arbeitsschritt folgte eine weitere dreistündige Einlagerung in einer 70%igen Propan-2-ol Lösung. Darauf folgte die Einbettung der Proben in Paraffin. Dieser Schritt war notwendig, um später aus den Präparaten histologische Schnitte anfertigen zu können. Da Paraffin jedoch nicht wasserlöslich ist, mussten die Präparate zunächst entwässert werden (Aumüller et al. 2010).

Zur Entwässerung wurde der automatische Karussellgewebereinbettter genutzt. Die Probenkassetten wurden der Reihenfolge nach für 180 Minuten in 70% Propan-2-ol, 90 Minuten in 80% Propan-2-ol, 90 Minuten in 90% Propan-2-ol und 180 Minuten in 100% Propan-2-ol getaucht. Anschließend wurden die Probenkassetten für 270 Minuten mit 100% Methylbenzoat behandelt. Darauf folgte ein 240-minütiges Paraffinbad. Der Prozess lief mithilfe des Karussellgewebereinbettters automatisch und somit zeitlich präzise ab. Nach Abschluss der Einbettung in der aufsteigenden Alkoholreihe mussten die Proben zügig mittels Paraffin zu einem Block gegossen werden. Hierzu benötigt man einen Paraffindispenser, der das Paraffin auf über 57°C erhitzen und somit verflüssigen kann. Die Probenkassetten wurden erneut aus dem Gewebereinbettter, zur Überführung, in ein Bad aus flüssigem Paraffin gegeben. Nacheinander konnten die Proben mit einer Pinzette aus den Probenkassetten in eine Ausgussform gesetzt werden. In diese Formen konnten nach und nach kleine Mengen flüssiges Paraffin gegeben werden. Eine Kühlplatte sorgte dafür, dass diese stufenweise aushärteten. Um den Paraffinblock später für den Schneideprozess fixieren zu können, wurde gegen Ende der Prozedur ein Einbettring eingesetzt. Auf diesem Ring wurde zur späteren Identifikation die Identifikationsnummer der jeweiligen Probe festgehalten. Damit sich das Paraffin vollständig verfestigt, musste der fertige Probenblock für einen weiteren Zeitraum auf der Kälteplatte belassen werden. Falls nötig, wurde während des Aushärtungsprozesses noch Paraffin hinzugegeben, sodass beim fertigen Paraffinblock die gesamte Probe bedeckt war. Darauf folgte die Anfertigung des Paraffinschnitts. Den Prozess der Einbettung habe ich in Tab. 7 zusammengefasst dargestellt.

Lösung	Dauer in Minuten
70% Propan-2-ol	180
80% Propan-2-ol	90
90% Propan-2-ol	90
100% Propan-2-ol	180
100% Methylbenzoat	270
Paraffin	240

Tabelle 7: Übersicht über die Gewebeeinbettung.

Vor Anfertigung der Paraffinschnitte empfiehlt es sich, die fertigen Probenblöcke in einem Kühlschrank zu lagern. Die Kühlung sorgt für weniger Komplikationen beim Schneiden, da die gekühlten Blöcke nicht so leicht splintern. Um die Schnitte herzustellen, nutzte ich ein Mikrotom. Der Paraffinblock wurde am Einbettring in das Mikrotom eingespannt. Hierbei war darauf zu achten, dass der Block gerade in die Halterung gesetzt wurde. Nach der Einstellung des Mikrotoms unter Sicht einer Standlupe konnte der Schneidvorgang beginnen. Der Probenblock musste jedoch zunächst mithilfe einiger Schnitte vom überschüssigen Paraffin befreit werden. Nach diesen Einstellschnitten erfolgte das Herstellen verwendbarer Schnitte. Die Dicke der Schnitte war hierbei besonders wichtig für die spätere Auswertung. Dünne Schnitte bieten eine gute Bildqualität bei der Mikroskopie, jedoch sollte ein Schnitt nicht zu dünn werden, da dies sonst die Weiterverarbeitung erschwert. Für meine Farbserien habe ich mich für eine Dicke von 6 µm entschieden. Wenn die Qualität eines Paraffinschnitts gut genug war, konnte dieser mithilfe eines Pinsels vorsichtig von der Mikrotomklinge abgetragen werden. Die Qualität wurde dann von mir als ausreichend bewertet, wenn das Gewebe intakt war und der Schnitt nicht gesplittert erschien. Der Schnitt wurde danach in ein warmes Wasserbad gelegt. Dort blieb er für wenige Minuten, wodurch die durch den Schnitt entstandenen Falten geglättet wurden. Aus dem Wasserbad wurde der Paraffinschnitt dann auf einen Objektträger übertragen. Bei der Platzierung der Probe auf den Objektträger ist darauf zu achten, dass sie am Ende mittig liegt. Auch sollte genug Abstand zum Rand des Objektträgers gehalten werden, da sonst ein späteres Umranden der Probe mit dem Fettstift erschwert wäre. Eine Wärmeplatte wurde nun genutzt, um überschüssiges Wasser vom Objektträger verdunsten zu lassen. Im letzten Schritt wurden die Objektträger für 12 bis 48 Stunden in einem Inkubator gelagert. Die Lagerzeit wurde für alle Proben ähnlich gehalten. Nach diesem Schritt ist der Paraffinschnitt am Objektträger befestigt. Für die Schnitte, die von mir mit HE gefärbt wurden, konnte ich herkömmliche Objektträger verwenden. Für die IHC-Färbung musste ich jedoch hitzebeständige Objektträger benutzen.

5.3 Färbungen

Um histologische Proben unter dem Mikroskop auswerten zu können, müssen diese zunächst angefärbt werden. Hierbei gibt es die unterschiedlichsten Färbeverfahren, die verschiedene Strukturen des zu untersuchenden Gewebes anfärben können. Für mein Experiment nutzte ich die Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsfärbung, um die Qualität der Präparate zu beurteilen, bevor ich die immunhistochemische Färbung durchführte. Diese Spezialfärbung nutzte ich, um TRPC5 und TRPM7 im Gewebe nachzuweisen. Die HE-Färbung ist eine einfache und kostengünstige Methode und deshalb besonders für die Qualitätskontrolle geeignet. Die IHC-Färbung ist aufgrund der verwendeten Antikörper kostspieliger und ihre Durchführung unterscheidet sich von der HE-Färbung. Auf diese beiden Färbungsmethoden und ihre Besonderheiten werde ich im folgenden Teil näher eingehen.

5.3.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung mit Hämatoxylin und Eosin ist schon seit langer Zeit als Standardfärbung in Forschung und Diagnostik etabliert. Das Prinzip der HE-Färbung beruht auf einer elektrostatischen Interaktion zwischen Farbstoff und anzufärbender Struktur. Man unterscheidet dementsprechend kationische Farbstoffe von anionischen Farbstoffen. Kationische Farbstoffe binden an negativ geladene Strukturen (z. B. DNA). Dementsprechend sind sie zur Anfärbung von Zellkernen geeignet. Hämatoxylin gehört zu den kationischen Farbstoffen (Lüllmann-Rauch and Asan 2019). Anionische Farbstoffe binden an positiv geladene Komponenten der Zelle, dazu gehören Mitochondrien, verschiedene Proteine oder Granula im Zytosol der Zelle. Eosin wirkt als anionischer Farbstoff. Ein HE-gefärbtes Präparat weist unter dem Mikroskop einen bläulich gefärbten Zellkern auf. Komponenten wie das Zellplasma, Kollagenfasern oder elastische Fasern sind je nach Struktur unterschiedlich stark rot gefärbt (Lüllmann-Rauch and Asan 2019). In meinem Experiment wurde diese Methode primär dazu verwendet, die Qualität der Proben zu beurteilen, bevor ich die IHC-Färbung durchführte (Feldman and Wolfe 2014; Chan 2014). Der größte Vorteil der HE-Färbung ist die einfache und kostengünstige Durchführung.

5.3.1.1 HE-Färbung: Durchführung

Als erstes müssen die Schnitte der Proben entparaffiniert werden. Hierzu wurden die Proben jeweils dreimal für fünf Minuten in Xylol gebadet. Nachdem der Schnitt nicht mehr in Paraffin eingebettet war, wurde die Probe rehydriert. Die Rehydrierung diente dazu, dass das wasserlösliche Hämatoxylin und Eosin an ihren Zielstrukturen binden konnten (Aumüller et al. 2010). Um eine gewebeschonende Rehydrierung der Schnitte zu ermöglichen, nutzte ich eine absteigende Alkoholreihe (Lang 2006). In meinem Experiment wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten in 100% Propan-2-ol und dann für jeweils fünf Minuten in 90% Propan-2-ol und 80% Propan-2-ol belassen. Nach der Rehydrierung konnte dann die eigentliche Färbung

beginnen. Hierfür wurden die Schnittpräparate für acht Minuten in ein Hämatoxylinbad gegeben. Anschließend wurden die Proben für ein paar Sekunden in destilliertem Wasser gespült, um einen Niederschlag des Hämatoxylins zu verhindern (Lang 2006). Das anschließende „Bläuen“ unter laufendem Leitungswasser für 12 Minuten sorgte dann für eine Erhöhung des pH-Werts und damit für die charakteristische Blaufärbung von Hämatoxylin (Lang 2006). Nach einer weiteren Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte nun in eine Eosinlösung getaucht und dort für 2 ½ Minuten belassen. Die Eosinlösung wurde zuvor mithilfe von Eisessig auf einen pH-Wert von 4-6 eingestellt. Diese Ansäuerung beendet das Bläuen, da dieser Prozess besonders im alkalischen Milieu stattfindet. Dies ist besonders wichtig, um eine gute Kontrastbildung zu erreichen (Lang 2006). Bei der Eosinfärbung handelt es sich um eine regressive Farbmethode. Das bedeutet, dass Eosin zunächst im Überfluss zugeführt wird. Um eine adäquate Differenzierung der Farbnuancen in der Probe zu erreichen, muss das Präparat daher zunächst in 90%iges Ethanol getaucht werden. Dadurch wird das überschüssige Eosin entfernt (Lang 2006). Später wurden die Proben zweimal für jeweils fünf Minuten in 100% Ethanol entwässert und dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol geklärt. Zum Schluss wurde das Präparat eingedeckt und zur Aushärtung bei Raumtemperatur über Nacht abgestellt. Nachdem das Präparat ausgehärtet war, konnte es mikroskopiert werden.

Da die HE-Färbung zu den histologischen Standardfärbungen gehört und die Färbung schon seit langer Zeit in der Wissenschaft Verwendung findet, sind die Protokolle zur Durchführung dieser Färbung sehr gut etabliert. In Tabelle 8 ist eine Kurzfassung des verwendeten Protokolls unseres Instituts dargestellt. Abbildung 5 zeigt als Beispiel das Ergebnis einer HE-Färbung der Lunge.

Entparaaffinieren		
<i>Arbeitsschritte</i>	<i>Verwendete Chemikalien</i>	<i>Dauer in Minuten</i>
Eintauchen	Xylol	5
Eintauchen	Xylol	5
Eintauchen	Xylol	5
Rehydrieren		
Eintauchen	100% Propan-2-ol	5
Eintauchen	100% Propan-2-ol	5
Eintauchen	90% Propan-2-ol	5
Eintauchen	80% Propan-2-ol	5
Färben		
Eintauchen	Hämatoxylin	8
Spülen	destilliertes Wasser	-
Bläuen	fließendes Leitungswasser	12
Spülen	destilliertes Wasser	0,5
Eintauchen	0,1% Eosin, Eisessig	2,5
Entwässern		
Eintunken	90% Propan-2-ol	-
Eintauchen	100% Propan-2-ol	5
Eintauchen	100% Propan-2-ol	5
Klären		
Eintauchen	Xylol	5
Eintauchen	Xylol	5
Eintauchen	Xylol	5
Eindecken		

Tabelle 8: Protokoll HE-Färbung.

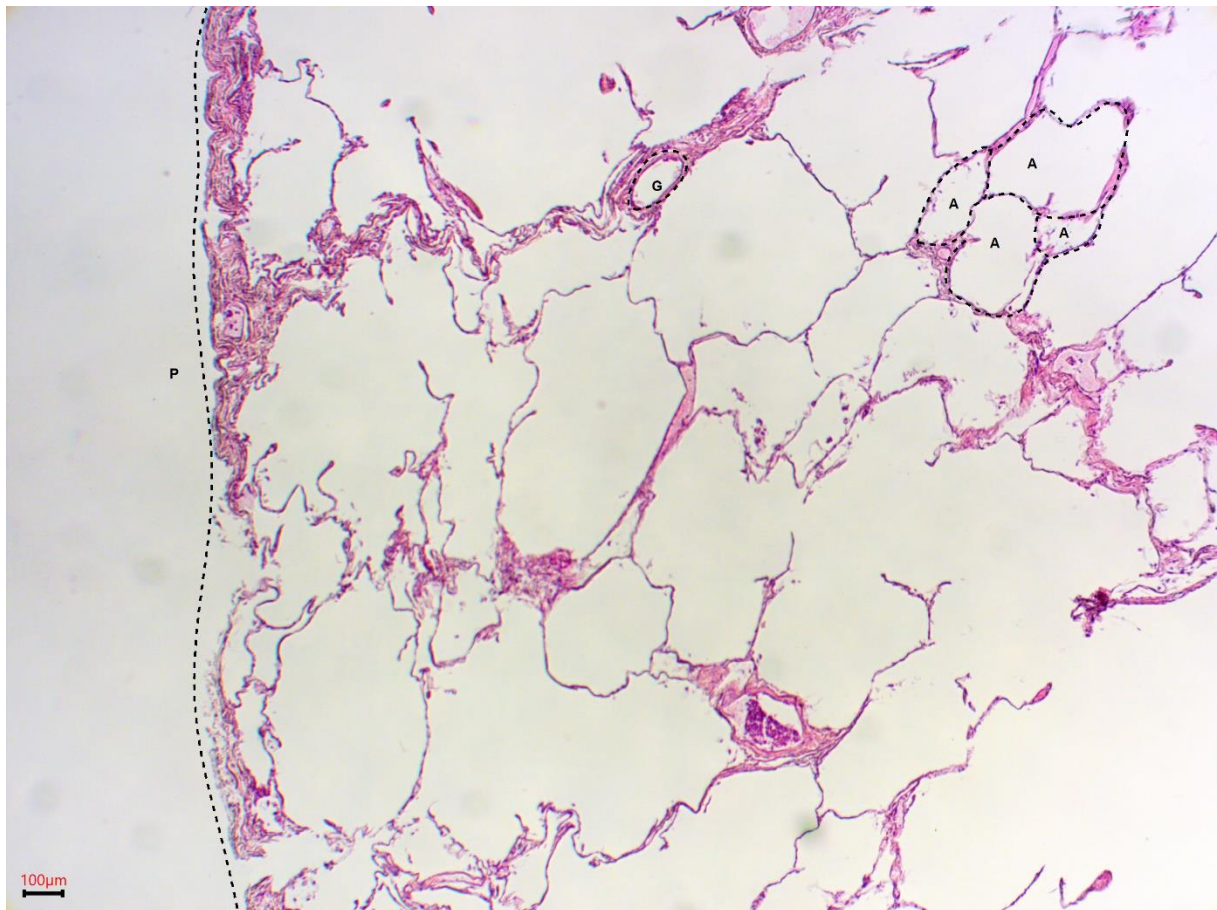


Abbildung 5: HE-Färbung der Lunge. A = Alveole, G = Pulmonales Blutgefäß, P = Pleura. 5-fache Vergrößerung.

5.3.2 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbungen werden eingesetzt, um spezifische Stoffe wie Proteine im histologischen Präparat anzufärben. Das Prinzip der IHC-Färbung stellt eine elegante und derzeit unentbehrliche Methode in der Diagnostik und Forschung dar (Magaki et al. 2019). Es beruht auf der Verwendung von Antikörpern, die an ein spezifisches Antigen binden können. Die Antikörper binden an das Antigen im Schlüssel-Schloss-Prinzip (Lang 2006). Antikörper werden entweder hergestellt, indem ein Versuchstier gegen den gewünschten Stoff immunisiert wird oder mithilfe von Zellkulturen und Bioreaktoren (Jyothilekshmi and Jayaprakash 2021). Für die Verwendung von Antikörpern zur Färbung von Präparaten gibt es unterschiedliche Methoden. Bei der direkten Färbung bindet ein Antikörper mit Fluoreszenzmarkierung direkt an die Zielstruktur und der Schnitt kann so direkt untersucht werden. Die indirekte Färbung nutzt neben dem Primärantikörper einen Sekundärantikörper. In meinem Experiment habe ich die indirekte Farbmethode verwendet. Der von mir verwendete Sekundärantikörper trägt an seinem Fc-Teil das Enzym HRP (horseradish peroxidase). HRP kann das Chromogen DAB mit H_2O_2 umsetzen. Hierbei entsteht eine bräunliche Färbung im Präparat an jeder Stelle, an der das Antigen vorhanden ist. Da meine Primärantikörper gegen TRPC5 und TRPM7 gerichtet sind, kann ich diese im Präparat nachweisen. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung dieses Prozesses.

Um sicherzustellen, dass bei der immunhistochemischen Färbung keine Fehler auftreten, wird in jeder Farbserie eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgefärbt. Die Positivkontrolle sollte ein Gewebe sein, dass das Zielantigen sicher enthält. Wenn die Positivkontrolle nicht positiv ausfällt, gab es ein Problem bei der Färbung. Bei der Negativkontrolle wird ein Schnitt aus dem Gewebe verwendet, von dem das Antigen nachgewiesen werden soll. Die Negativkontrolle wird genauso wie die regulären Proben verarbeitet. Nur der Primärantikörper wird bei der Färbung weggelassen. Stattdessen wird Kaninchenserum auf die Probe gegeben. Am Ende der Färbung war die IHC erfolgreich, wenn die Negativkontrolle kein Farbsignal aufwies. Falls doch ein Farbsignal identifiziert werden kann, muss man davon ausgehen, dass es zu einem Fehler (Pipettierfehler, unzureichende Peroxidase-Inaktivierung, etc.) bei der Färbung gekommen ist. Im schlimmsten Fall ist der Sekundärantikörper unspezifisch und bindet nicht nur an den Primärantikörper. Um dies zu verhindern, sollte man Antikörper verwenden, die bereits sowohl von der vertreibenden Firma als auch durch unabhängige Forschungsgruppen hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität validiert wurden. Im Folgenden möchte ich nun näher auf die Bindungsstellen der verwendeten Antikörper und auf das Farbprotokoll eingehen.

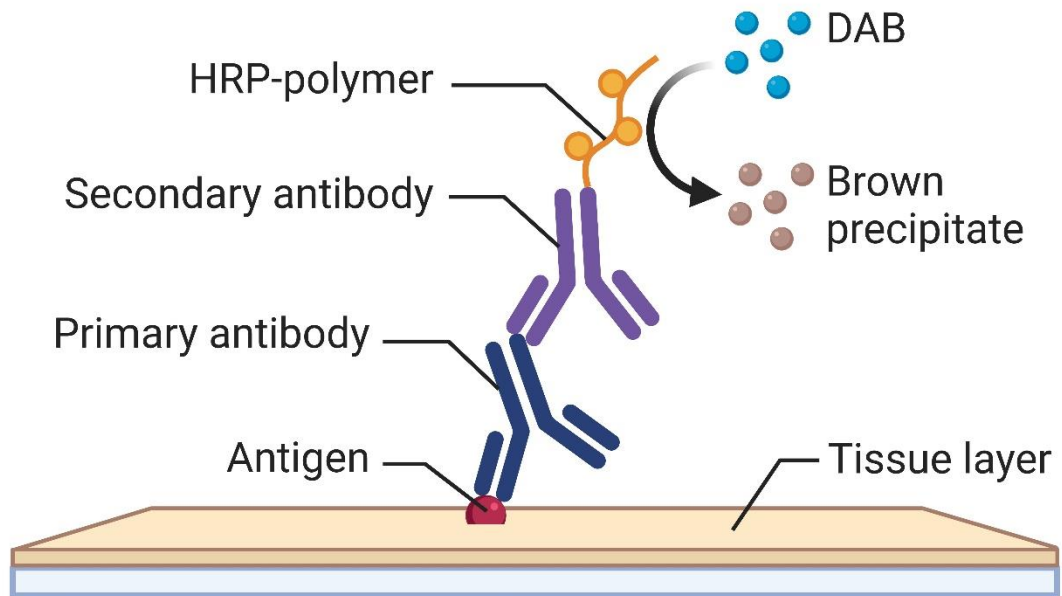


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise der sekundären Immunhistochemie. Der Primärantikörper (primary antibody) dockt an das Antigen (Antigen) an. An den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet das Sekundärantikörper (secondary antibody) horseradish peroxidase (HRP-polymer) Konjugat. Die HRP ist in der Lage Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) zu polymerisieren und somit eine Braunfärbung der Struktur des Präparats zu erreichen, an dem das Antigen vorhanden ist. Erstellt mithilfe von BioRender.com.

5.3.2.1 Bindungsstellen der verwendeten Antikörper

Die Antikörper, die ich in meinen Experimenten verwendet habe, binden an bestimmten Stellen des Proteins. Diese Stellen können sich je nach Antikörper unterscheiden. Der Antikörper gegen TRPC5 bindet laut Herstellerangaben an der 959-973 Aminosäure des humanen TRPC5 Proteins. Dieser Teil befindet sich am C-Terminus des Proteins. In Abbildung 7 ist die Bindestelle markiert (Alomone Labs 2023a).

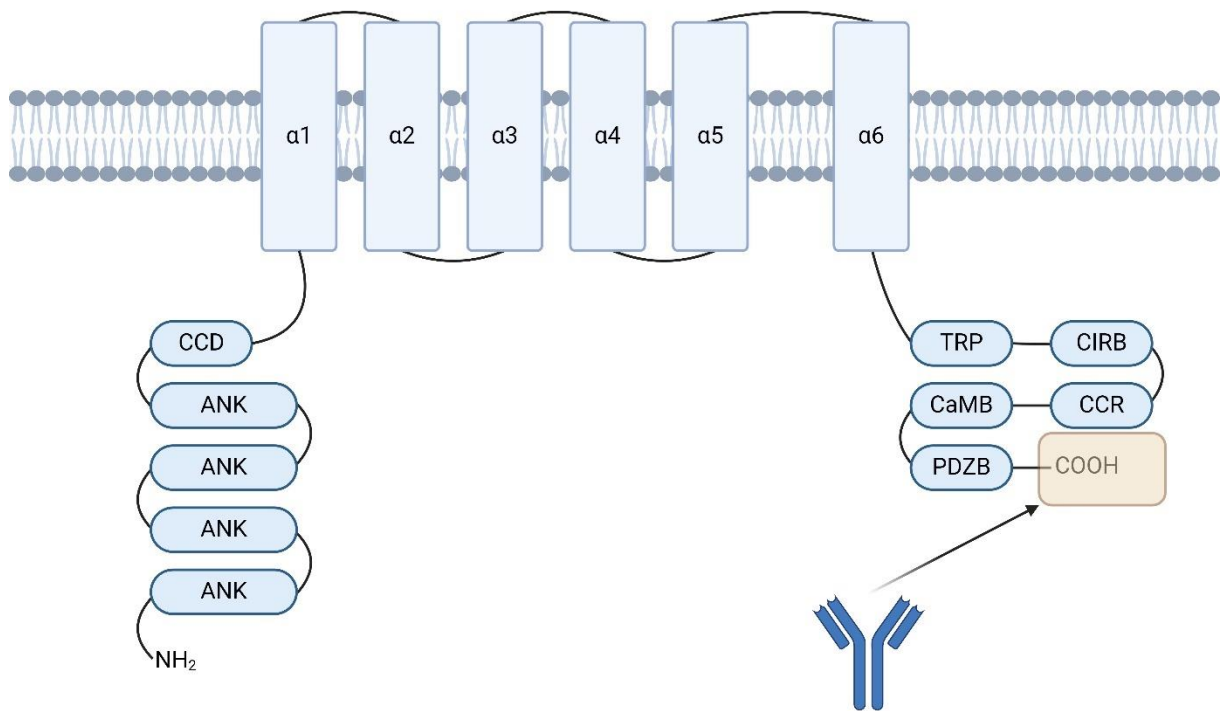


Abbildung 7: Schematische Darstellung von TRPC5 (2). „NH₂“ stellt das N-terminale Ende und „COOH“ das C-terminale Ende dar. CCD: coiled-coil-Domäne. ANK: Ankyrin-like-repeat. α 1-6: Transmembrandomänen. TRP: TRP-Box. CIRB: calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding domain. CaMB: Calmodulin binding site. PDZB: PDZ binding sequence. Die Bindungsstelle des Primärantikörpers ist in Orange markiert (Alomone Labs 2023a; Zholos 2014; J. Tang et al. 2001). Erstellt mithilfe von BioRender.com.

Der Antikörper, der verwendet wurde, um TRPM7 anzufärben, bindet laut Herstellerangaben an der 1146-1165 Aminosäure des humanen TRPM7. Das Epitop befindet sich intrazellulär am C-Terminus des Proteins. Weiter C-terminal befindet sich die Kinasedomäne von TRPM7. Abbildung 8 zeigt die Bindestelle des Antikörpers (Alomone Labs 2023b).

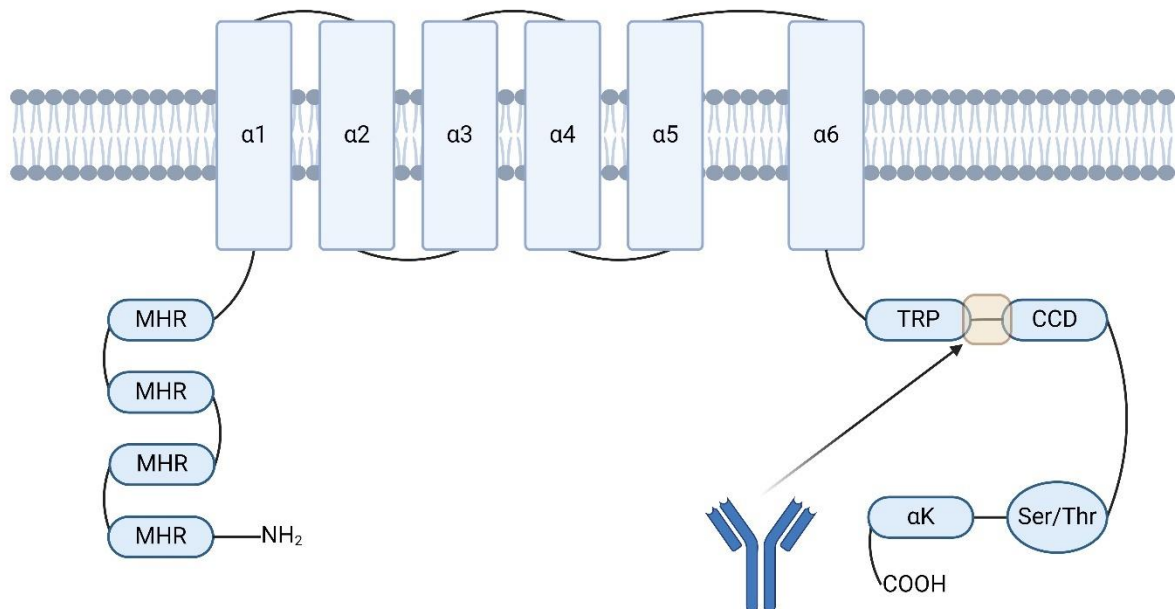


Abbildung 8: Schematische Darstellung von TRPM7 (2). „NH₂“ stellt das N-terminale Ende und „COOH“ das C-terminale Ende dar. CCD: coiled coil Domäne. MHR: melastatin homology region. α1-6: Transmembrandomäne 1-6. TRP: TRP-Box. Ser/Thr: Serin Threonin-Domäne. αK: Kinase-Domäne. Die Bindestelle des Primärantikörpers ist in Orange markiert (Jimenez et al. 2020; Alomone Labs 2023b; Fleig and Chubanov 2014). Erstellt mithilfe von BioRender.com.

5.3.2.2 IHC-Färbung: Protokoll

Das Protokoll, das ich für die IHC-Färbung verwendet habe, wurde von Prof. Tschernig und den Doktoranden erstellt, die vor mir IHC-Färbungen in meiner Fakultät durchgeführt haben. Aufgrund ihrer Vorarbeit war ich in der Lage, das Protokoll mithilfe der Literatur zu modifizieren. Eine IHC-Farbserie dauerte zwei Tage. Aus diesem Grund habe ich das Protokoll in zwei Teile unterteilt. Im nachfolgenden Teil möchte ich genauer auf die Arbeitsschritte eingehen.

Arbeitsschritt	Details zum Arbeitsschritt
Teil 1	
Entparaffinieren und Rehydrieren	<ol style="list-style-type: none">1. Xylol (3x8 Min.)2. 100% Propan-2-ol (2x5 Min.)3. 90% Propan-2-ol (5 Min.)4. 80% Propan-2-ol (5 Min.)5. 70% Propan-2-ol (5 Min.)6. H₂O dest. (5 Min.)
Demaskieren	<ol style="list-style-type: none">1. In Citrat-Puffer bei 95°C (60 Min.)2. Abkühlen bei Raumtemperatur (30 Min.)3. In PBS waschen (1 Min.)
Blockieren	<ol style="list-style-type: none">1. Objektträger trocken klopfen und mit Blockierlösung pipettieren2. In Feuchtkammer inkubieren (60 Min.)
Primärantikörper	<ol style="list-style-type: none">1. Verdünnte Primärantikörperlösung mit NGS ansetzen2. Blockierlösung vom Objektträger klopfen3. Primärantikörperlösung (1:50) auf Objektträger pipettieren4. Inkubation in Feuchtkammer bei Raumtemperatur über Nacht

Tabelle 9: IHC: Protokoll Tag 1.

Arbeitsschritt	Details zum Arbeitsschritt
Teil 2	
Peroxidase-Inaktivierung	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verbleibende Lösung von Objektträger klopfen 2. Mit PBS waschen (2x2 Min.) 3. 3% H₂O₂ auf Objektträger pipettieren und belassen (10 Min.) 4. Lösung vom Objektträger klopfen 5. Mit PBS waschen (2x2 Min.)
Sekundärantikörper	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sekundärantikörper-HRP-Konjugat als Lösung in NGS (1:500) auf Objektträger pipettieren und in Feuchtkammer stellen (45 Min.) 2. Lösung von Objektträger abklopfen 3. Mit PBS waschen (2x2 Min.)
DAB-Färbung	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inkubation mit 1:1 DAB-Lösung (10 Min.) 2. Objektträger in PBS tauchen
Gegenfärbung	<ol style="list-style-type: none"> 1. Objektträger in destilliertes Wasser (1 Min.) 2. In Hämatoxylin nach Ehrlich kurz eintunken 3. In destilliertes Wasser tunken 4. Unter fließendem Leitungswasser bläuen (5 Min.)
Entwässerung	<ol style="list-style-type: none"> 1. 70% Propan-2-ol (5 Min.) 2. 80% Propan-2-ol (5 Min.) 3. 90% Propan-2-ol (5 Min.) 4. 100% Propan-2-ol (2x5 Min.) 5. Xylol (3x5 Min.)
Eindecken	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mit Histokitt verkleben 2. Aushärten lassen unter dem Abzug 3. Lagern bei Raumtemperatur

Tabelle 10: IHC: Protokoll Tag 2.

5.3.2.3 Teil 1

Wie bei der HE-Färbung müssen die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Hierzu wurden die Proben dreimal für sieben Minuten in ein Xylolbad gegeben. Eine absteigende Alkoholreihe wurde dann genutzt, um die Proben zu rehydrieren. Dazu wurden die Proben zweimal für fünf Minuten in 100% Propan-2-ol, für fünf Minuten in 90% Propan-2-ol und schließlich für weitere fünf Minuten in 80% Propan-2-ol gegeben. Nach der Rehydrierung wurden die Proben schnellstmöglich weiterverarbeitet.

Als nächstes musste das Antigen der Proben demaskiert werden. In diesem Schritt wurden die durch die Fixierung entstandenen Quervernetzungen der Proteine und die an den Proteinen hängenden Formalinmoleküle gelöst. Der Primärantikörper konnte so leichter die Zellmembranen bis zum Antigen durchdringen (Lang 2006). Im Sinne des sog. HIER-Verfahrens (heat-induced epitope retrieval) habe ich die Proben zur Demaskierung für 45 Minuten bei 95°C in einen Wärmeschrank in Citratpufferlösung gegeben. Nachdem ich die Präparate in PBS gewaschen hatte, pipettierte ich sie mit Blockierlösung und inkubierte sie für 60 Minuten in einer Feuchtkammer. Anschließend inkubierte ich die Proben mit dem Primärantikörper gegen TRPC5 bzw. TRPM7.

Darauf folgte die Inkubation der Proben mit dem Primärantikörper gegen TRPC5 bzw. TRPM7. Ich pipettierte die Antikörperlösung in einer 1:50-Verdünnung auf die Schnitte. Die Antikörper wurden mit NGS verdünnt. Das im NGS enthaltene Albumin sorgt dafür, dass der Antikörper im Behälter nicht an den Wänden haften bleibt. Das Serumalbumin wirkt also als eine Art Trägerprotein (Lang 2006). Nachdem die Blockierungslösung von den Objektträgern abgeklopft worden war, konnte der Primärantikörper auf die Objektträger gegeben werden. Die Proben wurden dann über Nacht in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert.

5.3.2.4 Teil 2

Am zweiten Tag wurde zunächst die Peroxidase-Inaktivierung durchgeführt. Dieser Schritt ist essenziell, da sonst im späteren Verlauf die Färbung der Proben verfälscht werden könnte (Lang 2006). Als Vorbereitung klopfte ich zunächst die übrige Lösung vom Objektträger. Anschließend erfolgten zwei Waschungen mit PBS-Lösung für jeweils zwei Minuten. Das später auf die Proben pipettierte 3% H₂O₂ sorgte für die Inaktivierung der Peroxidasen, die im histologischen Präparat enthalten waren. Erfolgt dieser Schritt nicht, können die endogenen Peroxidasen ebenfalls das Chromogen umsetzen. Die Folge wäre ein falsch positives Ergebnis (Lang 2006). Das H₂O₂ wurde zehn Minuten auf den Präparaten belassen.

Im nächsten Schritt wurde eine Verdünnungslösung (1:500) aus NGS und einem Sekundärantikörper hergestellt und auf die Objektträger pipettiert. Die Objektträger stellte ich dann für 45 Minuten bei Raumtemperatur in eine Feuchtkammer. Nach Ablauf der Zeit wurde

die Lösung von den Objektträgern geklopft und diese dann erneut zweimal jeweils für zwei Minuten mit PBS gewaschen.

Anschließend folgte die DAB-Färbung. Hierzu gab ich Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) mithilfe einer Pipette auf die Objektträger. Das DAB wird als Chromogen durch die HRP oxidiert, die sich als Konjugat am Sekundärantikörper befindet. Dadurch findet ein Farbumschlag statt. Neben diesem Farbumschlag sorgt die Oxidation auch für eine Polymerisation an Proteinen in der Umgebung des Primärantikörpers. Der Farbstoff bleibt also an dem Ort, wo er gebildet wurde (Lang 2006). Nach Ende der DAB-Färbung wurde der Objektträger kurz in PBS gewaschen. Nach der Waschung müssen die Proben für eine Minute in destilliertem Wasser verbleiben.

Um die Gewebsarchitektur unter dem Mikroskop genauer beurteilen zu können, führten ich eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durch. Hierzu tauchten ich die Objektträger zunächst für eine Minute in destilliertes Wasser. Danach wurden die Präparate kurz in Hämatoxylin getunkt. Zum Schluss bläute ich die Präparate unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten. Das Resultat einer guten Gegenfärbung ist eine leichte Färbung der Zellkerne des Präparats. Bei einer zu starken Färbung kann es sein, dass das Signal der eigentlichen IHC-Färbung überlagert wird (Lang 2006).

Zur Entwässerung wurden die Präparate zunächst für fünf Minuten in 90% Propan-2-ol und dann zweimal für jeweils fünf Minuten in 100% Propan-2-ol getaucht. Anschließend klärte ich die Präparate dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol. Zum Schluss konnten die Präparate dann mit Deckgläsern und Histokleber eingedeckt werden. Die Aushärtung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Wie bereits erklärt führte ich, um die Qualität der Färbung zu verifizieren, noch eine Positiv- und zwei Negativkontrollen durch. Bei einer Positiv- und einer Negativkontrolle handelte es sich um Herzmuskelgewebe. TRPC5 und TRPM7 werden in diesem Gewebe exprimiert (S.-L. Du et al. 2021; Andriulė et al. 2022). Bei der Positivkontrolle wurde eine reguläre Färbung durchgeführt. Bei der Negativkontrolle hingegen wurde der Primärantikörper weggelassen. Die Positivkontrolle diente der Qualitätssicherung der IHC-Färbung und der Sensitivitätsbestimmung der Versuchsreihe. Die Negativkontrolle kann unspezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers demaskieren (Lang 2006). Für die zweite Negativkontrolle verwendete ich Lungengewebe. Eine Farbserie wurde von mir erst dann als valide beurteilt, wenn die Negativkontrolle kein Farbsignal und die Positivkontrolle ein Farbsignal aufwies. Abbildung 9 und 10 zeigen Negativ- und Positivkontrollen einer erfolgreichen Farbserie. Wichtig bei der IHC-Färbung ist, dass die Einwirkzeiten von Antikörpern und DAB ungefähr gleichgehalten werden. Unterschiedliche Einwirkzeiten können dazu führen, dass die Ergebnisse untereinander nicht mehr vergleichbar sind (Lang 2006).

Das von mir verwendete Protokoll habe ich genutzt, da es bereits durch verschiedene andere Projekte in meinem Institut etabliert wurde. Allerdings habe ich das Protokoll nach einer Testfärbung geändert. Zunächst habe ich eine Farbserie mit einer Antikörperkonzentration von 1:100 durchgeführt. Bei dieser Konzentration blieben die Strukturen jedoch ungefärbt. Ebenso habe ich die Dauer der Gegenfärbung angepasst. Es stellte sich heraus, dass ein zu langes Eintauchen in Hämatoxylin zu einer starken Gegenfärbung führt. Diese kann dazu führen, dass das Farbsignal des DAB überdeckt wird.

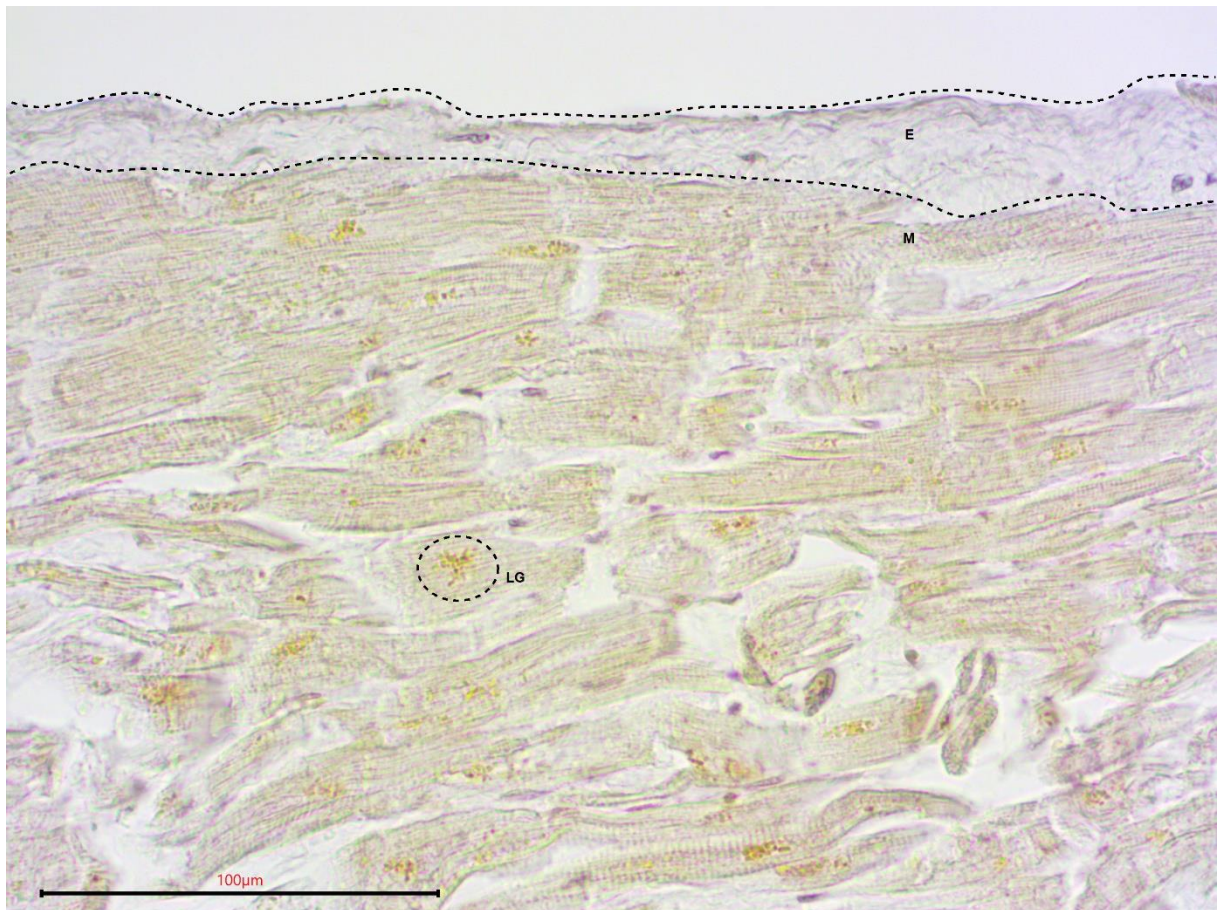


Abbildung 9: Negativkontrolle Herz. Die Probe wurde nur mit dem Sekundärantikörper behandelt und mit Hämatoxylin gegengefärbt. In den Herzmuskelzellen befinden sich bräunliche Lipofuszingranula, die auch als Alterspigmente bezeichnet werden (W.-W. Li et al. 2021). E = Endokard, M = Myokard, LG = Lipofuszingranula. 40-fache Vergrößerung.

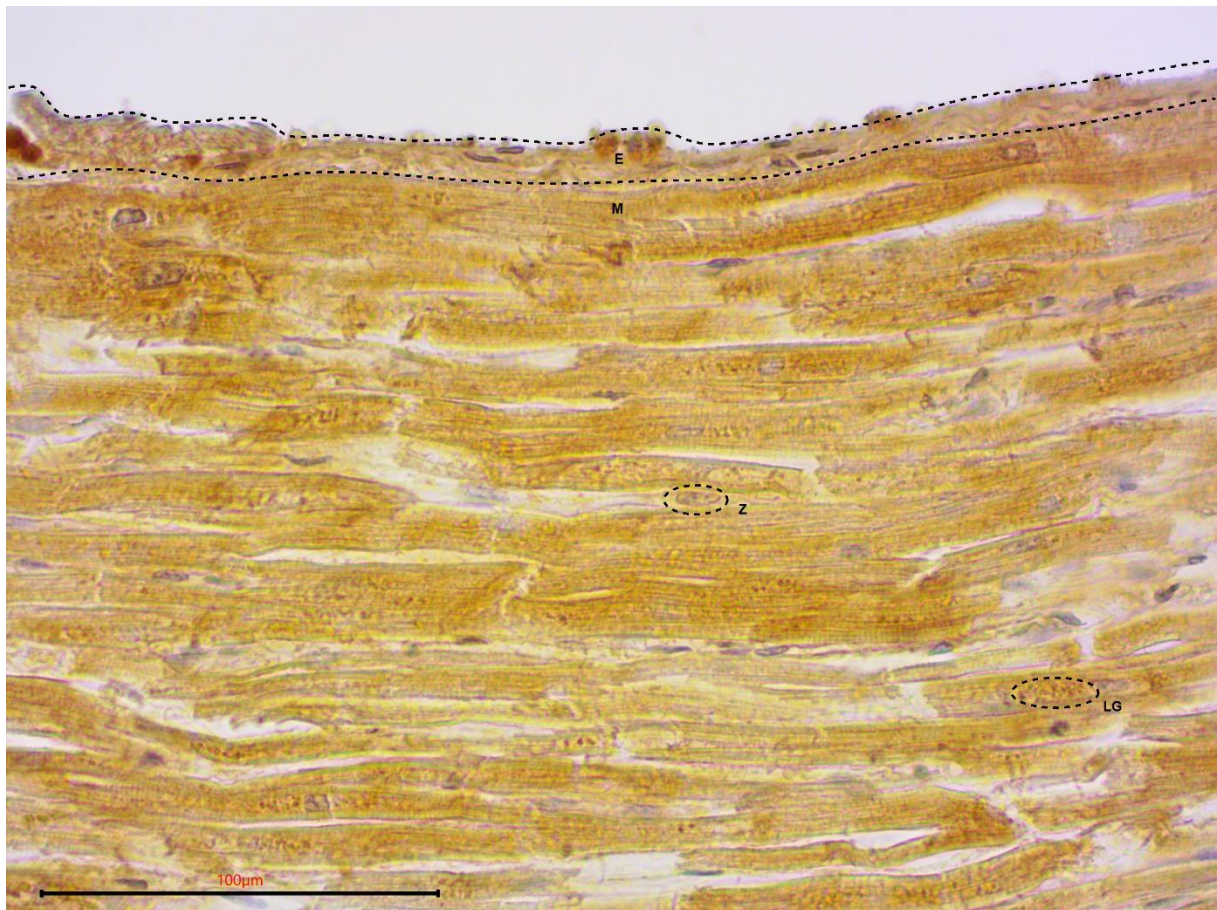


Abbildung 10: Positivkontrolle Herz. IHC-Färbung eines Dünnschnitts des Herzens. Der primäre Antikörper ist dabei gegen TRPC5 gerichtet. Die Herzmuskelzellen sind deutlich positiv für TRPC5. Die Kerne der Zellen sind bläulich gefärbt. E = Endokard, M = Myokard, LG = Lipofuszingranula, Z = Myozyten Zellkern. 40-fache Vergrößerung.

5.4 Aufnahme der Bilder und Auswertungsmethode

Nachdem die Objektträger mit den Proben gefärbt worden waren, konnte ich diese unter einem Lichtmikroskop untersuchen. Unter dem Mikroskop betrachtete ich die Präparate zunächst in fünffacher Vergrößerung, um einen Überblick über die Präparate zu erhalten. Dabei konnte auch die Qualität beurteilt werden. Danach bewertete ich die Präparate genauer in einer höheren Vergrößerungsstufe. Während der Untersuchung nahm ich Bilder von den Proben auf. Dies ermöglichte mir eine einfache Auswertung.

6 Ergebnisse

Insgesamt habe ich das Lungengewebe von sechs Körperspendern untersucht. Von den entnommenen Proben wurden zehn gegen TRPC5 und neun gegen TRPM7 gefärbt. Eine Übersicht der gefärbten Proben, ihrer jeweiligen Entnahmeorte und zugeordneten Spender kann Tab. 11 entnommen werden. Im folgenden Kapitel möchte ich die Ergebnisse meiner Experimente vorstellen und auf meine in Abschnitt 4.3 formulierten Forschungsfragen zu sprechen kommen. Das Kapitel 6.1 widmet sich dem generellen Nachweis von TRPC5 und TRPM7 in der menschlichen Lunge. In Kapitel 6.2 möchte ich auf die Expression von TRPC5- und TRPM7-Proteinen in den histologischen Strukturen der Lunge eingehen, inklusive der Expression in humanen Alveolarmakrophagen.

Um das Farbsignal und damit die Expression von TRPC5 und TRPM7 klassifizieren und auswerten zu können, habe ich ein Klassifizierungssystem erarbeitet. Dieses möchte ich im Folgenden näher erläutern. Eine Struktur oder Probe wurde als negativ (-) gewertet, wenn sie eine bläuliche Färbung aufwies, ähnlich wie die Gegenfärbung der Negativkontrolle. Als mäßig positiv wurde ein Farbsignal bezeichnet, das eine hell- bis dunkelorange Farbe aufwies oder wenn sich die Färbung deutlich von der Gegenfärbung der Negativkontrolle unterschied. Hell- bis dunkelbraune Farbsignale, in denen keine bläuliche Gegenfärbung mehr erkennbar war, wurden in der Analyse als stark positiv (++) bewertet. Diese Kategorisierung wird in Abb. 11 schematisch dargestellt.

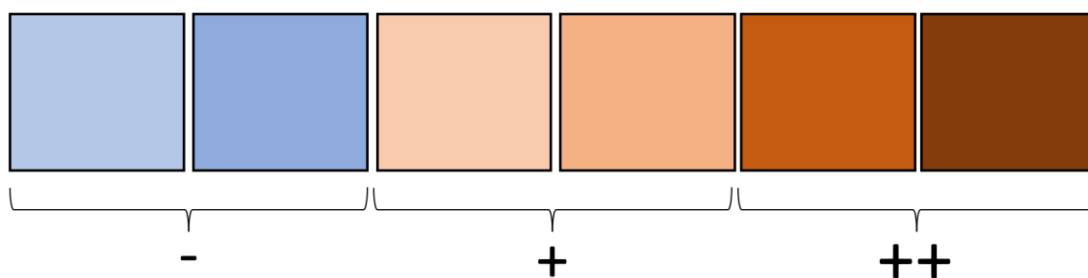


Abbildung 11: Schematische Kategorisierung der Farbsignale. Wenn nur die blaue Gegenfärbung zu erkennen war, wurde das Farbsignal als negativ (-) gewertet. Ein Farbsignal, das sich hell- bis dunkelorange darstellte und sich deutlich von der Gegenfärbung der Negativkontrolle abhob, wurde als mäßig positiv (+) gewertet. Stark positive Farbsignale (++) sind hell- bis dunkelbraun. Die blaue Gegenfärbung ist nicht zu erkennen.

Gefärbte Proben TRPC5	
Körperspender	Entnahmestellen
23/17	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/18	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/20	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/22	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/22	Hilusnaher Bereich, rechts
23/25	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/25	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, rechts
23/25	Lungenunterlappen, Segmentum basale laterale, rechts
23/25	Hilusnaher Bereich, rechts
23/26	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
Gefärbte Proben TRPM7	
Körperspender	Entnahmestellen
23/17	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/18	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/20	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/22	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/25	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links
23/25	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, rechts
23/25	Lungenunterlappen, Segmentum basale laterale, rechts
23/25	Hilusnaher Bereich, rechts
23/26	Lungenoberlappen, Segmentum apicale, links

Tabelle 11: Gefärbte Proben.

6.1 Nachweis von TRPC5 und TRPM7 in der Lunge

Die Probenauswahl wurde nach dem Kreuzschema getroffen. Das bedeutet, dass bei einem Körperspender die Proben aller Entnahmestellen gefärbt wurden und bei den übrigen Körperspendern jeweils die Proben aus einer Entnahmestelle. Bei allen Proben konnten die Antigene mit einer mäßigen bis überdurchschnittlichen Farbsignalstärke nachgewiesen werden. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, in fünffacher Vergrößerung.

Die mit TRPC5-Antikörpern gefärbten Proben wiesen unter mikroskopischer Betrachtung ein mäßiges bis starkes Farbsignal auf. Ein deutlicher Unterschied zur Negativkontrolle war feststellbar. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Proben Strukturen enthalten, in denen TRPC5 vorhanden ist. Abb. 15, 16 und 17 zeigen Beispielbilder. Zum Vergleich zeigt Abb. 14 eine Negativkontrolle.

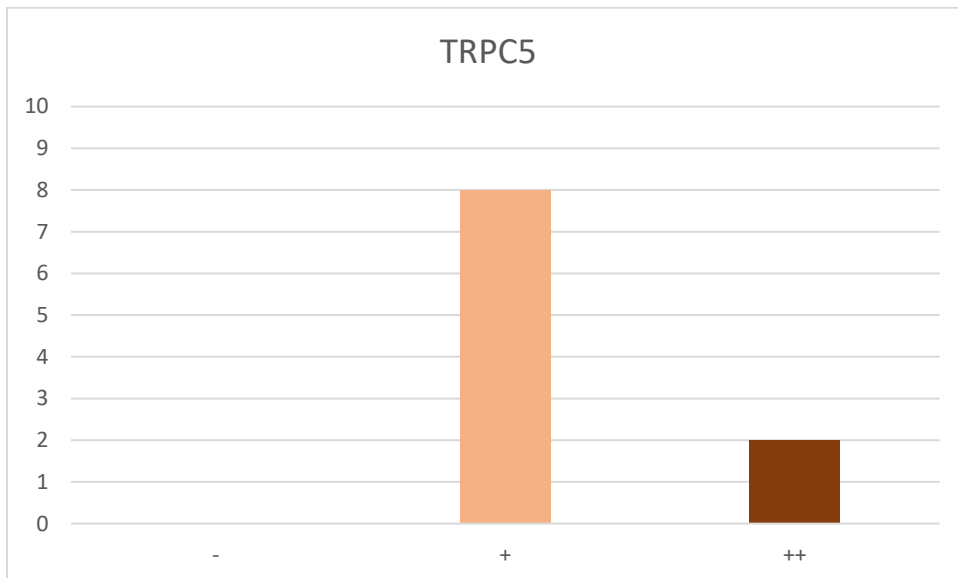


Abbildung 12: Übersicht Signal TRPC5. Das Diagramm beschreibt die Anzahl an TRPC5-negativen (-), mäßig positiven (+) und stark positiven (++) Proben, in 5-facher Vergrößerung. Die X-Achse beschreibt das Farbsignal. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der Proben.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Färbung mit TRPM7-Antikörpern. Die Proben wiesen ein mäßiges bis starkes Farbsignal auf. Der deutliche Unterschied zur Negativkontrolle deutet darauf hin, dass TRPM7-positive Zellen in den Strukturen vorhanden sind. Abb. 18, 19 und 20 zeigen Beispielbilder von Färbungen gegen TRPM7. Die Proben zeigten ein mäßig bis starkes Farbsignal auf. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 14 die dazugehörige Negativkontrolle.

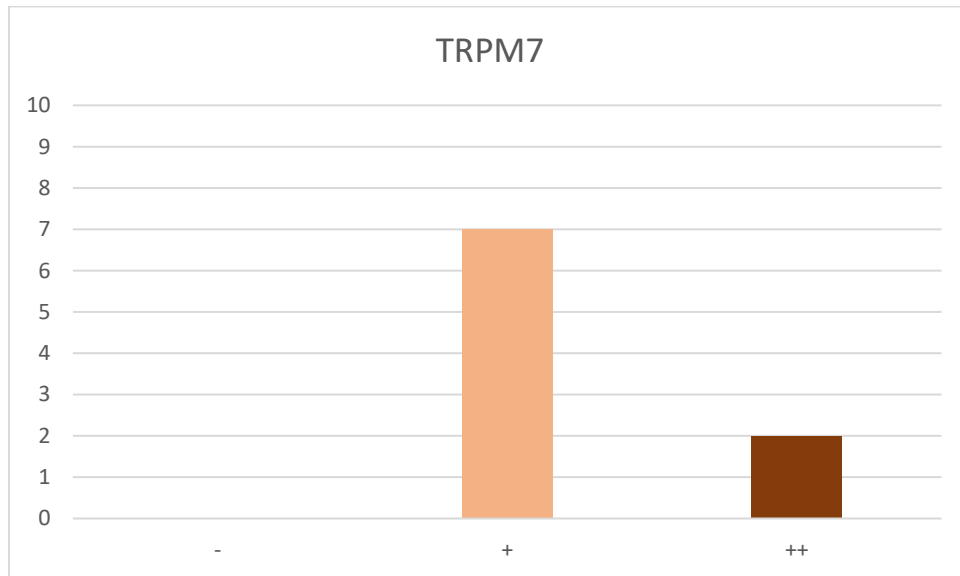


Abbildung 13: Übersicht Signal TRPM7. Das Diagramm beschreibt die Anzahl an TRPM7-negativen (-), mäßig positiven (+) und stark positiven (++) Proben, in 5-facher Vergrößerung. Die X-Achse beschreibt das Farbsignal. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der Proben.

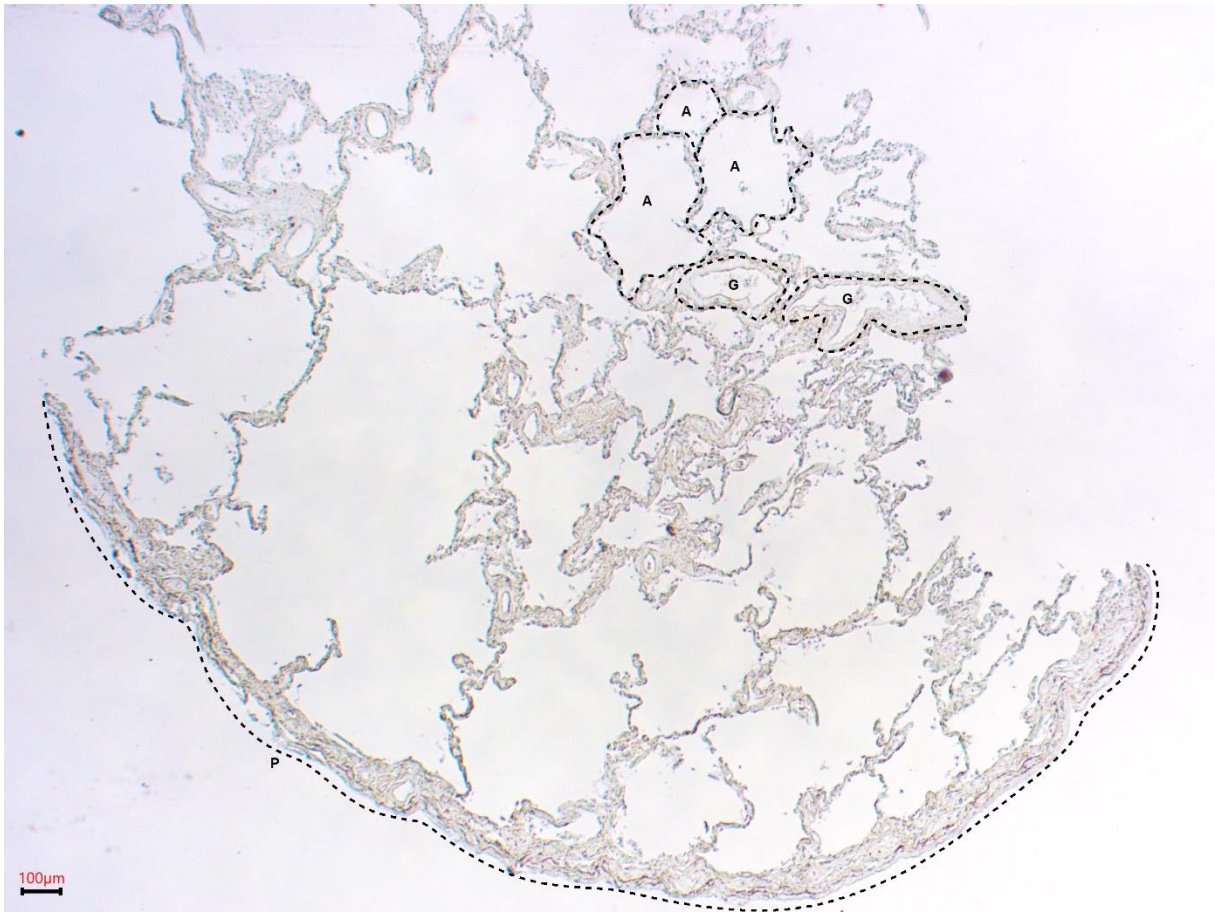


Abbildung 14: Negativkontrolle Lunge. A = Alveole, G = Pulmonales Blutgefäß, P = Pleura. 5-fache Vergrößerung.

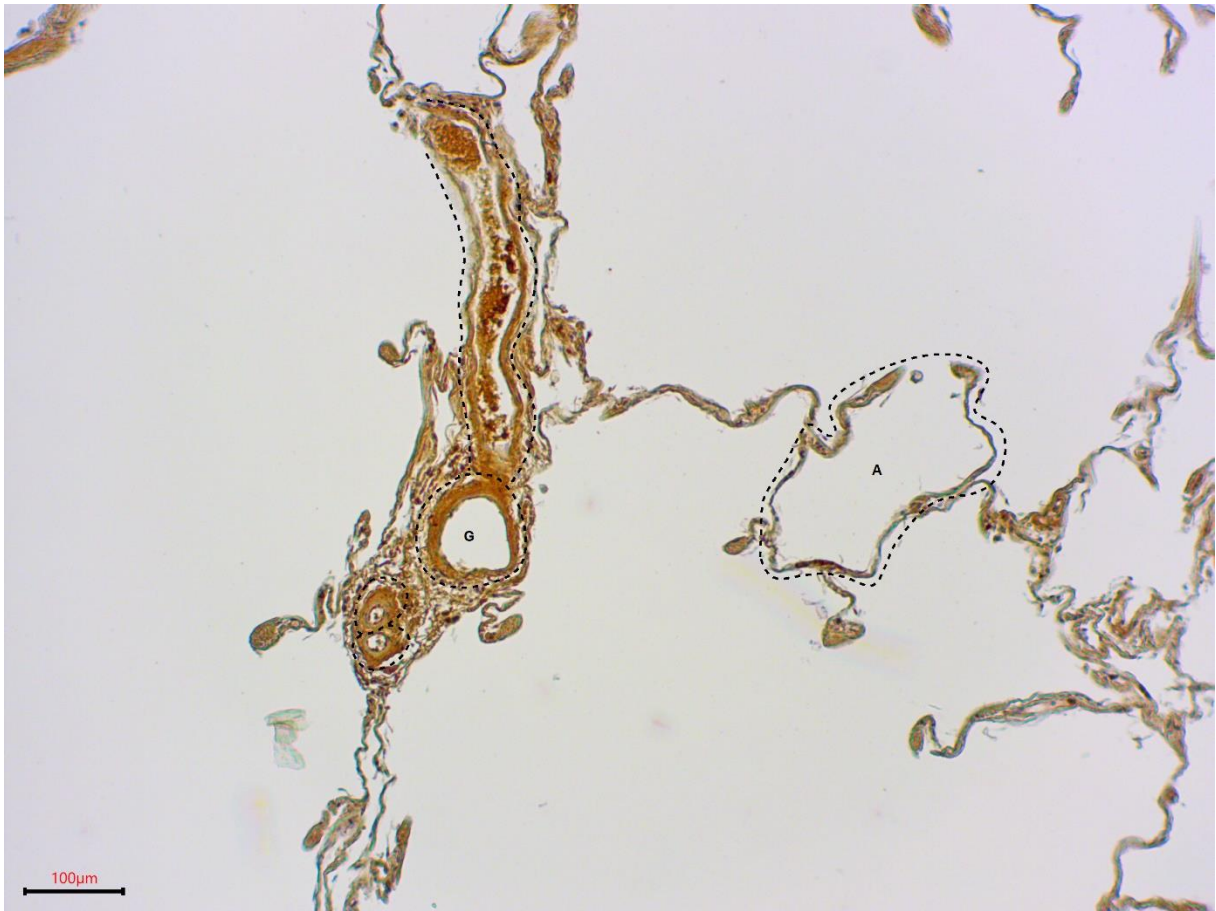


Abbildung 15: Färbung gegen TRPC5 (1). A = Alveole, G = Pulmonales Blutgefäß. 10-fache Vergrößerung.



Abbildung 16: Färbung gegen TRPC5 (2). AM = Alveolarmakrophage, AS = Alveolarseptum. 100-fache Vergrößerung.

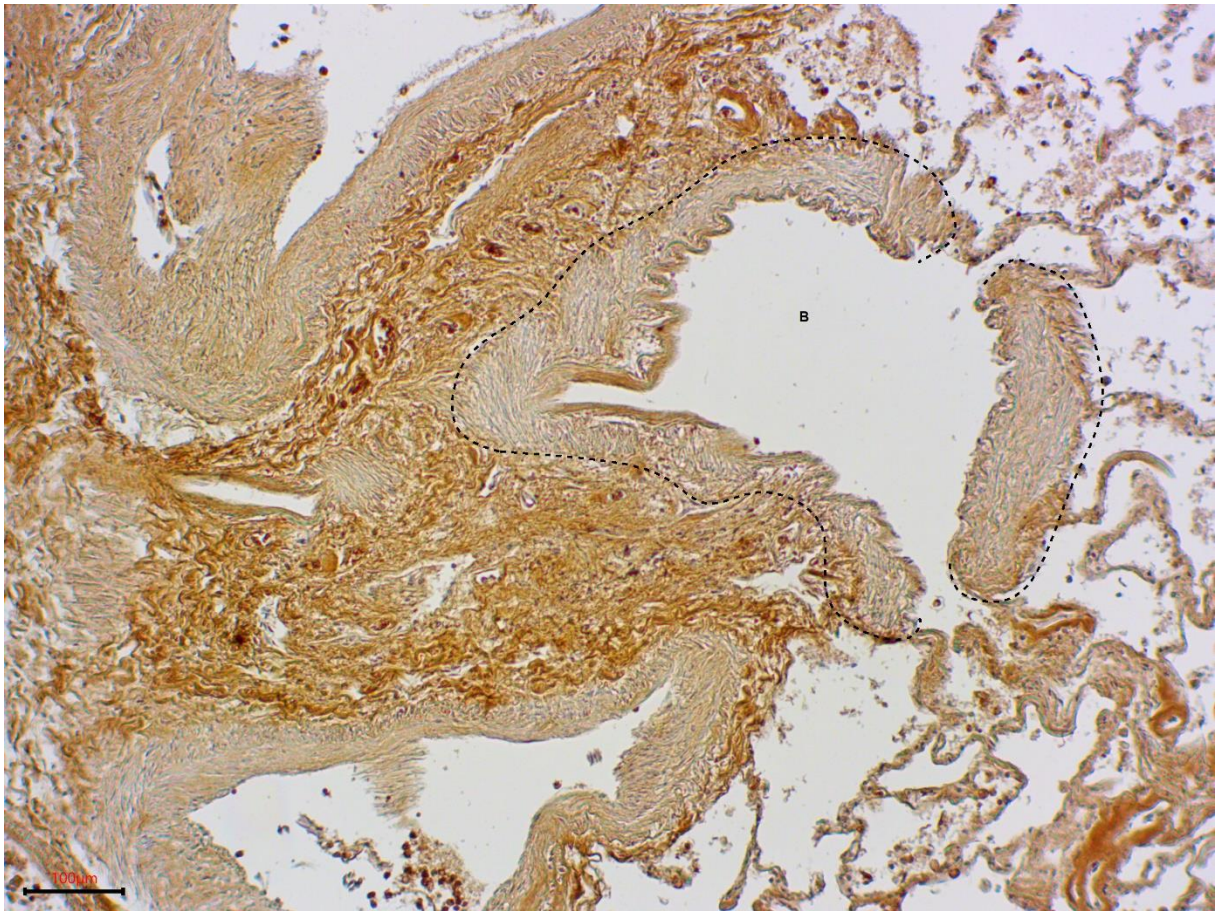


Abbildung 17: Färbung gegen TRPC5 (3). Bronchiole im Querschnitt. B = Bronchiole. 10-fache Vergrößerung.

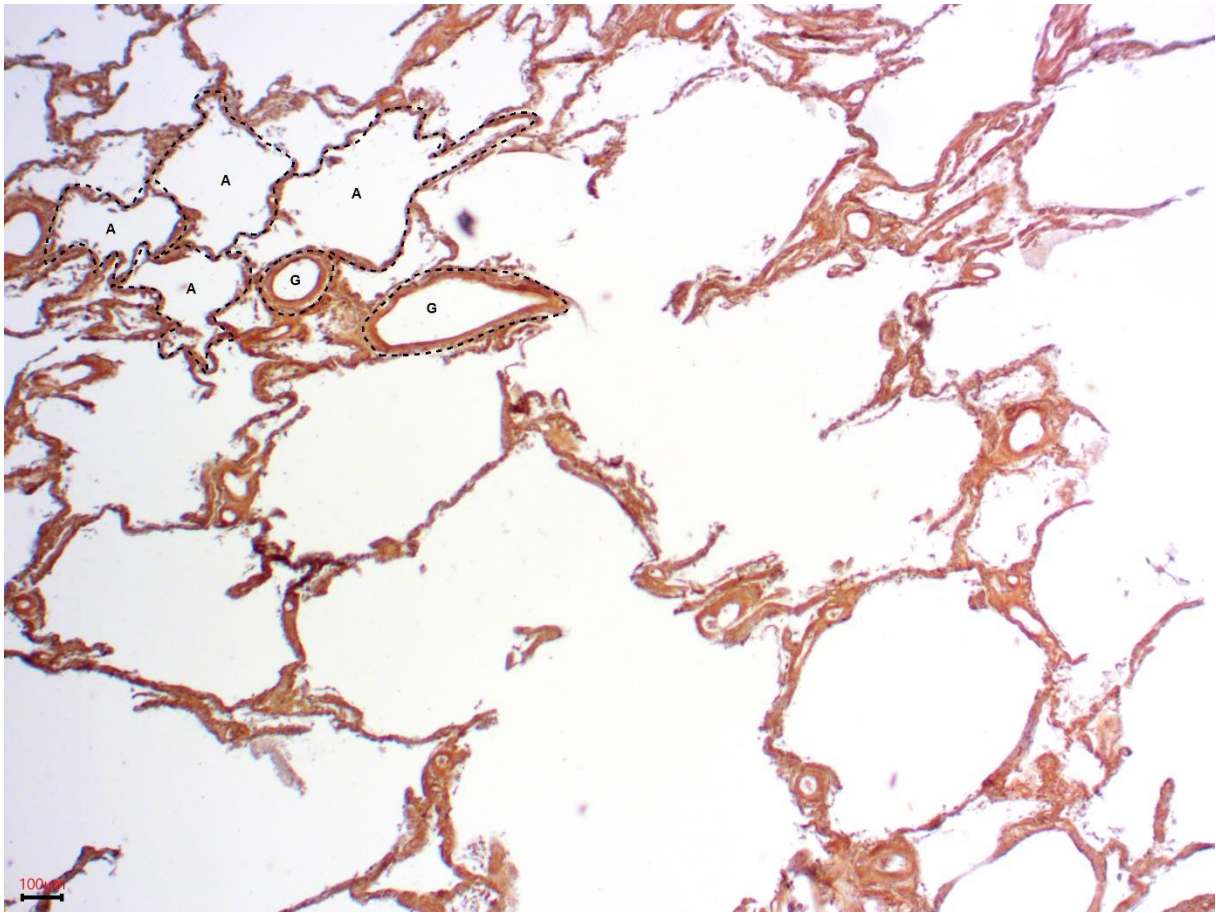


Abbildung 18: Färbung gegen TRPM7 (1). A = Alveole, G = Pulmonales Blutgefäß. 5-fache Vergrößerung.

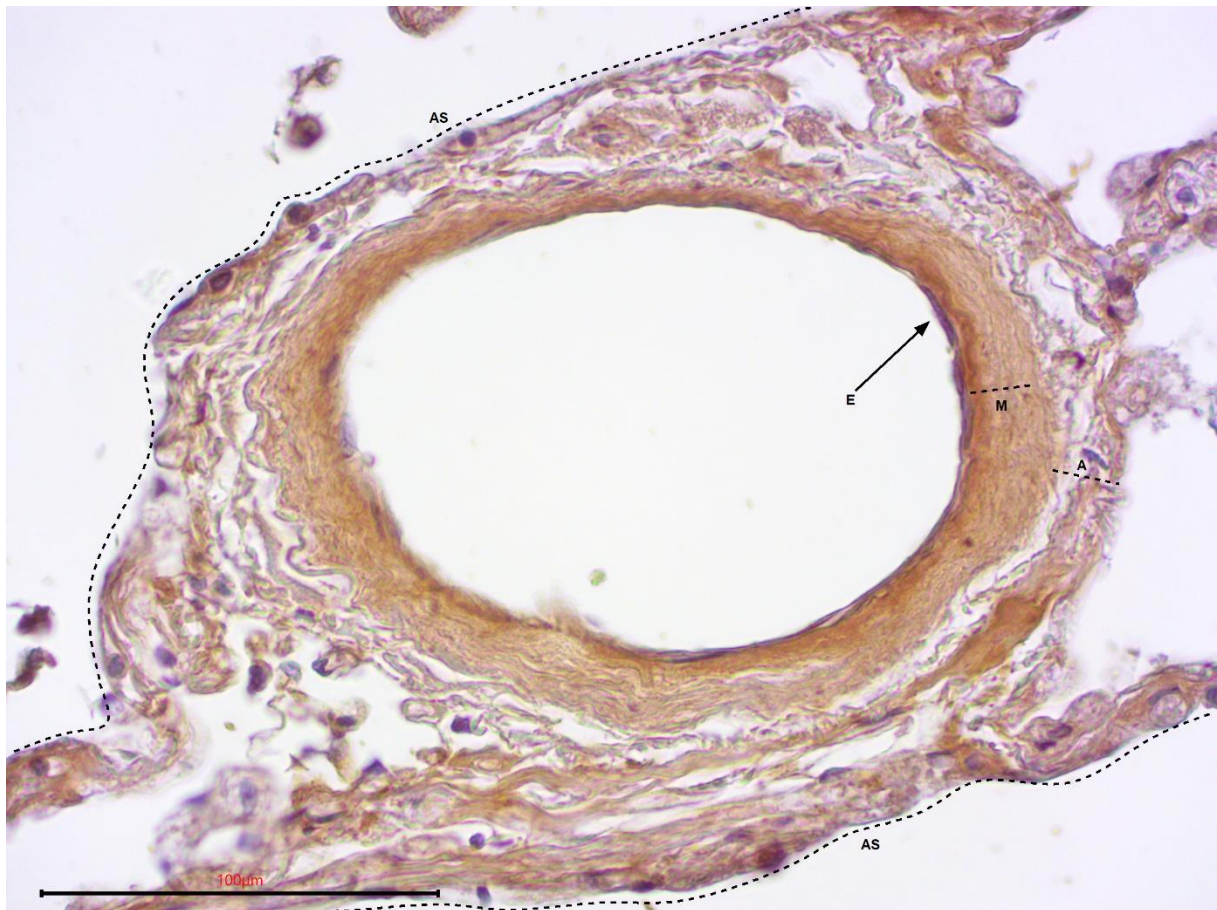


Abbildung 19: Färbung gegen TRPM7 (2). Gefäß im Querschnitt. AS = Alveolarseptum, A = Gefäßadventitia, E = Gefäßendothel, M = Gefäßmedia. 40-fache Vergrößerung.

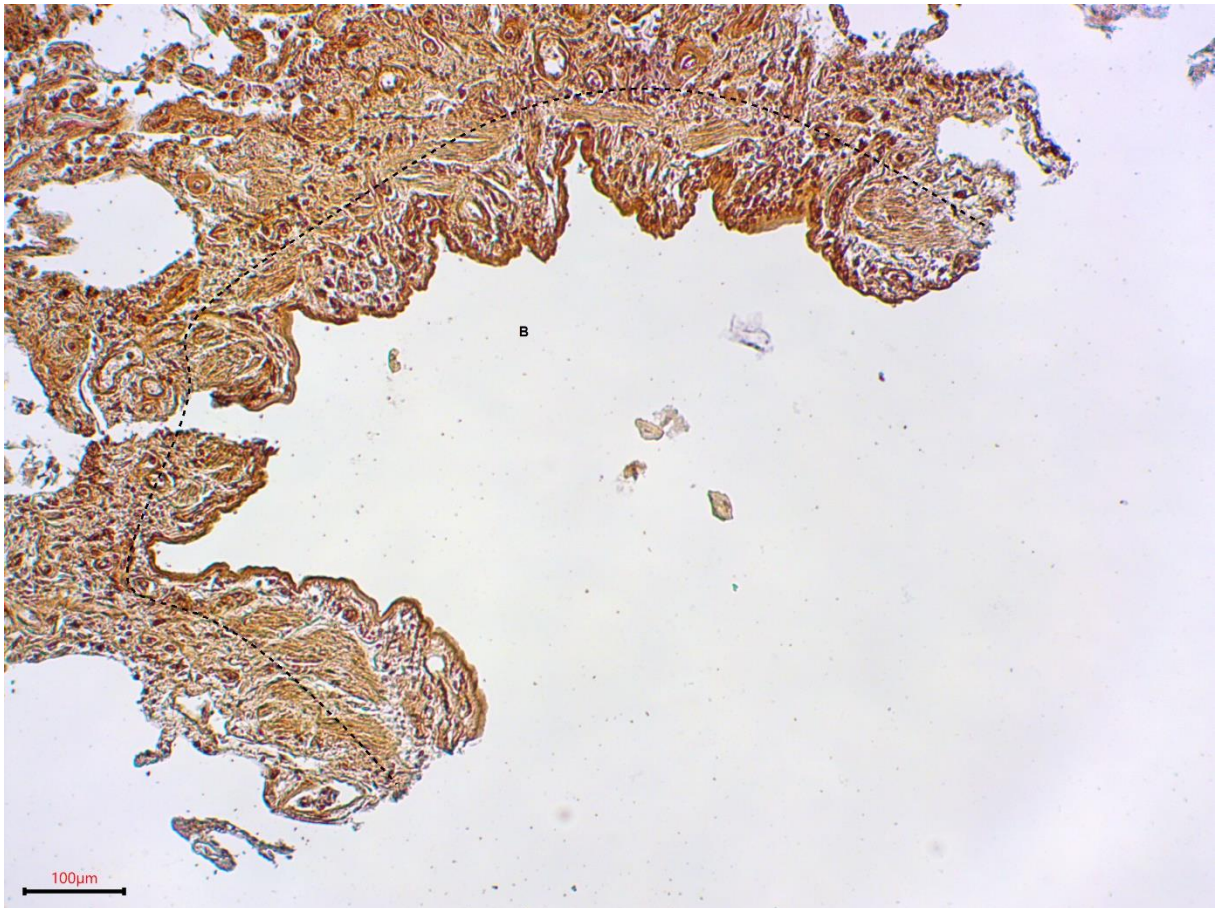


Abbildung 20: Färbung gegen TRPM7 (3). Bronchiole im Querschnitt. B = Bronchiole. 10-fache Vergrößerung.

6.2 Vergleich der Strukturen der Lunge

In meiner Auswertung habe ich außerdem das Vorkommen von TRPC5 und TRPM7 in den unterschiedlichen Strukturen der Lunge untersucht. Dazu habe ich die Proben unter dem Mikroskop untersucht und die Pleura, das subpleurale Bindegewebe, die Gefäße mit Endothel, Media und Adventitia, die Bronchiolen, das Alveolarseptum, die Alveolarmakrophagen und die Pneumozyten vom Typ I und Typ II auf ihr Farbsignal bewertet. Pro Präparat wurden bis zu fünf Exemplare der genannten Strukturen untersucht und nach den oben genannten Kriterien entweder als negativ (-), mäßig positiv (+) oder stark positiv (++) bewertet. Um die Strukturen insgesamt zu vergleichen, wurden die zusammengetragenen Daten in eine Tabelle übertragen. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, zunächst in 5-, dann in 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 und 22 dargestellt.

Pleura, subpleurales Bindegewebe, Lungengefäße, Bronchiolen, Pneumozyten vom Typ 1 und Typ 2 und Alveolarmakrophagen wiesen in allen untersuchten Proben ein mäßiges bis starkes Farbsignal auf. Keine der Strukturen war negativ. Die Ergebnisse deuten auf das Vorkommen von TRPC5 in allen untersuchten Strukturen hin.

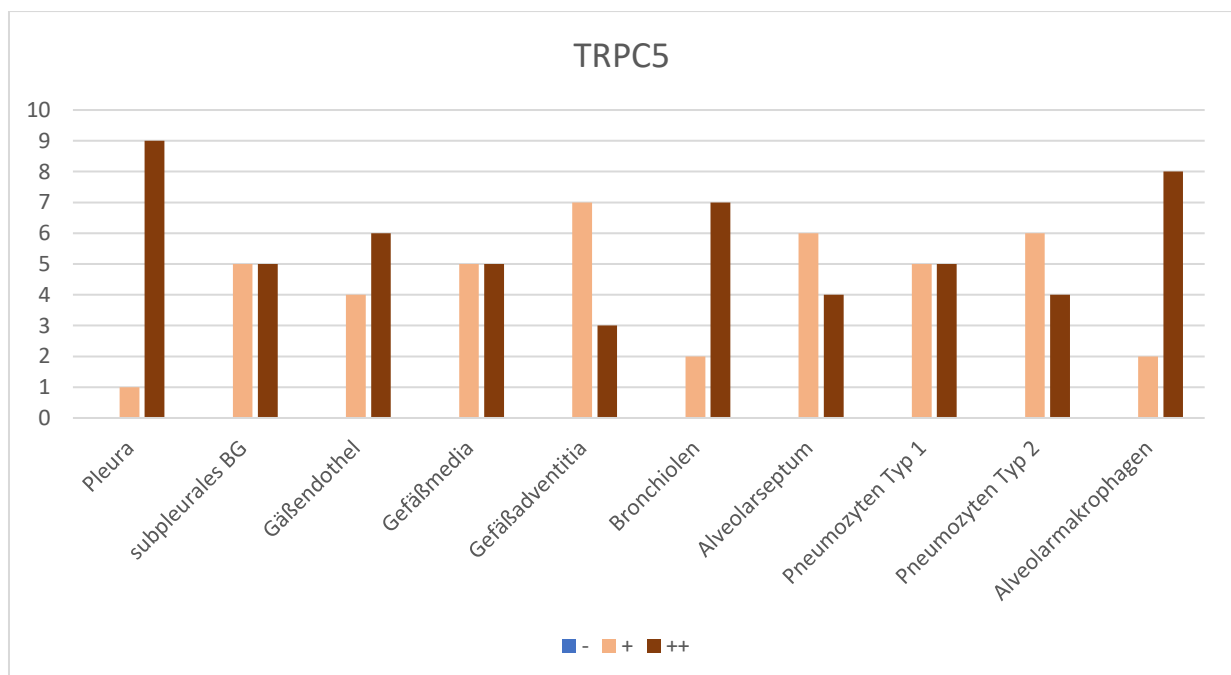


Abbildung 21: TRPC5-Farbsignal der Strukturen. Das Diagramm beschreibt die Anzahl an TRPC5-negativen (-), mäßig positiven (+) und stark positiven (++) Strukturen. Auf der X-Achse werden die untersuchten Strukturen dargestellt. Hierbei beschreiben die blauen Säulen die Anzahl der negativen Strukturen, die orangenen Säulen die der mäßig positiven Strukturen und die braunen Säulen die der stark positiven Strukturen. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der Proben. BG = Bindegewebe.

Auch bei der Anfärbung mit TRPM7-Antikörpern wiesen Pleura, subpleurales Bindegewebe, Lungengefäße, Bronchiolen, Pneumozyten vom Typ 1 und Typ 2 sowie Alveolarmakrophagen ein mäßiges bis starkes Farbsignal auf. Keine Struktur wurde als negativ klassifiziert. Dementsprechend ist das Vorkommen von TRPM7 in den genannten Strukturen wahrscheinlich.

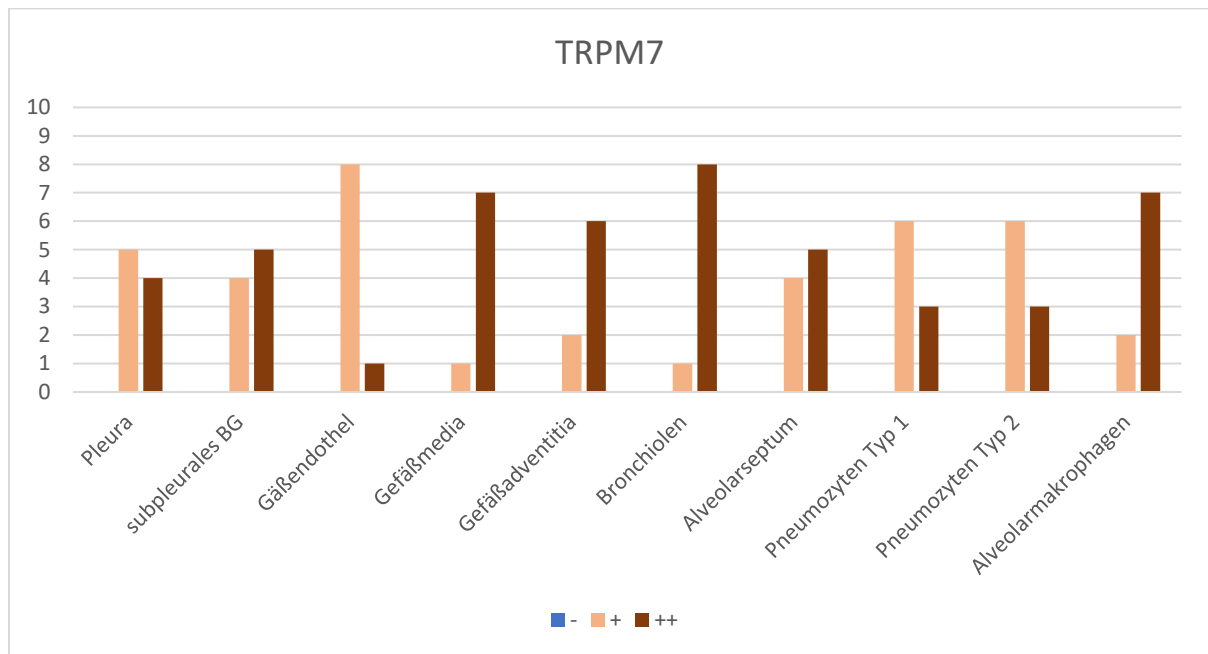


Abbildung 22: TRPM7-Farbsignal der Strukturen. Das Diagramm beschreibt die Anzahl an TRPM7-negativen (-), mäßig positiven (+) und stark positiven (++) Strukturen. Auf der X-Achse werden die untersuchten Strukturen dargestellt. Hierbei beschreiben die blauen Säulen die Anzahl der negativen Strukturen, die orangenen Säulen die der mäßig positiven Strukturen und die braunen Säulen die der stark positiven Strukturen. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der Proben. BG = Bindegewebe.

7 Diskussion

Nachdem ich in den vorangegangenen Teilen über die Methodik und die Ergebnisse meiner Experimente berichtet habe, möchte ich nun über die Ergebnisse diskutieren. Zunächst werde ich die Ergebnisse meiner Arbeit in Relation zur aktuellen Forschung setzen. Dann werde ich die von mir verwendete Methodik kritisch betrachten. Dabei gehe ich auf das Studiendesign, die Probenentnahme und -verarbeitung sowie auf das Spenderkollektiv ein. Außerdem diskutiere ich über das von mir genutzte Farbprotokoll. Schlussendlich möchte ich meine Arbeit zusammenfassen und auf die möglichen Perspektiven in diesem Forschungsgebiet eingehen.

7.1 Einordnung der Ergebnisse

Bei der mikroskopischen und makroskopischen Übersichtsbetrachtung der Proben ließ sich bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den Negativkontrollen und den Proben, die gegen TRPC5 bzw. TRPM7 gefärbt wurden, erkennen. Das Farbsignal deutet auf ein Vorkommen von TRPC5 und TRPM7 in der menschlichen Lunge hin. Die spätere detaillierte Betrachtung der Proben gab Hinweise auf ein ubiquitäres Vorkommen von TRPC5 und TRPM7 in Pleura, subpleuralen Bindegewebe, Lungengefäßen, Bronchiolen, Pneumozyten Typ 1 und Typ 2 sowie Alveolarmakrophagen.

7.1.1 Bezug auf aktuelle Forschung für TRPC5

Wie einleitend erwähnt, wurde TRPC5 bereits in mehreren Organen und Gewebetypen nachgewiesen. In der Lunge betrifft dies mehrere Zelllinien. Im menschlichen Gewebe wurde TRPC5 bisher nur in glatten Muskelzellen der Atemwege nachgewiesen (Lembrechts et al. 2012; White et al. 2006; Peng et al. 2010; Lu et al. 2008; Ong et al. 2003). Andere Nachweise stammen meist aus Kulturen tierischer Lungenzellen. Oft wurde auch nur die korrespondierende TRPC5- mRNA mittels RT-PCR detektiert. Meine Ergebnisse zeigen, dass TRPC5 wahrscheinlich sogar in der gesamten menschlichen Lunge vorhanden ist.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRPC5 eine Rolle in verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen spielt. Hierbei möchte ich besonders den Stellenwert von TRPC5 bei der Regulation des Ca^{2+} -Haushalts in glatten Muskelzellen hervorheben (Peng et al. 2010; B.-B. Liu et al. 2019; Chen et al. 2020; Ong et al. 2003). Eine Dysregulation dieses Haushalts kann nachweislich zur Entstehung von vaskulären Erkrankungen und Atemwegserkrankungen führen. Bezogen auf TRPC5 in der Lunge sind hierbei besonders zwei Entitäten zu nennen: Die pulmonale Hypertonie und das Asthma bronchiale (Koopmans et al. 2014; Peng et al. 2010). In beiden Fällen könnte ein besseres Verständnis von TRPC5 dazu beitragen, die Pathophysiologie der Krankheiten genauer aufzuklären und so eventuell einen Ansatzpunkt für neue Therapien zu schaffen (Koopmans et al. 2014; Peng et al. 2010).

Eine weitere Zellreihe, bei der TRPC5 an der Regulation von Zellfunktionen beteiligt ist, sind Makrophagen. Hier gibt es bereits Hinweise, dass TRPC5 die Polarisierung der Makrophagen in einen proinflammatorischen Phänotyp hemmt (Tao et al. 2020). Es gibt ebenfalls Hinweise, dass durch auf Makrophagen vorhandene TRPC4/TRPC5-Heteromere eine protektive Wirkung bei Sepsis vermittelt wird (Pereira et al. 2018). In meinen Experimenten konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass TRPC5 auch in Alveolarmakrophagen vorhanden ist. Dementsprechend könnte TRPC5 als Ziel pharmakologischer Interventionen genutzt werden, um entzündliche Erkrankungen der Lunge zu behandeln (Tao et al. 2020).

7.1.2 Bezug auf aktuelle Forschung für TRPM7

In menschlichen Zellen konnte TRPM7 bereits in Fibroblasten der MRC5- und WI-38-Linie sowie in Bronchialepithelzellen der 16-HBE-Linie nachgewiesen werden (Yu et al. 2013; K. Liu et al. 2018; Wei et al. 2009). Ähnlich wie bei TRPC5 wurden die meisten Nachweise von TRPM7 jedoch an tierischen Zellen erbracht. Zu diesen Zellen gehören Alveolarmakrophagen und glatte Muskelzellen aus den Atemwegen und Pulmonalarterien der Tiere (J. Li et al. 2018; Lin et al. 2016; C.-W. Yang et al. 2018). Meine Experimente deuten darauf hin, dass TRPM7 in der gesamten Lunge vorhanden ist.

Wie bereits erwähnt reguliert TRPM7 die intrazelluläre Kationenkonzentration, insbesondere Mg^{2+} , Na^{+} und Ca^{2+} . Die Dysregulation des Kationenhaushalts ist ein Teil der Pathogenese von fibroproliferativen Erkrankungen wie Lungenfibrose (Inoue, Kurahara, and Hiraishi 2019). TRPM7 wurde deshalb bereits als mögliches Ziel für pharmakologische Interventionen beschrieben (T. Xu et al. 2015). Genau wie bei TRPC5 könnte TRPM7 an der Entstehung von pulmonaler Hypertonie beteiligt sein. Somit stellt es ebenfalls ein Ziel für mögliche pharmakologische Interventionen dar (D. Wang et al. 2021; Hiraishi et al. 2022). Auch bei entzündlichen Erkrankungen der Lunge könnte TRPM7 einen wichtigen Angriffspunkt für medikamentöse Interventionen bieten. Erst neulich konnte die Arbeitsgruppe um Busey et al. zeigen, dass VPC01091.4 und AAL-149 einen antiinflammatorischen Effekt auf Alveolarmakrophagen haben. Dieser antiinflammatorische Effekt besteht laut den Autoren sogar im Mausmodell in vivo. VPC01091.4 und AAL-149 sind Analoga von FTY720, der auch als Fingolimod (GILENYA®) als Immunsuppressivum bei der Behandlung von Multipler Sklerose eingesetzt wird (Busey et al. 2024). Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRPM7 auch in menschlichen Alveolarmakrophagen vorhanden sind. Es bleibt dennoch abzuwarten, ob es sich bei VPC01091.4 und AAL-149 um pharmakologische Stoffe handelt, die auch zur Behandlung von inflammatorischen Lungenerkrankungen eingesetzt werden können (Busey et al. 2024).

7.2 Methodenkritik

In diesem Teil möchte ich näher auf die verwendete Methodik eingehen. Die möglichen Auswirkungen des Spenderkollektivs, der Entnahme und Verarbeitung der Proben sowie des verwendeten Farbprotokolls, auf meine Ergebnisse, möchte ich hierbei besonders hervorheben. Zunächst möchte ich jedoch über das von mir gewählte Nachweisverfahren diskutieren.

7.2.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie als Nachweismethode bietet mehrere Vorteile. Einerseits ist die Methode einfach durchzuführen. Die benötigten Gerätschaften gehören zur Standardausrüstung der meisten Labore und die Chemikalien sowie die Antikörper sind einfach über die Industrie zu beziehen. Andererseits bietet die Methode eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis der entsprechenden Antigene. Die Sensitivität und Spezifität hängen hierbei besonders von den verwendeten Antikörpern ab (Lang 2006). Die von mir verwendeten Antikörper wurden bereits in mehreren Publikationen genutzt und von der Firma selbst getestet. Es gibt ausreichend Hinweise, dass die verwendeten Antikörper spezifisch und sensitiv genug waren (Mačianskienė et al. 2017; Y. Zhu et al. 2019; Zhang et al. 2022). Die Färbung von Positiv- und Negativkontrollen half ebenfalls dabei, falsch positive und falsch negative Ergebnisse zu verhindern und erhöhte somit die Validität der Ergebnisse (Lang 2006). Da die Färbungen manuell durchgeführt wurden, konnten auch hier Fehler entstehen, z. B. durch falsches Pipettieren. Es war wichtig, das Protokoll der Färbung einzuhalten und alle Proben möglichst einheitlich zu behandeln, um eine interne Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Dies betrifft besonders die verwendete Konzentration der Primärantikörper und die Dauer mit der die Proben mit DAB gefärbt wurden.

7.2.2 Spenderkollektiv

Für meine Experimente wurden jeweils Proben von sechs Körperspendern (vier Männer und zwei Frauen) entnommen. Das Durchschnittsalter der Körperspender betrug 81,3 Jahre. Informationen über die Vorgeschichte der Körperspender waren nicht verfügbar. Alle Spender starben an einem natürlichen Tod, wobei ein Spender an den Folgen einer Pneumonie verstarb.

Insgesamt habe ich zehn immunhistochemische Färbungen für den Nachweis von TRPC5 und neun für den Nachweis von TRPM7 durchgeführt. Die untersuchte Stichprobe mit insgesamt sechs Individuen war dementsprechend recht klein. Das von mir verwendete Spenderkollektiv lag mit 81,3 Jahren ebenfalls deutlich über dem deutschen Durchschnittsalter von 43,4 Jahren im Jahr 2021 (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung 2023). Aus diesem Grund lässt sich keine sichere Aussage über das Vorkommen von TRPC5 und TRPM7 in der Lunge von jüngeren Spendern treffen.

Krankheitsbedingte und postmortale Veränderungen der Lunge könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Aussagekraft meiner Experimente haben. Postmortale Veränderungen könnten unter anderem aufgrund einer Verzögerung der NEP- Fixierung nach dem Tod der Spender eintreten. Um die Qualität der Proben zu gewährleisten, wurde deshalb vor der IHC-Färbung eine HE-Übersichtsfärbung durchgeführt. Einige diskretere pathophysiologische Veränderungen lassen sich allerdings durch diese Methode nicht nachweisen.

Aufgrund der niedrigen Anzahl der Färbungen, des Spenderkollektivs und der möglichen postmortalen und krankheitsbedingten Veränderungen der Proben müssen meine Ergebnisse differenziert betrachtet werden. Dennoch gibt meine Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass TRPC5 und TRPM7 ubiquitär in der menschlichen Lunge vorhanden sind.

7.2.3 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Die durchgeführte mediane Sternotomie zur Probenentnahme ermöglichte mir eine gute Übersicht über die Spenderlungen, sodass ich die Proben zielsicher entnehmen konnte. Bei der Entnahme war jedoch darauf zu achten, dass die Proben keine Gewebstraumata durch die verwendete Pinzette erlitten. Bei der weiteren Verarbeitung der Proben war es wichtig, dies möglichst zügig durchzuführen. Nur so konnte ein vorzeitiges Denaturieren der Proben verhindert werden. Ebenfalls war es wichtig, die Verarbeitung streng nach Protokoll durchzuführen, um eine Ungleichbehandlung zu vermeiden und für jede Probe gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen.

7.3 Zusammenfassung und Perspektive

Nachdem ich über die Einordnung meiner Ergebnisse in die aktuelle Forschung berichtet und die von mir verwendete Methodik kritisch beurteilt habe, möchte ich nun zum letzten Teil dieses Abschnitts kommen. Hier werde ich meine Arbeit noch einmal zusammenfassen und einen möglichen Ausblick auf weitere Forschung in diesem Bereich geben.

In meinen Experimenten konnte ich aufzeigen, dass TRPC5 und TRPM7 nicht nur in einzelnen Zelltypen der Lunge vorkommen, sondern wahrscheinlich in der gesamten Lunge ubiquitär vorhanden sind. Dennoch ist es gerade aufgrund der methodischen Limitationen meiner Arbeit wie dem hohen Alter und der geringen Größe des Spenderkollektivs wichtig, diese Ergebnisse an Proben von jüngeren Spendern zu verifizieren. Hierfür würden sich eine erneute Untersuchung an intraoperativ entnommenen Proben besonders gut eignen. In Zellen sind TRPC5 und TRPM7 an den unterschiedlichsten physiologischen Vorgängen beteiligt. Hierzu zählt besonders die Regulation des Kationenhaushaltes (Fleig and Chubakov 2014; Zholos 2014). Mehrere Forschungsgruppen liefern hierbei Hinweise darauf, dass TRPC5 und TRPM7 in die Genese verschiedenster Krankheiten der Lunge involviert sein könnten (Zholos 2014; Fleig and Chubakov 2014). Im Hinblick auf diese Tatsachen zeigt meine Arbeit auf, wie wichtig

die weitere Erforschung von TRPC5 und TRPM7 in der menschlichen Lunge ist. Eine noch genauere Untersuchung dieser Ionenkanäle könnte nicht nur zu einem besseren Verständnis der Zellbiologie und der Funktion vieler Zelltypen in der Lunge beitragen. Im besten Fall könnte weitere Forschung auf diesem Themengebiet dabei helfen, neue Ziele für pharmakologische Interventionen und Behandlungsoptionen für bisher schwer kontrollierbare Krankheiten zu finden. Es wurden bisher mehrere Stoffe identifiziert, die als Inhibitoren von TRPC5 oder TRPM7 pharmakologisch genutzt werden könnten. Einige dieser Inhibitoren sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt Gegenstand klinischer Studien oder wurden sogar schon zur Anwendung am Menschen zugelassen (Walsh et al. 2021; Qin et al. 2013; Busey et al. 2024). Es bleibt abzuwarten, ob diese Medikamente auch zur Behandlung von Lungenkrankheiten eingesetzt werden könnten.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung von TRPC5 (1)
Abb. 2	Schematische Darstellung von TRPM7 (1)
Abb. 3	Lungenflügel
Abb. 4	Endabschnitt des Bronchialbaums
Abb. 5	HE-Färbung der Lunge
Abb. 6	Schematische Darstellung der Funktionsweise der sekundären Immunhistochemie
Abb. 7	Schematische Darstellung von TRPC5 (2)
Abb. 8	Schematische Darstellung von TRPM7 (2)
Abb. 9	Negativkontrolle Herz
Abb. 10	Positivkontrolle Herz
Abb. 11	Schematische Kategorisierung der Farbsignale.
Abb. 12	Übersicht Signal TRPC5
Abb. 13	Übersicht Signal TRPM7
Abb. 14	Negativkontrolle Lunge
Abb. 15	Färbung gegen TRPC5 (1)
Abb. 16	Färbung gegen TRPC5 (2)
Abb. 17	Färbung gegen TRPC5 (3)
Abb. 18	Färbung gegen TRPM7 (1)
Abb. 19	Färbung gegen TRPM7 (2)
Abb. 20	Färbung gegen TRPM7 (3)
Abb. 21	TRPC5 Farbsignal der Strukturen
Abb. 22	TRPM7 Farbsignal der Strukturen

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht der möglichen Öffnungsreize
Tab. 2	Übersicht der genutzten Geräte
Tab. 3	Übersicht der genutzten Verbrauchsmaterialien
Tab. 4	Übersicht der genutzten Lösungen und Chemikalien
Tab. 5	Übersicht über die Spenderdaten
Tab. 6	Übersicht über die entnommenen Proben
Tab. 7	Übersicht über die Gewebeeinbettung
Tab. 8	Protokoll HE-Färbung
Tab. 9	IHC: Protokoll Tag 1
Tab. 10	IHC: Protokoll Tag 2
Tab. 11	Gefärbte Proben

10 Literaturverzeichnis

1. Abiria, Sunday A, Grigory Krapivinsky, Rajan Sah, Ana G Santa-Cruz, Dipayan Chaudhuri, Jin Zhang, Pichet Adstamongkonkul, Paul G DeCaen, and David E Clapham. 2017. 'TRPM7 Senses Oxidative Stress to Release Zn²⁺ from Unique Intracellular Vesicles.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (30): E6079–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707380114>.
2. Alomone Labs. 2023a. 'Anti-TRPC5 Antibody'. <https://www.alomone.com/p/Anti-Trpc5/ACC-020>. 23 November 2023.
3. Alomone Labs. 2023b. 'Anti-TRPM7 Antibody'. <https://www.alomone.com/p/Anti-Trpm7/ACC-047>. 23 November 2023.
4. Andriulė, Inga, Dalia Pangonytė, Asfree Gwanyanya, Dainius Karčiauskas, Kanigula Mubagwa, and Regina Mačianskienė. 2022. 'Detection of TRPM6 and TRPM7 Proteins in Normal and Diseased Cardiac Atrial Tissue and Isolated Cardiomyocytes.' *International Journal of Molecular Sciences* 23 (23). <https://doi.org/10.3390/ijms232314860>.
5. Antigny, Fabrice, Nathalie Girardin, and Maud Frieden. 2012. 'Transient Receptor Potential Canonical Channels Are Required for in Vitro Endothelial Tube Formation.' *The Journal of Biological Chemistry* 287 (8): 5917–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.295733>.
6. Aumüller, G, G Aust, A Conrad, J Engele, J Kirsch, G Maio, A Mayerhofer, et al. 2010. *Duale Reihe Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-46981>.
7. Baaij, Jeroen H F de. 2023. 'Magnesium Reabsorption in the Kidney.' *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 324 (3): F227–44. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00298.2022>.
8. Bernal, Laura, Pamela Sotelo-Hitschfeld, Christine König, Viktor Sinica, Amanda Wyatt, Zoltan Winter, Alexander Hein, et al. 2021. 'Odontoblast TRPC5 Channels Signal Cold Pain in Teeth.' *Science Advances* 7 (13). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf5567>.
9. Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung. 2023. 'Durchschnittsalter Der Bevölkerung in Deutschland (1871-2021)'. <https://www.bib.bund.de/DE/Fakten/Fakt/B19-Durchschnittsalter-Bevoelkerung-Ab-1871.html>. 23 November 2023.
10. Busey, Gregory W, Mohan C Manjegowda, Tao Huang, Wesley H Iobst, Shardul S Naphade, Joel A Kennedy, Catherine A Doyle, Philip V Seegren, Kevin R Lynch, and Bimal N Desai. 2024. 'Analogues of FTY720 Inhibit TRPM7 but Not S1PRs and Exert Multimodal Anti-Inflammatory Effects.' *The Journal of General Physiology* 156 (1). <https://doi.org/10.1085/jgp.202313419>.

11. Chan, John K C. 2014. 'The Wonderful Colors of the Hematoxylin-Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology.' *International Journal of Surgical Pathology* 22 (1): 12–32. <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>.
12. Chen, Yuan-Yuan, Meng-Fei Yu, Xiao-Xue Zhao, Jinhua Shen, Yong-Bo Peng, Ping Zhao, Lu Xue, et al. 2020. 'Paracetamol Inhibits Ca²⁺ Permeant Ion Channels and Ca²⁺ Sensitization Resulting in Relaxation of Precontracted Airway Smooth Muscle.' *Journal of Pharmacological Sciences* 142 (2): 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.07.007>.
13. Cosens, D J, and A Manning. 1969. 'Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant.' *Nature* 224 (5216): 285–87. <https://doi.org/10.1038/224285a0>.
14. Desai, Bimal N, Grigory Krapivinsky, Betsy Navarro, Luba Krapivinsky, Brett C Carter, Sebastien Febvay, Markus Delling, et al. 2012. 'Cleavage of TRPM7 Releases the Kinase Domain from the Ion Channel and Regulates Its Participation in Fas-Induced Apoptosis.' *Developmental Cell* 22 (6): 1149–62. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.006>.
15. Diver, Melinda M, John V Lin King, David Julius, and Yifan Cheng. 2022. 'Sensory TRP Channels in Three Dimensions.' *Annual Review of Biochemistry* 91 (June): 629–49. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-105738>.
16. Du, Jianyang, Jia Xie, Zheng Zhang, Hiroto Tsujikawa, Daniel Fusco, David Silverman, Bruce Liang, and Lixia Yue. 2010. 'TRPM7-Mediated Ca²⁺ Signals Confer Fibrogenesis in Human Atrial Fibrillation.' *Circulation Research* 106 (5): 992–1003. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206771>.
17. Du, Sheng-Li, Zeng-Qin Jia, Jiu-Chang Zhong, and Le-Feng Wang. 2021. 'TRPC5 in Cardiovascular Diseases.' *Reviews in Cardiovascular Medicine* 22 (1): 127–35. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2021.01.212>.
18. Feldman, Ada T, and Delia Wolfe. 2014. 'Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining.' *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1180: 31–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3.
19. Fleig, Andrea, and Vladimir Chubanov. 2014. 'TRPM7.' *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 521–46. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_21.
20. Frias, Bárbara, and Adalberto Merighi. 2016. 'Capsaicin, Nociception and Pain.' *Molecules (Basel, Switzerland)* 21 (6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060797>.
21. Gaunt, Hannah J, Naveen S Vasudev, and David J Beech. 2016. 'Transient Receptor Potential Canonical 4 and 5 Proteins as Targets in Cancer Therapeutics.' *European Biophysics Journal: EBJ* 45 (7): 611–20. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1142-1>.
22. Gomis, Ana, Sergio Soriano, Carlos Belmonte, and Félix Viana. 2008. 'Hypoosmotic- and Pressure-Induced Membrane Stretch Activate TRPC5 Channels.' *The Journal of Physiology* 586 (23): 5633–49. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.161257>.

23. González-Ramírez, Ricardo, Yong Chen, Wolfgang B. Liedtke, and Sara L. Morales-Lázaro. 2017. *TRP Channels and Pain*.
24. Hardie, Roger C. 2011. 'A Brief History of Trp: Commentary and Personal Perspective.' *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 461 (5): 493–98. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0922-9>.
25. Hardy, Serge, Yevgen Zolotarov, Jacob Coleman, Simon Roitman, Hira Khursheed, Isabelle Aubry, Noriko Uetani, and Michel L Tremblay. 2023. 'PRL-1/2 Phosphatases Control TRPM7 Magnesium-Dependent Function to Regulate Cellular Bioenergetics.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (14): e2221083120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2221083120>.
26. Hiraishi, Keizo, Lin Hai Kurahara, Kaori Ishikawa, Tetsuhiko Go, Naoya Yokota, Yaopeng Hu, Takayuki Fujita, Ryuji Inoue, and Katsuya Hirano. 2022. 'Potential of the TRPM7 Channel as a Novel Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension.' *Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* 58 (0): 50–62. <https://doi.org/10.1540/jsmr.58.50>.
27. Hu, Feng, Meiyong Li, Fengyu Han, Qing Zhang, Yuhao Zeng, Weifang Zhang, and Xiaoshu Cheng. 2021. 'Role of TRPM7 in Cardiac Fibrosis: A Potential Therapeutic Target (Review).' *Experimental and Therapeutic Medicine* 21 (2): 173. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9604>.
28. Inoue, Ryuji, Lin-Hai Kurahara, and Keizo Hiraishi. 2019. 'TRP Channels in Cardiac and Intestinal Fibrosis.' *Seminars in Cell & Developmental Biology* 94 (October): 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.11.002>.
29. Janczyk, Pawel, Janet Weigner, Antina Luebke-Becker, Sabine Kaessmeyer, and Johanna Plendl. 2011. 'Nitrite Pickling Salt as an Alternative to Formaldehyde for Embalming in Veterinary Anatomy--A Study Based on Histo- and Microbiological Analyses.' *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 193 (1): 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2010.08.003>.
30. Jang, Yongwoo, Yunjong Lee, Sung Min Kim, Young Duk Yang, Jooyoung Jung, and Uhtaek Oh. 2012. 'Quantitative Analysis of TRP Channel Genes in Mouse Organs.' *Archives of Pharmacal Research* 35 (10): 1823–30. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-1016-8>.
31. Ji, Delphine, Andrea Fleig, F David Horgen, Zhong-Ping Feng, and Hong-Shuo Sun. 2022. 'Modulators of TRPM7 and Its Potential as a Drug Target for Brain Tumours.' *Cell Calcium* 101 (January): 102521. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102521>.
32. Jimenez, Ivanka, Yolanda Prado, Felipe Marchant, Carolina Otero, Felipe Eltit, Claudio Cabello-Verrugio, Oscar Cerda, and Felipe Simon. 2020. 'TRPM Channels in Human Diseases.' *Cells* 9 (12). <https://doi.org/10.3390/cells9122604>.

33. Jung, Silke, Anja Mühle, Michael Schaefer, Rainer Strotmann, Gunter Schultz, and Tim D Plant. 2003. 'Lanthanides Potentiate TRPC5 Currents by an Action at Extracellular Sites Close to the Pore Mouth.' *The Journal of Biological Chemistry* 278 (6): 3562–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211484200>.
34. Jyothilekshmi, I, and N S Jayaprakash. 2021. 'Trends in Monoclonal Antibody Production Using Various Bioreactor Syst.' *Journal of Microbiology and Biotechnology* 31 (3): 349–57. <https://doi.org/10.4014/jmb.1911.11066>.
35. Kaczmarek, J Stefan, Antonio Riccio, and David E Clapham. 2012. 'Calpain Cleaves and Activates the TRPC5 Channel to Participate in Semaphorin 3A-Induced Neuronal Growth Cone Collapse.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (20): 7888–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205869109>.
36. Kashio, Makiko, and Makoto Tominaga. 2022. 'TRP Channels in Thermosensation.' *Current Opinion in Neurobiology* 75 (August): 102591. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102591>.
37. Klopffleisch, R, M von Deetzen, A Th Weiss, J Weigner, F Weigner, J Plendl, and A D Gruber. 2013. 'Weigners Fixative-an Alternative to Formalin Fixation for Histology with Improved Preservation of Nucleic Acids.' *Veterinary Pathology* 50 (1): 191–99. <https://doi.org/10.1177/0300985812441031>.
38. Koopmans, T, V Anaparti, I Castro-Piedras, P Yarova, N Irechukwu, C Nelson, J Perez-Zoghbi, X Tan, J P T Ward, and D B Wright. 2014. 'Ca²⁺ Handling and Sensitivity in Airway Smooth Muscle: Emerging Concepts for Mechanistic Understanding and Therapeutic Targeting.' *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 29 (2): 108–20. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.05.001>.
39. Krapivinsky, Grigory, Luba Krapivinsky, Yunona Manasian, and David E Clapham. 2014. 'The TRPM7 Chanzyme Is Cleaved to Release a Chromatin-Modifying Kinase.' *Cell* 157 (5): 1061–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.046>.
40. Kunert-Keil, Christiane, Frederike Bisping, Jana Krüger, and Heinrich Brinkmeier. 2006. 'Tissue-Specific Expression of TRP Channel Genes in the Mouse and Its Variation in Three Different Mouse Strains.' *BMC Genomics* 7 (June): 159. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-159>.
41. Lang, Gudrun. 2006. *Histotechnik*. Vienna: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/3-211-33142-5>.
42. Lembrechts, Robrecht, Inge Brouns, Kathy Schnorbusch, Isabel Pintelon, Jean-Pierre Timmermans, and Dirk Adriaensen. 2012. 'Neuroepithelial Bodies as Mechanotransducers in the Intrapulmonary Airway Epithelium: Involvement of TRPC5.' *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 47 (3): 315–23. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0068OC>.

43. Li, Jie, Yan Zheng, Ming-Xian Li, Chu-Wei Yang, and Yu-Fei Liu. 2018. 'Tanshinone IIA Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Downregulating TRPM7 and pro-Inflammatory Factors.' *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22 (1): 646–54. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13350>.
44. Li, Wen-Wen, Hai-Jie Wang, Yu-Zhen Tan, Yong-Li Wang, Shu-Na Yu, and Zhi-Hua Li. 2021. 'Reducing Lipofuscin Accumulation and Cardiomyocytic Senescence of Aging Heart by Enhancing Autophagy.' *Experimental Cell Research* 403 (1): 112585. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112585>.
45. Lin, Xiaoling, Cheng Yang, Linjie Huang, Ming Chen, Jianting Shi, Lihua Ouyang, Tiantian Tang, et al. 2016. 'Upregulation of TRPM7 Augments Cell Proliferation and Interleukin-8 Release in Airway Smooth Muscle Cells of Rats Exposed to Cigarette Smoke.' *Molecular Medicine Reports* 13 (6): 4995–5004. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5161>.
46. Liou, Jen, Man Lyang Kim, Won Do Heo, Joshua T Jones, Jason W Myers, James E Ferrell, and Tobias Meyer. 2005. 'STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx.' *Current Biology: CB* 15 (13): 1235–41. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>.
47. Liu, Bei-Bei, Yong-Bo Peng, Wen-Jing Zhang, Xiao-Xue Zhao, Li-Ping Chen, Meng-Su Liu, Ge-Ge Wang, et al. 2019. 'NS8593 Inhibits Ca²⁺ Permeant Channels Reversing Mouse Airway Smooth Muscle Contraction.' *Life Sciences* 238 (December): 116953. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116953>.
48. Liu, Kai, Shao-Hua Xu, Zhao Chen, Qing-Xin Zeng, Zhi-Jun Li, and Zhou-Miao Chen. 2018. 'TRPM7 Overexpression Enhances the Cancer Stem Cell-like and Metastatic Phenotypes of Lung Cancer through Modulation of the Hsp90α/UPA/MMP2 Signaling Pathway.' *BMC Cancer* 18 (1): 1167. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5050-x>.
49. Liu, Qing, Suyao Li, Yuran Qiu, Jiayu Zhang, Francisco J Rios, Zhiguo Zou, and Rhian M Touyz. 2023. 'Cardiovascular Toxicity of Tyrosine Kinase Inhibitors during Cancer Treatment: Potential Involvement of TRPM7.' *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 10: 1002438. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1002438>.
50. Löf, Christoffer, Tero Viitanen, Pramod Sukumaran, and Kid Törnquist. 2011. 'TRPC2: Of Mice but Not Men.' *Advances in Experimental Medicine and Biology* 704: 125–34. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_6.
51. Lu, Wenju, Jian Wang, Larissa A Shimoda, and J T Sylvester. 2008. 'Differences in STIM1 and TRPC Expression in Proximal and Distal Pulmonary Arterial Smooth Muscle Are Associated with Differences in Ca²⁺ Responses to Hypoxia.' *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 295 (1): L104-13. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00058.2008>.

52. Lüllmann-Rauch, Renate, and Esther Asan. 2019. *Taschenlehrbuch Histologie*. 6th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>.
53. Ma, Xin, Zhen Chen, Dong Hua, Dongxu He, Linjun Wang, Peng Zhang, Junqi Wang, et al. 2014. 'Essential Role for TrpC5-Containing Extracellular Vesicles in Breast Cancer with Chemotherapeutic Resistance.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (17): 6389–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400272111>.
54. Mačianskienė, Regina, Mantė Almanaitytė, Aistė Jekabsone, and Kanigula Mubagwa. 2017. 'Modulation of Human Cardiac TRPM7 Current by Extracellular Acidic PH Depends upon Extracellular Concentrations of Divalent Cations.' *PloS One* 12 (1): e0170923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170923>.
55. Magaki, Shino, Seyed A Hojat, Bowen Wei, Alexandra So, and William H Yong. 2019. 'An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry.' *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1897: 289–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25.
56. Mederos y Schnitzler, Michael, Janine Wäring, Thomas Gudermann, and Vladimir Chubanov. 2008. 'Evolutionary Determinants of Divergent Calcium Selectivity of TRPM Channels.' *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (5): 1540–51. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9694com>.
57. Mikoshiba, Katsuhiko. 2015. 'Role of IP3 Receptor Signaling in Cell Functions and Diseases.' *Advances in Biological Regulation* 57 (January): 217–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.001>.
58. Miller, Barbara A. 2014. 'TRPC2.' *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 53–65. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_3.
59. Minke, Baruch. 2010. 'The History of the Drosophila TRP Channel: The Birth of a New Channel Superfamily.' *Journal of Neurogenetics* 24 (4): 216–33. <https://doi.org/10.3109/01677063.2010.514369>.
60. Monteilh-Zoller, Mahealani K, Meredith C Hermosura, Monica J S Nadler, Andrew M Scharenberg, Reinhold Penner, and Andrea Fleig. 2003. 'TRPM7 Provides an Ion Channel Mechanism for Cellular Entry of Trace Metal Ions.' *The Journal of General Physiology* 121 (1): 49–60. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028740>.
61. Nadler, M J, M C Hermosura, K Inabe, A L Perraud, Q Zhu, A J Stokes, T Kurosaki, et al. 2001. 'LTRPC7 Is a Mg.ATP-Regulated Divalent Cation Channel Required for Cell Viability.' *Nature* 411 (6837): 590–95. <https://doi.org/10.1038/35079092>.
62. Nilius, Bernd, and Thomas Voets. 2004. 'Diversity of TRP Channel Activation.' *Novartis Foundation Symposium* 258: 140–49; discussion 149-59, 263–66.
63. Oancea, Elena, Joshua T Wolfe, and David E Clapham. 2006. 'Functional TRPM7 Channels Accumulate at the Plasma Membrane in Response to Fluid Flow.' *Circulation Research* 98 (2): 245–53. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200179.29375.cc>.

64. Ong, Hwei L, Helen M Brereton, M Lyn Harland, and Greg J Barritt. 2003. 'Evidence for the Expression of Transient Receptor Potential Proteins in Guinea Pig Airway Smooth Muscle Cells.' *Respirology (Carlton, Vic.)* 8 (1): 23–32. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00424.x>.
65. Peng, Gongyong, Wenju Lu, Xiaoyan Li, Yuqin Chen, Nanshan Zhong, Pixiu Ran, and Jian Wang. 2010. 'Expression of Store-Operated Ca²⁺ Entry and Transient Receptor Potential Canonical and Vanilloid-Related Proteins in Rat Distal Pulmonary Venous Smooth Muscle.' *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 299 (5): L621–30. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00176.2009>.
66. Pereira, Domingos M S, Saulo J F Mendes, Khadija Alawi, Pratish Thakore, Aisah Aubdool, Nágila C F Sousa, João F R da Silva, et al. 2018. 'Transient Receptor Potential Canonical Channels 4 and 5 Mediate Escherichia Coli-Derived Thioredoxin Effects in Lipopolysaccharide-Injected Mice.' *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 4904696. <https://doi.org/10.1155/2018/4904696>.
67. Prakriya, Murali, and Richard S Lewis. 2015. 'Store-Operated Calcium Channels.' *Physiological Reviews* 95 (4): 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>.
68. Putney, J W. 1986. 'A Model for Receptor-Regulated Calcium Entry.' *Cell Calcium* 7 (1): 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6).
69. Qin, Xin, Zhichao Yue, Baonan Sun, Wenzhong Yang, Jia Xie, Eric Ni, Yi Feng, Rafat Mahmood, Yanhui Zhang, and Lixia Yue. 2013. 'Sphingosine and FTY720 Are Potent Inhibitors of the Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) Channels.' *British Journal of Pharmacology* 168 (6): 1294–1312. <https://doi.org/10.1111/bph.12012>.
70. Ramsey, I Scott, Markus Delling, and David E Clapham. 2006. 'An Introduction to TRP Channels.' *Annual Review of Physiology* 68: 619–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>.
71. Rios, Francisco J, Zhi-Guo Zou, Adam P Harvey, Katie Y Harvey, Ryszard Nosalski, Panagiota Anyfanti, Livia L Camargo, et al. 2020. 'Chanzyme TRPM7 Protects against Cardiovascular Inflammation and Fibrosis.' *Cardiovascular Research* 116 (3): 721–35. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz164>.
72. Roos, Jack, Paul J DiGregorio, Andriy V Yeromin, Kari Ohlsen, Maria Lioudyno, Shenyuan Zhang, Olga Safrina, et al. 2005. 'STIM1, an Essential and Conserved Component of Store-Operated Ca²⁺ Channel Function.' *The Journal of Cell Biology* 169 (3): 435–45. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>.
73. Runnels, L W, L Yue, and D E Clapham. 2001. 'TRP-PLIK, a Bifunctional Protein with Kinase and Ion Channel Activities.' *Science (New York, N.Y.)* 291 (5506): 1043–47. <https://doi.org/10.1126/science.1058519>.

74. Ryazanova, Lillia V, Maxim V Dorovkov, Athar Ansari, and Alexey G Ryazanov. 2004. 'Characterization of the Protein Kinase Activity of TRPM7/ChaK1, a Protein Kinase Fused to the Transient Receptor Potential Ion Channel.' *The Journal of Biological Chemistry* 279 (5): 3708–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308820200>.
75. Ryazanova, Lillia V, Lusliany J Rondon, Susanna Zierler, Zhixian Hu, Joanna Galli, Terry P Yamaguchi, Andrzej Mazur, Andrea Fleig, and Alexey G Ryazanov. 2010. 'TRPM7 Is Essential for Mg(2+) Homeostasis in Mammals.' *Nature Communications* 1 (November): 109. <https://doi.org/10.1038/ncomms1108>.
76. Sadler, Katelyn E, Francie Moehring, Stephanie I Shiers, Lauren J Laskowski, Alexander R Mikesell, Zakary R Plautz, Allison N Brezinski, et al. 2021. 'Transient Receptor Potential Canonical 5 Mediates Inflammatory Mechanical and Spontaneous Pain in Mice.' *Science Translational Medicine* 13 (595). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd7702>.
77. Sah, Rajan, Pietro Mesirca, Marjolein Van den Boogert, Jonathan Rosen, John Mably, Matteo E Mangoni, and David E Clapham. 2013. 'Ion Channel-Kinase TRPM7 Is Required for Maintaining Cardiac Automaticity.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (32): E3037-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311865110>.
78. Semtner, Marcus, Michael Schaefer, Olaf Pinkenburg, and Tim D Plant. 2007. 'Potentiation of TRPC5 by Protons.' *The Journal of Biological Chemistry* 282 (46): 33868–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702577200>.
79. Sharma, Swagat, and Corey R Hopkins. 2019. 'Review of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC5) Channel Modulators and Diseases.' *Journal of Medicinal Chemistry* 62 (17): 7589–7602. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01954>.
80. Sukumar, Piruthivi, and David J Beech. 2010. 'Stimulation of TRPC5 Cationic Channels by Low Micromolar Concentrations of Lead Ions (Pb²⁺).' *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393 (1): 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.074>.
81. Sun, Hong-Shuo, Michael F Jackson, Loren J Martin, Karen Jansen, Lucy Teves, Hong Cui, Shigeki Kiyonaka, et al. 2009. 'Suppression of Hippocampal TRPM7 Protein Prevents Delayed Neuronal Death in Brain Ischemia.' *Nature Neuroscience* 12 (10): 1300–1307. <https://doi.org/10.1038/nn.2395>.
82. Tai, Chao, Dustin J Hines, Hyun B Choi, and Brian A MacVicar. 2011. 'Plasma Membrane Insertion of TRPC5 Channels Contributes to the Cholinergic Plateau Potential in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons.' *Hippocampus* 21 (9): 958–67. <https://doi.org/10.1002/hipo.20807>.
83. Tang, J, Y Lin, Z Zhang, S Tikunova, L Birnbaumer, and M X Zhu. 2001. 'Identification of Common Binding Sites for Calmodulin and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors on the

- Carboxyl Termini of Trp Channels.' *The Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 21303–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102316200>.
84. Tang, Y, J Tang, Z Chen, C Trost, V Flockerzi, M Li, V Ramesh, and M X Zhu. 2000. 'Association of Mammalian Trp4 and Phospholipase C Isozymes with a PDZ Domain-Containing Protein, NHERF.' *The Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 37559–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006635200>.
 85. Tao, Lerong, Gang Guo, Yanyan Qi, Yong Xiong, Xueyu Ma, Nan Wu, Chao Dong, and Cui Yang. 2020. 'Inhibition of Canonical Transient Receptor Potential 5 Channels Polarizes Macrophages to an M1 Phenotype.' *Pharmacology* 105 (3–4): 202–8. <https://doi.org/10.1159/000503452>.
 86. Thiel, W. 1992. '[The Preservation of the Whole Corpse with Natural Color].' *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 174 (3): 185–95.
 87. Trebak, Mohamed, Loic Lemonnier, Wayne I DeHaven, Barbara J Wedel, Gary S Bird, and James W Putney. 2009. 'Complex Functions of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Regulation of TRPC5 Cation Channels.' *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 457 (4): 757–69. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0550-1>.
 88. Tsunoda, Y. 1998. 'Receptor-Operated Calcium Influx Mediated by Protein Tyrosine Kinase Pathways.' *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 18 (4–6): 281–310. <https://doi.org/10.3109/10799899809047748>.
 89. Venkatachalam, Kartik, and Craig Montell. 2007. 'TRP Channels.' *Annual Review of Biochemistry* 76: 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>.
 90. Walsh, Liron, John F Reilly, Caitlin Cornwall, Gregory A Gaich, Debbie S Gipson, Hiddo J L Heerspink, Leslie Johnson, et al. 2021. 'Safety and Efficacy of GFB-887, a TRPC5 Channel Inhibitor, in Patients With Focal Segmental Glomerulosclerosis, Treatment-Resistant Minimal Change Disease, or Diabetic Nephropathy: TRACTION-2 Trial Design.' *Kidney International Reports* 6 (10): 2575–84. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.07.006>.
 91. Wang, Dan, Zhuang-Li Zhu, Da-Cen Lin, Si-Yi Zheng, Kun-Han Chuang, Long-Xin Gui, Ru-Hui Yao, Wei-Jie Zhu, James S K Sham, and Mo-Jun Lin. 2021. 'Magnesium Supplementation Attenuates Pulmonary Hypertension via Regulation of Magnesium Transporters.' *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 77 (2): 617–31. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14909>.
 92. Wang, Hongbo, Xiaoding Cheng, Jinbin Tian, Yuling Xiao, Tian Tian, Fuchun Xu, Xuechuan Hong, and Michael X Zhu. 2020. 'TRPC Channels: Structure, Function, Regulation and Recent Advances in Small Molecular Probes.' *Pharmacology & Therapeutics* 209 (May): 107497. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107497>.

93. Wei, Chaoliang, Xianhua Wang, Min Chen, Kunfu Ouyang, Long-Sheng Song, and Heping Cheng. 2009. 'Calcium Flickers Steer Cell Migration.' *Nature* 457 (7231): 901–5. <https://doi.org/10.1038/nature07577>.
94. White, Thomas A, Ailing Xue, Eduardo N Chini, Michael Thompson, Gary C Sieck, and Mark E Wylam. 2006. 'Role of Transient Receptor Potential C3 in TNF-Alpha-Enhanced Calcium Influx in Human Airway Myocytes.' *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35 (2): 243–51. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0003OC>.
95. Xu, Shang-Zhong, Piruthivi Sukumar, Fanning Zeng, Jing Li, Amit Jairaman, Anne English, Jacqueline Naylor, et al. 2008. 'TRPC Channel Activation by Extracellular Thioredoxin.' *Nature* 451 (7174): 69–72. <https://doi.org/10.1038/nature06414>.
96. Xu, Tao, Bao-Ming Wu, Hong-Wei Yao, Xiao-Ming Meng, Cheng Huang, Ming-Ming Ni, and Jun Li. 2015. 'Novel Insights into TRPM7 Function in Fibrotic Diseases: A Potential Therapeutic Target.' *Journal of Cellular Physiology* 230 (6): 1163–69. <https://doi.org/10.1002/jcp.24801>.
97. Yamada, H, M Wakamori, Y Hara, Y Takahashi, K Konishi, K Imoto, and Y Mori. 2000. 'Spontaneous Single-Channel Activity of Neuronal TRP5 Channel Recombinantly Expressed in HEK293 Cells.' *Neuroscience Letters* 285 (2): 111–14. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01033-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01033-8).
98. Yang, Chu-Wei, Hui Liu, Xiang-Dong Li, Shao-Guang Sui, and Yu-Fei Liu. 2018. 'Salvianolic Acid B Protects against Acute Lung Injury by Decreasing TRPM6 and TRPM7 Expressions in a Rat Model of Sepsis.' *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (1): 701–11. <https://doi.org/10.1002/jcb.26233>.
99. Yang, Fan, and Jie Zheng. 2017. 'Understand Spiciness: Mechanism of TRPV1 Channel Activation by Capsaicin.' *Protein & Cell* 8 (3): 169–77. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0353-7>.
100. Yoshida, Takashi, Ryuji Inoue, Takashi Morii, Nobuaki Takahashi, Shinichiro Yamamoto, Yuji Hara, Makoto Tominaga, Shunichi Shimizu, Yoji Sato, and Yasuo Mori. 2006. 'Nitric Oxide Activates TRP Channels by Cysteine S-Nitrosylation.' *Nature Chemical Biology* 2 (11): 596–607. <https://doi.org/10.1038/nchembio821>.
101. Yu, Mingzhe, Cheng Huang, Yan Huang, Xiaoqin Wu, Xiaohui Li, and Jun Li. 2013. 'Inhibition of TRPM7 Channels Prevents Proliferation and Differentiation of Human Lung Fibroblasts.' *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 62 (11): 961–70. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0653-9>.
102. Zhang, Pengju, Wei Li, Yaan Liu, Yanqin Gao, and Nashat Abumaria. 2022. 'Neuroprotective Effects of TRPM7 Deletion in Parvalbumin GABAergic vs. Glutamatergic Neurons Following Ischemia.' *Cells* 11 (7). <https://doi.org/10.3390/cells11071178>.

103. Zholos, Alexander V. 2014. 'TRPC5.' *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 129–56. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_6.
104. Zhu, Michael Xi. 2005. 'Multiple Roles of Calmodulin and Other Ca(2+)-Binding Proteins in the Functional Regulation of TRP Channels.' *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 451 (1): 105–15. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1427-1>.
105. Zhu, Yifei, Mengru Gao, Tingting Zhou, Mingxu Xie, Aiqin Mao, Lei Feng, Xiaoqiang Yao, Wing Tak Wong, and Xin Ma. 2019. 'The TRPC5 Channel Regulates Angiogenesis and Promotes Recovery from Ischemic Injury in Mice.' *The Journal of Biological Chemistry* 294 (1): 28–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005392>.
106. Zimmermann, Katharina, Jochen K Lennerz, Alexander Hein, Andrea S Link, J Stefan Kaczmarek, Markus Delling, Serdar Uysal, John D Pfeifer, Antonio Riccio, and David E Clapham. 2011. 'Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 5 (TRPC5) Is a Cold-Transducer in the Peripheral Nervous System.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (44): 18114–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115387108>.

11 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden innerhalb eines wissenschaftlichen Journals zur Veröffentlichung eingereicht. Die Publikation dieser Ergebnisse steht zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Dissertation noch aus.

Vergangene Publikationen	
07/2023	Gu Yuan, Maximilian A Becker, Luisa Müller, Katharina Reuss, Frederik Umlauf, Tianci Tang, Michael D Menger, and Matthias W Laschke. 2023. 'MicroRNAs in Tumor Endothelial Cells: Regulation, Function and Therapeutic Applications.' <i>Cells</i> 12 (13). https://doi.org/10.3390/cells12131692 .

12 Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Prof. Thomas Tschernig bedanken. Er überließ mir nicht nur das Thema meiner Dissertation, sondern stellte mir das Labor, die Proben und Verbrauchsmaterialien zur Verfügung. Prof. Tschernig bot mir die Möglichkeit, meine Arbeit eigenständig zu gestalten und Ideen einzubringen. Dennoch stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Diese Arbeitsweise war nicht nur sehr angenehm und ermutigte mich zum wissenschaftlichen Arbeiten, sondern bot mir eine Freiheit, die alles andere als selbstverständlich ist. Vielen Dank!

Ein ebenso großes Dankeschön möchte ich auch an Irina Scheck und Katja Schäfer sowie an Alexander Grissmer richten. Sie zeigten mir alle benötigten Arbeitstechniken und waren jederzeit bereit, mir Hilfestellung zu geben. Ich möchte mich ebenfalls bei meinen Mitstudenten bedanken, die mir nicht nur mit praktischen Tipps zur Seite standen, sondern auch halfen, das Farbprotokoll zu optimieren.

Zusätzlich möchte ich mich beim Institut für Pathologie des Bundeswehrzentralkrankenhauses Koblenz unter der Leitung von Oberstarzt Dr. Erich Sieber für das unkomplizierte Bereitstellen eines Mikroskops während meiner Famulatur bedanken. In diesem Zuge möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Fidelis Flockerzi (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universität des Saarlandes) für die Beurteilung meiner Proben bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei BioRender.com bedanken. Durch Ihr bereitgestelltes Tool konnte ich viele meiner Abbildungen erstellen.

Zu guter Letzt gilt besonderer Dank auch meinen Eltern Kerstin und Andreas, meiner Schwester Manon, meiner Freundin Johanna und meinen Freunden. Ihre liebevolle Unterstützung half mir, nicht nur meine Dissertation zu verfassen, sondern auch mich zu verwirklichen und zu der Person zu werden, die ich heute bin. Darüber bin ich unendlich dankbar.

13 Lebenslauf

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