Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Expression des TRPC6-Kanals in humanem Gewebe des hepatobiliären Systems

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2022

vorgelegt von

Mariesa Sandra Walz

geb. am 29.08.1998 in Neumarkt in der Oberpfalz

Tag der Promotion: 06.10.2022

Betreuer: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Tschernig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Yildiz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 6

1 Zusammenfassung/Summary 7

1.1 Zusammenfassung 7

1.1 Summary 8

2 Einleitung 9

2.1 Calciumkanäle in der Signalübertragung 9

2.2.1 Familie der TRP-Kanäle 11

2.2.2 TRPC-Kanäle 14

2.2.3 TRPC6-Kanäle 15

2.2.3.1 Struktur 15

2.2.3.2 Aktivierungsmechanismen 17

2.2.3.3 Inaktivierung 19

2.2.3.4 Regulationsmechanismen 19

2.2.3.5 Expression und Funktion 21

2.2.3.6 TRPC6 in verschiedenen Organsystemen und Pathologien 21

2.3 Anatomie des hepatobiliären Systems 24

2.3.1 Leber 24

2.3.2 Gallenblase und extrahepatische Gallenwege 26

2.4 Rolle von Calcium und dem TRPC6-Kanal im hepatobiliären System 27

2.5 Zielsetzung der Arbeit 31

3 Material und Methoden 32

3.1 Material 32

3.2 Methoden 38

3.2.1 Fixierung der Körperspender 38

3.2.1.1 Körperspende am Universitätsklinikum des Saarlandes 38

3.2.1.2 Fixierung – Grundlagen 38

3.2.1.3 Ablauf der Fixierung am Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes 39

3.2.2 Ethikvotum 40

3.2.3 Probenentnahme 40

3.2.4 Aufbereitung der Gewebeproben 43

3.2.5 Färbungen 46

3.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung 46
3.2.5.2 Immunhistochemie 48
3.2.6 Ergebnisanalyse 55

4 Ergebnisse 56

4.1 Spenderkollektiv 56

4.2 Auswertungsschema 56

4.3 Kontrollen 58
4.3.1 Negativkontrollen 58
4.3.2 Peptidkontrolle 59

4.4 Auswertung der Leberschnitte 60
4.4.1 Variation der Primärantikörperkonzentrationen und DAB-Einwirkzeiten 64
4.4.2 TRPC6-Expressionsmuster in der Leber 66
4.4.2.1 Morphologische Zuordnung der Proteinexpression zu den Strukturen 66
4.4.2.2 Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins innerhalb der Leber eines Spenders und zwischen den Lebern verschiedener Spender 71

4.5 Leberpathologien 75
4.5.1 Spender 10 – Akute Stauung 75
4.5.2 Spender 07 – Steatose 78
4.5.3 Spender 11 – Lebermetastasen 80
4.5.4 Spender 02 – Leberzirrhose bei chronischer Hepatitis 84
4.5.5 Spender 08 – aktive Hepatitis 87

4.6 Auswertung der Gallenblasenschnitte 90
4.6.1 Variation der Konzentrationen 92
4.6.2 TRPC6-Expressionsmuster innerhalb der Gallenblase 93
4.6.2.1 Morphologische Zuordnung der Proteinexpression zu den Strukturen 94
4.6.2.2 Vergleich der Expression von TRPC6 innerhalb der Gallenblase eines Spenders und zwischen den Gallenblasen verschiedener Spender 100

4.7 Auswertung der extrahepatischen Gallenwege 104
4.7.1 TRPC6-Expressionsmuster in den extrahepatischen Gallenwegen 106
4.7.1.1 Morphologische Zuordnung der Proteinexpression zu den einzelnen Strukturen 106
4.7.1.2 Vergleich der Expression zwischen den extrahepatischen Gallenwegen verschiedener Körperspender 110

5 Diskussion 111

5.1 Diskussion der Ergebnisse - Lebergewebe 111
  5.1.1 Einordnung in die Literatur 113
  5.1.2 Pathologien 114

5.2 Diskussion der Ergebnisse – Biliäres System 116

5.3 Diskussion des verwendeten Materials 117

5.4 Diskussion der verwendeten Methode 118

6 Literaturverzeichnis 120

7 Abbildungsverzeichnis 129

8 Tabellenverzeichnis 132

9 Publikationen 133

10 Anhang 134

Danksagung 135

Lebenslauf 136

Abkürzungsverzeichnis

BDNF	Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (brain-derived neurotrophic factor)
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium, Calciumion
CC-Domäne	Coiled-Coil-Domäne
CRAC	Calciumfreisetzungsaktivierte Kanäle (calcium-release activated calcium channels)
DAB	3,3′-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
G-Protein	Guanylnucleotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IHC	Immunhistochemie
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
kD	kiloDalton
kg	Kilogramm
l	Liter
mAChR	muskarinerger Acetylcholinrezeptor
min	Minute
mM	Millimol, millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
mV	Millivolt
N-Terminus	Amino-Terminus
Na^{+}	Natrium, Natriumion
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol-400-Lösung
NGS	Ziegenserum (normal-goat-serum)
nM	Nanomol, nanomolar

OAG	1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
P_{Ca2+}/P_{Na+}	Permeabilität$_{\text{Calcium}}$/Permeabilität$_{\text{Natrium}}$
PKC	Proteinkinase C
pS	Pikosiemens
PtdIP$_2$	Phosphatidylinositol (4,5) -bisphosphat
PTK	Protein-Tyrosinkinasen
ROCE	Rezeptorgesteuerter Calciumeintrag (receptor-operated calcium entry)
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
SOCE	Speichergesteuerter Calciumeintrag, (store-operated calcium entry)
TRP	transientes Rezeptorpotential (transient receptor potential)
TRPA	TRP-Protein vom Ankyrin-Typ (transient receptor potential ankyrin)
TRPC	TRP-Protein vom kanonischen / klassischen Typ (transient receptor potential canonical)
TRPM	TRP-Protein vom Melastatin-Typ (transient receptor potential melastatin)
TRPML	TRP-Protein vom Mucolipin-Typ (transient receptor potential mucolipin
TRPN	TRP-Protein vom NO-Mechano-Potential-C-Kanal-Typ (transient receptor potential no mechanoreceptor potential C)
TRPP	TRP-Protein vom Polyzystin-Typ (transient receptor potential polycystin)
TRPV	TRP-Protein vom Vanilloid-Typ (transient receptor potential vanilloid)
VOCC	Spannungsgesteuerte Calciumkanäle (voltage-operated calcium channels)
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

Der TRPC6-Kanal ist ein calciumpermeabler nicht selektiver Kationenkanal, der zur Unterfamilie der kanonischen Transienten-Rezeptor-Potential-Kanäle (TRPC) zählt. Diese Unterfamilie umfasst insgesamt sieben Vertreter. Der Kanal ist sowohl an physiologischen als auch an pathophysiologischen Prozessen im menschlichen Organismus beteiligt. Mutationen dieses Ionenkanals sind für die Entwicklung einer Nierenerkrankung, der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), verantwortlich.

Eine entscheidende Rolle spielt der TRPC6-Kanal in überexprimierter Form auch im Wachstum des hepatozellulären Karzinoms (HCC) der Leber. Dieses Karzinom weist global gesehen die fünft höchste krebsbezogene Mortalität auf. In Zukunft soll dieser Kanal deshalb molekulares Ziel aussichtsreicher neuer Therapieformen sein. Während man deshalb vermehrt seiner Rolle in verschiedenen Leberpathologien Beachtung schenkt, ist seine Expression und Verteilung im gesunden Lebergewebe des Menschen nicht im Detail untersucht worden. Da die Leber eine Einheit mit dem biliären System (Gallenblase, extrahepatische Gallenwege) bildet und über die Expression und Lokalisierung des Kanals dort bis dato nichts bekannt war, hat sich diese Arbeit das Ziel gesetzt, die Expression und Lokalisierung dieses relevanten Kanals in eben diesen Strukturen zu untersuchen.

Hierfür wurden post mortem menschliche Gewebeproben aus dem hepatobiliären System von Körperspendern des Anatomischen Institutes des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen und untersucht. Es wurden immunhistochemische Methoden gewählt, da diese eine morphologische Zuordnung der Signale zu einzelnen Strukturen ermöglichen. Dies bot die Möglichkeit, neue Erkenntnisse zu den bisherigen Arbeiten zu gewinnen.

In der Leber konnte die Expression des Kanals in den Hepatozyten von allen untersuchten Lebern nachgewiesen werden. Die höchste Expression ließ sich dort subzellulär im Bereich der Plasmamembran feststellen. Außerdem zeigte sich eine leichte reaktive Zunahme der TRPC6-Expression in den Hepatozyten von Lebern, die von Gewebszerstörung (Zirrhose, Hepatitis) betroffen waren.

Sowohl im Gallenblasengewebe als auch in den extrazellulären Gallenwegen zeigte das Oberflächenepithel (Cholangiozyten) eine starke TRPC6-Protein-Expression, die der perinukleären Region zugeordnet werden konnte. Auch die glatte Muskulatur der Gallenblase wies eine deutliche TRPC6-Expression auf, deren Signalstärke zwischen den Gewebeproben variierte.

Diese Beobachtungen liefern den Nachweis, dass der TRPC6-Kanal im hepatobiliären System des Menschen vorkommt und in welchen Strukturen das Protein dort lokalisiert ist. Außerdem geben diese Ergebnisse Hinweise auf physiologische Funktionen des Kanals, welche bei der Entwicklung von zukünftigen Therapiestrategien beachtet werden müssen.

1.1 Summary

The TRPC6 channel is a calcium-permeable non-selective cation channel that belongs to the canonical transient receptor potential channel (TRPC) subfamily. This subfamily includes a total of seven representatives.

The channel is involved in both physiological and pathological processes in the human organism. Mutations of this ion channel are responsible for the development of the kidney disease FSGS (focal segmental glomerulosclerosis).

When overexpressed, the TRPC6 channel also plays a crucial role in the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) of the liver, which has the fifth highest cancer-related mortality globally. In the future, this channel is therefore expected to be a molecular target of promising new therapies.

While increased attention is therefore being paid to its role in various liver pathologies, its expression and distribution in healthy human liver tissue has not been studied in detail.

Since the liver forms a unit with the biliary system (gallbladder, extrahepatic bile ducts) and nothing is known about the expression and localization of the channel there until now, this work aimed to investigate the expression and localization of this relevant channel in these very structures.

For this purpose, post-mortem human tissue samples were obtained from the hepatobiliary system of body donors at the Anatomical Institute of Saarland University Hospital. To achieve this goal, immunohistochemical methods were chosen because they allow morphological assignment of signals to individual structures. This offers the possibility to gain new insights to the previous studies.

In the liver, expression of the channel was detectable in the hepatocytes of all livers examined.

The highest expression was found subcellularly in the plasma membrane region.

In addition, a slight reactive increase/condensation of TRPC6 expression was evident in the hepatocytes of livers affected by tissue destruction (cirrhosis, hepatitis).

In the gallbladder tissue as well as in the extracellular bile ducts, the surface epithelium (cholangiocytes) showed strong TRPC6 protein expression, which could be assigned to the perinuclear region. Smooth muscle in the wall of the gallbladder also showed significant TRP6 expression, with signal intensity varying between tissue samples.

These observations provide evidence that the TRPC6 channel is present in the human hepatobiliary system, and in which structures the protein is localized there. In addition, the localization within the structures provides clues to potential functions that need to be considered in the development of future therapeutic strategies.

2 Einleitung

2.1 Calciumkanäle in der Signalübertragung

Calcium ist das häufigste im menschlichen Organismus vorkommende Mineral [5]. Bei einer erwachsenen Person macht dieses Element circa 1 kg des Körpergewichtes aus. Das meiste Calcium ist im Knochen verbaut und dort in Form von Hydroxylapatit eingelagert [5].

Ein kleiner Teil des Knochen-Calciums kann dynamisch mit dem löslichen Calcium ausgetauscht werden [5]. Das lösliche Calcium liegt als freies hydratisiertes Ion vor und ist ein Signalmolekül in vielen Stoffwechselwegen sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen ([5] ; [103]).

Da Calcium in komplexen Vorgängen der Zelle eine Rolle spielt, ist es schwierig die Calcium-spezifischen Funktionen zu bestimmen. Essenziell ist Calcium bekanntermaßen in der Zellproliferation sowie Gentranskription [23]. Zu hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen führen allerdings zum Zelltod (Apoptose) [79]. Seine Konzentration wird deshalb intrazellulär streng reguliert und ist mit 100 nM um das 20.000fache niedriger als die extrazelluläre Konzentration (2 mM) [23].

Das durch Calcium vermittelte Signalisierungssystem ist sehr heterogen. Dies betrifft zum einen die Vielzahl der Komponenten als auch die räumliche und zeitliche Verteilung der Signale [11].

Die gemeinsame Endstrecke jedes Signalisierungssystems ist jedoch die Erhöhung des zytosolischen Calciums.

Zum Einstrom von Calcium in die Zelle und damit zur Erhöhung der Calciumkonzentration kann es durch unterschiedliche Mechanismen kommen:

Innerhalb der Plasmamembran sind unter anderem zwei Rezeptorklassen zu finden: Die Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GCRs) und die der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) [23]. Nach der Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls (Hormon oder Neurotransmitter) an die Rezeptoren, kommt es zur Aktivierung einer Isoform der Phospholipase C. Dieses Enzym führt zur Spaltung des Membranlipides Phosphatidylinositol (4,5) -bisphosphat (PtdlP$_2$) in ein wasserlösliches Signalmolekül Inositoltriphosphat (IP$_3$) sowie ein membrangebundenes Signalmolekül Diacylglycerin (DAG) (Abbildung 1). Das wasserlösliche IP$_3$ kann zum endoplasmatischen Retikulum, dem intrazellulären Calciumspeicher der Zelle, diffundieren und an seinen dort lokalisierten Rezeptor, den IP$_3$-Rezeptor, binden. Diese Bindung löst die Freisetzung von Calcium aus eben diesen Speichern aus [103].

Nach der Calciumerhöhung aus dem Zellinneren, kommt es auch zur Aktivierung von Plasmamembrankanälen. Dies geschieht zum einen durch das membrangebundene Signalmolekül DAG, zum anderen als Folge der Verarmung der Calciumspeicher. Es folgt der Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Milieu ([23] ; [68]).

Der Einstrom, der zum Auffüllen der Calciumvorräte in den Speichern der Zelle dient, wird als speichergesteuerter Calcium-Eintrag (store-operated calcium entry; SOCE) bezeichnet. Dieser wird durch die Calciumverarmung der Speicher aktiviert [51].

Der Weg über das Signalmolekül DAG ist unabhängig vom Speicherzustand des endoplasmatischen Retikulums.
Da DAG als Folge der Rezeptoraktivierung durch externe Signale gebildet wird, bezeichnet man diesen Einstrom als rezeptorgesteuerten Calcium-Eintrag (receptor-operated calcium entry; ROCE) [11].

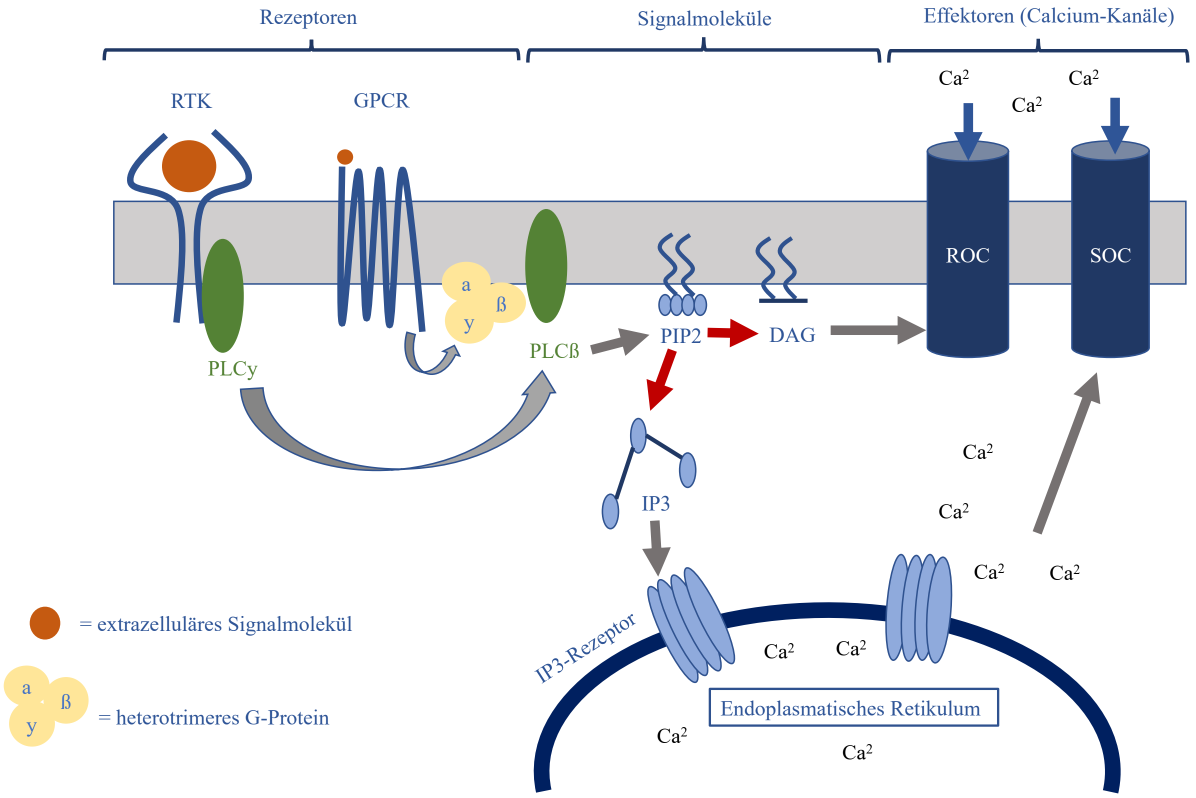

Rezeptoren
Signalmoleküle
Effektoren (Calcium-Kanäle)
RTK
GPCR
Ca^2
Ca^2
Ca^2
ROC
SOC
a
ß
y
PLCß
PLCy
PIP2
DAG
IP3
Ca^2
Ca^2
Ca^2
Ca^2
IP3-Rezeptor
Ca^2
Ca^2
Endoplasmatisches Retikulum
Ca^2
Ca^2
= extrazelluläres Signalmolekül
a
ß
y
= heterotrimeres G-Protein

Abbildung 1: Mechanismen zur Aktivierung der rezeptor- und speichergesteuerten Calciumkanäle; Aktivierung der G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK) führt über die Phospholipase C (PLC) zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 bindet an den IP_3-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, was zur Freisetzung von gespeichertem Calcium (Ca^{2+}) und zur Erschöpfung der Calciumspeicher führt. Die leeren Speicher bedingen dann den Einstrom von Calcium über die speichergesteuerten Kanäle (SOC), während DAG den Einstrom über rezeptorgesteuerte Calciumkanäle (ROC) auf direktem Wege vermittelt; eigene Darstellung in Anlehnung an [103].

Neben der Kanalaktivierung durch Rezeptoren und dem Speicherzustand des endoplasmatischen Retikulums, gibt es weitere calciumdurchlässige Plasmamembrankanäle, die durch andere Mechanismen aktiviert werden können.
Ein Sonderfall, der bisweilen gut erforscht wurde, stellt der in erregbaren Zellen vorkommende Mechanismus über spannungsgesteuerte Kanäle dar. Diese als „voltage-gated calcium channels (VOCC)“ bezeichneten Kanäle können den Calcium-Spiegel schnell in die Höhe treiben [23]. Die Öffnung der Kanalpore wird über eine Depolarisation (Erhöhung des Membranpotentials von -70 mV auf einen höheren Wert) der Zellen gesteuert. Spannungssensoren der S4-Helix der Kanäle detektieren diese und es kommt zu deren Konformationsänderungen und folglich zur Öffnung [23].

Auch intrazelluläre Signalmoleküle können das Ausgangssignal zur Öffnung von Plasmamembrankanälen sein. Ist dies der Fall bezeichnet man diese Kanäle als second-messenger-operated channels, wie z. B. die zyklischen Nukleotid-gesteuerten Kanäle [11].

Außerdem gibt es Kanaltypen, die nicht nur einer der Kategorien zuzuordnen sind. Diese reagieren auf eine Vielzahl von Stimuli wie Temperatur und Dehnung. Viele dieser vielfältig modulierbaren Kanäle gehören zur Familie der transient-receptor-potential (TRP)-Ionenkanäle [11].

2.2 TRP-Kanäle

2.2.1 Familie der TRP-Kanäle

Bei den TRP-Kanälen handelt es sich um eine Familie von nicht selektiven, calciumpermeablen Kationenkanälen [91].

Der erste TRP-Kanal wurde im Jahr 1969 im Auge der Fliege „*Drosophilia melanogaster*“ entdeckt. Auf ihn aufmerksam wurde man durch seine mutierte Version. Diese zeigte in elektrophysiologischen Ableitungen nach kurzer Belichtung nur einen kurz anhaltenden, transienten Einstrom statt eines anhaltenden Plateaus [25]. Aus diesen Beobachtungen ergab sich auch der Name des Kanals: transient-receptor potential channel kurz TRP-Kanal [74].

Es dauerte einige Zeit, bis man erkannte, dass es sich bei dem TRP-Kanal sowie dem nahverwandten TRPL-Kanal um Vermittler der Phototransduktion im Auge der Fliegen handelt [80].

Im Jahr 1995 konnte dann durch die Arbeiten von Birnbaumer und Montell der erste in Säugetieren vorkommende TRP-Kanal „TRPC1“ aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zum Drosophilia-TRP gefunden werden. Dieser Kanal gründete damit die klassische TRP-Familie (TRPC) und damit die Erste von mittlerweile sieben beschriebenen Unterfamilien ([131] ; [126]).

Neben der TRPC- (kanonische)-Familie, auf die später noch genauer eingegangen wird, existiert die Familie der TRPV- (Vanilloid-), TRPM- (Melastatin), TRPP- (Polycystin), TRPML- (Mucolipin-), TRPA- (Ankyrin-)-Kanäle sowie die der TRPN-Kanäle.

Diese sieben Unterfamilien enthalten insgesamt mehr als fünfzig Mitglieder, die in Vertebraten, Würmern, Fliegen und Fischen gefunden werden können [36]. Betrachtet man nur die TRP-Kanäle, die in Säugetieren vorkommen, so beschränkt sich die Anzahl auf 28. Diese 28 Kanäle verteilen sich lediglich auf sechs Unterfamilien (Abbildung 2) [36].

Die TRPN-Familie enthält TRP-Kanäle, die nur in niederen Vertebraten und wirbellosen Tieren exprimiert werden und gehört somit formal nicht in die Gruppe der Säugetier-TRPs [106].

Aufgrund der Übereinstimmung in Teilen ihrer Aminosäurensequenz können die oben genannten Unterfamilien in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden. Während die erste Gruppe fünf Mitglieder umfasst (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN und TRPA), befinden sich in der zweiten Gruppe nur zwei Mitglieder (TRPP und TRPML) [119].

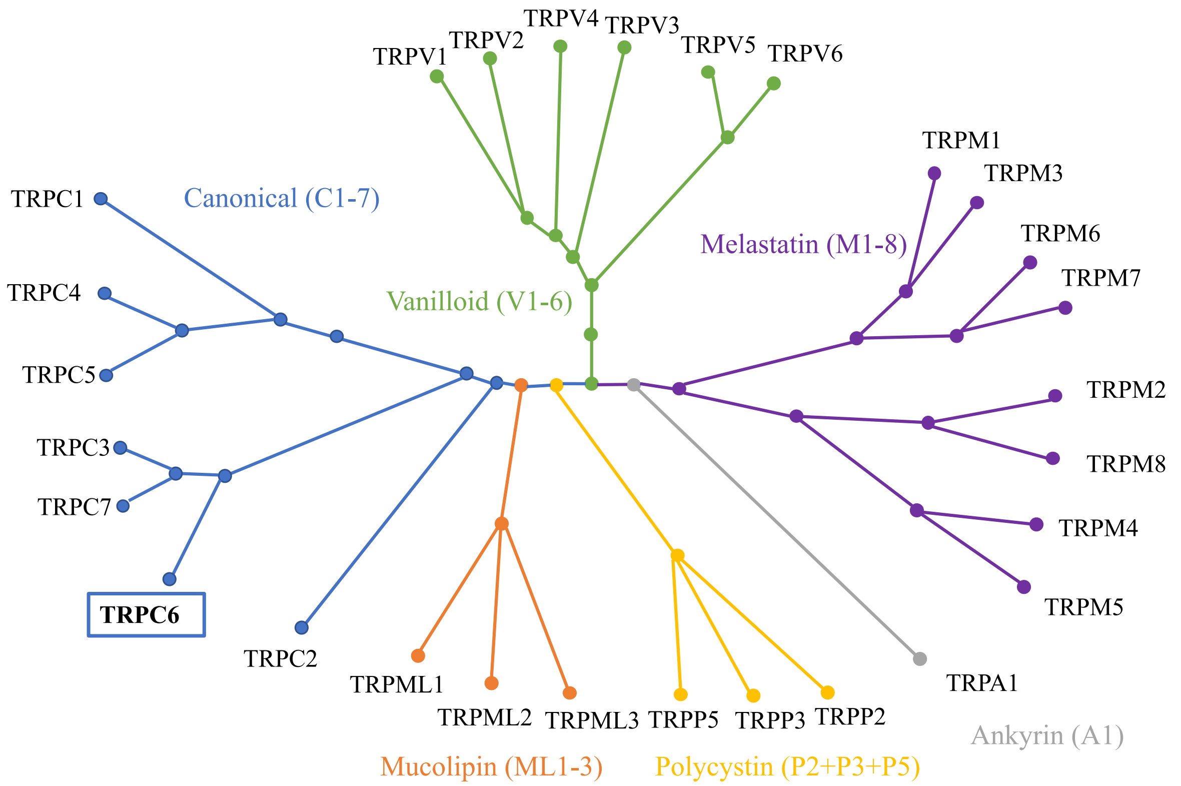

TRPV1
TRPV2
TRPV4
TRPV3
TRPV5
TRPV6
TRPM1
TRPM3
Melastatin (M1-8)
TRPM6
TRPM7
TRPC1
Canonical (C1-7)
TRPC4
Vanilloid (V1-6)
TRPC5
TRPM2
TRPC3
TRPM8
TRPC7
TRPM4
TRPC6
TRPM5
TRPC2
TRPA1
TRPML1
TRPML2
TRPML3
TRPP5
TRPP3
TRPP2
Ankyrin (A1)
Mucolipin (ML1-3)
Polycystin (P2+P3+P5)

Abbildung 2: Darstellung des Stammbaums der Säugetier-TRP-Kanäle, 6 Subfamilien, 28 Mitglieder; eigene Darstellung in Anlehnung an [36].

Allen Mitgliedern gleich ist ihre Grundstruktur: Diese besteht aus sechs membrandurchspannenden Helices (S1-S6), einer porenbildenden Schleife zwischen S5 und S6, sowie einer intrazellulären NH_2- und COOH-Domäne (Abbildung 3 rechts im Bild) [81].

Vier dieser Untereinheiten schließen sich zu einem funktionellen Komplex aus 24 Transmembranhelices zusammen. Sie sind symmetrisch um eine zentrale Pore angeordnet, die durch die S5- und S6-Helix der vier Untereinheiten geformt wird. Diese tetramere Struktur kann sowohl durch homologe als auch durch heterologe Zusammenschlüsse gebildet werden (Abbildung 3 links im Bild) [47].

Durch die Bildung von Heteromeren können sich neue Eigenschaften der Kanäle im Hinblick auf deren Aktivierung sowie die Durchlässigkeit für Ionen je nach Untereinheiten ergeben [98].

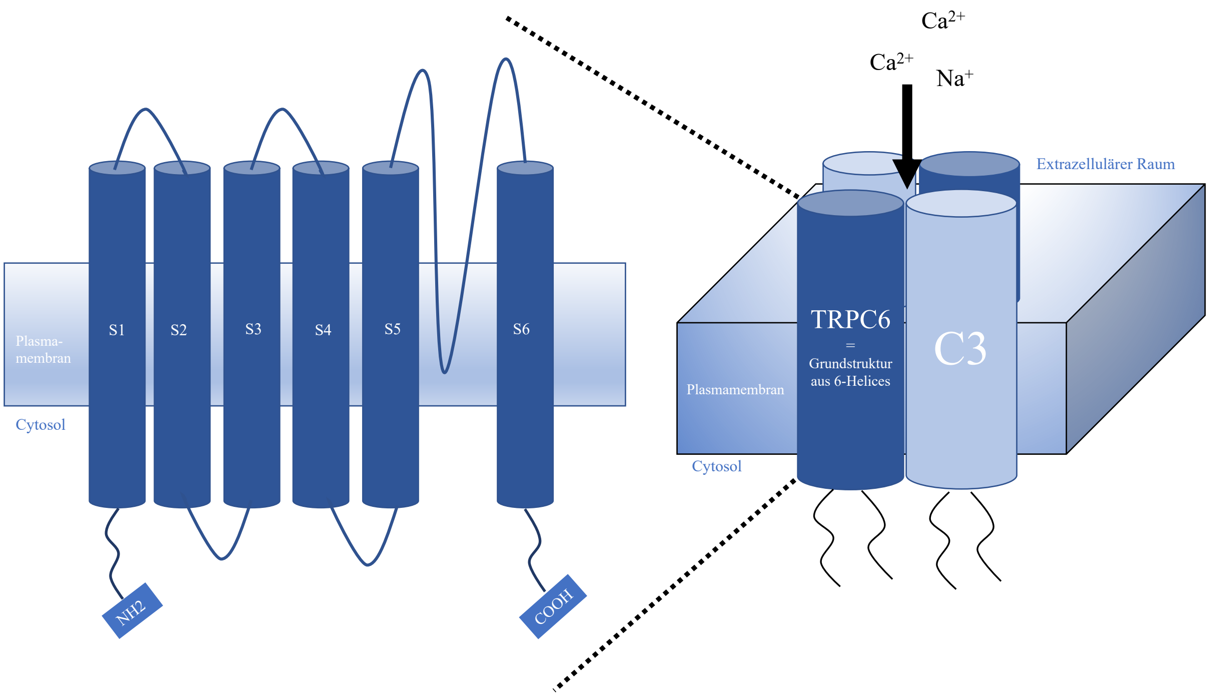


Abbildung 3: Membrantopologie der transient-receptor-potential (TRP)-Kanäle: rechts im Bild: Darstellung der sechs membrandurchspannenden Helices (Grundstruktur); links im Bild: Tetramere Struktur aus vier Grundstrukturen am Beispiel des TRPC6/TRPC3-Heteromer; eigene Darstellung in Anlehnung an [31].

Ihrem Grundaufbau nach haben die TRP-Kanäle Ähnlichkeiten zur Familie der spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle. Dennoch fehlt ihnen der für die Spannungssensitivität charakteristische Sensor in der vierten Transmembranhelix (S4). In spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen findet man hier konservierte Asparaginreste. Diese sind positiv geladen. In den TRP-Kanälen hingegen sind diese durch ungeladene Aminosäuren ersetzt und somit funktionslos [75].

Die TRP-Kanäle sind sowohl für divalente Kationen wie Calcium als auch für monovalente Kationen wie Natrium durchlässig [91]. Dabei sind die meisten Kanäle dieser Familie leitfähiger für Calcium als für Natrium (Permeabilität(P)$_{Ca2+}$/Permeabilität(P)$_{Na+}$ = 1–10). Unter den TRP-Kanälen gibt es auch Calcium-selektive Kanäle wie TRPM3α2, TRPV5, TRPV6, aber auch Natrium-selektive Kanäle wie TRPM3α1, TRPM4, TRPM5. Deshalb rangiert die Permeabilität (Quotient aus P_{Ca2+}/P_{Na+}) der einzelnen Mitglieder zwischen Werten von < 0,05 (Natrium-selektiv) bis zu Werten von >100 (Calcium-selektiv) [91].

Die Möglichkeiten zur Aktivierung der Kanäle sind sehr vielfältig und unterscheiden sich zwischen den Kanälen auch innerhalb einer Unterfamilie. Jeder Kanal verfügt dabei über mehrere Mechanismen, die sich auch gegenseitig beeinflussen können. So haben diese Kanäle eine Vermittlerfunktion inne, um die Information gebündelt an die Zelle weitergeben zu können [119].

TRP-Kanäle kommen ubiquitär in Säugetierorganismen vor und erfüllen eine Reihe von Funktionen sowohl in sensorischen Signalkaskaden als auch auf zellulärer Ebene [119].

Neben ihrer Lokalisation in der Plasmamembran der Zelle, können TRP-Kanäle auch in intrazellulär gelegenen Organellen vorkommen [91].

2.2.2 TRPC-Kanäle

Die TRPC-Kanäle sind dem Drosophila-Kanal am ähnlichsten. Sie stimmen zu 30 bis 40 % ihrer Aminosäurensequenz mit dem Gründungsmitglied überein [119].

Diese Unterfamilie beinhaltet sieben in Säugetieren vorkommende Kanäle (C1-C7). Von diesen sieben Kanälen kommen sechs im menschlichen Organismus vor [119].

Bei TRPC2 handelt es sich beim Menschen um ein Pseudogen. Durch ein Stopcodon an der Stelle 690 kommt es zu einem vorzeitigen Translationsabbruch. Dieses Protein ist somit beim Menschen verkürzt und damit nicht funktionsfähig. Seine ursprüngliche Funktion konnte an Mäusen untersucht werden. Hier ist es für die Pheromonwahrnehmung im Vomeronasalorgan zuständig ([116] ; [70]).

Innerhalb der Familie der TRPC-Kanäle können vier Gruppen formiert werden. Die Zuteilung der Kanäle zu diesen Gruppen beruht auf Ähnlichkeiten ihrer Aminosäurensequenz sowie ihrer Aktivierungsmechanismen [119].

1. Gruppe 1: TRPC1
2. Gruppe 2: TRPC2
3. Gruppe 3: TRPC3/6/7
4. Gruppe 4: TRPC 4/5

Hierbei bilden der TRPC1- und TRPC2-Kanal jeweils eine eigenständige Gruppe. Der TRPC2-Kanal hat dabei die geringste Ähnlichkeit zu allen Mitgliedern der TRPC-Familie [75].

Der TRPC4- und TRPC5-Kanal weisen zueinander eine Sequenzähnlichkeit von 65 % auf [86], während die Mitglieder der dritten Gruppe rund um TRPC3, C6 und C7 eine Sequenzähnlichkeit von 70 bis 80% besitzen [117].

Die Bildung von heterologen Tetrameren ist für TRPC-Kanäle innerhalb der Grenzen dieser Gruppenzugehörigkeit möglich. Dabei bedingt der Zusammenschluss der verschiedenen TRPC-Proteine unterschiedliche Eigenschaften der Kanaleinheit. Während TRPC4 sowie C5 interagieren können, bilden die Mitglieder der Gruppe rund um TRPC 3/6/7 untereinander Komplexe aus [52].

TRPC1 kann hingegen mit allen Mitgliedern der TRPC-Familie interagieren. Während hierbei die Interaktion mit TRPC1 für den TRPC4/5 Kanal hinreichend bekannt ist ([52] ; [37]), konnte die Interaktion mit TRPC3/6/7 durch elektrophysiologische Ableitungen erstmals gezeigt werden [109]. Die Interaktion mit TRPC1 verringert dabei die Kanalleitfähigkeit der Interaktionspartner. Somit stellt die Heteromerbildung auch eine Möglichkeit zur Steuerung der Kanalaktivität dar [109].

Alle TRPC-Kanäle können durch Phospholipase C-gesteuerte Rezeptoren aktiviert werden [77]. Da aus der Phospholipase C-Aktivität verschiedene Signalwege resultieren können, wurde für alle Mitglieder der TRPC-Familie sowohl eine Beteiligung am ROCE als auch am SOCE diskutiert. Dabei ist der rezeptorgesteuerte Calcium-Eintrag für einige TRPC-Kanäle bereits erwiesen worden [51]. Bezogen auf den speichergesteuerten Calcium-Eintrag ist die Datenlage für einzelne Kanäle noch unklar.

2.2.3 TRPC6-Kanäle

Der TRPC6-Kanal wurde das erste Mal im Jahr 1997 im Gehirn von Mäusen durch eine Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-basierte Strategie entdeckt [16].

Dieses Kanalprotein umfasst eine Länge von 931 Aminosäuren und seine Erbinformation ist auf dem Chromosom 11 q21–q22 lokalisiert ([16] ; [119]).

2.2.3.1 Struktur

Neben der TRP-Kanal-typischen sechs-helikalen transmembranösen Struktur besitzen die TRPC6-Kanäle an den zytosolischen Enden für sie charakteristische Domänen [21]. Diese können die Funktion der Kanäle steuern oder die Struktur der Komplexe stabilisieren. Einen Überblick über die Anordnung der im folgenden erwähnten Domänen bietet die Abbildung 4.

N-Terminal besitzen die TRPC6-Kanäle vier Ankyrin-Wiederholungen [21].

Darauffolgend findet sich N-Terminal eine Coiled-Coil (CC)-Domäne. Sowohl die Ankyrin-Wiederholungen als auch die N-terminale CC-Domäne sind für den korrekten Zusammenschluss zu einer tetrameren Struktur zuständig [64].

Der sechsten Transmembranhelix schließt sich der C-Terminus des TRPC6-Kanals an. Im C-Terminus findet man zunächst die TRP-Domäne, die in allen TRPC-Kanälen vorkommt und in diesen strukturell gleich aufgebaut ist. Die TRP-Domäne enthält eine hochkonservierte Struktur, die TRP-Box, mit der Konsensussequenz „EWK-FAR“. Die TRP-Domäne trägt zur Steuerung der Kanäle bei, indem sie zwischen Signal und dem konsekutiven Öffnen vermittelt [40].

C-Terminal gelegen ist auch die Bindestelle für Calmodulin und den IP3-Rezeptor. Diese Stelle, kurz auch CRIB genannt, ist an der Regulation der Kanalöffnung durch die beiden namensgebenden Signalstoffe beteiligt [120]. An diese schließt sich über eine Verbindungshelix die viergliedrige CC-Domäne an. Diese CC-Domäne trägt wie auch die N-Terminal gelegen CC-Domäne zur Stabilisierung der tetrameren Kanalstruktur bei [21].

Dreidimensional ergibt sich für die TRPC6-Kanäle eine zweischichtige Architektur. Die obere Schicht wird durch die Transmembranhelices gebildet, während die untere Schicht durch die zytosolischen Domänen der C- und N-terminalen Reste gebildet wird [112].

Die Pore, durch die Ionen durchtreten, wird gemeinsam durch acht porenbildende Helices gebildet. Davon stammen jeweils zwei Helices (S5-S6) aus einer der vier Untereinheiten. Diese Helices sind Teil des Selektivitätsfilters und nach zentral gerichtet [24].

Die vier Porenschleifen, wobei jede Untereinheit eine beiträgt, sind an der Steuerung der Selektivität beteiligt und bilden das obere Eintrittstor. Die Porenschleifen liegen extrazellulär zwischen der S5- sowie S6-Helix der Untereinheit und tauchen retrograd in die Pore ein [24].

Das konservierte Leucin-Phenylalanin-Tryptophan-(LFW)-Motiv als Bestandteil der Porenschleife trägt zu deren richtigen Platzierung innerhalb der Pore bei [21].

Die Selektivität für bestimmte Ionen wird dabei von den Aminosäuren der Porenschleife bestimmt. Bei TRPC6-Kanälen handelt es sich bei den die Selektivität bestimmenden Aminosäuren um Glycin und Phenylalanin [112].

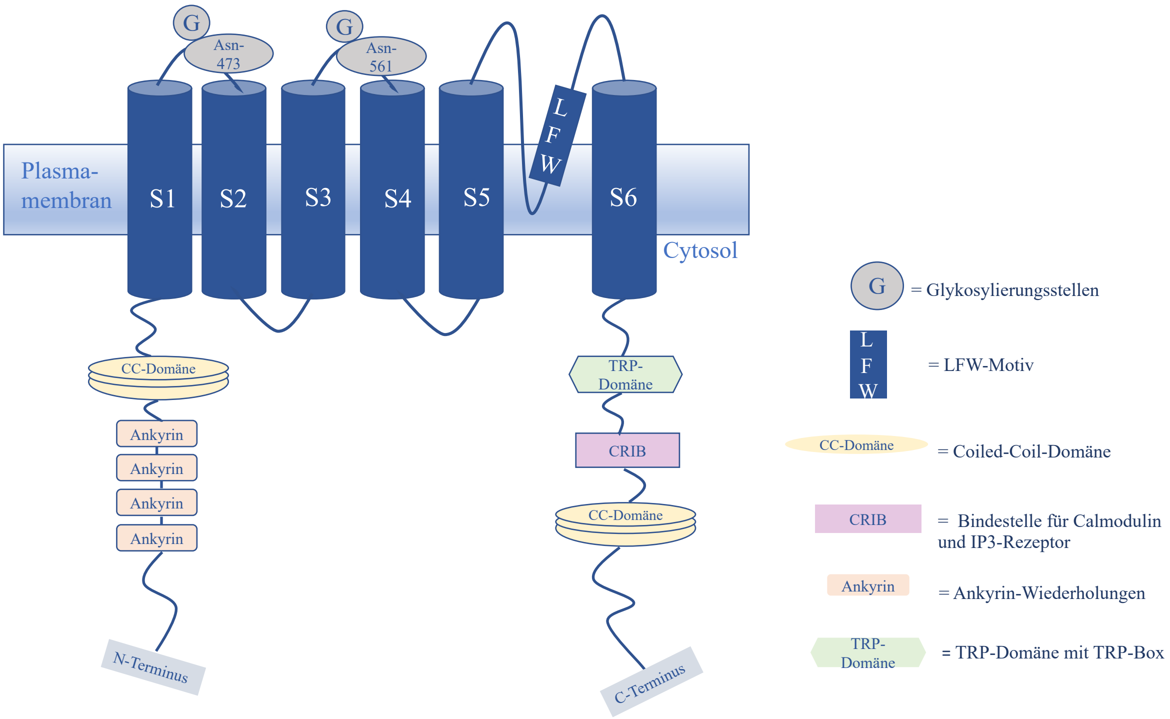

G
Asn-473
G
Asn-561
L F W
Plasma-membran
S1
S2
S3
S4
S5
S6
Cytosol
CC-Domäne
Ankyrin
Ankyrin
Ankyrin
Ankyrin
N-Terminus
TRP-Domäne
CRIB
CC-Domäne
C-Terminus
G = Glykosylierungsstellen
L F W = LFW-Motiv
CC-Domäne = Coiled-Coil-Domäne
CRIB = Bindestelle für Calmodulin und IP3-Rezeptor
Ankyrin = Ankyrin-Wiederholungen
TRP-Domäne = TRP-Domäne mit TRP-Box

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des TRPC6-Kanals: Transmembranöse 6-helikale Schicht samt Glykosylierungsstellen und Porenschleife sowie die N- als auch C-terminalen zytosolischen Enden samt der für TRPC6 charakteristischen Domänen, eigene Darstellung in Anlehnung an [31].

Die Permeabilitätseigenschaften, die sich daraus ergeben, sind charakteristisch für Mitglieder der TRPC-Familie. Der Permeabilitätsquotient aus der Leitfähigkeit von Calcium und Natrium beträgt fünf [90]. Somit sind die TRPC6-Kanäle durchlässiger für das zweiwertige Calcium als für das einwertige Natrium. Der Leitwert beträgt 28-37 pS [90].

Insgesamt besitzen die TRPC6-Kanäle im Vergleich zum nahverwandten TRPC3-Kanal nur eine geringe basale Grundaktivität [27]. Diese Eigenschaft des Kanals wird durch eine zweifache Glykosylierung an Asparaginresten der extrazellulären Schleifen bedingt. Zum einen betrifft dies die Aminosäure Asparagin an der Stelle 473 zwischen der S1- und S2-Helix, zum anderen den Asparagin-

Rest an der Stelle 561 zwischen der S3- und S4-Helix. Der TRPC6-Kanal ist somit ein streng regulierter Kanal, der für einen signifikanten Strom durch das Kanalprotein Aktivatoren benötigt [27].

2.2.3.2 Aktivierungsmechanismen

Der TRPC6-Kanal wird in einer Phospholipase C-abhängigen Weise aktiviert [21].

Zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die über die Phospholipase C zur Aktivierung von TRPC6 führen, gehören beispielsweise α_1-Adrenozeptoren, Angiotensin-II-Rezeptoren, muskarinerge Acetylcholinrezeptoren M1-3, Serotonin-Rezeptoren, Histamin-Rezeptoren und Bradykinin-Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden von den gleichnamigen Signalmolekülen angesteuert [1].

Als Vertreter der TRPC6-aktivierenden Rezeptortyrosinkinasen seien hier als Auswahl der platelet-derived growth factor-Rezeptor, der epidermal growth factor (EGF)-Rezeptor sowie der brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Rezeptor genannt [1].

Neben der TRPC-typischen Aktivierung durch die Phospholipase C, können die TRPC6-Kanäle durch eine Vielzahl weiterer Mechanismen aktiviert werden.

Diese reichen von Metaboliten, die physiologisch innerhalb einer Signalkaskade entstehen, über die direkte Aktivierung nach Zugabe eines Stoffes bis hin zur Veränderung physikalischer Parameter und dem Einbau des Kanals in die Plasmamembran.

Für die TRPC3/6/7 Untergruppe charakteristisch ist die direkte Aktivierung durch das endogene DAG, welches nach der Aktivität der Phospholipase C membrangebunden entsteht. Das endogene DAG sowie sein synthetisches Analogon OAG können die TRPC6-Kanäle aber auch Phospholipase C-unabhängig mit einem Schwellenwert von 10 µM aktivieren ([50] ; [45]).

Der gleiche Effekt wird durch die Hemmung der DAG-Lipase durch RHC80267 erreicht [2]. Eine Bindestelle für DAG am Kanal selbst konnte bisher noch nicht identifiziert werden [45].

Weitere Substanzen, die den TRPC6-Kanal aktivieren können, sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Aktivierungssubstanzen des TRPC6-Kanals

Substanz	Erklärung	Quelle
AIF4 (Tetrafluoroaluminat-Ion)	AIF4 kann an das heterotrimere G-Protein binden und ahmt dabei das gamma-Phosphat von Guanosintriphosphat (GTP) und somit den energiereichen, aktiven Zustand nach. Es folgt die Dissoziation in G_{alpha} und $G_{ßy}$ und damit die Initiierung der nachgeschalteten Signalwege.	[81] ; [12]
Flufenamate	Bei Flufenamate handelt es sich eigentlich um einen Kationenkanalblocker, der die nahverwandten Kanäle TRPC3 und C7 inaktiviert, TRPC6 hingegen aktiviert.	[55]
Hyperforin	Hyperforin, der Inhaltsstoff des Johanniskrauts, führt zur Erhöhung des Calcium- sowie Natriumeintrags durch den TRPC6-Kanal in die Zellen. Hyperforin hat eine antidepressive Wirkung, da es die Aufnahme von Noradrenalin und Serotonin hemmt. Vermutlich basiert diese antidepressive Wirkung auf der Aktivierung des TRPC6-Kanals.	[65]
Oxidativer Stress: Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	In Gegenwart der reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 wird der Kanal an seinen Cysteinresten oxidiert beziehungsweise werden redoxsensitive Proteine an ihren Thiolgruppen modifiziert, die dann auf den TRPC6-Kanal einwirken. Dies führt zu einem erhöhten Prozentsatz geöffneter Kanäle, einer Sensibilisierung für den Aktivator DAG sowie die Translokation des Kanals in die Plasmamembran. All diese Mechanismen führen zu einer Erhöhung des TRPC6-bedingten Kationeneinstroms in die Zelle.	[39]

Neben den oben aufgeführten Möglichkeiten, können auch Veränderungen physikalischer Parameter die TRPC6-Kanäle aktivieren.
Zu diesen zählen sowohl mechanisch- als auch osmotisch-bedingte Membranveränderungen (Druck und Volumen). Durch die Verformung der Plasmamembran kommt es folglich zu deren Ausdünnung. Der genaue Mechanismus, der als Folge der Ausdünnung die Kanäle aktiviert, ist bis dato nicht bekannt. Vermutet werden Lipid-Kanal-Interaktionen [108].

Außerdem erfolgt die Regulierung der Kanalaktivität über die Anzahl der TRPC6-Kanäle in der Plasmamembran. Die Anzahl wird dabei reaktiv durch einen exozytotischen Mechanismus erhöht.

Wird ein muskarinerger Acetylcholinrezeptor der GPCR-Familie stimuliert, so fusionieren intrazellulär gelegene, TRPC6-speichernde Endosomen mit der Plasmamembran. Prozentual steigt der Gehalt an TRPC6 von 12 % auf circa 40 bis 60 % an [20].

Auch eine Speicherentleerung im endoplasmatischen Retikulum sorgt vermutlich für eine Translokation der Kanäle in die Membran. Allerdings führt die Entleerung der Calciumspeicher lediglich zur Fusion der Endosomen mit der Membran, aber nicht zur Aktivierung der TRPC6-Kanäle [20].

2.2.3.3 Inaktivierung

Physiologisch können die TRPC6-Kanäle durch Protonen und damit einem niedrigen pH-Wert inhibiert werden [104].

Für Forschungszwecke ist die Inaktivierung der Kanäle durch Zugabe von externen Stoffen wichtig. Diese Inaktivierung kann für TRPC6-Kanäle durch folgende Substanzen erreicht werden:

SKF-96365 Hydrochloride, Lanthanum, Gadolinium, Amilorid, BTDM (2-(benzo[d] [1,3] dioxol-5-ylamino) thiazol- 4-yl) ((3 S,5 R) -3,5-dimethylpiperidin-1-yl) methanone sowie das Tarantula Peptid-Toxin GsMTx-4 [2].

Lanthanum und Gadolinium hemmen die Aktivität des TRPC6-Kanals, indem sie die Pore für den Durchtritt der Ionen verschließen. Bei den Kanälen TRPC4 und TRPC5 zeigt sich bei diesen Stoffen hingegen eine Potenzierung deren Leitfähigkeit [21].

BTDM erreicht die Inaktivierung des TRPC6-Kanals hingegen über einen anderen Mechanismus: Es klemmt sich zwischen die Porenhelices S5 und S6 und blockiert damit die Pore [112].

Bei dem TRPC6-Kanal-Antagonisten GsMTx-4 handelt es sich um ein Spinnengift aus Vogelspinnen. Dieses lagert sich in die äußere Schicht der Plasmamembran der Zelle ein und verhindert so die oben beschriebene Aktivierung des TRPC6-Kanals durch Dehnung der Membran. Außerdem hemmt das Peptid auch die Aktivierung des Kanals durch DAG und die Phospholipase C, was auf einen gemeinsamen molekularen Vermittlungsmechanismus hinweist [108].

2.2.3.4 Regulationsmechanismen

Eine Besonderheit birgt die Regulation des Kanals durch Calcium. Dieses Element kann den Kanal sowohl positiv als auch negativ in seiner Aktivität modulieren. TRPC6-Kanäle zeigen bei intrazellulären Calciumkonzentrationen unter 200 nM eine Erhöhung des Stroms, während Konzentrationen über 200 nM den Strom hemmen [105].

Nicht nur das intrazelluläre, sondern auch das extrazelluläre Calcium kann die Kanäle steuern. Die extrazelluläre Calcium-Regulierung zeigt hierbei einen ähnlichen biphasischen Verlauf. Extrazelluläres Calcium im submilli- bis millimolaren Bereich erhöht die Aktivität des Kanals, während Konzentrationen im hohen millimolaren Bereich die Aktivität spannungsabhängig hemmen [105].

MxA ist ein Protein, welches mit dem TRPC6-Kanal interagiert und dessen Aktivität erhöht. MxA gehört zur Dynamin-Familie und ist intrazellulär im Zytosol der Zelle gelegen [72]. Seine Bindestelle an TRPC6 liegt im Bereich der zweiten Ankyrin-Wiederholung. Diese verfügt über ein Sequenzmotiv (Haarnadel-Helix-Schleifen-Helix-Strukturen), welches für Interaktionen zwischen Proteinen konserviert ist und bei TRPC-Kanälen leichte Abwandlungen aufweist. Ob die direkte Bindung von MxA an das Kanalprotein zur Aktivitätserhöhung führt oder ob diese indirekt über weitere Mechanismen reguliert wird, ist unklar [72].

Wie oben anhand der Glykosylierungen des Kanals bereits gezeigt wurde, haben posttranslationale Modifikationen der Aminosäuren Einfluss auf die Aktivität des Kanals.

Zu diesen Modifikationen gehört auch die posttranslationale Phosphorylierung.

TRPC6-Kanäle können dabei sowohl an Threonin-, Tyrosin- und Serinresten phosphoryliert werden [43]. Je nach Enzym und Stelle unterscheiden sich die resultierenden Effekte auf den TRPC6-Kanal.

Tyrosinphosphorylierungen des Kanals werden durch Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie wie z.B. Fyn oder Scr gesteuert. Diese Phosphorylierungen wirken sich positiv auf den Einstrom durch die TRPC6-Kanäle aus [48]. Die Protein-Tyrosin-Kinasen werden dabei nach Stimulation des EGF-Rezeptors, eine Rezeptortyrosinkinase der Plasmamembran, aktiviert. Die Tyrosinphosphorylierungen sowie die DAG-Stimulation sind somit additiv in ihrer Wirkung [48].

Der Serinrest an Stelle 14 des TRPC6-Kanals ist über mehrere Spezies hinweg eine hochkonservierte Region und wird durch die mitogen aktivierten Kinasen p38 und ERK1 sowie Prolin-gerichteten Kinasen wie der Cyclin-abhängigen Kinase 5 phosphoryliert. Das Ergebnis der Phosphorylierung dieses Serinrestes ist eine erhöhte Membranexpression des TRPC6-Proteins [43].

Während es durch die Tyrosinphosphorylierungen der Kanäle zu einer erhöhten Aktivität kommt, wirken sich die Phosphorylierungen durch die Proteinkinase C und G an Serin und Threoninresten negativ auf den Einstrom durch die Kanäle aus ([17] ; [111]).

Nach der Aktivierung der TRPC6-Kanäle durch Bindung von Agonisten an deren jeweiligen G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren kann man beobachten, dass der Strom durch die Kanäle nach einiger Zeit abfällt [17]. Der Rückgang des Stroms beruht auf einer negativen Rückkopplung, die durch die Proteinkinase C vermittelt wird. Die Proteinkinase C wird dabei durch das Membranlipid DAG aktiviert [118]. Es kommt zur Phosphorylierung des TRPC6-Kanals an den Serinresten 448, 714 und 768 und damit zur Inaktivierung der Kanäle [17].

Die Proteinkinase G phosphoryliert den Threoninrest an der Stelle 69, was ebenfalls zu einer Hemmung des Kanals führt [83].

2.2.3.5 Expression und Funktion

Der TRPC6-Kanal kann durch seine Durchlässigkeit für Calcium sowohl an der Gentranskription, der Zellproliferation, Zellmigration als auch dem Zelltod beteiligt sein [81]. Außerdem ist das TRPC6-Protein durch seine Funktion als Calcium-durchlässiger Ionenkanal am Mineralhaushalt beteiligt [119]. Die spezifischen Funktionen ergeben sich dann aus dem Expressionsort (Organ) sowie dem Gewebetyp (Lokalisation).

Die höchste Expression der TRPC6-Kanälen konnte bisher in der Lunge, der Plazenta (im dritten Trimester) sowie in den Ovarien festgestellt werden [119].

In der Studie „mRNA distribution analysis of human TRPC Family in CNS and peripheral tissues“ aus dem Jahr 2002 untersuchten Antonio Riccio und Kollegen die mRNA-Expression von TRPC-Molekülen mittels TaqMan-Echtzeit-RT-PCR in humanem Gewebe. Für TRPC6 konnte eine gleichmäßige Verteilung über das ZNS sowie die peripheren Gewebe festgestellt werden. Dabei fiel auf, dass die Verteilung des Kanals im Vergleich zu den anderen TRPC-Kanälen weniger ZNS spezifisch war [94]. Insgesamt gibt es allerdings Abweichungen zwischen den Ergebnissen der bisher durchgeführten Expressionsstudien.

2.2.3.6 TRPC6 in verschiedenen Organsystemen und Pathologien

Die Funktion des TRPC6-Kanals kann also nicht verallgemeinert werden. Deshalb ist es sinnvoll, die Rolle des Kanals für jedes Organ und damit seinem nativen Expressionsort gesondert zu betrachten. Am ausführlichsten ist dies bereits für des kardiovaskuläre sowie renale System geschehen:

TRPC6 im kardiovaskulären System

Eines der Charakteristika des TRPC6-Kanals ist seine Rolle in der Steuerung des myogenen Tonus der kleinen Widerstandsgefäße (Arterien und Arteriolen). Er ist in den glatten Muskelzellen (VSM) der vaskulären Gefäße stark exprimiert und vermittelt den durch einen erhöhten intravaskulären Druck erzeugten Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle [124]. Es folgt die Vasokonstriktion. Der zugrunde liegende Mechanismus beruht vermutlich auf der in Abschnitt 2.2.3.2 geschilderten Aktivierung des TRPC6-Kanals durch mechanische Plasmamembranveränderungen infolge deren Dehnung [1].

Auch im Hinblick auf die Blutdruckregulierung innerhalb der Gefäße scheint der TRPC6-Kanal eine Rolle zu spielen. Der TRPC6-Kanal wird als Bestandteil des 1-Adrenozeptor-aktivierten, speicher-unabhängigen Kationenstroms gehandelt, um bei einer erhöhten sympathischen Aktivität den Calcium-Eintritt und damit die Gefäßverengung zu gewährleisten [55]. Kommt es dann zu einer erhöhten Expression des TRPC6-Proteins, steigert sich auch die Kontraktilität der vaskulären Gefäßmuskelzellen. TRPC6 kann somit auch als Vermittler bei bestimmten Formen des vaskulären Bluthochdrucks betrachtet werden [4].

Diese Beobachtungen können auch auf die Lunge übertragen werden. Dort ist der TRPC6-Kanal an der Gefäßverengung der pulmonalen Strombahn beteiligt. Die Verengung folgt dabei dem Sauerstoffmangel als physiologische Reaktion im Rahmen des Liljestrand-Mechanismus [121]. Kommt es dort allerdings zu einer erhöhten Expression von TRPC6, bedingt die Vasokonstriktion eine Hypertrophie der muskulären Schicht und folglich eine pulmonale Hypertonie. Dieser Mechanismus kann auch bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler arterieller Hypertonie festgestellt werden, bei der allerdings die Ursache der erhöhten TRPC6-Expression nicht bekannt ist [130].

Eine klinisch wichtige Rolle spielt der TRPC6-Kanal neben den Gefäßmuskelzellen der Lunge auch in deren Endothelzellen. Innerhalb der Lunge kommt es nach Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes, beispielsweise nach Lungenembolie, zu einem durch die Reperfusion induzierten Ödems. Dies wird als lungenischämisches Reperfusionssyndrom bezeichnet. An der Entstehung dieses Mechanismus, der zu einer hohen Mortalität führt, ist der TRPC6-Kanal in den Endothelzellen der Lungengefäße beteiligt. Seine Aktivierung erfolgt durch eine Signalkaskade, die durch endotheliales Nox2 und reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst wird. Es folgt eine veränderte Zellstruktur und eine erhöhte endotheliale Permeabilität, die das Ödem bedingt [122].

Am Herzen kann man bei einer verstärkten TRPC6-Expression je nach Zelltyp zwei gegensätzliche Auswirkungen identifizieren [82]:

In Herzfibroblasten hat die Überexpression des Kanals einen protektiven Effekt. Sie hemmt die Umwandlung der Herzfibroblasten zu Myofibroblasten, welche extrazelluläre Matrixproteine absondern können. Die abgesonderten Matrixproteine führen dann zur Herzfibrose. Das Fortschreiten der Herzfibrose kann durch die erhöhte Aktivität der TRPC6-Kanäle bis zu einem bestimmten Maß gebremst werden ([82] ; [1]). In Kardiomyozyten andererseits führt eine übermäßige TRPC6-Aktivität als Initiator des Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg zu einer vermehrten Herzhypertrophie, welche das Herz schädigt [31]. Das Ausmaß der Erkrankung sowie die folgende Herzinsuffizienz korreliert hierbei mit der TRPC6-Expression in den Kardiomyozyten [1].

TRPC6 in der Niere

In der Niere findet man den TRPC6-Kanal sowohl in den Tubuli als auch den Glomeruli [93].

Innerhalb der Glomeruli ist der Kanal unter anderem mit der Schlitzmembran assoziiert und wird in den Podozyten exprimiert [76].

Die Fußfortsätze der Podozyten sowie die Schlitzmembran sind im Wesentlichen für die Filterfunktion der Niere verantwortlich [1].

Diese Filterfunktion ist bei glomerulären Nierenerkrankungen wie der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) gestört, was folglich zum Austritt von Proteinen über die Membran in den Urin führt. Dies führt zur zunehmenden Schädigung der Niere sowie zu ihrem Funktionsverlust [69].

Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im TRPC6-Gen auf Chromosom 11 für manche autosomal-dominant vererbte Formen der FSGS verantwortlich sind [127].

Daraus können zwei unterschiedliche Gruppen resultieren. Zum einen Mutationen, die zu einer erhöhten TRPC6-Kanal-Funktion führen (gain-of-function) sowie solche die zu einer verminderten beziehungsweise gleichbleibenden Funktion des Kanals führen (loss-of-function). Beide zeigen im Resultat dennoch eine ähnliche Pathologie [95].

Zentrales Nervensystem (ZNS)

Wie im Abschnitt „Expression und Funktion" erwähnt, ist der TRPC6-Kanal im Vergleich zu anderen TRPC-Gruppenmitgliedern nicht ZNS-dominierend. Dennoch ist dieser Kanal an mehreren neuronalen Prozessen beteiligt [1].

Eine Rolle spielt der TRPC6-Kanal sowie der nahverwandte TRPC3-Kanal im Überleben von Neuronen. Dies konnte für die Körnerzellen des Kleinhirns gezeigt werden. Der Schutz vor Apoptose und damit das Überleben hängt von BDNF, einem neurotrophen Faktor des Gehirns, ab [101]. Dessen Funktion wird über die Aktivierung der gleichnamigen Rezeptortyrosinkinase und der daraus folgenden TRPC6-vermittelten Calciumerhöhung vermittelt [57].

Eine weitere durch TRPC6-vermittelte Funktion in den Körnerzellen des Kleinhirns ist die Drehung der Wachstumskegel dieser Neurone. Kommt es innerhalb der Umgebung der Neurone zu einer Signalstofferhöhung wie der von BDNF, so richtet sich das Axon des Neurons samt des Wachstumskegels danach aus. Die Drehung in die Richtung der Signalerhöhung wird dabei durch den Calciumeinstrom über TRPC6-Kanäle innerhalb des Neurons gesteuert [67].

Außerdem konnte eine Beteiligung des Kanals am dendritischen Wachstum der Neuronen im Hippocampus von Ratten festgestellt werden. Dies trat am stärksten in der postnatalen Phase auf. Das Wachstum ist in dieser Phase maximal und unabhängig von der neuronalen Aktivität, wie dies nach Ausreifung des ZNS infolge von Lernvorgängen eigentlich gängig ist [110].

Tumore

TRPC6-Kanäle findet man in hoher Expression auch in einer Reihe von verschiedenen Tumorarten. Ihnen kann also eine Funktion in der Proliferation von entarteten Zellen zugeschrieben werden [1].

Diskutiert wurde dies bisher für das Glioblastom (ICD-10 C71) [22], das Adenokarzinom der Brust (ICD-10 C50) [42], die Epithelzellen des Prostatakarzinoms (ICD-10 C61) [114] sowie für eine bösartige Neubildung in der Leber, dem hepatozellulären Karzinom (ICD-10 C22) [32].

2.3 Anatomie des hepatobiliären Systems

2.3.1 Leber

Die Leber hat eine lebensnotwendige Funktion im Stoffwechsel des Menschen. Sie ist an der Synthese von Blutprodukten (Albumin, Gerinnungsfaktoren) und Fettsäuren beteiligt, trägt zur Entgiftung körperfremder sowie eigener Stoffe bei und spielt eine Rolle sowohl im Glucose-, Protein- und Fettstoffwechsel [61]. Außerdem gibt sie als exokrines Organ täglich um die 600 bis 800 ml Gallenflüssigkeit in das Duodenum ab ([71] ; [61]).

Makroskopische Anatomie

Die Leber liegt im rechten Oberbauch unterhalb des Diaphragmas in einer intraperitonealen Lage [73]. Durch ihre Lage können zwei Flächen unterschieden werden. Die *Facies diaphragmatica* ist dem Zwerchfell zugewandt und konvex gekrümmt, während die *Facies visceralis* den abdominellen Organen zugewandt ist und eine konkave Krümmung besitzt. Die Leber ist von einer bindegewebigen Kapsel, der Glisson-Kapsel umgeben. Von dieser gehen Septen aus, die die Leber in vier Lappen gliedern [61]. Der rechte sowie der linke Leberlappen sind von ventraler sowie dorsaler Ansicht erkennbar. In der Dorsalansicht erkennt man auch die kleineren Lappen *Lobus quadratus* sowie *Lobus caudatus*. Neben der rein morphologischen/anatomischen Einteilung kann die Leber auch funktionell in acht Segmente unterteilt werden [61]. Diese Einteilung orientiert sich an den Verläufen der portalen Trias aus Ästen der *Vena portae hepatis*, der *Arteria hepatica propria* und der Gallengänge. Diese Trias ist sowohl vom Leberhilus bis zur schlussendlichen Einmündung in die Sinusoide zu finden. Der venöse Abfluss erfolgt in die *Vena cava inferior* über drei aus der Leber austretende Venen [61].

Mikroskopische Anatomie

Die histologische Baueinheit der Leber ist das Zentralvenenläppchen. Schematisch kann dieses als sechseckige Säule beschrieben werden, die im histologischen Präparat unterschiedlich angeschnitten ist [123]. In der Mitte des Läppchens liegt die Zentralvene, zu der die Hepatozyten radiär in Balken angeordnet sind. Ein Balken ist dabei nur eine Zellschicht breit, deshalb grenzen die Hepatozyten von beiden Seiten an die parallel verlaufenden Sinusoide. Diese entsprechen breiten Kapillaren und transportieren das Blut in Richtung der Zentralvene [123]. Am Rande des Leberläppchens ist dieses von spärlichem Bindegewebe umzäunt. An den Ecken, an denen drei Leberläppchen aneinandergrenzen, befindet sich das Periportalfeld samt Glisson-Trias [123].

Der Gallenfluss erfolgt im Läppchen von zentral nach peripher, also entgegengesetzt des Blutflusses. Die Gallenkanälchen verlaufen zwischen zwei Hepatozyten, besitzen kein eigenes Epithel und sind vielfach miteinander verbunden. Erst kurz vor der Einmündung in die im Bindegewebe verlaufenden Gallengänge besitzen sie ein eigenes Epithel. Hier werden sie als Hering-Kanälchen bezeichnet [123].

Die Hepatozyten erfüllen die leberspezifischen Funktionen und stellen mit rund 80 % des Gewichtes den Hauptteil der Leber dar [49]. Hepatozyten sind polygonale Zellen, die polar gebaut sind. Sie besitzen einen Gallenpol sowie einen Blutpol. Zwischen Sinusoid und Blutpol des Hepatozyten befindet sich ein Bindegewebsraum, der als Disse-Raum bezeichnet wird (Abbildung 5). Die dünnen Kollagenfibrillen des Disse-Raums sorgen durch die Verbindung zwischen Zentralvene sowie Portalfeld für mehr Stabilität innerhalb des Leberläppchens [123]. Das Endothel der Sinusoide besitzt weite Poren ohne Diaphragma (diskontinuierliches Endothel) sowie keine Basallamina. Diese Charakteristika erleichtern den Stoffaustausch [123]. Dem Endothel liegen von außen Kupffer-Zellen an. Diese durchdringen mit ihren Fortsätzen teilweise die Poren des Endothels und sind phagozytierende Zellen. Sie beseitigen Moleküle, die über das Blut in das Leberläppchen gelangt sind. In einer Leber, die mit Fremdstoffen belastet wurde, findet man auch mehr Kupffer-Zellen [123]. Umso peripherer sie innerhalb des Läppchens liegen, umso aktiver sind die Zellen [71]. Eine weitere Zellart ist im Disse-Raum zu finden: Die Leber-Sternzellen, auch Ito-Zellen genannt. Sie sind Vitamin-A-Speicher-Zellen. Außerdem produzieren sie das Bindegewebe, welches im Disse-Raum zu finden ist [71].

Hepatozyten leben mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 150 Tagen überdurchschnittlich lange und teilen sich nur selten mitotisch [123]. Dennoch besitzt die Leber aufgrund verschiedener Mechanismen eine hohe Regenrationsfähigkeit. Bei kleinen bis mittleren Leberschädigungen kann die mitotische Aktivität der Hepatozyten gesteigert werden, um die Defekte auszugleichen. Bei großen Schädigungen kommt eine weitere Zellart ins Spiel: Die Ovalzellen. Diese befinden sich im Epithel der Hering-Kanäle und sind Stammzellen. Sie können sowohl zu Hepatozyten als auch Gallengangsepithelzellen heranreifen ([123] ; [61]).

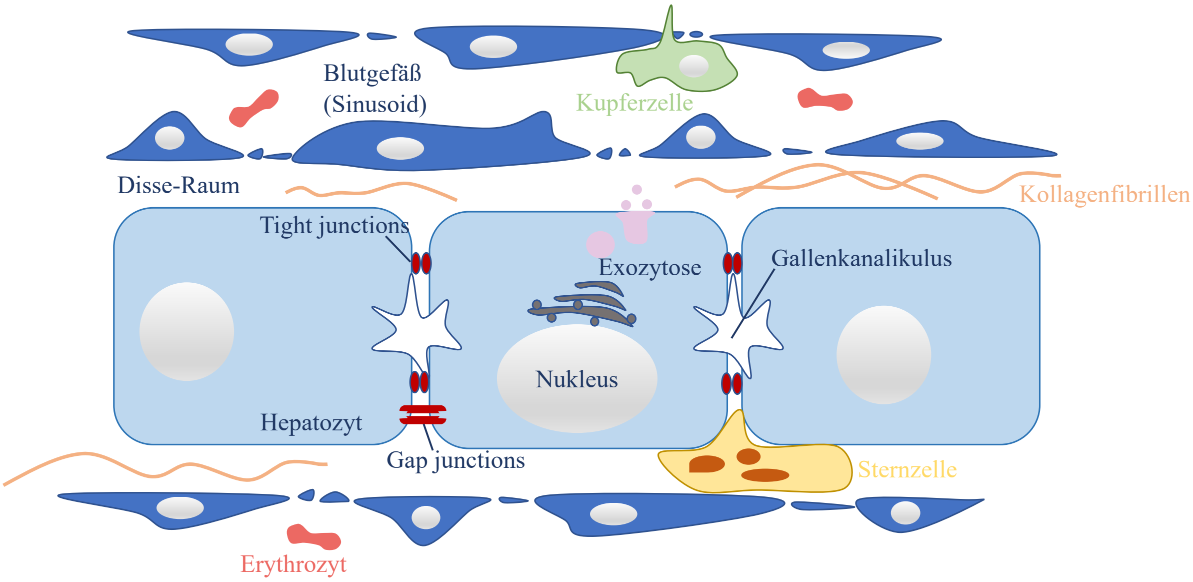


Abbildung 5: Schematische Abbildung der Ultrastruktur der leberständigen Zellen, eigene Darstellung in Anlehnung an [107].

2.3.2 Gallenblase und extrahepatische Gallenwege

Gallenwege

Das Gallengangsystem setzt sich aus den intrahepatischen sowie den extrahepatischen Gallenkanälen zusammen. Diese transportieren die in der Leber gebildete Galle in Richtung Duodenum [61]. Über den rechten und linken *Ductus hepaticus* verlässt die Galle die Leber. Die beiden Kanäle fusionieren dann zum *Ductus hepaticus communis*, der das erste Mitglied der extrahepatischen Gallenwege darstellt. Von diesem geht der Ductus cysticus ab, der zur Gallenblase führt. Nach der Abgabe des *Ductus cysticus* wird der weiterführende Gallengang als *Ductus choledochus* bezeichnet ([123] ; [61]).

Gallenblase

Die Gallenblase fungiert als Speicher für die Gallenflüssigkeit. Außerdem wird die Galle hier eingedickt, indem Wasser sowie negativ geladene Ionen entzogen werden [54].

Die Gallenblase liegt in der *Fossa vesicae biliaris* von dorsal der Leber an, und ist über Bindegewebsstränge fest mit der Leberkapsel verbunden. Die Gallenblase wird anatomisch in drei Abschnitte untergliedert: Den Gallenblasenhals (Collum), der diese mit dem *Ductus cysticus* verbindet, den Körper (*Corpus*) sowie den Fundus, der über den Leberrand hinausragt und die Gallenblase nach unter abschließt ([123] ; [61]).

Die Wandung der Gallenblase ist dreischichtig aufgebaut. Zum Lumen des Hohlorgans hin befindet sich die *Tunica mucosa*. Diese umfasst das einschichtige hochprismatische Epithel sowie die daran anschließende bindegewebige *Lamina propria* [123]. Diese Schicht ist in Falten gelegt, die je nach Füllungszustand des Organs in ihrer Höhe variieren. Dabei können die Falten bis tief in die darunterliegende Muskelschicht einstrahlen und durch Schleimhautbrücken verbunden sein. Im histologischen Schnitt kann so der Eindruck von Hohlräumen entstehen (Rokitansky-Aschoff-Krypten) [71].

An die Schleimhautschicht schließt sich die *Tunica muscularis* an. Deren Hauptbestandteil sind glatte Muskelzellen die im Schnitt sowohl längs, quer als auch schräg verlaufen. Dieser Verlauf ermöglicht eine optimale Kontraktion, um die Gallenflüssigkeit auszutreiben. Zwischen den Muskelzügen liegen vereinzelt Stränge aus Bindegewebe und elastischen Fasern, die die Dehnbarkeit der Gallenblase vermitteln [123].

Die äußerste Schicht der Gallenblasenwandung stellt die *Tunica serosa/adventitia* dar. Die *Tunica serosa* besteht aus der *Tela subserosa* und aus einem Peritonealepithel, welches die Gallenblase von außen bedeckt. An den Stellen, an denen die Gallenblase mit der Leber verwachsen ist, fehlt dieser Peritonealüberzug. Die Schicht wird an diesen Stellen deshalb als *Tunica adventitia* bezeichnet [123].

2.4 Rolle von Calcium und dem TRPC6-Kanal im hepatobiliären System

2.4.1 Calcium und der TRPC6-Kanal in der Leber

Viele Leberfunktionen werden über Calcium als sekundären Botenstoff gesteuert [7]. Zu den so gesteuerten Funktionen zählen auch folgende Schritte des Gallensäuren-Stoffwechsels: Zum einen vermittelt Calcium die Aufnahme der Gallensäuren aus dem Blut in die Hepatozyten, zum anderen vermittelt es auch die sich anschließende Sekretion der Gallensäuren aus eben diesen Zellen in die Gallenkanälchen. Und auch die Steuerung des Transportes entlang dieser Kanäle obliegt einem Calcium-abhängigen Mechanismus ([99] zitiert nach [7]). Zusammengenommen mit der Proteinsynthese und deren Calcium-abhängiger Abgabe ins Blut, zeigt sich Calcium insgesamt als wichtiger Sekretionsvermittler [7].

Neben den genannten Funktionen sind auch die meisten intrazellulären Wege des hepatischen Kohlenhydrat-, Fettsäure- und Aminosäurenstoffwechsels und die Metabolisierung artfremder Stoffe allesamt abhängig von Calcium [7]. Auch die in Abschnitt 2.3.1 beschriebene Regeneration der Leberepithelzellen wird über dieses Element gesteuert. Hier ist es sowohl für die Zellproliferation als auch die Apoptose entscheidend [3]. Insgesamt ist Calcium somit für eine intakte Leberfunktion essenziell. Eine fehlregulierte Calciumbilanz kann verschiedenste Lebererkrankungen auslösen und aufzeigen [88].

Die Information wird bei der Calcium-Signalgebung innerhalb der Leber über Oszillationen weitergegeben, wobei die Frequenz der Oszillation den extrazellulären Hormongehalt widerspiegelt [96]. Ist kein extrazelluläres Calcium vorhanden, so enden diese hormoninduzierten Oszillationen nach ca. 5-10 Minuten [129]. Bei jeder Calcium-Oszillation geht ein kleiner Teil des intrazellulären Calciums verloren. Folglich ist der Einstrom von Calcium über die Membran notwendig, um die Oszillationen zu erhalten. Dieser Einstrom wird in Leberepithelzellen zum größten Teil über speicher- sowie rezeptorgesteuerte Ionenkanäle vermittelt [41]. Den größten Teil der rezeptorgesteuerten Ionenkanäle bilden in der Leber vermutlich die TRP-Ionenkanäle [7]. Auch eine Beteiligung am speichergesteuerten Calciumeintrag in der Leber wird einem Mitglied der TRP-Familie, dem TRPV1-Kanal, zugeschrieben [8].

Der TRPC6-Kanal ist in der Leber vor allem durch seine Beteiligung an der Entstehung und dem Fortschreiten chronischer Erkrankungen bekannt. Zu diesen zählen in erster Linie das hepatozelluläre Karzinom [32] sowie die Leberfibrose nach Schädigung der Leber infolge eines Sauerstoffmangels [56]. In isolierten Hepatozyten gesunder Patienten ist der TRPC6-Kanal laut bisheriger Untersuchungen nur spärlich zu finden. Eine erhöhte Expression zeigt sich hingegen beim hepatozellulären Karzinom der Leber, das weltweit die fünft höchste krebsbezogene Mortalität aufweist [32]. Dabei soll die Expression des Kanals simultan mit der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms ansteigen und ihren

Höhepunkt mit der Manifestation des Karzinoms erreichen [132]. Das Wachstum von Hepatomzellen wird über den speichergesteuerten Calciumeintrag in den Hepatozyten reguliert [33]. Denn Calcium ist im Wesentlichen für die Zellzyklusprogression zuständig [33].
El Boustany hat in seiner Studie aus dem Jahr 2008 herausgefunden, dass der TRPC6-Kanal in der tumorösen Leber an diesem speichergesteuerten Einstrom und damit auch an der Proliferation der Krebszellen beteiligt ist. Der Kanal bildet hierzu einen Komplex mit den in gleicher Höhe exprimierten Proteinen STIM1 und Orai. Am OAG-induzierten Calciumeinstrom und damit am nicht kapazitiven Calciumeinstrom über die Plasmamembran ist der TRPC6-Kanal in Hepatomzellen hingegen nicht beteiligt. Dies scheint zu überraschen, wenn man dies im Vergleich zu den physiologischen Abläufen in anderen Organen betrachtet, bei denen dies oftmals umkehrt ist [32].
Die erhöhte TRPC6-Expression, die in den Tumorzellen zu verzeichnen ist, wird hierbei durch den endothelialen Wachstumsfaktor oder den Hepatozyten-Wachstumsfaktor induziert. Dabei wird die TRPC6-Expression circa um den Faktor drei erhöht. Eine Erhöhung der Wachstumsfaktoren ist dabei charakteristisch für eine tumoröse Leber [32].

Neben dem Malignom ist der TRPC6-Kanal vermutlich auch an der Fibrose-Entwicklung der Leber bei Sauerstoffmangel beteiligt [56]. Die Leberfibrose ist Ausdruck einer chronischen Leberschädigung und kann durch das Einwirken unterschiedlicher Einflüsse wie Alkohol, Hepatitis-Viren, überschüssiges Fett und Cholestase induziert werden. Bis zu 90 % der hepatozellulären Karzinome entstehen aus dem Vorstadium einer Leberfibrose beziehungsweise einer Zirrhose [59]. Die Lebersternzellen sind dabei die entscheidenden Akteure, da sie nach ihrer Aktivierung extrazelluläre Matrix aussondern, was zum Fortschreiten der Fibrose führt [34]. Der TRPC6-Kanal kann hier eine Rolle spielen. Durch den hypoxischen Zustand infolge der Leberschädigung kommt es zur Hochregulierung des hypoxia inducible Factor 1α (HIF1α) der über den NOTCH-Signalweg zu einer Überexpression von TRPC6 führen kann. Die durch die Überexpression bedingte Calciumaggregation kann dann für die Produktion von extrazelluärer Matrix, Kollagen sowie Alpha-Actin-2 verantwortlich sein [56].

Ein etwas anderes Bild ergab sich bei einer Studie des Forscherteams von Kazuhiro Nishiyama, bei der die Beteiligung des TRPC6-Kanals an der Entwicklung und dem Fortschreiten der Steatohepatitits untersucht wurde. Bei der nichtalkoholischen Steatohepatitis handelt es sich um eine Entzündung der Leber. Die Entzündung entsteht auf dem Boden der Leberverfettung, die in diesem Falle nicht durch einen erhöhten Alkoholkonsum bedingt ist. Es kommt zur Infiltration von Entzündungszellen und folglich auch zu einer Fibrose [84]. Da Calcium bei der Entstehung der Steatohepatitis eine Rolle spielen soll, untersuchte man in diesem Zusammenhang auch die Beteiligung des TRPC6-Kanals. Mäuse wurden hierzu mit einer Cholin-Mangel, L-Aminosäure-definierten, fettreichen Diät gefüttert, die gezielt die Entstehung der Steatohepatitis bedingt. Durch den systemischen TRPC6-Knockout in diesen Mäusen konnten die Fibrose, die Verfettung und Entzündung der Leber allerdings nicht aufgehalten

oder verringert werden. Somit konnte keine Korrelation zwischen der TRPC6-Expression und der Fibrose nach Steatohepatitis festgestellt werden [84].
Beide Mechanismen, sowohl die Minderversorgung mit Sauerstoff als auch die Entzündung infolge einer Fettleber, führen in der Endstrecke zur Entwicklung einer Leberfibrose. Beteiligt ist der TRPC6-Kanal wahrscheinlich nur am ersteren Mechanismus. Es scheint, dass die Beteiligung des Kanals an der Leberfibrose abhängig von deren Entstehungsmechanismus ist. Zusammengenommen kann die Teilhabe des TRPC6-Kanals an der Fibroseentstehung somit nicht verallgemeinert und für jeden Fibrose-Patienten angenommen werden [84].
Diese Erkenntnisse machen das TRPC6-Protein zu einem potenziellen molekularen Target, um bösartigen Krebs zu heilen beziehungsweise die dazu führenden Leberveränderungen in erster Linie bereits vor der Manifestation zu stoppen ([56] ; [132]).

Ein weiteres, häufiges Problem bei der Bekämpfung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) ist, dass die malignen Zellen eine Resistenz gegen die üblichen Arzneimittel bilden (multi-drug-resistance) [30]. Diese Resistenz wird über verschiedene Mechanismen wie Medikamenten-Effluxpumpen, den HIF-Faktor bei Hypoxie oder die DNA-Schadensreparatur induziert [30]. Die genannten Mechanismen sind abhängig von einer Calcium-Aggregation in der Zelle, die zum Teil durch den Calciumeinstrom über den TRPC6-Kanal in die HCC-Zellen erzeugt wird [125]. Das erhöhte intrazelluläre Calcium sorgt dann über STAT3 für die Aktivierung der Mechanismen, die zur Arzneimittelresistenz führen. Da die Entwicklung der Arzneimittelresistenz in den maligne veränderten Leberepithelzellen auch mit einem erhöhten TRPC6-mRNA Gehalt einher geht, verstärkt sich demnach durch eine erhöhte Kanalexpression die Calcium-Aggregation in den Zellen. Somit hat der TRPC6-Kanal in der Leber auch eine wesentliche Rolle in der Resistenzbildung des kanzerösen Gewebes gegen die Standarttherapien [125]. Im Modell konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Hemmung des Kanals sowohl zur Steigerung der Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum Doxorubicin, als auch zu einem verlangsamtem Fortschreiten der Erkrankung führt [125]. Zusammengefasst ist der TRPC6-Kanal also sowohl am Fortschreiten des hepatozellulären Karzinoms als auch an dessen Resistenzentwicklung während der Therapien beteiligt.

2.4.2 Calcium und der TRPC6-Kanal in der Gallenblase

Die gallenblasenspezifischen Funktionen belaufen sich vor allem auf die Speicherung, Eindickung und Austreibung der Gallenflüssigkeit [54]. Auch hier findet sich Calcium als Steuerungselement.

Das Epithel der Gallenblase ist für die Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit verantwortlich. Die Zusammensetzung wird über die Sekretions- und Absorptionsaktivität des Epithels gesteuert und so die Gallenflüssigkeit innerhalb der Gallenblase eingedickt. Die Konzentrierung wird dabei über einen

Natrium-Chlorid-Gradienten geregelt, der aktiv erzeugt wird und dem osmotisch Wasser folgt ([58] , [128]).

In diesem Zusammenhang wird Natrium aufgenommen und gegen Protonen ausgetauscht, was zu einer Ansäuerung des Gallenblaseninhalts führt. Diese Ansäuerung erhöht die Löslichkeit von Calciumcarbonat und Cholesterin und senkt damit das Risiko für Gallensteine [92].

Um sich vor dem niedrigen pH-Wert sowie den Gallensäuren zu schützen, sezerniert das Epithel Bikarbonat und Muzine [53]. Die Sekretion der Muzine ist hierbei abhängig von Calcium und wird über die Gallensäuren selbst sowie Adenosintriphosphat in der Gallenflüssigkeit stimuliert [29].

Das Austreiben der Gallenflüssigkeit bei der Nahrungsaufnahme wird über die Kontraktion der glatten Muskulatur der Gallenblase gesteuert [54]. Die Kontraktion kann dabei in eine synchrone und asynchrone Form unterteilt werden. Die asynchrone Form führt zu rhythmischen Kontraktionen einzelner Muskelbündel und ist für den Basaltonus der Gallenblase zuständig. Die synchrone Form führt nach der Aktivierung durch Agonisten zu einer koordinierten Kontraktion der gesamten Muskulatur der Gallenblase. Die glatten Muskelzellen werden dabei über den Calciumeinstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch einen IP3-abhängigen Mechanismus aktiviert, der durch den Einstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle verstärkt wird [6].

Ob der TRPC6-Kanal in der Gallenblase exprimiert wird und hier folglich an der Vermittlung dieser Calcium-gesteuerten Funktionen beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt.

Kommt es allerdings zu Veränderungen in diesem aufeinander abgestimmten System, so kann dies zu pathologischen Zuständen wie beispielsweise dem Gallensteinleiden führen [54].

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Seit der Entdeckung der TRP-Kanäle im Jahr 1969 haben sich viele Forscher weltweit bemüht, die Charakteristika und funktionellen Eigenschaften dieser Kanäle aufzudecken [46].

Es konnte gezeigt werden, dass die TRP-Kanäle an der Entstehung und dem Fortschreiten von verschiedensten Krankheiten beteiligt sind. Diese zielgerichtet zu therapieren ist die Zukunftshoffnung sowohl in der Medizin als auch der Pharmazie.

Auch in der Leber wurde die Beteiligung des TRPC6-Kanals am hepatozellulären Karzinom und der Leberfibrose untersucht, mit der Hoffnung in diesem Kanal ein molekulares Target zur Therapie gefunden zu haben. Bei der Inhibierung des TRPC6-Kanals und damit der Bekämpfung der Erkrankung sollten die physiologischen Funktionen in den leberständigen Zellen nicht aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Über dessen physiologische Funktionen im Lebergewebe ist bis dato allerdings wenig bekannt.

Da Calcium-Signale in der Leber entscheidend zu deren Hauptfunktionen beitragen, kann auch der TRPC6-Kanal als Calcium-leitender Kanal hier eine wichtige Rolle spielen. Grundlage jeglicher Funktion ist, dass der Kanal in dem jeweiligen Organ auch vorkommt.

Erst durch die Kenntnis der Expression und vor allem der Lokalisation des Kanals innerhalb des Organs lassen sich Rückschlüsse über dessen physiologische Funktion, Folgen einer Inhibierung sowie mögliche zukünftige Therapien ableiten.

Da das biliäre System (Einheit aus Gallenblase und Gallenwegen) mit dem Lebergewebe eine funktionelle Einheit bildet, war es von Bedeutung, die Expression des TRPC6-Kanals auch in diesem System zu untersuchen. Über die Expression des Kanals in der Gallenblase sowie den extrahepatischen Gallenwegen wurde bisher nicht berichtet.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die systematische Untersuchung der Expression und Lokalisation des TRPC6-Kanals an nativem humanem Gewebe des hepatobilären Systems.

Hierfür wurden postmortal Proben aus zwölf fixierten Körperspendern entnommen, aufbereitet und einer Standardfärbung (Hämatoxylin-Eosin) sowie einer immunhistochemischen Färbung unterzogen. Eingeschlossen wurde hierzu Gewebe aus Lebern, Gallenblasen sowie extrahepatischen Gallengängen der Spender.

Durch verschiedene Entnahmestellen an Leber und Gallenblase wurde die Kartierung des TRPC6-Kanals innerhalb dieser Organe angestrebt.

Der *Ductus choledochus* wurde exemplarisch als Vertreter der großen extrahepatischen Gallenwege untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben handelt es sich um humanes Gewebe. Dieses stammt von Leichen aus dem Körperspende-Programm des Anatomischen Institutes des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Tabelle 2: Körperspender

Spender	Geschlecht	Geburtsjahr	Tod	Ankunft	Fixierungsdatum	Fixierung-Art
01	Weiblich	1944	25.02.21	25.02.21	01.03.21	NEP
02	Männlich	1945	04.03.21	05.03.21	06.03.21	NEP
03	Männlich	1938	20.04.21	20.04.21	21.04.21	NEP
04	Weiblich	1937	27.04.21	27.04.21	28.04.21	NEP
05	Männlich	1934	07.05.21	07.05.21	10.05.21	NEP
06	Weiblich	1924	18.05.21	18.05.21	19.05.21	NEP
07	Männlich	1937	18.05.21	19.05.21	20.05.21	NEP
08	Männlich	1934	23.05.21	25.05.21	26.05.21	NEP
09	Weiblich	1940	04.06.21	04.06.21	07.06.21	NEP
10	Männlich	1930	09.06.21	09.06.21	10.06.21	NEP
11	Männlich	1940	10.06.21	10.06.21	14.06.21	NEP
12	Weiblich	1935	11.06.21	14.06.21	14.06.21	NEP

NEP = Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol-400-Lösung

Tabelle 3: Geräteliste

Geräte	Hersteller
BRESSER MikroCam SP 5.1	Bresser GmbH, Rhede, Deutschland
Digitaler VWR INCU-Line IL 56 Inkubator	VWR International, Pennsylvania, USA
Feuchte Kammer	Panalo-em, Zertr. ChL.
GFL Paraffinbad 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Karussell Gewebeeinbetter MTP	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlanlage für Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Kühlplatte	
Kühlplatte MPS/C	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Labor-Abzugshaube Captair®Flex® M321	Erlab®group, Val-de-Reuil Cedex, Frankreich
Leica DM 1000	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2025	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Nikon ECLIPSE E200 LED-Fotomikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Paraffin Ausgießstation MPS/P1	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin-Dispenser	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
UHP Einkanalpipette **20 – 200µl** **100 – 1000µl**	VWR International, Pennsylvania, USA
Vortexer-Vortex Mixer	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Wärme-/Trockenschrank VT6025	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
WR Heizplatte W10 für Histologie-Objektträger	Kunz Instruments, Sandelsgatan, Schweden

Tabelle 4: Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien/Puffer/Lösungen	Hersteller
100x Citratpuffer pH6	Abcam (ab93678)
2-Propanol 97 %	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eosin 0,1 %	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5 -3,7 %	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formalinlösung nach Basler	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ImmPACT DAB EqV	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Bestellnummer: SK-4103)
Kaninchenserum	Ref.: A10547; Life Technologies AG, Carlsbad, USA
Methylbenzoat 99%	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
NEP-Lösung nach Weigner	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
NGS-Blockierlösung	Merck KGaA, Deutschland
Roti®fair 10x PBS 7.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRPC6-Antigen Kontrollpeptid	Ref.: BLP-CC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Wasserstoffperoxid 35 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
ACU-Punch®Biopsie-Stanze 8/10mm	Acuderm inc., Fort Lauderdale, USA
Bovivet Einmalkanülen 14G 2,1x60mm	Kruuse, Langeskov, Dänemark
CELLSTAR®Tubes **15 ml Zentrifugenröhrchen** **50 ml Zentrifugenröhrchen**	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
DakoPen Fettstift	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
Deckgläser 22x22 mm / 24x50 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Discofix® Drei-Wege-Hahn	Ref.: 4095111, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einbettkassetten Macro, weiß	Ref.: M512, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Einbettringe	Ref.: M460, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Filtrierpapiere	Ref.: 534018, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
Histologischer Kleber Roti-Histokitt©	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen DB80	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Pipettenspitzen **20 – 200 µl** **100 – 1000 µl**	VWR International, Pennsylvania, USA
PROLENE 1,0 Nahtmaterial	Ethicon US LLC, Cincinnati, USA
Roti® -Plast Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sterile Skalpellklingen Nr. 22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R.Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

Tabelle 6: Primärantikörper

Antikörper	Wirt/Isotyp	Verdünnung	Firma	Artikelnummer
Anti-TRPC6 Antikörper	Rabbit/IgG	1:100	Alomone Labs	ACC-017

Bei dem verwendeten Primärantikörper handelte es sich um einen polyklonalen gegen TRPC6-gerichteten Antikörper vom Isotyp IgG. Dieser findet Verwendung in der Forschung an Mäusen, Ratten sowie humanen Gewebs- bzw. Zellproben. Die Antikörper wurden aus den Seren von Hasen isoliert, denen zuvor ein Peptid des TRPC6-Mausproteins verabreicht wurde. Die F(ab')-Region des Antikörpers ist gegen die Aminosäuren 24-38 des intrazellulären N-Terminus des TRPC6-Kanals gerichtet (Abbildung 6) [133].

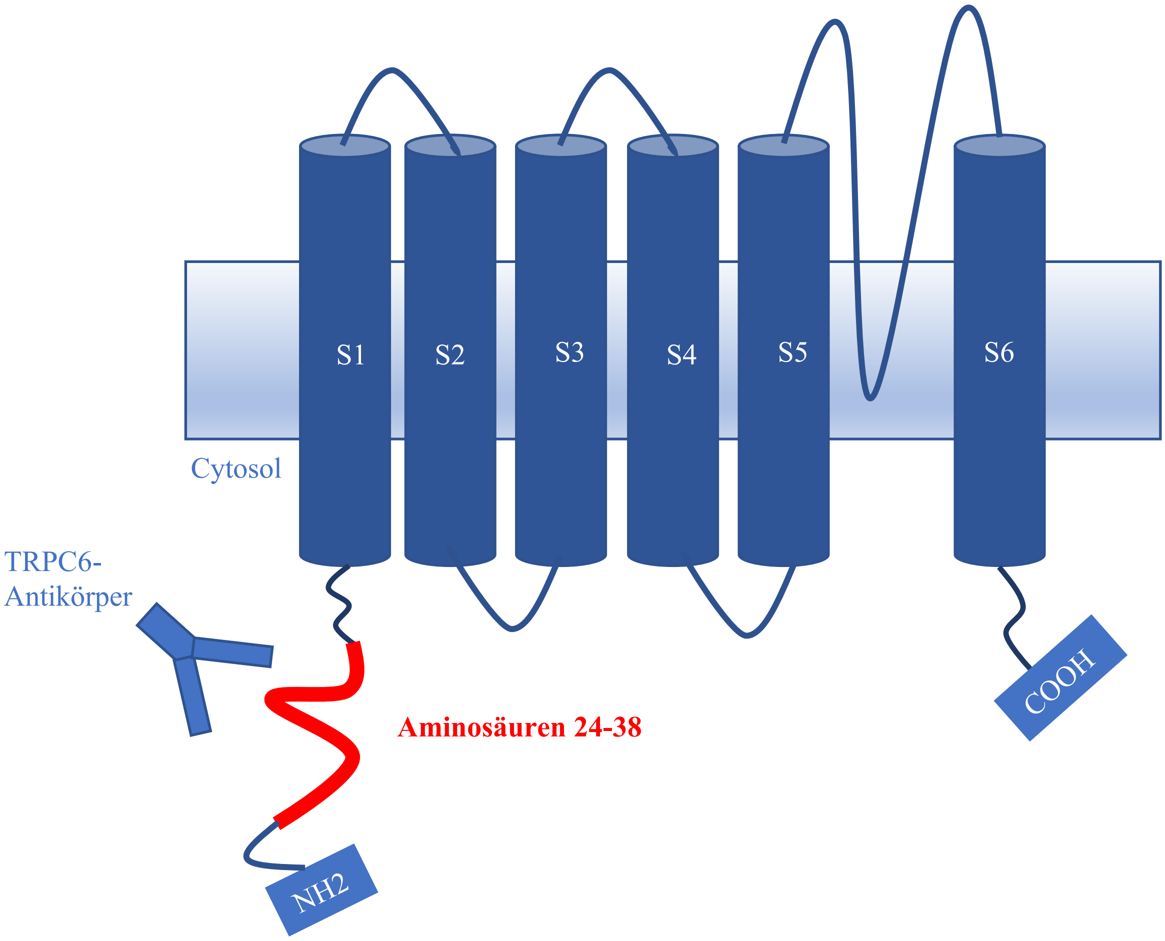


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bindestelle des Primärantikörpers am Protein, eigene Darstellung in Anlehnung an [133].

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt/Isotyp	Verdünnung	Firma	Artikelnummer
Anti-Rabbit HRP-konjugierter AK	Goat/IgG	1:500	Thermo Fisher Science	A10547

Bei dem verwendeten Sekundärantikörper handelte es sich um HRP-konjugierte F(ab') - Fragmente von Antikörpern des Isotyps IgG. Diese sind gegen von Hasen stammende Immunglobuline gerichtet und wurden aus dem Serum von Ziegen gewonnen.

3.2 Methoden

3.2.1 Fixierung der Körperspender

3.2.1.1 Körperspende am Universitätsklinikum des Saarlandes

In der Datenbank des Anatomischen Institutes der Universität des Saarlandes sind aktuell (Stand Juli 2021) zum Zwecke der Körperspende 2342 Personen registriert. Jährlich melden sich im Büro der Prosektur der Anatomie im Saarland über 100 Personen aus dem Einzugsgebiet rund um Homburg.

Die dort gelisteten Personen haben zu Lebzeiten mit dem Institut eine Vereinbarung getroffen, ihren Körper nach ihrem Ableben der Universität des Saarlandes zu übergeben [9].

Sie tragen damit einen wichtigen Teil zur Ausbildung von Studenten im Rahmen des Präparier-Kurses bei. Zukünftige Ärzte lernen so über mehrere Monate hinweg durch sorgfältige Präparation des Leichnams die Anatomie des Menschen kennen.

Auch approbierte Ärzte lernen und profitieren durch Operations- sowie Fortbildungskursen von den Toten.

Neben der Lehre können die fixierten Körper auch einen Beitrag zur Forschung leisten. Hierbei können beispielsweise klinische Techniken verbessert oder durch histologische Untersuchungen, wie im Rahmen dieser Dissertation, die Abläufe im Körper weiter verstanden werden.

Die Beweggründe, warum sich Menschen zu Lebzeiten für die Spende ihres Körpers nach dem Tod entscheiden, sind dabei so individuell wie die Personen selbst.

Das Institut wird nach dem Ableben der Personen informiert und die Körper der Verstorbenen durch ein Bestattungsunternehmen in die Anatomie überführt [89].

Nach der Ankunft der Verstorbenen im Institut wird durch den Leiter der Prosektur eine zweite, amtsärztliche, Leichenschau durchgeführt. Dies ist durch den Gesetzgeber vorgeschrieben [9].

Bis zur Fixierung beziehungsweise Konservierung wird der Leichnam bei -4 bis -6 Grad in der Kühlung des Institutes gelagert. In der Regel wird der Spender am darauffolgenden Tag nach dem im folgenden geschilderten Ablauf fixiert.

3.2.1.2 Fixierung – Grundlagen

Die Fixierung eines Leichnams kann in zwei Teilschritte untergliedert werden.

Zunächst findet die Perfusionsfixierung Anwendung. Hierzu wird mittels einer Kanüle ein Zugang, wahlweise an Arm oder Bein, gelegt und so die Blutgefäße mit der Fixierlösung gespült. Es handelt sich hierbei um eine an der Physiologie orientierte Fixierung, die den Erhalt tief liegender Strukturen sichert [62].

Daran anschließend findet die Immersionsfixierung statt. Der Leichnam wird nach der Perfusionsfixierung in die Fixierflüssigkeit gelegt. So dringt das Fixans über die Haut in den Körper ein [62]. Welches Konservierungsmittel eingesetzt wird, ist von Institut zu Institut verschieden [89].
Am Universitätsklinikum das Saarlandes werden für die hier stattfindenden studentischen Sektionskurse in der Regel Formalin-fixierte Präparate verwendet. Die Liegezeit in der Fixierlösung ist hier nicht auf ein bestimmtes Zeitintervall begrenzt und die Präparate sind somit für eine längere Konservierung besser geeignet.
Ein weiteres am Anatomischen Institut in Homburg verwendete Fixans ist die Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol-400-Lösung (NEP), auch als Fixierung nach Weigener bezeichnet.
NEP-fixierte Leichen werden meist im Rahmen von Operationskursen verwendet. Die Präparate verweilen für maximal drei Monate in NEP, bevor sie verwendet werden. Durch längere Liegezeiten verhärtet sich das Gewebe und ist somit für die Kurse ungeeignet.
Bei den untersuchten Gewebeproben handelt es sich um Entnahmen aus NEP-fixierten Körperspendern.

3.2.1.3 Ablauf der Fixierung am Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes

Der Leichnam wurde vor der Fixierung entkleidet, gewogen, rasiert und medizinische Zugänge wie beispielsweise Venenverweilkatheter, falls vorhanden, entfernt.
Am rechten Oberschenkel wurde die *Arteria femoralis* aufgesucht und freigelegt. Mittels eines Skalpells wurde das Gefäß inzidiert und über diese Inzision Hohlnadeln nach kranial sowie nach kaudal in das Gefäß eingebracht.
Die Hohlnadeln waren über ein Schlauchsystem mit Dreiwegehahn über eine Pumpe mit der Fixierlösung verbunden.
Die Fixierlösung wurde dann durch diese Pumpe mit einem Druck von 1-2 bar über das Gefäßsystem in den Leichnam eingebracht.
Zusätzlich wurden Stellen, die durch die oben geschilderte Methode schwer erreichbar waren, mittels Einmalkanüle (14G) punktuell nachgebessert. Bei diesen Stellen handelte es sich in der Regel um die obere und untere Extremität, Rücken, Gesäß und Nacken.
Zur vollständigen Perfusionsfixierung wurden abhängig von Größe und Gewicht des Leichnams ca. 15-20 l Fixierlösung benötigt.
Im Anschluss wurde der vorbehandelte Leichnam in ein Becken gefüllt mit NEP-Lösung gelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sämtliche Strukturen des Körpers von Flüssigkeit umgeben waren.
Bei NEP-Präparaten betrug die Liegezeit zur ausreichenden Immersionsfixierung circa 3 Monate.

3.2.2 Ethikvotum

Vor dem Start der Studie wurde ein Ethikvotum bei der Ethikkommission der Fakultät beantragt. Gegen die Durchführung der geplanten Studie bestanden „weder berufsrechtliche noch ethische Bedenken“ [Ethikvotum 163/20 vom 17.07.20 im Anhang] seitens der Ethikkommission. Somit konnte das Forschungsvorhaben in Übereinstimmung mit den zuvor genehmigten Richtlinien der Ethikkommission durchgeführt werden.

3.2.3 Probenentnahme

Alle im folgenden beschriebenen Schritte wurden eigenständig durchgeführt.
Die Probenentnahme erfolgte an zwölf Körperspendern (n=12). Hierfür wurde das Abdomen der Leichen durch einen rechtsseitigen Rippenbogenrandschnitt im Sinne einer subkostalen Laparotomie eröffnet und die Leber von den sie fixierenden bindegewebigen Strukturen getrennt (*Ligamentum falciforme, Ligamenta triangularia, Ligamentum coronarium, Ligamentum hepatogastricum*). Die *Vena cava* wurde nach ihrem Austritt aus der Leber abgesetzt. So auch das *Ligamentum heaptoduodenale* samt der darin verlaufenden Pfortader, der *Arteria hepatis* sowie des *Ductus choledochus*. Die Leber konnte so aus dem Spender gelöst und die Proben unter guter Sicht entnommen werden.
Insgesamt wurden pro Körperspender jeweils zwölf Proben aus sechs verschiedenen Stellen der Leber, drei Proben aus verschiedenen Stellen der Gallenblase sowie pro Spender ein Stück des *Ductus choledochus* entnommen. In ausgewählten Spendern wurden aus bestimmten anatomischen Regionen auch mehrere Proben zum Vergleich der Expression entnommen. Die exakten Entnahmestellen auf der Leber sind in Tabelle 8 mit ihrer anatomischen Lagezuordnung aufgeführt und in Abbildung 7 und Abbildung 8 illustriert. Orientiert wurde sich bei der Auswahl der Entnahmestellen an den vier anatomischen Leberlappen.
Für die Entnahme der Proben aus der Leber wurden dermatologische Biopsiestanzen verwendet. Die für die Entnahme am Lebergewebe verwendete Stanze besaß einen Durchmesser von 10 mm.

Zur Entnahme des Gallenblasengewebes wurde die Gallenblase am *Ductus cysticus* abgesetzt. Es wurde Gewebe aus allen drei anatomischen Regionen entnommen (Tabelle 9 und Abbildung 9). Jede Entnahme wurde dann in eine eigene zuvor bereits mit Spender-Nummer und Probenentnahmestelle beschriftete Einbettkassetten überführt.

Tabelle 8: Entnahmestellen auf der Leber

Probennummer	Entnahmestellen auf der Leber
1	Lobus hepatis dexter; Facies diaphragmatica
2	Lobus hepatis sinister; Facies diahpragmatica
3	Lobus hepatis sinister, Facies visceralis
4	Lobus hepatis dexter, Facies visceralis
5	Lobus caudatus
6	Lobus quadratus

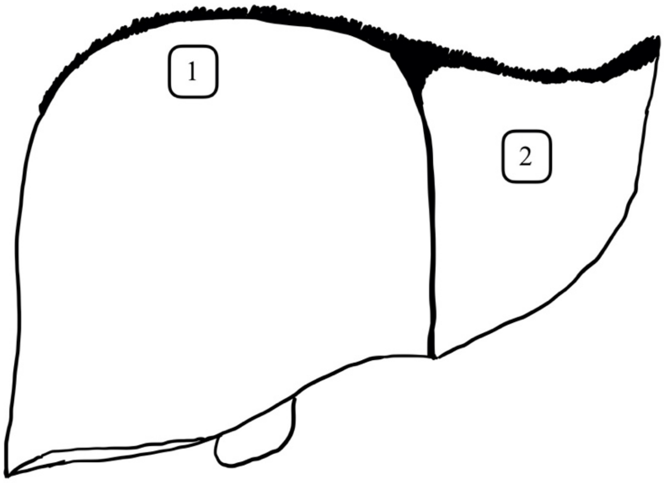


Abbildung 7: Entnahmestellen auf der Leber, Ansicht von vorne-oben

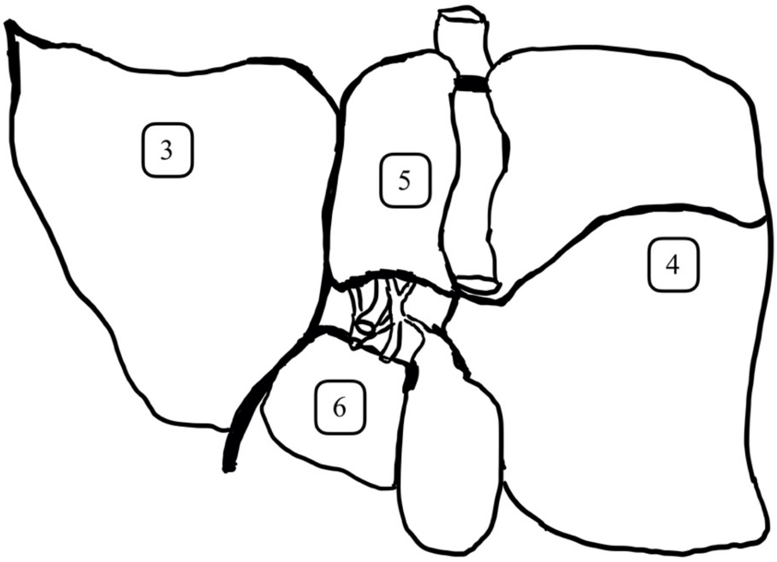


Abbildung 8: Entnahmestellen auf der Leber, Ansicht von hinten-unten

Tabelle 9: Entnahmestellen aus den Gallenblasen

Probennummer	Entnahmestellen aus der Gallenblase
1	Fundus vesicae biliaris (Gallenblasenboden)
2	Corpus vesicae biliaris (Gallenblasenkörper)
3	Collum vesicae biliaris (Gallenblasenhals)

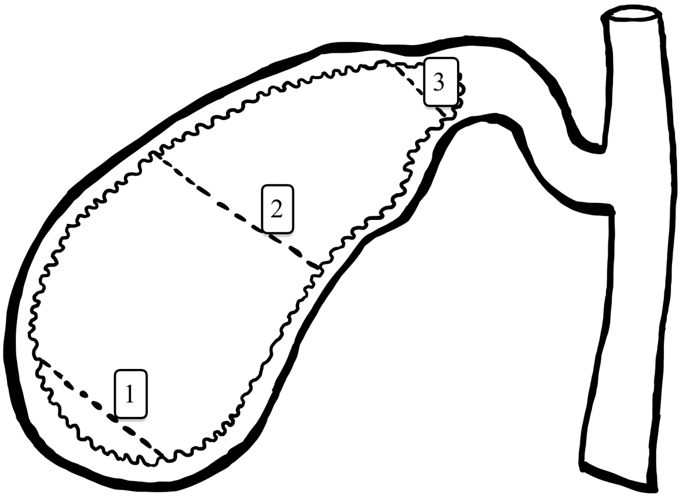
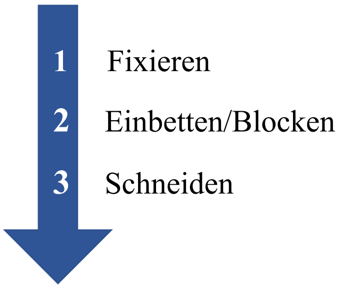


Abbildung 9: Entnahmestelle aus den Gallenblasen

3.2.4 Aufbereitung der Gewebeproben

Die weiteren Schritte nach der Probenentnahme folgten einem bestimmten Schemata, das in seinen Grundzügen bei allen histologischen Probenverarbeitungen zum Tragen kommt [62]:



1. Fixieren
2. Einbetten/Blocken
3. Schneiden

(Nach-)Fixierung

Das Gewebe wurde direkt nach der Entnahme für 24 Stunden in eine 3,5%ige Formalinlösung gelegt, um eine ausreichende Fixierung der Probe zu gewährleisten. Auf die 24 Stunden in Formaldehyd folgten erneute 24 Stunden in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). In dieser Zeit wurden die Proben jeweils bei vier Grad Celsius im Kühlschrank gelagert.

Einbetten/Blocken

Bevor die Proben den Einbettvorgang im dafür vorgesehen Gerät durchlaufen konnten, wurden sie für drei Stunden unter fließendes Leitungswasser gestellt. Es folgten weitere drei Stunden in 70%igem 2-Propanol.

Das Ziel war es, das im Gewebe vorhandene Formaldehyd auszuwaschen, da dieses die anschließenden Färbungen potenziell negativ beeinflussen könnte [62].

Das allgemeine Prinzip des Einbettens besteht darin, über mehrere Schritte die im Gewebe enthaltene Fixierlösung durch das Einbettmedium auszutauschen. Die Triebkraft für den Austausch stellen Konzentrationsunterschiede der verwendeten Lösungen dar [62].

Da es sich bei dem verwendeten Fixans um ein wässriges Medium handelte und das Einbettmedium hydrophobe Eigenschaften aufwies, musste ein Übergang zwischen diesen Lösungen durch Substanzen geschaffen werden, die sowohl in wässrigen als auch organischen Flüssigkeiten löslich sind [62].

Dazu wurde die wässrige Fixierlösung zunächst durch Alkohol ersetzt. Dabei wurde die Konzentration des verwendeten Alkohols sukzessiv erhöht, um Schrumpfungen und Zerreißungen des Gewebes zu vermeiden [123]. Es folgte das Intermedium. Dieses hat die Eigenschaft, sowohl in Alkohol als auch dem Einbettmedium löslich zu sein. Diese Zwischenschritte ermöglichten folglich die Infiltration des Einbettmediums ins Gewebe. Routinemäßig wird für mit formalinfixiertes Gewebe, wie auch hier, Paraffin als Einbettmedium verwendet [62].

Ablauf:

Die entnommenen Proben wurden im Einbettautomaten automatisiert entwässert und in Paraffin getränkt. Im Automaten wurde hierfür das Programm 01 – Routine mit einer Gesamtlaufzeit von 17 Stunden und 40 Minuten verwendet. Die im Folgenden erwähnten zwölf Schritte des Einbettungsprozesses wurden somit automatisiert im Einbettautomaten durchlaufen.

Das Programm startete mit der Entwässerung der Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (Schritte 1-5 des Programms). In der folgenden Tabelle ist der verwendete Alkohol mit den jeweiligen Verweildauern der Proben aufgelistet.

Tabelle 10: Aufsteigende Alkoholreihe und die jeweiligen Verweildauern

Lösung	**Dauer**
70 % 2-Propanol	3 h
80 % 2-Propanol	1,5 h
90 % 2-Propanol	1,5 h
100 % 2-Propanol	1,5 h
100 % 2-Propanol	1,5 h

An die aufsteigende Alkoholreihe schloss sich der Übergang ins Intermedium an. Bei dem verwendeten Intermedium handelte es sich um Methylbenzoat, in das die Proben anschließend für 3 x 1,5 h getaucht wurden (Schritte 6-8).

Das Infiltrieren der Proben mit dem Einbettmedium fand im Anschluss statt. Die mit Methylbenzoat durchtränkten Gewebeproben wurden dazu in circa 58-60 Grad Celsius warmes Paraffin eingebracht. Darin verblieben die Proben für 2 x 2 h (Schritte 9-10). Damit endete das Programm im Automaten.

Blocken

Für das verwendete Einbettmedium ist es charakteristisch, dass es bei Raumtemperatur erhärtet und bei einer spezifischen Siedetemperatur in einen flüssigen Zustand übergeht [62]. Der Schmelzpunkt des verwendeten Paraffins lag bei circa 57 Grad Celsius.

Dieser Umstand ermöglichte es, die Proben im erwärmten flüssigen Einbettmedium wunschgemäß auszurichten und so in Blöcke auszugießen. Dieser Vorgang wird demnach auch als Blocken bezeichnet.

Hierzu wurden die Proben am nächsten Morgen aus dem Automaten in einen Paraffin Dispenser mit einer Betriebstemperatur von circa 60 Grad überführt, damit die mit Paraffin durchtränkten Proben über den Prozess des Blockens bei Raumtemperatur nicht erstarrten.

Zu Beginn wurden die Ausgießformen mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Die zugehörigen Entnahmen wurden daraufhin passend orientiert hineingelegt. Die Ausgießformen samt den Präparaten wurden auf die Kälteplatte zum Aushärten gebracht und Paraffin nachgegossen. Ab einer bestimmten Füllhöhe wurden die Proben mit einem Einbettring versehen und weiter aufgefüllt. Zum endgültigen Aushärten wurden die Ausgießformen auf die -3 bis -4 Grad Celsius kalte Kälteplatte gestellt. Die Blöcke härteten dann bei vier Grad Celsius im Kühlschrank über Nacht weiter aus.

Schneiden

Die ausgehärteten Blöcke wurden mittels einer scharfen Klinge so zurechtgeschnitten, dass das überschüssige Paraffin seitlich in ausreichendem Abstand zur Probe entfernt wurde.

Zum Schneiden wurde ein Rotationsmikrotom der Firma Leica Biosystems verwendet. Die Proben wurden zuvor im Kühlschrank gelagert und kurz vor dem Schneiden erneut auf eine Kälteplatte gelegt. Zunächst wurden Schnitte von 10 µm Dicke angefertigt, um ein optimales artefaktarmes Ergebnis zu erzielen. Daraufhin wurde die Schnittdicke auf die optimale Schnittbreite vermindert. Diese betrug für das Lebergewebe im Durchschnitt 6-7 µm, während für das Gallenblasengewebe eine Schnittbreite von 8-9 µm gute Ergebnisse erzielte.

Die Paraffinschnitte wurden dann Mittels Pinzette und Pinsel in ein 40 Grad warmes Wasserbad gelegt, wo sich die Schnitte an der Wasseroberfläche entfalteten. Daraufhin konnten die Paraffinschnitte auf den silanisierten Objektträger aufgenommen werden. Auf einen Objektträger wurden zwei Gewebsschnitte von unterschiedlichen Entnahmestellen des gleichen Organs eines Körperspenders platziert. Silanisierte Objektträger wurden verwendet, um eine bessere Haftung der Schnitte an der Glasoberfläche zu gewährleisten [62]. Anschließend wurden die Paraffinschnitte zur besseren Anheftung auf einer Wärmebank von 37 Grad Celsius für mindestens 30 min getrocknet. Die Trocknung wurde im Inkubator über Nacht bei 37 Grad Celsius weitergeführt. Eine ausreichende Trocknung der Schnitte war essenziell, um ein Ablösen vom Objektträger zu verhindern.

3.2.5 Färbungen

3.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Um die Qualität der Schnitte beurteilen zu können, wurde zunächst eine Standardübersichtsfärbung nach einem am hiesigen Institut etablierten Protokoll angefertigt. Hierbei handelte es sich um eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Prinzip der HE-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen setzen sich aus zwei Färbegängen zusammen, bei denen Färbelösungen mit spezifischen Eigenschaften eingesetzt werden. Aufgrund dieser Eigenschaften lagern sich diese an verschiedene Zell- und Gewebsbestandteilte an [123].

Bei dem verwendeten basischen Farbstoff handelte es sich um Hämatoxylin nach Ehrlich (Hämatoxylinlack des Aluminiums). Dieses lagert sich an anionischen, negativ geladenen Bestandteilen des Gewebes an [123]. Zellkerne sind durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen deshalb Zielort der basischen Farbstoffe. Auch andere negativ geladene Zellbestandteilte, wie RNA-haltige Ribosomen, werden durch Hämatoxylin angefärbt [62]. Die Strukturen werden deshalb als basophil bezeichnet [123].

Hämatoxylin nach Ehrlich färbt im alkalischen Milieu blau. Die Bindung erfolgt allerdings im stark sauren Bereich. Um eine blaue Färbung zu erreichen, muss ein pH-Wert > 7 eingestellt werden. Dies kann durch fließendes Leitungswasser erreicht werden. Der Vorgang wird als Bläuen bezeichnet [62].

Bei dem zweiten Farbstoff handelt es sich um das saure Eosin (Y). Dieser anionische Farbstoff lagert sich an kationische, positiv geladene Zell- und Gewebsbestandteile an. Diese werden deshalb auch als eosinophil bezeichnet [71]. Eosinophile Strukturen sind beispielweise das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern. Diese werden demnach rot angefärbt. Der pH-Wert von Eosin sollte zwischen Werten von 4 bis 6 liegen. Um diesen einzustellen, werden vor der Verwendung 1 bis 2 Tropfen Eisessig hinzugefügt. Dies senkt den pH-Wert des sauren Farbstoffes und erleichtert in dem nach dem durch das Wässern entstandenen alkalischen Milieu die Kontrastbildung. Ein zu niedriger pH-Wert allerdings bedingt wiederrum eine Überfärbung des Gewebes [62].

Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Das Hämatoxylin nach Ehrlich sowie das 0,1 %ige Eosin wurden vor dem Gebrauch gefiltert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Eosin in minimalem zeitlichem Abstand zum Verbrauch aus der Kühlung genommen und gefiltert wurde, sodass möglichst wenig der enthaltenen Essigsäure verfliegen konnte. Zum Eosin wurden vor dem Gebrauch zusätzlich zwei Tropfen Eisessig hinzugefügt.

Da es sich bei den gewählten Farbstoffen um wässrige Lösungen handelt, war es notwendig die Schnitte vor dem Färbegang ausreichend zu hydrieren [123].

Hierzu wurde zunächst das Paraffin von den Schnittpräparaten entfernt. Die Proben durchliefen hierfür zunächst für 3 x 5 min ein Bad in Xylol.

Es folgte eine absteigende Alkoholreihe mit 2 x 5 min in 100 %igem 2-Propanol, gefolgt von je 5 min in 90 %igem und 80 %igem 2-Propanol.

Da sowohl hochprozentiger Alkohol als auch Xylol ein erhöhtes Gefährdungspotential aufweist, wurden die dazu notwendigen Schritte allesamt unter dem Abzug durchgeführt [62].

Direkt im Anschluss an das 80 %ige 2-Propanol wurden die entparaffinierten Schnitte in das zuvor gefilterte Hämatoxylin nach Ehrlich überführt. In diesem verblieben sie für 8 min.

Die überschüssige Farbe wurde anschließend durch das Spülen in destilliertem Wasser entfernt.

Um die blaue Farbe zu erhalten, wurden die Schnitte für 15 min unter fließendes Leitungswasser gestellt und so gebläut.

Anschließend wurden sie erneut in destilliertem Wasser gespült. Es folgte der zweite Färbeschritt in 0,1 %igem Eosin für 2,5 min.

Das Dippen in 90 %iges 2-Propanol erfolgte so lange, bis die gewünschte rote Farbe erreicht wurde. Durch weitere 2 x 5 Minuten in 100 %igen 2-Propanol wurden die Schnitte dehydriert. Es folgten 3 x 5-minütige Durchgänge in Xylol.

Das Eindecken der Schnittpräparate erfolgte im Anschluss. Die Objektträger wurden aus dem Xylol entnommen, mit einem Tupfer grob getrocknet und mit Deckgläsern versehen.

Die Schnitte wurden dann zum Aushärten des verwendeten Klebstoffs bei Raumtemperatur unter den Abzug gelegt.

3.2.5.2 Immunhistochemie

3.2.5.2.1 Grundlagen

A. Prinzip der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Das Ziel ist es, ein im Gewebe vorkommendes Antigen durch die Verwendung eines spezifischen, gegen das Antigen gerichteten Antikörpers zu detektieren [62].

Der spezifische Antikörper wird in einer Lösung auf das Gewebe aufgebracht. Ist das Antigen im Gewebe vorhanden, so bindet der Antikörper an die Bereiche, in denen dieses vorkommt [123].

Um die Bildung der Immunkomplexe am Ort des Antigens sichtbar zu machen, können unterschiedliche Detektionssysteme verwenden werden. Werden zwei aufeinanderfolgende Antikörper verwendet, so bezeichnet man die Methode als indirekt. Der Primärantikörper bindet hier spezifisch an das Antigen im Gewebe (Schritt 1), während der markierte Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper gerichtet ist (Schritt 2). Da mehrere Sekundärantikörper an einen gewebespezifischen Primärantikörper binden können, kann das Signal so verstärkt werden (Abbildung 10, B) [62].

Zur Detektion kann das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet werden, welches durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym (Meerrettichperoxidase) zu einem brauen Farbstoff umgewandelt wird [62]. Diese Methode fand auch im Rahmen dieser Dissertation Anwendung.

Für die Immunhistochemie wurden polyklonale Immunglobuline vom Typ IgG verwendet. Sie besitzen eine Y-Form mit einem Fc-Teil, der den Stamm, und einen Fab-Teil, der die variable Region des Antikörpers darstellt. Der Fab-Bereich (ab= antigenbindend) passt sich dem Antigen an und ist somit für die passgenaue Bindung an dieses zuständig (Abbildung 10, A) [62]. Der Vorteil der IgG-Antikörper ist deren Größe. Mit 150 kD gehören sie zu den kleineren Antikörpern und können leichter die Poren des Gewebes durchschreiten [62]. Werden lediglich die F(ab‘) -Fragmente, wie im Falle unseres Sekundärantikörpers, verwendet, verstärkt sich dieser Effekt.

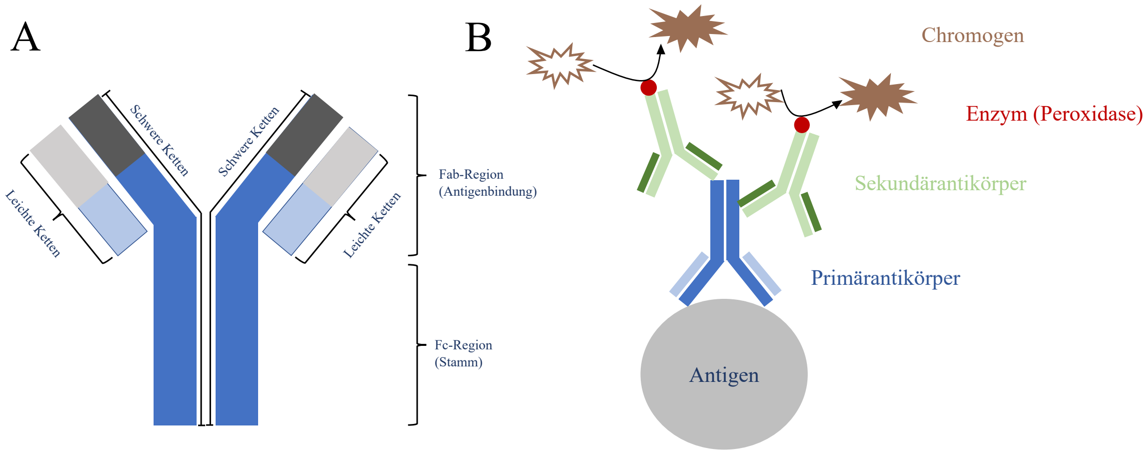

A
Schwere Ketten
Leichte Ketten
Schwere Ketten
Leichte Ketten
Fab-Region
(Antigenbindung)
Fc-Region
(Stamm)
B
Chromogen
Enzym (Peroxidase)
Sekundärantikörper
Primärantikörper
Antigen

Abbildung 10, A+B: Schematische Darstellung der Prinzipien der Immunhistochemie

A: Immunglobuline vom Typ IgG, eigene Darstellung in Anlehnung an [68].
B: Indirekten Immunhistochemie, eigene Darstellung in Anlehnung an [60], [35].

Polyklonale Antikörper binden verschiedene Epitope innerhalb eines Antigens. Diese Eigenschaft ergibt sich aus deren Herstellungsverfahren. Hergestellt werden polyklonale Antikörper, indem Versuchstieren eine antigene Substanz verabreicht wird [87]. Diese wird vom Immunsystem erkannt, dieses formiert sich und B-Zellen als Effektoren werden aktiviert. Wird das Versuchstier erneut mit dem Antigen konfrontiert, so wandeln sich die B-Zellen zu Plasmazellen um. Diese bilden Antikörper, die sie ins Blut abgeben. Da es sich hier um verschiedene Plasmazellen handelt, die gegen verschiedene Bereiche des Antigens gerichtet sind, erhält man die Variabilität der Epitope [87]. Vorteil der polyklonalen Antikörper ist, dass das Antigen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit trotz der im Verarbeitungsprozess entstandenen Strukturveränderungen erkannt wird [85].

Die Konzentration des verwendeten Primärantikörpers hat wesentlich Einfluss auf das Ergebnis der Immunhistochemie. Deshalb wurden zu Beginn der Versuchsreihe verschiedene Primärantikörper-Verdünnungen getestet (1:100, 1:250, 1:500, 1:1000), um eine Überfärbung beziehungsweise ein zu schwaches Signal im Schnitt zu vermeiden.

B. Antigen – Retrieval

Da die Proben nach der Entnahme einer 4 %igen-neutral gepufferte Formaldehydlösung (Formalin) zugeführt wurden, waren Antigen-Retrieval-Schritte anzuwenden.

Formalin fixiert die Proteine des Gewebes über Quervernetzung, indem Methylenbrücken sowie Brücken zwischen den Epsilon-Aminogruppen sowie den Stickstoffgruppen der Peptidbindung gebildet werden [62]. Die so gewonnene Stabilität erhält die Morphologie und Integrität des Gewebes auch über die weiteren Reaktionsschritte hinweg (Hitze, Wasserentzug) [62].

Der Natur dieser Fixierung liegt durch dessen additiven Mechanismus auch die Veränderung der Proteinstruktur, die Denaturierung, zu Grunde. Eine mögliche Folge wäre ein falsch-negatives Ergebnis der Immunhistologie, da der spezifische Antikörper durch die Vernetzung des Gewebes nicht zum Protein gelangt oder die Epitope des Antigens maskiert sind [78].

Um dies verhindern zu können, mussten Antigen-Retrieval-Methoden eingesetzt werden. Diese führen zur Auflösung der teilweise reversiblen Bindungen und erhöhen die Durchlässigkeit des Gewebes [62]. Eine sehr häufig angewandte Methode ist die hitzeinduzierte Antigendemaskierung [113]. Das Prinzip beruht hier auf dem Aufbrechen der Bindungen durch thermische Energie. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht bekannt [44]. Hierzu können die Schnitte in einem Autoklav erhitzt werden. Damit diese nicht austrocknen, werden sie für die Zeit im Autoklaven in Citratpuffer gestellt. Dabei wirkt sich dieser ebenfalls positiv auf die Gewebestruktur aus. Citratpuffer (pH 6,0) bindet Calcium-Ionen im Gewebe, die durch Calcium-Protein-Interaktionen ebenfalls zur Demaskierung der Antigene führen können [62].

C. Hintergrundfärbungen vermeiden

Im Rahmen der Immunhistochemie kann es zu zahlreichen Fehlbindungen der Antikörper im Gewebe kommen. Es können Strukturen angefärbt werden, die das gesuchte Protein nicht enthalten.

Viele dieser Fehlerquellen sind bereits bekannt und können durch einfache Methoden verhindert werden:

Inaktivierung endogener Enzyme

Die DAB-Methode beruht auf einer Umsetzung des Chromogens durch Enzyme der Familie der Peroxidasen. Durch die Kopplung dieses Enzyms an den Sekundärantikörper, werden die Chromogene direkt am Ort des Antigens umgesetzt und eine Färbung wird sichtbar.

Enthält nun die Probe selbst endogene Peroxidasen wird das Chromogen unspezifisch über das Präparat hinweg umgesetzt. Deshalb war es wichtig, die gewebeeigenen Peroxidasen vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper reaktionsunfähig zu machen [85].

Dazu wurde eine 3%ige Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Lösung in ausreichender Menge eingesetzt [19]. Dies war vor allem in der Leber von Bedeutung, da diese über eine sehr hohe endogene Enzymexpression verfügt [85].

Reaktive Bindungen verhindern

Außerdem wurde das zu untersuchende Gewebe, bevor der Primärantikörper hinzugegeben wurde, mit einem Normalserum der Tierspezies des Sekundärantikörpers bedeckt. Die Idee war, hydrophobe und geladene Gruppen im Gewebe zu sättigen, damit diese keine unspezifischen Bindungen mit dem Primärantikörper eingehen [85].

Dies galt auch für die gewebsständigen F_c-Rezeptoren der zu untersuchenden Probe. Diese können den F_c-Teil der Primärantikörper binden, was dann zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führt. Eine Aufsättigung durch die im Serum enthaltenen Immunglobuline verhinderte das [18].

Bei der Inkubation mit dem Normalserum wurde dieses nicht im Überschuss und nur in einer Konzentration von nicht mehr als 1-5 % auf den Schnitt aufgetragen. Eine zu hohe Konzentration hätte dazu führen können, dass sich zu viele Proteine auf dem Schnitt befinden und der Antikörper nicht mehr zum Antigen gelangt [85]. Des Weiteren war zu beachten, dass der Schnitt zwischen der Normalseren-Inkubation und dem Auftragen des Primärantikörpers nicht gewaschen wurde. Ein Waschen des Objektträgers würde die Bindungen lösen und den Schnitt wieder in den vorherigen Zustand bringen [85].

D. Validierung der Ergebnisse

Um durch die immunhistochemische Methode ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, musste gezeigt werden, dass die Färbung auch tatsächlich auf einer korrekten Antigen-Antikörper-Bindung beruht. Hierfür waren Kontrollen nötig, die zusätzlich zur eigentlichen Färbung mitgeführt wurden [18].

Primärantikörperkontrolle (Peptidkontrolle, Kompetitive Hemmung):

Diese wurde eingesetzt, um die Spezifität des primären Antikörpers für das gesuchte Antigen nachzuweisen. Eine einmalige Durchführung zur Etablierung des Verfahrens war ausreichend.

Der Primärantikörper wurde mit einer Peptidlösung zusammengeführt, die das aufgereinigte Antigen enthielt. So sollte der Antikörper durch die Peptide abgefangen werden ([18] ; [97]).

Sekundärantikörperkontrolle (Negativkontrolle):

Je eine Negativkontrolle wurde für jedes Organ pro Färbegang mitgeführt.

Die Sekundärantikörperkontrolle zeigte, ob die zustande gekommene Reaktion auch wirklich auf der Bindung an den Primärantikörper und nicht auf weiteren Strukturen im Gewebe beruhte [18]. Für diese Kontrolle wurde statt des Primärantikörpers ein Tierserum verwendet. Da in diesem keine spezifischen Antikörper vorkommen, sollte die IHC bei weiterer routinemäßiger Fortführung auf diesen Schnitten keine Färbung erzielen. So konnten unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers effektiv erkannt werden [18].

Positivkontrolle:

Wenn Schnitte auf die Expression eines bestimmten Proteins untersucht werden, können negative Reaktionen auch durch eine fehlerhafte Immunhistochemie bedingt sein. Fatal ist es, wenn dies als fehlende Expression interpretiert wird. Aus diesem Grund wurden Positivkontrollen eingesetzt. Von diesen weiß man, dass sie das Protein mit Sicherheit exprimieren und bei korrekter Vorgehensweise positiv gefärbt sind. Es boten sich endogene Positivkontrollen (Gefäßanschnitte) an, d.h. diese befanden sich im zu untersuchenden Schnittpräparat und wurden automatisch bei jedem Färbegang mitgeführt [85].

3.2.5.2.2 Protokoll der Immunhistochemie-DAB-Färbung für Paraffinschnitte

Am Vortag der immunhistochemischen Färbungen wurden die notwendigen Substanzen auf ihre Verfügbarkeit geprüft, um einen reibungslosen Ablauf der Färbung zu gewährleisten. Der anschließende Färbegang erstreckte sich über zwei Tage.

Tag 1 - Vorbereitungen

Zu Beginn des ersten Tages wurden die Färbestationen aufgebaut und benötigte Lösungen vorbereitet.

Der Citratratpuffer (Antigen Retriaval) wurde vor der Verwendung frisch angesetzt. Hierzu wurden 5 ml des 100fachen Citratpuffers mit 495 ml destilliertem Wasser vermengt. Der angesetzte Citratpuffer wurde im Anschluss in einer Küvette im Wärmeschrank auf 95 Grad Celsius vorgewärmt.

Für die an diesem Tag stattfindenden Inkubationen wurden Feuchtkammern vorbereitet. Diese wurden mit Leitungswasser-getränkten Papiertüchern versehen und so feucht gehalten. So konnte auch bei längeren Inkubationszeiten ein Austrocknen der Schnitte verhindert werden.

Der Primärantikörper wurde vor seiner Verwendung auf die gewünschte 1:100 Verdünnung gebracht. Hierzu wurde der 1:50 vorverdünnte AK durch eine 1:2 Verdünnung mit Blockierungslösung vermengt und mittels Vortexter vermischt. Um 400 µl der Primär-Antikörper-Lösung zu erhalten, wurden 200 µl der im Gefrierfach gelagerten auf 1:50 vorverdünnten Antikörper-Lösung mit 200 µl der Blockierungslösung (10 % Normal-Goat-Serum (NGS) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)) verdünnt.

Die für die Negativkontrolle benötigte Kaninchenserum-Stocklösung (1:50) wurde durch Hinzufügen von PBS auf die gewünschte 1:500 Verdünnung gebracht. Die Peptidkontrolle wurde am Vortag der immunhistochemischen Färbung vorbereitet. Das Kontrollpeptid (40 µg) wurde hierzu abzentrifugiert und anschließend in 25 µl PBS gelöst.

Des Weiteren wurden 50 µl Primär-Antikörper-Lösung in der verwendeten Standardverdünnung (1:100) vorbereitet. Die beiden Lösungen wurden anschließend zusammengeführt und über Nacht im Kühlschrank bei vier Grad Celsius inkubiert.

Tag 1 - Färbeschritte

Die Färbung startete mit der Entparaffinierung der Leerschnitte unter dem Abzug. Dazu wurden die Schnitte in einer Küvette für 3 x 5 min in Xylol gestellt. Dabei wurde für jeden Durchgang frisches Xylol verwendet.

Im Anschluss wurden die Proben erneut rehydriert. Dies geschah mittels absteigender Alkoholreihe. Dazu wurden die Objektträger für zweimal 5 min in eine Küvette mit 100 %igem Isopropanol und für jeweils 5 min in 90 %iges, 80 %iges und 70 %iges 2-Propanol gestellt. Der letzte Schritt der Rehydrierung bestand aus dem Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser für eine Dauer von 5 min. Die Küvette samt den Objektträgern wurde anschließend in den vorgeheizten Citratpuffer überführt und für 60 min bei 95 Grad im Wärmeschrank inkubiert. Nach 30-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für eine Minute in einer Küvette in PBS gewaschen.

Die Schnitte wurden aus der Küvette genommen, trocken geklopft und in eine Feuchtkammer gelegt. Die Umrandung der Gewebeproben auf den Objektträgern erfolgte im Anschluss mittels eines Fettstiftes (Darko-Pen). Der um die Präparate gezeichnete Kreis wirkte wasserabweisend und gewährleistete so bei den folgenden Schritten wie beispielsweise der Antikörperinkubation die Konzentrierung der Lösungen auf das Schnittpräparat. Auf die umrandeten Schnitte wurde dann die Blockierungslösung pipettiert und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Bei der Blockierungslösung handelte es sich um 10 %iges Normal Goat Serum in PBS. Um 50 ml dieser Blockierungslösung herzustellen, wurden 5 ml 10 %iges Normal Goat Serum, 50 µl 0,1 %iges Triton X100 sowie 50 ml PBS vermengt. Die Blockierungslösung wurde nach der einstündigen Inkubation vom Schnitt geklopft und die Primär-Antikörper-Lösung in einer 1:100 Verdünnung auf den Schnitt pipettiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Negativkontrolle wurde statt des Primär-Antikörpers Kaninchenserum in PBS auf den Schnitt aufgebracht. Alle weiteren Schritte wurden beibehalten.

Im Rahmen der Peptidkontrolle wurde die am Tag zuvor vorbereitete Peptid-Antikörper-Lösung anstelle der reinen Primär-Antikörperlösung auf den Schnitt aufgetragen. Auch hier wurden anschließend alle weiteren Schnitte analog durchgeführt.

Tag 2 - Vorbereitung

Für den zweiten Tag der immunhistochemischen Färbung wurde zur Peroxidase-Inaktivierung 3 %iges H2O2 benötigt. Dieses wurde zu Beginn des Tages frisch angesetzt. Hierzu wurde die 35 %ige H2O2 Lösung mit PBS vermengt. Um 100 ml der 3 %-Lösung herzustellen, benötigte man 8,57 ml des 35 %igem H2O2 sowie 91,43 ml PBS.

Der Sekundärantikörper wurde vorbereitet, indem zunächst 20 µl Antikörper mit 980 µl Blockierungslösung zusammengeführt wurden (1:50 Verdünnung) und 100 µl dieser Sekundärlösung erneut mit der Blockierungslösung vermengt wurden (900 µl). Das Ergebnis war die gewünschte 1:500 Verdünnung des Sekundärantikörpers, der bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert wurde.

Zum Reinigen der Schnitte wurde Phosphate-buffered-saline (PBS) (Isoton, pH 7,4) verwendet, welches zu Beginn des Tages in ausreichender Menge angesetzt wurde.

Tag 2 – Färbeschritte

Nach den Vorbereitungen wurde am Folgetag die Antikörperlösung von den Schnitten abgeklopft und für 2 x 2 min in einer Küvette in PBS gewaschen. Das Waschen in PBS diente dazu, die überschüssige Lösung von den Schnitten zu entfernen und sowohl den pH-Wert als auch die Salzkonzentration für die Proteine des Gewebes zu optimieren [62].

Die Schnitte wurden dann für 10 min mit 3 %igem H_2O_2 in PBS in einer Feuchtkammer inkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger abgeklopft und erneut für 2 x 2 min in PBS gewaschen.

Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde in einer 1:500 Verdünnung aufgetragen und für 60 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der 60 min erfolgte ein erneutes Abklopfen und Waschen der Schnitte für 2 x 2 min in PBS.

Die DAB-Lösung wurde frisch angesetzt. Hierzu wurde das ImmPACT DAB-Reagenz 1 mit dem ImmPACT DAB-Reagenz 2 in einer 1:1 Verdünnung vor dem Gebrauch zusammengeführt.

Um die für das Gewebe charakteristische Inkubationszeit herauszufinden, wurde zunächst einer der Schnitte unter mikroskopischer Sichtung mit DAB-Lösung inkubiert, bis sich die charakteristische gewünschte braune Färbung ergab, sofern der Kanal im untersuchten Gewebe exprimiert wurde. Die Reaktion wurde durch einmaliges Eintauchen in PBS unterbrochen. Die restlichen Schnitte wurden demnach für diese Zeiten mit DAB-Lösung bedeckt, bis die Reaktion durch Eintauchen in PBS unterbrochen wurde.

Vom PBS aus wurden die Schnitte in destilliertes Wasser gestellt und in diesem für eine Minute gewaschen.

Die Gegenfärbung der Präparate wurde mittels Hämatoxylin nach Ehrlich (gefiltert) durchgeführt. Durch den damit gewonnenen Kontrast ließ sich die Gewebestruktur besser darstellen. In Hämatoxylin wurde die Küvette mit den Schnitten lediglich einmal gedippt. Der Färbezeitraum wurde kurzgehalten, um eine Überfärbung und damit Überlagerung der eigentlichen IHC-Färbung zu vermeiden [62].

Vor der Benutzung wurde das Hämatoxylin nach Ehrlich gefiltert.

Die überschüssige Farblösung wurde von den Präparaten entfernt, indem diese in destilliertem Wasser gespült wurden. Im Anschluss wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser für 5 min gebläut.

Zur Dehydration durchliefen die Proben eine aufsteigende Alkoholreihe. Dabei verblieben sie für je 5 min in 70 %igem, 80 %igem sowie 90 %igem 2-Propanol, bevor sie für 2 x 5 min in 100 %iges 2-

Propanol eingebracht wurden. Nach der Alkoholreihe wurden die Proben für 3 x 5 min zur Reinigung in Xylol gestellt.

Der Färbegang wurde damit beendet und die Schnitte mittels Roti Histokitt eingedeckt. Zum Aushärten des Klebers verblieben diese aufgrund der noch vorhandenen Xylol-Dämpfe unter dem Abzug.

3.2.6 Ergebnisanalyse

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop. Die Schnitte wurden dabei im Hellfeld betrachtet.

Um die Färbung auch digital auswerten zu können, wurde das Digitalmikroskop Nikon Eclipse E200 in den Vergrößerungen 4x, 10x 20x, 40x, 60x sowie das Computerprogramm TCapture verwendet. Bilder von den immunhistochemisch-gefärbten Schnitten wurden mit der digitalen Mikroskop-Kamera TrueChrome Metrics von Tucsen aufgenommen.

Für die Aufnahme der Bilder der HE-Färbungen wurde die Mikroskopkamera BRESSER MikroCam SP 5.1 mit dem Systemmikroskop Leica DM1000 und die zugehörige Software Mikrocam LabII verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Spenderkollektiv

Die Altersspanne der in die Studie eingeschlossenen Körperspendern lag zwischen 75 und 97 Lebensjahren (Abbildung 11). Die Körperspender hatten ein Durchschnittsalter von 84 Jahren. Von den Spendern waren 7 männlich und 5 weiblich.

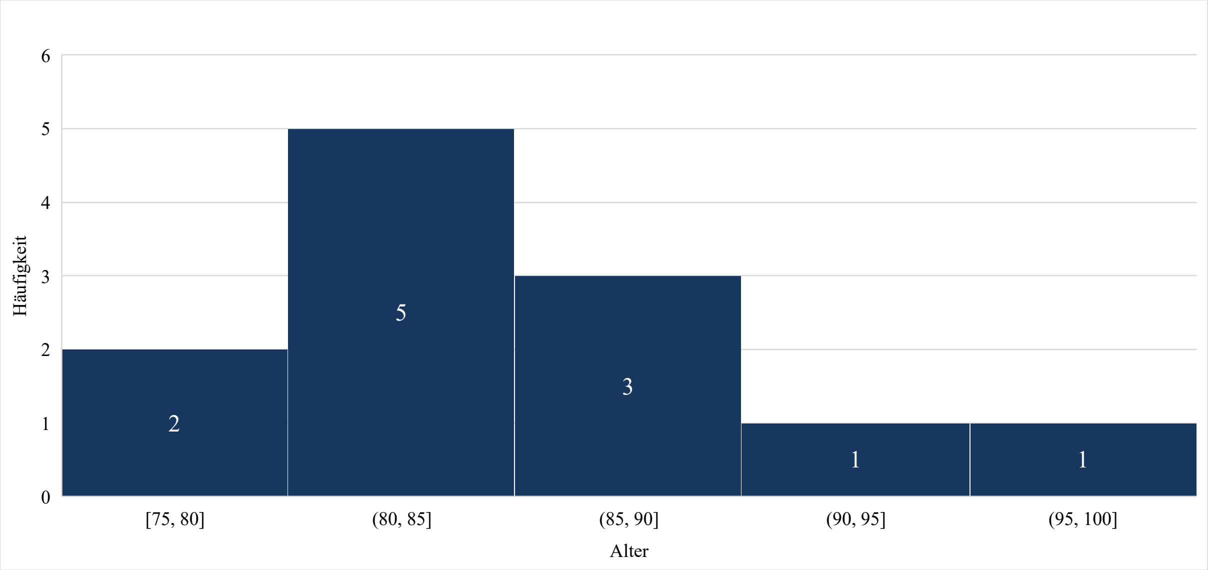


Abbildung 11: Altersverteilung der Körperspender

4.2 Auswertungsschema

Die Untersuchung der Expression und Lokalisation des TRPC6-Kanals erfolgte immunhistochemisch. Eine Braunfärbung durch das Chromogen DAB ergab sich an allen Stellen des Präparates, an welchen das TRPC6-Antigen lokalisiert war. Demnach wurde aus der Braunfärbung auf das Vorhandensein des TRPC6-Kanals im untersuchten Organ geschlossen.

Die Auswertung erfolgte unabhängig durch Eigen- und Fremdbewertung anhand des folgenden Auswertungsschemas. Die Fremdbewertung wurde von Dr. med. Jan Federspiel (Rechtsmedizinisches Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes) durchgeführt. Die Eigenbewertung erfolgte durch die Autorin. Die Ergebnisse beider Auswertungen wurden im Anschluss verglichen.

Schema – Ablauf

Zunächst erfolgte die Beurteilung der TRPC6-Expression in den verschiedenen Gewebstypen eines Organs anhand repräsentativer Schnitte. Hierfür wurden zwei Kategorien definiert: TRPC6-positiv und TRPC6-negativ. Dies erfolgte sowohl für das Leber- und Gallenblasengewebe als auch für die extrahepatischen Gallengänge.

Falls die Zelltypen positiv für TRPC6 waren, schloss sich eine Beurteilung des subzellulären Expressionsmusters an (membranös, zytoplasmatisch, nukleär, anderweitig).

Es folgte die Auswertung der Färbungen anhand eines Kreuzschemas.

Hierbei wurden zunächst alle Schnitte eines Organs von einem Spender untersucht und verglichen. Daraufhin folgte der Vergleich der Schnitte verschiedener Spender des identischen Entnahmeortes.

Der Vergleich der Protein-Expression zwischen den Schnitten eines Spenders sowie zwischen den Schnitten der gleichen Entnahmestelle verschiedener Spender erfolgte **semi-quantitativ**.

Hierfür wurden vier Färbeintensitäten festgelegt:

0 = ungefärbt
1 = leicht gefärbt
2= mäßig gefärbt
3 = stark gefärbt

Daraus ergaben sich erneut zwei unterschiedliche Kategorien. Zum einen die Kategorie, die die nicht gefärbten Schnitte und damit die Färbeintensität „0 = ungefärbt“ umfasste. Diese wurde als „Negativität“ bezeichnet.

Die restlichen Färbeintensitäten (1-3) konnten allesamt der Kategorie „Positivität“ zugeordnet werden.

Im Gallenblasengewebe zeigten sich Schwankungen in der Morphologie der Gewebeproben zwischen den verschiedenen Spendern. Um diese bei der Beurteilung zu berücksichtigen und damit die Vergleichbarkeit der Schnitte zu erhalten, wurde das Kreuzschema durch ein Stufensystem ergänzt:

- Stufe 1: Zeigt die *Lamina propria /Tunica serosa/adeventitia* flächenhafte braune Färbung auch in azellulären Arealen? **ja /nein.** Wenn sich eine deutliche Überfärbung zeigte, wurden die Schnitte ausgeschlossen.
- Stufe 2: Ist das Epithel vollständig abgelöst? **ja / nein**. Wenn Ja, Bewertung der Cholangiozyten in diesen Schnitten nicht möglich.
- Stufe 3: Ist das Epithel teils siegelringartig konfiguriert? **ja / nein**
- Stufe 4: Die semiquantitative Beschreibung der Färbeintensität und der Vergleich der Schnitte erfolgte daraufhin nur zwischen gleich bewerteten Schnitten. Somit kann es bei den folgenden Vergleichen zu abweichenden Spenderzahlen kommen.

4.3 Kontrollen

4.3.1 Negativkontrollen

Bei jedem Färbegang wurde eine Negativkontrolle pro Gewebstyp mitgeführt. Die Kontrollen waren bei allen Durchgängen erfolgreich, sodass die Braunfärbung auf die Bindung des Primärantikörpers an das Antigen zurückzuführen ist. Es folgt exemplarisch die Darstellung jeweils eines Schnittes pro Gewebstyp.

Die Negativkontrolle des Gallenblasengewebes (Abbildung 12 B) zeigt sich teilweise eine gelb-grüne Färbung, die durch den eingelagerten biliären Farbstoff bedingt ist.

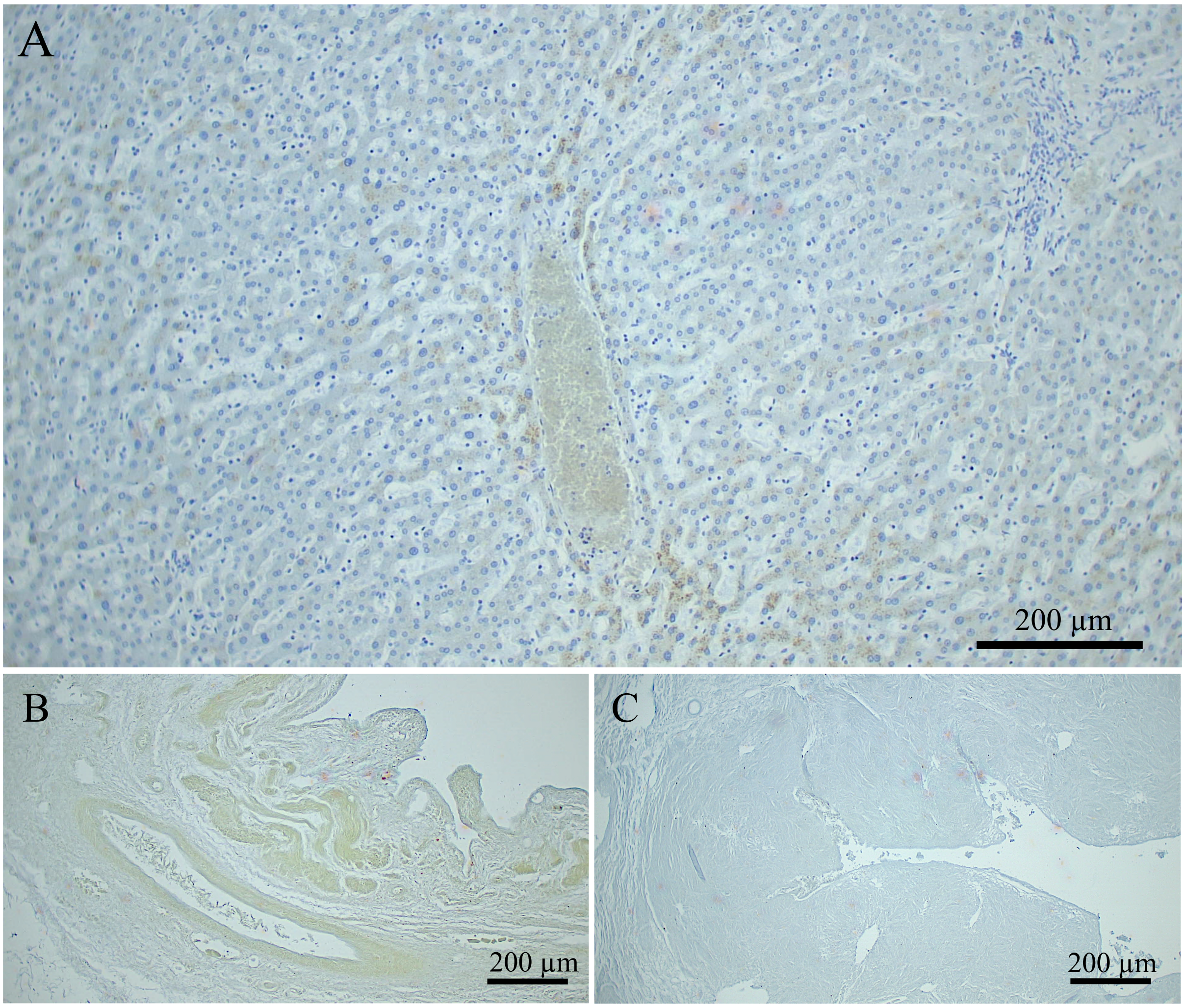


Abbildung 12, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahme von Negativkontrollen, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Negativkontrollen**

A: Lebergewebe, Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*)
B: Gallenblasengewebe, Spender 09, *Collum vesicae biliaris*
C: Extrahepatischer Gallenweg, Spender 01

4.3.2 Peptidkontrolle

Die Peptidkontrolle wurde an einem Leberschnitt des Spenders 10 durchgeführt. Das Präparat zeigte nach Vorinkubation des Primärantikörpers mit dem Kontrollpeptid keine Färbung der Strukturen in der darauffolgenden Immunhistochemie (Abbildung 13 A). Die Peptidkontrolle ähnelte in ihrem Erscheinungsbild der Negativkontrolle (Abbildung 13 B) und war damit erfolgreich. Somit bindet der Primärantikörper spezifisch an das TRPC6-Antigen.

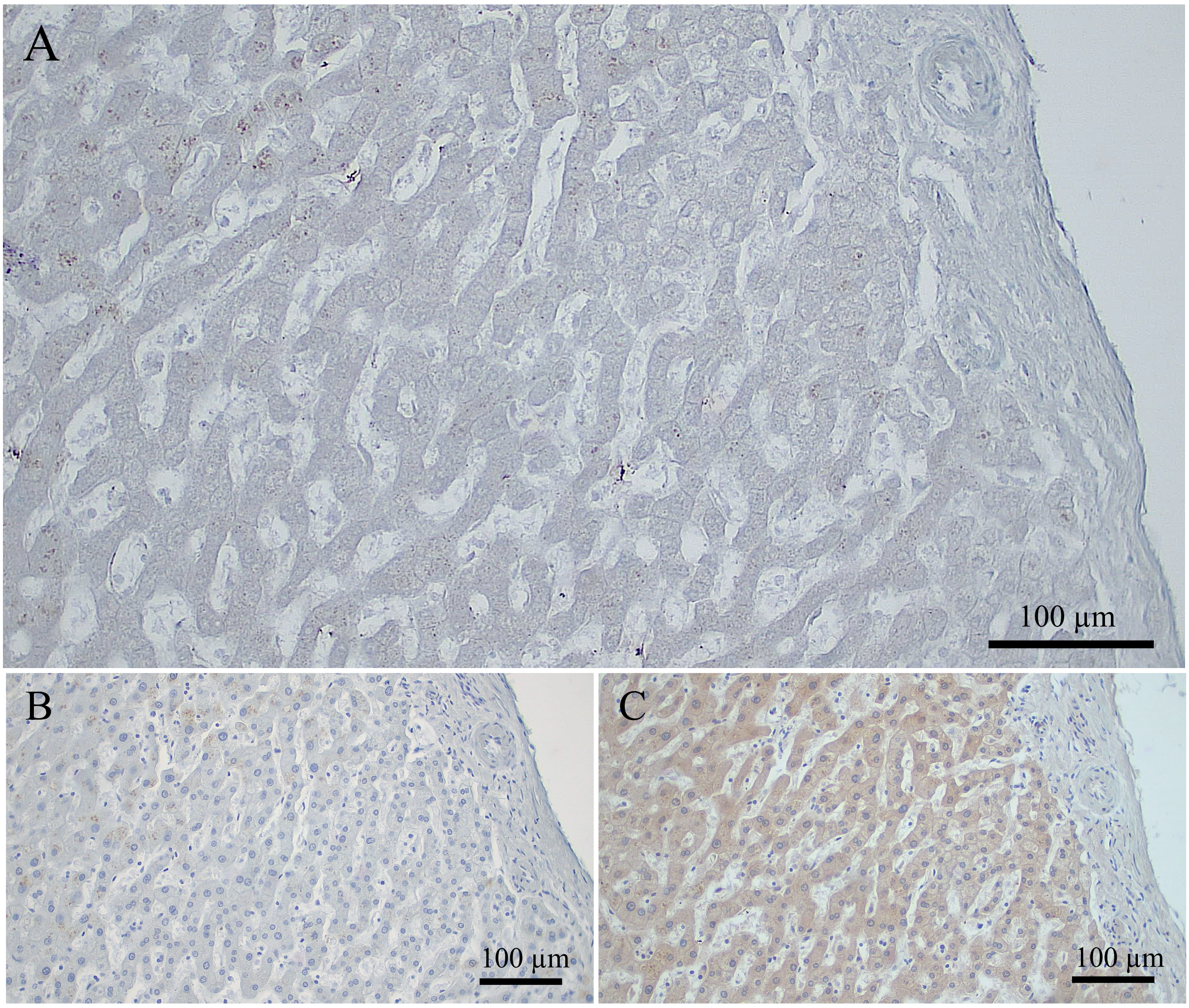


Abbildung 13, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*), 20fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Peptidkontrolle**

A: Peptidkontrolle
B: Negativkontrolle
C: Immunhistochemische Färbung, Primärantikörper-Konzentration 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit

4.4 Auswertung der Leberschnitte

Alle gewonnenen Leberproben wurden zunächst mit der Übersichtsfärbung Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um sie auf die morphologische Intaktheit des Gewebes zu untersuchen (Abbildung 14: erkennbar intaktes Leberparenchym; erkennbar intakte sechseckige Leberläppchen).

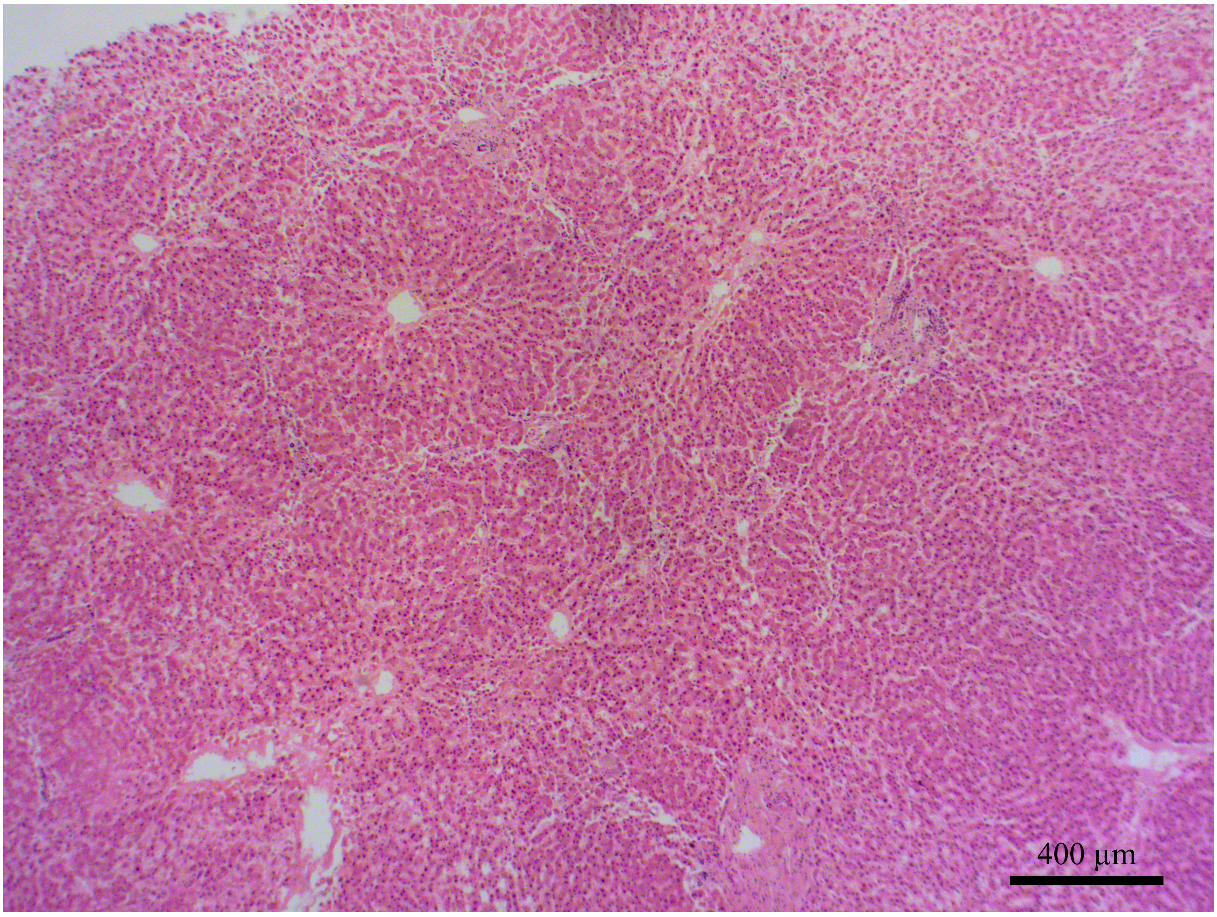


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 01; *Lobus hepatis dexter* (*ventral,* 1), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **Übersichtsfärbung Lebergewebe**

Von den 73 nach Hämatoxylin-Eosin gefärbten Leberproben wurden 45 in die Studie eingeschlossen. Somit wurden insgesamt 45 Leberproben immunhistochemisch auf die Expression des TRPC6-Proteins untersucht. Die Proben wurden aus 11 verschiedenen Spendern gewonnen (n=11).

Dabei beschränkte sich die Auswahl lediglich auf die gut erhaltenen Leberschnitte, die nicht von postmortaler Autolyse betroffen waren. Der 12. Spender (05) musste aufgrund schlechter Qualität des Leberparenchyms ausgeschlossen werden (Abbildung 15).

In Tabelle 11 sind die Spender, aus denen die Proben entnommen und anschließend immunhistochemisch gefärbt wurden, sowie die dazugehörigen Entnahmestellen aufgeführt.

Tabelle 11: Immunhistochemisch-gefärbte Proben – Leberschnitte

Entnahmeort	**Spender 01**	**Spender 02**	**Spender 03**	**Spender 04**	**Spender 05**	**Spender 06**
Lobus caudatus	X		X	X	/ *	X
Lobus quadratus	X X		X	X	/ *	
Lobus hepatis sinister, ventral	X X	X	X	X	/ *	X
Lobus hepatis sinister, kaudal				X	/ *	
Lobus hepatis dexter, ventral	X X	X	X	X	/ *	X
Lobus hepatis dexter, kaudal				X	/ *	

/ * Ausgeschlossener Spender aufgrund von Autolyse des gesamten Lebergewebes

Entnahmeort	**Spender 07**	**Spender 08**	**Spender 09**	**Spender 10**	**Spender 11**	**Spender 12**
Lobus caudatus		X X	X	X X		X X
Lobus quadratus					XX	
Lobus hepatis sinister, ventral	X					
Lobus hepatis sinister, kaudal		X		X X	X	
Lobus hepatis dexter, ventral	XXX	X	X	X	X	X X

Auch Proben, die vom gleichen Spender stammten, waren teils unterschiedlich gut erhalten. Die Proben, die konstant über alle Spender hinweg am besten konserviert waren, waren die aus dem *Lobus caudatus* stammenden.

Es zeigte sich in einer Gewebsstanze mit zunehmendem Abstand von der Leberkapsel zur Organmitte eine zunehmende Autolyse der Leberepithelzellen. Während unterhalb der Leberkapsel die histologische Läppchen-Gliederung mit abgrenzbaren Leberzellbalken erkennbar war, zeigte sich in Richtung Organmitte eine zunehmende Gewebszerstörung mit verschwimmenden Zellgrenzen sowie fehlender Läppchen-Gliederung (Abbildung 16, Veränderung der Gewebsstruktur ausgehend von der Glisson-Kapsel (A) zur Organmitte der Leber (B)).

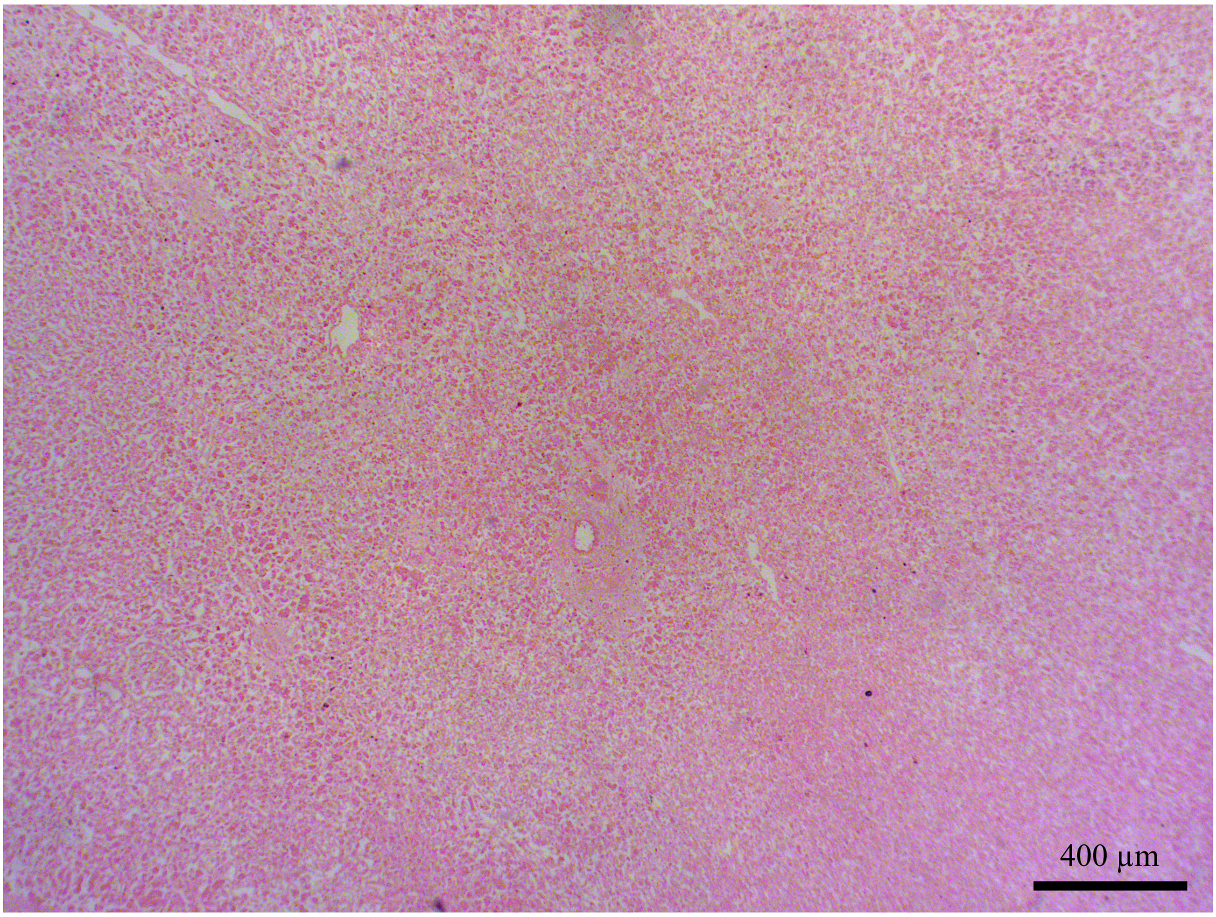


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Schnittes aus dem *Lobus quadratus*, Spender 05, HE-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **Exemplarische Darstellung eines Schnittes des ausgeschlossenen Spenders**

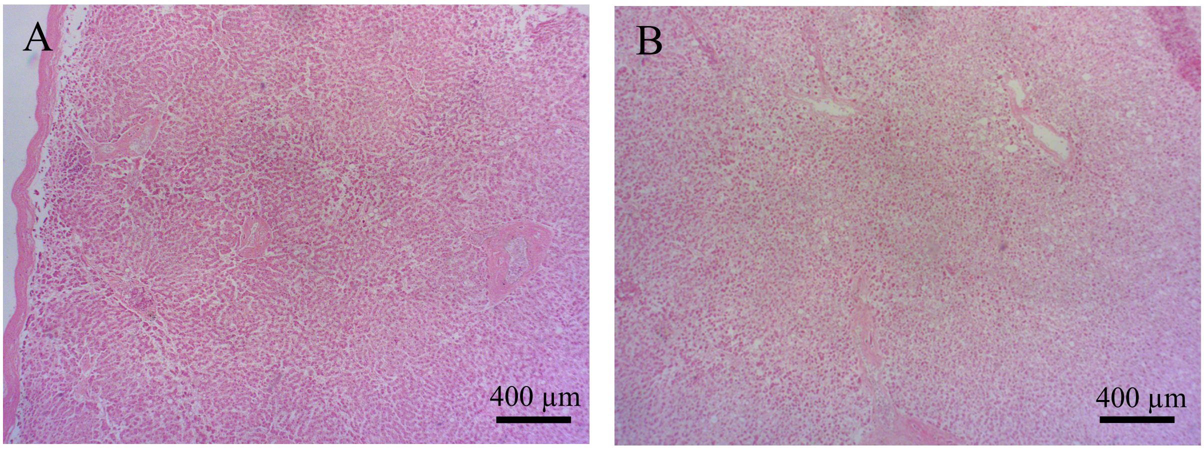


Abbildung 16, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe 06, *Lobus hepatis dexter*, (*ventral*), HE-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **Gleicher Schnitt, Aufnahmen mit unterschiedlichen Abständen zur Organaußenseite**

A: Organperipherie mit Glisson-Kapsel, erhaltene Leberarchitektur
B: Ca. 2 cm Abstand von der Leberkapsel mit zunehmender Autolyse, Morphologie nicht erkennbar

4.4.1 Variation der Primärantikörperkonzentrationen und DAB-Einwirkzeiten

Die Stärke der Braunfärbung des Präparates ist im Wesentlichen abhängig von zwei Parametern:

1. Konzentration des Primärantikörpers
2. Einwirkzeit des Chromogens (DAB)

Es wurden unterschiedliche Kombination der beiden Parameter getestet. Die Ergebnisse der Testungen sind in Abbildung 17, A-F zu sehen.

Das beste Ergebnis der Testreihe für das Lebergewebe konnte die Kombination aus der Primärantikörperverdünnung 1:100 und der DAB-Einwirkzeit von 4 min erzielen. Hier zeigte sich ein ausreichender Kontrast ohne Überfärbung des Präparates.

Alle im folgenden verglichenen Schnitte wurden in der gleichen Primärantikörperverdünnung (1:100) gefärbt und erhielten bei der Färbung die DAB-Einwirkzeit von 4 min, um die Vergleichbarkeit der Schnitte zu gewährleisten.

Eine Ausnahme bildet Abbildung 18 „Nahaufnahme des Leberparenchym“ bei der das Gewebe eine DAB-Einwirkzeit von 7 min erhielt. Durch die stärkere Färbung konnte die subzelluläre Lokalisation des TRPC6-Kanals in den Leberepithelzellen besser beurteilt werden.

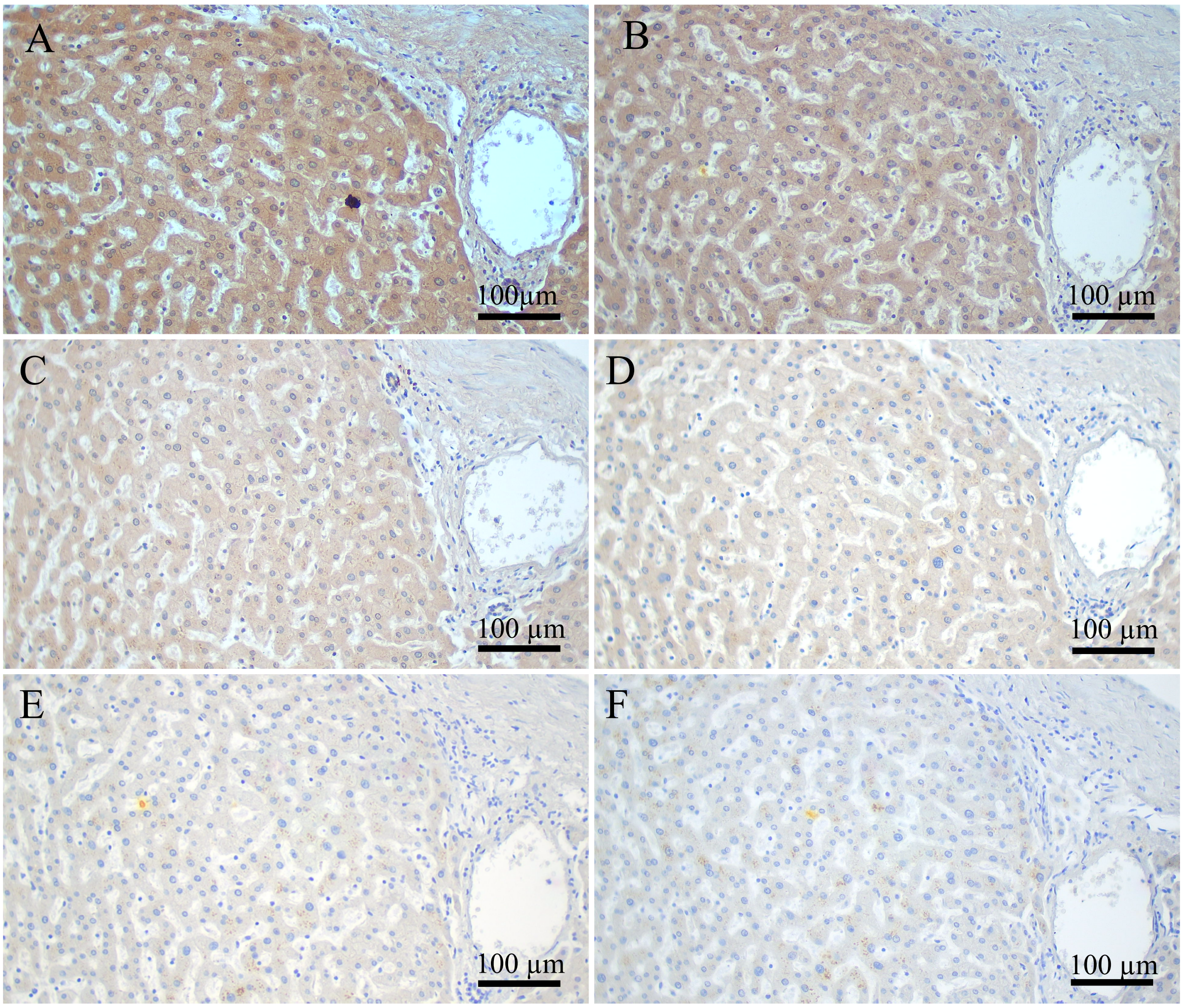


Abbildung 17, A-F: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe Spender 10; *Lobus caudatus*, 20fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Variation der Primärantikörperverdünnung und DAB-Einwirkzeit - Leber**

A: Primärantikörperverdünnung 1:100; Einwirkzeit 7 ½ min
B: Primärantikörperverdünnung 1:100; Einwirkzeit 4 min
C: Primärantikörperverdünnung 1:250; Einwirkzeit 7 ½ min
D: Primärantikörperverdünnung 1:500; Einwirkzeit 7 ½ min
E: Primärantikörperverdünnung 1:1000; Einwirkzeit 7 ½ min
F: Negativkontrolle

4.4.2 TRPC6-Expressionsmuster in der Leber

Zunächst wurde jeder Schnitt auf die Expression des TRPC6-Kanals in den verschiedenen Strukturen der Leber untersucht (Abschnitt 4.4.2.1). Anschließend wurden die Schnitte miteinander verglichen (Abschnitt 4.4.2.2).

4.4.2.1 Morphologische Zuordnung der Proteinexpression zu den Strukturen

Die morphologische Zuordnung der Signale zu den Strukturen erfolgte repräsentativ an Schnitten des Spenders 10, 06 sowie 12.

Mit dem bloßen Auge sowie in geringer Vergrößerung betrachtet, imponierten die gefärbten Leberpräparate in einer bräunlichen Färbung. In Zusammenschau mit der Negativkontrolle, die keine Braunfärbung des Präparates zeigte, kann von einer TRPC6-Expression im Lebergewebe ausgegangen werden.

Hepatozyten

Wird ein Leberläppchen in den Fokus genommen, so können die radiär angeordneten Leberzellbalken gut identifiziert werden. Diese sind eindeutig und abgrenzbar braun gefärbt. Das Signal ist dabei auf die TRPC6-Expression in den Hepatozyten zurückzuführen. Die subzelluläre Lokalisation des TRPC6-Kanals in den Hepatozyten kann wie folgt beschrieben werden:

Es zeigt sich eine Färbung des Zytoplasmas, die das Bild einer leichten Körnung ergibt. Der Zellkern ist dabei ausgespart (TRPC6-negativ) und demnach durch Hämatoxylin blau angefärbt. Außerdem zeigt sich eine deutliche Expression des TRPC6-Proteins im Bereich der Zellgrenzen, die verglichen mit dem Zytoplasma insgesamt kräftiger erscheint (Abbildung 18). Diese kann als submembranöse Expression beschrieben werden.

Die Sinusoide stellen sich ungefärbt dar. Das Endothel ist teilweise kollabiert. In den Sinusoiden liegen Zellen, die keine spezifische Färbung zeigen und somit den TRPC6-Kanal nicht exprimieren (Abbildung 18, Pfeile). Es sind lediglich deren Zellkerne, die durch die Gegenfärbung blau erscheinen, zu sehen. Außerdem können in den Sinusoiden Zellen identifiziert werden, die nur in Teilbereichen den TRPC6-Kanal exprimieren (Abbildung 18, Pfeilköpfe). Diese Zellen können sowohl den Endothelzellen, Kupffer-Zellen aber auch den hepatischen Sternzellen entsprechen, da sich die Zellen im histologischen Schnitt nicht eindeutig voneinander unterscheiden lassen.

In der histologischen Baueinheit des Leberläppchens zeigte sich von der Peripherie des Läppchens in Richtung der zentral gelegenen Vene keine Veränderung der TRPC6-Expression in den Leberepithelzellen. Die Hepatozyten zeigten über den gesamten Schnitt hinweg eine gleich starke Färbung (Abbildung 19). Zentral im Bild ist die abführende Vene (Zentralvene, Abbildung 19) sowie die radiär zu dieser angeordneten Hepatozytenbälkchen zu sehen.

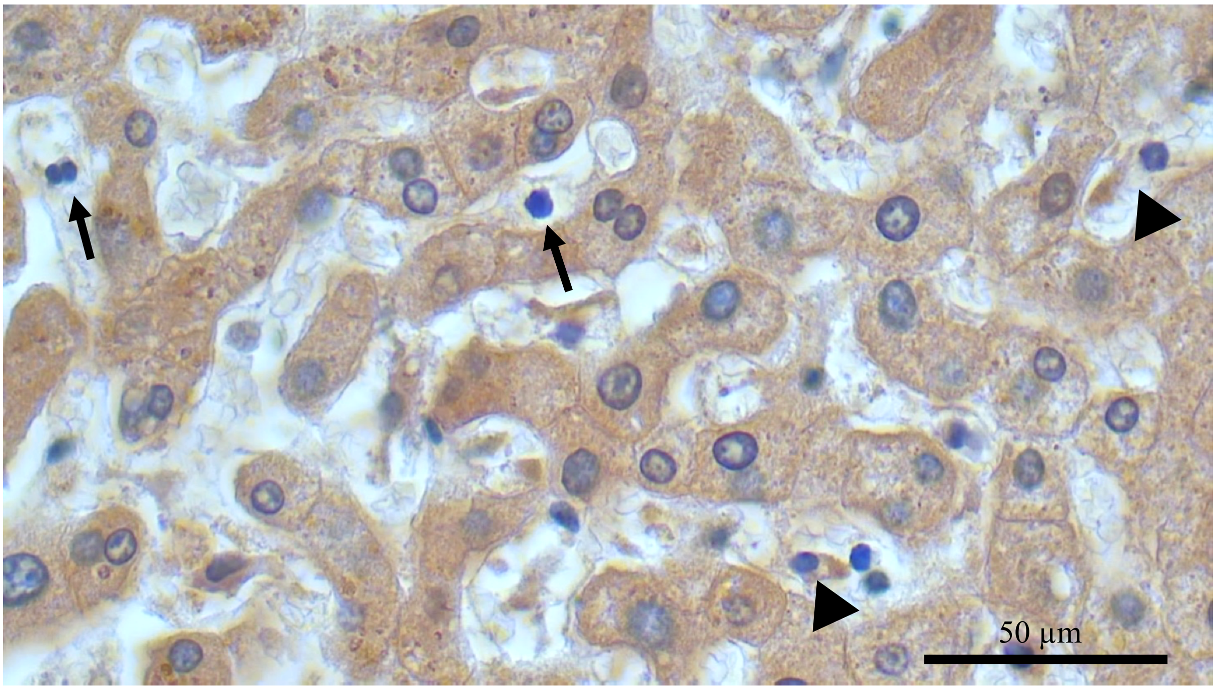


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 10*, Lobus hepatis sinister* (*kaudal,* 1), Pfeile = TRPC6-negative Zellen, Pfeilköpfe = TRPC6-positiv nur in Teilbereichen, Primärantikörperverdünnung 1:100, 7 ½ min DAB-Einwirkzeit; 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: **Nahaufnahme Leberparenchym**

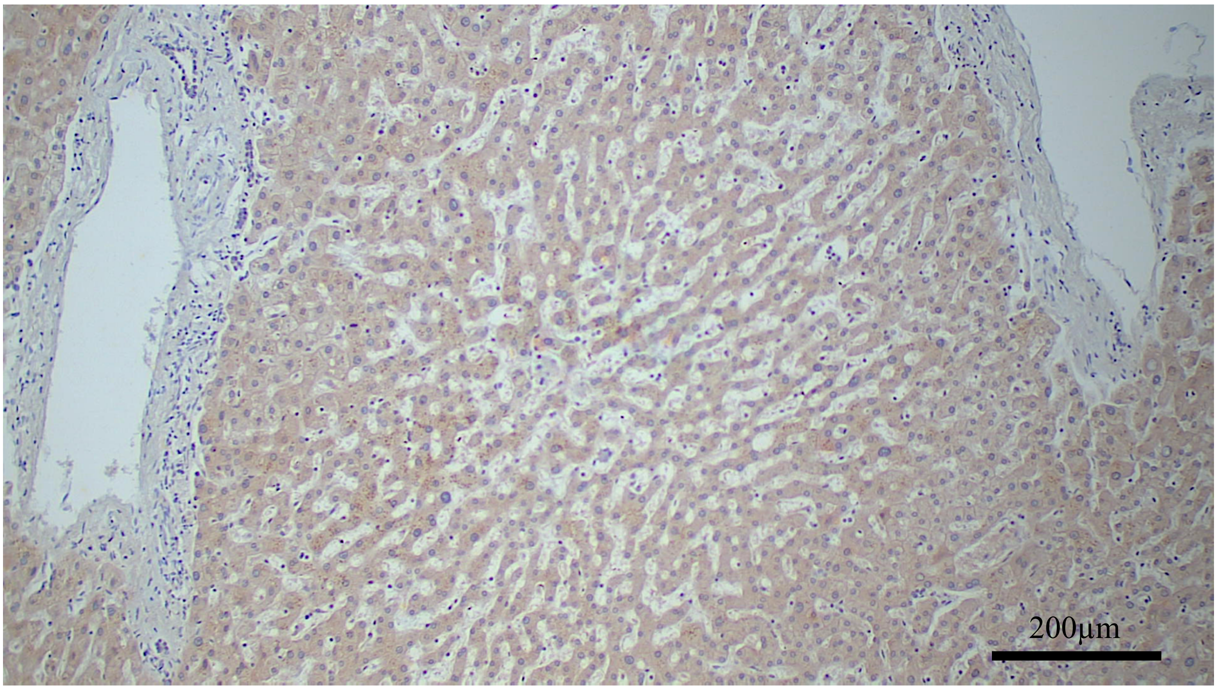


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*,1), Primärantikörperkonzentration 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm**: TRPC6-Expression im Leberläppchen**

Gefäßstraßen

In den Bindegewebsstraßen der Leber verlaufen die intrahepatischen Abgänge der Pfortader, der Leberarterie sowie die intrahepatischen Gallengänge. Des Weiteren finden sich abführende Venen.

Das umgebende Bindegewebe erschien in der Immunhistologie bläulich und exprimiert das TRPC6-Protein demnach nicht.

Die in der Leber verlaufenden Blutgefäße wiesen in ihrer Wandschichtung folgendes Färbeverhalten auf:

Die intrahepatischen Arterien/Arteriolen zeigten eine schwache Färbung mit Betonung im Bereich der *Tunica intima*. Die in Abbildung 20 B abgebildeten Arteriolen des Spenders 06 erscheinen schwach positiv.

Die in der Leber vorkommenden Venen, sowohl die Abgänge der Pfortader als auch die Zuflüsse zur *Vena cava inferior*, zeigten ebenfalls eine schwache TRPC6-Expression in ihrer Wandung. Eine Akzentuierung in einer bestimmten Wandschicht ist in den venösen Gefäßen nicht erkennbar (Abbildung 20, A).

Die Cholangiozyten der in den Portalfeldern verlaufenden Gallengänge waren positiv für das TRPC6-Protein. Die Braunfärbung nahm hierbei proportional zur Kalibergröße der Gallengänge zu. Das subzelluläre Expressionsmuster in den Cholangiozyten war zytoplasmatisch. Die sich anschließende bindegewebige Gallengangswandung blieb ungefärbt (Abbildung 20, C).

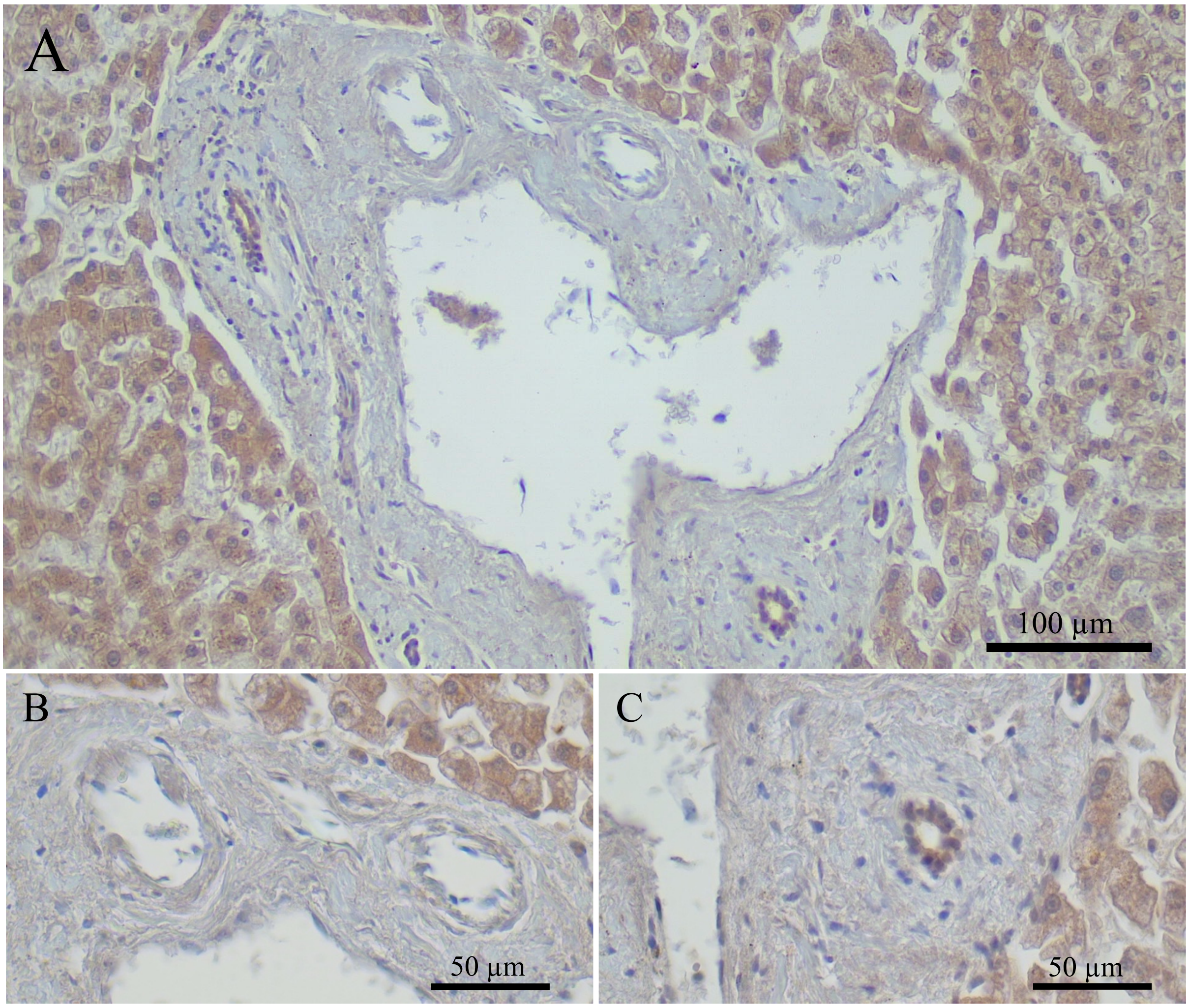


Abbildung 20, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe Spender 06, *Lobus caudatus*, Primärantikörperverdünnung 1:100; 4 min**: Bindegewebsstraße Leber**

A: 20fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: Übersicht über portale Trias
B: 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: Arteriolen
C: 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: intrahepatischer Gallengang

Leberkapsel (Glisson-Kapsel)

Die Leberkapsel besteht aus derbem Bindegewebe. Sie blieb wie das periportale Bindegewebe ungefärbt (Kategorie „negativ“) und exprimiert das TRPC6-Protein folglich nicht (Abbildung 21).

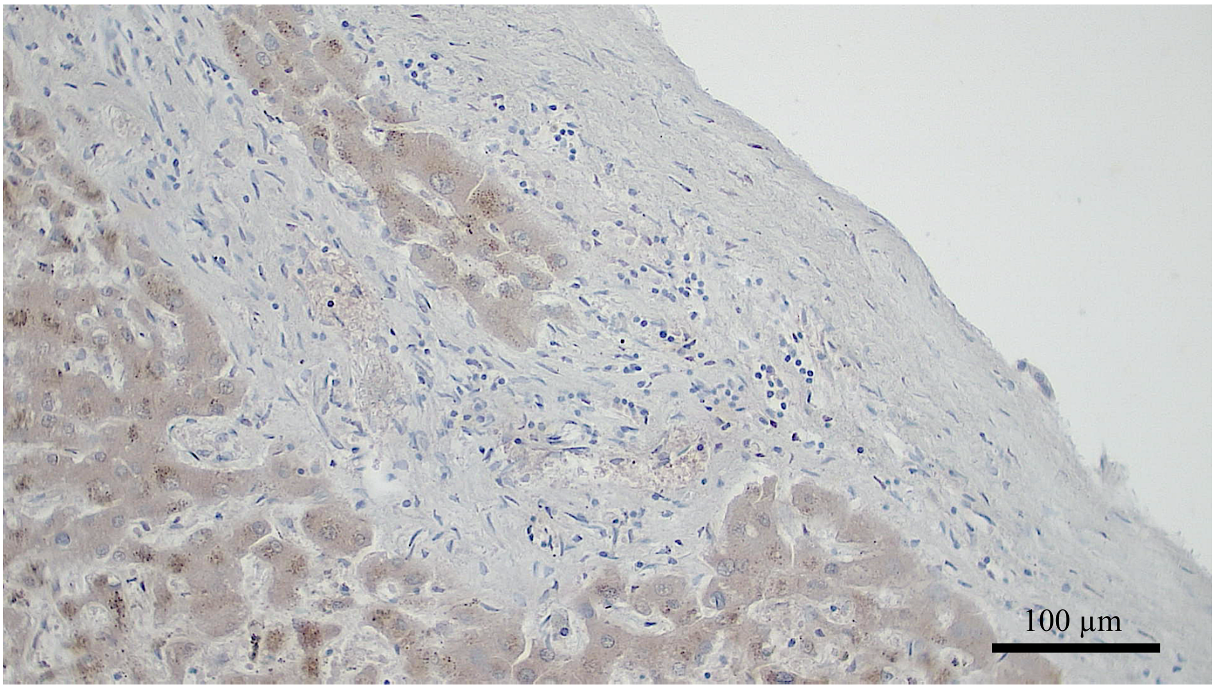


Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 12, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*, 1), Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 20fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Glisson-Kapsel**

4.4.2.2 Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins innerhalb der Leber eines Spenders und zwischen den Lebern verschiedener Spender

Kreuzschema: Ein Spender

Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte des Spenders 01 wurden miteinander verglichen.

Hepatozyten

Die vier Leberlappen zeigten untereinander keine Abweichung im Färbeverhalten der Hepatozyten und der Signalstärke des Gewebes. Exemplarisch sind in Abbildung 22 A-D vier Schnitte aus unterschiedlichen Leberlappen des gleichen Spenders zu sehen.

Auch innerhalb des gleichen Leberlappens konnten bei Proben aus verschiedenen Entnahmestellen keine Unterschiede in der Signalintensität festgestellt werden. Hierfür wurden zwei Schnitte aus dem rechten Leberlappen des Spenders 01 verglichen.

Insgesamt zeigte sich in den Hepatozyten aller Schnitte des Spenders 01 eine Positivität für das TRPC6-Protein und eine Signalintensität von 2 (= mäßig).

Bindegewebe

Das Bindegewebe (azelluläre Grundsubstanz) hatte in allen Schnitten (n = 7) des Spenders 01 die Färbeintensität 0 und ist demnach TRPC6-negativ. Die im Bindegewebe vorkommenden Zellen zeigten sich teilweise schwach positiv (Färbeintensität 1).

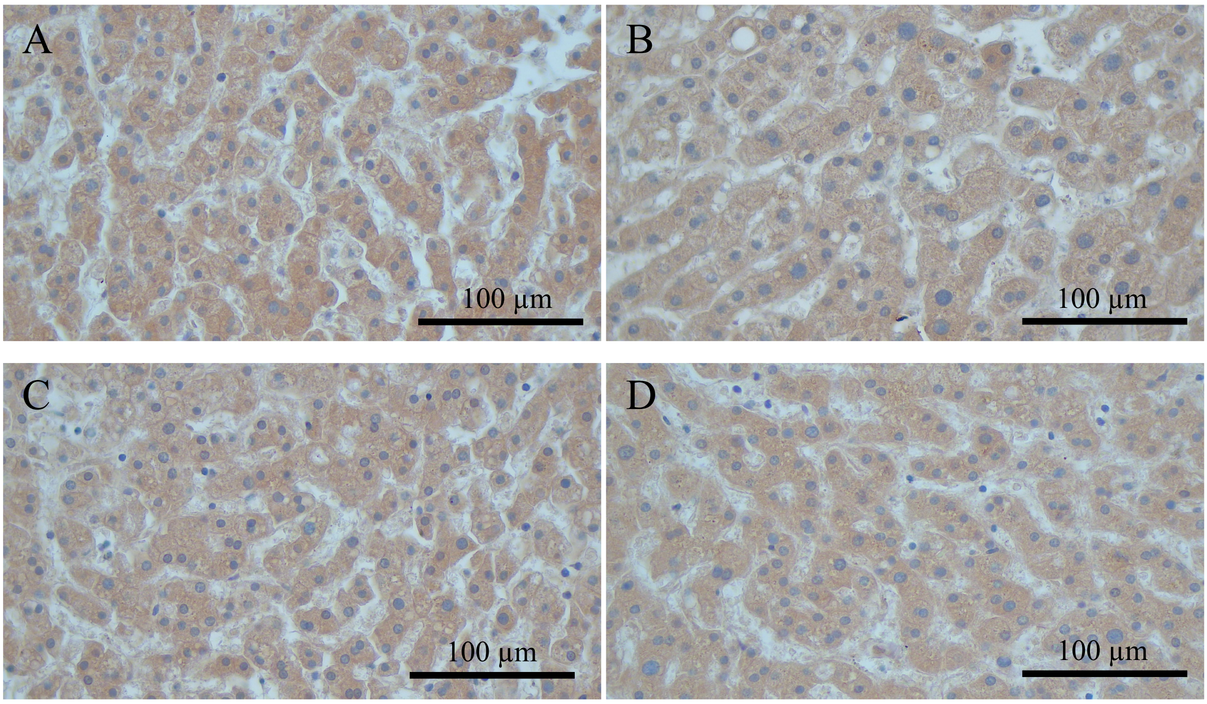


Abbildung 22, A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe des gleichen Spenders (01); vier verschiedene Entnahmestellen; Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 40fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins in Entnahmen des gleichen Spenders, Fokus Hepatozyten**

A: Spender 01, *Lobus quadratus* (1)
B: Spender 01, *Lobus caudatus*
C: Spender 01, *Lobus hepatis sinister* (*ventral*, 2)
D: Spender 01, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*, 1)

Kreuzschema: Eine Entnahmestelle

Um die Expression, Lokalisation und Signalintensität des TRPC6-Kanals in den Leberzellen auch zwischen verschiedenen Spendern zu vergleichen, wurde jeweils die gleiche Entnahmestelle herangezogen. Dabei handelte es sich um Entnahmen aus dem *Lobus caudatus*.

Da die Leberproben von vier Spendern höhergradige leberspezifische Pathologien zeigten (07, 08, 11, 02), wurden diese hierbei nicht mit einbezogen. Demnach entsprach die Anzahl der hier verglichenen Lebern sieben.

Insgesamt zeigten sich zwischen den Spendern Unterschiede in der Qualität der Gewebserhaltung. Außerdem waren unterschiedliche Ausprägungen von Lipofuszin-Einlagerungen in den Hepatozyten der Spender zu erkennen. Dieses Alterspigment imponiert im Schnitt als gelb-rötliche Körnung. Gut sichtbar in Abbildung 23 A-D, mit Pfeilen markiert.

Hepatozyten:

Die TRPC6-Immunhistochemie zeigte für die Leberepithelzellen der verschiedenen Spender ein ähnliches Färbeergebnis, sowohl was das Expressionsmuster als auch die Intensität der Färbung betraf. Die Färbungen unterschieden sich leicht in ihren Brauntönen (rot-braun, orange-braun) zwischen den verschiedenen Lebern, aufgrund interindividuellem gewebeeigenem Pigmentvorkommen.

Insgesamt konnte eine Positivität der leberspezifischen Zellen (Hepatozyten) für das TRPC6-Protein in 100 % der eingeschlossenen Schnitte festgestellt werden. Die Präparate waren dabei mäßig bis stark gefärbt.

Bindegewebe, Glisson-Trias:

Das Bindegewebe war in allen untersuchten Schnitten TRPC6-negativ. Lediglich der Schnitt „*Lobus caudatus* Spender 06“ zeigte eine diskrete Überfärbung der azellulären Substanz und war demnach schwach positiv. Sowohl die Leberarterien als auch die Venen zeigten in den Gewebeproben der verschiedenen Spender allesamt eine schwache Färbung (Färbeintensität 1) und waren somit TRPC6-positiv.

Die Cholangiozyten der Gallengänge waren ebenfalls TRPC6-positiv mit einer Färbeintensität von 2 bis 3 (mäßig bis stark) je nach Kalibergröße des Gangs und untersuchtem Spender.

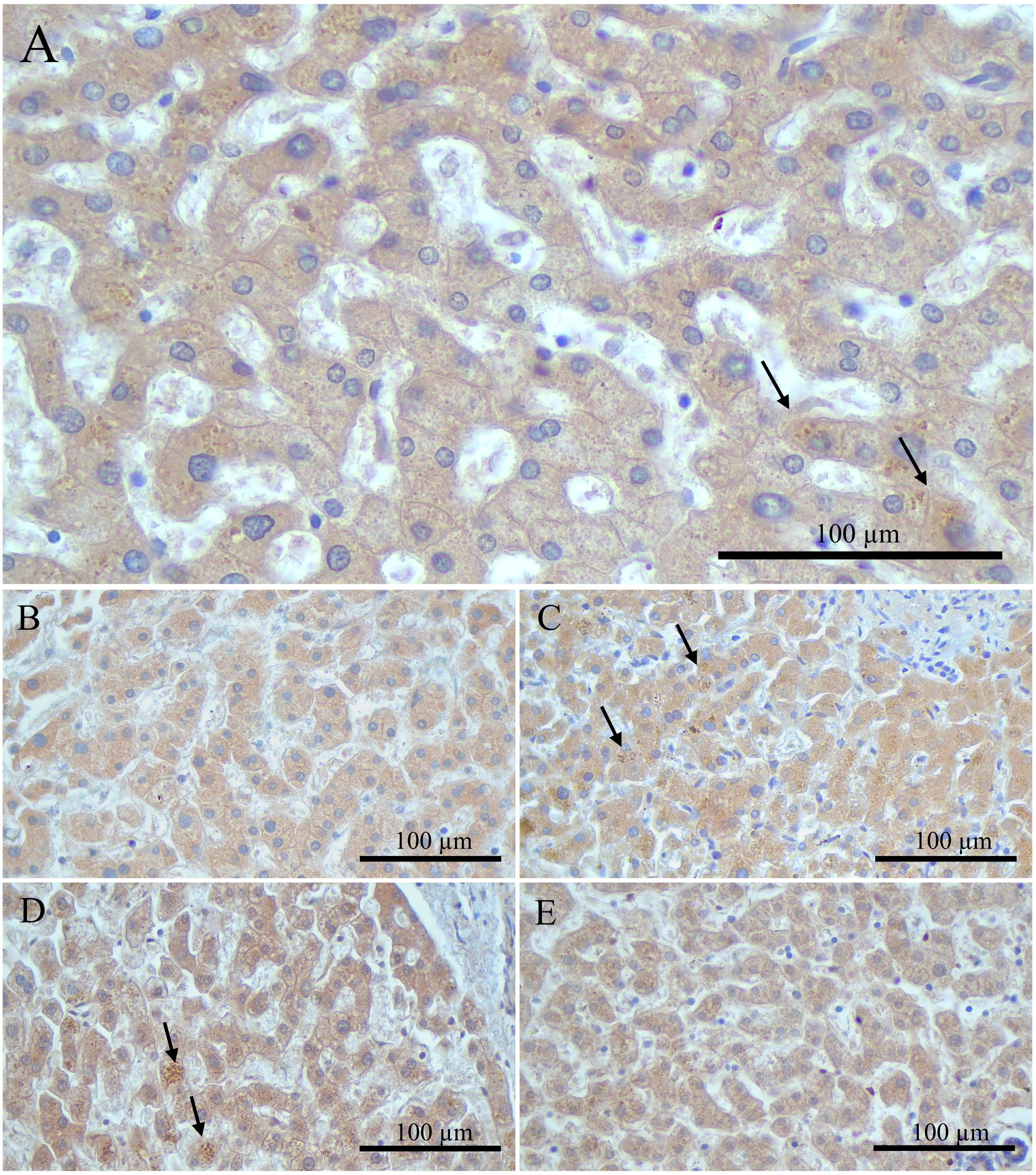


Abbildung 23, A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe verschiedener Körperspender, gleiche Entnahmestelle *Lobus caudatus*, Alterspigment mit Pfeilen markiert, Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 40fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins zwischen Entnahmen verschiedener Spender, Fokus Hepatozyten**

A: Spender 10 (1)
B: Spender 01
C: Spender 12 (2)
D: Spender 06
E: Spender 09

4.5 Leberpathologien

Im Folgenden werden Auffälligkeiten in den histologischen Schnitten der einzelnen Spender erläutert, pathologisch eingeordnet und die Auswirkungen auf die TRPC6-Expression geschildert.

4.5.1 Spender 10 – Akute Stauung

In den Präparaten des Spenders 10 ist eine deutliche Erweiterung der Lebersinusoide zu verzeichnen. Von der Zentralvene ausgehend ergibt sich das charakteristische Bild von sternförmig verlaufenden Stauungsstraßen (Abbildung 24). Dieser Befund spricht am ehesten für eine ausgedehnte akute Rückstauung des Blutes innerhalb der Leber. Die angegebene Todesursache „thrombembolisches Ereignis“ zusammengenommen mit der vorbestehenden Herzerkrankung des Spenders passt hierbei zu den vorgefundenen Befunden.

Bezogen auf die Beurteilung der TRPC6-Expression erleichtert dieser Befund die Identifizierung der Hepatozyten, da die einzelnen Leberzellbalken hier eindrücklich hervortreten. Es zeigte sich hierbei durch diese Pathologie keine veränderte Färbeintensität in der Immunhistochemie und damit in der Expression des TRPC6-Proteins (Abbildung 25 A).

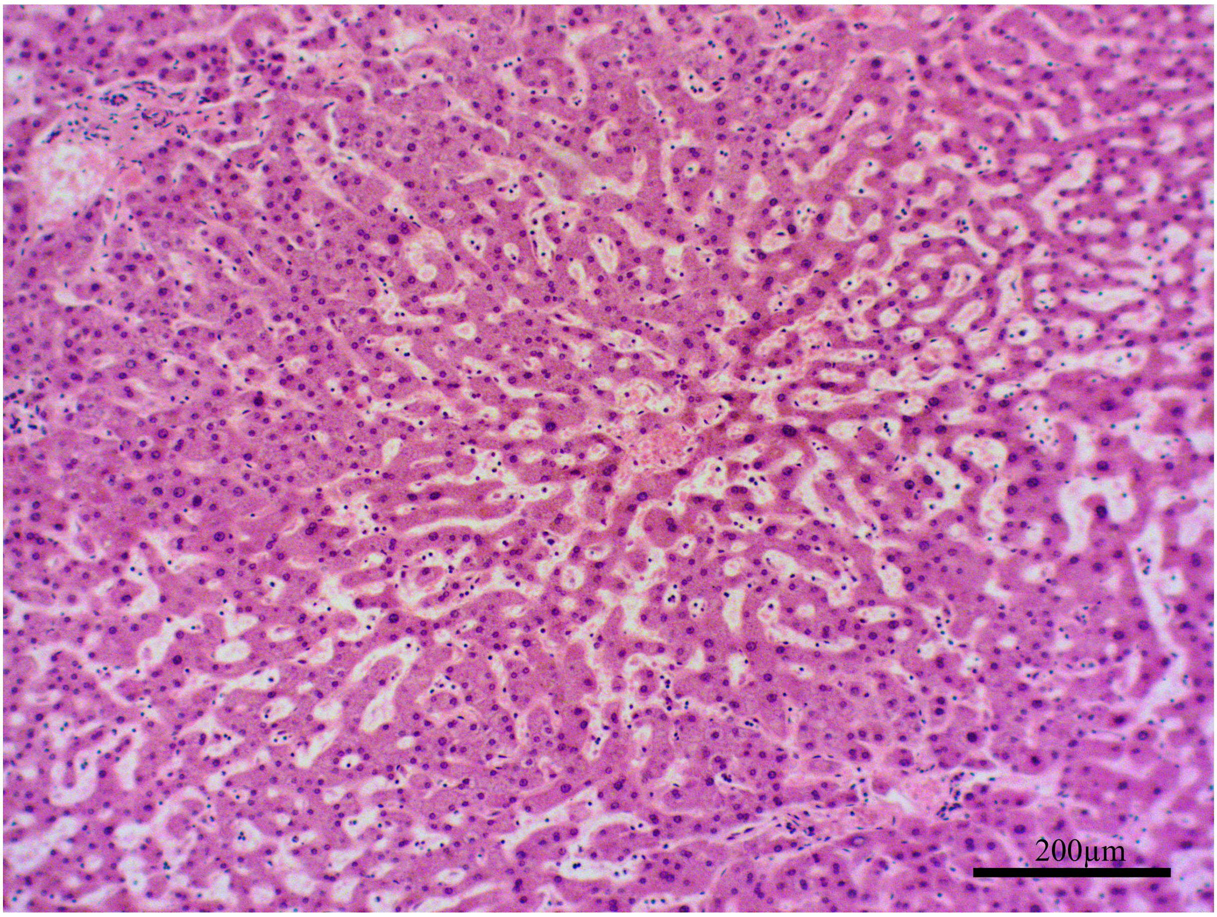


Abbildung 24: Lichtmikroskopische Aufnahme des Lebergewebes Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*, 1), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Akute Stauungsleber**

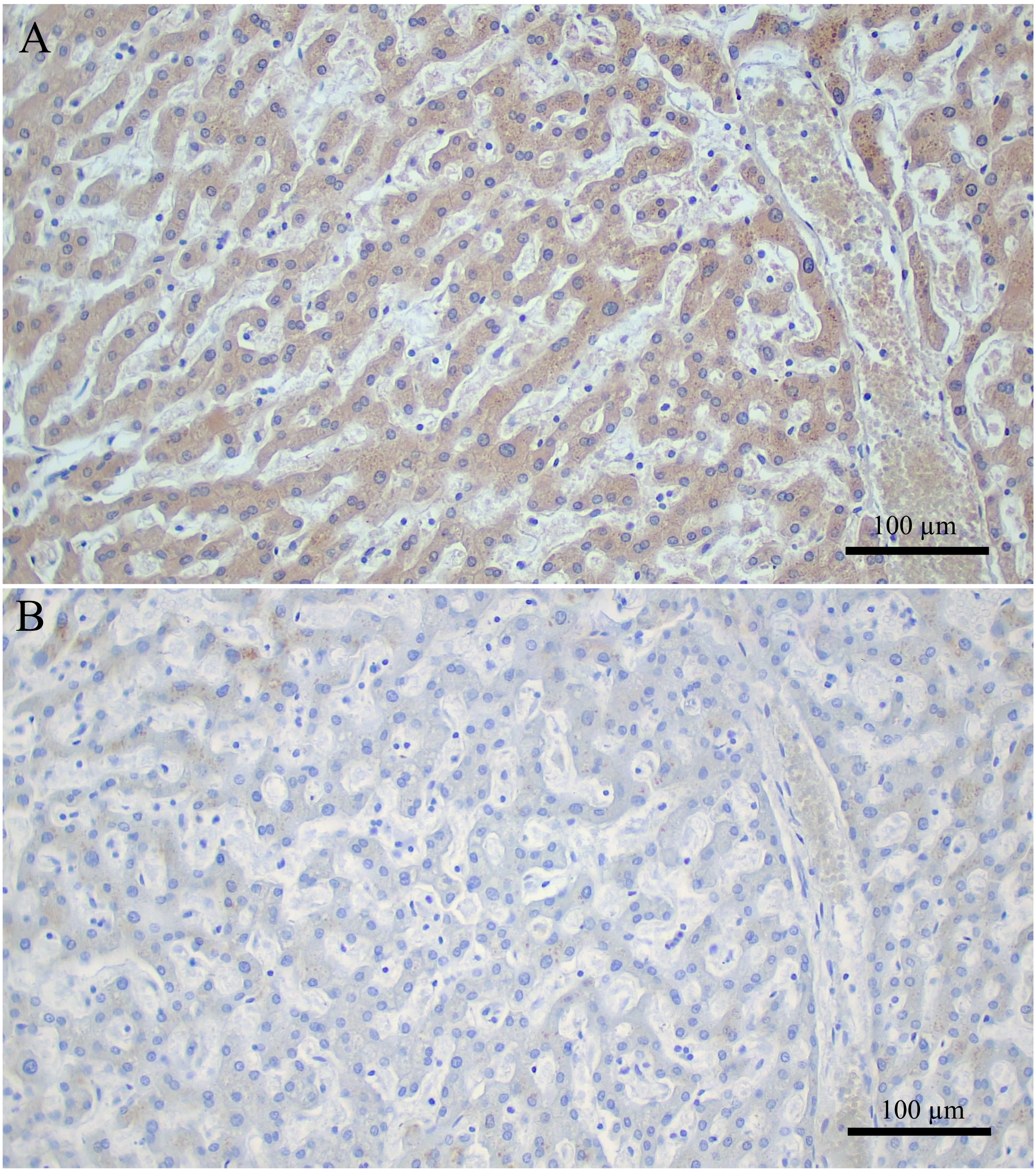


Abbildung 25, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*, 1), 20fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Nahaufnahme Stauungsstraßen**

A: Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit
B: Negativkontrolle

4.5.2 Spender 07 – Steatose

Die Leberproben des Spenders 07 zeigten eine ausgeprägte Leberverfettung. Mehr als 2/3 der Hepatozyten waren von Fetteinlagerungen betroffen. Dies entspricht demnach einem Grad 3 der Verfettung. Das periportale Bindegewebe zeigte einen gering erhöhten Anteil, was für eine beginnende Fibrose-Entwicklung im Rahmen der Pathologie spricht (Abbildung 26).

In der 60fachen Vergrößerung zeigte sich sowohl eine mikrovesikuläre Verfettung der Leberzellen als auch eine makrovesikuläre Verfettung mit Siegelringform der verfetteten Hepatozyten (Abbildung 27). Aufgrund der Verdrängung des Zytoplasmas durch die Fettvakuolen wird der Eindruck einer schwächeren Signalintensität in den betroffenen Zellen erweckt. Die Hepatozyten, die nicht von einer Fetteinlagerung betroffen sind, zeigten hingegen die typisch mäßige Braunfärbung der Zelle gegen das TRPC6-Protein und damit keine Veränderung der Expression durch die Steatose.

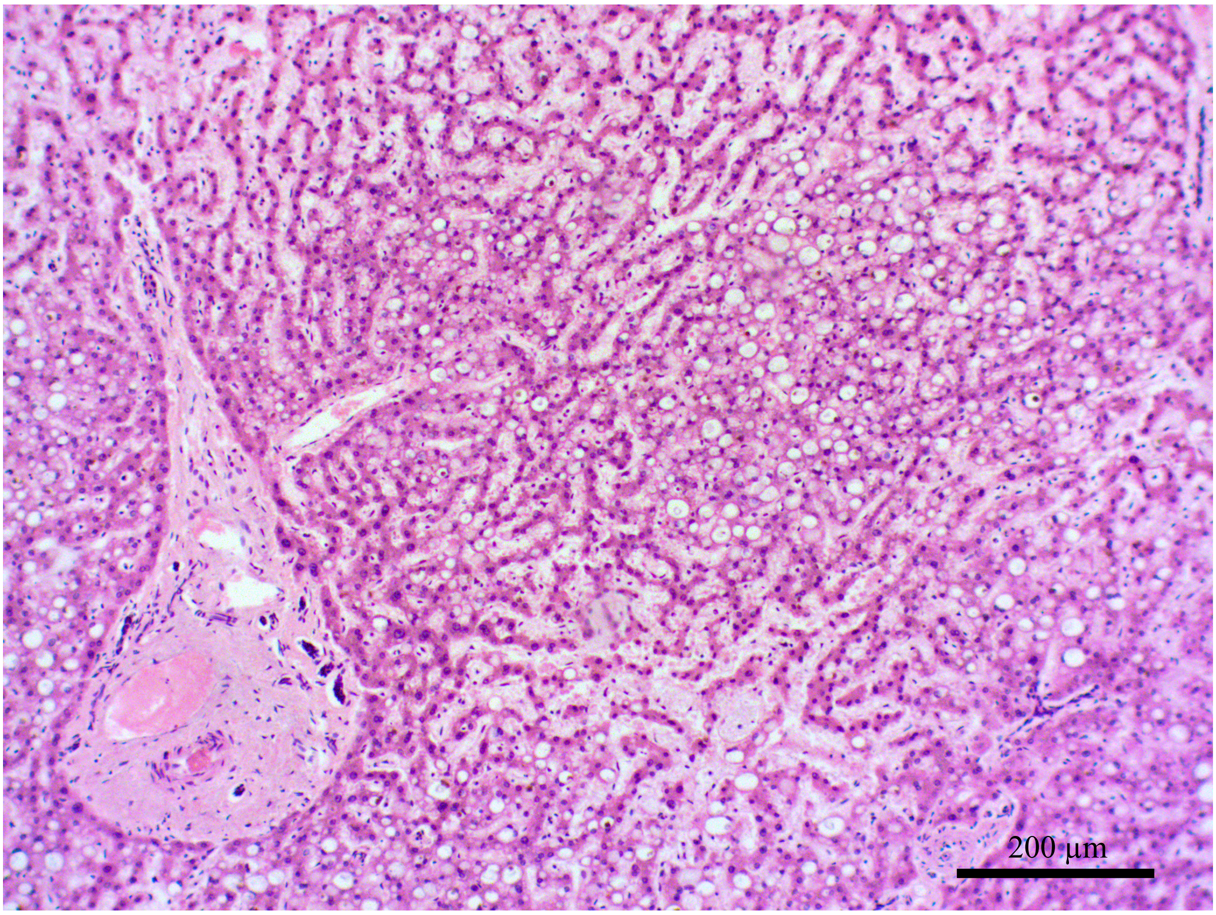


Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahme des Lebergewebes, Spender 07, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*, 1), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm**: HE-Färbung - Steatose**

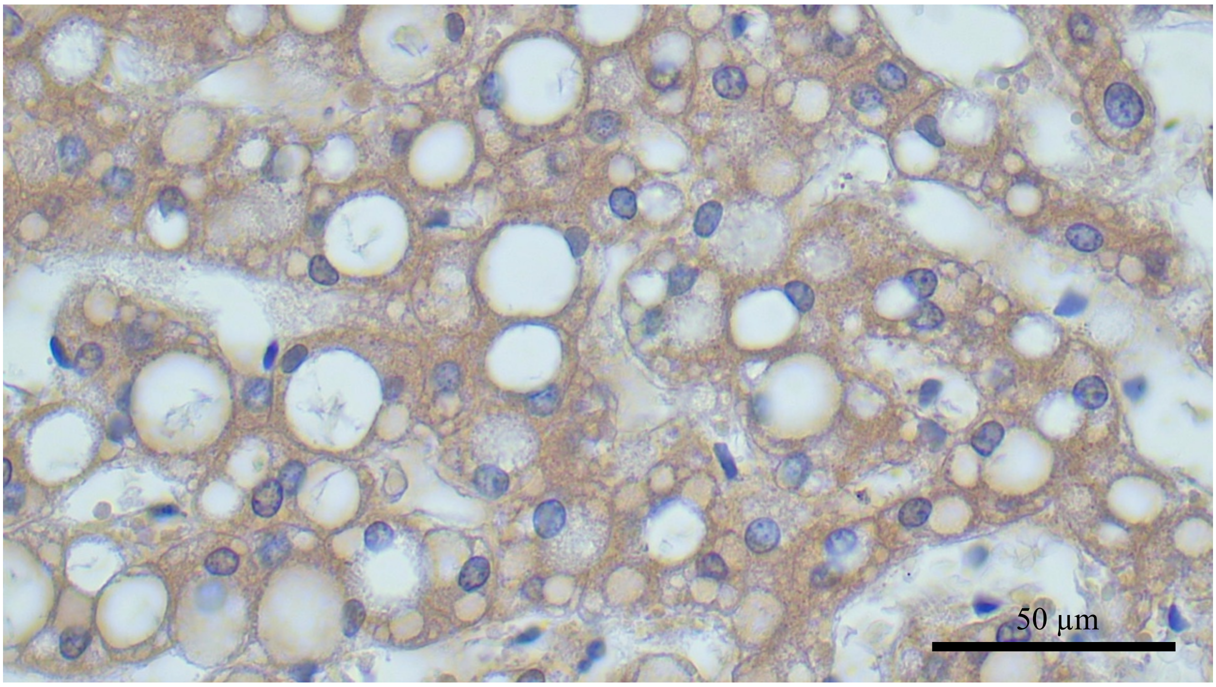


Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 07, Lobus hepatis dexter (ventral, 1), Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: **Nahaufnahme Steatose**

4.5.3 Spender 11 – Lebermetastasen

Schon makroskopisch fielen in der Leber des Spenders 11 bei der Entnahme der Proben multiple knotige Veränderungen auf, die die Oberfläche hervorwölbten. Dieser Befund imponiert auch sehr eindrücklich in den histologischen Schnitten. In diesen sind diffuse multiple Läsionen zu erkennen, welche ein infiltratives Wachstum in das Lebergewebe zeigen (Abbildung 28). Größere Läsionen zeigen zentral nekrotische Vorgänge. Die Tumorzellen erscheinen dicht gelagert sowie rund-oval.

Diese Befunde sprechen morphologisch am ehesten für ein malignes Geschehen in der Leber. Dies bestätigt sich durch die zu Lebzeiten gestellte Diagnose eines metastasierten Prostatakarzinoms. Die Lebermetastasen bedingten vor dem Ableben des Spenders ein Organversagen mit Coma hepaticum und stellten die Todesursache dar.

Das nicht tumorös veränderte Lebergewebe zeigte eine leichte bis mäßige Färbung der Hepatozyten gegen das TRPC6-Protein. Im Vergleich zu den gesunden Lebern anderer Spender zeigte sich keine Veränderung des Expressionsmusters des TRPC6-Proteins in diesen Zellen (Abbildung 29 A). Die Färbung erschien in ihrer Intensität im Vergleich zu anderen Spendern allerdings deutlich inhomogener. Auffällig ist, dass die Neoplasie keine Braunfärbung im immunhistochemischen Schnitt zeigte (Abbildung 29 B) und sich damit identisch zur Negativkontrolle darstellte. Somit findet man in den Tumorzellen keinen Anhaltspunkt für die Expression des TRPC6-Kanals (Abbildung 30 A+B).

Die Leberzellen um die Metastasen erscheinen langgestreckt. Die klassische Anordnung der Hepatozyten in der Baueinheit des Leberläppchens ist aufgehoben.

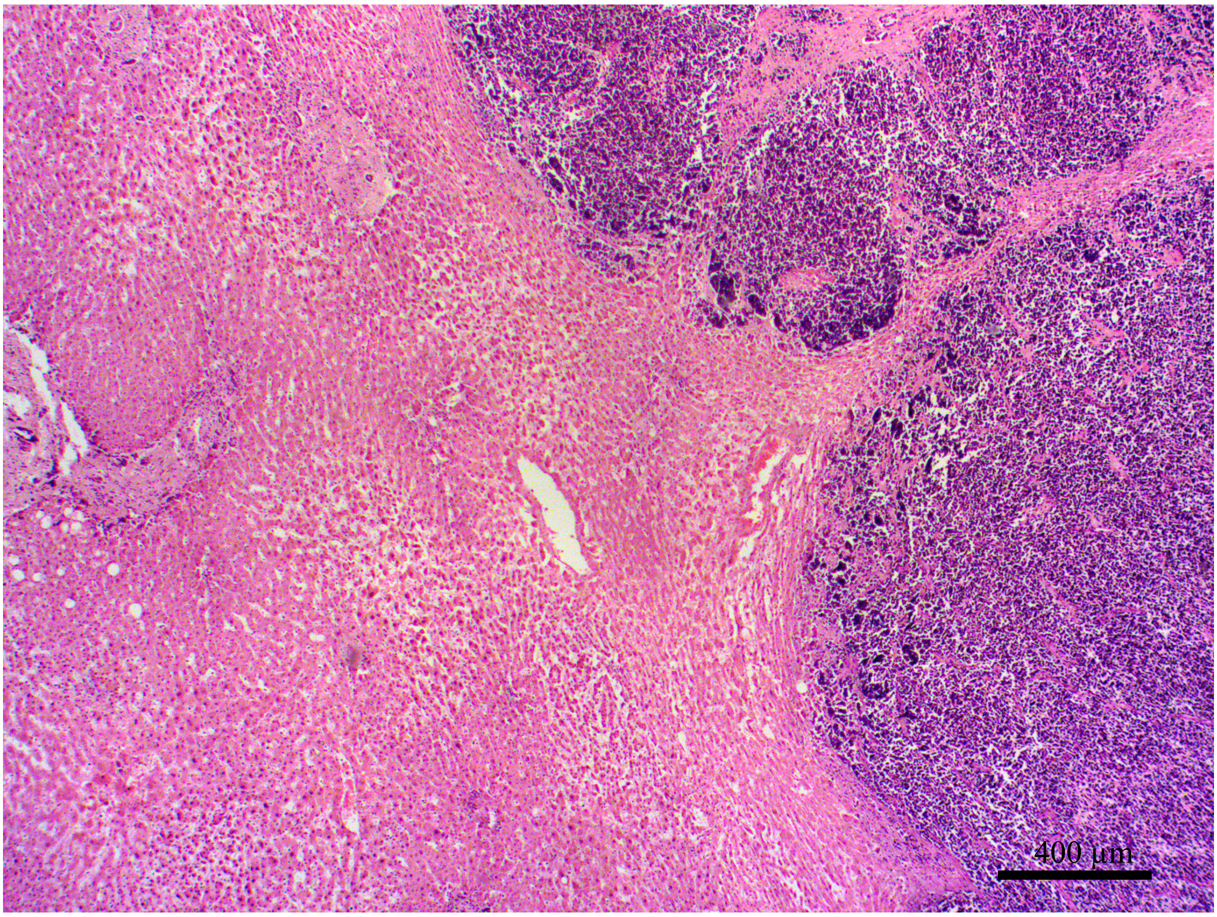


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 11, *Lobus quadratus* (2), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm**: HE-Färbung - Lebermetastase**

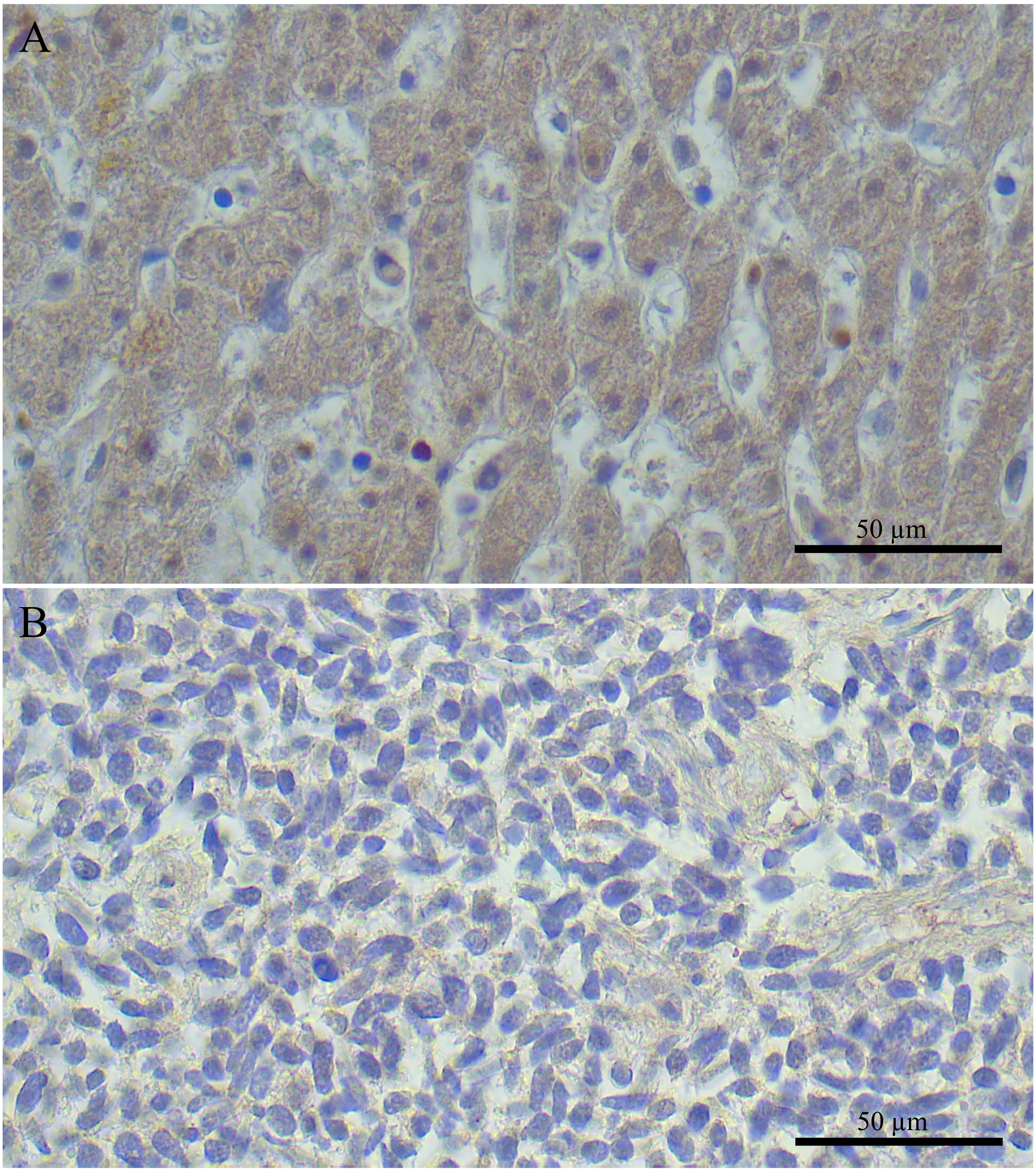


Abbildung 29, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 11, *Lobus quadratus* (2) Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: **Nahaufnahmen Metastasen-Leber**

A: Nahaufnahme der Hepatozyten
B: Nahaufnahme der Tumorzellen

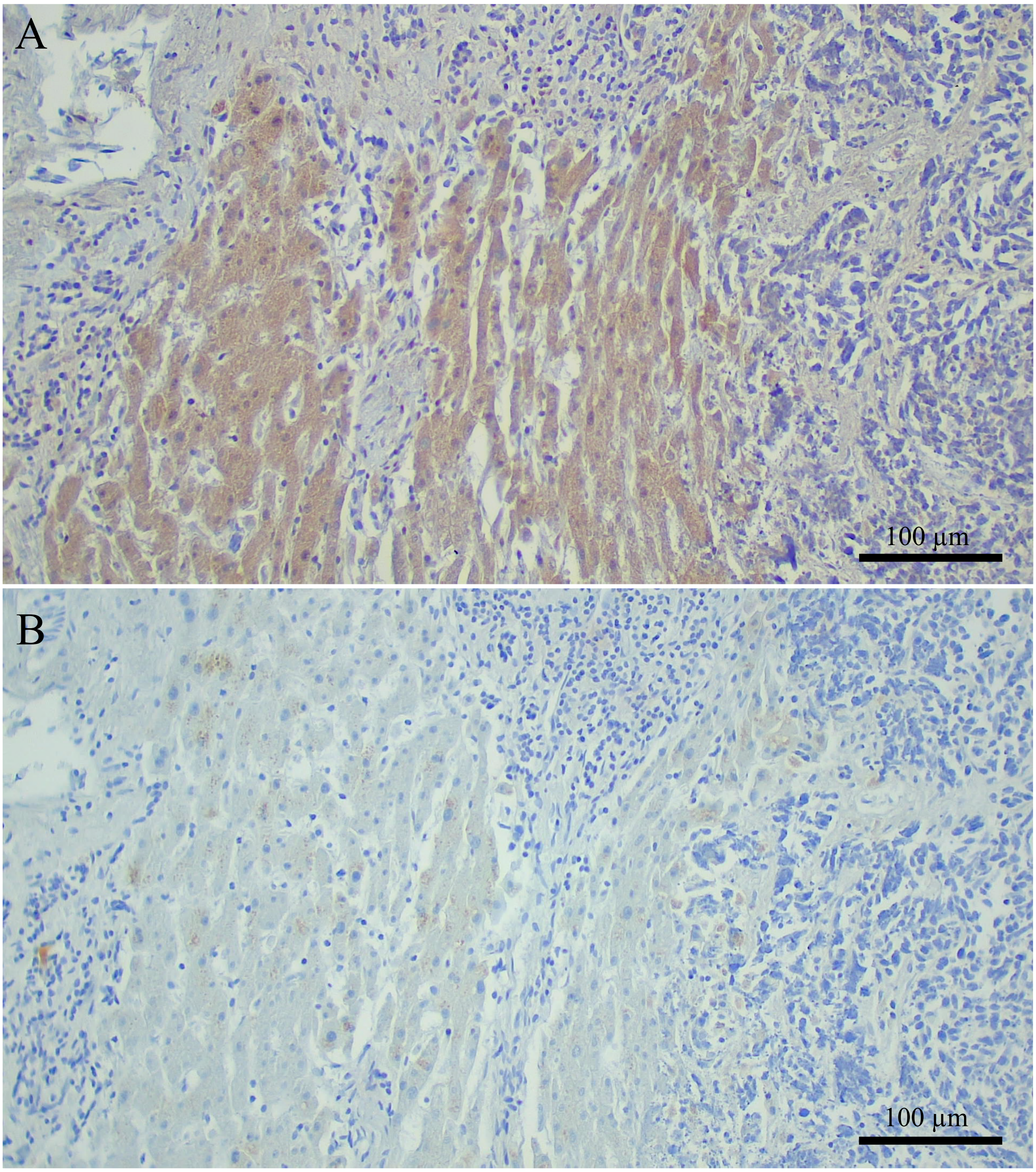


Abbildung 30, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 11, *Lobus quadratus* (2), 20fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Tumorleber – Negativkontrolle**

A: Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit
B: Negativkontrolle

4.5.4 Spender 02 – Leberzirrhose bei chronischer Hepatitis

Die Schnitte des Spenders 02 zeigten einen ausgedehnten fibrotischen Umbau der Leber. Die zwischen den dicken Bändern aus fibrotischem Gewebe liegenden Hepatozyten unterlagen einem regenerativen knotigen Umbau.

In den Bindegewebsstraßen sind vereinzelt Zellinfiltrate zu erkennen (Abbildung 31, Pfeile). Im Periportalfeld fallen Gallengangsproliferate auf (Abbildung 31, Pfeilköpfe). Diese zeigen aufgrund der regelmäßigen Epithelstruktur keinen Anhalt für Malignität. Gegen einen Von-Meyer-Komplex (Harmatom der Leber) spricht die atypische Lage sowie die Morphologie der Proliferate.

Deshalb lässt der morphologische Befund am ehesten auf eine manifeste Leberzirrhose bei akut auf chronischer Hepatitis schließen.

Die TRPC6-Expression in den Hepatozyten schien reaktiv vermehrt zu sein. Mehrfach Färbungen des gleichen Präparates zeigten konstant eine starke Braunfärbung. Die Signalintensität lag damit etwas über dem Durchschnitt der Färbeintensitäten der anderen gefärbten Leberschnitte (Abbildung 32).

Die Nahaufnahme zeigt eine starke Färbung der Hepatozytenbälkchen. Auffällig ist hier die homogene/kräftige Färbung des gesamten Zytoplasmas der Zelle (Abbildung 33).

In der 10fachen Vergrößerung sind die noch erhaltenen Leberzellen eindeutig durch ihre starke Färbung von den deutlich verbreiterten Bindegewebsstraßen zu trennen (Abbildung 34).

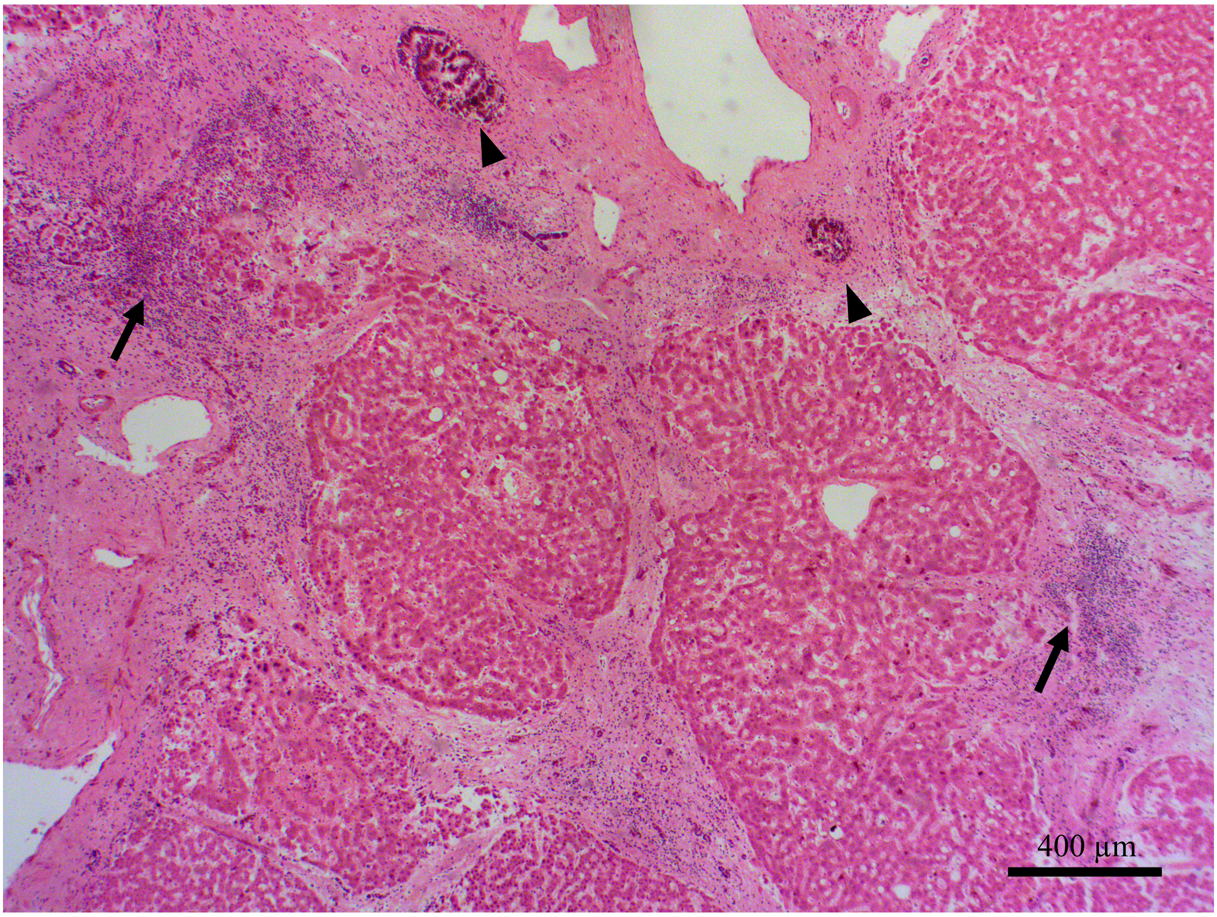


Abbildung 31: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 02, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Pfeilköpfe = Gallengangsproliferate, Pfeile = Entzündungszell-Infiltrate, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **HE-Färbung - Leberzirrhose**

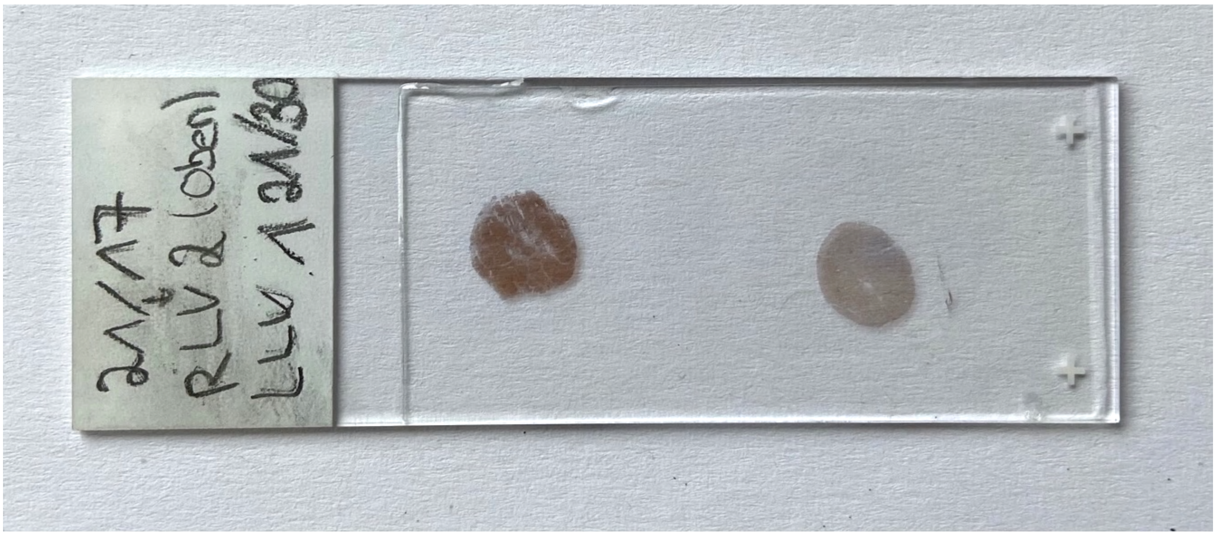


Abbildung 32: **Vergleich der Färbeintensität** zwischen dem Spender 02 (links) mit erhöhter TRPC6-Expression bei zirrhotischer Leber und dem Spender 04 (rechts) mit moderater Färbeintensität (dem Durchschnitt entsprechend) bei identischen Antikörperkonzentrationen und Einwirkzeiten in der Immunhistochemie, Primärantikörperverdünnung 1:100, DAB-Einwirkzeit 4 min

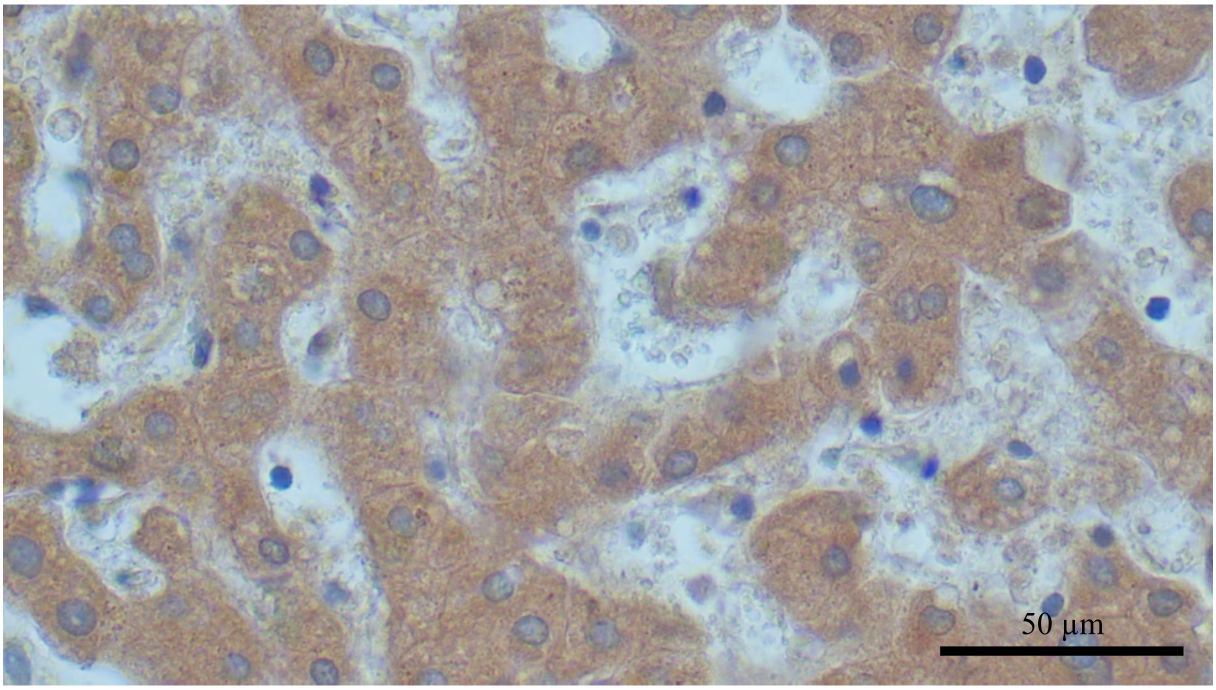


Abbildung 33: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 02, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), Primärantikörperverdünnung 1: 100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: **Nahaufnahme der Hepatozyten in zirrhotischer Leber**

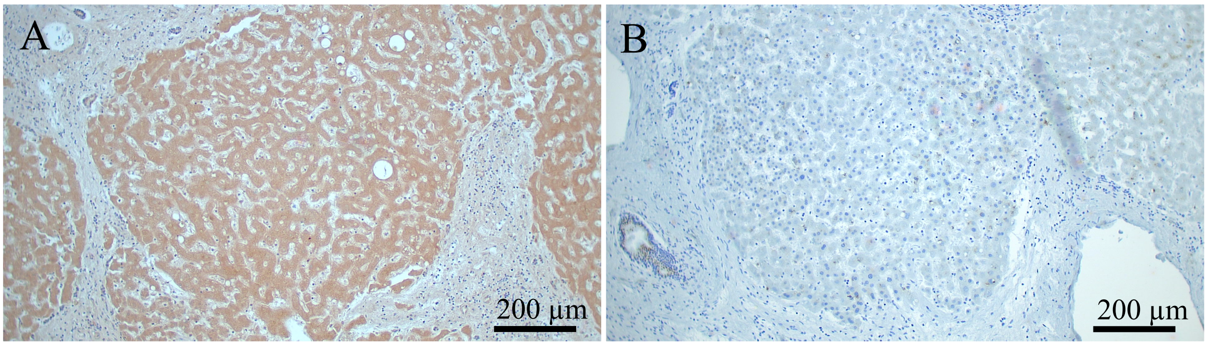


Abbildung 34, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 02, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Leberzirrhose – Negativkontrolle**

A: Primärantikörperverdünnung, 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit
B: Negativkontrolle

4.5.5 Spender 08 – aktive Hepatitis

Die histologischen Leberschnitte des Spenders 08 zeigen eine ausgedehnte aktive Hepatitis. In den Portalfeldern ist ein ausgeprägtes lymphoplasmazelluläres Infiltrat erkennbar (Abbildung 35). Am Übergang zum Lebergewebe zeigen sich teilweise periportale Nekrosen. Diese durchbrechen die periportale Grenzlammelle und ziehen Septen mononukleärer Zellinfiltration hinter sich her. Diese Piecemeal-Nekrosen treten häufig bei einer Infektion mit Hepatitis-Viren bei Immunschwäche auf. Der Spender 08 war an einer chronischen lymphatischen Leukämie erkrankt. Die Diagnose passt somit anamnestisch zu diesem Befund.

Die TRPC6-Expression in den Hepatozyten weist in diesen Proben eine leichte Expressionsverstärkung bzw. -verdichtung auf (besonders in geringeren Vergrößerungen wie der 10fachen in Abbildung 37 A zu erkennen). Die Hepatozyten erscheinen durch die verstärkte Färbung verplumpt, das Zytoplasma ist homogener gefärbt. Die Zellgrenzen sind schwerer zu identifizieren (Abbildung 36). Das lymphoplasmazelluläre Infiltrat der Portalfelder zeigte hingegen keinerlei Braunfärbung und entspricht damit der Negativkontrolle (Abbildung 37 A+B).

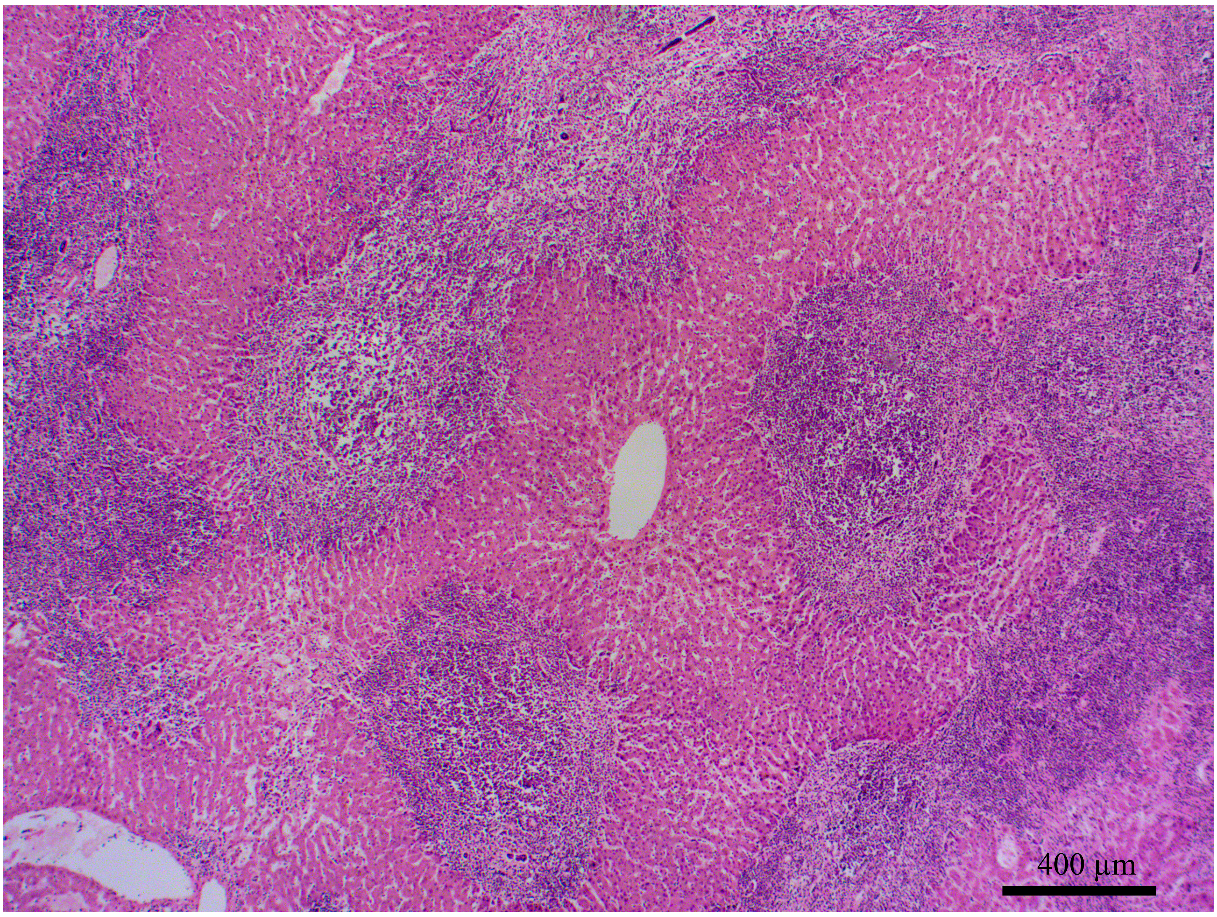


Abbildung 35: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 08, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **HE-Färbung – aktive Hepatitis**

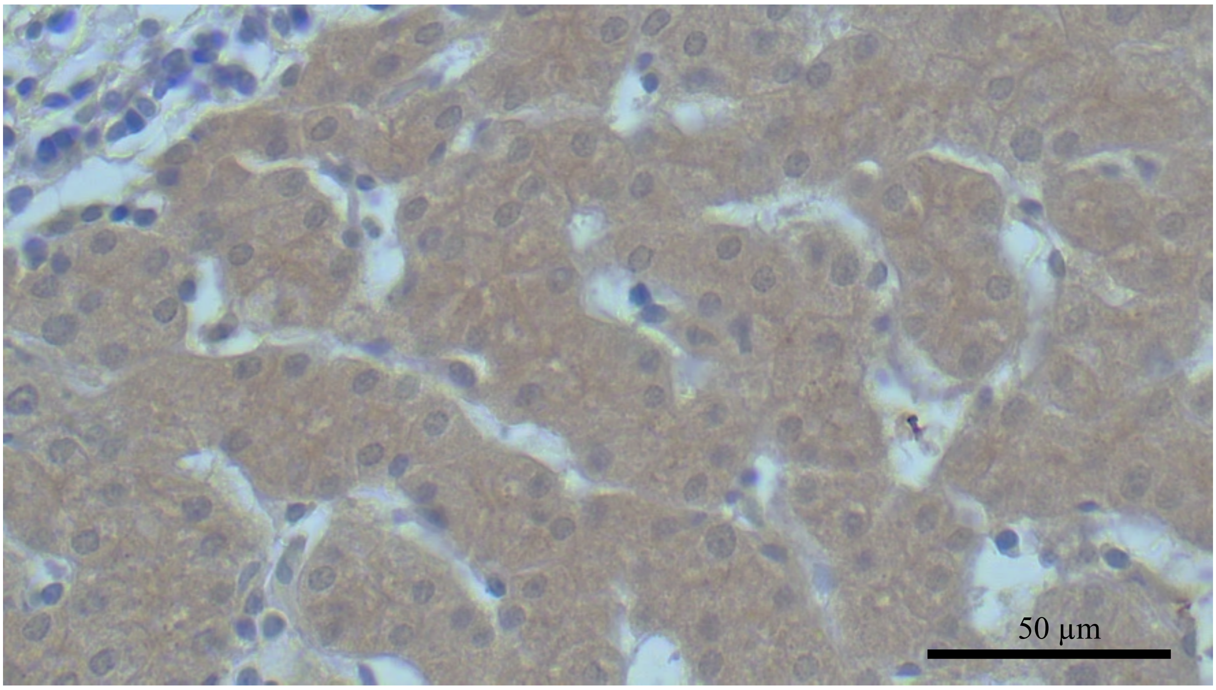


Abbildung 36: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 08, *Lobus caudatus* (2), Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: **Nahaufnahme Hepatozyten bei aktiver Hepatitis**

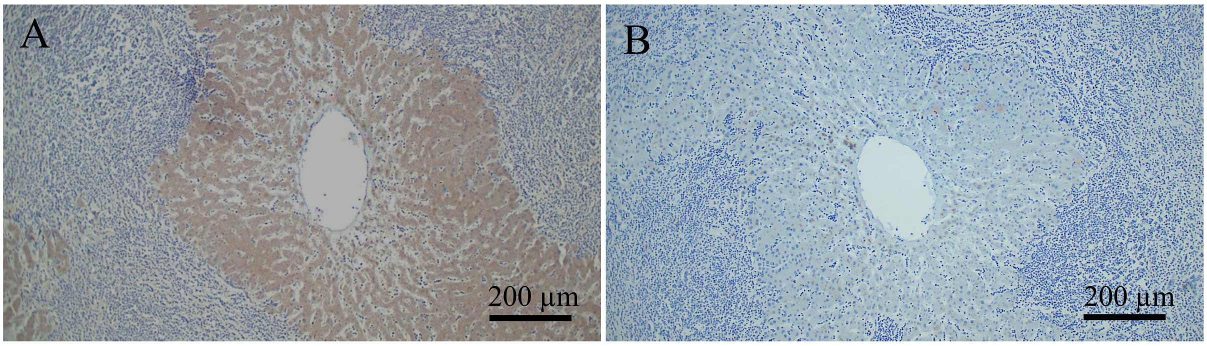


Abbildung 37, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 08, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Aktive Hepatitis - Nahaufnahme**

A: Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit
B: Negativkontrolle

4.6 Auswertung der Gallenblasenschnitte

Bei Spender 12 wurde bereits zu Lebzeiten die Gallenblase chirurgisch entfernt. Dieser Spender wurde folglich für die Expressionsstudie am Gallenblasengewebe ausgeschlossen. Es ergibt sich hiermit eine Spenderanzahl von 11.

Von diesen elf Spendern wurden 19 Entnahmen aus verschiedenen Lokalisationen nach vorheriger Sichtung im Hämatoxylin-Eosin-Schnitt (Abbildung 38) immunhistochemisch gegen das TRPC6-Protein gefärbt.

Eine Übersicht über Spender und Entnahmeort der 19 Gallengewebs-Proben, die auf die Expression des TRPC6-Proteins untersucht wurden, zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12 : Immunhistochemisch gefärbte Proben - Gallenblasenschnitte

Entnahmeort	**Spender 01**	**Spender 02**	**Spender 03**	**Spender 04**	**Spender 05**	**Spender 06**
Gallenblase Collum	X	X	X	X		X
Gallenblase Corpus	X	X	X	X	X	X
Gallenblase Fundus						

Entnahmeort	**Spender 07**	**Spender 08**	**Spender 09**	**Spender 10**	**Spender 11**	**Spender 12**
Gallenblase Collum			X	X		/*
Gallenblase Corpus	X	X		X	X	/*
Gallenblase Fundus	X				X	/*

/*Cholezystektomie zu Lebzeiten

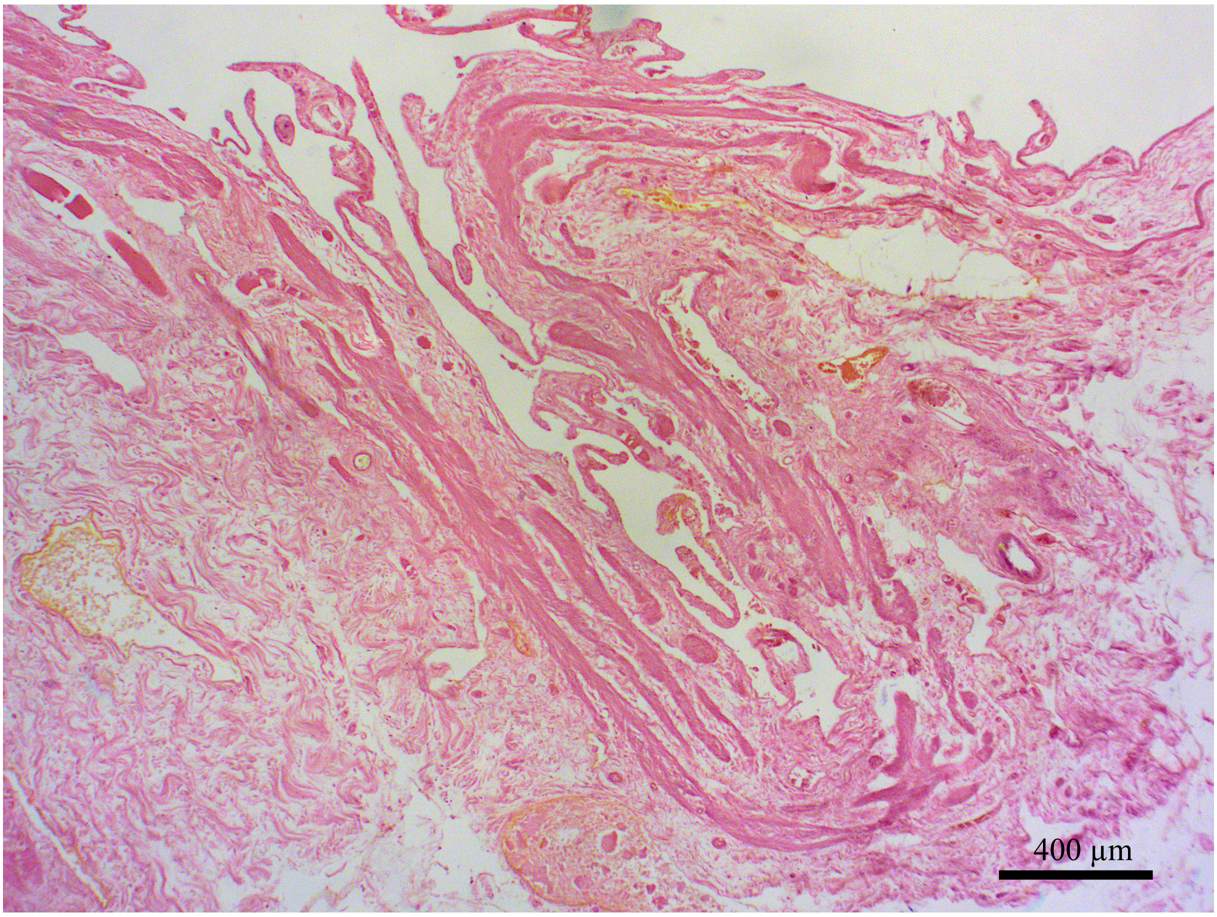


Abbildung 38: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 10, *Fundus vesicae biliaris,* Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **Übersichtsfärbung - Gallenblasengewebe**

4.6.1 Variation der Konzentrationen

Vor dem Start der immunhistochemischen Färbungen wurden verschiedenen Primärantikörperkonzentrationen am Gallenblasengewebe getestet.

Eingesetzt wurden die Konzentrationen 1:100, 1:500 sowie 1:1000 (Abbildung 39). Die Einwirkzeit des Chromogens DAB betrug jeweils sieben Minuten.

Hierbei ergaben sich folgende Ergebnisse:

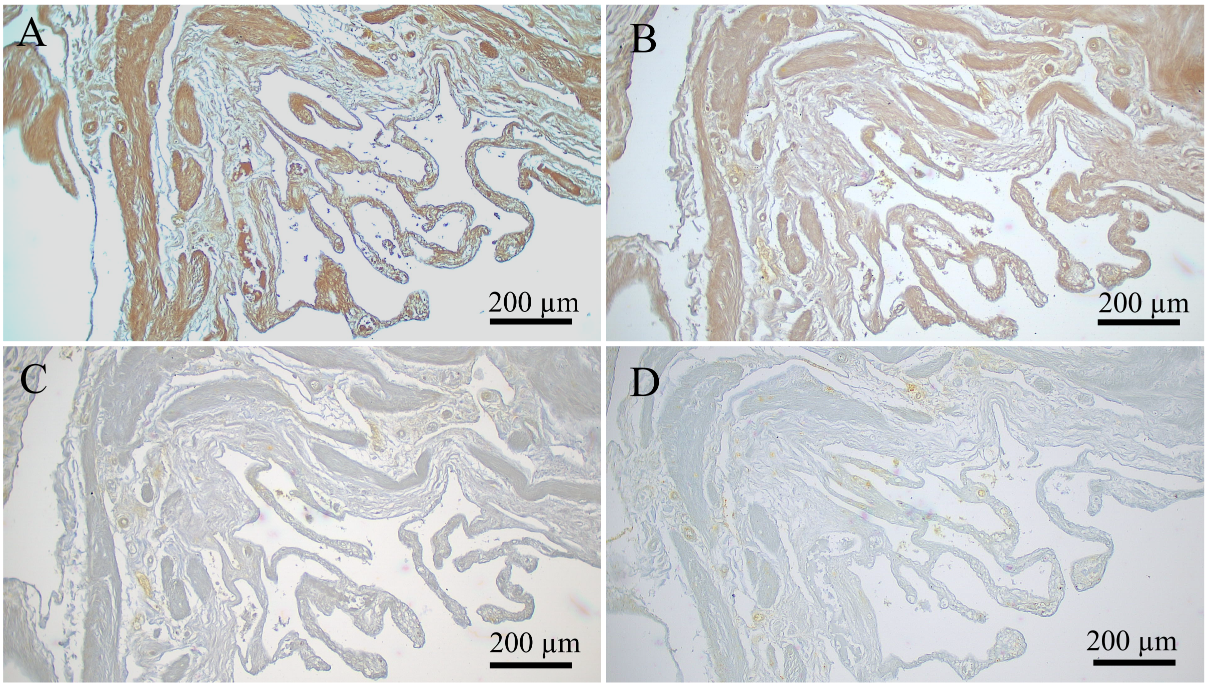


Abbildung 39; A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengewebe, Spender 10, *Fundus vesicae biliaris,* 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Variation der Primärantikörperverdünnung - Gallenblasengewebe**

A: Primärantikörperverdünnung 1:100; DAB-Einwirkzeit 7 min
B. Primärantikörperverdünnung 1:500; DAB-Einwirkzeit 7 min
C: Primärantikörperverdünnung 1:1000; DAB-Einwirkzeit 7 min
D: Negativkontrolle

Der beste Kontrast ergab sich demnach für die höchste getestete Konzentration. Für alle weiteren Schnitte des Gallenblasengewebes wurde deshalb eine 1:100 Verdünnung verwendet.

4.6.2 TRPC6-Expressionsmuster innerhalb der Gallenblase

Exemplarisch wird im Folgenden die Expression des TRPC6-Kanals im Gallenblasengewebe an einem Schnitt der Spender 07, 04 sowie 06 beurteilt. Hierbei werden die drei Wandschichten *Tunica mucosa* (Abbildung 40, a), *Tunica muscularis* (Abbildung 40, b) sowie *Tunica serosa/adventitia* (Abbildung 40, c) im Einzelnen betrachtet, wobei die *Tunica mucosa* nochmals in das Oberflächenepithel sowie die *Lamina propria* unterteilt werden kann.

Es wird von der innersten (lumenseitig) zur äußersten Wandschichtung vorgegangen. Einen Überblick über das Färbeverhaltens der einzelnen Wandschichten innerhalb eines Präparates bietet die Abbildung 40.

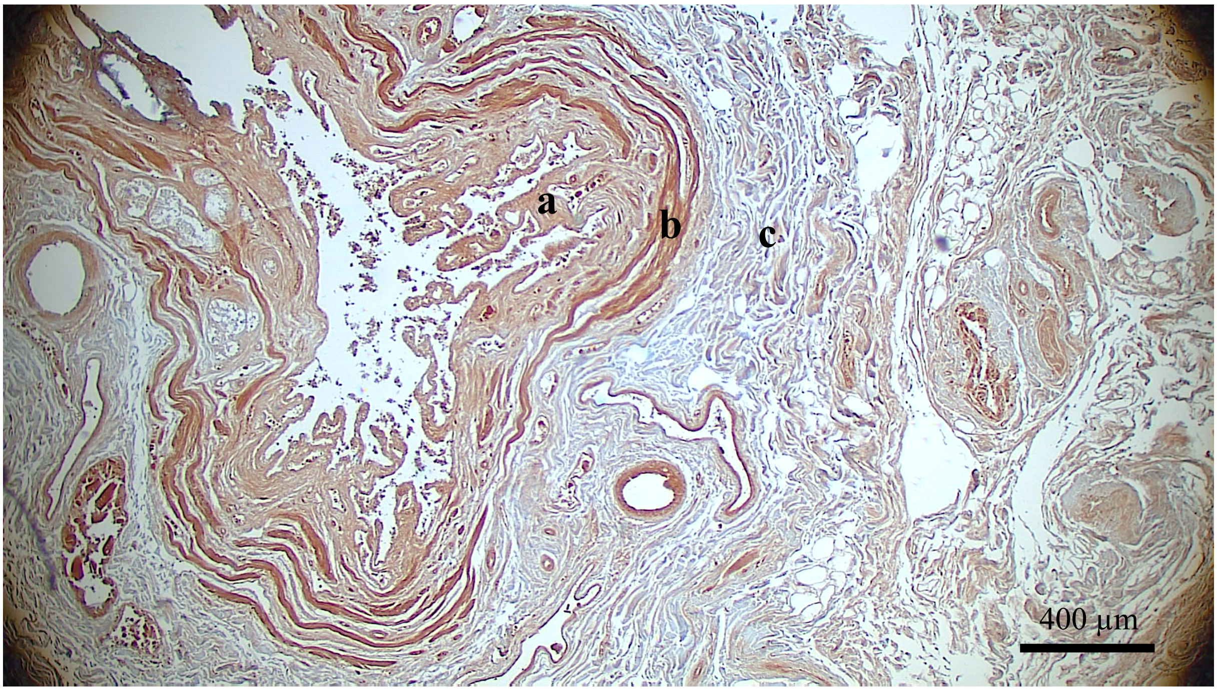


Abbildung 40: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 01, *Collum vesicae biliaris,* a = Tunica mucosa, b = Tunica muscularis, c = Tunica serosa/adventitia, TRPC6-Primärantikörperverdünnung 1:100, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm**: Übersichtsdarstellung des TRPC6-Expressionsmusters in den Wandschichten der Gallenblase**

4.6.2.1 Morphologische Zuordnung der Proteinexpression zu den Strukturen

Tunica mucosa

Cholangiozyten:

In vielen Schnitten hatten sich die Cholangiozyten der *Tunica mucosa* durch den Verarbeitungsprozess von der Basalmembran gelöst.

Die noch erhaltenen Zellen zeigten Unterschiede in deren Zellmorphologie.

Neben der klassischen einschichtig hochprismatischen Epithelform lagen die Cholangiozyten teilweise in einer Siegelringform vor. Das hochprismatische Epithel der *Tunica mucosa* zeigte eine starke braune Färbung. Die siegelringförmigen Cholangiozyten wiesen hingegen eine schwächere Färbung auf.

Das subzelluläre TRPC6-Expressionsmuster in den hochprismatischen Cholangiozyten kann wie folgt beschrieben werden:

Der Zellkern ist im unteren bis mittleren Drittel der Zelle gelegen. Um den Zellkern herum zeigt sich eine starke Expression des TRPC6-Kanals. Die Zellgrenzen weisen eine mäßige TRPC6-Expression auf. Das Zytoplasma erscheint je nach Zelle schwach bis kaum gefärbt. In Abbildung 41 A zeigt sich deutlich, wie die perinukleäre TRPC6-Expression dem Zellkern in seiner Lage folgt.

Auch in den tiefer gelegenen Rokitansyky-Aschoff-Krypten (Abbildung 41 B) zeigt sich das gleiche subzelluläre Expressionsmuster. In Abbildung 41 B ebenfalls gut zu sehen, ist die Variation der Färbeintensität der einzelnen Cholangiozyten in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander.

Lamina propria

Das Bindegewebe der *Lamina propria* der Gallenblase kann sowohl in die azelluläre Grundsubstanz (Kollagenfibrillen, elastische Fasern) als auch die dort eingelagerten Zellen gegliedert werden.

Diese Zellen zeigten eine schwache bis mäßige Färbung in der Immunhistochemie. Die azelluläre Substanz war in der Umgebung der Zellen ebenfalls gefärbt, wenn auch schwächer.

Insgesamt erschien die *Lamina propria* der Gallenblase damit schwach TRPC6-positiv.

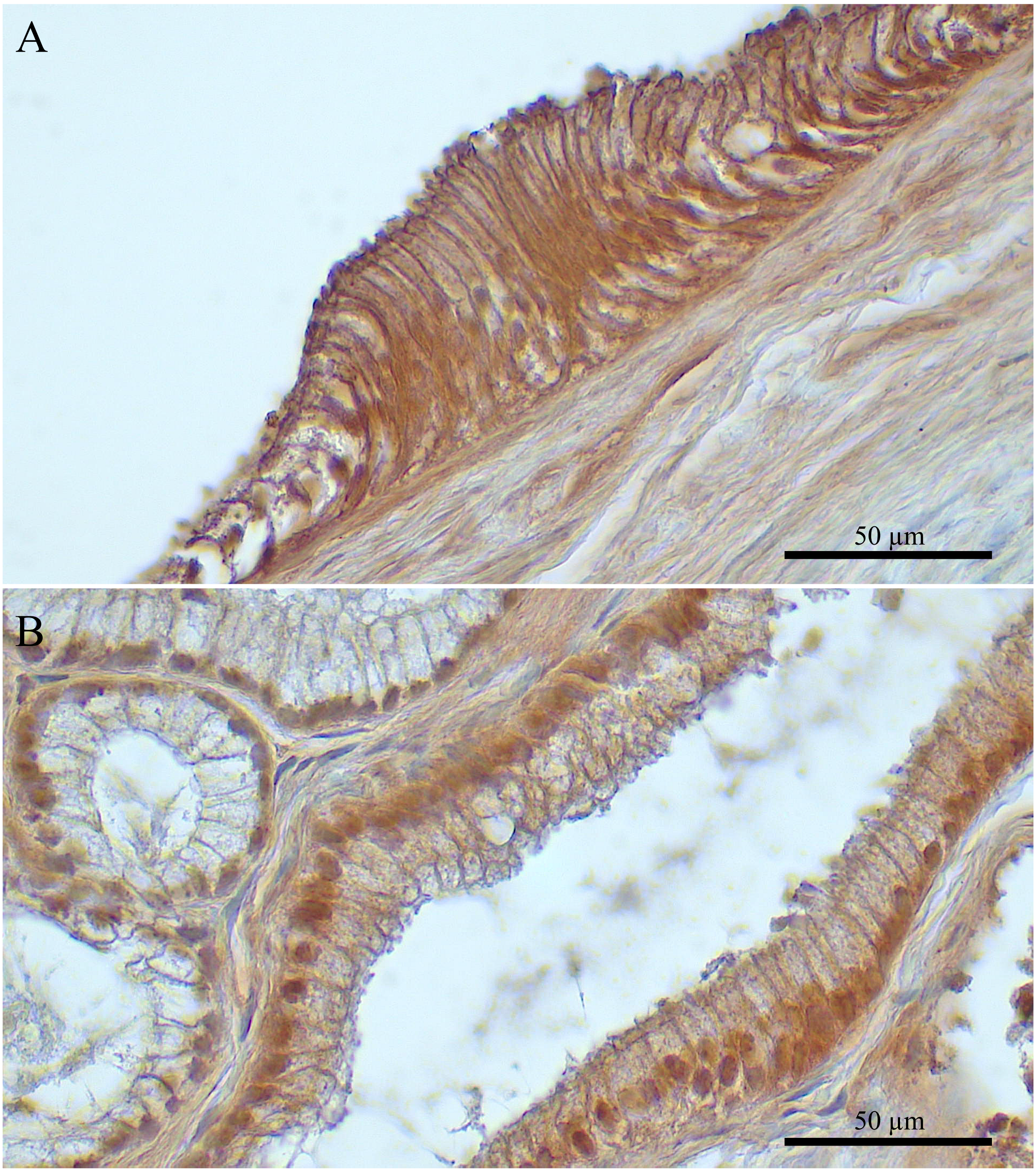


Abbildung 41; A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengewebe, Spender 07, Primärantikörperverdünnung 1:100, 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: **Nahaufnahme Cholangiozyten (hochprismatisch) - Gallenblasengewebe**

A: *Fundus vesicae biliaris*
B: *Corpus vesicae biliaris*

Tunica muscularis

Die Myozyten der Tunica muscularis zeigten eine stärkere Expression des TRPC6-Kanals als das umliegende Bindegewebe der Gallenblase. Die sowohl längs (Abbildung 42 B) als auch quer (Abbildung 42 A) angeschnittene glatte Muskulatur hob sich deutlich vom umliegenden Gewebe ab.

Die Myozyten zeigten eine homogene Färbung des Zytoplasmas (zytoplasmatisches Expressionsmuster). Der Zellkern, der charakteristisch für die glatte Muskulatur im Querschnitt zentral gelegene ist, erschien durch die Gegenfärbung blau.

Es zeigte sich in der glatten Muskulatur der Gallenblase eine Positivität für TRPC6 in allen 19 Gewebeschnitten.

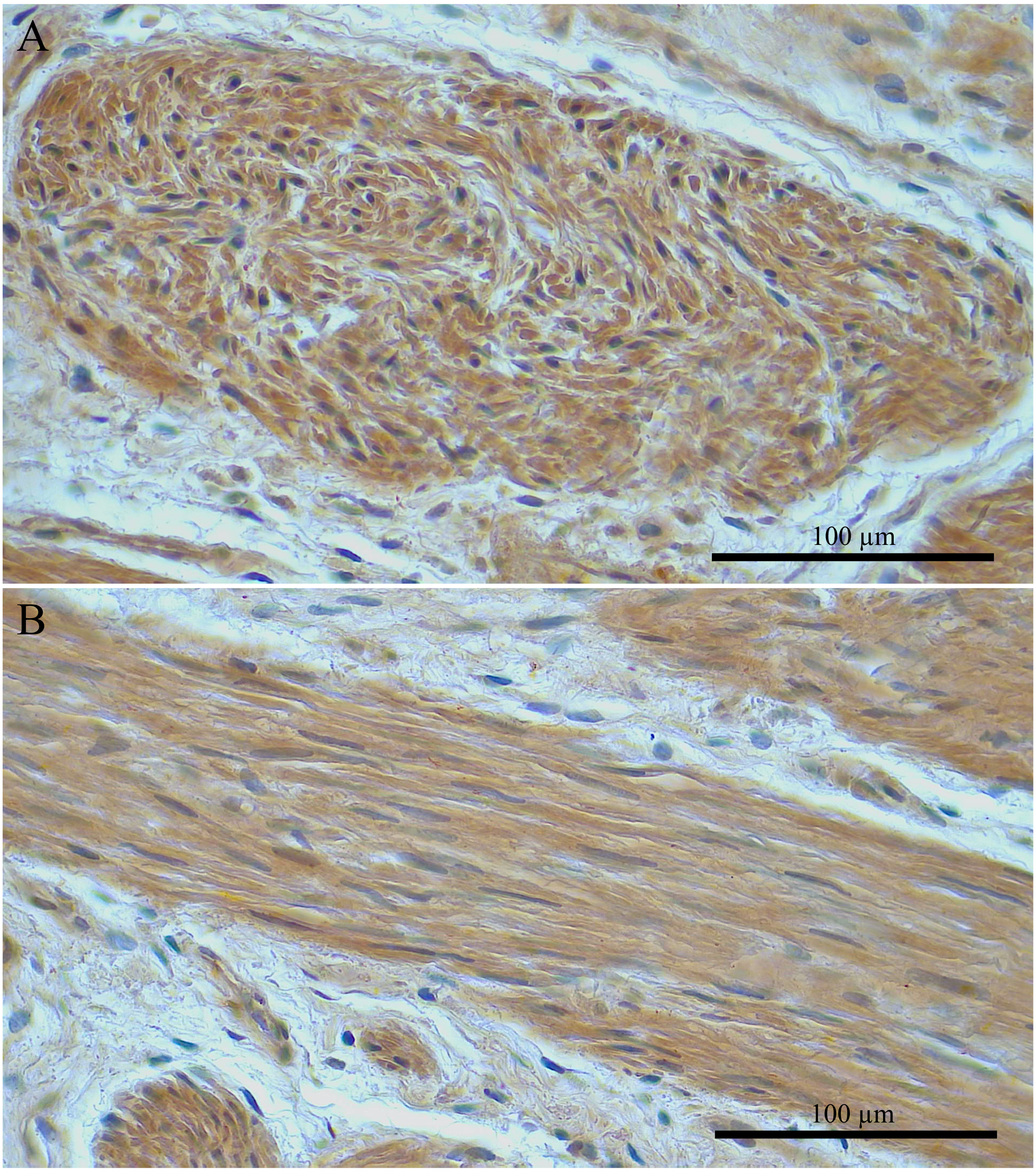


Abbildung 42, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 04, *Corpus vesicae biliaris*, Primärantikörperverdünnung 1:100, 40fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: **Nahaufnahme der glatten Muskulatur der Gallenblase**

A: Glatte Muskulatur im Querschnitt
B: Glatte Muskulatur im Längsschnitt

Tunica serosa/adventitia

In dieser mächtigen bindegewebigen Verschiebeschicht finden sich vor allem die versorgenden Gefäße sowie zahlreiche Fettzellen.

Diese Schicht schließt sich an die *Tunica muscularis* der Gallenblase an und zeigte folgendes Färbeverhalten:

Die zellulären Anteile zeigten eine leichte bis mäßige TRPC6-Expression. Insgesamt war der Anteil der zellulären Bestandteile im Vergleich zur *Tunica mucosa* allerdings geringer. Die Bindegewebsfasern sind lockerer angeordnet. Die Interzellularsubstanz war im Umkreis der Zellen leicht gefärbt, während in anderen Bereichen die Bindegewebsfasern TRPC6-negativ erschienen. Damit erschien die *Tunica serosa/adventita* je nach Probe und untersuchtem Abschnitt negativ bis schwach positiv für das TRPC6-Protein. Dies zeigt die Abbildung 43 A.

Für die dort verlaufenden Gefäße kann eine Positivität für das TRPC6-Protein beschrieben werden:

Das Endothel der Arterien und das angeschlossene Bindegewebe der *Tunica interna* sind schwach positiv gefärbt. In der *Tunica media* wird der TRPC6-Kanal hingegen verstärkt exprimiert. Die *Tunica media* besteht überwiegend aus dicht gelagerten glatten Muskelbündeln. Die darauffolgende dritte Schicht, die *Tunica externa*, besteht aus Bindegewebe und ist im immunhistochemischen Schnitt kaum angefärbt (Abbildung 43 C).

Das Endothel sowie die glatten Muskelfasern der Venen sind stark positiv für das TRPC6-Protein (Abbildung 43 B). Das umliegende Bindegewebe ist schwach braun gefärbt.

Demnach kann die Stärke der Färbung und damit die TRPC6-Expression in den Wandschichten der Gallenblase in aufsteigender Reihenfolge wie folgt sortiert werden:

Tunica serosa/adventitia < Lamina propria < Tunica muscularis < Epithel (Cholangiozyten)

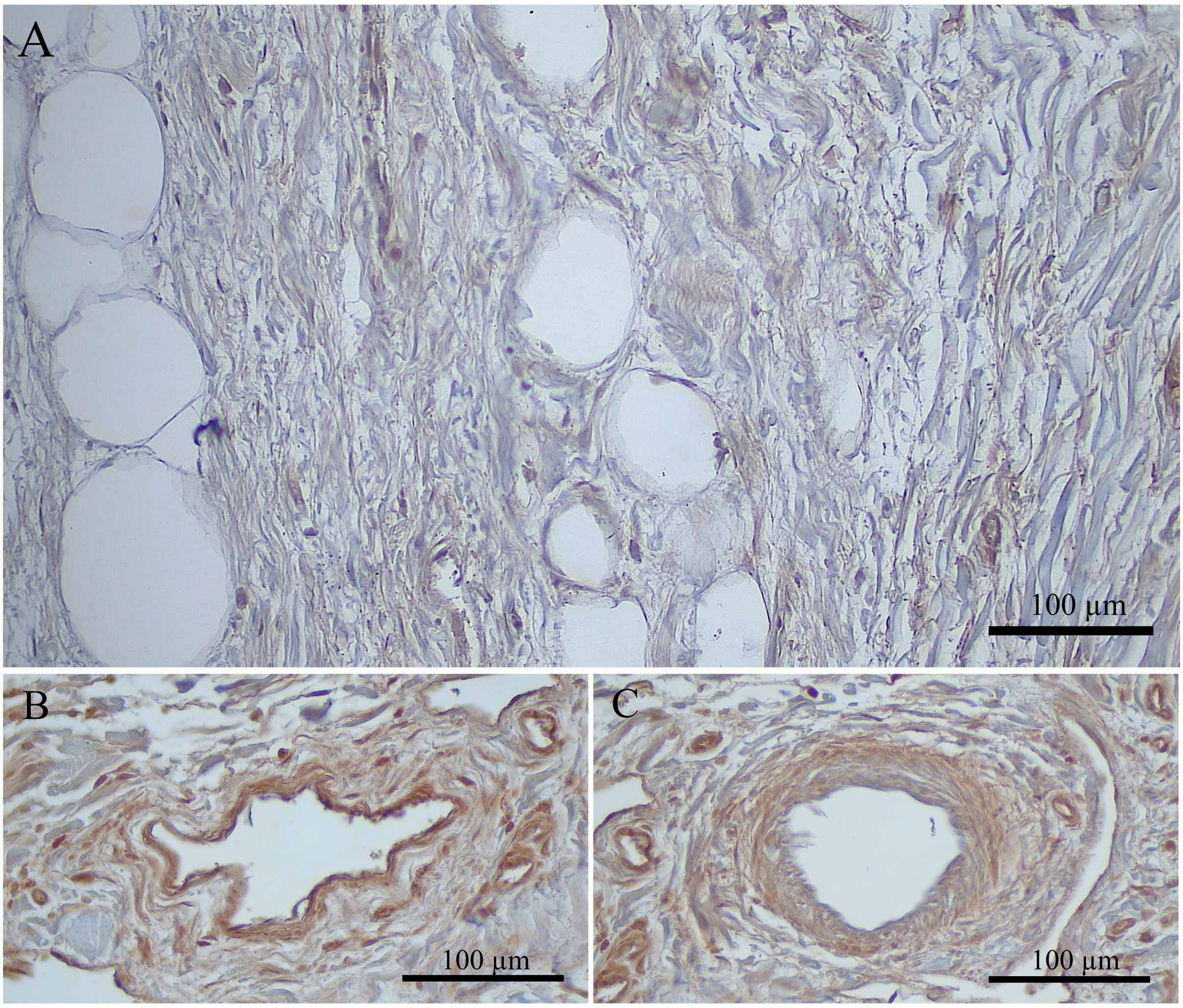


Abbildung 43, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 06, *Collum vesicae biliaris*, Primärantikörperverdünnung 1:100: **Ausschnitte aus der Tunica serosa/adventitia**

A: 20fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm, Bindegewebe mit eingelagerten Fettzellen
B: 40fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm, Vene
C: 40fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm, Arterie

4.6.2.2 Vergleich der Expression von TRPC6 innerhalb der Gallenblase eines Spenders und zwischen den Gallenblasen verschiedener Spender

Kreuzschema: Ein Spender

Bei Proben aus unterschiedlichen Entnahmestellen desselben Spenders zeigte sich, dass sowohl die Höhe der Krypten als auch die Expression des TRPC6-Kanals innerhalb einer Gallenblase in etwa gleich sind. Dies traf sowohl auf den Vergleich zwischen dem Galleblasenhals und Gallenblasenkörper (Abbildung 44), als auch auf den Vergleich zwischen dem Gallenblasenboden und Gallenblasenkörper (Abbildung 45) zu.

Vergleich Gallenblasenhals und Gallenblasenkörper:

Die Proben aus dem Gallenblasenkörper zeigten verglichen mit den Schnitten des Halsbereiches der Gallenblase des Spenders 06 eine 100 %ige Übereinstimmung sowohl in der Färbeintensität der Wandschichtungen als auch in der Gewebsmorphologie.

Die Cholangiozyten waren in beiden Schnitten in weiten Teilen von der Basalmembran gelöst. Eine Siegelringmorphologie zeigte sich nicht. Insgesamt waren die noch erhaltenen Cholangiozyten in beiden Schnitten stark positiv für den TRPC6-Kanal (Kategorie 3).

Die Tunica muscularis war in beiden Bereichen mäßig bis stark gefärbt (Stufe zwischen Kategorie 2 und 3), während die bindegewebigen Anteile der *Lamina propria* sowie der *Tunica serosa/adventitia* eine leichte Färbung zeigten. Insgesamt waren beiden Gallenblasenanteile diskret überfärbt (Abbildung 44).

Vergleich Gallenblasenboden und Gallenblasenkörper:

In den Schnitten des Spenders 10 waren die Cholangiozyten nur noch an einzelnen Stellen der Basalmembran anhaftend und teilweise degeneriert. Eine Siegelringmorphologie zeigte sich an wenigen, vereinzelten Stellen.

Das Epithel (hochprismatisch) und die *Tunica muscularis* waren sowohl im Bereich des *Fundus* als auch im *Corpus* mäßig gefärbt (Kategorie 2), das Bindegewebe zeigte eine schwache Färbung (Kategorie 1).

Insgesamt konnten keine Unterschiede der TRPC6-Expression über das Organ hinweg festgestellt werden.

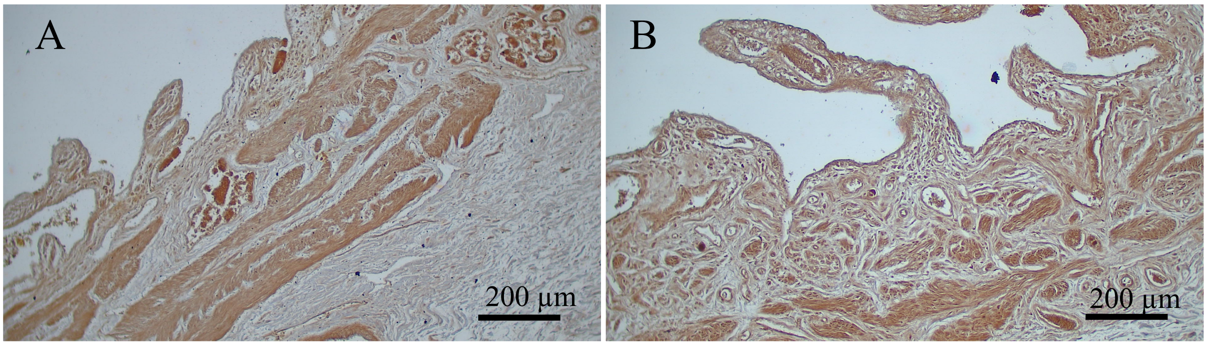


Abbildung 44, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengewebe des Spenders 06, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Vergleich zwischen Corpus und Collum**

A: *Corpus vesicae biliaris*
B: *Collum vesicae biliaris*

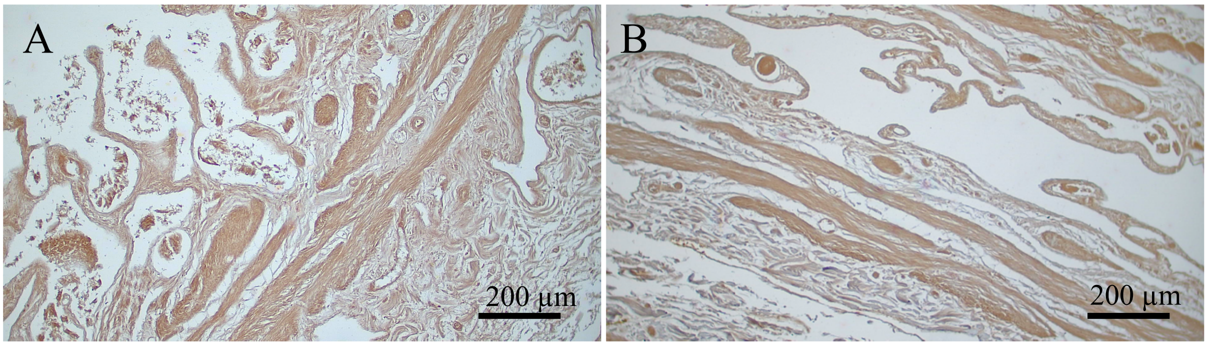


Abbildung 45, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengebe des Spenders 10, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Vergleich zwischen Corpus und Fundus**

A: *Corpus vesicae biliaris*
B: *Fundus vesicae biliaris*

Kreuzschema: Eine Entnahmestelle

Für den Vergleich der Expression des TRPC6-Kanals zwischen den einzelnen Spendern wurden insgesamt zehn verschiedene Spender herangezogen. Es handelte sich bei den Schnitten jeweils um Proben der gleichen Entnahmestelle am Gallenblasenkörper. Da sich in den Schnitten der Spender 05 sowie 08 eine deutliche Überfärbung und damit starke Färbung der azellulären Areale zeigte, wurden diese in Stufe 1 des Stufensystems ausgeschlossen. Somit wurden acht Proben von verschiedenen Spendern verglichen.

Cholangiozyten

Die Cholangiozyten waren in sieben der Spender abschnittsweise erhalten und somit nur dort beurteilbar (Stufe 2). Diese zeigten eine mäßige (3 Spender) bis starke Färbung (4 Spender) und damit die Expression des TRPC6-Kanals. Eine Siegelringmorphologie zeigte sich zusätzlich in zwei Schnitten (Stufe 3).

Lamina propria/ Tunica mucosa

Die Schnitte der acht Spender zeigten eine schwache Färbung des Bindegewebes.

Tunica muscularis

Die glatte Muskulatur der Tunica muscularis war in allen untersuchten Schnitten positiv für TRPC6. Es zeigten sich allerdings Unterschiede in deren Färbeintensität zwischen den Schnitten verschiedener Spender. Zur Darstellung der verschiedenen Ausprägungen der Muskulatur-Färbung dient Abbildung 46 A-F. Des Weiteren konnte keine Korrelation zwischen der Färbeintensität der Muskelschicht und der Kryptentiefe, als Maß der sekretorischen Aktivität, festgestellt werden.

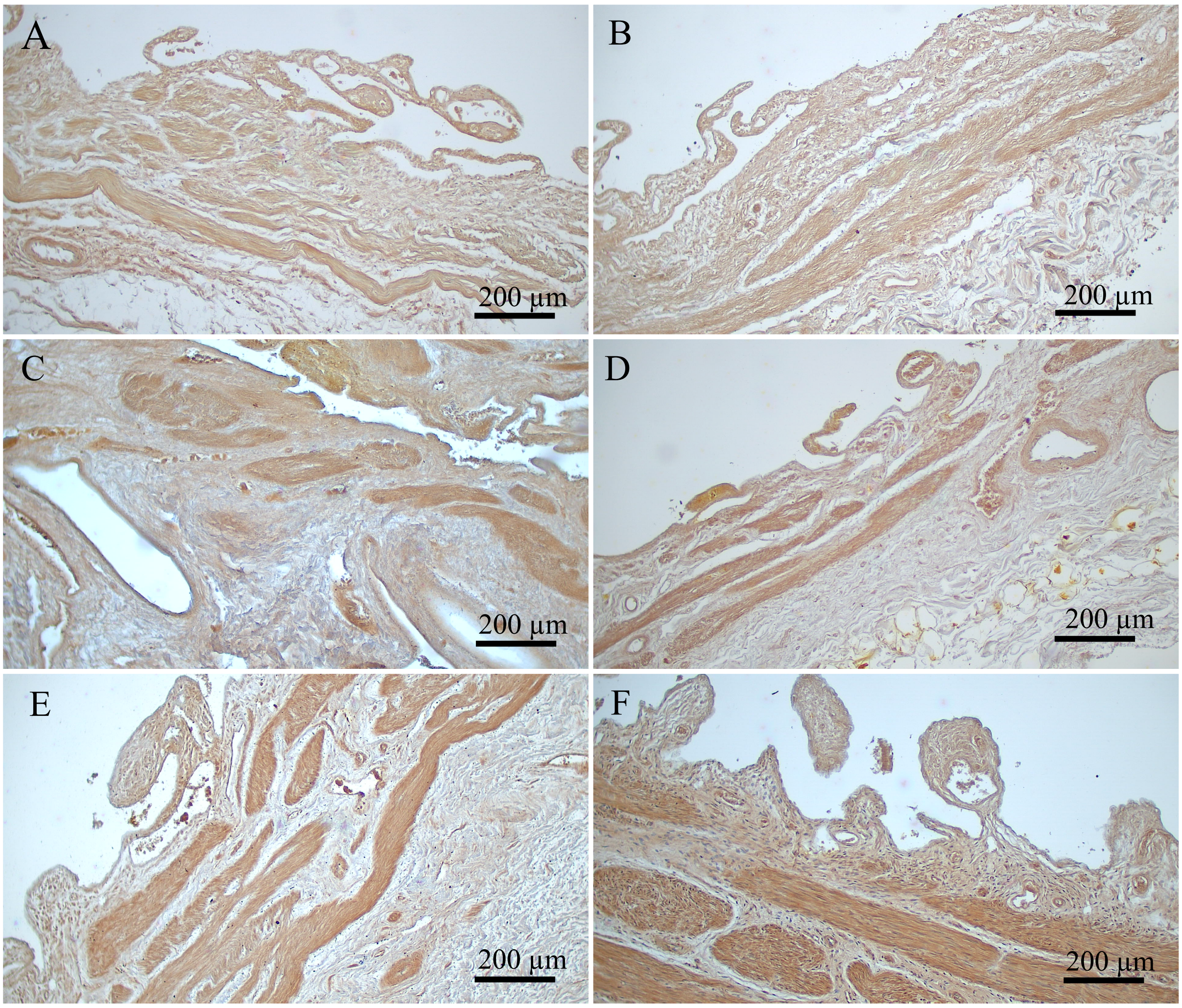


Abbildung 46, A-F: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe verschiedener Spender, jeweils aus dem *Corpus vesicae biliaris* entnommen, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm: **Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins in der Tunica muscularis zwischen Entnahmen verschiedener Spender – Gallenblase**

A: Spender 03, schwach-mäßige Färbung
B: Spender 11, schwach-mäßige Färbung
C: Spender 01, mäßige Färbung
D: Spender 10, mäßige Färbung
E: Spender 06, mäßig-starke Färbung
F: Spender 04, mäßig-starke Färbung

4.7 Auswertung der extrahepatischen Gallenwege

Von insgesamt sieben Spendern wurden proximale Teilstücke des Ductus choledochus entnommen (Tabelle 13).

Diese wurden anschließend zur Übersicht nach Hämatoxylin-Eosin (Abbildung 47) sowie im Folgenden immunhistochemisch gegen das TRPC6-Protein gefärbt. Bei der immunhistochemischen Färbung wurde in Anlehnung an das Gallenblasengewebe eine Verdünnung des Primärantikörpers von 1:100 bei einer DAB-Einwirkzeit von 7 min gewählt.

Tabelle 13: Immunhistochemisch gefärbte Proben - extrahepatische Gallenwege

Entnahmeort	**Spender 01**	**Spender 02**	**Spender 03**	**Spender 04**	**Spender 05**	**Spender 06**
Ductus choledochus	X		X		X	

Entnahmeort	**Spender 07**	**Spender 08**	**Spender 09**	**Spender 10**	**Spender 11**	**Spender 12**
Ductus choledochus		X	X	X	X	/*

/* Cholezystektomie zu Lebzeiten, Gallengang nicht auffindbar

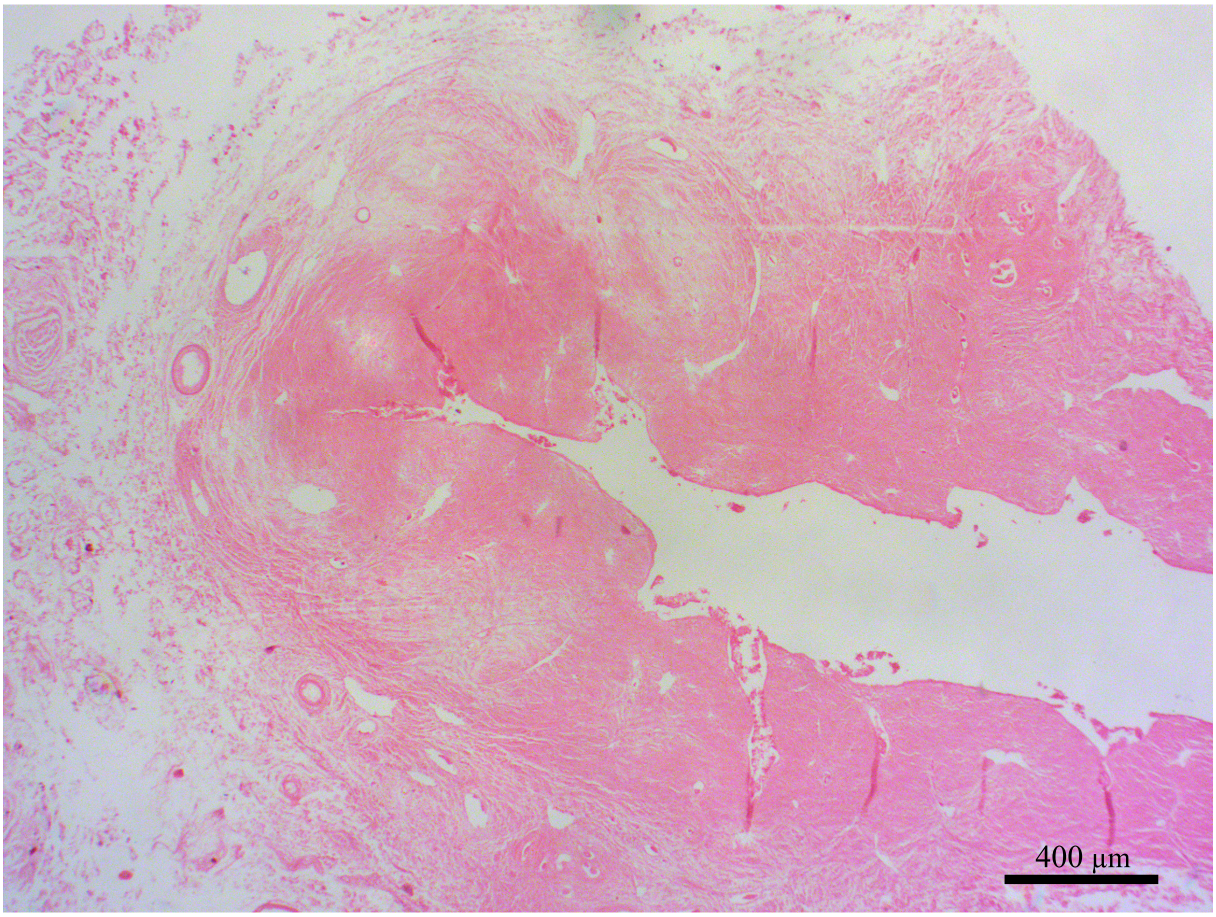


Abbildung 47: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallengangs, Spender 01, *Ductus choledochus*, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **Übersichtsfärbung extrahepatischer Gallenweg**

4.7.1 TRPC6-Expressionsmuster in den extrahepatischen Gallenwegen

Zur Übersichtsdarstellung des immunhistochemischen Färbemusters in den Wandschichten der extrahepatischen Gallengänge dient die Abbildung 48 (oben = lumenwärts).
In den Schnitten des *Ductus choledochus* zeigte sich in Analogie zum Gallenblasenepithel eine Ablösung der Cholangiozyten von der Basalmembran (Abbildung 48, Pfeile).

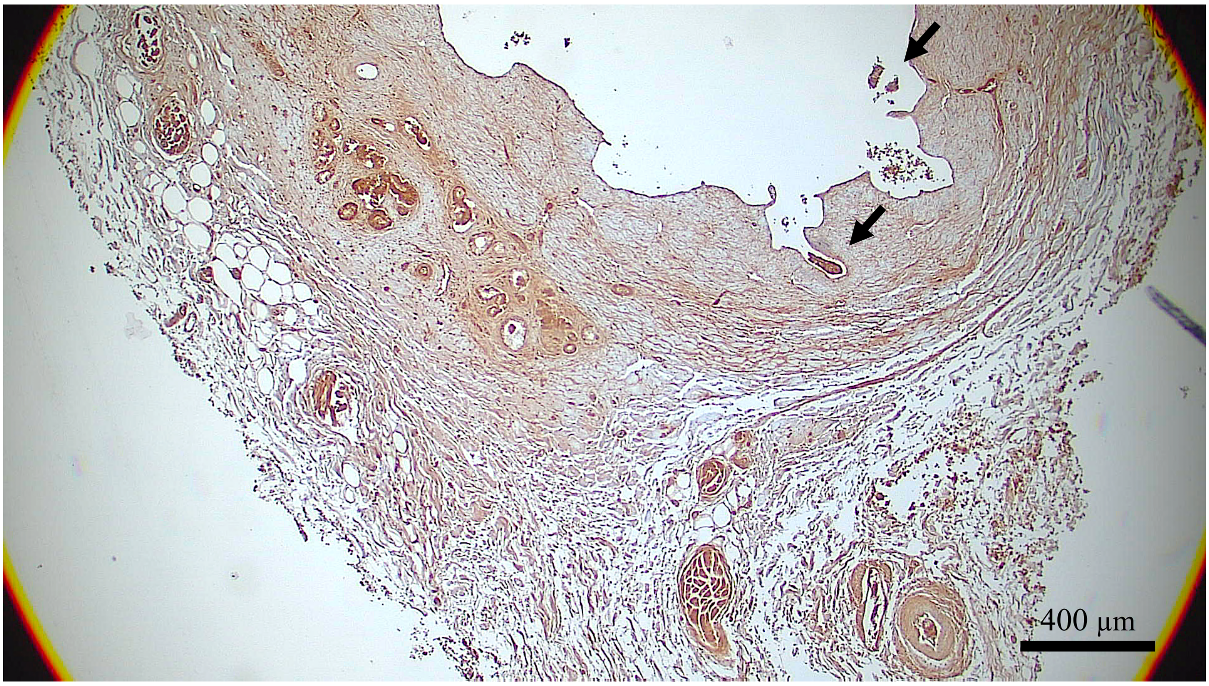


Abbildung 48: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallenwegs, Spender 10, Ablösung des Oberflächenepithels mit Pfeilen markiert, Primärantikörperverdünnung 1:100, 4fache Vergrößerung, Maßstab = 400 µm: **Übersichtsdarstellung des Ductus choledochus**

4.7.1.1 Morphologische Zuordnung der Proteinexpression zu den einzelnen Strukturen

Epithel der extrazellulären Gallenwege

Die Cholangiozyten waren stark positiv gefärbt (Abbildung 49). Auch die Basalmembran zeigte nach Ablösung des Epithels noch immer eine verstärkte Färbung. Insgesamt ähnelte das Färbeergebnis dem der gallenblasenständigen Cholangiozyten, wobei in den Cholangiozyten der Gallengänge neben der starken perinukleären Färbung noch eine deutliche Färbung der Zellgrenzen sowie des restlichen Zytoplasmas zu verzeichnen war (Abschnitt 4.6.2.1).

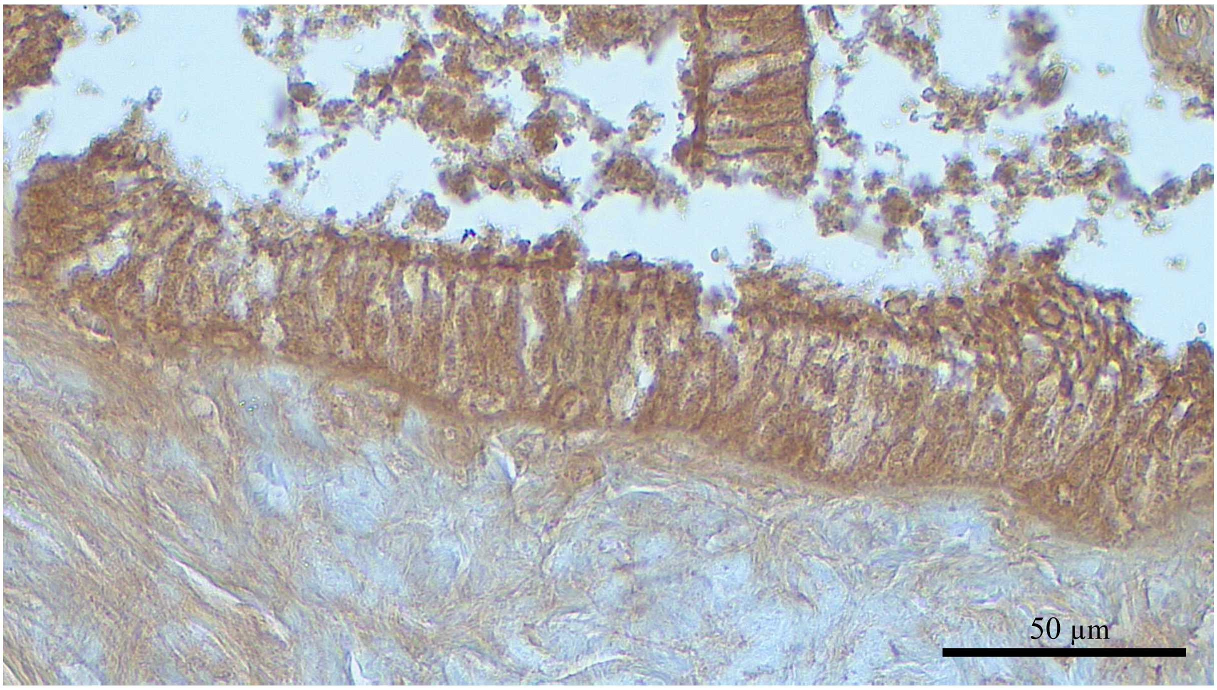


Abbildung 49: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallenweges, Spender 01, Primärantikörperverdünnung 1:100, 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: **Nahaufnahme Cholangiozyten - extrahepatischer Gallenweg**

Lamina propria

Die *Lamina propria* des Gallengangs enthält Bindegewebe aus kollagenen und elastischen Fasern. Außerdem sind glatte Muskelzellen, erkennbar an deren spindelförmiger Morphologie, in die Wandung des Gallengangs eingelagert. Diese waren TRPC6-positiv. In den subserösen Anteilen ergab sich deshalb teilweise eine leopardenartige Struktur des Bindegewebes.

Neben den Muskelzellen zeigten auch andere bindegewebsständigen Zellen, wie Keratinozyten, eine leichte Braunfärbung. Die azelluläre Substanz blieb ungefärbt.

Es zeigte sich im Verlauf der Wandbreite ein Übergang zwischen dicht gelagertem zu lockerem Bindegewebe. Der Übergang ging demnach mit einer Abnahme der Braunfärbung einher (Abbildung 48, Übersichtsfärbung).

Das Gewebe erschien an einzelnen Stellen ungefärbt wolkig, bedingt durch dort eingelagerte und damit TRPC6-negative tubuloalveoläre Drüsenanteile.

Die den Gallengang versorgenden Arterien und Venen waren stark positiv gefärbt. Sie zeigten die in Abschnitt 4.6.2.1 beschriebene Färbemuster und damit die TRPC6-Expression in ihren Wandschichten. Auch die angeschnittenen vegetativen Nerven waren stark positiv für das TRPC6-Protein (Abbildung 50 B).

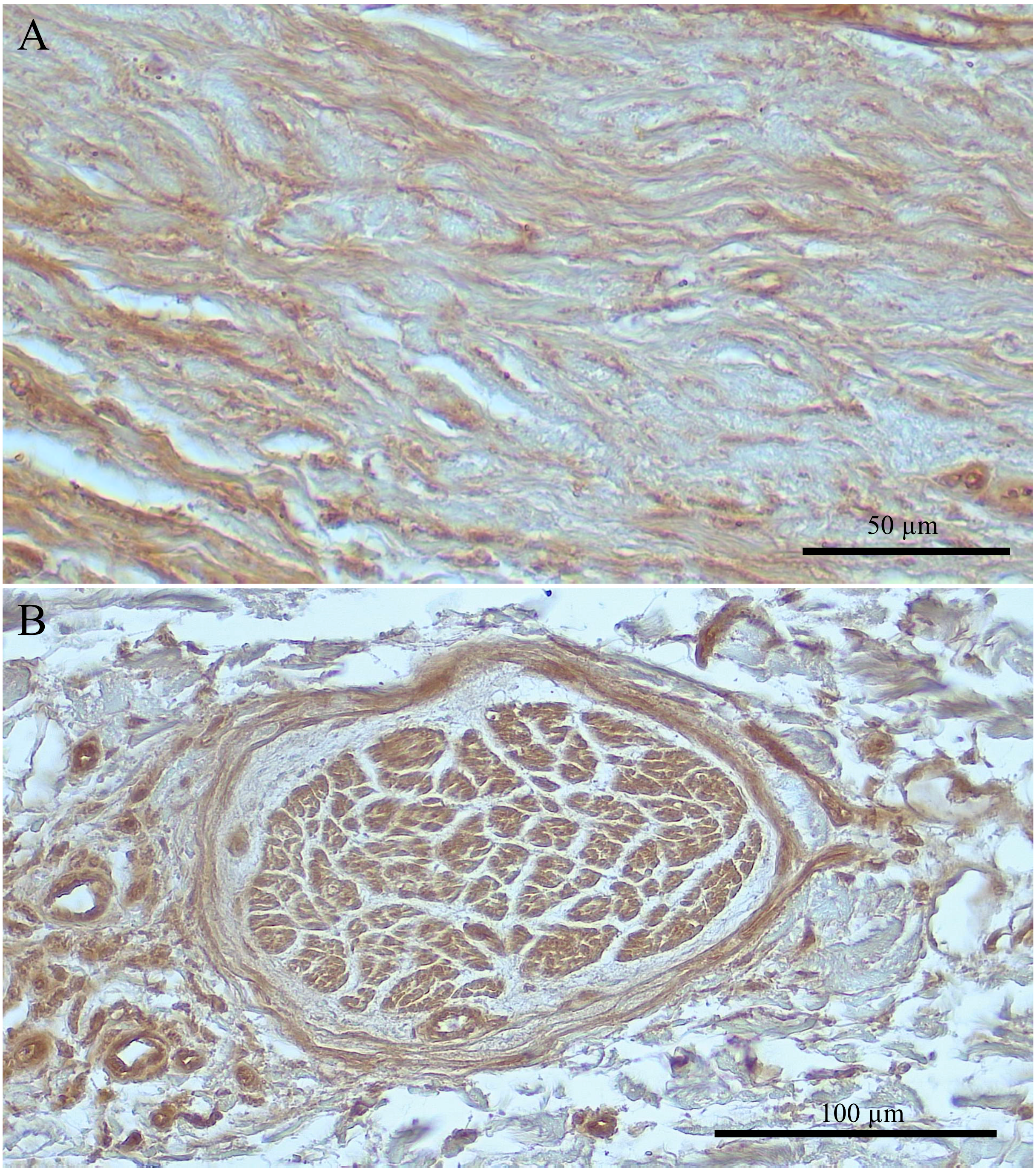


Abbildung 50, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallengangs, Spender 08, Primärantikörperverdünnung 1:100: **Nahaufnahme Bindegewebe – extrahepatische Gallenweg**

A: 60fache Vergrößerung, Maßstab = 50 µm: Bindegewebsstruktur
B: 40fache Vergrößerung, Maßstab = 100 µm: Angeschnittener peripherer Nerv

4.7.1.2 Vergleich der Expression zwischen den extrahepatischen Gallenwegen verschiedener Körperspender

Die Gallengangs-Entnahmen des Spenders 09 zeigten eine leichte Cholangitis. Deshalb wurden dessen Schnitte nicht in den Vergleich mit einbezogen. In den restlichen sechs Spendern zeigte sich ein identisches Färbemuster der *Lamina propria* sowie eine starke Färbung der Cholangiozyten. In Abbildung 51 A-D sind zum Vergleich exemplarisch vier gegen das TRPC6-Protein gefärbte extrahepatische Gallengänge dargestellt.

Aufgrund der Ablösung des Epithels war die Färbung der Cholangiozyten in nur vier der sechs Spender beurteilbar. Bei all diesen Exemplaren konnte eine starke Färbung (Kategorie 3) des Oberflächenepithels festgestellt werden. Damit konnte die Expression des TRPC6-Proteins in diesem Zelltyp in 100 % der Fälle nachgewiesen werden.

Die Zellen des Bindegewebes waren in der Mehrzahl der Fälle mäßig (Kategorie 2) gefärbt.

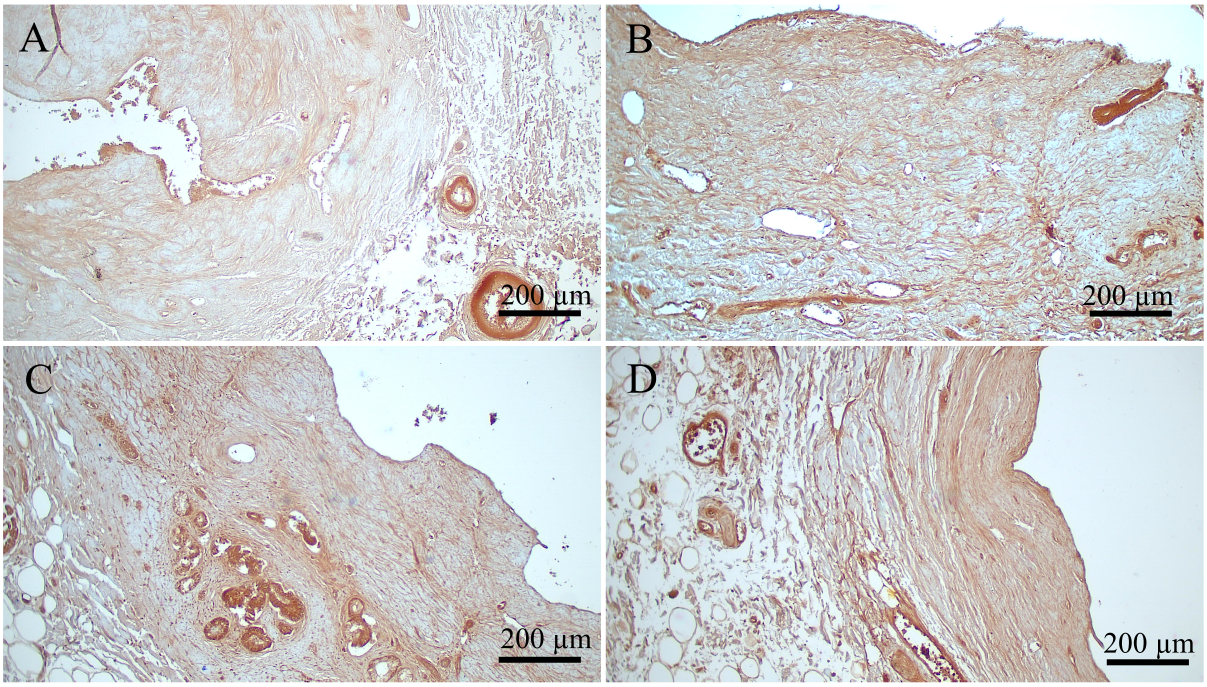


Abbildung 51, A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen extrahepatischer Gallenwege, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, Maßstab = 200 µm**: Vergleich der extrahepatischen Gallengänge zwischen verschiedenen Spendern**

A: Spender 01
B: Spender 03
C: Spender 10
D: Spender 08

5 Diskussion

Der TRPC6-Kanal ist auf molekularer Ebene an vielen physiologischen Abläufen sowohl im Gehirn als auch in den peripheren Organen beteiligt.

Die Expression des Kanals ist dabei in Geweben von verschiedenen Tierarten nachgewiesen worden, dennoch finden sich auf diesem Gebiet Erkenntnislücken. Dies betrifft vor allem die Expression des Kanals im menschlichen Gewebe und die genaue Lokalisation des Proteins innerhalb der Organe.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb der systematische Nachweis und die Lokalisierung des TRPC6-Kanals in der Leber, der Gallenblase sowie den extrahepatischen Gallenwegen des Menschen.

5.1 Diskussion der Ergebnisse - Lebergewebe

Die Expression des TRPC6-Kanals in den Hepatozyten von menschlichen Lebern konnte in dieser Dissertation nachgewiesen werden. In der Immunhistochemie zeigte sich eine leichte Braunfärbung des Zytoplasmas mit verstärkter submembranöser Expression des TRPC6-Proteins an den Zellgrenzen.

TRP-Kanäle mit Plasmamembran-Lokalisierung steuern den Einstrom von externem Calcium in das Zellinnere.

Für den TRPC6-Kanal wurde durch Über- und Unterexpressions-Studien an tumorösem Gewebe der Leber die Beteiligung am SOCE sowie am nicht kapazitiven Calciumeinstroms bereits untersucht. Hierbei zeigte sich überraschenderweise für den TRPC6-Kanal lediglich eine Beteiligung am SOCE [32]. Da nun gezeigt wurde, dass der TRPC6-Kanal auch an der Membran gesunder Hepatozyten lokalisiert ist, kann das Protein folglich auch im gesunden Lebergewebe am SOCE beteiligt sein.

Da nicht nur die Plasmamembran selektiv gefärbt war, sondern auch das Zytoplasma in unmittelbarer Nähe, ist es potenziell möglich, dass der TRPC6-Kanal in der Leber über einen exozytotischen Mechanismus in die Membran integriert werden kann. Bei diesem Mechanismus werden die Kanäle in Vesikeln submembranös gespeichert und fusionieren dann als Reaktion auf ein externes Signal mit der Membran [20].

Welche Zellen (hepatische Sternzellen, Kupffer-Zellen, Endothelzellen) den ungefärbten Zellen in den Sinusoiden entsprechen, lässt sich nicht eindeutig bestimmen, da sich die Zellen im histologischen Schnitt nicht gänzlich voneinander unterscheiden lassen. Über die dortige TRPC6-Expression kann deshalb keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Es ist lediglich eine morphologische Zuordnung möglich: Die dort lokalisierten ungefärbten Zellen liegen mittig im Sinusoid und besitzen eine runde Kernstruktur. Damit können die Endothelzellen aufgrund der fehlenden flachen Kernstruktur ausgeschlossen werden. Morphologisch sind die TRPC6-freien Zellen deshalb am ehesten den Ito- oder Kupffer-Zellen der Leber zuzuordnen.

Weitere Strukturen, die in der Leber das TRPC6-Protein exprimierten, waren die Cholangiozyten der Gallengänge. Wobei hier interindividuelle Unterschiede in der Intensität der Expression zwischen den Spendern erkennbar waren. Es zeigte sich hier eine schwache Färbung, die sich mit zunehmendem Kaliber der Gallengänge verstärkte (genauere Erläuterung, Diskussion der Färbung - Cholangiozyten Abschnitt 5.2).

Die Gefäße innerhalb der Leber, sowohl Arterien als auch Venen, zeigten eine geringe Expression des TRPC6-Kanals.

Allgemein bekannt ist die Beteiligung des TRPC6-Kanals am myogenen Tonus der Widerstandsgefäße und damit auch die Expression von TRPC6 in der Vaskulatur [38]. Die geringe Färbung der Gefäße in der Leber spiegelt deshalb vermutlich den geringen Gehalt an glatter Muskulatur in der Wandschichtung der Lebergefäße wider.

Aus den Vergleichen der Färbungen zwischen den Leberproben der Spender ohne leberspezifische Pathologien ließen sich zwei Dinge schlussfolgern:

1. Die TRPC6-Expression ist innerhalb eines Organs gleich. Es zeigen sich keine Unterschiede in der Expression des TRPC6-Kanals zwischen den einzelnen Leberlappen und auch die Expression innerhalb der funktionellen Baueinheit des Zentralvenenläppchens ist vergleichbar.

   Man weiß, dass innerhalb des Leberläppchens das Sauerstoffangebot an die Leberzellen in Richtung der Zentralvene abnimmt. Damit sinkt auch die Stoffwechselleistung der Leberzellen [123].

   Während sich also die Metaboliten-Produktion sowie der Protein- und Glukosestoffwechsel der Leber auf die Randbereiche des Läppchens konzentrieren, finden perivenös vor allem die Entgiftungsreaktionen statt [123].

   Da sich keine merklichen Unterschiede in der TRPC6-Expression über das gesamte Läppchen hinweg zeigten, spricht dies somit eher für eine generalisierte Funktion des Kanals in den Leberzellen als für eine Spezialisierung auf eine bestimmte Funktion.
2. Zwischen den Spendern unterschieden sich die subzelluläre TRPC6-Expression im Leberparenchym sowie die Expression des Kanals in den anderen dort ansässigen Gewebsstrukturen kaum. Somit konnten die Ergebnisse an mehreren Spendern bestätigt werden.

5.1.1 Einordnung in die Literatur

Die Informationen, die zur Expression des TRPC6-Kanals in der Leber bisher vorlagen, beruhen zum großen Teil auf mRNA-basierten Studien.

Die Arbeitsgruppe rund um Thomas Hoffmann bestimmten im Jahr 2000 mittels Northern-Blot-Verfahren den mRNA-Gehalt an einer Auswahl von 16 verschiedenen Geweben, darunter auch die Leber. Dabei handelte es sich beim Untersuchungsgut um mRNA-Gemische isoliert aus menschlichen Proben. In diesen Proben konnte keine TRPC6-mRNA in der Leber nachgewiesen werden [51].

Zwei Jahre später berichteten Antonio Riccio und Kollegen über einen zwar geringen, aber deutlich detektierbaren Gehalt an TRPC6-mRNA in der menschlichen Leber. Die hier angewandte Methode war ein RT-PCR-basiertes Verfahren [94].

Die Ergebnisse unserer Studie können grundsätzlich nicht komplett mit den oben genannten Studien gleichgesetzt werden, da die mRNA-Werte nicht immer die absolute Häufigkeit eines bestimmten Kanals auf Proteinebene widerspiegeln. Dennoch korrelieren diese beiden Werte und es sollte eine gewisse Anzahl von mRNA-Kopien vorhanden sein, sofern man eine Proteinexpression detektieren kann [94].

Gründe für die Abweichung in den Ergebnissen dieser beiden mRNA-Studien können die unterschiedlichen Sensitivitäten der Verfahren sein [94]. Während man beim Northern-Blot-Verfahren eine bestimmte Menge an Template benötigt, ist das RT-PCR-basierte Verfahren durch die Amplifikation der DNA deutlich empfindlicher. So konnte die vermutlich geringe, aber dennoch vorhandene Anzahl an mRNA-Kopien in der Leber eindeutig nachgewiesen werden.

Eine Studie, die das hepatozelluläre Karzinom auf die Überexpression des TRPC6-Kanals untersuchte, führte hierzu in Proben von Krebspatienten die Analysemethode der Immunfluoreszenz durch.

Diese zeigte eine verstärkte TRPC6-Expression in den von Tumor befallenen Regionen. Die Expression in den nicht befallenen Zonen wurde hierbei anderen leberständigen Zellen wie den Endothelzellen oder Kupffer-Zellen zugeordnet. Es wurde daraufhin geschlussfolgert, dass der TRPC6-Kanal nur in Leberepithelzellen tumoröser Lebern exprimiert werden würde.

Denn auch die quantitative PCR, die in derselben Arbeit an gesunden isolierten Hepatozyten durchgeführt wurde, zeigte eine nur sehr geringe mRNA-Expression [32].

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass das native Protein des TRPC6-Kanals auch in den Hepatozyten von gesunden (nicht tumorösen) Lebern exprimiert wird. Der größte Teil des Leberparenchyms stellte sich in unseren Untersuchungen deutlich braun gefärbt dar, was etwa dem prozentualen Anteil der Hepatozyten in der Leber, die circa 80 % des Gewebsvolumens ausmachen, entsprach [49].

Beide Techniken, sowohl die Immunfluoreszenz sowie die von uns angewendete Immunhistochemie bieten jeweils Vorteile. Bei der Hellfeldbildung, wie sie im Rahmen dieser Dissertation angewandt wurde, blieben die morphologischen Details im Schnitt sichtbar [87].

Durch die mögliche Korrelation mit der Standart-HE-Färbung bot sich in der von uns gewählten Methode zusätzlich die Möglichkeit, die gefärbten Strukturen durch die Übersichtsfärbung zu identifizieren und die Antigene zu lokalisieren. So konnten wir die TRPC6-Expression auch den Hepatozyten der Leber zuordnen und eine gleichmäßige Expression in den Hepatozyten über die histologische Baueinheit des Leberläppchens, sowie innerhalb der verschiedenen Leberlappen nachweisen.

Die Immunfluoreszenz hat hingegen eine bessere Auflösung, da die Fluorchrome direkt an den Antikörper gekoppelt sind, was somit auch eine quantitative Bewertung ermöglicht [87].

Für die Lokalisierung der Expression im Gewebe, auf die im Rahmen dieser Studie besonders Wert gelegt wurde, war die Hellfeldmikroskopie allerdings besser geeignet.

Im Rahmen einer weiteren Arbeit wurde die Expression des TRPC3-, TRPC6- und TRPV5-Kanals in Gewebe von Mäusen untersucht. Auch hier wurde die mRNA quantitativ mittels RT-PCR, aber auch durch in-situ-Lokalisierung untersucht. Es zeigte sich ähnlich zu den menschlichen Gewebeproben nur eine geringe Anzahl an mRNA-Kopien von TRPC6 in den Lebern der Mäuse. In der indirekten Immunfluoreszenz und -histochemie konnte man ein deutliches Signal für TRPC3 und TRPC6 im Lebergewebe und nur ein geringes Signal für TRPV5 feststellen [13].

Studien an murinem Gewebe oder anderen Säugetierarten bieten sich aus ethischen Aspekten an und geben auch die Möglichkeit, Sachverhalte an perfundiertem nativem Gewebe zu untersuchen.

Allerdings kann die Proteinausstattung in den Zellen einer Maus nicht exakt auf den Menschen übertragen werden. Auch die Maus-Isoform des TRPC6-Kanals unterscheidet sich durch das Fehlen einer Aminosäure von der des Menschen [16].

Dennoch konnte in der hier durchgeführten Immunhistochemie eine ähnliche Expression des TRPC6-Kanals in menschlichem Gewebe verglichen mit dem murinen Gewebe festgestellt werden.

5.1.2 Pathologien

Sowohl in der Leber des Spenders 08 als auch in der des Spenders 02 konnte eine starke, verdichtete Expression des TRPC6-Kanals in den Hepatozyten festgestellt werden.

Die Leber des Spenders 08 war außerdem von einer fulminanten Hepatitis mit Nekrosen und der Einwanderung mononukleärer Zellen betroffen. Bei Spender 02 zeigte sich eine ausgeprägte Zirrhose nach am ehesten chronischer Hepatitis.

Die Lebern beider Spender waren demnach von einem Krankheitsgeschehen betroffen, welches eine Verdichtung der TRPC6-Expression zur Folge hatte.

Bereits in der oben genannten Studie von El Boustany am hepatozellulären Karzinom untersuchte man, ob Viren als häufige Auslöser des Tumors auch die TRPC6-Expression erhöhen können.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden tumoröse Lebern auf TRPC6 untersucht, die als Ursache der Krebsentwicklung eine Hepatitis B oder C Infektion hatten. Als Vergleich nutzte man HCC-Lebern, die nicht von Viren befallen waren. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede in der Expression. Somit schloss die Forschergruppe darauf, dass die TRPC6-Überexpression unabhängig von den Hepatitis-Viren war [32]. Ob der Auslöser für die Leberentzündung bei Spender 02 sowie 08 ein viraler Befall war, ist nicht bekannt.

Der Grund für die Überexpression des TRPC6-Kanals liegt hier am ehesten an den regenerativen Vorgängen im verbleibenden gesunden Lebergewebe. Durch den mit der Hepatitis sowie Zirrhose verbundenen Zelluntergang wird die Regeneration der intakten Hepatozyten induziert, um eine ausreichende Leberfunktion zu erhalten.

Die Regeneration und damit auch der Zellzyklus werden in ihrem Fortschreiten über Calciumsignalisierungssysteme gesteuert. Diese erfordern die Freisetzung von Calcium aus internen Speichern und eine Zufuhr von externem Calcium. Eine Überexpression von leberständigen TRPC-Kanälen könnte den erhöhten Calciumbedarf mit ausgleichen [10]. Da das TRPC6-Protein hier eine verstärkte Expression zeigte, wäre es möglich, dass dieses am regenerativen Wachstum beteiligt ist.

Auch in Prostataepithelzellen wurde der TRPC6-Kanal als Effektor-Protein des proliferativen Effektes von Phenylephrin am α1-adrenerge Rezeptoren entdeckt. Der Kanal induziert die Zellproliferation sowohl in gutartigem, aber auch maligne entartetem Prostataepithelgewebe [114].

In der Leber des Spenders 11 imponierten diffuse maligne Läsionen, welche sich laut Todesbescheinigung als Metastasen eines Prostatakarzinoms herausstellten, welches zu Lebzeiten diagnostiziert wurde. Die Färbung auf TRPC6 fiel in diesen metastatischen Absiedlungen allerdings negativ aus. Es zeigte sich keine Expression des TRPC6-Kanals. Die Zellen der Metastase zeigten ein klein-blauzelliges, hyperchromatisches Erscheinungsbild, was demnach einem schlecht-differenzierten, neuroendokrinen Karzinom der Prostata entsprechen könnte [15]. Eine solche neuroendokrine Differenzierung zeigt selbst keine bzw. eine geringe Proliferationsaktivität (G0-Phase) und findet sich in aggressiven Tumoren. Die fehlende TRPC6-Expression in den Herden könnte demnach durch die fehlende Proliferationsaktivität dieser Tumordifferenzierung bedingt sein [14].

5.2 Diskussion der Ergebnisse – Biliäres System

Auch im biliären System des Menschen konnte die Expression des TRPC6-Kanals in dieser Dissertation eindeutig nachgewiesen werden.

Die IHC-Färbung des Gallenblasengewebes als auch des *Ductus choledochus* zeigte eine deutliche Expression im Oberflächenepithel, den Cholangiozyten. Die Expression war hierbei vor allem auf die perinukleäre Region konzentriert.

Die Zellgrenzen und das Zytoplasma in der Peripherie wiesen eine leichte bis keine Färbung auf.

In der perinukleären Region sind unter anderem die für die Biosynthese und Sekretion verantwortlichen Kompartimente zu finden ([102] ; [66]). Demnach wird das TRPC6-Protein dort vermutlich im endoplasmatischen Retikulum und/oder im Golgi-Apparat exprimiert

Jedes Membranprotein muss den Weg entlang dieser Kompartimente durchlaufen, ehe es schließlich zur Plasmamembran gelangt. Folglich sind die Proteine dort auch nachweisbar. Da sich im perinukleären Bereich allerdings eine deutlich stärkere Färbung als an der Plasmamembran der Cholangiozyten zeigte, spricht dies eher für eine dortige konstitutive Expression.

Hierzu passend wird aktuell die konstitutive Expression von TRP-Proteinen an intrazellulären Membranen und mögliche Funktionen diskutiert. Calcium-Fluktuationen in diesen Kompartimenten sollen hierbei das Trafficking sowie die Fusion von Endosomen mit der Plasmamembran und anderen Kompartimenten steuern [28]. Im endoplasmatischen Retikulum könnten TRPC-Kanäle als Leck-Kanäle zur Steuerung des Calciumhaushaltes dienen [28]. Auch im Golgi-Apparat könnten sie einen Beitrag zu dessen Funktion leisten, wie dies in der Studie „Increasing the expression of calcium-permeable TRPC3 and TRPC7 channels enhances constitutive secretion“ aus dem Jahr 2008 für TRPC3 und TRPC7 bereits untersucht wurde [63].

In den Cholangiozyten, die auch sekretorische Eigenschaften besitzen (siehe Einleitung Abschnitt 2.4.2.), kann der TRPC6-Kanal somit an der Steuerung dieser sekretorischen Funktionen beteiligt sein. Um dies eindeutig nachzuweisen, sind allerdings weitere funktionelle Studien von Nöten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die glatte Muskulatur der Gallenblase den TRPC6-Kanal exprimiert.

Die Funktion des TRPC6-Kanals wurde im Gastrointestinaltrakt bisher an intestinalen glatten Muskelzellen von Mäusen durch Gene-Silencing untersucht. Der Kanal steuert hier als Folge der Aktivierung von muskarinergen Rezeptoren (zusammen mit weiteren Kanälen) die Schnelligkeit der Dünndarmmotilität [115].

Da auch die Kontraktion der Gallenblase nach Freisetzung von Acetylcholin aus den Gallenblasenneuronen über den muskaringergen Rezeptor M3 gesteuert wird [54], kann der TRPC6-Kanal in Anlehnung an die oben genannten Ergebnisse auch in der Gallenblase wesentlich an deren motorischen Eigenschaften beteiligt sein.

Im Bindegewebe der Gallenblasen und der Gallenwege zeigten die ansässigen, fixen Zellen (Fibrozyten/Fibroblasten) eine leichte TRPC6-Expression.

In Verbindung gebracht wurde der TRPC6-Kanal mit diesen Zellen bisher im Rahmen der Wundheilung. Hier zeigte sich in einer Studie von Jennifer Davis und Kollegen eine Beteiligung des Kanals an der Induktion der Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten bei Gewebsverletzungen. Untersucht und bewiesen wurden dies durch den TRPC6-Knockout und die TRPC6-Überexpression in menschlichen Haut- und murinen Herzfibroblasten. Hierdurch konnte die Transformation der Zellen vollständig gehemmt oder stimuliert werden [26]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die TRPC6-Expression durch den profibrotischen Wachstumsfaktor TGFβ induziert werden kann. Dieser Wachstumsfaktor wird als Reaktion auf Gewebsverletzungen von Entzündungszellen und Fibroblasten freigesetzt [26].

Inwiefern der TRPC6-Kanal in unstimulierten Fibroblasten des Menschen exprimiert wird, wurde nicht explizit geschildert. In dieser Dissertation konnte nun gezeigt werden, dass dies, zumindest für das biliäre System, in schwacher Ausprägung zutrifft.

Die Interzellularsubstanz zeigte in der Umgebung der Fibroblasten ebenfalls eine leichte Färbung in der Immunhistochemie. Diese Färbung beruhte allerdings am ehesten auf Spill-Over-Artefakten bedingt durch die Färbemethode, statt auf der Expression des Kanals in diesen azellulären Strukturen. Denn durch die Amplifizierung des Signals können fälschlicherweise Bereiche um das Antigen positiv erscheinen, ohne dieses tatsächlich zu exprimieren.

5.3 Diskussion des verwendeten Materials

Das hier verwendetet Probenmaterial stammte von Körperspendern des Anatomischen Institutes des Universitätsklinikum des Saarlandes.

Somit handelte es sich um intaktes humanes Gewebe, das postmortal aus einem NEP-fixierten Leichnam entnommen wurde. Alle Spender sind hierbei infolge eines natürlichen Todes verstorben.

Die Vorteile, die sich aus dem nativen Gewebe im Vergleich zu den häufig verwendeten Zelllinien ergaben, waren die physiologische Proteinausstattung und die räumliche Anordnung der Zellen im Gewebe. Denn Zelllinien zeigen häufig einen veränderten Gehalt an Signalproteinen wie den Calciumkanälen oder Hormonrezeptoren [7].

Aus funktionellen Studien an den Zelllinien wird oftmals auf die Expression geschlossen. Wie beispielsweise die Studie von C. Lyer, die Veränderungen der Expression des TRPC6-Kanals an der humanen hepatischen Stellat-LX-2-Zelllinie untersuchte [56].

Um die Expression des Kanals im physiologischen Zustand zu untersuchen, ist es von Bedeutung die natürliche Proteinausstattung und die intrazelluläre Organisation von Hepatozyten in der intakten Leber als gegeben voraussetzen zu können.

Ein Nachteil, welcher sich aus dem gewählten Probenkollektiv ergab, war das hohe Alter der eingeschlossenen Spender. Mit einem Durchschnittsalter von 84 Jahren repräsentiert dies nicht die Altersverteilung der Gesellschaft. Somit findet man in den Gewebeproben altersbedingte Veränderungen. Dies betrifft weniger das biliäre System als die Leber. Denn in der Leber verändert sich ab einem Alter von 60 Jahren das Bild des histologischen Schnittes beim Menschen. Zu diesen Veränderungen gehört z.B. die Zunahme von Lipofuszin im Zytoplasma der Hepatozyten (siehe Abbildung 23: A, C, D). Auch nimmt der Gehalt an Kollagen in der Leber zu [100]. Diese Veränderungen waren in einigen Spendern wie 12 (86 Jahre) oder 04 (83 Jahre) zu verzeichnen.

Außerdem ergibt sich eine Latenzzeit zwischen dem Aussetzen des Herz-Kreislauf-Systems bis zur Fixierung der Körperspender. In dieser Zeit setzen autolytische Vorgänge ein, die teilweise durch eine Lagerung bei Temperaturen nahe null gebremst werden können. Dies führt vor allem in enzymreichen Geweben zu Einbußen in der Gewebemorphologie [62]. Dies betraf aufgrund der hohen Anzahl der gewebsständigen Enzyme vor allem die Leber. Die Schnittqualität des biliären Systems war hiervon weniger beeinträchtigt. Hier führten eher die rauen Verarbeitungsschritte der Färbung z.B. im Hinblick auf die Ablösung der Cholangiozyten, zu Einbußen in der Gewebsmorphologie.

5.4 Diskussion der verwendeten Methode

Die Expression des TRPC6-Kanals wurde im Rahmen dieser Studie immunhistochemisch untersucht. Hierbei kam die indirekte Methode zum Einsatz. Der gegen TRPC6-gerichtetet Primärantikörper wurde dabei von einem Sekundärantikörper gebunden. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym führte anschließend zur Umsetzung des Substrates. Es ergab sich ein brauner Farbumschlag an der Lokalisation des Antigens.

Der Vorteil der indirekten Methode war die Signalverstärkung. An einen Primärantikörper konnten mehrere Sekundärantikörper binden, was folglich zu einem verstärkten Farbumschlag führte [62]. So konnten auch kleine Mengen des Proteins nachgewiesen werden. Dies war vor allem in der Leber von Bedeutung. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde deshalb auf die indirekte Methode im Rahmen der Immunhistochemie gesetzt. Die Signalverstärkung durch dieses Verfahren kann damit auch die starke Färbung in unseren Resultaten im Vergleich zu den anderen Studien begründen.
Demnach ist allerdings auch die Färbung nicht direkt proportional zur Proteinexpression und sagt somit nichts über die absolute Höhe der TRPC6-Expression aus.

Bedingt durch die manuelle Methode spielte bei der Auswertung die Beobachtungsvariabilität eine entscheidende Rolle. Die Bewertung der Färbungen hing im Wesentlichen vom Begutachter ab. Um diesen Einflussfaktor zu minimieren, wurde die Zweitbegutachtung der Färbungen durch einen unabhängigen, erfahrenen Prüfer angestrebt. Hier zeigte sich eine Übereinstimmung in circa 90 % der Ergebnisse.

5.5 Ausblick

Für zukünftige zielgerichtete Therapien des HCC und anderen TRPC6-getriggerten Pathologien in der Leber ist zu beachten, dass der TRPC6 auch in gesundem Lebergewebe exprimiert wird. Bevor TRPC6-inhibierende Therapien zum Einsatz kommen, müssen die leberspezifischen Funktionen des TRPC6-Kanals und dessen Relevanz in den physiologischen Abläufen erforscht werden.
Denn der TRPC6-Kanal trägt vermutlich nicht nur in entarteten Zellen zum Wachstum bei, sondern auch in intakten Hepatozyten, die im Rahmen von Lebergewebezerstörung zur Aufrechterhaltung der Leberfunktion beitragen. Auf welche speziellen Pathologien dies zutrifft oder ob dies generell gilt, muss noch systematisch untersucht und bewiesen werden.

Die Expression des TRPC6-Kanals in der glatten Muskulatur der Gefäße und seine Funktion in deren Kontraktilität ist weitreichend bekannt. In dieser Studie wurde nun auch die Expression in der glatten Muskulatur der Gallenblase nachgewiesen.
Einen neuen Aspekt in der subzellulären Lokalisierung des TRPC6-Kanals wurde durch das Expressionsmuster in den Cholangiozyten aufgeworfen.
In diesem, bisher nicht auf das TRPC6-Protein untersuchten Zelltyp, zeigte sich ein perinukleäres Expressionsmuster. In Zusammenschau mit der sekretorischen Funktion dieser Zellen ist eine konstitutive Expression in den dort liegenden Organellen, dem endoplasmatischen Retikulum sowie dem Golgi-Apparat möglich. Die Frage, ob der TRPC6-Kanal nun an den sekretorischen Vorgängen beteiligt ist, welche Relevanz dies besitzt und ob die Aktivierungsmechanismen die gleichen sind, wie dies für die Plasmamembran der Fall ist, bietet Potential für weiterführende Arbeiten.

6 Literaturverzeichnis

1. Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. FASEB J 23:297–328
2. Alexander (2009) Transient receptor potential (TRP) cation channels. Br J Pharmacol 158:148–155
3. Amaya MJ, Nathanson MH (2013) Calcium signaling in the liver. Compr Physiol 3:515–539
4. Bae YM, Kim A, Lee YJ, Lim W, Noh YH, Kim EJ, Kim J, Kim TK, Park SW, Kim B, Cho S Il, Kim DK, Ho WK (2007) Enhancement of receptor-operated cation current and TRPC6 expression in arterial smooth muscle cells of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. J Hypertens 25:809–817
5. Baird GS (2011) Ionized calcium. Clin Chim Acta 412:696–701
6. Balemba OB, Salter MJ, Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT, Mawe GM (2006) Spontaneous electrical rhythmicity and the role of the sarcoplasmic reticulum in the excitability of guinea pig gallbladder smooth muscle cells. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol 290:655–664
7. Barritt GJ, Chen J, Rychkov GY (2008) Ca2+-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res 1783:651–672
8. Barritt GJ, Litjens TL, Castro J, Aromataris E, Rychkov GY (2009) Store-operated CA2+ channels and microdomains of CA2+ in liver cells. Clin Exp Pharmacol Physiol 36:77–83
9. Becker KW Anatomisches Institut Homburg-Saar - PROSEKTUR. URL: http://prosektur.de/05_fragen.html
10. Berridge MJ (1995) Calcium signalling and cell proliferation. BioEssays 17:491–500
11. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 4:517–529
12. Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M (1987) Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP. EMBO J 6:2907–2913
13. Bisping F (2013) “Expression und Lokalisation der Kationenkanäle TRPC3, TRPC6 und TRPV5 in verschiedenen Geweben der Maus.”
14. Bonkhoff H, Fixemer T (2004) Neuroendokrine Differenzierung im Prostatakarzinom. Der Urol Ausgabe A 43:836–842
15. Bonkhoff PD med. H Prostatakarzinome mit neuroendokriner Differenzierung.
16. Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Cloning and Expression of a Novel Mammalian Homolog of Drosophila Transient Receptor Potential (Trp) Involved in Calcium Entry Secondary to Activation of Receptors Coupled by the G q Class of G Protein*. J Biol Chem 272:29672–29680

17. Bousquet SM, Monet M, Boulay G (2010) Protein Kinase C-dependent Phosphorylation of Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) on Serine 448 Causes Channel Inhibition. J Biol Chem 285:40534–40543
18. Burry RW (2011) Controls for immunocytochemistry: An update. J Histochem Cytochem 59:6–12
19. Bussolati G, Radulescu RT (2011) Blocking endogenous peroxidases in immunohistochemistry: A mandatory, yet also subtle measure. Appl Immunohistochem Mol Morphol 19:484
20. Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM, Boulay G (2004) Exocytotic Insertion of TRPC6 Channel into the Plasma Membrane upon G q Protein-coupled Receptor Activation. J Biol Chem 279:7241–7246
21. Chen X, Sooch G, Demaree IS, White FA, Obukhov AG (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now XingjuanCells. Cells 9:1–48
22. Chinigò G, Castel H, Chever O, Gkika D (2021) TRP Channels in Brain Tumors. Front Cell Dev Biol 9:1–17
23. Clapham DE (1995) Calcium Signaling. Cell 80:259–268
24. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. Nature 426:517–524
25. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant [30]. Nature 224:285–287
26. Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkentin JD (2012) A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo.
27. Dietrich A, Mederos Y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T (2003) N-Linked Protein Glycosylation Is a Major Determinant for Basal TRPC3 and TRPC6 Channel Activity. J Biol Chem 278:47842–47852
28. Dong XP, Wang X, Xu H (2010) TRP channels of intracellular membranes. J Neurochem 113:313–328
29. Dray-Charier N, Paul A, Combettes L, Bouin M, Mergey M, Balladur P, Capeau J, Housset C (1997) Regulation of mucin secretion in human gallbladder epithelial cells: Predominant role of calcium and protein kinase C. Gastroenterology 112:978–990
30. Duan B, Huang C, Bai J, Zhang YL, Wang X, Yang J, Li J (2019) Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. Hepatocell Carcinoma 141–158
31. Eder P, Molkentin JD (2011) TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. Circ Res 108:265–272
32. El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T (2008) Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. Hepatology 47:2068–2077
33. Enfissi A, Prigent S, Colosetti P, Capiod T (2004) The blocking of capacitative calcium entry

by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. Cell Calcium 36:459–467

34. Eng FJ, Friedman SL (2000) Fibrogenesis. I. New insights into hepatic stellate cell activation: The simple becomes complex. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol 279:7–11
35. Fassler DJ, Abousamra S, Gupta R, Chen C, Zhao M, Paredes D, Batool SA, Knudsen BS, Escobar-Hoyos L, Shroyer KR, Samaras D, Kurc T, Saltz J (2020) Deep learning-based image analysis methods for brightfield-acquired multiplex immunohistochemistry images. Diagn Pathol 15:
36. Gees M, Colsoul B, Nilius B (2010) The role of transient receptor potential cation channels in Ca2+ signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:3962–3963
37. Goel M, Sinkins WG, Schilling WP (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. J Biol Chem 277:48303-48310n-linked
38. Gonzalez-Cobos JC, Trebak M (2010) TRPC channels in smooth muscle cells. Front Biosci 15:1023–1039
39. Graham S, Ding M, Ding Y, Sours-Brothers S, Luchowski R, Gryczynski Z, Yorio T, Ma H, Ma R (2010) Canonical Transient Receptor Potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel. J Biol Chem 285:23466–23476
40. Gregorio-Teruel L, Valente P, González-Ros JM, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A (2014) Mutation of I696 and W697 in the TRP box of vanilloid receptor subtype i modulates allosteric channel activation. J Gen Physiol 143:361–375
41. Gregory RB, Barritt GJ (2003) Evidence that Ca 2T-release-activated Ca 2T channels in rat hepatocytes are required for the maintenance of hormone-induced Ca 2T oscillations. Biochem J 370:695–702
42. Guilbert A, Dhennin-Duthille I, Hiani YEL, Haren N, Khorsi H, Sevestre H, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H (2008) Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. BMC Cancer 8:1–11
43. Hagmann H, Mangold N, Rinschen MM, Koenig T, Kunzelmann K, Schermer B, Benzing T, Brinkkoetter PT (2018) Proline-dependent and basophilic kinases phosphorylate human TRPC6 at serine 14 to control channel activity through increased membrane expression. FASEB J 32:208–219
44. Hantschke M, Palmedo G (2015) Immunhistologische Techniken. Springer Berlin Heidelberg
45. Hardie RC (2007) TRP channels and lipids: From Drosophila to mammalian physiology. J Physiol 578:9–24
46. Hardie RC (2011) A brief history of trp: Commentary and personal perspective. Pflugers Arch Eur J Physiol 461:493–498
47. Hellmich UA, Gaudet R (2014) Structural Biology of TRP Channels HHS Public Access. Handb Exp Pharmacol 223:963–990

48. Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A, Mikoshiba K (2004) Regulation of TRPC6 Channel Activity by Tyrosine Phosphorylation*. J Biol Chem 279:18887–18894
49. Höfler G, Kreipe HH, Moch H (2019) Pathologie - Das Lehrbuch. 1104
50. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature 397:259–263
51. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. J Mol Med 78:14–25
52. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99:7461–7466
53. Hohenester S, Maillette de Buy Wenniger L, Paulusma CC, van Vliet SJ, Jefferson DM, Oude Elferink RP, Beuers U (2012) A biliary HCO 3- umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. Hepatology 55:173–183
54. Housset C, Chrétien Y, Debray D, Chignard N (2016) Functions of the Gallbladder. Compr Physiol 6:1549–1577
55. Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha;1-adrenoceptor-activated Ca2+-permeable cation channel. Circ Res 88:325–332
56. Iyer SC, Kannan A, Gopal A, Devaraj N, Halagowder D (2015) Receptor channel TRPC6 orchestrate the activation of human hepatic stellate cell under hypoxia condition. Exp Cell Res 336:66–75
57. Jia Y, Zhou J, Tai Y, Wang Y (2007) TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. Nat Neurosci 10:559–567
58. Kaye GI, Wheeler HO, Whitlock RT, Lane N (1966) Fluid transport in the rabbit gallbladder. A combined physiological and electron microscopic study. J Cell Biol 30:237–268
59. Kew MC (2014) The role of cirrhosis in the etiology of hepatocellular carcinoma. J Gastrointest Cancer 45:12–21
60. Kim SW, Roh J, Park CS (2016) Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. J Pathol Transl Med 50:411–418
61. Kirsch J (2017) Thieme: Duale Reihe - Anatomie.
62. Lang G (2013) Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.
63. Lavender V, Chong S, Ralphs K, Wolstenholme AJ, Reaves BJ (2008) Increasing the expression of calcium-permeable TRPC3 and TRPC7 channels enhances constitutive secretion. Biochem J 413:437–446
64. Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, Bousquet SM, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, Boulay G (2006) Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. J Biol Chem 281:30356–30364

65. Leuner K, Kazanski V, Muller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE (2007) Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. FASEB J 21:4101–4111

66. Li J, Ahat E, Wang Y (2019) Golgi structure and function in health, stress, and diseases. Nature Publishing GroupURL: /pmc/articles/PMC7076563/

67. Li Y, Jin YC, Cul K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ, Yuan XB (2005) Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. Nature 434:894–898

68. Löffler G, Pedrides PE, Müller M, Heinrich PC, Graeve L (2014) Biochemie & Pathobiochemie. Biochem und Pathobiochemie 9.Auflage:1–1263

69. Lu CC, Wang GH, Lu J, Chen PP, Zhang Y, Hu ZB, Ma KL (2019) Role of Podocyte Injury in Glomerulosclerosis. Adv Exp Med Biol 1165:195–232

70. Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: Mechanism of pheromone transduction. Neuron 40:551–561

71. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2015) Taschenlehrbuch Histologie.

72. Lussier MP, Cayouette S, Lepage PK, Bernier CL, Francoeur N, St-Hilaire M, Pinard M, Boulay G (2005) MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. J Biol Chem 280:19393–19400

73. Manns MP, Schneidewind S (2016) Praxis der Hepatologie.

74. Minke B, Wu C, Pak W (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant. 258:1–23

75. Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. Physiol Rev 82:429–472

76. Möller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, Pippin JW, Rastaldi MP, Wawersik S, Schiavi S, Henger A, Kretzler M, Shankland SJ, Reiser J (2007) Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. J Am Soc Nephrol 18:29–36

77. Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. Sci STKE 2005:

78. Montero C (2003) The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 51:1–4

79. Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S (1994) Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. Cell Calcium 16:279–288

80. Niemeyer BA, Suzuki E, Scott K, Jalink K, Zuker CS (1996) The Drosophila light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. Cell 85:651–659

81. Nilius B (2007) TRP channels in disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis 1772:805–812

82. Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H

(2007) Gα12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. J Biol Chem 282:23117–23128

83. Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H (2010) Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. J Biol Chem 285:13244–13253
84. Nishiyama K, Toyama C, Kato Y, Tanaka T, Nishimura A, Nagata R, Mori Y, Nishida M (2021) Deletion of TRPC3 or TRPC6 fails to attenuate the formation of inflammation and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. Biol Pharm Bull 44:431–436
85. Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000) Praxis der Immunhistochemie.
86. Numaga-Tomita T, Nishida M (2020) TRPC Channels in Cardiac Plasticity. Cells 9:
87. O’Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A, Li B, Kampf C, Pontén F, Gallagher WM, Lindskog C (2014) Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. Mol Oncol 8:783–798
88. Oliva-Vilarnau N, Hankeova S, Vorrink SU, Mkrtchian S, Andersson ER, Lauschke VM (2018) Calcium signaling in liver injury and regeneration. Front Med 5:192
89. Pabst R, Schmiedl A, Vera /, Pabst C, Tschernig T (2014) Ethik und Emotionen im Umgang mit Körperspenden in deutschsprachigen Anatomien. Zeitschrift für medizinische Ethik 60:355–366
90. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: An overview. Cell Calcium 38:233–252
91. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. Annu Rev Physiol 68:619–647
92. Rege R V., Moore EW (1987) Evidence for H+ secretion by the in vivo canine gallbladder. Gastroenterology 92:281–289
93. Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, Mcgee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. Nat Genet 37:739–744
94. Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. Mol Brain Res 109:95–104
95. Riehle M, Büscher AK, Gohlke BO, Kaßmann M, Kolatsi-Joannou M, Bräsen JH, Nagel M, Becker JU, Winyard P, Hoyer PF, Preissner R, Krautwurst D, Gollasch M, Weber S, Harteneck C (2016) TRPC6 G757D loss-of-function mutation associates with FSGS. J Am Soc Nephrol 27:2771–2783
96. Rooney TA, Sass EJ, Thomas AP (1989) Characterization of Cytosolic Calcium Oscillations

Induced by Phenylephrine and Vasopressin in Single Fura-2-loaded Hepatocytes. J Biol Chem 264:17131–17141

97. Saper CB (2005) An open letter to our readers on the use of antibodies. J Comp Neurol 493:477–478

98. Schaefer M (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. Pflugers Arch Eur J Physiol 451:35–42

99. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC (2002) Schiff's Diseases of the Liver.

100. Schmucker DL (2005) Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? Exp Gerontol 40:650–659

101. Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA (1997) Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF(-/-) mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. Neuron 19:269–281

102. Schwarz DS, Blower MD (2016) The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. Cell Mol Life Sci 73:79–94

103. Selvaraj S, Sun Y, Singh B (2012) TRPC Channels and their Implications for Neurological Diseases. CNS Neurol Disord - Drug Targets 9:94–104

104. Semtner M, Schaefer M, Pinkenburg O, Plant TD (2007) Potentiation of TRPC5 by protons. J Biol Chem 282:33868–33878

105. Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Ito Y, Inoue R (2004) Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. J Physiol 561:415–432

106. Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T (2003) NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. Science (80-) 301:96–99

107. Siegenthaler W, Blum HE, Amann-Vesti BR, Arnold C, Bals R, Beuschlein F, Böhm M, Büttner U, Düsing R, Er F, Fromm M, Gärtner R, Gay S, Geißler M, Häussinger D, Hallek M, Harendza S, Hoffmann U, Hohlfeld R, Kanz L, Kaufmann SHE, Kindermann M, Kohlhase J, Kreuzer K-A, Laufs U, Link A, Ludwig M, Maack C, Martin S, Moradpour D, Müller-Ladner U, Nawroth PP, Neumann-Haefelin C, Oertel WH, Opitz OG, Panzer U, Passarge E, Peter H-H, Pichler WJ, Reincke M, Richter WO, Rosenow F, Schaberg T, Scheller B, Schepelmann K, Scherbaum WA, Schneider A, Schopohl J, Schwacha H, Semmo N, Stahl RAK, Staib P, Strasburger CJ, Tatò F, Tauber R, Thaiss F, Thimme R, Vogelmeier C, Eckardstein A von, Weisel K, Wenzel U, Zidek W, Ziegler R, Zygmunt M (2016) Klinische Pathophysiologie. Thieme Verlag

108. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL (2006) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. Proc Natl Acad Sci U S A 103:16586–16591

109. Storch U, Forst AL, Philipp M, Gudermann T, Mederos Y Schnitzler M (2012) Transient

receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. J Biol Chem 287:3530–3540

110. Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, Wang Y (2008) TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. J Cell Sci 121:2301–2307
111. Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori MX, Honda A, Inoue R (2008) Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. J Physiol 586:4209–4223
112. Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu JX, Liu M, Zhou X, Zhang X, Chen L (2018) Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. Cell Res 28:746–755
113. Taylor CR, Shi S-R (2001) Antigen Retrieval Technique for Immunohistochemistry. 239–265
114. Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Slomianny C, Beck B, Mariot P, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Capiod T, Skryma R, Prevarskaya N (2006) Differential role of transient receptor potential channels in Ca 2+ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. Cancer Res 66:2038–2047
115. Tsvilovskyy V V, Zholos A V, Aberle T, Philipp SE, Dietrich A, Zhu MX, Birnbaumer L, Freichel M, Flockerzi V (2009) Deletion of TRPC4 and TRPC6 in Mice Impairs Smooth Muscle Contraction and Intestinal Motility In Vivo. Gastroenterology 137:1415–1424
116. Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999) Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca2+ entry channel. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2060–2064
117. Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW (2004) The mammalian TRPC cation channels. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res 1742:21–36
118. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. J Biol Chem 278:29031–29040
119. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. Annu Rev Biochem 76:387–417
120. Wedel BJ, Vazquez G, McKay RR, Bird GSJ, Putney JW (2003) A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP3 receptor-independent process. J Biol Chem 278:25758–25765
121. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Y Schnitzler MM, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. Proc Natl Acad Sci U S A 103:19093–19098
122. Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Mederos Y Schnitzler M, Brandes RP, Grimminger F, Meissner M, Freichel M, Offermanns S, Veit F, Pak O, Krause KH, Schermuly RT, Brewer AC, Schmidt HHHW, Seeger W, Shah AM, Gudermann T, Ghofrani

HA, Dietrich A (2012) Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. Nat Commun 3:1–10

123. Welsch, Ulrich ; Kummer, Wolfgang ; Deller T (2018) Histologie - Das Lehrbuch - 5th Edition.
124. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. Circ Res 90:248–250
125. Wen L, Liang C, Chen E, Chen W, Liang F, Zhi X, Wei T, Xue F, Li G, Yang Q, Gong W, Feng X, Bai X, Liang T (2016) Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent. Sci Rep 6:1–14
126. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Proc Natl Acad Sci U S A 92:9652–9656
127. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB (2005) Medicine: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. Science (80-) 308:1801–1804
128. Wood JR, Svanvik J (1983) Gall-bladder water and electrolyte transport and its regulation. Gut 24:579–593
129. Woods NM, Cuthbertson KSR, Cobbold PH (1986) Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. Nature 319:600–602
130. Yu Y, Fantozzi I, Remillard C V, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JXJ (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A 101:13861–13866
131. Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L (1995) Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene. FEBS Lett 373:193–198
132. Zúñiga-García V, Chávez-López M de G, Quintanar-Jurado V, Gabiño-López NB, Hernández-Gallegos E, Soriano-Rosas J, Pérez-Carreón JI, Camacho J (2015) Differential Expression of Ion Channels and Transporters During Hepatocellular Carcinoma Development. Dig Dis Sci 60:2373–2383
133. Anti-TRPC6 Antibody | KO Validated | Alomone Labs. URL: https://www.alomone.com/p/anti-trpc6/ACC-017?gclid=EAIaIQobChMIrd7ZwK7T8AIVhpeyCh11pQKeEAAYASAAEgJXUvD_BwE

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen zur Aktivierung der rezeptor- und speichergesteuerten Calciumkanäle; Aktivierung der G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK) führt über die Phospholipase C (PLC) zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 bindet an den IP_3-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, was zur Freisetzung von gespeichertem Calcium (Ca^{2+}) und zur Erschöpfung der Calciumspeicher führt. Die leeren Speicher bedingen dann den Einstrom von Calcium über die speichergesteuerten Kanäle (SOC), während DAG den Einstrom über rezeptorgesteuerte Calcium-Kanäle (ROC) auf direktem Wege vermittelt; eigene Darstellung in Anlehnung an [94]. 10
Abbildung 2: Darstellung des Stammbaums der Säugetier-TRP-Kanäle, 6 Subfamilien, 28 Mitglieder; eigene Darstellung in Anlehnung an [35] 12
Abbildung 3: Membrantopologie der transient-receptor-potential (TRP)-Kanäle: rechts im Bild: Darstellung der sechs membrandurchspannenden Helices (Grundstruktur); links im Bild: Tetramere Struktur aus vier Grundstrukturen am Beispiel des TRPC6/TRPC3-Heteromer; eigene Darstellung in Anlehnung an [31]. 13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des TRPC6-Kanals: Transmembranöse 6-helikale Schicht samt Glykosylierungsstellen und Porenschleife sowie die N- als auch C-terminalen zytosolischen Enden samt der für TRPC6 charakteristischen Domänen, eigene Darstellung in Anlehnung an [31]. 16
Abbildung 5: Schematische Abbildung der Ultrastruktur der leberständigen Zellen, eigene Darstellung in Anlehnung an [98]. 25
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bindestelle des Primärantikörpers am Protein, eigene Darstellung in Anlehnung an [123]. 36
Abbildung 7: Entnahmestellen auf der Leber, Ansicht von vorne-oben 41
Abbildung 8: Entnahmestellen auf der Leber, Ansicht von hinten-unten 41
Abbildung 9: Entnahmestelle aus den Gallenblasen 42
Abbildung 10, A+B: Schematische Darstellung der Prinzipien der Immunhistochemie; eigene Darstellung in Anlehnung an [78] 49
Abbildung 11: Altersverteilung der Körperspender 56
Abbildung 12, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahme von Negativkontrollen, 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm: **Negativkontrollen** 58
Abbildung 13, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*), 20fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Peptidkontrolle** 59
Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 01; *Lobus hepatis dexter* (*ventral,* 1), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm: **Übersichtsfärbung Lebergewebe** 60
Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Schnittes aus dem *Lobus quadratus*, Spender 05, HE-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm: **Exemplarische Darstellung eines Schnittes des ausgeschlossenen Spenders** 63
Abbildung 16, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe Spender 06, *Lobus hepatis dexter*, (*ventral*), HE-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm: **Gleicher Schnitt, Aufnahmen mit unterschiedlichen Abständen zur Organaußenseite** 63
Abbildung 17, A-F: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe Spender 10; *Lobus caudatus*, 20fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Variation der Primärantikörperverdünnung und DAB-Einwirkzeit - Leber** 65
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 10*, Lobus hepatis sinister* (*kaudal,* 1), Primärantikörperverdünnung 1:100, 7 ½ min DAB-Einwirkzeit; 60fache Vergrößerung, Maßstab 50 µm: **Nahaufnahme Leberparenchym** 67
Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*,1), Primärantikörperkonzentration 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm**: TRPC6-Expression im Leberläppchen** 67
Abbildung 20, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe Spender 06, *Lobus caudatus*, Primärantikörperverdünnung 1:100; 4 min**: Bindegewebsstraße Leber** 69

Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe Spender 12, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*, 1), Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 20fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Glisson-Kapsel** 70
Abbildung 22, A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe des gleichen Spenders (01); vier verschiedene Entnahmestellen; Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 40fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins in Entnahmen des gleichen Spenders, Fokus Hepatozyten** 72
Abbildung 23, A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe verschiedener Körperspender, gleiche Entnahmestelle *Lobus caudatus*, Alterspigment mit Pfeilen markiert, Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 40fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins zwischen Entnahmen verschiedener Spender, Fokus Hepatozyten** 74
Abbildung 24: Lichtmikroskopische Aufnahme des Lebergewebes Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*, 1), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm: **Akute Stauungsleber** 76
Abbildung 25, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 10, *Lobus hepatis sinister* (*kaudal*, 1), 20fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Nahaufnahme Stauungsstraßen** 77
Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahme des Lebergewebes, Spender 07, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*, 1), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm**: HE-Färbung - Steatose** 79
Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 07, Lobus hepatis dexter (ventral, 1), Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab 50 µm: **Nahaufnahme Steatose** 79
Abbildung 28: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 11, *Lobus quadratus* (2), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm**: HE-Färbung - Lebermetastase** 81
Abbildung 29, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 11, *Lobus quadratus* (2) Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab 50 µm: **Nahaufnahmen Metastasen-Leber** 82
Abbildung 30, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 11, *Lobus quadratus* (2), 20fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Tumorleber – Negativkontrolle** 83
Abbildung 31: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 02, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Pfeilköpfe = Gallengangsproliferate, Pfeile = Entzündungszell-Infiltrate, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm: **HE-Färbung - Leberzirrhose** 85
Abbildung 32: Vergleich der Färbeintensität zwischen dem Spender 02 (links) mit erhöhter TRPC6-Expression bei zirrhotischer Leber und dem Spender 04 (rechts) mit moderater Färbeintensität (dem Durchschnitt entsprechend) bei identischen Antikörperkonzentrationen und Einwirkzeiten in der Immunhistochemie, Primärantikörperverdünnung 1:100, DAB-Einwirkzeit 4 min 85
Abbildung 33: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 02, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), Primärantikörperverdünnung 1: 100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab 50 µm: **Nahaufnahme der Hepatozyten in zirrhotischer Leber** 86
Abbildung 34, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe, Spender 02, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm: **Leberzirrhose – Negativkontrolle** . 86
Abbildung 35: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 08, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm: **HE-Färbung – aktive Hepatitis** 88
Abbildung 36: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 08, *Lobus caudatus* (2), Primärantikörperverdünnung 1:100, 4 min DAB-Einwirkzeit, 60fache Vergrößerung, Maßstab 50 µm: **Nahaufnahme Hepatozyten bei aktiver Hepatitis** 89
Abbildung 37, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe, Spender 08, *Lobus hepatis dexter* (*ventral*), 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm: **Aktive Hepatitis - Nahaufnahme** .. 89
Abbildung 38: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 10, *Fundus vesicae biliaris,* Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm: **Übersichtsfärbung - Gallenblassengewebe** 91

Abbildung 39; A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengewebe, Spender 10, *Fundus vesicae biliaris,* 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm: **Variation der Primärantikörperverdünnung - Gallenblasengewebe** 92
Abbildung 40: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 01, *Collum vesicae biliaris,* TRPC6-Primärantikörperverdünnung 1:100, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm**: Übersichtsdarstellung des TRPC6-Expressionsmusters in den Wandschichten der Gallenblase** 93
Abbildung 41; A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengewebe, Spender 07, Primärantikörperverdünnung 1:100, 60fache Vergrößerung, Maßstab 50 µm: **Nahaufnahme Cholangiozyten (hochprismatisch) - Gallenblasengewebe** 95
Abbildung 42, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 04, *Corpus vesicae biliaris*, Primärantikörperverdünnung 1:100, 40fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm: **Nahaufnahme der glatten Muskulatur der Gallenblase** 97
Abbildung 43, A-C: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe, Spender 06, *Collum vesicae biliaris*, Primärantikörperverdünnung 1:100: **Ausschnitte aus der Tunica serosa/adventitia** 99
Abbildung 44, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengewebe des Spenders 06, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm: **Vergleich zwischen Corpus und Collum** 101
Abbildung 45, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gallenblasengebe des Spenders 10, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, 200 µm: **Vergleich zwischen Corpus und Fundus** 101
Abbildung 46, A-F: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gallenblasengewebe verschiedener Spender, jeweils aus dem *Corpus vesicae biliaris* entnommen, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm: **Vergleich der Expression des TRPC6-Proteins in der Tunica muscularis zwischen Entnahmen verschiedener Spender – Gallenblase** 103
Abbildung 47: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallengangs, Spender 01, *Ductus choledochus*, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm: **Übersichtsfärbung extrahepatischer Gallenweg** 105
Abbildung 48: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallenwegs, Spender 10, Primärantikörperverdünnung 1:100, 4fache Vergrößerung, Maßstab 400 µm**: Übersichtsdarstellung des Ductus choledochus** 106
Abbildung 49: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallenweges, Spender 01, Primärantikörperverdünnung 1:100, 60fache Vergrößerung, Maßstab 50 µm: **Nahaufnahme Cholangiozyten - extrahepatischer Gallenweg** 107
Abbildung 50, A+B: Lichtmikroskopische Aufnahme eines extrahepatischen Gallengangs, Spender 08, Primärantikörperverdünnung 1:100: **Nahaufnahme Bindegewebe – extrahepatische Gallenweg** 109
Abbildung 51, A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen extrahepatischer Gallenwege, Primärantikörperverdünnung 1:100, 10fache Vergrößerung, Maßstab 200 µm**: Vergleich der extrahepatischen Gallengänge zwischen verschiedenen Spendern** 110

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktivierungssubstanzen des TRPC6-Kanals....18
Tabelle 2: Körperspender....32
Tabelle 3: Geräteliste....33
Tabelle 4: Chemikalien, Puffer und Lösungen....34
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien....35
Tabelle 6: Primärantikörper....36
Tabelle 7: Sekundärantikörper....37
Tabelle 8: Entnahmestellen auf der Leber....41
Tabelle 9: Entnahmestellen aus den Gallenblasen....42
Tabelle 10: Aufsteigende Alkoholreihe und die jeweiligen Verweildauern....44
Tabelle 11: Immunhistochemisch-gefärbte Proben – Leberschnitte....61
Tabelle 12 : Immunhistochemisch gefärbte Proben - Gallenblasenschnitte....90
Tabelle 13: Immunhistochemisch gefärbte Proben - extrahepatische Gallenwege....104

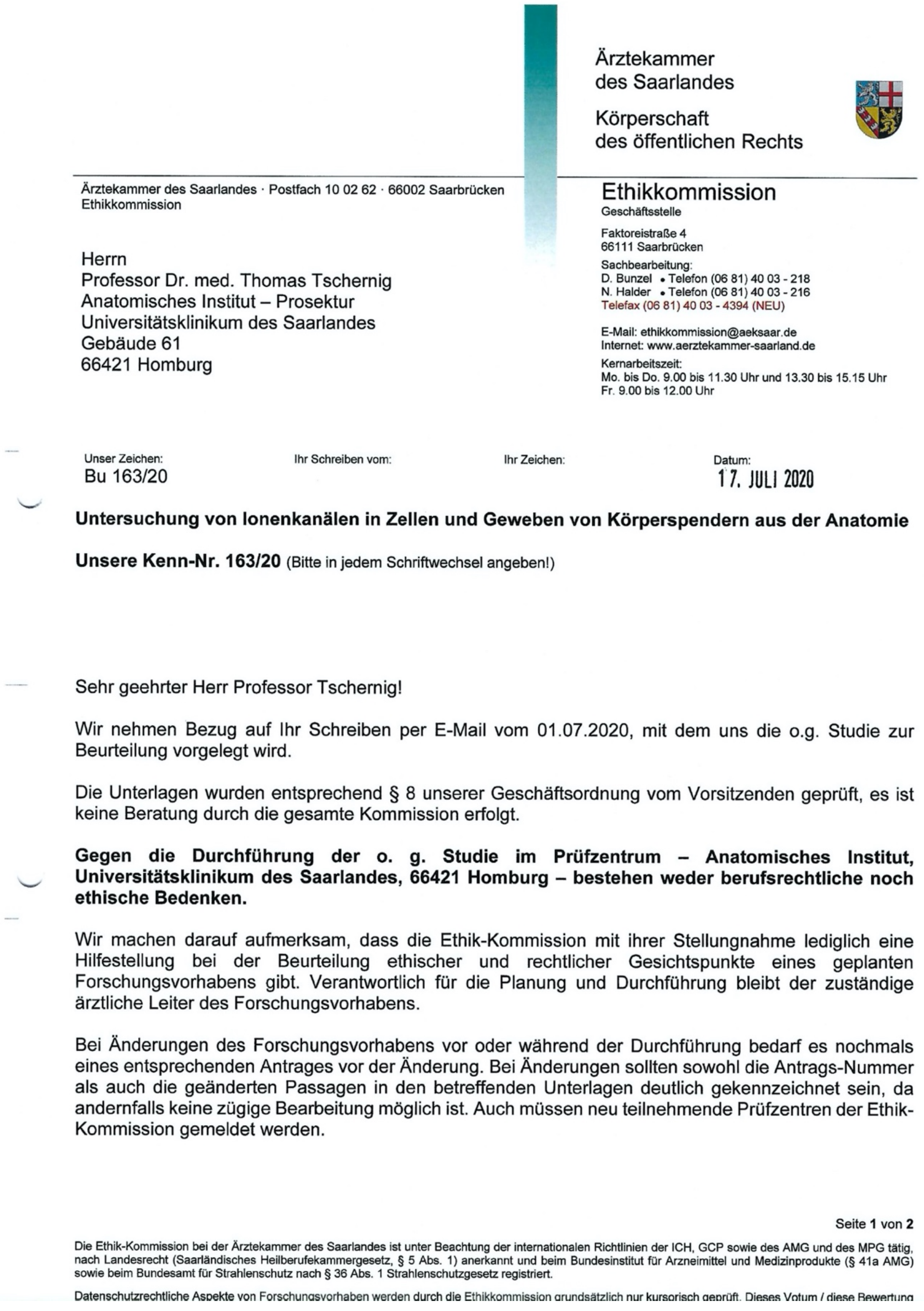
9 Publikationen

Colya N. Englisch, Daniel Röhricht, **Mariesa Walz**, Kerstin Junker, Anja Beckmann, Carola Meier, Friedrich Paulsen, Martin Jung, Thomas Tschernig (2022). *TRPC6 is found in distinct compartments of the human kidney*. Int. J. Transl. Med 2: 156-163.

Mariesa Walz, Jan Federspiel, Thomas Tschernig. *TRPC6 in the epithelia of the human hepatobiliary system.* in Vorbereitung

10 Anhang

Ethikvotum



Ärztekammer
des Saarlandes

Körperschaft
des öffentlichen Rechts

Ärztekammer des Saarlandes · Postfach 10 02 62 · 66002 Saarbrücken
Ethikkommission

Herrn
Professor Dr. med. Thomas Tschernig
Anatomisches Institut – Prosektur
Universitätsklinikum des Saarlandes
Gebäude 61
66421 Homburg

Ethikkommission
Geschäftsstelle

Faktoreistraße 4
66111 Saarbrücken
Sachbearbeitung:
D. Bunzel • Telefon (06 81) 40 03 - 218
N. Halder • Telefon (06 81) 40 03 - 216
Telefax (06 81) 40 03 - 4394 (NEU)

E-Mail: ethikkommission@aeksaar.de
Internet: www.aerztekammer-saarland.de
Kernarbeitszeit:
Mo. bis Do. 9.00 bis 11.30 Uhr und 13.30 bis 15.15 Uhr
Fr. 9.00 bis 12.00 Uhr

Unser Zeichen:	Ihr Schreiben vom:	Ihr Zeichen:	Datum:
Bu 163/20			17. JULI 2020

Untersuchung von Ionenkanälen in Zellen und Geweben von Körperspendern aus der Anatomie

Unsere Kenn-Nr. 163/20 (Bitte in jedem Schriftwechsel angeben!)

Sehr geehrter Herr Professor Tschernig!

Wir nehmen Bezug auf Ihr Schreiben per E-Mail vom 01.07.2020, mit dem uns die o.g. Studie zur Beurteilung vorgelegt wird.

Die Unterlagen wurden entsprechend § 8 unserer Geschäftsordnung vom Vorsitzenden geprüft, es ist keine Beratung durch die gesamte Kommission erfolgt.

Gegen die Durchführung der o. g. Studie im Prüfzentrum – Anatomisches Institut, Universitätsklinikum des Saarlandes, 66421 Homburg – bestehen weder berufsrechtliche noch ethische Bedenken.

Wir machen darauf aufmerksam, dass die Ethik-Kommission mit ihrer Stellungnahme lediglich eine Hilfestellung bei der Beurteilung ethischer und rechtlicher Gesichtspunkte eines geplanten Forschungsvorhabens gibt. Verantwortlich für die Planung und Durchführung bleibt der zuständige ärztliche Leiter des Forschungsvorhabens.

Bei Änderungen des Forschungsvorhabens vor oder während der Durchführung bedarf es nochmals eines entsprechenden Antrages vor der Änderung. Bei Änderungen sollten sowohl die Antrags-Nummer als auch die geänderten Passagen in den betreffenden Unterlagen deutlich gekennzeichnet sein, da andernfalls keine zügige Bearbeitung möglich ist. Auch müssen neu teilnehmende Prüfzentren der Ethik-Kommission gemeldet werden.

Seite **1** von **2**

Die Ethik-Kommission bei der Ärztekammer des Saarlandes ist unter Beachtung der internationalen Richtlinien der ICH, GCP sowie des AMG und des MPG tätig, nach Landesrecht (Saarländisches Heilberufekammergesetz, § 5 Abs. 1) anerkannt und beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (§ 41a AMG) sowie beim Bundesamt für Strahlenschutz nach § 36 Abs. 1 Strahlenschutzgesetz registriert.

Datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben werden durch die Ethikkommission grundsätzlich nur kursorisch geprüft. Dieses Votum / diese Bewertung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Tschernig, für die hervorragende Betreuung sowie die freundliche Hilfe und Unterstützung über die gesamte Zeit des Projektes hinweg.

Davide Servello möchte ich für jegliche Unterstützung in der Startphase meiner Arbeit danken. Dies gilt auch für Jan Abdinghoff, der immer mit Freude Tipps und Tricks bei der Laborarbeit an mich weitergab.
Dr. Jan Federspiel danke ich für die sachkundige, erfahrene Unterstützung bei der Entnahme und Auswertung der Proben.
Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Prosektur des Anatomischen Institutes des Universitätsklinikums des Saarlandes bedanken, die immer hilfsbereit und für jegliche Fragen offen waren. Hierbei vor allem bei Frau Irina Scheck, die sich zu jeder Zeit um uns Doktoranden und alle Belange des Labors gekümmert hat.
Auch bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Meier möchte ich mich für die materielle Aushilfe und Unterstützung über die gesamte Zeit der Laborarbeit bedanken.

Dr. Sandra Hoedtke möchte ich für das mühevolle Korrekturlesen danken!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Udo und Irene, für die bedingungslose Unterstützung und das Vertrauen in mich. Ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen!
Herzlich danken möchte ich auch meinen Großeltern, Lydia und Stefan, denen ich diese Arbeit widme.

Lebenslauf

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