

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

TRPC6-Kanäle in der humanen Cochlea

-

Anatomische Präparationstechnik und Immunhistochemische Untersuchung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Jakob Simon Steinhäuser

geb. am: 11.06.1990 in Leipzig

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2. ZUSAMMENFASSUNG.....	3
3. EINLEITUNG UND GRUNDLAGEN.....	7
3.1 EINLEITUNG	7
3.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE FAMILIE DER TRP-KANÄLE	7
3.3 ALLGEMEINE MOLEKULARE STRUKTUR DER TRP-KANÄLE.....	9
3.4 DIE FAMILIE DER TRPC-KANÄLE	12
3.5 STRUKTUR, FUNKTION UND EXPRESSION DER TRPC6-KANÄLE	13
3.5.1 <i>Molekulare Struktur von TRPC6-Kanälen.....</i>	13
3.5.2 <i>Signaltransduktion durch TRPC6-Kanäle</i>	15
3.5.3 <i>Expressionsorte und pathophysiologische Einflüsse von TRPC6-Kanälen</i>	17
3.6 ÜBERBLICK ÜBER DIE ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER HUMANEN COCHLEA	18
3.7 RELEVANZ VON TRPC6-KANÄLEN FÜR DIE COCHLEÄRE FUNKTION	21
4. FRAGESTELLUNGEN DIESER FORSCHUNGSARBEIT	23
5. MATERIALIEN UND METHODEN	24
5.1 PROBENGEWINNUNG	24
5.1.1 <i>Körperspende am Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes.....</i>	24
5.1.2 <i>Probenkollektiv.....</i>	24
5.1.3 <i>Schematischer Arbeitsablauf.....</i>	24
5.1.4 <i>Thanatopraxie</i>	25
5.1.5 <i>Gegenüberstellung NEP & Formalinfixierung</i>	26
5.2 TABELLARISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE KÖRPERSPENDER.....	27
5.3 ENTWICKLUNG EINER SICHEREN ENTNAHMETECHNIK.....	28
5.3.1 <i>Vorbereitende Untersuchungen.....</i>	28
5.3.2 <i>Entnahme der Proben.....</i>	30
5.4 DECALZIFIZIERUNG	36
5.4.1 <i>Theoretische Grundlagen.....</i>	36
5.4.2 <i>Gegenüberstellung gängiger Reagenzien der Decalzifizierung</i>	37
5.4.3 <i>Wahl der Decalzifizierungsmethode</i>	38
5.4.3 <i>Durchgeführter Decalzifizierungsprozess.....</i>	39
5.5 ERSTELLEN DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE.....	43

5.6 ERSTELLEN DER FÄRBUNGEN	45
5.6.1 Theoretische Grundlagen der indirekten immunhistochemischen Färbung	45
5.6.2 Methodik der immunhistochemischen Färbung auf TRPC6-Kanäle	47
5.6.3 Positivkontrolle mittels Pan-Cytokeratin Antikörper	48
5.6.4 Verwendeter Sekundärantikörper und Chromogene	49
5.6.5 Spezifikationsnachweis per Peptidkontrolle.....	52
5.6.6 Theoretische Grundlagen der HE-Färbung.....	53
5.6.7 Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbung von TRPC6-Kanälen.....	54
5.6.8 Etablierung des Färbeprotokolls.....	54
5.6.9 Durchführung der immunhistochemischen Färbung Tag 1	55
5.6.10 Durchführung der immunhistochemischen Färbung Tag 2	59
5.6.11 Tabellarische Übersicht über die Schritte der immunhistochemischen Färbung	61
5.7 ETHIKVOTUM	63
5.8 VERWENDETE GERÄTE UND CHEMIKALIEN.....	64
5.8.1 Verwendete Geräte	64
5.8.2 Verwendete Chemikalien und Antikörper	65
6. ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG.....	66
6.1 EINFÜHRUNG	66
6.2 UMFANG DER AUSGEWERTETEN PROBEN.....	66
6.3 PRINZIP DER AUSWERTUNG	68
6.4 ERGEBNISPRÄSENTATION DER QUANTITATIVEN UND QUALITATIVEN AUSWERTUNG	69
6.4.1 Histologische Ergebnisse des Nachweises einzelner Leitstrukturen	69
6.4.2 Statistische Ergebnisse des Nachweises einzelner Leitstrukturen.....	74
6.5 DARSTELLUNG DER FÄRBEERGEBNISSE IN DEN MIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN	76
6.5.1 Färbereferenz anhand Probefärbungen an der humanen Niere	77
6.5.2 Färbeverhalten von Corti-Organ und Tektorial-Membran	79
6.5.3 Färbeverhalten der Basilar-Membran und Reissner-Membran.....	88
6.5.4 Färbeverhalten des Nervus cochlearis und Ganglion spirale.....	94
6.5.5 Färbeverhalten der Stria vascularis.....	114
6.6 ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN BEWERTUNG EINZELNER LEITSTRUKTUREN	118
6.6.1 Statistische Präsentation der semiquantitativen Auswertung	118
6.6.2 Statistische Ergebnisse der Eigenauswertung.....	119
6.6.3 Statistische Ergebnisse der Fremdauswertung	120
6.8 ERGEBNISSE DER SPEZIFITÄTSKONTROLLE PER PEPTIDINKUBATION	122

6.9 KRITISCHE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE UND METHODEN	123
6.9.1 <i>Postmortales Intervall, Autolyse und Probenkollektiv</i>	123
6.9.2 <i>Auswirkungen der Fixierung</i>	125
6.9.3 <i>Auswirkungen der Decalzifizierung</i>	127
6.10 AUSWERTUNG HINSICHTLICH DER FRAGESTELLUNGEN	128
6.11 EINORDNUNG DER ERGEBNISSE UND AUSBLICK IN DIE ZUKUNFT	130
7. QUELLENVERZEICHNIS.....	132
8. TABELLEN/DIAGRAMM-VERZEICHNIS.....	143
8.1 TABELLENVERZEICHNIS.....	143
8.2 DIAGRAMMVERZEICHNIS	143
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	144
10. DANKSAGUNG.....	149
11. PUBLIKATIONEN.....	150
12. LEBENSLAUF.....	151

To Colm O'Doherty

-

Clinacaput

1. Abkürzungsverzeichnis

AK Antikörper
A1-4 Ankyrin Domäne 1-4
BSA Bovine Serum Albumin
bzw. beziehungsweise
ca. circa
CaM Calmodulin
cDNA complementary Desoxyribonucleicacid
CIRBIP Ca^{2+} /Calmodulin-; IP_3 -Rezeptor-; Phophoinositol- Bindestelle
cm Zentimeter
cm³ Kubikzentimeter
CT Computertomographie
DAG Diacylglycerin
dB Dezibel
DNA Desoxyribonucleicacid
EDTA Ethyldiamintetraessigsäure
ER Endoplasmatisches Retikulum
EZR Extrazellulärraum
FA fast-adapting
Fab antigen-binding fragment
Fc constant fragment
FSGS fokal-segmentale Glomerulosklerose
G-Aktin globulares Aktin
GPCR G-Protein coupled receptor
HCC Hepatozelluläres Karzinom
HE Hämatoxylin-Eosin
HIER Heat-induced-epitope-retrieval
histolog. histologischer
hTRPC6 human TRPC6
ICD intracellular cytoplasmic domain
IgG Immunglobulin G
IHC Immunhistochemie
IP3 Inositol-1,4,5-triphosphat
IP3-R Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IPH Idiopathische pulmonale Hypertonie
IZR Intrazellulärraum
JNR Journalnummer
KP Kontrollpeptid
l Liter
MET mechano-electrical-transducer
min Minute
mm Millimeter
mmol Millimol
mRNA messenger-RNA
NaCl Natriumchlorid
NEP Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol
nm Nanometer
PBS phosphate-buffered-saline
PMI Postmortales Intervall
PI Phosphatidylinositol

PIP Phosphatidylinositolphosphat
PIP2 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC Proteinkinase C
PLC Phospholipase C
PM Plasmamembran
PTFE Polytetrafluorethylen
RBD Rapid-Bone-Decalcifier
ROCE Rezeptor-Operierter-Calcium-Einstrom
ROC Rezeptor-Operierter-Kanal
SA slow-adapting
s.g. so genannte
SOCE Speicher-Operierter-Calcium-Einstrom
SOC Speicher-Operierter-Kanal
SOP standard operating procedure
STIM stromal interaction molecule
TMD transmembrane domain
TRP Transient Receptor Potential
TRPC TRP-Canonical/Classical
TRPC 1 TRP-Canonical/Classical Typ 1
TRPC 2 TRP-Canonical/Classical Typ 2
TRPC 3 TRP-Canonical/Classical Typ 3
TRPC 4 TRP-Canonical/Classical Typ 4
TRPC 5 TRP-Canonical/Classical Typ 5
TRPC 6 TRP-Canonical/Classical Typ 6
TRPC 7 TRP-Canonical/Classical Typ 7
TRPM TRP-Melastin
TRPV TRP-Vanilloid
µm Micrometer
ZNS Zentrales Nervensystem

2. Zusammenfassung

Die Beteiligung von TRPC6-Kanälen (Transient Receptor Potential Classical) am Hörvorgang ist Gegenstand aktueller Forschung und bisher nicht hinreichend geklärt. In ihrer grundlegenden Funktion als nicht-selektive Kationenkanäle, spielen sie in physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen diverser Organe wie beispielsweise an Nieren, Herz und Blutgefäßen eine Rolle. Durch ihre Permeabilität für Calcium-Ionen vermitteln sie dabei intrazelluläre Signalkaskaden.

Nach Kenntnisstand des Autors ist ein immunhistochemischer Nachweis dieser Kanäle am menschlichen Innenohr bisher nicht erfolgt. Ziel dieser Dissertationsarbeit war ein spezifischer, immunhistochemischer Nachweis von TRPC6-Kanälen in der menschlichen Cochlea. Des Weiteren wurden die Leitstrukturen hinsichtlich ihres Färbeverhaltens verglichen, was Rückschlüsse über die Expression von TRPC6-Kanälen in den verschiedenen Geweben zuließ. Darüber hinaus wurde eine anatomische Präparationstechnik entwickelt, mit der auch in zukünftigen Forschungsprojekten eine sichere Entnahme der Cochlea aus dem menschlichen Felsenbein möglich ist.

Durch die Lage der Cochlea in der pars petrosa ossis temporale erfolgte vor der histologischen Aufarbeitung eine Decalzifizierung des Knochengewebes mittels EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraessigsäure) um histologische Schnitte erstellen zu können und die Zielstrukturen zugänglich zu machen.

Insgesamt wurden 28 Proben aus 14 Körperspendern des anatomischen Institutes der Universität des Saarlandes entnommen. Die Körper wurden im Vorfeld mit Formalin- bzw. NEP-Lösung fixiert. Zur Planung der Entnahme erfolgte eine computertomographische Untersuchung an einem humanen Schädel. Die erfolgreiche Entnahme wurde anschließend anhand der ersten gewonnenen Proben, ebenfalls per Computertomographie, kontrolliert.

Anschließend konnten die Proben dem Decalzifizierungsprozess zugeführt werden. Nach einer mittleren Decalzifizierungszeit von 201 Tagen, konnten aus 15 dieser Proben verwertbare histologische Schnitte erstellt werden.

Per indirekter, immunhistochemischer Färbung erfolgte anschließend die Untersuchung der Proben hinsichtlich ihrer Expression von TRPC6-Kanälen. Die Spezifität der Färbungen wurde durch eine Peptidkontrolle gesichert. Dabei wurde der Primärantikörper vor Verwendung mit einem TRPC-6-Blocking-Peptid inkubiert.

In der Auswertung der Ergebnisse konnte ein Nachweis von TRCP-6 Kanälen an diversen cochleären Leitstrukturen erbracht werden. Insbesondere das Corti-Organ mit den inneren und äußeren Haarzellen, sowie der Nervus cochlearis, zeigten deutlich positive Färbeergebnisse. Die Peptidkontrolle zeigte ebenfalls positive, jedoch deutlich abgeschwächte Färbeergebnisse. Es ist damit von einer Spezifität der verwendeten Methode hinsichtlich von TRPC6-Kanälen auszugehen.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit das Vorhandensein von TRPC6-Kanälen in verschiedenen Strukturen der humanen Cochlea nachgewiesen, eine sichere Entnahmetechnik der Cochlea aus dem Os temporale und ein zuverlässiger, gewebeschonender Decalzifizierungsprozess etabliert werden.

Abstract:

The role of TRPC6-channels ((**T**ransient **R**eceptor **P**otential **C**lassical) in the hearing process is the subject of current research and has not yet been fully clarified. In their basic function as non-selective cation channels, they play a role in physiological and pathophysiological processes in various organs, such as Kidneys, Heart and Blood Vessels. Due to their permeability for calcium ions, they mediate intracellular signaling cascades.

To the best of the author's knowledge, no immunohistochemical evidence of these channels in the human inner ear has yet been obtained. The aim of this dissertation was a specific, immunohistochemical detection of TRPC6-channels in the human cochlea and their key structures. In addition, an anatomical preparation technique was developed that will also make it possible to safely remove the entire cochlea from the human petrous bone in future research projects.

Due to the location of the cochlea in the pars petrosa of the temporal bone, the bone tissue was needed to be decalcified using an EDTA (Ethylenediaminetetraacid) solution to make the target structures accessible, before the histological processing and immunohistochemical staining.

A total of 28 samples were taken from 14 body donors from the Anatomical Institute of the Saarland University. The bodies underwent fixation beforehand under the use of formalin or NEP solution. To plan the removal of the cochlea from the skull, a computer tomographic scan was carried out. The successful removal was then checked on the basis of the first samples obtained, also by computer tomography.

The samples could then be fed into the decalcification process. After a mean decalcification time of 201 days, usable histological sections could be created from 15 of these samples.

The samples were then examined for their expression of TRPC6 channels using indirect immunohistochemical staining. The specificity of the staining was secured by a peptide control by incubating the primary antibody with a TRPC-6-blocking-peptide before use.

In the evaluation of the results, evidence of TRCP-6 channels on various cochlear key structures could be shown. In particular, the organ of Corti with the inner and outer hair cells, as well as the cochlear nerve, showed strong positive staining results.

The peptide control also showed positive, but weaker staining results. It can therefore be assumed that the method used is specific to TRPC6-channels.

Overall, the detection of TRPC6 channels in the structures of the human cochlea has been successful and a safe extraction technique, as well as a reliable and gentle decalcification process has been developed.

3. Einleitung und Grundlagen

3.1 Einleitung

Die Koordination der Signale zwischen den Körperzellen höherer Lebewesen spielt eine zentrale Rolle für die Funktionen des Gesamtorganismus und dementsprechend auch für Verständnis und Erforschung selbiger. Als Vermittler dieser Signale dienen zumeist sogenannte "second messenger", welche sich unter anderem als Ionen, wie beispielsweise Calcium, darstellen können. Je nachdem welche Zellen miteinander kommunizieren, welche second messenger genutzt werden oder welcher Rezeptor das Signal empfängt, werden so verschiedene Körperfunktionen auf zellulärer Ebene realisiert. Dabei reicht die Vielfalt der ausgelösten Reaktion von der Weiterleitung eines elektrischen oder mechanischen Reizes, über Reaktionen auf der Ebene von ganzen Zellverbänden, bis hin zu existenziellen Zellreaktionen wie Proliferation oder Apoptose. Da jede Krankheit, die uns in der Medizin begegnet, auch ein pathophysiologisches Korrelat auf zellulärer Ebene hat, ist die Erforschung eben dieser Vorgänge von großer Bedeutung für das Verständnis und folgend auch für die Therapie beziehungsweise Therapieentwicklung.

3.2 Übersicht über die Familie der TRP-Kanäle

Die Entdeckung und Namensgebung der Transient-Receptor-Potential-Kanäle (TRP) geht zurück auf die Forschung von Cossens und Mannig im Jahre 1969. Sie untersuchten die Fruchtfliegengattung *Drosophila melanogaster* und stellten dabei eine Mutation in den Photorezeptoren selbiger fest, die zur lediglich vorübergehenden (engl. transient) Erregung des Rezeptors auf einen Lichtreiz führte, während der Wildtyp-Rezeptor für die gesamte Dauer des Lichtreizes einen kontinuierlichen Stromfluss aufwies (Cossens & Manning, 1969). Im weiteren Verlauf konnte von Montell und Rubin erstmalig das zu diesem Phänomen gehörige Gen der TRP Familie identifiziert werden (Montell & Rubin, 1989).

Über die Jahre wurden zahlreiche weitere verwandte Ionenkanäle entdeckt, die sich anhand ihrer Struktur und Funktion in sieben Familien einteilen lassen. Man spricht wegen dieser großen Vielfalt der TRP-Kanäle auch von einer „Superfamilie“. Die Familien der TRPC-Kanäle, wobei das „C“ hierbei für entweder „classical“ oder „canonical“ steht, soll im näheren Fokus dieser Arbeit stehen.

Einige Beispiele für Funktionen der anderen Familien sind etwa die TRPM („M“ für Melastatin) Familie, die unter anderem beim Kälteempfinden bei Geschmacksstoffen wie Menthol zum Tragen kommt (hierbei genauer TRPM8), oder auch die TRPV Familie („V“ für Vanilloid“), welche als Nozirezeptoren für das Verständnis der Kopplung von Hitzeempfinden und Schmerz (hierbei insbesondere TRPV1) nach Stimulation durch beispielsweise Capsaicin, unerlässlich sind.

Die Funktionen der verschiedenen TRP-Kanalfamilien und ihrer Vertreter wurden 2003 von Clapham zusammengefasst (Clapham, 2003).

3.3 Allgemeine molekulare Struktur der TRP-Kanäle

Wenngleich die Funktionen und genetischen Expressionslokalisierungen der TRPC-Familie sehr vielfältig sind, so ist die molekulare Struktur der Vertreter dieser Superfamilie recht einheitlich. Ein Rezeptor besteht dabei stets aus 6 Transmembrandomänen in der Plasmamembran einer Körperzelle. Zwischen den Domänen 5 und 6 befindet sich die so genannte Porenregion. Es wird angenommen, dass durch die Zusammenlagerung von jeweils vier TRP-Kanälen (Tetramerisierung) der eigentliche Ionenkanal aus den vier Porenregionen der Einzelkanäle geformt wird. Dies ermöglicht die grundlegende, verbindende Eigenschaft der TRP Kanäle: Die Permeabilität für Kationen, wie zum Beispiel Calcium Ionen.

Dabei kommt es je nach Rezeptorfamilie und Vertreter sowohl zur Ausbildung von Homotetrameren (aus vier gleichen Untereinheiten), als auch Heterotetrameren (aus verschiedenen Untereinheiten). Die Carboxyl- und Amino-Termini der Kanäle liegen dabei jeweils auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran. Eine Übersicht über diese Strukturmerkmale bietet die Arbeit von Venkatachalam und Montell aus dem Jahre 2007 (Venkatachalam & Montell, 2007).

Nachstehende Abbildungen sollen die zuvor geschilderten Sachverhalte noch einmal veranschaulichen.

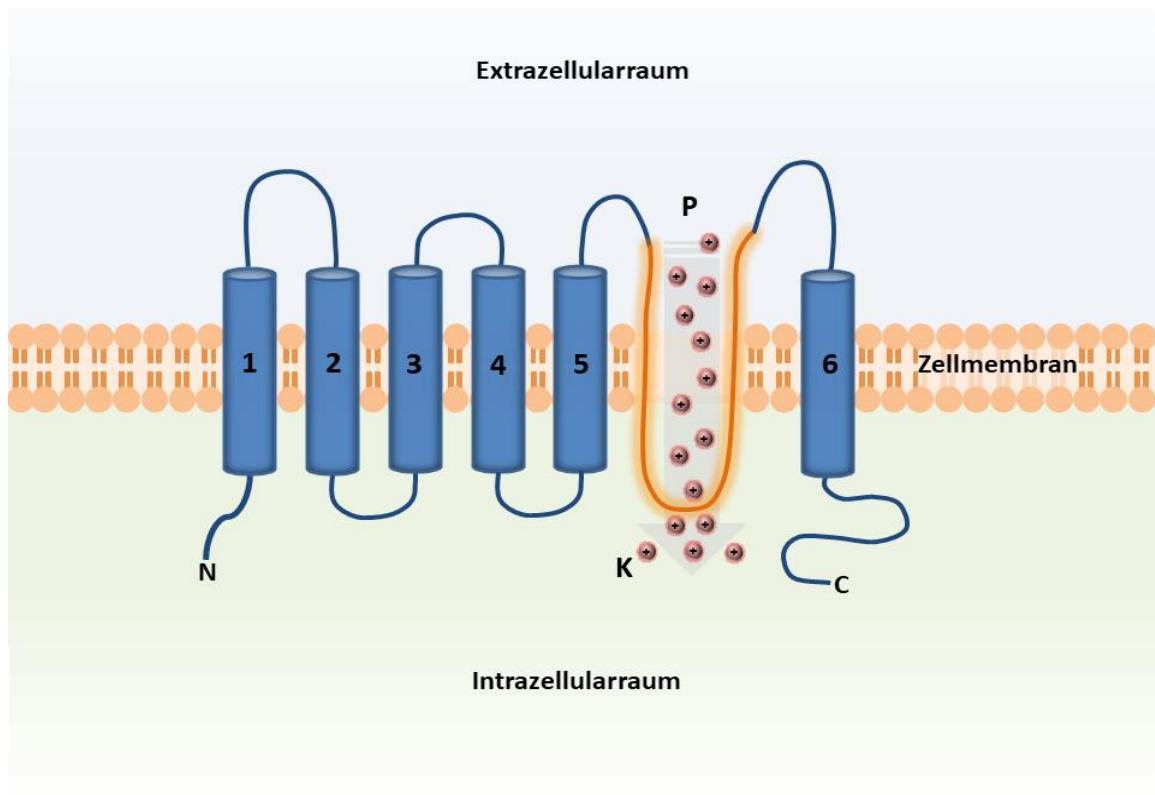


Abbildung 1 - Schematischer Aufbau eines TRP Kanal Monomers

frei nach (Woudenberg-Vrenken et al., 2009)

Dargestellte Strukturen:

1-6= Transmembrandomänen

N= Amino-Terminus

C= Carboxy-Terminus

P= Porenregion

K= Kation

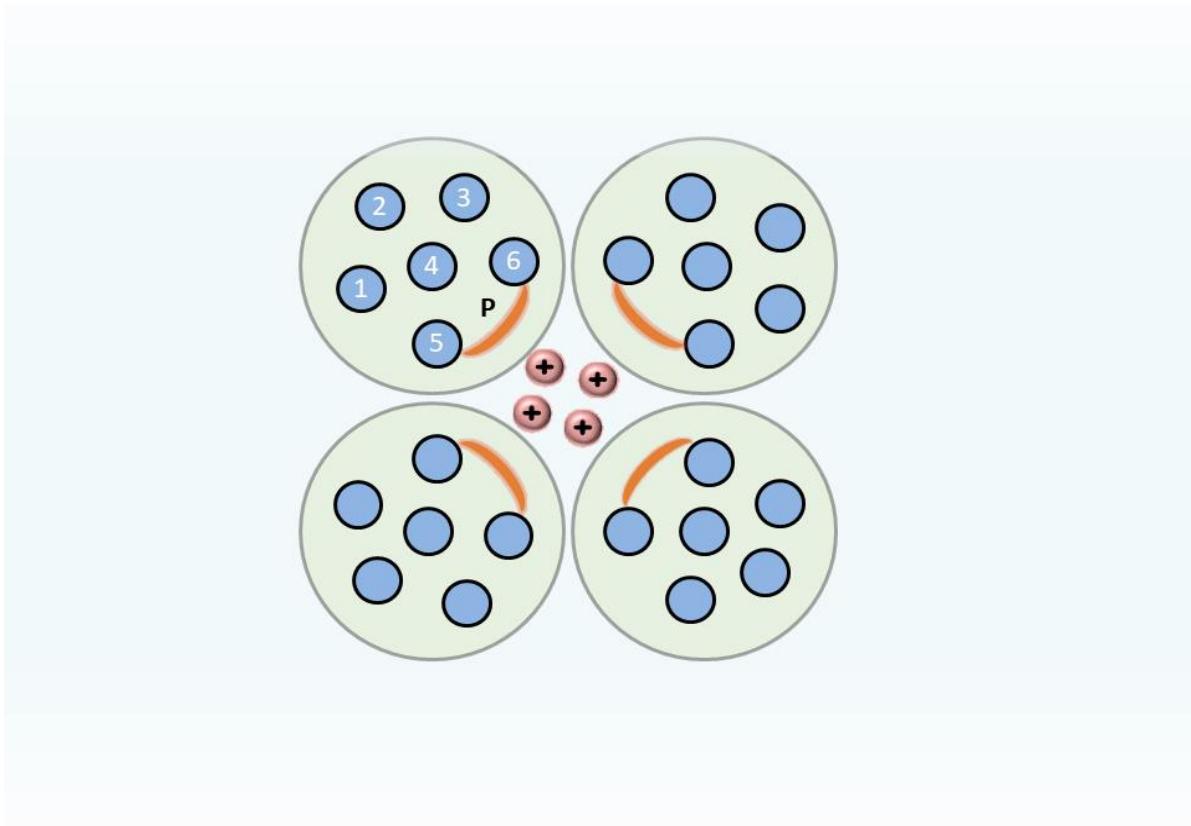


Abbildung 2 - Schematischer Aufbau eines TRP Kanal Tetramers

frei nach (Woudenberg-Vrenken et al., 2009)

Dargestellte Strukturen:

1-6= Transmembrandomänen

P= Porenregion

3.4 Die Familie der TRPC-Kanäle

Bei der Namensgebung der TRPC-Kanäle, steht das „C“ für „classical“ beziehungsweise „canonical“, was auf die verhältnismäßig hohe Ähnlichkeit dieser Familie mit den zuerst entdeckten TRP Kanälen der *Drosophila melanogaster* zurückgeht. Es werden insgesamt 7 verschiedene Vertreter (TRPC1-7) unterschieden, die sich hinsichtlich ihrer Expression und Sequenzhomologie unterscheiden und daher in 4 Gruppen unterteilt werden können (Clapham, 2003). So wird der TRPC1 (Gruppe 1) in humanen Geweben fast ubiquitär exprimiert (Nilius & Owsianik, 2011) und nimmt Einfluss auf den Zellzyklus (Madsen et al., 2012).

TRPC2 (Gruppe 4) hingegen liegt lediglich als so genanntes Pseudogen vor und wird im menschlichen Organismus nicht exprimiert. Bei Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass TRPC2 eine wichtige Rolle in deren Sozial-/Sexualverhalten und bei der Gefahrenwahrnehmung spielt (Koike et al., 2021). Eine weitere Gruppe wird von den Kanälen TRPC4 und TRPC5 (Gruppe 2) gebildet. Die beiden Kanäle haben zwar ein einzigartiges Bindemotiv (PDZ – postsynaptic density protein 95) am Carboxyterminus gemein, ihre Einflüsse auf den Organismus unterscheiden sich jedoch deutlich. Während TRPC4 beispielsweise im Endothel von Blutgefäßen exprimiert wird und dort eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Gefäßweite spielt (Freichel et al., 2004), konnte für TRPC5 eine Expression in der Amygdala und ein Einfluss auf das Angstverhalten nachgewiesen werden (Riccio et al., 2009).

Die dritte Gruppe umfasst die Kanäle TRPC3, TRPC6 und TRPC7, welche sich hinsichtlich ihrer molekularen Zusammensetzung sehr ähnlich sind (65%-78% Übereinstimmung hinsichtlich des Aminosäureprofils). Darüber hinaus verbindet sie eine Aktivierbarkeit durch Diacylglycerol (Hofmann et al., 1999), was bedeutet, dass es sich hierbei mindestens teilweise um Rezeptor-operierte-Kanäle (ROC) handelt (Okada et al., 1999). Dies ist dahingehend relevant, da zuvor davon ausgegangen wurde, dass sämtliche TRP Kanäle Speicher-operierte-Kanäle (SOC) wären. Auf die Unterschiede zwischen ROC und SOC wird in Kapitel 3.5.2 dieser Arbeit näher eingegangen. Für alle drei Vertreter der Gruppe konnte gezeigt werden, dass sie insbesondere in Herzmuskelzellen exprimiert werden und dort eine Rolle bei der Reperfusion und Regeneration von Herzmuskelzellen nach Ischämien, etwa in Form eines Myokardinfarktes, spielen (He et al., 2017). Insbesondere auf die Expression von TRPC6-Kanälen soll im nächsten Kapitel gesondert eingegangen werden.

3.5 Struktur, Funktion und Expression der TRPC6-Kanäle

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Untersuchung von TRPC6-Kanälen liegt, soll auf deren Eigenschaften hier detaillierter eingegangen werden.

Der TRPC6-Kanal ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, welcher eine sechsfach erhöhte Permeabilität für Calcium Ionen im Vergleich zu Natriumionen aufweist (Dietrich & Gudermann, 2014).

Die komplementäre DNA (cDNA) des humanen TRPC6-Kanals konnte erstmals 1999 durch Hofmann et al. aus plazentarem Gewebe isoliert werden (Hofmann et al., 1999), nachdem Boulay und Kollegen bereits TRPC6 mRNA in den Gehirnen von Mäusen nachweisen konnten (Boulay et al., 1997). Das zugehörige Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 11 (11q21-q22) und kodiert mit 13 Exons für 931 Aminosäuren.

3.5.1 Molekulare Struktur von TRPC6-Kanälen

Analog zu den anderen TRP Kanälen besteht auch der TRPC6-Kanal aus 6 Transmembrandomänen, wobei sich zwischen Domäne 5 und 6 die Porenregion befindet. An den jeweils intrazellulär gelegenen N- und C-Termini zeigen sich jedoch einige Besonderheiten. Beginnend vom N-Terminus finden sich vier Ankyrin-Domänen, gefolgt von einer stabilen „Wendeldomäne“ („coiled-coil“), welche zur Tetramerisierung der Monomere beiträgt (Q. Tang et al., 2018).

Auf extrazellulärer Seite finden sich jeweils zwischen den Domänen 1 und 2, sowie 3 und 4 eine Glykosylierungsstelle, welche für die, im Vergleich zu TRPC3 (nur eine Glykosylierungsstelle), geringere Basalaktivität des Kanals verantwortlich sind (Dietrich et al., 2003).

Im Anschluss an Domäne 6, welche auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran liegt, befinden sich die so genannte TRP-Box (eine stark konservierte Aminosäurestruktur mit bisher ungeklärter Funktion), die CIRB (Ca^{2+} /Calmodulin-; IP_3 -Rezeptor-; Phosphoinositid-Bindestelle), sowie eine weitere Coiled-Coil-Domäne.

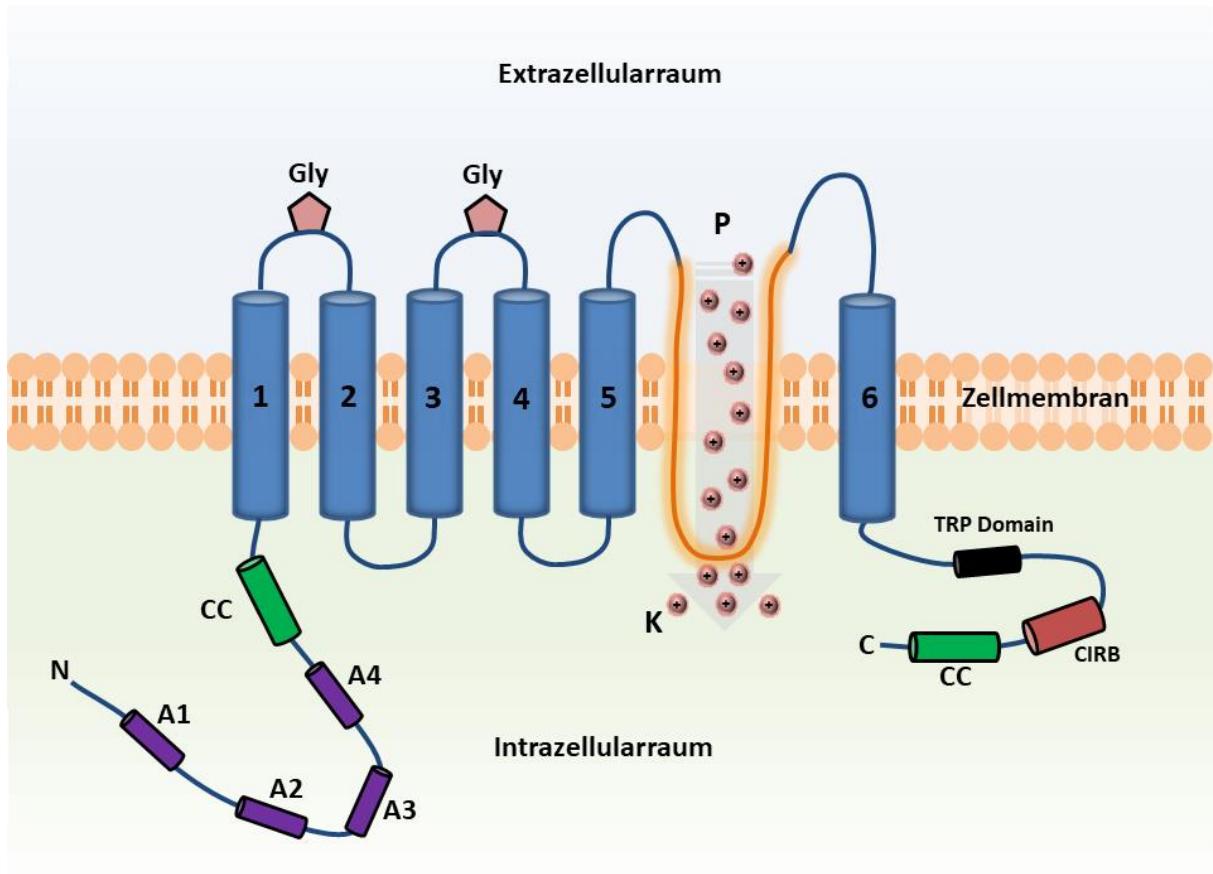


Abbildung 3 - Schematische Darstellung eines TRPC6 Monomers mit Strukturelementen

Die Nummern 1-6 bezeichnen die Transmembrandomänen (Blau). Vom N-Terminus ausgehend finden sich die vier Ankyrin-Domänen (A1-A4, Violett), gefolgt von der Coiled-Coil-Domäne (CC - Grün). Zwischen den Domänen 1 und 2, sowie 3 und 4 sind die Glykosylierungsstellen (Gly - Hellrot) dargestellt. An die Domäne 6 schließt sich die TRP Domain (Schwarz), sowie die CIRB-Region an. Nach einer weiteren Coiled-Coil-Domäne ist das carboxyterminale Ende des Proteins erreicht. P = Porenregion K = Kationen

Abbildung frei nach (Dryer & Reiser, 2010)

3.5.2 Signaltransduktion durch TRPC6-Kanäle

TRPC6-Kanäle sind, ebenso wie auch TRPC3- und TRPC7-Kanäle, in der Lage ihre Funktion sowohl als Rezeptor-operierter-Kanal (ROC), als auch in Form eines Speicher-operierten-Kanals (SOC) zu realisieren. Auf die unterschiedliche Funktionsweise dieser beiden Mechanismen der Signaltransduktion soll an dieser Stelle näher eingegangen werden.

Als second-messenger beim Rezeptor-operierten-Calcium-Einstrom (ROCE) dient für die TRPC6-Kanäle Diacylglycerin (DAG). Dabei kommt es über Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C (PLC). Dabei entsteht Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und DAG.

Die Lipophilie von DAG ermöglicht eine Akkumulation in der Plasmamembran der Zelle und eine konsekutive Aktivierung des TRPC6-Kanals (Hofmann et al., 1999).

Beim Speicher-Operierten-Calcium-Einstrom (SOCE) kommt es nach Freisetzung von Calcium Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle, beispielsweise durch einen Stimulus in Form von IP₃, zu einer Multimerisation von Stroma-Interaction-Molecules (STIM), welche in der Membran des ER lokalisiert sind. Die STIM sind in der Lage, Orai-Kanäle in der Plasmamembran der Zelle zur Tetramerisierung anzuregen und zu öffnen, was die intrazelluläre Calcium-Homöostase gewährleistet (Cahalan, 2009). Es konnte sowohl eine Interaktion der STIM Proteine (Yuan et al., 2009), als auch der Orai-Kanäle (Liao et al., 2007) mit TRPC6-Kanälen nachgewiesen werden, was deren Bedeutung für den SOCE verdeutlicht. Die geschilderten Zusammenhänge werden in Abbildung 4 noch einmal veranschaulicht.

Durch die ROCE oder SOCE vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration wird je nach Zelltyp eine Vielzahl von Prozessen gesteuert, u.a. Genexpression, Proliferation, Kontraktion oder Apoptose (Berridge et al., 2000).

Der Einfluss von TRPC6-Kanälen auf multifunktionale und essentielle Signalwege im Körper verdeutlicht ihre Bedeutung für die Funktionalität des menschlichen Organismus.

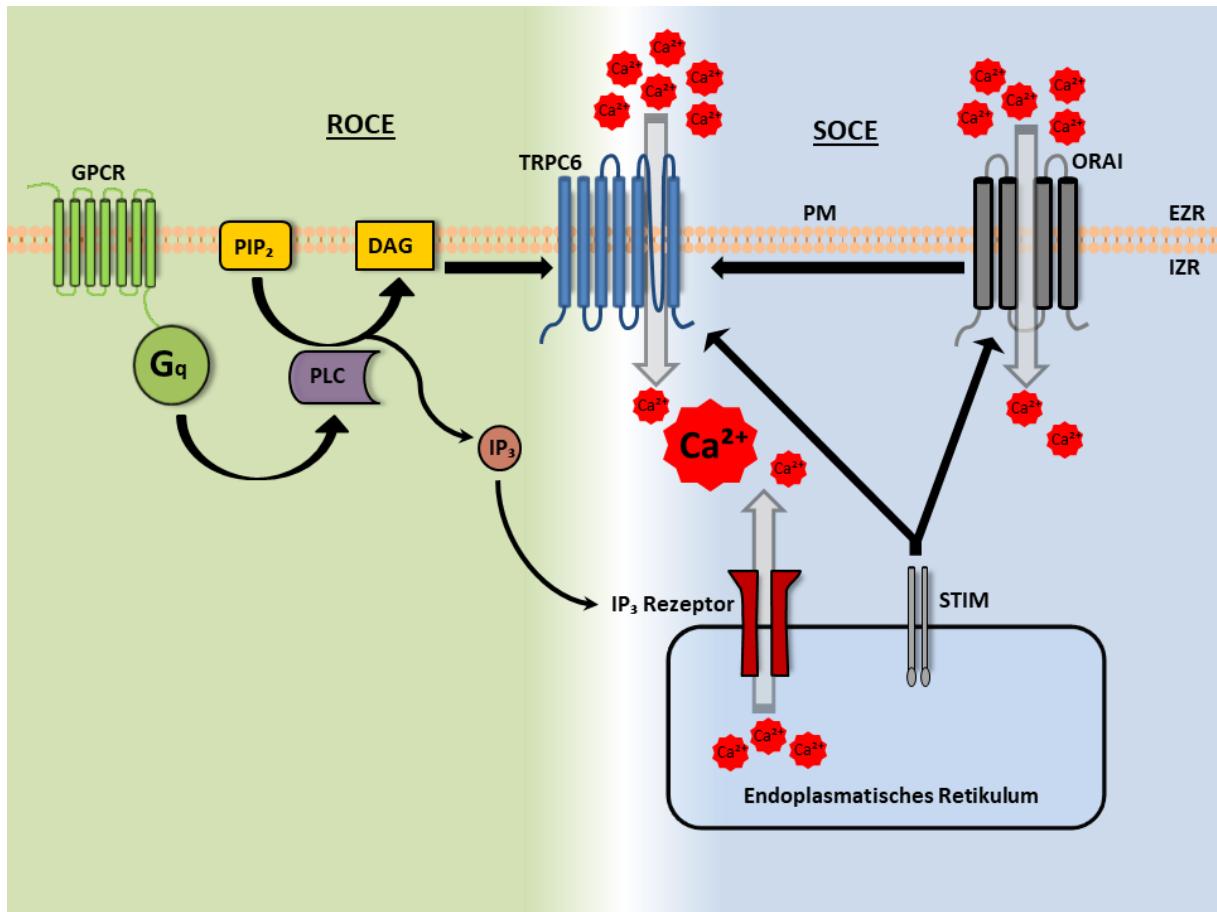


Abbildung 4 - Schematische Darstellung der Partizipation von TRPC6 Kanälen am ROCE und SOCE

Dargestellt sind die im vorangegangenen Abschnitt erläuterten physiologischen Vorgänge.

ROCE=Rezeptor-Operierter-Calcium-Einstrom; SOCE=Speicher-Operierter-Calcium-Einstrom;

GPCR/Gq=G-Protein gekoppelter Rezeptor; PIP₂=Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; DAG=Diacylglycerin; PLC=Phospholipase C; IP₃=Inositol-1,4,5-Trisphosphat; STIM=Stroma-Interaction-Molecules; PM=Plasmamembran;

EZR=Extrazellulärraum; IZR=Intrazellulärraum

In Anlehnung an (Stanzione et al., 2022) und (Malczyk et al., 2017)

3.5.3 Expressionsorte und pathophysiologische Einflüsse von TRPC6-Kanälen

Durch das vielfältige Expressionsmuster der TRPC6-Kanäle im menschlichen Körper kommt es bei Fehlfunktionen zu ebenso vielfältigen pathologischen Komplikationen unterschiedlicher Organsysteme.

Bisher konnte eine Expression von TRPC6 unter anderem in Lunge, Herz, ZNS, Ovar, Nieren, Pankreas, Knochen, Leber, Magen und Blutgefäßen gezeigt werden (Riccio et al., 2002; Welsh et al., 2002; Xia et al., 2014). In den Glomeruli der Nieren führt eine „gain-of-finction“ Mutation der TRPC6-Kanäle zu dem Krankheitsbild der Fokalen Segmentalen Glomerulussklerose (FSGS) (Winn et al., 2005). Es kommt dabei zu progredienten Vernarbungen (Sklerosen) der Glomeruli mit fokalem Befallsmuster und konsekutivem Funktionsverlust der Nieren. Die Symptome reichen dabei von Proteinurie (Eiweißverlust über die Nieren), Ödembildung (Wassereinlagerungen im Körperegewebe) und Bluthochdruck bis hin zum dialysepflichtigen Nierenversagen.

Eine weitere Rolle spielen TRPC6-Kanäle in Blutgefäßen für die durch Calciuminflux gesteuerte Regulation der Permeabilität des Endothels. So konnte durch Weissmann et al. gezeigt werden, dass TRPC6 defiziente Mäuse vor LIRE (lung-ischaemia-reperfusion-induced-edema), einer häufigen Komplikation nach Lungentransplantationen, geschützt sind (Weissmann et al., 2012).

Da die pulmonale Regulation der Gefäßweite durch glatte Muskelzellen im Rahmen des Euler-Liljestrand-Mechanismus (Euler & Liljestrand, 1946) ebenfalls calciumabhängig ist und auch in diesen glatten Muskelzellen TRPC6 exprimiert werden, ist der Einfluss auf hypertensiv bedingte Pathologien wie die idiopathische-pulmonale-Hypertonie (IPH) naheliegend und bewiesen (H. Tang et al., 2016). Dabei werden Medikamente, die gezielt TRPC6-Kanäle blockieren, bereits als Therapeutika dieser Erkrankung diskutiert (Jain et al., 2021).

Am Herzen sind TRPC6-Kanäle sowohl an der Entwicklung von hypertrophen Herzerkrankungen (Yamaguchi et al., 2017) als auch an der Entstehung von Ischämie-/Reperfusions-Schäden nach Myokardinfarkten beteiligt (He et al., 2017).

3.6 Überblick über die Anatomie und Physiologie der humanen Cochlea

Die Gehörschnecke (lateinisch Cochlea=Schnecke) liegt in der pars petrosa ossis temporale, einem neurokraniellem Areal mit, im Verhältnis zu anderen Knochen des menschlichen Körpers, deutlich erhöhter Knochendichte (Wilhelm et al., 2015). Vereinfacht gesprochen handelt es sich um einen ca. 30 mm langen Knochenkanal, welcher um einen zentralen Bereich, den Modiolus, gewunden ist. Auf der Länge ihrer 2,5 Windungen ist die Cochlea durch zwei Membranen in insgesamt drei Gänge unterteilt. Dabei trennt die Reissner-Membran die Scala vestibuli vom Ductus cochlearis und die Basilar-Membran die Scala tympani ebenfalls vom Ductus cochlearis. Alle drei Gänge sind mit Lymphe gefüllt, jedoch mit deutlich unterschiedlicher Zusammensetzung hinsichtlich des Gehaltes an Elektrolyten (Gagov et al., 2018). Während in der Scala vestibuli und Scala tympani Perilymphe mit einer hohen Konzentration von Kalium (ca. 150mmol/l) und niedrigen Konzentration von Natrium (circa 5mmol/l) zu finden ist, so sind die Konzentrationsverhältnisse in der Endolymphe des Ductus cochlearis reziprok. Realisiert wird die Elektrolytverteilung der Endolymphe im Ductus cochlearis maßgeblich durch die Stria vascularis (Ciuman, 2009), einer bindegewebigen Struktur mit einer hohen Dichte an Blutgefäßen und Ionenkanälen (unter anderem Kir4.1 und KCNQ1/KCNE1-K+) (Hibino et al., 2010). Diese Gegebenheiten sind essentiell für den Aufbau des endocochleären Potentials und damit für die Umwandlung der mechanischen Energie, die in Form der Schallwelle aus der Umwelt aufgenommen wird, in ein elektrisches Signal, welches über den Nervus cochlearis zum zentralen Nervensystem weitergeleitet wird und anschließend interpretiert werden kann. Eine entscheidende Rolle für diesen Vorgang spielt das Corti-Organ, welches im Ductus cochlearis zu finden ist und der Basilar-Membran aufsitzt. Es enthält die äußeren und inneren Haarzellen, welche durch die Tektorial-Membran bedeckt sind. Dabei stehen die äußeren Haarzellen über Stereozilien mit der Tektorial-Membran in Kontakt. Wenn eine Schallwelle das menschliche Ohr erreicht, versetzt sie die Membrana tympani (Trommelfell) in Schwingung, welche diese über die Gehörknöchelchenkette des Mittelohres schließlich am ovalen Fenster an die Perilymphe der Scala vestibuli fortleitet. Durch die Trägheit der Lymphe wird die so genannte Wanderwelle erzeugt, die die Basilar-Membran erfasst und die Haarzellen gegenüber der Tektorial-Membran auslenkt, woraufhin es zum Abscheren der Stereozilien der 3-4 Reihen der äußeren Haarzellen kommt.

Die äußenen Haarzellen sind über sogenannte Tip-Links miteinander verbunden (Sakaguchi et al., 2009). Bei Dehnung der Tip-Links kommt es zum Kalium-Einstrom und zur Depolarisation der äußenen Haarzelle, welche sich daraufhin verkürzt und dadurch die Schwingung der Basilar-Membran verstärkt. Dieser Vorgang wird als hydromechanische Kopplung bezeichnet (Fettiplace, 2017). Die äußenen Haarzellen haben durch diesen Mechanismus einen verstärkenden Effekt auf die eigentliche Sinneswahrnehmung (Dallos, 2008), welche in den inneren Haarzellen auf ähnliche Weise stattfindet.

Die inneren Haarzellen werden durch die Schwingung der Basilar-Membran ausgelenkt, jedoch ohne direkten Kontakt zur Tectorial-Membran zu haben. Auch hier wird die Depolarisation der Zelle durch Dehnung der Tip-Links und Kalium-Einstrom ermöglicht, jedoch mit anschließender Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (Zheng & Holt, 2021), konsekutiver Glutamatfreisetzung (Ottersen et al., 1998) in den synaptischen Spalt der afferenten Nervenfasern des ersten Neurons der Hörbahn. Dort wird ein positives postsynaptisches Potential erzeugt, welches nach Umschaltung im zentral innerhalb des Modiolus gelegenen Ganglion spirale, in Richtung des auditorischen Kortex fortgeleitet wird.

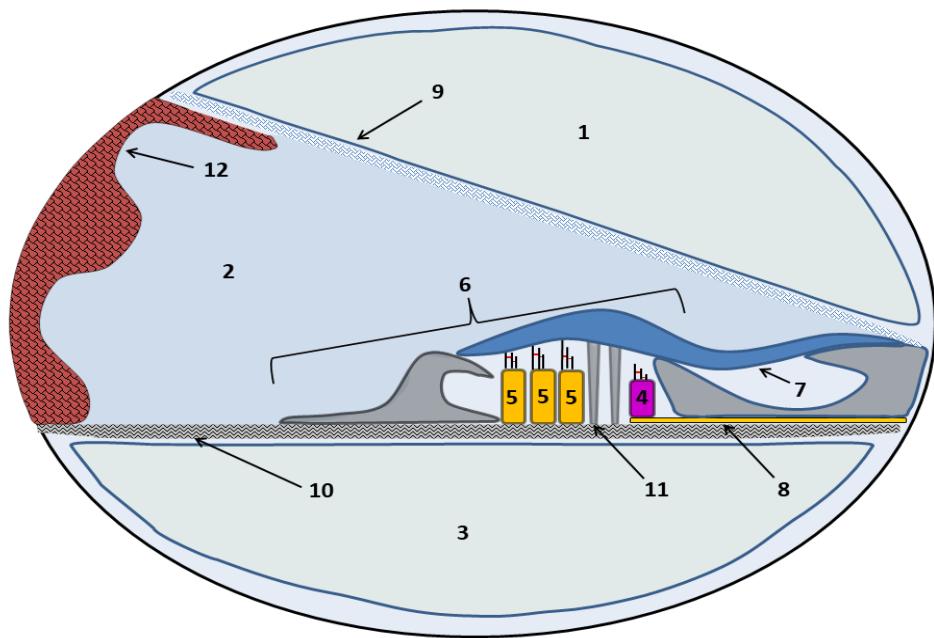


Abbildung 5 - Schematischer Querschnitt durch das Lumen des cochleären Gangsystems mit Leitstrukturen (frei nach (Moser & Zenner, 2019))

1= Scala vestibuli

2= Ductus cochlearis

3= Scala tympani

4= Innere Haarzelle mit Stereozilien (schwarz) und Tip-Links (Rot)

5= Äußere Haarzellen mit Stereozilien (Schwarz) und Tip-Links (Rot)

6= Corti-Organ

7= Tectorial-Membran

8= afferente Nervenfaser der Hörbahn

9= Reissner-Membran

10= Basilar-Membran

11= Stützzellen

12= Stria vascularis

3.7 Relevanz von TRPC6-Kanälen für die cochleäre Funktion

Die bisherige Forschung zur Funktion und Expression von TRPC6-Kanälen in der Cochlea ist bisher lediglich an Mausmodellen durchgeführt worden. So wiesen Takumida und Anniko TRPC6-Kanäle in diversen Strukturen des Innenohrs von Mäusen immunhistochemisch nach. Dazu zählten die inneren und äußeren Haarzellen, das Corti-Organ und das Ganglion spirale (Takumida & Anniko, 2009). Weiterhin konnte in „Double-knock-out“ Mäusen gezeigt werden, dass TRPC3 und TRPC6 relevant für den Hörvorgang sind (Sexton et al., 2016).

Beim Hörvorgang beschreibt die Mechanotransduktion die Umwandlung eines mechanischen Reizes in ein elektrisches Signal, welches dann in Richtung des zentralen Nervensystems fortgeleitet wird. Dafür sind sogenannte mechano-elektrical-transducer (MET) -Kanäle (Hudspeth, 1985) notwendig, die bisher im Innenohr nicht endgültig identifiziert werden konnten. Weiterhin ist die cochleäre Sensibilität von großer Bedeutung. Bereits eine Auslenkung um 1° Winkelmaß (Corey & Hudspeth, 1983) beziehungsweise 1 nm (Rhode & Geisler, 1967) ist für die Erzeugung eines nervalen Impulses ausreichend (zusammengefasst in (Gillespie & Müller, 2009)). Aufgrund dieser hohen Sensibilität ist die Anpassungsfähigkeit der Haarzellen an anhaltende mechanische Reize von großer Bedeutung. Man unterscheidet hierbei die schnelle („fast adaptation“ = FA), von der mittleren („intermediate adaptation“ = IA) und der langsamen Anpassung („slow adaptation“ = SA). Im Rahmen der FA liegt aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit ein Mechanismus auf Basis des Calciuminflux, wie etwa eine Konformationsänderung des MET-Kanals, nahe (Eatoeck et al., 1987). Durch die experimentelle Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration konnte die Anpassungsreaktion moduliert werden, was diese Theorie stützt (Crawford et al., 1991; Ricci & Fettiplace, 1997).

Bei der SA wird davon ausgegangen, dass es nach Stimulation und Auslenkung der Stereozilien der inneren Haarzellen und folgender Dehnung der Tip-Links, zu einer Gegenregulation durch den so genannten Adaptationsmotor, einer Ansammlung verschiedener Myosinmoleküle (insbesondere Myosin-1c (Gillespie & Cyr, 2004)), am Ankerpunkt des Tip-Links der Haarzellen kommt. Dies führt zur teilweisen Relaxation der Tip-Links und dementsprechend verminderter Stimulation (Howard & Hudspeth, 1987).

Bei Dehnung der Tip-Links erfolgt eine Öffnung der MET-Kanäle, was zu einer Lösung des Myosin-1c von seinem Aktinfilament führt. Es wird davon ausgegangen, dass das Myosin in kaudaler Richtung am Aktinfilament hinabgleitet und somit die Relaxation des Tip-Links bewirkt. Daraus resultieren ein Schließen der MET-Kanäle, eine verminderte Calciumkonzentration im Stereozilium und eine Wiederanheftung des Myosins an das Aktinfilament. Dort steigt es in Richtung der Spitze des Stereoziliums auf und stellt damit den Grundzustand des Tip-Links wieder her (Assad & Corey, 1992). Diese mechanistische Theorie wird gestützt durch die Beobachtung, dass der Ankerpunkt der Tip-Links in Richtung der Spitze des Stereoziliums wandert, sobald man den zugehörigen Tip-Link durchtrennt (Michalski et al., 2009).

Die Annahme, dass TRPC6-Kanäle eine entscheidende Rolle als MET-Kanäle bei der Mechanotransduktion und Adaptation der cochleären Haarzellen spielen (Quick et al., 2012), musste nach neueren Forschungsergebnissen revidiert werden (Sexton et al., 2016).

Die genaue Funktion von TRPC6-Kanälen in der humanen Cochlea ist weiterhin nicht abschließend geklärt und Gegenstand der Forschung.

4. Fragestellungen dieser Forschungsarbeit

Im Folgenden sollen die Fragestellungen, mit denen sich diese Dissertationsarbeit auseinandersetzt, vorgestellt werden. Dabei sind sowohl technische Aspekte hinsichtlich der Probengewinnung und Aufbereitung, als auch anatomische Grundlagenforschung bezüglich des Nachweises von TRPC6-Kanälen im menschlichen Innenohr, von Interesse. In dieser Forschungsarbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann eine Standard-Operating-Procedure (SOP) für die sichere Entnahme der humanen Cochlea etabliert werden?
2. Gelingt ein immunhistochemisch basierter Nachweis von TRPC6-Kanälen an der humanen Cochlea?
3. Sind Unterschiede der TRPC6-Expressionsmuster verschiedener cochlearer Strukturen feststellbar?

5. Materialien und Methoden

5.1 Probengewinnung

5.1.1 Körperspende am Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes

Für diese Forschungsarbeit wurden humane Gewebeproben verwendet, welche den Körpern von Menschen entnommen wurden, die sich vor ihrem Tode zur freiwilligen Spende ihres Körpers zu Lehr- und Forschungszwecken entschieden hatten. Dazu erfolgte nach ausführlicher Aufklärung durch Prof. Dr. Thomas Tschernig und Abschluss eines Vertrages über die Körperspende die Aufnahme auf die Spenderliste des anatomischen Institutes der Universität des Saarlandes. Post mortem wurden die Körper der Spender in die Prosektur des anatomischen Institutes gebracht und umgehend in Kühlkammern bei ca. -5°C gelagert, um die natürlichen autolytischen Prozesse bis zur anschließenden Thanatopraxie möglichst gering zu halten. Darüber hinaus wurde nach Erfassung und Abgleich der persönlichen Daten des Verstorbenen eine interne Journalnummer zur späteren zweifelsfreien Identifikation an jeden Spender vergeben. Nach vollständiger Entkleidung, Rasur der Körperbehaarung und neuerlicher Leichenschau, erfolgte die Fixierung der Körper mittels Formalin- oder NEP-Lösung.

5.1.2 Probenkollektiv

Insgesamt wurden für diese Arbeit 28 Proben ($n = 28$) von 14 Körperspendern verwendet. Dabei wurden bei allen 14 Spendern die jeweils paarigen Felsenbeine entnommen. Eine zusätzliche Gewebeentnahme eines Spenders erfolgte als Stanzbiopsie aus der Nierenrinde, zum Zwecke der Etablierung der anschließenden immunhistochemischen Färbung (siehe folgende Kapitel).

5.1.3 Schematischer Arbeitsablauf

In nachfolgender Grafik werden die verschiedenen Arbeitsschritte aufgezeigt, die zur Erstellung der histologischen Schnitte durchgeführt wurden.

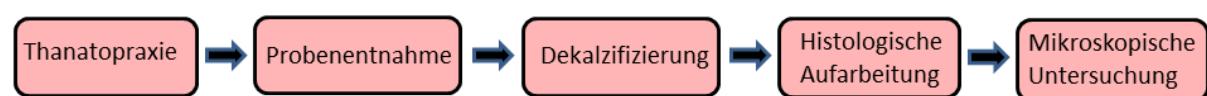


Abbildung 6 - Schematischer Arbeitsablauf

5.1.4 Thanatopraxie

Die thanatopraktische Behandlung wurde in der Prosektur durch die Mitarbeitenden, gegebenenfalls mit Unterstützung durch studentische Hilfskräfte, durchgeführt. Zunächst wurde der Körper aus der Kühlzelle entnommen und auf den speziell dafür eingerichteten Fixationstisch umgelagert. Es folgte die Etablierung eines arteriellen Zugangs für die intravasale Injektion der Fixationslösung. Zumeist wurde dafür die Arteria femoralis dextra verwendet, da diese gut zugänglich ist, ein ausreichendes Lumen aufweist und wegen der topografischen Nähe zur Aorta abdominalis eine gute Verteilung der Lösung im Großteil des Körpergewebes ermöglicht. Über einen Hautschnitt im Bereich des medialen Oberschenkels wurde zunächst die Kutis und Subkutis durchtrennt und anschließend die Arterie identifiziert und freipräpariert. Es folgte die longitudinale Inzision der Arterie auf ca. 5 cm Länge und die Einführung zweier Knopfkanülen in proximaler beziehungsweise distaler Ausrichtung und deren Sicherung mittels zweier Gefäßklemmen. Über die Kanülen wurde mit einem Druck von ca. 3 bar das Fixans in das arterielle Gefäßsystem des Spenderkörpers gepumpt, um auch periphere Gebiete zu erreichen. Insgesamt wurden auf diesem Weg etwa 101 Fixationslösung, je nach Körpergröße und Gewicht, über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten infundiert. Während dieser Zeit erfolgte zusätzlich die manuelle Injektion von Fixationslösung mittels scharfer Kanülen in für das Fixans schwer zugängliche subkutane Bereiche des Körpers, so zum Beispiel an den gesamten Extremitäten, sowie im gluteal-, scapular- und occipital-Bereich. Nach Abschluss der genannten Prozeduren wurde der Körper in eine mit Fixierlösung gefüllte und verschlossene Stahlwanne überführt, wo er zur vollständigen Fixierung und bis zur weiteren Verwendung, je nach Verfahren, etwa 5-120 Tage verblieb (Immersionsfixierung).

5.1.5 Gegenüberstellung NEP & Formalinfixierung

Für diese Arbeit wurden sowohl Proben aus Körpern, die mit Formalin, als auch solchen, die mit NEP fixiert wurden, verwendet. Daher soll hier eine kurze Gegenüberstellung der Methoden erfolgen. Die Formalinfixierung erfolgte intraarteriell/subkutan mittels der s.g. Basler-Lösung nach Kurz. Anschließend erfolgte die Immersionsfixierung in der Wanne in 4%iger Formalinlösung. Diese Methode ermöglicht lange lagerbare Körper, welche unter regelmäßigen Kontrollen in luftdicht verschweißten Folien („Pharopack“) und bei ca. 14°C aufbewahrt werden. Die Denaturierung der körpereigenen Proteine resultiert in einem sehr guten Fixationsergebnis und einer eher derben Konsistenz des Körpergewebes. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn gezielt auch kleinste Körperstrukturen beim Studium der Anatomie des menschlichen Körpers präpariert werden sollen. Daher wird diese Methode bevorzugt bei Körperspenden verwendet, die anschließend für die Lehre im Kurs der makroskopischen Anatomie genutzt werden sollen.

Bei der NEP-Fixierung wird hingegen die namensgebende Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol-Lösung verwendet. Nachdem die intraarterielle/subkutane Injektion des Fixans analog zur Formalinfixierung abläuft, erfolgt die Immersionsfixierung in einer Mischlösung aus NEP und Formalin. Die Haltbarkeit der Körper ist dabei geringer und die Verwendung der Körperspender sollte innerhalb von etwa drei Monaten erfolgen. Im Ergebnis sind die fixierten Körper deutlich weicher als nach Formalinfixierung und dem originären Zustand des menschlichen Körpers ähnlicher. Daher eignet sich diese Fixationsmethode insbesondere für Kurse bei denen authentische Arbeitsbedingungen gewünscht sind, beispielsweise bei Operationskursen für die Ausbildung von Ärzten und sonstigem medizinischen Fachpersonal.

5.2 Tabellarische Übersicht über die Körperspender

Die nachstehende Tabelle soll einen Überblick über die Daten der Körperspender, das postmortale Intervall und die gewählte Fixationsmethode geben. Das postmortale Intervall setzt sich zusammen aus der Zeit zwischen dem Versterben des Körperspenders und der Durchführung der Thanatopraxie im Anatomischen Institut.

<u>Journalnummer</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Alter</u>	<u>Postmortales Intervall</u>	<u>Fixiermethode</u>
2141	Männlich	76 Jahre	2 Tage	NEP
2145	Männlich	91 Jahre	1 Tag	Formalin
2146	Männlich	91 Jahre	3 Tage	Formalin
2156	Männlich	84 Jahre	2 Tage	NEP
2157	Weiblich	84 Jahre	2 Tage	NEP
2158	Weiblich	92 Jahre	2 Tage	NEP
2193	Männlich	72 Jahre	2 Tage	NEP
2218	Männlich	61 Jahre	5 Tage	Formalin
2219	Männlich	66 Jahre	2 Tage	Formalin
2220	Männlich	80 Jahre	2 Tage	Formalin
2221	Weiblich	58 Jahre	3 Tage	Formalin
2249	Männlich	62 Jahre	3 Tage	Formalin
2250	Weiblich	86 Jahre	3 Tage	Formalin
2251	Weiblich	67 Jahre	7 Tage	Formalin

Tabelle 1 - Übersicht über die Körperspender mit Journalnummern

Die Journalnummern des anatomischen Institutes wurden aus Gründen des Datenschutzes durch Journalnummern zur anschließenden histologischen Aufarbeitung der Proben ersetzt.

5.3 Entwicklung einer sicheren Entnahmetechnik

5.3.1 Vorbereitende Untersuchungen

Durch die Lage der Cochlea in der pars petrosa ossis temporale ist eine genaue Lokalisation der selbigen am eröffneten Schädel makroskopisch nicht möglich. Da jedoch bereits vor Probenentnahme abzusehen war, dass die Aufbereitung der zu entnehmenden Teile des Felsenbeines mit innenliegender Cochlea (siehe Kapitel 5.4) eine lange Zeit erfordern würde, war es ein Ziel dieser Arbeit, eine spezielle Entnahmetechnik zu entwickeln, die auch ohne Kontrolle der einzelnen Proben oder nach Abwarten der Aufbereitung, mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit die gewünschte Zielstruktur enthält und einfach anzuwenden ist.

Dazu wurde vor Beginn der eigentlichen Probengewinnung eine computertomographische Schnittbildgebung an einem bereits in den Beständen des anatomischen Institutes vorhandenen, humanen Schädelknochen durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war die genaue Lokalisation der Cochlea im Os temporale, sowie die Bestimmung deren Größe. Darüber hinaus erwies sich für die Planung des späteren Entnahmeprozesses die Distanzmessung zwischen dem lateralen Ende der Cochlea und dem medialen Ende der pars petrosa ossis temporale als sehr hilfreich. Durch diese Daten konnte anschließend das zu entfernende Knochensegment so groß gewählt werden, dass die Zielstrukturen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Probe enthalten sind und so klein gewählt werden, dass der anschließende Prozess der weiteren Aufbereitung nicht unnötig verlängert wurde.



Abbildung 7 - Computertomographische Aufnahme der knöchernen Strukturen des rechten Hemikraniums in coronarer Schnittführung.

1= *Os temporale*

2= *Porus acusticus externus*

3= *Pars petrosa ossis temporale mit nachträglich hinzugefügtem, horizontalem Längenmaß*

4= *Cochlea mit nachträglich hinzugefügtem, diametralem Längenmaß*

5= *Foramen magnum*

5.3.2 Entnahme der Proben

Nach Abschluss dieser Voruntersuchungen zu Planungszwecken, erfolgten die Präparation der Körperspender und die Gewinnung der zu untersuchenden Proben.

Vor Beginn der Präparation wurden die Daten des Körperspenders erhoben und dokumentiert, sowie zum Zwecke des Datenschutzes eigene Journalnummern vergeben.

Nach Umlagern des Körpers aus der Kühleinheit auf einen Präparationstisch wurde zunächst mit der Planung der Schnittführung am Schädel begonnen. Einerseits war das Ziel, das Lumen des eröffneten Schädelns nach der durchzuführenden Kraniektomie möglichst groß zu halten, sodass ein sicheres und ungehindertes Arbeiten im Schädelinneren möglich ist, andererseits sollte aber auch das Gehirn selbst bestmöglich erhalten bleiben, da dieses im weiteren Verlauf konserviert und zu Lehrzwecken im Kursus der Neuroanatomie für Studenten genutzt werden sollte.

Beim zirkulären Anzeichnen der Schnittführung wurden als anatomische Orientierungspunkte die Glabella ossis frontalis (im frontalen Bereich) und die Linea nuchalis suprema ossis occipitalis (im occipitalen Bereich) genutzt. Es folgte die Inzision der Kutis und Subkutis mittels Skalpell (Klingentyp 20) und bei der tieferen Präparation die Durchtrennung der Musculi temporalis, procerus und occipitofrontalis sowie der Galea aponeurotica. Anschließend wurde das durchtrennte Weichteilgewebe mit einem Raspatorium in beiden vertikalen Richtungen vom Schädelknochen mobilisiert, sodass eine Zone freiliegenden Knochens von ca. 3cm Breite entlang der gesamten Zirkumferenz des Schädelns entstand. Zur weiteren Eröffnung des Schädelns wurde eine oszillierende Säge verwendet, da diese einerseits Knochen zuverlässig durchtrennt, und andererseits bei der Nutzung ein verhältnismäßig geringes Verletzungsrisiko für den Präparator darstellt. Da auch nach vollständiger Durchtrennung der von außen zugänglichen Kalottenabschnitte ein Entfernen des Schäeldaches noch nicht möglich war, wurden abschließend Hammer und Meißel verwendet, um die Schädelanteile voneinander zu trennen. Nachdem der knöcherne Schädel vollständig mobilisiert wurde, erfolgte die Durchtrennung der bindegewebigen Strukturen (Dura mater und Falx cerebri) im Schädelinneren mittels Skalpell, sowie, nach vorsichtiger Mobilisation des Telencephalons, des Tentorium cerebelli. Anschließend wurde der Hirnstamm im Bereich der Medulla oblongata vom Rückenmark getrennt und das nun vollständig mobilisierte Gehirn entnommen und zur weiteren Verwendung in ein mit gepufferter Formalinlösung gefülltes Behältnis überführt.

Zur Orientierung hinsichtlich der weiteren Probenentnahme wurde als anatomische Leitstruktur am eröffneten Schädelsitus der Porus acusticus internus mit austretendem Nervus vestibulocochlearis, sowie der Arteria und Vena labyrinthi aufgesucht. Ausgehend von diesen wurde ein Durafenster erstellt, indem die Dura mater, entlang des zu entnehmenden Knochenanteiles der Pars petrosa ossis temporale, inzidiert und anschließend entfernt wurde. Das Fenster wurde bewusst größer als die zuvor in der CT ausgemessene Distanz vom medialen Rand gewählt, um die Cochlea beim anschließenden Heraustrennen des Knochenstückes nicht zu beschädigen.



Abbildung 8 - Blick in den eröffneten Schädel situs in kranio-kaudaler Richtung nach Entfernung des Groß- und Kleinhirns.

1= Durafenster und darunter freiliegende Pars petrosa ossis temporale

2= Porus acusticus internus mit austretendem Nervus vestibulocochlearis und Arteria/ Vena labyrinthi

3= Chiasma opticum

4= Fossa cranii anterior

5= Fossa cranii media

6= Fossa cranii posterior

7= Diencephalon (durchtrennt)

Das Heraustrennen des gewünschten Knochenteiles entlang des Durafensters wurde ebenfalls mit der oszillierenden Säge, sowie mit Hammer und Meißel vorgenommen. Anschließend wurde ein nicht resorbierbarer, chirurgischer Faden in die superiore Seite der Probe eingebracht und verknotet. Dieser diente gemeinsam mit dem Porus acusticus internus zur späteren dreidimensionalen Orientierung an der Probe und der Planung der Schnittführung am Mikrotom. Abschließend wurde jede Probe in ein 50ml Falkongefäß mit gepufferter 4%iger Formalinlösung überführt.

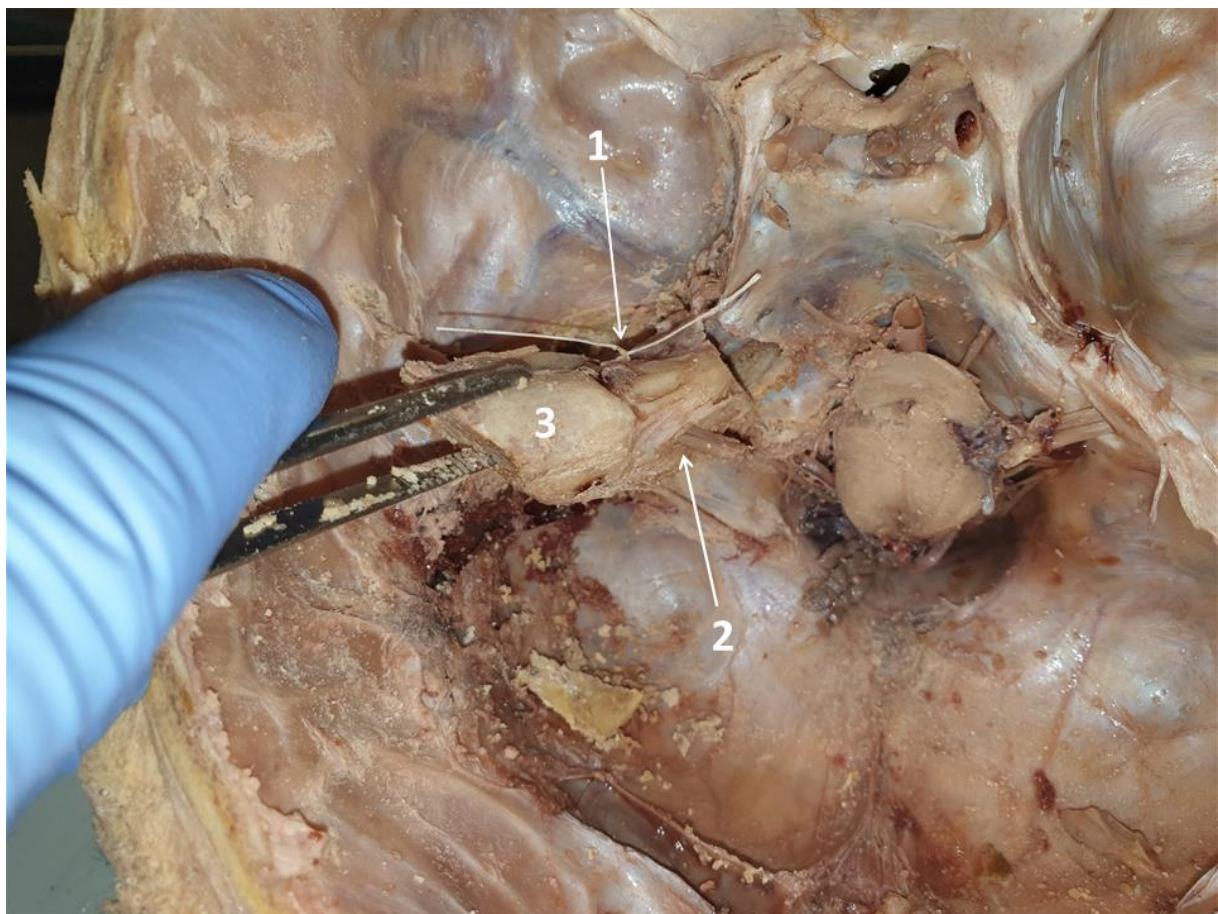


Abbildung 9 - Blick in den Schädelsitus in kranio-kaudaler Richtung nach Heraussägen der Probe

1= superior eingebrachter chirurgischer Faden

2= Porus acusticus internus mit austretenden Strukturen

3= entnommenes Fragment der Pars petrosa ossis temporale

Die definitive Bestätigung der erfolgreichen und vollständigen Entnahme der Cochlea wäre erst nach dem zeitaufwendigen Decalzifizierungsprozess (siehe Kapitel 5.4) und dem Erstellen erster histologischer Schnitte zu erlangen. Um dem damit verbunden Risiko und Zeitverlust vorzubeugen, wurde nach der ersten Entnahme eine computertomographische Untersuchung der gewonnenen Proben vorgenommen.

Dadurch konnte die korrekte und vollständige Entnahme der Cochlea zweifelsfrei bestätigt werden und die zuvor beschriebene Methode auch zur verlässlichen Gewinnung der weiteren Proben eingesetzt werden.

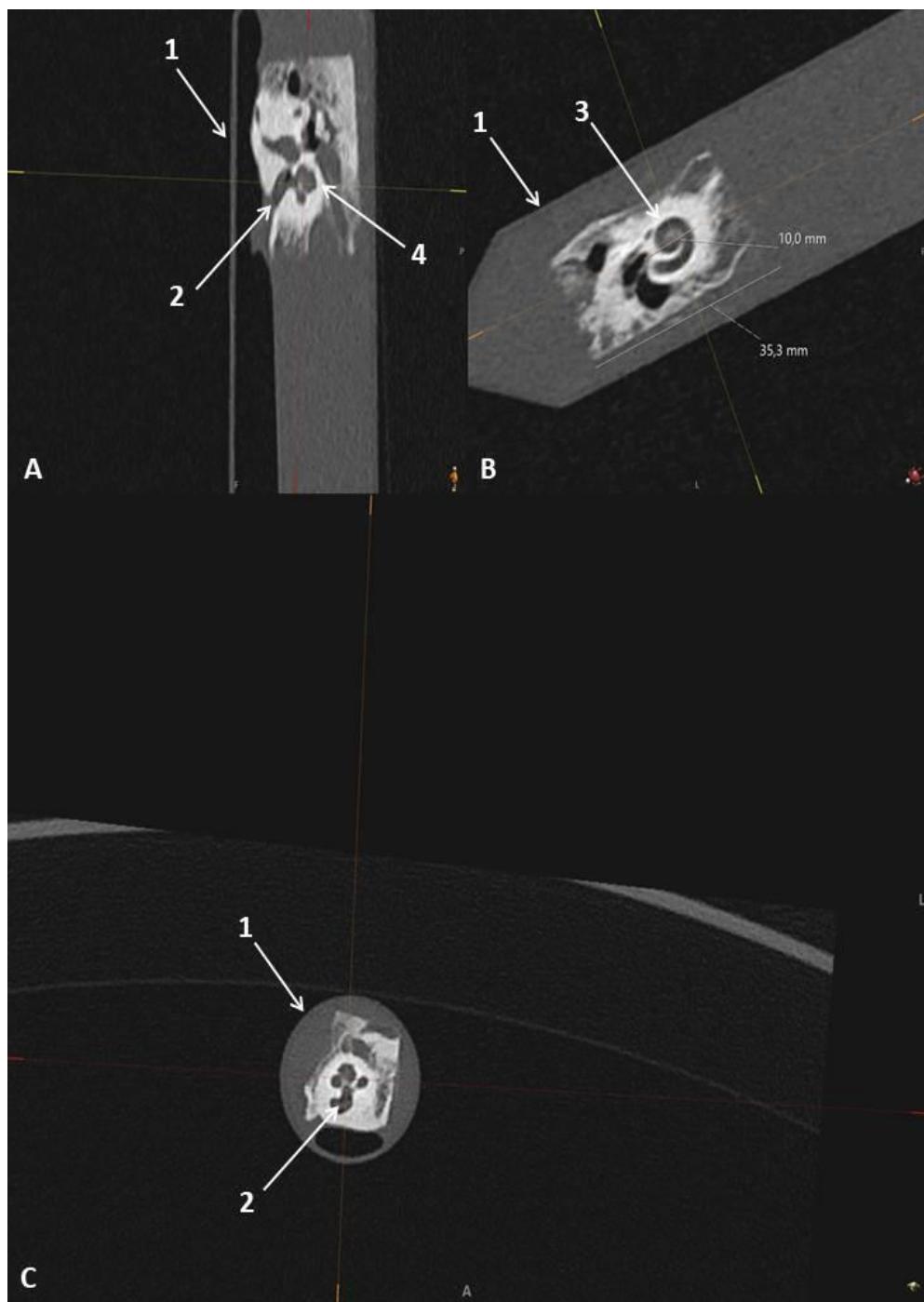


Abbildung 10 - Computertomographische Aufnahme des entnommenen Teils der Pars petrosa ossis temporale

A: Sagittale Schnittebene 1= Falkon 2= Meatus acusticus internus 4= Cupula Cochleae

B: Frontale Schnittebene mit Längenmaßen 1= Falkon 3= Canalis spiralis Cochleae

C: Transversale Schnittebene 1= Falkon 2= Meatus acusticus internus

5.4 Decalzifizierung

5.4.1 Theoretische Grundlagen

Der Prozess der Decalzifizierung beschreibt das chemische Entfernen von Calcium aus der knöchernen Matrix oder anderen calciumhaltigen Geweben. Dies war notwendig um histologische Schnitte mittels eines Mikrotoms erstellen zu können, was im nativen Zustand des Knochens aufgrund seiner Härte nicht möglich war. Im Knochen findet sich das Calcium in Form von Hydroxyapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), welche in Verbindung mit Kollagenfasern vom Typ I die extrazelluläre Matrix bilden. Diese umgibt die eigentlichen Zellen des Knochens, die Osteozyten. Ziel der Entkalkung des Knochens war der bestmögliche Erhalt der histologischen Strukturen und Gewebskohäsion, bei gleichzeitig guter Schneid- und Anfärbarkeit der Proben.

Je nachdem zu welchen Anteilen die zu untersuchende Knochenprobe aus spongiösem (feine Bälkchenstruktur, zu finden in der Spongiosa von Röhrenknochen und Wirbelkörpern) oder kortikalem (dichte Struktur, zu finden in der Kortikalis der Röhrenknochen und der meisten Schädelknochen) Gewebe besteht, war mit einer variierenden Dauer des Entkalkungsprozesses zu rechnen. Zum einen ist im kortikalen Knochengewebe deutlich mehr Hydroxyapatit und damit Calcium vorhanden, zum anderen ist die Penetration des decalzifizierenden Reagens abhängig von der Dichte des Gewebes.

Da die Pars petrosa ossis temporale ausschließlich aus kortikalem Knochengewebe besteht und die Proben ein verhältnismäßig hohes Volumen aufwiesen, war mit einem sehr zeitaufwendigen Entkalkungsprozess zu rechnen.

5.4.2 Gegenüberstellung gängiger Reagenzien der Decalzifizierung

Grundlegend lassen sich drei Arten von Entkalkungsreagenzien unterscheiden:

1. Chelatbildner
2. Starke Mineralsäuren
3. Schwache organische Säuren

1. Chelatbildner wie Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) sind für zeitunkritische Untersuchungen wie in dieser Forschungsarbeit besonders gut geeignet, da sie zwar verhältnismäßig langsam entkalken, aber auch schonend für die Gewebeproben sind, was den anschließenden Färbungen zuträglich ist. Abgesehen von dem Erhalt der Gewebemorphologie ist, insbesondere bei den angewandten immunhistochemischen Färbungen, ein Erhalt der molekularen Strukturen (Epitope als Bindestelle der Primärantikörper) essentiell.
2. Zu den starken Mineralsäuren gehören zum Beispiel reine Säuren wie Salpetersäure (verwendet üblicherweise in 5%iger Konzentration) oder Salzsäure (5%-10%ige Konzentration) sowie auch Säuregemische wie die Perenyi'sche Flüssigkeit (10%ige Salpetersäure, 0,5%ige Chromsäure und 100%iges Ethanol) oder die Ebner'sche Flüssigkeit (NaCl Lösung, destilliertes Wasser und Salzsäure). Durch die hohe Reaktivität dieser Säuren läuft der Entkalkungsprozess schneller ab, was bei der dringlichen Untersuchung von Proben, beispielsweise im Rahmen einer pathologischen Untersuchung, von Vorteil ist. Nachteilig für die Untersuchung von Proben zu Forschungszwecken ist jedoch die Schädigung des Gewebes durch die hohe Aggressivität der Säuren. Darüber hinaus ist gerade der Einsatz von Salzsäure für die Entkalkung von Formalin-fixierten Präparaten gefährlich, da es zur Bildung von karzinogenem Bischlormethylether kommt.
3. Schwache organische Säuren stellen einen Kompromiss zwischen den starken Mineralsäuren und den Chelatbildnern hinsichtlich Entkalkungszeiten und Gewebeschädigung dar. Häufig verwendete Reagenzien hierbei sind zum Beispiel Ameisensäure, Pikrinsäure oder Trichloressigsäure. Auch hier gibt es fest etablierte Lösungen wie beispielweise die Evans- und-Krajian-Lösung (Ameisensäure, Natriumzitrat und destilliertes Wasser).

5.4.3 Wahl der Decalzifizierungsmethode

Neben der Wahl des geeigneten Reagens gibt es noch weitere Möglichkeiten, Einfluss auf die Geschwindigkeit und den Erfolg der Decalzifizierung zu nehmen. So ist eine Erhöhung der Temperatur zwar geeignet, um den Prozess zu beschleunigen, jedoch mit einer stärkeren Belastung des Gewebes verbunden. Darüber hinaus sollte die Probe gleichmäßig und allseitig in Kontakt mit der Lösung stehen und idealerweise in leichter Bewegung sein, zum Beispiel auf einem Laborschüttler. Auch sollte die Konzentration der Entkalkungslösung und das Volumenverhältnis von Lösung und Probe (etwa 20:1) ausreichend hoch gewählt werden. Da die Lösung im Verlaufe des Prozesses mit Calcium gesättigt ist, muss sie regelmäßig erneuert werden.

Unter dem Gesichtspunkt der Geschwindigkeit des Prozesses wurde in Kooperation mit der Klinik für Radiologie der Universitätsklinik des Saarlandes eine radiologisch gestützte Gegenüberstellung verschiedener Reagenzien zur Decalzifizierung durchgeführt (Gawlitza et al., 2021). Dazu wurden vier Proben aus dem Femur derselben Körperspenderin in Gefäße mit 4% Formalin (Negativkontrolle) / 10% EDTA / Osteosoft (Firma Merck) / RBD (Rapid Bone Decalcifier) gegeben und die Abnahme der Knochendichte im Intervall von 2/4/8/11/20/44/77 Stunden gemessen. Dabei zeigte sich, dass die mit RBD versetzte Probe die einzige war, welche nach dem Ende der Untersuchung vollständig entkalkt war. Da auch die mit EDTA behandelte Probe über den Untersuchungszeitraum eine kontinuierliche Abnahme der Knochendichte zeigte, wurde sich gegen das Salzsäure-basierte Verfahren (RBD) entschieden. Damit sollte zum einen die Schonung des Gewebes und zum anderen die Reduzierung gesundheitlicher Risiken erreicht werden. Darüber hinaus zeigte sich in anderen Untersuchungen (Liu et al., 2017; Miquelestorena-Standley et al., 2020), dass sich die EDTA-Decalzifizierung besonders gut für immunhistochemische Färbungen eignet. In Anbetracht der relativ großen Probenvolumina wurde eine Konzentration der EDTA-Lösung von 20% für diese Arbeit gewählt.

5.4.3 Durchgeführter Decalzifizierungsprozess

Zur Decalzifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Proben wurde eine 20%ige EDTA-Lösung bei einem pH von 7,2 verwendet.

Herstellung 3 l EDTA-Lösung:

1. 600 g EDTA in zunächst 2 l destilliertem Wasser auflösen
2. pH Kontrolle (ca. 12,3)
3. pH-Korrektur auf 7,2 mittels 100%iger Zitronensäure (ca. 135 ml)
4. Auffüllen der Lösung mit destilliertem Wasser auf 3 l Gesamtmenge

Anschließend wurden die Proben paarweise (zwei Proben pro Körperspender, eine aus jedem Felsenbein) in Schraubgläser mit 500 ml EDTA-Lösung gegeben. Dabei wurde auf ein hinreichendes Verhältnis der Volumina der Proben und der Lösung geachtet:

Volumen einer Probe: 3,5 cm x 1,5 cm x 1,5 cm = 7,8 cm³

Lösungsvolumen: 500 ml = 500 cm³

Verhältnis Probenvolumen/Lösungsvolumen: 15,75 cm³ Probenvolumen in 500 cm³ Lösungsvolumen entspricht einem Verhältnis von Lösung zu Probe von 31,74/1.

Die Gläser wurden während der gesamten Decalzifizierung auf einem Laborschüttler gelagert, sodass eine konstante Umspülung der Proben durch die Lösung gewährleistet wurde. Weiterhin wurde eine konstante Temperatur von 37°C gewählt, mit dem Ziel die Entkalkung gegenüber Raumtemperatur zu beschleunigen.



Abbildung 11 - Lagerung der Proben im Wärmeschüttelschrank in Schraubgläsern mit EDTA-Lösung

Die Dauer des Decalcifikationsprozesses war im Voraus nur grob abzuschätzen. Die für die Entkalkung mit EDTA-Lösung vorhandenen Daten (Gawlitza et al., 2021) gaben eine etwaige Orientierung. Da jedoch Unterschiede hinsichtlich Knochenstruktur und Dichte zwischen den dort verwendeten Femurproben und den für diese Arbeit untersuchten Felsenbeinproben zu erwarten waren, wurde die Lagerung der Proben in EDTA-Lösung solange fortgesetzt, bis taktil eine deutliche Konsistenzminderung festgestellt werden konnte.

Bei der manuellen Untersuchung der Proben musste mit größter Vorsicht vorgegangen werden, um die innenliegenden Zielstrukturen nicht zu beschädigen. Dadurch war nicht abzusehen, ob die inneren Bereiche der Probe bereits in gleichem Maße entkalkt waren wie die Äußeren. Nach 13 Tagen in EDTA-Lösung wurden daher zunächst von der lateralen Seite der Probe, welche entsprechend der CT-Untersuchung keine Zielstrukturen enthielt, Schnittversuche mit dem Skalpell durchgeführt. Es zeigte sich eine gute Schneidbarkeit in den äußeren Schichten, jedoch waren die tieferen Schichten nach wie vor stark kalkhaltig.

Im weiteren Verlauf erfolgten wöchentliche Wechsel der EDTA-Lösungen, um einer Aufsättigung mit Calcium Ionen vorzubeugen, darüber hinaus Kontrollen der Entkalkung und ein „Trimmen“ der Proben mittels Skalpell um bereits entkalkte Schichten zu entfernen und ein Durchdringen der tieferen Probenanteile durch die EDTA-Lösung zu erreichen.

Im Rahmen dieses Etablierungsprozesses der Entkalkungsmethode wurde, nachdem die ersten Proben 93 Tage in EDTA-Lösung gelegen hatten, eine erste Einbettung in Paraffin vorgenommen. Bei den anschließenden Schneidversuchen am Mikrotom stellte sich heraus, dass die Probe weiterhin nicht ausreichend entkalkt war, um damit zu arbeiten. Ein erfolgreiches Erstellen histologischer Schnitte war nicht möglich, da es zum Zerreißen der Schnitte und starker Abnutzung der Mikrotomklinge kam.

Da von jedem Körperspender zwei Proben (linkes bzw. rechtes Felsenbein) entnommen wurden, konnte, nachdem die erste untersuchte Probe nicht erfolgreich genutzt werden konnte, die kontralaterale zweite Probe weiterverarbeitet werden. Diese verblieb bis zur Einbettung in Paraffin weiter in EDTA-Lösung.

Aus den geschilderten Erkenntnissen erfolgte eine Anpassung des weiteren Vorgehens:

1. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme mittels einer Bandsäge zugeschnitten, um die Gesamtmasse zu verringern und den Entkalkungsprozess zu beschleunigen.
2. Die Dauer der Entkalkung in der EDTA-Lösung musste deutlich erhöht werden.
3. Auf das manuelle Trimmen der Proben wurde wegen der starken mechanischen Belastung der Proben, bei ausbleibendem Erfolg der gewünschten Entkalkung, verzichtet.

Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Proben und die jeweilige Dauer der Entkalkung bis zum erfolgreichen Erstellen der histologischen Schnitte.

<u>Journalnummer</u>	<u>Proben-entnahme</u>	<u>Einbettung in Paraffin</u>	<u>Dauer der Decalzifizierung</u>	<u>Erneuerungen der Lösung</u>
2141 L	13.05.2020	13.08.2020	93 Tage	27x
2141 R	13.05.2020	09.02.2021	270 Tage	53x
2145 L/R	15.05.2020	20.11.2020	190 Tage	51x
2146 L/R	15.05.2020	23.11.2020	193 Tage	51x
2156 L/R	23.06.2020	08.12.2020	169 Tage	40x
2157 L/R	23.06.2020	11.12.2020	172 Tage	41x
2158 L/R	23.06.2020	08.12.2020	169 Tage	40x
2193 L/R	22.08.2020	09.02.2021	172 Tage	30x
2218 L/R	02.10.2020	30.04.2021	211 Tage	23x
2220 L/R	02.10.2020	30.04.2021	211 Tage	23x
2219 L/R	02.10.2020	11.06.2021	253 Tage	27x
2221 L/R	02.10.2020	11.06.2021	253 Tage	27x
2249 L/R	12.02.2021	25.08.2021	195 Tage	20x
2250 L/R	12.02.2021	25.08.2021	195 Tage	20x
2251 L/R	12.02.2021	25.08.2021	195 Tage	20x

Tabelle 2 - Übersicht über die Decalzifizierungsprozesse der einzelnen Proben

Die weitere Bearbeitung der Probe 2141 L wurde nach dem zuvor geschilderten, nicht erfolgreichen Schneidversuch abgebrochen.

Die durchschnittliche Dauer der Decalzifizierung betrug für die erfolgreich entkalkten Proben (n = 27) 201 Tage. Dabei wurde die EDTA-Lösung im Mittel 33-mal in diesem Zeitraum gewechselt, was einer durchschnittlichen Erneuerungsfrequenz von 6 Tagen entspricht.

Auffallend war dabei, dass trotz stetiger Reduktion der Erneuerungsfrequenz der EDTA-Lösung, bei vergleichbaren Entkalkungszeiten, eine Schneidbarkeit der jeweiligen Proben realisiert werden konnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich die hohe Dauer der Entkalkung nicht, beziehungsweise nur partiell, aus einer Aufsättigung der EDTA-Lösungen mit den aus dem Knochengewebe gelösten Calcium Ionen ergibt, welcher mit einem häufigen Wechsel der Lösungen hätte entgegengewirkt werden können. Vielmehr ist davon auszugehen, dass der entscheidende Faktor für die erfolgreiche Decalzifizierung die Zeitdauer ist, welche zur vollständigen Penetration der Probe durch die EDTA-Lösung nötig war. Darüber hinaus lässt sich als weitere Variable auch eine Inhomogenität der Knochendichte der Spenderproben vermuten.

5.5 Erstellen der histologischen Schnitte

Nachdem die Proben erfolgreich entkalkt wurden, erfolgte die Entwässerung und Einbettung in Paraffin am Einbettautomaten der Firma Sakura. Dabei durchliefen die Proben eine aufsteigende Alkoholreihe (70% / 90% / 100% Ethanol), anschließend drei Stationen in 100% Xylol und schließlich zwei Stationen in flüssigem Paraffin mit einer Temperatur von ca. 60°C. Nach dem Erkalten der fertigen Paraffinblöcke und anschließender Kühlung auf -20°C, konnten erste Schnitte (4 µm Dicke) am Mikrotom angefertigt werden. Diese wurden zunächst in einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und anschließend in einem Heißwasserbad (ca. 45°C) „gestreckt“, sodass ein ebenmäßiges Auflagern auf dem Objektträger möglich ist.

Anschließend wurden die Schnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 37-45°C getrocknet. Bei dem Trocknungsprozess kam es wiederholt zu Schrumpfungsphänomenen der Schnitte auf dem Objektträger, was zur starken Ablösung führte und eine weitere Bearbeitung unmöglich machte. Daher wurden die Objektträger mit den Schnitten mit einer PTFE-Folie und einem zweiten blanken Objektträger bedeckt und über Nacht in einer Blätterpresse gelagert. Im Anschluss an diese Prozedur kam es nur noch vereinzelt zu Ablösungen der Schnitte.



Abbildung 12 - Aufsicht auf den Präparatekasten

Deutlich zu erkennen sind die zahlreichen, durch Schrumpfungsphänomene abgelösten, histologischen Schnitte auf den Objekträgern.

5.6 Erstellen der Färbungen

5.6.1 Theoretische Grundlagen der indirekten immunhistochemischen Färbung

Die indirekte Methode der immunhistochemischen Färbung beruht auf der Verwendung zweier, auf die Probe und einander abgestimmter Antikörper. Zunächst wird ein Primärantikörper auf das Präparat aufgebracht, welcher mit seinem Fab-Teil an die zu untersuchende Zielstruktur, in diesem Falle den TRPC6-Kanal, bindet. Nach Inkubation der Probe mit dem Primärantikörper folgt die Applikation des Sekundärantikörpers, der wiederum mit seinem Fab-Teil an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Der Sekundärantikörper ist in der Lage chromogene Substanzen (Farbstoffe) zu binden, welche eine lichtmikroskopische Detektion ermöglichen. Diese Methode bezeichnet man als indirekte immunhistochemische Färbung, da der nach Abschluss der Färbung detektierte Sekundärantikörper mit den Chromogenen nicht direkt an die Zielstruktur bindet, sondern die vorherige Bindung des Primärantikörpers voraussetzt. Nachfolgendes Schema soll diesen Mechanismus veranschaulichen.

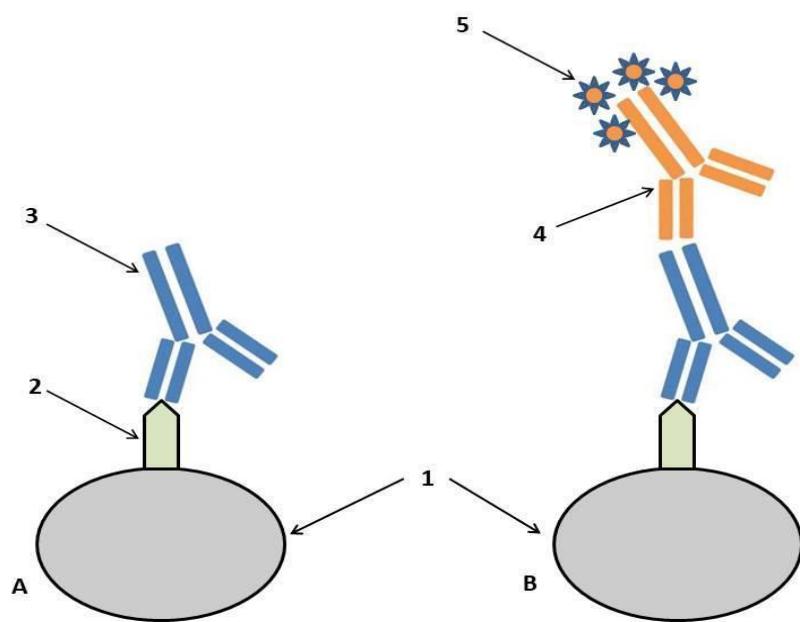


Abbildung 13 - Schematische Darstellung der indirekten immunhistochemischen Färbung

A: Zustand nach Zugabe des Primärantikörpers (Färbetag 1)

B: Zustand nach Zugabe des Sekundärantikörpers und Chromogens (Färbetag 2)

1= Körperzelle

2= zu untersuchendes TRPC6-Epitop

3= Primärantikörper

4= Sekundärantikörper

5= Chromogen-Moleküle

5.6.2 Methodik der immunhistochemischen Färbung auf TRPC6-Kanäle

Als Primärantikörper für die Untersuchung der Gewebeprobe auf die Expression von TRPC6 Proteinen wurde der Anti-TRPC6-Antikörper der Firma Alomone Labs (Ref: ACC-017; Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) genutzt. Dieser polyklonale Antikörper aus Hasen ist geeignet, um TRPC6-Proteine in verschiedenen Spezies zu detektieren, beispielsweise in Mäusen, Ratten und Menschen. Selbiger Antikörper kam auch in vorangegangen Forschungsarbeiten zur Expression von TRPC6-Proteinen in fixierten, humanen Geweben erfolgreich zum Einsatz. So zum Beispiel am humanen Herzen (Jacobs et al., 2022) oder humanem Skelettmuskel (Servello et al., 2022). Auffällig war hierbei, dass für diese Arbeit, im Vergleich zu der Arbeit von Servello et al., deutlich höhere Konzentrationen des Primärantikörpers für ein suffizientes Färbeergebnis vonnöten waren. Als Ursachen dafür kommen verschiedene Faktoren in Betracht. So ist anzunehmen, dass die Penetration durch das Fixans der in vorangegangenen Studien untersuchten Gewebe Herz-, beziehungsweise Skelett-Muskel im Rahmen der Thanatopraxie, im Vergleich zum hier untersuchten Innenohr, deutlich besser war. Durch die deutlich geringere Vaskularisierung des Innenohres ist von einem späteren Eindringen der Fixationslösung und daraus resultierenden, stärkeren autolytischen Prozessen der Zielproteine auszugehen. Weiterhin war in den zuvor genannten Forschungsarbeiten kein Decalzifizierungsprozess notwendig, der mit einer nicht unerheblichen Exposition der Gewebe gegenüber chemischen Reizen durch EDTA einherging. Auch dadurch ist ein Verlust an detektierbaren Antigen-Epitopen und ein konsekutiv erhöhter Antikörperbedarf vorstellbar. Auf die Einordnung dieser Einflussfaktoren wird in Kapitel 6.9 ausführlicher eingegangen.

5.6.3 Positivkontrolle mittels Pan-Cytokeratin Antikörper

Zur Kontrolle des prinzipiellen Erfolges des zweiten Abschnittes der indirekten immunhistochemischen Färbung, der Bindung des Sekundärantikörpers, wurde in jedem Färbevorgang ein zusätzlicher Objektträger mit dem Primärantikörper Mouse-Anti-Cytokeratin AE1/AE3 der Firma Merck (Ref: MAB3412, Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Dieser monoklonale Antikörper aus Mäusen richtet sich gegen Cytokeratine, die sowohl im Zytoskelett von Zellen als auch in vielen anderen epidermalen Geweben und der humanen Cochlea (Bauwens et al., 1991) zu finden sind. Durch diesen zusätzlichen Arbeitsschritt konnte bei unzureichendem Erfolg der TRPC6-Färbungen zwischen Problemen bei der Bindung der Primär-, beziehungsweise Sekundär-Antikörper unterschieden werden. Darüber hinaus ergaben sich daraus auch eine direkte Vergleichbarkeit der Färbeintensitäten zwischen TRPC6- und Pan-Cytokeratin-Färbungen und daraus resultierend Rückschlüsse auf die relative Expression der jeweiligen Proteine.

5.6.4 Verwendeter Sekundärantikörper und Chromogene

Für die erfolgreiche Detektion der Zielstrukturen, je nach verwendetem Primärantikörper, waren ebenfalls ein Sekundärantikörper und natürlich eine Möglichkeit der farblichen Kennzeichnung, vonnöten. Dabei wurde sich für das DAKO REAL Detektionssystem entschieden (Ref: K0005; Dako Denmark, Glostrup, Dänemark). Dieses System besteht aus drei verschiedenen Bestandteilen, welche in ihrer Funktionsweise im Folgenden erläutert werden sollen. Der erste Bestandteil ist eine Reaktionslösung mit den sekundären Antikörpern, welche jeweils mit mehreren Molekülen Biotin pro Antikörpermolekül markiert wurden. Nach der Inkubation der Probe mit diesem Reagenz und der erfolgreichen Bindung zwischen Primär- und Sekundär-Antikörpern, schließt sich die Zugabe der zweiten Reaktionslösung an, welche aus Streptavidinmolekülen besteht. Diese Streptavidinmoleküle sind ihrerseits mit mehreren Molekülen des Reporterenzymes, in diesem Falle der Alkalischen Phosphatase konjugiert. Es kommt zu einer Bindung des Streptavidins des zweiten Reagens an die Biotinmoleküle der sekundären Antikörper. Bei anschließender Zugabe des dritten Reagens, den eigentlich fargebenden Chromogenen, kommt es durch enzymatische Umsetzung selbiger durch das Reporterenzym Alkalische Phosphatase zu der schlussendlich lichtmikroskopisch sichtbaren Färbung. Ein schematischer Ablauf des Färbevorgangs mit der Streptavidin-Biotin-Methode ist in Abbildung 14 dargestellt.

Ein bedeutender Vorteil der geschilderten Methode ist die Amplifikation des Färbesignales in mehreren Ebenen:

1. Generell kann häufig mit der indirekten immunhistochemischen Färbung ein stärkeres Färbesignal erreicht werden, da bereits an jeden Primärantikörper mehr als nur ein Sekundärantikörper binden kann.
2. Durch das Vorhandensein von mehreren Biotinmolekülen pro Sekundärantikörper können jeweils mehrere Streptavidinmoleküle gebunden werden.
3. Da pro Streptavidinmolekül mehrere Moleküle der Alkalischen Phosphatase als Reporterenzym vorhanden sind, kann mehr Chromogen umgesetzt und damit sichtbar gemacht werden.

Die geschilderten Mechanismen finden als Streptavidin-Biotin-Methode vielfach Anwendung bei immunhistochemischen Färbungen, bei denen wenig Antigen im Substrat zu erwarten ist (Bratthauer, 2010; Ramos-Vara, 2011).

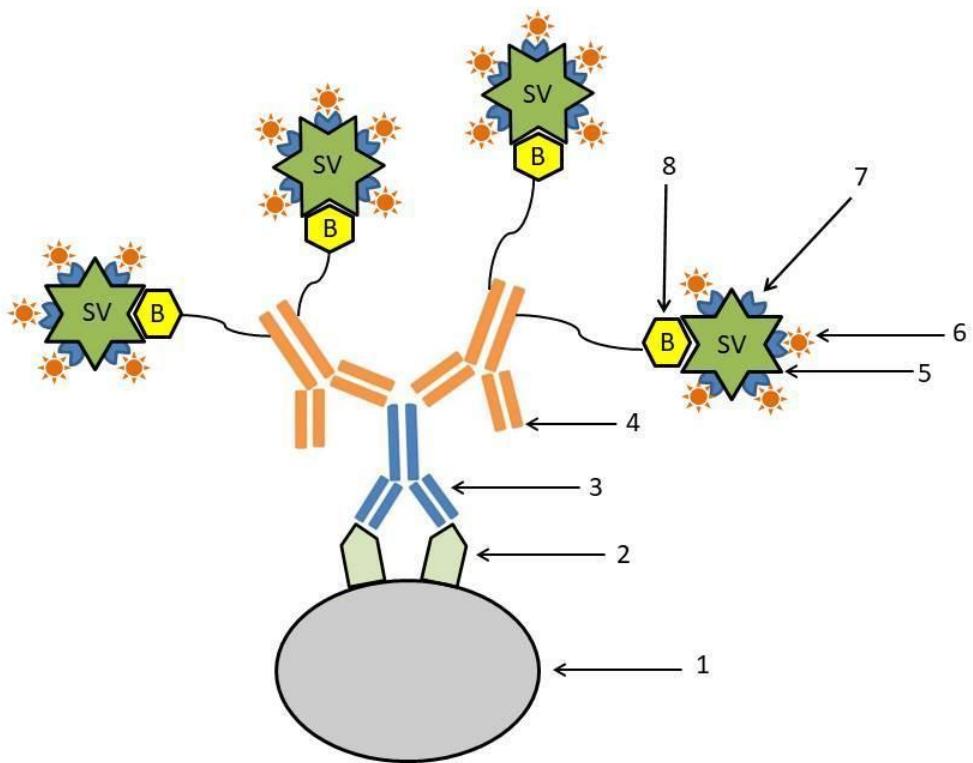


Abbildung 14 - Schematische Darstellung der verwendeten Streptavidin-Biotin-Methode zur Amplifikation der indirekten immunhistochemischen Färbung.

1= Körperzelle

2= TRPC6-Epitop

3= Primärantikörper

4= Sekundärantikörper

5= Streptavidin

6= Chromogen

7= Alkalische Phosphatase

8= an Sekundärantikörper gebundenes Biotin

SV= Streptavidin

B= Biotin

5.6.5 Spezifikationsnachweis per Peptidkontrolle

Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Färbeprüfungen, wurde zur Sicherung der Spezifität der verwendeten Methode eine Peptidkontrolle durchgeführt. Dabei wird der für die restlichen Färbungen ebenfalls verwendete TRPC6-Antikörper in gleicher Verdünnung, vor der Applikation auf den histologischen Schnitt, über Nacht mit einem speziellen Kontrollpeptid (TRPC6-Blocking Peptide, Kat.Nr: BLP-CC017, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) inkubiert. Die Kontrollpeptidlösung enthält die zu detektierenden TRPC6-Epitope in gelöster Form. Es kommt daher zu einer partiellen Bindung der Primärantikörper bereits vor Aufbringung auf den Objekträger, wodurch anschließend weniger freie Primärantikörper zur Bindung an die TRPC6-Epitope im Probengewebe zur Verfügung stehen. Daraus sind auch eine geringere Menge an bindenden Sekundärantikörpern und ein konsekutiv schwächeres Farbsignal bei der mikroskopischen Untersuchung des histologischen Schnittes zu erwarten. Zum Zwecke der Vergleichbarkeit wurde bei der Peptidkontrolle jeweils ein Schnitt aus derselben Probe und histologischen Schnittreihe mit der Standard TRPC6-Antikörperlösung, ein Schnitt mit der zuvor mit dem Kontrollpeptid inkubierten TRPC6-Antikörperlösung, eine Positivkontrolle mit Pan-Cytokeratin-Antikörper-Lösung und eine Negativkontrolle lediglich mit 1% BSA in PBS-Lösung behandelt. Dabei drückt sich eine Spezifität der verwendeten Methode in einem Färbeergebnis des Schnittes mit Peptidkontrolle aus, welches hinsichtlich der Intensität der Färbung zwischen der des standardisierten Anti-TRPC6 Färbung und der Negativkontrolle liegen sollte.

5.6.6 Theoretische Grundlagen der HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung diente für diese Arbeit während des Erstellens der passenden Schnitte zur schnellen Orientierung und zum sicheren Auffinden der Zielstrukturen im Schnitt.

Darüber hinaus war die Hämatoxylin-Färbung auch bei den immunhistochemischen Färbungen, als so genannte Gegenfärbung, unerlässlich, um einen Kontrast zu den eigentlichen Zielstrukturen darzustellen.

Dabei färbt das Hämatoxylin saure, basophile Strukturen blau an – insbesondere Zellkerne. Das Eosin dient als saurer Farbstoff dazu, basische Strukturen wie beispielweise Zellplasmaproteine rot anzufärben (Feldman & Wolfe, 2014).

Für die orientierenden Schnellfärbungen während des Erstellens der histologischen Schnitte wurde dabei eine klassische HE-Färbung durchgeführt, in den anschließenden immunhistochemischen Färbungen wurde auf das Eosin verzichtet. Dies diente der Vermeidung von falsch-positiven Färbeergebnissen, da die verwendete immunhistochemische Färbemethode ebenfalls ein rotes Farbsignal an den Zielstrukturen ergab.

5.6.7 Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbung von TRPC6-Kanälen

Als Orientierung für die Erstellung eines Färbeprotokolls dienten vorangegangene Forschungsarbeiten am anatomischen Institut der Universität des Saarlandes, welche sich ebenfalls mit der Expression von TRPC6-Kanälen, allerdings in anderen Körperteilen, befasst hatten. Da jedoch ein abweichender Sekundärantikörper verwendet wurde und darüber hinaus die für diese Arbeit verwendeten Proben durch die Decalzifizierung anderen chemischen Reizen ausgesetzt waren, musste eine eigene Färbung etabliert werden. Mit umfangreicher Unterstützung des Teams des Forschungslabors der Klinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes, konnte ein Färbeprotokoll erstellt werden, welches im Nachfolgenden erläutert wird.

Vorbereitend wurden die Objektträger mit der Journalnummer des Körperspenders, dem Datum der Schnitterstellung und dem Datum der Färbung beschriftet. Darüber hinaus wurde vor Beginn der Färbung festgelegt, welche Objektträger als Negativkontrolle, Positivkontrolle und zur TRPC6-Untersuchung genutzt werden sollten. Auch dies wurde auf dem Objektträger dokumentiert.

5.6.8 Etablierung des Färbeprotokolls

Für das Erstellen eines zuverlässigen Färbeprotokolls, wurden zunächst Proben aus der Niere eines Körperspenders verwendet, da die Expression von TRPC6-Kanälen an diesem Gewebe bereits hinreichend untersucht wurde und als gesichert angenommen werden kann (A. Dietrich & Gudermann, 2007). Weiterhin war es vorteilhaft, dass die Nierenproben nicht decalzifiziert werden mussten und die Etablierung der Färbemethode somit bereits während der Vorbereitung der restlichen Proben erfolgen konnte.

Im nachfolgenden Abschnitt sollen die einzelnen durchgeführten Schritte der immunhistochemischen Färbung erläutert werden.

5.6.9 Durchführung der immunhistochemischen Färbung Tag 1

In jedem zweitägigen Färbedurchlauf wurden jeweils acht Objektträger aus zwei Proben gefärbt. Dabei entfielen pro Probe ein Schnitt auf die Positiv- und Negati-Kontrolle und zwei Schnitte auf die Untersuchung auf TRPC6-Kanäle. Während zwei Färbedurchläufen wurde dabei je einer der mit Anti-TRPC6 Antikörper behandelten Schnitte zur Peptidkontrolle (siehe Kapitel 5.6.5) verwendet.

Entparaffinieren: Um das Paraffin aus den Schnitten zu lösen wurden die Objektträger zunächst für je 90 Sekunden durch eine Reihe aus drei 100%igen Xylol Tauchbädern geführt. Dies ist für die weitere Verarbeitung der histologischen Schnitte unbedingt erforderlich, um das Gewebe für die Färbungen zugänglich zu machen.

Rehydratisierung: Mithilfe des Durchlaufens einer absteigenden Alkoholreihe (100% / 90% / 70%) wurden die Schnitte rehydratisiert, was für die spätere Reaktion mit den in wässriger Lösung befindlichen Reagenzien nötig war.

Die zwei zuvor genannten Arbeitsschritte wurden zum Gesundheitsschutz unter dem Laborabzug durchgeführt.

Demaskierung: Die Demaskierung dient insbesondere bei fixierten Präparaten der Freilegung der Antigenen Epitope, die durch die Quervernetzung von Proteinen maskiert und damit für den Primärantikörper unzugänglich sein können (Magaki et al., 2019). Ziel der Demaskierung ist eine „Renaturierung“ der Zielproteine. Hierbei wurde sich für die gängige HIER (Heat-induced-epitope-retrieval) Methode entschieden (Pileri et al., 1997; Yamashita & Katsumata, 2017). Dazu wurden Küvetten mit einem eigens dafür hergestellten Retrievalpuffer (Citratpuffer pH 6) befüllt und in einer Mikrowelle bis zum Siedepunkt erwärmt. Die Objektträger wurden, um die Schnitte zu schonen und eine Ablösung während der Demaskierung zu verhindern, mit einer PTFE-Folie und einem blanken Objektträger bedeckt, mithilfe einer Klammer fixiert und anschließend in die Küvetten verbracht (in Anlehnung an (Eckhard et al., 2019)).



Abbildung 15 - Vorbereitung der Objektträger vor der Demaskierung mithilfe von PTFE-Folie und spezieller Klammern.

Um einer Ablösung der histologischen Schnitte während der HIER entgegenzuwirken, wurde jeder Objektträger mit einem Zuschnitt aus PTFE-Folie und einem weiteren, leeren Objektträger bedeckt und die Verbindung anschließend mit einer dafür vorgesehenen Klammer gesichert.

Anschließend erfolgte die Überführung der Küvetten in ein zuvor vorbereitetes Wasserbad in einem Reiskocher, welches auf 95°C erhitzt war. Im Verlauf der Demaskierung wurde die Temperatur innerhalb der Küvetten mit einem Einstechthermometer kontrolliert, bis eine Temperatur von 95°C erreicht war. Bei dieser Temperatur wurden die Schnitte für 15 Minuten demaskiert. Nach Abschluss der Demaskierung wurden die Küvetten aus dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten auf unter 50°C abgekühlt. Anschließend wurden die Klammern, die PTFE-Folie und der zusätzliche Objektträger entfernt.

Es folgte ein Auswaschen des Retrieval-Puffers, indem die Objektträger in drei Küvetten für je 3 Minuten in einer PBS-Pufferlösung geschwenkt wurden. Diese Phosphate-Buffered-Saline Lösung soll für die Antikörperbindung ideale Bedingungen durch adäquate Regulation des pH schaffen (Shi et al., 1995).

Zwischenzeitlich wurde eine Feuchtkammer zur Inkubation der Objektträger mit den verschiedenen Reagenzien der nächsten Arbeitsschritte vorbereitet. Diese diente dem Schutz der histologischen Schnitte vor Austrocknung und Schrumpfungsphänomenen zwischen den Arbeitsschritten und vor einem übermäßigen Verdunsten der wässrigen Anteile der Reaktionslösungen während der Inkubation, was eine Veränderung der Konzentrationen der Lösungen zur Folge gehabt hätte.

Blockierung: Um falsch-positive Bindungen des Primärantikörpers und damit übermäßig starke Hintergrundsignale zu vermeiden, wurden die Schnitte zunächst in eine Feuchtkammer überführt und anschließend mit einer 5%igen BSA (Bovine-Serum-Albumin) in PBS-Lösung bedeckt (200 µl pro Objektträger) und 30 Minuten inkubiert. Der BSA-Block wird standardmäßig bei immunhistochemischen Färbungen eingesetzt und zeigt gute Ergebnisse bezüglich der anschließenden Bindung der Primärantikörper und Vermeidung von Hintergrundsignalen (Jeyachandran et al., 2010).

Applikation Primärantikörper: Es folgte das Aufbringen der Primärantikörper. Dabei wurde für die Detektion der TRPC6-Proteine der Anti-TRPC6-Antikörper der Firma Alomone Labs (Ref: ACC-017; Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) in einer Verdünnung von 1:10 verwendet. Da jeweils vier Objektträger pro Färbevorgang auf die Expression von TRPC6-Proteinen untersucht wurden, waren dazu insgesamt 800 µl Antikörperlösung nötig. Die bei -20°C gelagerte Antikörperlösung wurde in Vorbereitung bereits in geeignete Mengen von 80 µl pro Färbedurchgang aufgeteilt und separat eingefroren. Unmittelbar vor Beginn der Färbung wurde die Antikörperlösung aufgetaut und anschließend zentrifugiert. Es folgte die Herstellung der verdünnten Lösung durch Zugabe von 720 µl 1%BSA in PBS-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 800 µl. Dieses wurde gevortext und anschließend erneut zentrifugiert, bevor es gleichmäßig zu je 200 µl auf jeden der vier Objektträger pipettiert wurde.

Für die Positivkontrolle der Färbung wurde der Mouse-Anti-Cytokeratin AE1/AE3 Antikörper in der Verdünnung 1:300 der Firma Merck (Ref: MAB3412, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Hierbei wurden je Färbedurchgang mit acht Objektträgern eine Gesamtmenge von 400 µl Lösung benötigt, die analog zum oben genannten Vorgehen aus 2 µl Antikörperlösung und 598 µl 1%BSA in PBS-Lösung hergestellt wurden. Dabei wurde sich aus Gründen der Präzision gegen das Pipettieren von Volumina unter 1 µl entschieden.

Es wurde darauf geachtet, dass jeder Schnitt gleichmäßig mit 200 µl Lösung bedeckt wurde. Die Verbleibenden 200 µl Pan-Cytokeratin-Antikörperlösung wurden verworfen. Während der Zeit zwischen Ansetzen und Applikation der Antikörperlösungen wurden diese in einer mit Eis gefüllten Styropor-Kältebox zwischengelagert.

Die Objektträger zur Negativkontrolle wurden ausschließlich mit 200 µl 1%BSA in PBS-Lösung bedeckt.

Anschließend wurden die Objektträger in der Feuchthaltekammer bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

5.6.10 Durchführung der immunhistochemischen Färbung Tag 2

In Vorbereitung auf die folgenden Färbeschritte des zweiten Tages der immunhistochemischen Färbung wurde das DAKO Real Detection System K5005 zunächst aus dem Kühlschrank entnommen. Anschließend folgt ein einstündiges Aufwärmen bei Raumtemperatur. Dazu wurden die verschiedenen Flaschen mit den Reagenzien aus der isolierenden Styropor Verpackung genommen und zur weiteren Verwendung bereitgestellt.

Zur Entfernung der primären Antikörperlösung vom Vortag erfolgten zunächst drei Waschvorgänge in einer Küvette mit PBS-Lösung bei pH 7,2 für drei Minuten. Zwischen den Waschungen wurde die Lösung jeweils erneuert.

Nachfolgend wurden alle Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchthaltekammer mit der bereits gebrauchsfertigen Lösung A des Dako Real Detektionssystems inkubiert, welche den biotinylierten Sekundärantikörper enthielt. Dabei wurden gemäß dem Datasheet, drei bis vier Tropfen Lösung pro Objektträger verwendet.

Es folgte ein weiterer Waschdurchgang analog zum oben geschilderten Vorgehen von dreimal drei Minuten in PBS.

Währenddessen wurde die Substrat-Chromogen-Lösung für den letzten Schritt der immunhistochemischen Färbung angesetzt. Dazu wurden 750 µl Alkalische-Phosphatase-Puffer nacheinander mit je 30 µl der Chromogen-Lösungen 1-3 versetzt. Nach dem Hinzufügen einer der Chromogen-Lösungen wurde das Gemisch jeweils für 30 Sekunden mit einem Vortexmixer durchmengt.

Nach Ende des Waschvorgangs wurde jeder Schnitt mit 200 µl der fertigen Substrat-Chromogen-Lösung behandelt und für 15 Minuten inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser in zwei Küvetten, wobei die Objektträger in der ersten Küvette lediglich kurz geschwenkt wurden und in der zweiten für fünf Minuten belassen wurden.

In der Zwischenzeit wurde die Gegenfärbung mit Hämatoxylin vorbereitet (Hämatoxylin Lösung nach Mayer; Ref: MHS32, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Dazu wurde die Lösung vor jeder Verwendung durch einen Zellstofffilter filtriert und in einer Färbeküvette aufgefangen.

In selbiger Küvette wurden die Schnitte für sieben Minuten in der Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Anschließend erfolgte eine zehnminütige indirekte Spülung unter fließendem Leitungswasser. Die abschließenden Arbeitsschritte wurden unter dem Laborabzug durchgeführt.

Zur Entwässerung durchliefen die Objektträger eine aufsteigende Alkoholreihe (70% / 90% / 100% Ethanol) für je 90 Sekunden, gefolgt von dreimal 90 Sekunden in drei verschiedenen Küvetten mit 100%igem Xylol.

Die letzte Behandlung der Schnitte geschah durch das Eindecken, um eine langfristige Haltbarkeit der Schnitte sicherzustellen. Dazu wurde auf jeden Schnitt ein Tropfen Entellan (Entellan Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie; Ref: 107961; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) gegeben und anschließend ein Deckglas aufgebracht. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, keine Lufteinschlüsse unter dem Deckglas zu erzeugen.

Die fertig bearbeiteten Objektträger wurden für 24 Stunden in waagerechter Position getrocknet, bevor sie mikroskopiert werden konnten.

5.6.11 Tabellarische Übersicht über die Schritte der immunhistochemischen Färbung

Nachfolgende Tabellen sollen die beschriebenen Arbeitsschritte anschaulich und übersichtlich zusammenfassen:

Tag 1	Arbeitsschritt	Durchführung
1.	Entparaffinieren (unter Laborabzug)	<input type="checkbox"/> 90 Sekunden Tauchbad 100% Xylol Küvette 1 <input type="checkbox"/> 90 Sekunden Tauchbad 100% Xylol Küvette 2 <input type="checkbox"/> 90 Sekunden Tauchbad 100% Xylol Küvette 3
2.	Rehydratisierung (unter Laborabzug)	<input type="checkbox"/> Schwenken in Küvette mit 100% Ethanol <input type="checkbox"/> Schwenken in Küvette mit 90% Ethanol <input type="checkbox"/> Schwenken in Küvette mit 70% Ethanol
3.	Vorbereitung Demaskierung	<input type="checkbox"/> Ansatz Citratpuffer pH 6 <input type="checkbox"/> Klemmen der Objektträger mit PFTE-Folie
4.	Demaskierung (zwei Durchläufe mit je vier Objektträgern)	<input type="checkbox"/> 15 Minuten Wasserbad im Reiskocher bei 95°C <input type="checkbox"/> 30 Minuten abkühlen lassen auf < 50°C
5.	Waschdurchlauf	<input type="checkbox"/> 3x3 Minuten in PBS pH 7,2
6.	Blockierung	<input type="checkbox"/> 30 Minuten Inkubation mit 5% BSA in PBS bei Raumtemperatur in Feuchthaltekammer
7.	Applikation Primärantikörper	<input type="checkbox"/> Je 200 µl Lösung pro Schnitt auf pipettieren: <input type="checkbox"/> Untersuchung: Anti-TRPC6-AK Lösung 1:10 <input type="checkbox"/> Positivkontrolle: Mouse-Anti-Cytokeratin-AK Lösung 1:300 <input type="checkbox"/> Negativkontrolle: 1% BSA in PBS <input type="checkbox"/> Zusätzlich ggf. ein Objektträger mit Peptidkontrolle
8.	Inkubation Primärantikörper	<input type="checkbox"/> Über Nacht bei 4°C im Kühlschrank in Feuchthaltekammer

Tabelle 3 - Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung Tag 1

<u>Tag 2</u>	<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Durchführung</u>
1.	Detektionssystem vorbereiten	<input type="checkbox"/> Eine Stunde bei Raumtemperatur aufwärmen lassen
2.	Waschdurchlauf	<input type="checkbox"/> 3x3 Minuten in PBS pH 7,2
3.	Applikation Sekundärantikörper	<input type="checkbox"/> 3-4 Tropfen Lösung biotinylierter Sekundärantikörper je Objektträger <input type="checkbox"/> Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Feuchthaltekammer
4.	Waschdurchlauf	<input type="checkbox"/> 3x3 Minuten in PBS pH 7,2
5.	Applikation Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Lösung	<input type="checkbox"/> 3-4 Tropfen Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Lösung pro Objektträger <input type="checkbox"/> Inkubation 30 Minuten bei Raumtemperatur in Feuchthaltekammer
6.	Waschdurchlauf	<input type="checkbox"/> 3x3 Minuten in PBS pH 7,2
7.	Vorbereitung Substrat-Chromogen Lösung	<input type="checkbox"/> 750 µl AP-Puffer mit je 30 µl Chromogen 1-3 versetzen <input type="checkbox"/> Nach Zugabe eines Chromogens Durchmischen im Vortexmixer
8.	Applikation Substrat-Chromogen Lösung	<input type="checkbox"/> 200 µl pro Objektträger auf pipettieren <input type="checkbox"/> Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Feuchthaltekammer
9.	Spülung	<input type="checkbox"/> Schwenken in Küvette mit destilliertem Wasser <input type="checkbox"/> Belassen der Objektträger in Küvette mit destilliertem Wasser für 5 Minuten
10.	Gegenfärbung mit Hämatoxylin	<input type="checkbox"/> Objektträger für 7 Minuten in gefilterter Hämatoxylin Lösung belassen
11.	Spülung	<input type="checkbox"/> 10-minütige indirekte Spülung unter fließendem Leitungswasser
12.	Dehydratisierung (unter Laborabzug)	<input type="checkbox"/> Schwenken in Küvette mit 70% Ethanol <input type="checkbox"/> Schwenken in Küvette mit 90% Ethanol <input type="checkbox"/> Schwenken in Küvette mit 100% Ethanol
13.	Vorbereitung des Eideckens (unter Laborabzug)	<input type="checkbox"/> 90 Sekunden Tauchbad 100% Xylol Küvette 1 <input type="checkbox"/> 90 Sekunden Tauchbad 100% Xylol Küvette 2 <input type="checkbox"/> 90 Sekunden Tauchbad 100% Xylol Küvette 3
14.	Eidecken (unter Laborabzug)	<input type="checkbox"/> Applikation eines Tropfens Entellan pro Objektträger <input type="checkbox"/> Aufbringen des Deckglases <input type="checkbox"/> 24 Stunden Trocknung bei Raumtemperatur

Tabelle 4 - Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung Tag 2

5.7 Ethikvotum

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Proben stammen aus den Köpern von Körperspendern, welche sich vor ihrem Tod aus freiem Willen dazu bereit erklärt hatten, ihren Körper der Wissenschaft zur Verfügung zu stellen.

Die durchgeführte Forschung wurde von der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Hinsichtlich der Untersuchung auf TRPC6 und andere Ionenkanäle am Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes lautet die zugehörige Kennnummer 163/20.

5.8 Verwendete Geräte und Chemikalien

5.8.1 Verwendete Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung / Hersteller</u>
Computertomograph	Somatom Force, Siemens Healthineers, Erlangen, DE
Fotomikroskop	Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Tokyo, JP
Oszillierende Säge	GL 2000/83, OSCILLOW, DE
Einbettautomat	Histocentre 2, Shandon Diagnostics Ltd, Cambridge, UK
Mikrotom	Leica SM2000R, Leica Biosystems, Deer Park IL, US
Wärme- /Schüttelschrank	311DS Labnet, Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, DE
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, US
Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus, Hanau, DE
Pipette	Transferpette S, BRAND GmbH, Wertheim, DE
pH-Meter	WTW pH 197, Xylem Analytics, Weilheim, DE
Feinwaage	KERN 510, KERN & Sohn GmbH, Balingen, DE
Entwässerungsautomat	Tissue-Tek VIP 5Jr., Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL
Bandsäge	cut-grinder 011/110, patho-service GmbH, Hamburg, DE

Tabelle 5 - Übersicht über die verwendeten Geräte

5.8.2 Verwendete Chemikalien und Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Primärantikörper	- Anti-TRPC6-AK #ACC-017, Lot.Nr: #ACC017AN4702, v.8.5.20, Alomone Labs, Jerusalem, IL - Anti-CK AE1 / AE 3 MAB3412, Lot.Nr: 3201692, Chemicon GmbH, Limburg an der Lahn, DE
Sekundärantikörper	Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies, Rabbit/Mouse, Dako Denmark, Glostrup, DK
Kontrollpeptid	TRCP6 Blocking Peptide, Kat.Nr: BLP-CC017, Alomone Labs, Jerusalem, IL
Detektionssystem	Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, Dako Denmark, Glostrup, DK
EDTA	Grafox Chemie, Babenhausen, DE
Citronensäure-Monohydrat cryst.	Ch.-B. 20003892002, Caesar & Lorentz GmbH, Hilden, DE
PBS-Pufferlösung	Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes Ch: 4720I-07928, Homburg, DE
Haematoxylin-Lösung	Lot.Nr.: #SLCG9022, Sigma-Aldrich, St. Louis, US
4% gepufferte Formaldehyd-Lösung	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol 99%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE
Xylol 100%	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Entellan	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
BSA pH 7.0	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE
Fixierlösung nach Weigner	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Konservierungslösung nach Basler	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland

Tabelle 6 - Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Antikörper

6. Ergebnisse und Auswertung

6.1 Einführung

Unter den Gesichtspunkten der eingangs in dieser Arbeit formulierten Fragestellungen wurden die histologischen Schnitte nach Durchführung der immunhistochemischen Färbungen mikroskopisch begutachtet. Dabei sollte zunächst festgestellt werden, ob sich Anschnitte der Cochlea im betreffenden Schnitt befinden und welche cochleären Leitstrukturen sich identifizieren lassen. Im Folgenden wurden die identifizierten Strukturen dann hinsichtlich ihres Färbeverhaltens untersucht. Über die Intensität der Färbung einer bestimmten Leitstruktur konnten Rückschlüsse auf das Expressionsmuster von TRPC6-Kanälen im betrachteten Gewebe gezogen werden.

Es erfolgte ein Vergleich der mit Anti-TRPC6-Antikörpern gefärbten Schnitte mit der jeweiligen Negativkontrolle, welche zu jedem Schnitt zusätzlich angefertigt wurde. Weiterhin erfolgte anhand von zwei Färbedurchgängen eine Kontrolle der Spezifität der durchgeführten immunhistochemischen Färbung mittels eines Kontrollpeptids (vergleiche Kapitel 5.6.5).

Es wurde in Abhängigkeit der darzustellenden Struktur und ihrer Größe in verschiedenen mikroskopischen Vergrößerungsstufen gearbeitet. Mittels einer, dem Mikroskop aufgesetzten, Kamera und der zugehörigen Software wurden anschließend die Fotos erstellt, welche in dieser Arbeit dargestellt werden.

6.2 Umfang der ausgewerteten Proben

Durch die umfangreiche Etablierungsphase hinsichtlich des Decalzifizierungsprozesses bis hin zur Schneidbarkeit der Proben mittels Mikrotoms, sowie der anschließenden Erstellung eines zuverlässigen Färbeprotokolls, war im Voraus mit einem gewissen Anteil an nicht verwendbaren Proben zu rechnen. Darüber hinaus waren bei unterschiedlichen postmortalen Intervallen der Körperspender aberrante Färbeergebnisse durch die ungleich fortgeschrittenen autolytischen Prozesse zu erwarten.

Drei der entnommenen Felsenbeine waren notwendig, um den Decalzifizierungsprozess zu etablieren. Durch wiederholtes Ausblocken in Paraffin, anschließende Schneidversuche mit dem Mikrotom und erneutem Erhitzen der Probe, um das Paraffin zu lösen und die Entkalkung fortzusetzen, waren diese Proben einem hohen Maß an chemischem und physikalischem Stress ausgesetzt.

Es wurde sich daher dagegen entschieden, an diesen Proben eine immunhistochemische Färbung zu etablieren, da die Fehlerquellen bei Nichterfolg durch die o.g. Vorbehandlung als zu zahlreich gewertet wurden.

Nachdem die Decalzifizierung hinsichtlich der Schneidbarkeit der Proben erfolgreich etabliert werden konnte, schloss sich die histologische Aufarbeitung an. Dabei kam es erneut zu unterschiedlichen Komplikationen. Hinsichtlich des makroskopischen Aspekts stellte sich das bereits im Kapitel 5.5 gezeigte Problem der Ablösung der Schnitte vom Objektträger, mutmaßlich durch Schrumpfungsphänomene als Herausforderung dar. Mikroskopisch zeigten sich dadurch die anfänglichen Schnitte als physikalisch so stark beschädigt, dass eine verlässliche Auswertung nicht möglich war. Die Beschädigung der Schnitte wurde auf einen zu hohen Restgehalt an Calcium und damit erhöhter Dichte des Gewebes zurückgeführt. Diese Theorie erklärte sowohl die makroskopischen Schrumpfungsphänomene, als auch die mikroskopischen Schäden, welche am ehesten durch Zerreißungen des Gewebes beim Schneiden mit dem Mikrotom entstanden sein könnten.

Als Reaktion auf die o.g. Problematiken wurde die Decalzifizierungszeit erhöht, sowie die Proben nach der Entnahme noch mit einer Bandsäge zugeschnitten, um eine bessere Penetration der Proben durch die EDTA-Lösung zu realisieren.

Insgesamt waren die Maßnahmen erfolgreich und es konnte, hinsichtlich des Struktur- und Färbeaspekts, eine deutliche Verbesserung der Qualität der histologischen Schnitte erreicht werden.

Von den insgesamt 28 entnommenen und anschließend decalzifizierten Felsenbeinen der Körperspender konnten 25 für die Erstellung histologischer Schnitte genutzt werden. Von diesen 25 prinzipiell schneidbaren Proben, konnten aus 15 Proben histologische Schnitte erstellt werden, die hinsichtlich der erkennbaren Strukturen und des immunhistochemischen Färbeverhaltens aussagekräftig waren und für die Auswertung dieser Arbeit verwendet wurden.

6.3 Prinzip der Auswertung

Bezüglich der Bewertung des Färbeverhaltens wurde ein Auswertungsschema erstellt. Dabei wurden drei Stufen der Färbeintensität festgelegt. Aufgrund der für diese Arbeit verwendeten Färbemethode ist ein positives Färbesignal an einer deutlichen Rot/Rosa-Färbung des Gewebes zu erkennen. Es erfolgte dabei zunächst eine Begutachtung des gesamten histologischen Schnittes in der kleinstmöglichen Vergrößerung (4-fache Vergrößerung). Anschließend wurden die gesuchten Zielstrukturen in aufsteigender Vergrößerung (10-fache Vergrößerung und 40-fache Vergrößerung) aufgesucht, sicher identifiziert und hinsichtlich des Färbeverhaltens bewertet. Als Vergleichsreferenz bezüglich des Färbesignales wurden Proben aus der Niere eines Körperspenders verwendet, welche mit demselben Färbeprotokoll wie die cochleären Proben gefärbt wurden. Da die Expression von TRPC6-Kanälen im Bereich der humanen Niere bereits hinlänglich untersucht und belegt ist (Winn et al., 2005), wurde diese Referenzbasis als legitim bewertet.

Auf der niedrigsten Stufe „0“ ließ sich keine signifikante Färbung der jeweiligen Struktur im Vergleich zum gesamten Färbeverhalten des Schnittes oder der Negativkontrolle feststellen. Strukturen dieser Stufe wurden dementsprechend als negativ hinsichtlich der Expression von TRPC6-Kanälen gewertet.

Die Stufe „1“ zeigte ein abgrenzbares positives Färbesignal im Vergleich zur Negativkontrolle an, welches jedoch verhältnismäßig schwach ausgeprägt war.

Die Stufe „2“ zeigte ein deutlich positives Färbesignal der gewählten Struktur im Vergleich zur Negativkontrolle an.

Die nachstehende Tabelle soll dieses Schema verdeutlichen.

Stufe	Kriterien
0	<input type="checkbox"/> Keine Rotfärbung der Zielstruktur
1	<input type="checkbox"/> Rotfärbung sichtbar <input type="checkbox"/> Schwächer ausgeprägt als in Stufe 2
2	<input type="checkbox"/> Deutliche Rotfärbung

Tabelle 7 - Auswertungsschema für die Beurteilung der Färbesignale und damit verbunden Expression von TRPC6-Kanälen in den immunhistochemischen Färbungen.

Die Auswertung wurde für die Leitstrukturen stets nach oben genanntem Schema durchgeführt. Die Ergebnisse wurden tabellarisch erfasst.

Zur Objektivierung der Auswertungsergebnisse wurde die Auswertung nach gleichem Schema von einer unabhängigen Person im Sinne einer Fremdauswertung wiederholt. Diese Person verfügte über hinreichende histologische Kenntnisse, um die Zielstrukturen zu erkennen und das Färbeverhalten zu bewerten.

6.4 Ergebnispräsentation der quantitativen und qualitativen Auswertung

6.4.1 Histologische Ergebnisse des Nachweises einzelner Leitstrukturen

Die Identifikation der Leitstrukturen erfolgte nach eigener Kenntnis des Autors, unterstützt durch die Verwendung histologischer Fachliteratur. Dabei wurde insbesondere auf die räumliche Beziehung der Strukturen zueinander geachtet, um ein sicheres Erkennen zu ermöglichen. Bei verbleibenden Unsicherheiten wurde die Struktur als nicht sicher nachweisbar gewertet.

Anhand der nachfolgenden mikroskopischen Photographien sollen die identifizierten Leitstrukturen exemplarisch dargestellt werden. Dabei werden die Photographien in diesem Teil der Auswertung ausschließlich hinsichtlich des Vorhandenseins der Zielstrukturen bewertet, nicht jedoch nach dem Färbeverhalten.

Es zeigte sich dabei ein deutlich unterschiedliches Nachweismuster für einzelne Strukturen. Insbesondere verhältnismäßig große Strukturen (wie beispielsweise das Corti-Organ) waren zumeist darstellbar. Mit abnehmender Größe und mutmaßlich resultierender Vulnerabilität der Strukturen hinsichtlich des physikalischen und chemischen Stresses im Rahmen der Probenaufbereitung und immunhistochemischen Färbungen sank die Anzahl der Nachweise.

Dennoch konnten sämtliche gesuchte Leitstrukturen mehrfach (vergleiche Tabelle 8) identifiziert werden, sodass eine spätere Aussage über deren Färbeverhalten repräsentativ und zulässig ist.

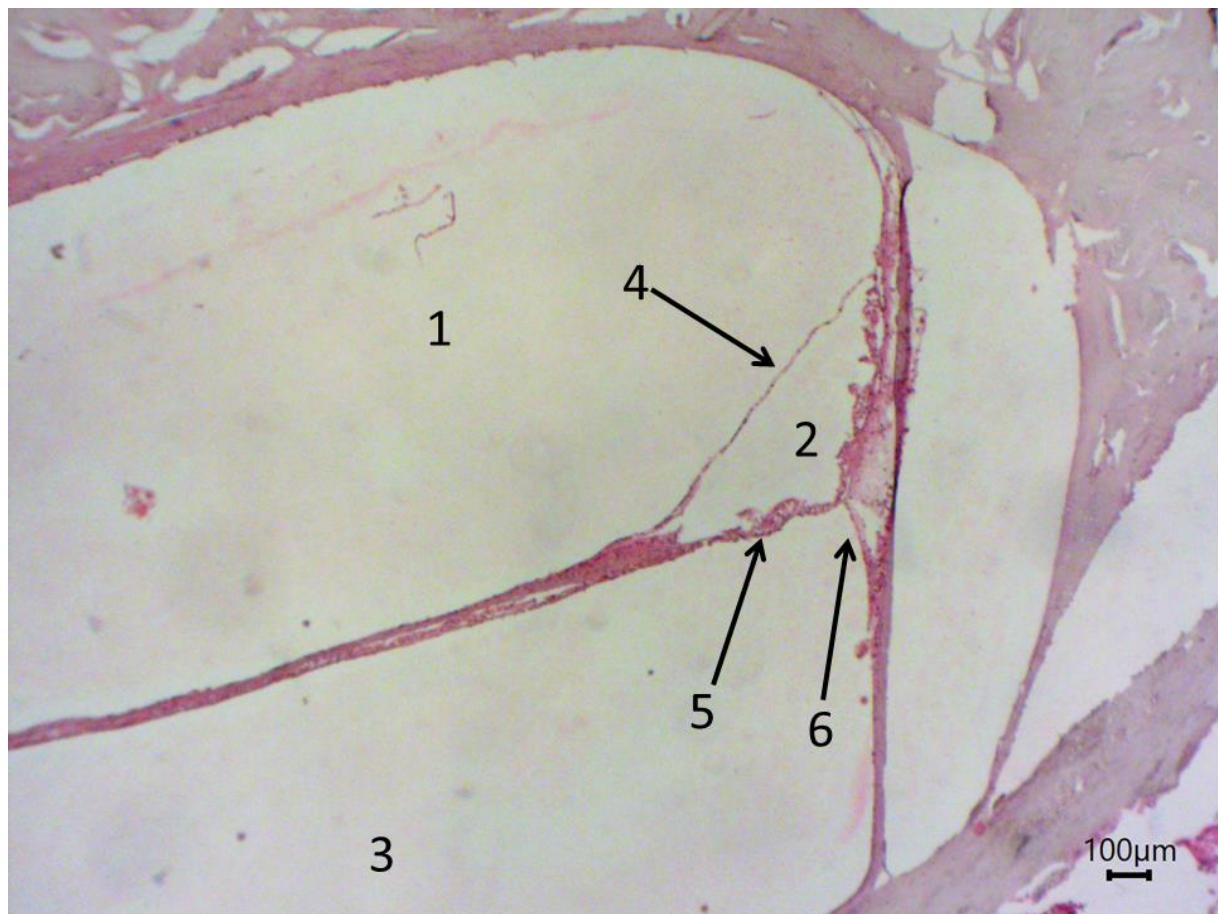


Abbildung 16 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2193R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Scala vestibuli

2= Scala media

3= Scala tympani

4= Reissner-Membran

5= Basilar-Membran mit aufsitzendem Corti-Organ

6= Stria vascularis

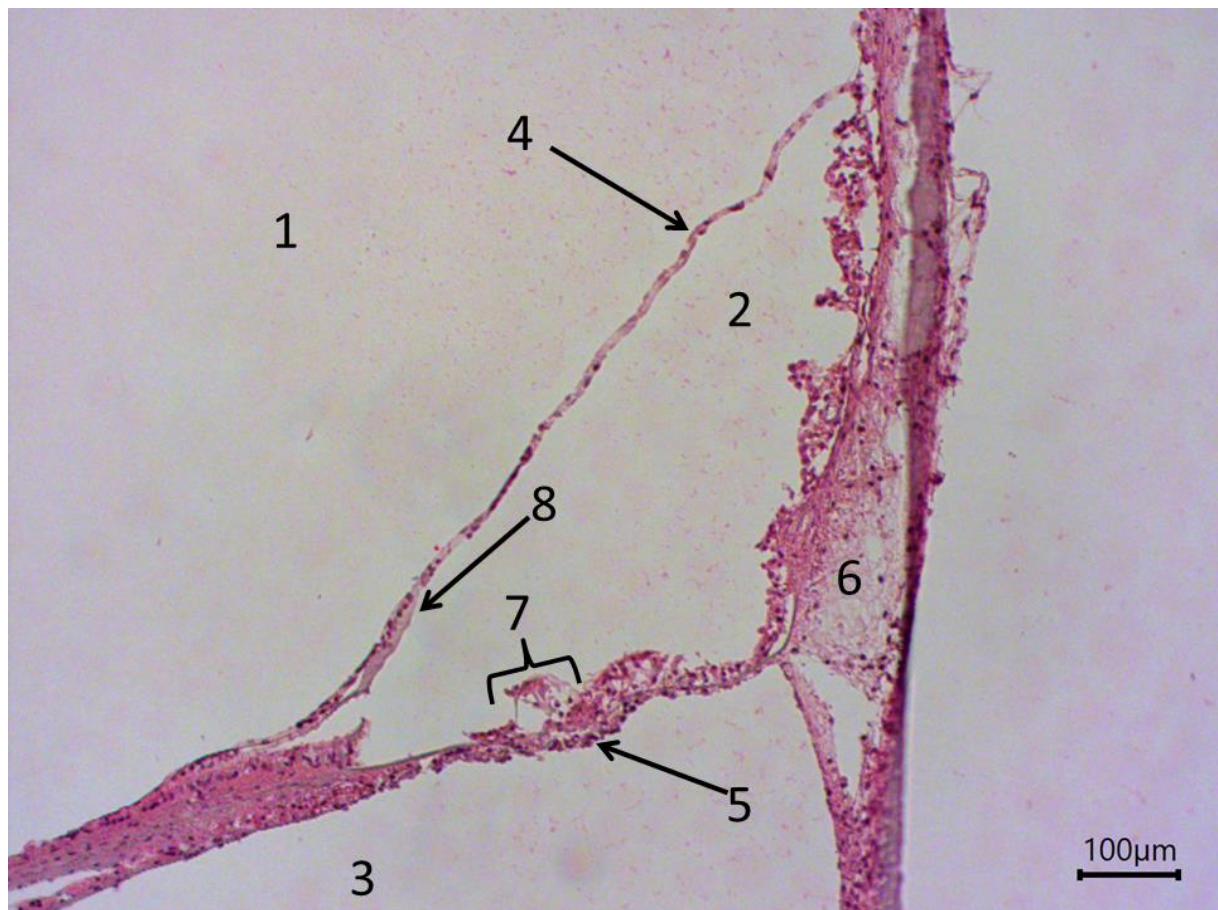


Abbildung 17 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2193R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Scala vestibuli

2= Scala media

3= Scala tympani

4= Reissner-Membran

5= Basilar-Membran mit aufsitzendem Corti-Organ

6= Stria vascularis

7= Corti-Organ

8= Tectorial-Membran (in Richtung der Reissner-Membran disloziert)

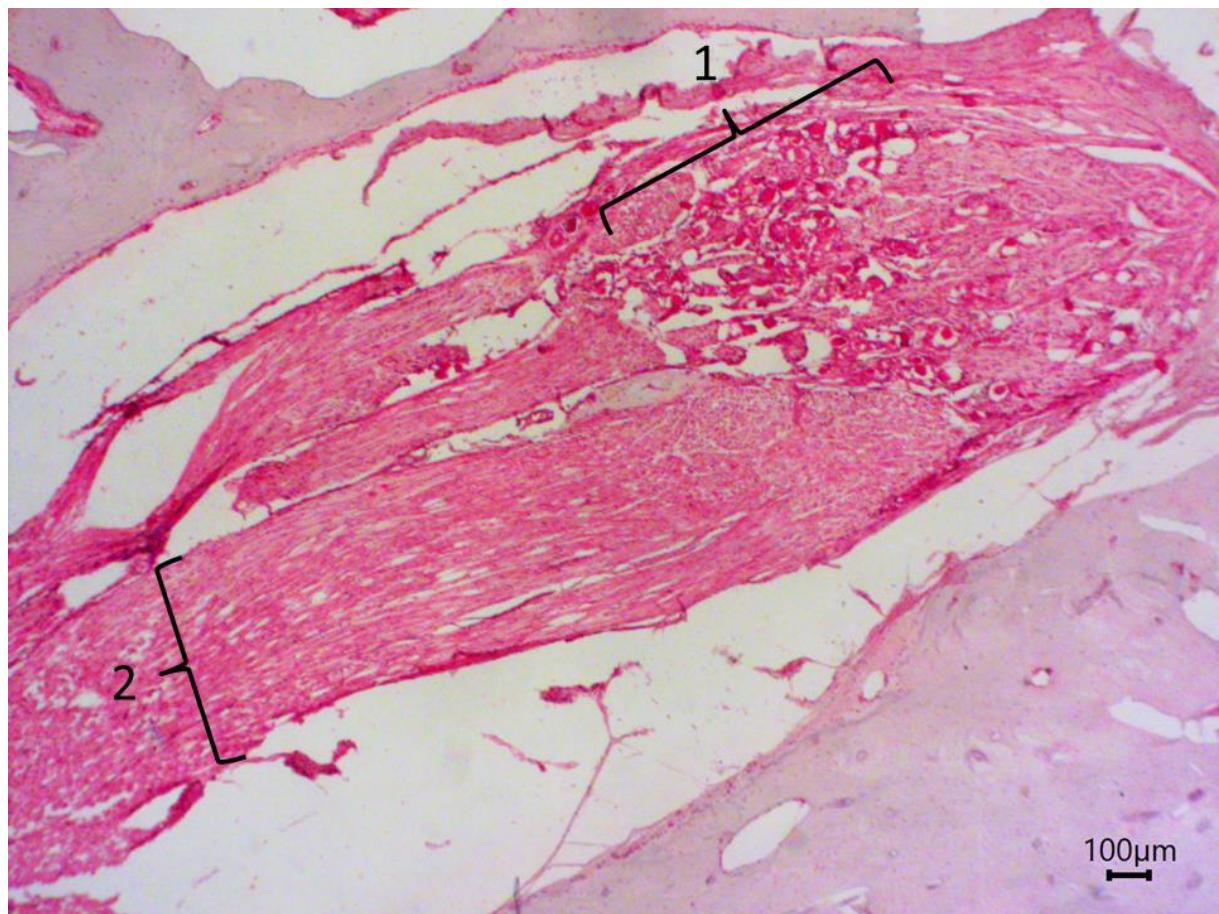


Abbildung 18 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= *Ganglion spirale*

2= *Fasern des Nervus cochlearis*

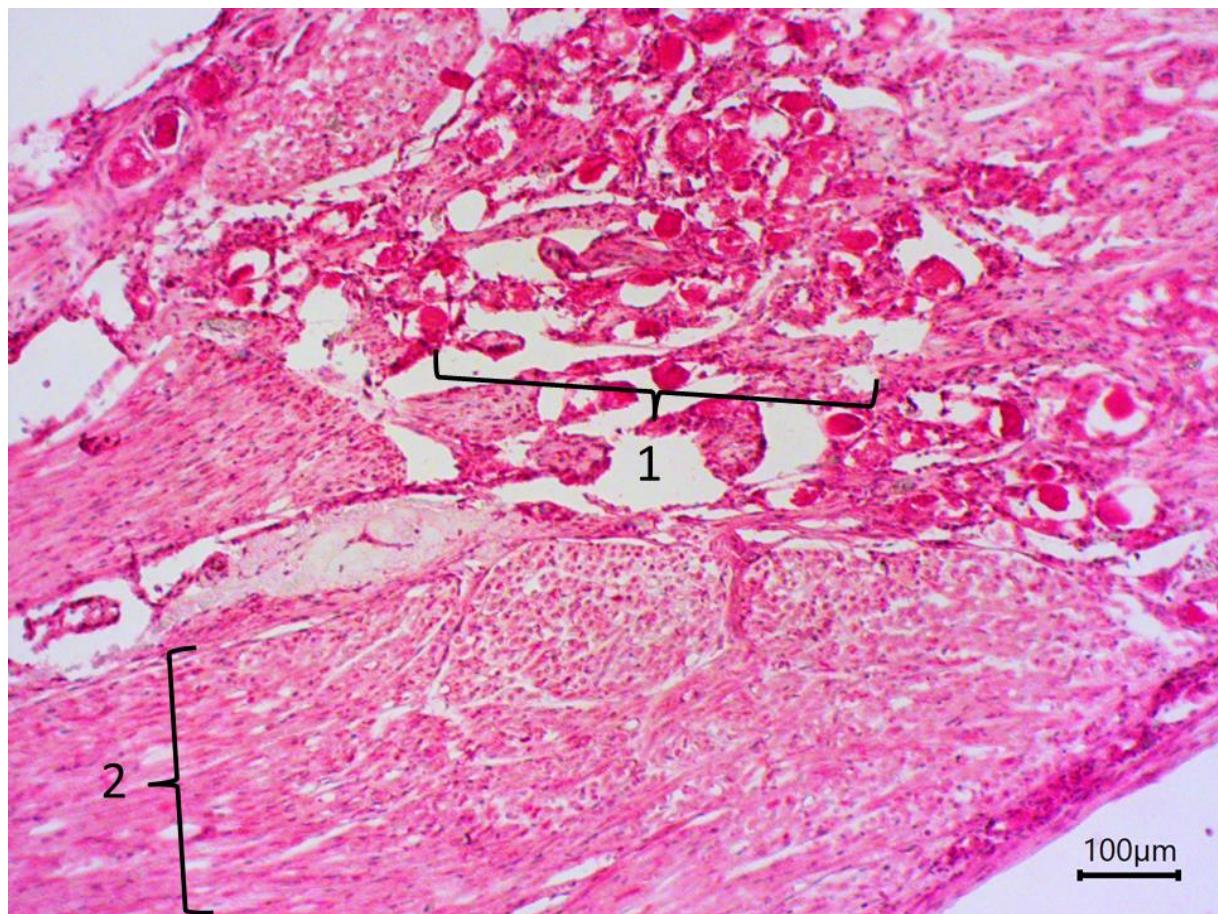


Abbildung 19 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Ganglion spirale mit Perikarien

2= Axone des Nervus cochlearis in axialem und longitudinalem Anschnitt

6.4.2 Statistische Ergebnisse des Nachweises einzelner Leitstrukturen

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Auswertung der für diese Arbeit verwendeten immunhistochemisch gefärbten Schnitte tabellarisch und graphisch dargestellt. Dazu erfolgt zunächst je eine tabellarische Übersicht der Ergebnisse hinsichtlich der identifizierten Leitstrukturen in den für die Auswertung verwendeten Proben, sortiert nach Journalnummern der Körperspender.

<u>Journal- Nummer</u>	<u>Corti- Organ</u>	<u>Tekorial- Membran</u>	<u>Reissner- Membran</u>	<u>Basilar- Membran</u>	<u>Stria Vascularis</u>	<u>Ganglion spirale</u>	<u>Nervus cochlearis</u>
2141L	-	-	-	+	+	+	+
2141R	-	-	+	+	+	-	-
2145L	-	-	-	-	-	-	+
2145R	+	+	+	+	+	-	-
2146R	+	+	+	+	+	+	+
2156R	-	-	-	-	-	+	+
2157L	-	-	-	+	+	-	-
2193L	-	-	-	+	+	-	-
2193R	+	+	+	+	+	-	-
2218L	-	-	-	+	+	-	+
2219L	+	+	+	+	+	-	-
2220L	-	-	+	+	+	+	+
2220R	+	+	+	+	+	-	-
2221L	+	+	+	+	+	-	+
2221R	+	+	+	+	+	-	+

Tabelle 8 - Darstellung der Ergebnisse der Auswertung der histologischen Schnitte im Hinblick auf die identifizierbaren cochleären Leitstrukturen, geordnet nach Journalnummer des betreffenden Körperspenders.

Ein „+“ steht hierbei dafür, dass die betreffende Leitstruktur in der Probe nachweisbar war, ein „-“ steht für keinen oder nicht sicheren Nachweis.

Die Auflistung der Körperspender erfolgte in chronologischer Reihenfolge der Probenentnahme, der Decalzifizierung und damit auch der histologischen Aufarbeitung und immunhistochemischen Färbung. Auffällig ist hierbei die steigende Anzahl der darstellbaren Leitstrukturen je Probe mit dem zeitlichen Verlauf. Dieses Ergebnis ist nach Einschätzung des Autors auf die Verbesserung der einzelnen Arbeitsschritte im Rahmen der Probenaufbereitung und den damit verbundenen besseren Erhalt der histologischen Strukturen zurückzuführen.

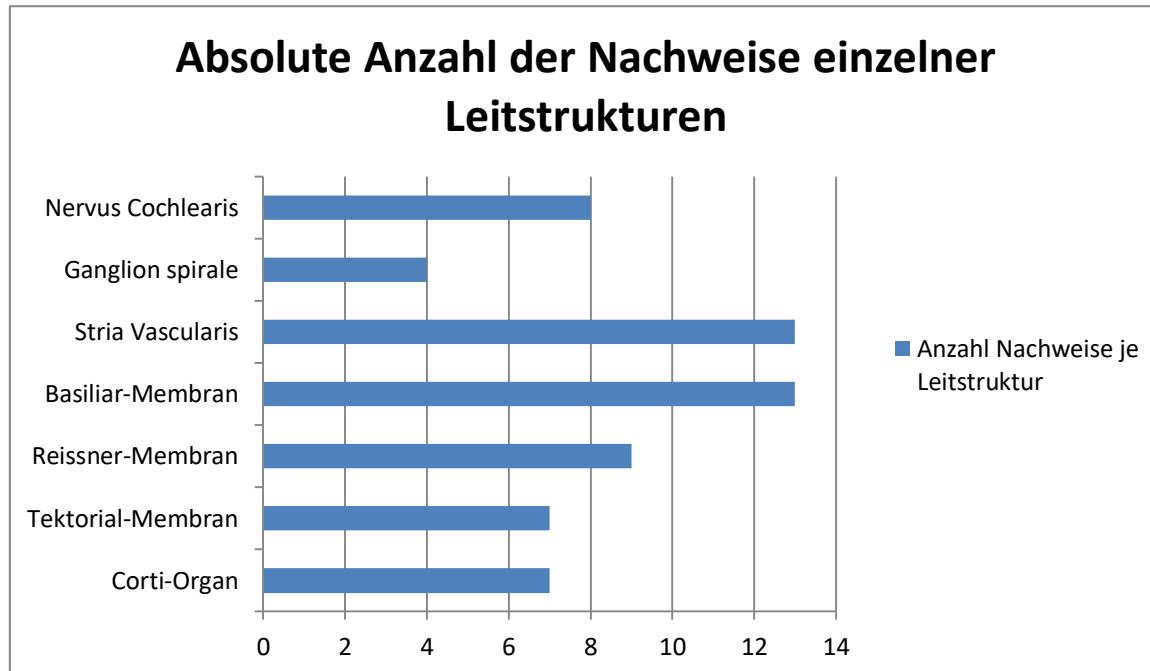


Diagramm 1 - Darstellung der absoluten Anzahl der Nachweise einzelner cochleärer Leitstrukturen in den untersuchten Proben in Form eines Balkendiagramms.

6.5 Darstellung der Färbeergebnisse in den mikroskopischen Aufnahmen

Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in Form mikroskopischer Photographien dargestellt. Dadurch sollen die erlangten Ergebnisse veranschaulicht und eine Nachvollziehbarkeit der anschließenden statistischen Auswertung und folgender Rückschlüsse erreicht werden. Zum Zwecke der Übersichtlichkeit werden die Bilder dieses Kapitels nach Leitstrukturen geordnet präsentiert.

Dabei erfolgt eine Gegenüberstellung der einzelnen histologischen Schnitte und der Zielstrukturen in der Anti-TRPC6-Antikörperfärbung, der Negativkontrolle und gegebenenfalls der Spezifitätskontrollen mittels Peptidinkubation, in verschiedenen Vergrößerungsstufen.

Aufgrund der topographischen Nähe einiger Leitstrukturen, werden diese zusammen behandelt und dargestellt.

Das Corti-Organ und die Tektorial-Membran haben im Verbund eine zentrale Bedeutung für den Hörvorgang. Das Corti-Organ enthält dabei die inneren Haarzellen, deren Stereozilien für die elektromechanische Kopplung und die Entstehung des Sensorpotentials unerlässlich sind, sowie die äußeren Haarzellen mit Kontakt zur Tektorial-Membran, welche bei der Verstärkung der Wanderwelle maßgeblich beteiligt sind (Oghalai, 2004).

Die Funktion von TRPC6-Kanälen im Hörvorgang und insbesondere bei den physiologischen Vorgängen im Corti-Organ ist Gegenstand der jüngeren Forschung, daher ist der positive Nachweis dieser Kanäle in den betrachteten humanen Proben von großem Interesse (X. Wu et al., 2016).

Auch hinsichtlich ihrer Rolle bei den physiologischen Leitvorgängen in nervalen Strukturen werden TRPC6-Kanäle aktuell erforscht (Wang et al., 2020), daher sind auch die Färbeergebnisse und die Rückschlüsse über die Expressionsmuster der Kanäle des Nervus cochlearis und des Ganglion spirale zu untersuchen.

Unter den untersuchten bindegewebigen Strukturen fällt ein besonderes Augenmerk auf die Stria vascularis mit ihren namensgebenden Blutgefäßen, bei Reissner-Membran und Tektorial-Membran sind nach bisherigem Kenntnisstand, ob des Mangels an nervalen, vaskulären oder ähnlichen funktionalen Binnenstrukturen mit TRPC6-Beteiligung, eher schwächere Färbeergebnisse zu erwarten.

6.5.1 Färbereferenz anhand Probefärbungen an der humanen Niere

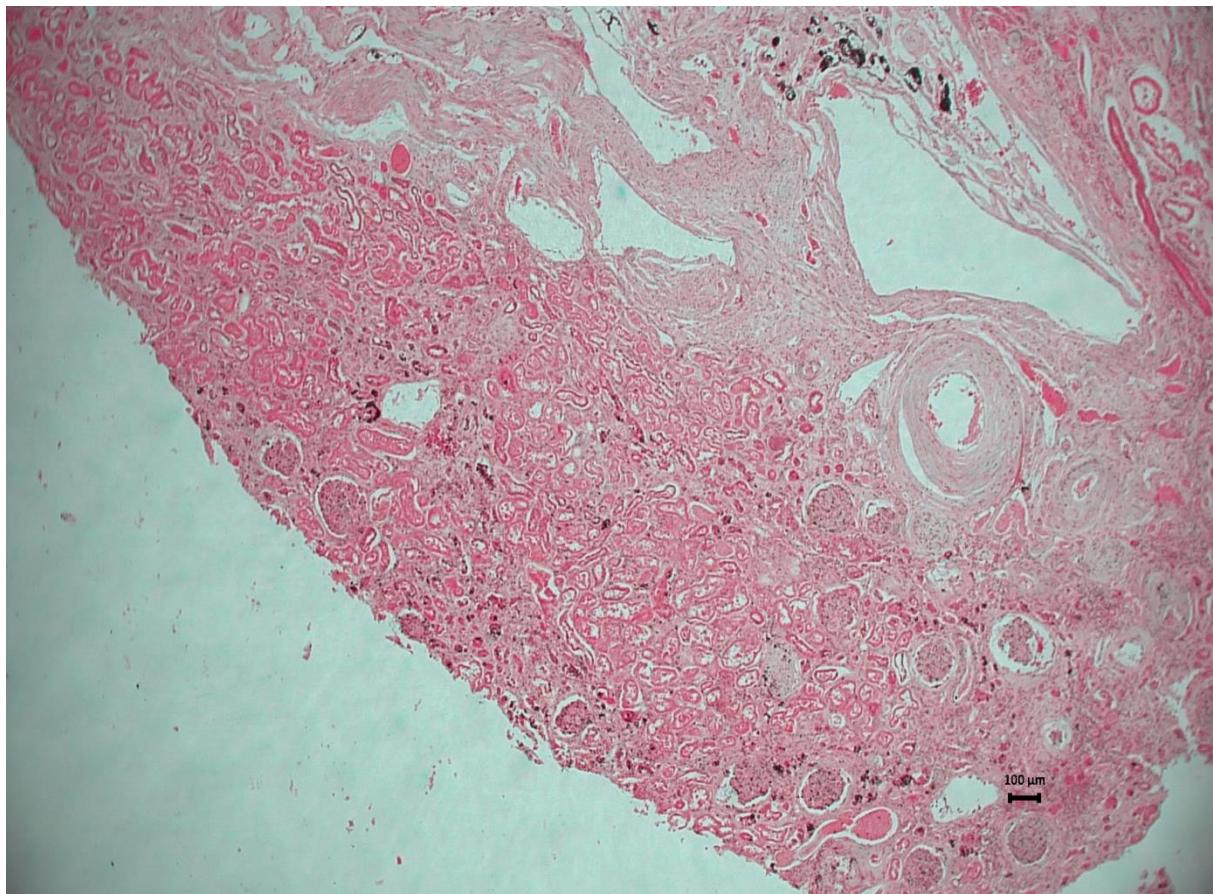


Abbildung 20 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Niere (Journalnummer 2151) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Über den gesamten Schnitt ist ein deutlich positives Färbesignal zu beobachten. Dies diente als Referenz für die Bewertungsstufe 2.

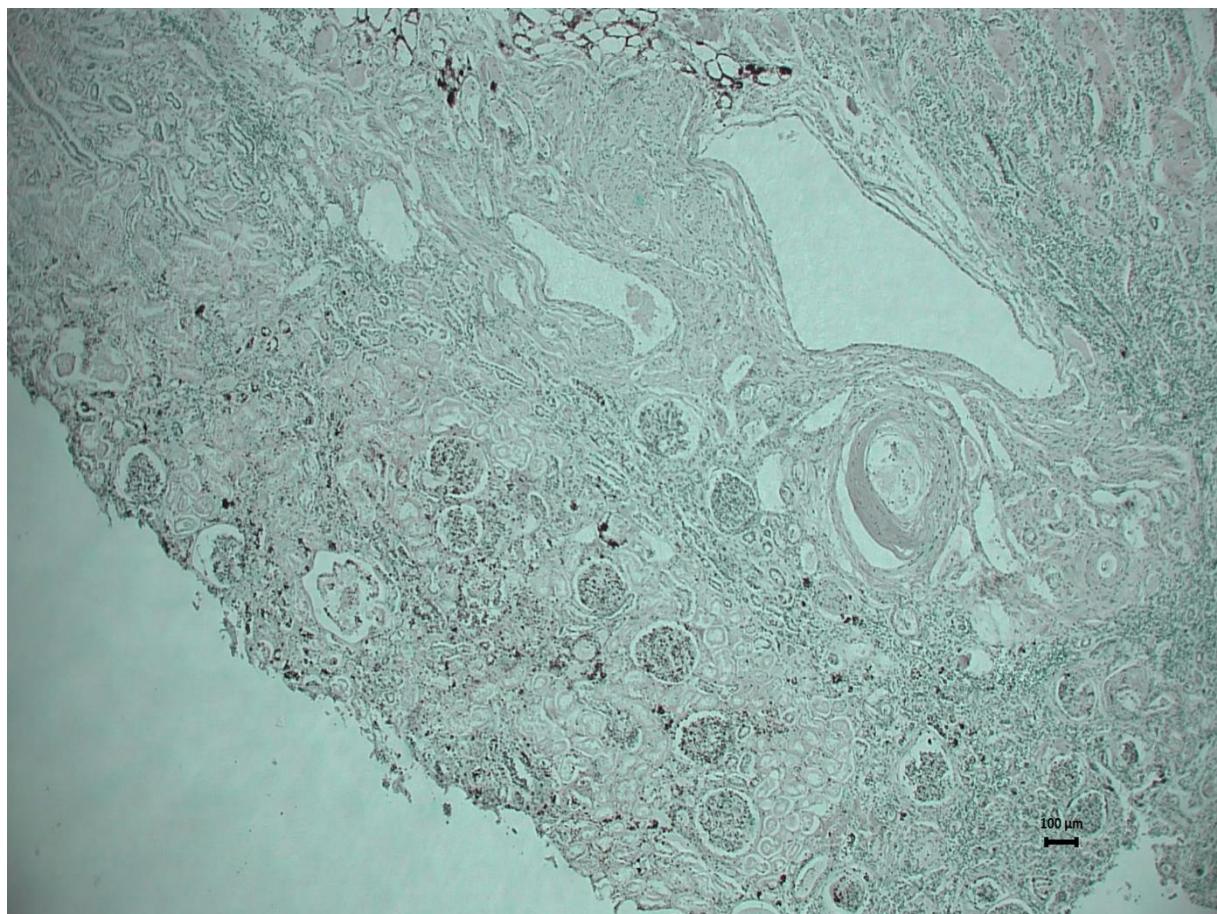


Abbildung 21 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Niere (Journalnummer 2151) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Über den gesamten Schnitt ist kein signifikantes Färbesignal zu beobachten. Dies diente als Referenz für die Bewertungsstufe 0.

6.5.2 Färbeverhalten von Corti-Organ und Tektorial-Membran

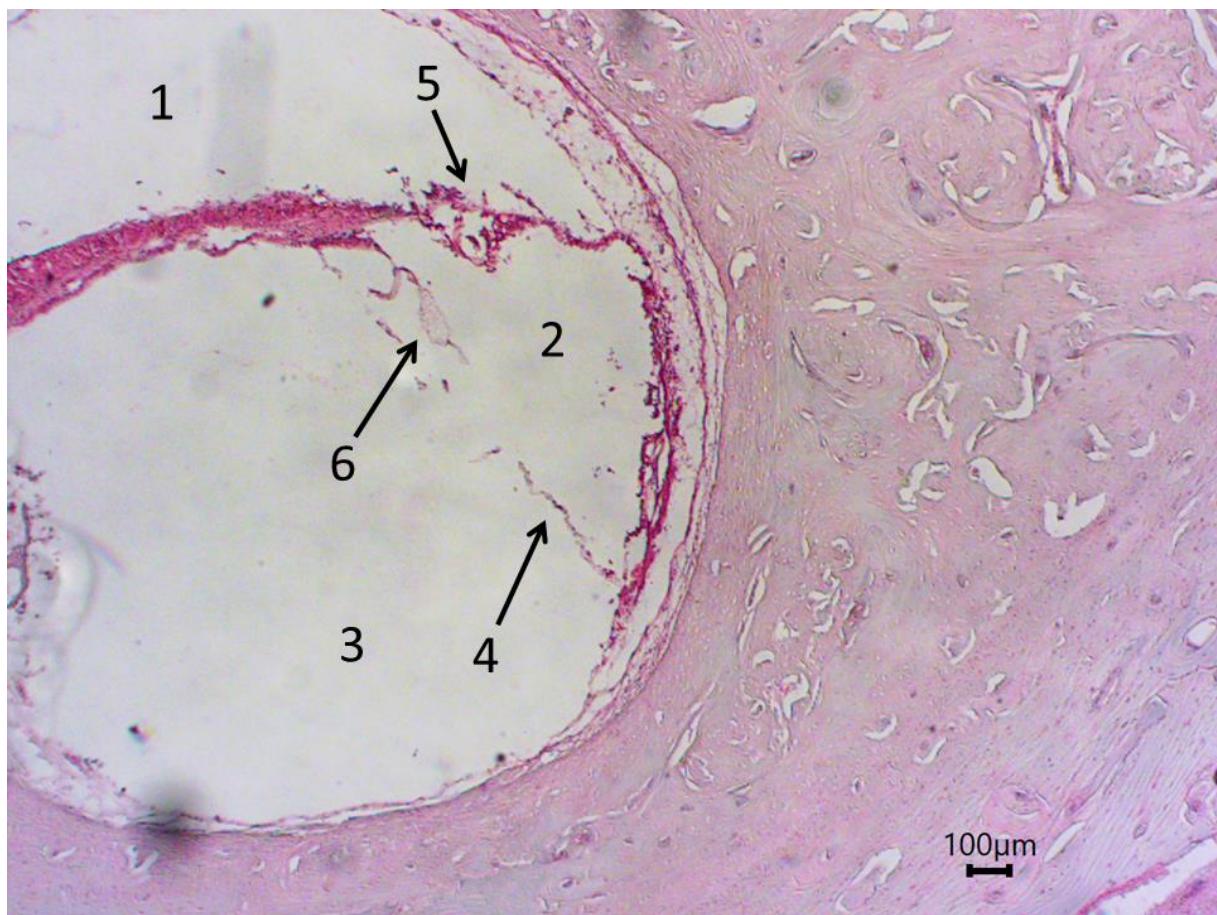


Abbildung 22 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Scala tympani

2= Scala media

3= Scala vestibuli

4= Reissner-Membran (perforiert)

5= Corti-Organ

6= Tektorial-Membran

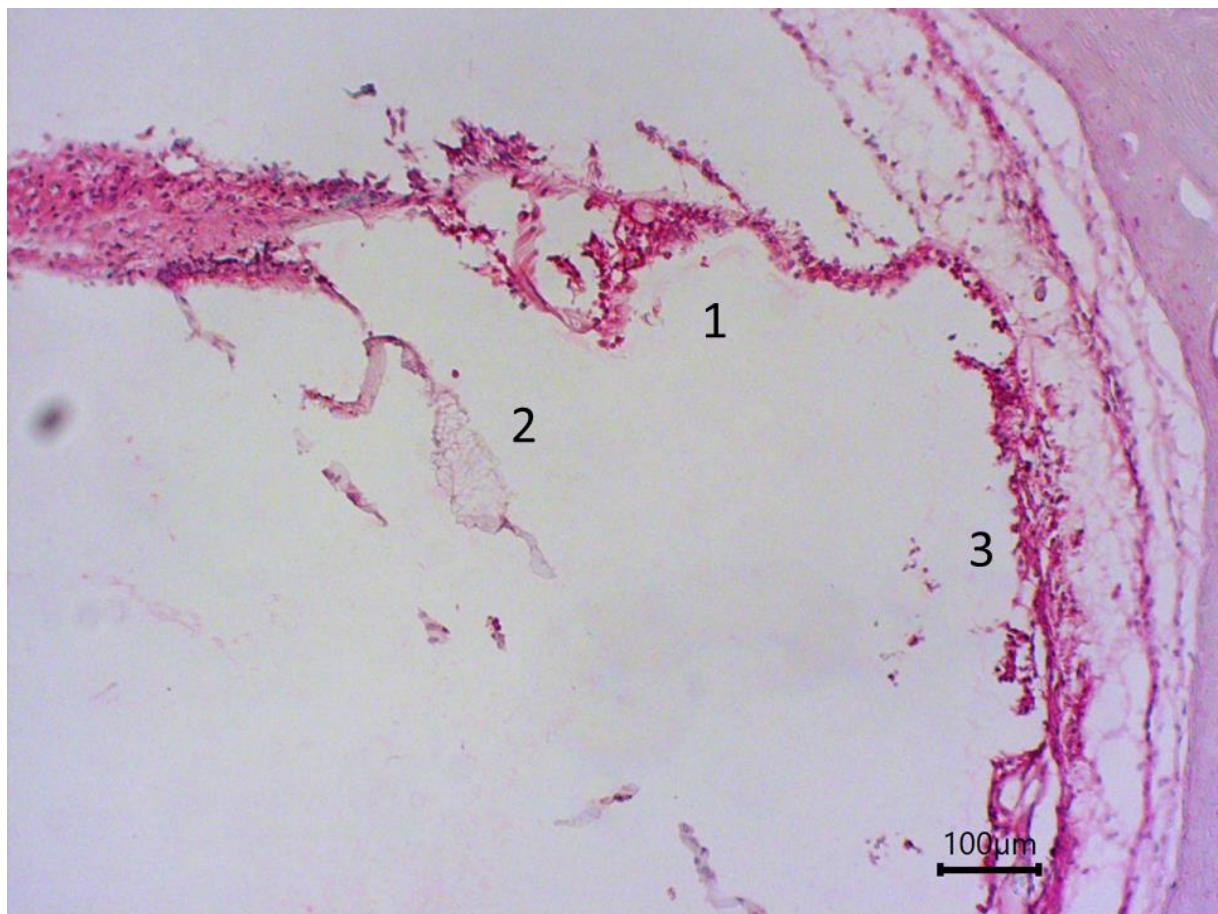


Abbildung 23 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellt sind das Corti-Organ, die Tectorial-Membran und Stria vascularis. Das Färbesignal wurde für das Corti-Organ und die Stria vascularis als positiv (Stufe 2) gewertet. Die Tectorial-Membran zeigte kein signifikantes Färbesignal (Stufe 0).

Dargestellte Strukturen:

1= Corti-Organ

2= Tectorial-Membran

3= Stria vascularis



Abbildung 24 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper mit vorheriger Peptidinkubation und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellt sind das Corti-Organ, die Tectorial-Membran und Stria vascularis. Im Vergleich mit der Färbung ohne vorherige Peptidinkubation (Abbildung 23), ist hinsichtlich des Corti-Organ und der Stria vascularis eine deutliche Abnahme des Färbesignals (Stufe 1) nach Peptidinkubation zu erkennen.

Dargestellte Strukturen:

1= Corti-Organ

2= Tectorial-Membran

3= Stria vascularis

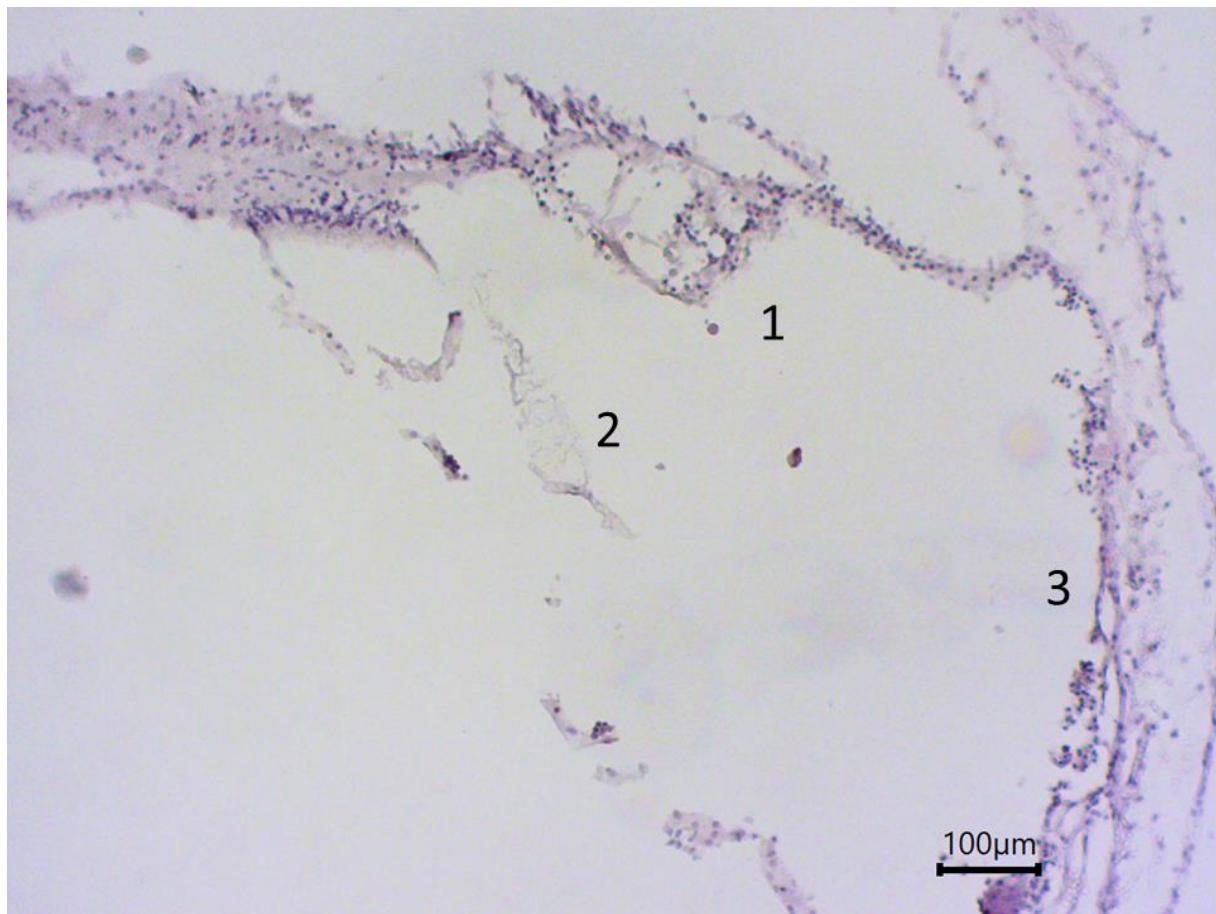


Abbildung 25 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellt sind das Corti-Organ, die Tectorial-Membran und die Stria vascularis. Das Färbesignal wurde in dieser Aufnahme als nicht signifikant gewertet (Stufe 0).

Dargestellte Strukturen:

1= Corti-Organ

2= Tectorial-Membran

3= Stria vascularis

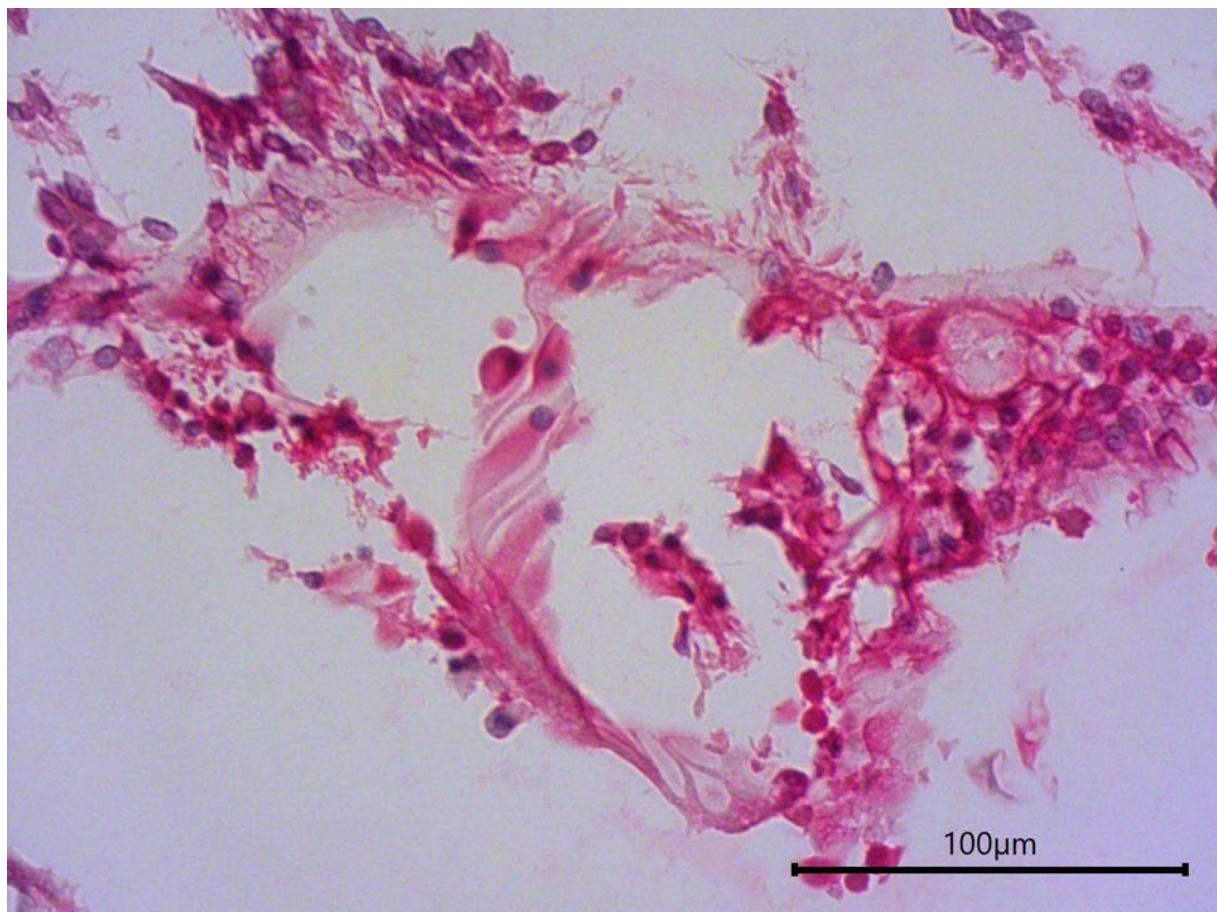


Abbildung 26 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist das Corti-Organ als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde als stark positiv (Stufe 2) gewertet. Einzelne Zellen (innere/äußere Haarzellen, Stützzen) sind zu erkennen, eine Zuordnung in der Photographie war aufgrund der Zerreißungsartefakte nicht eindeutig möglich.

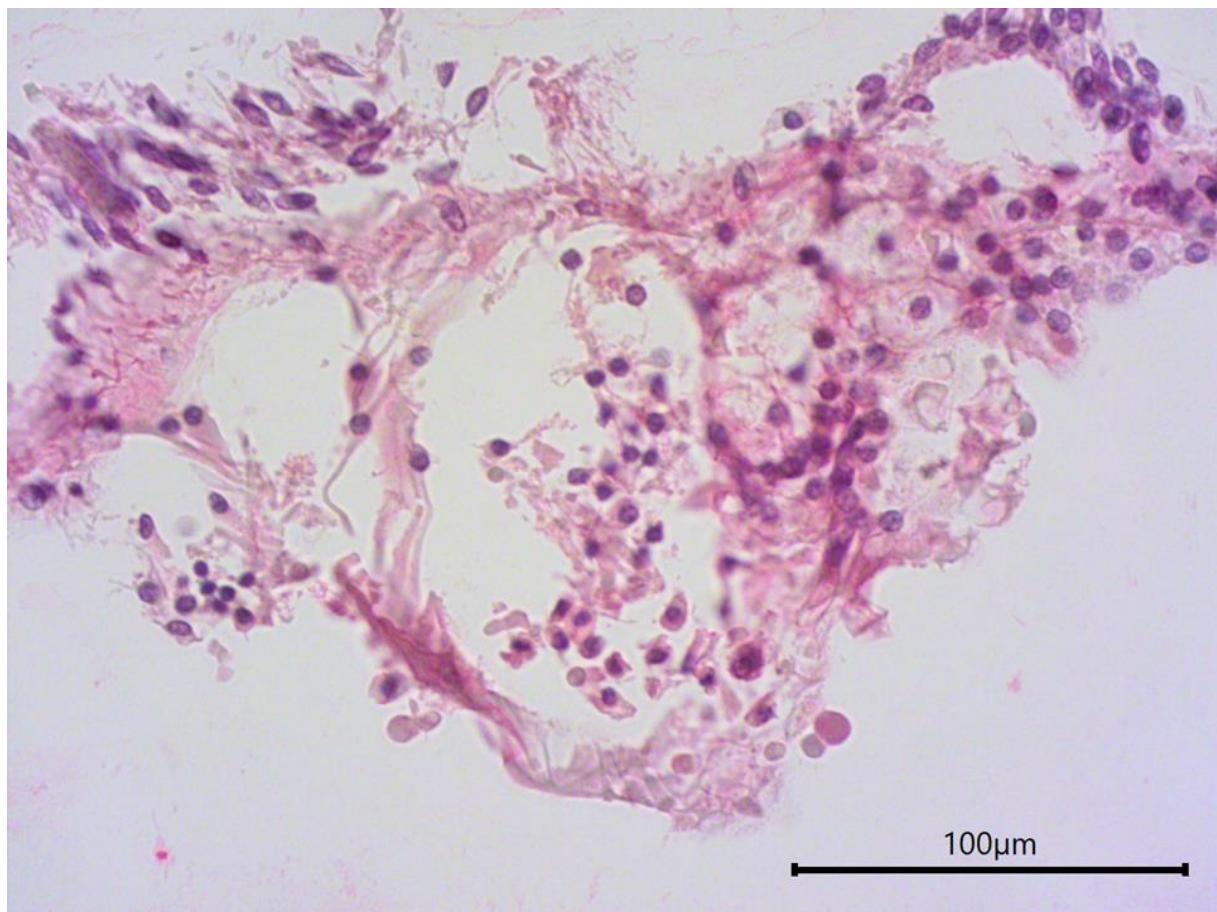


Abbildung 27 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper mit vorheriger Peptidinkubation und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist das Corti-Organ als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde als schwach positiv (Stufe 1) gewertet. Im Vergleich zur Aufnahme ohne Peptidinkubation ist eine deutliche Abnahme des Färbesignals zu erkennen. Dies spricht für die Spezifität der immunhistochemischen Färbung hinsichtlich TRPC6-Kanälen.

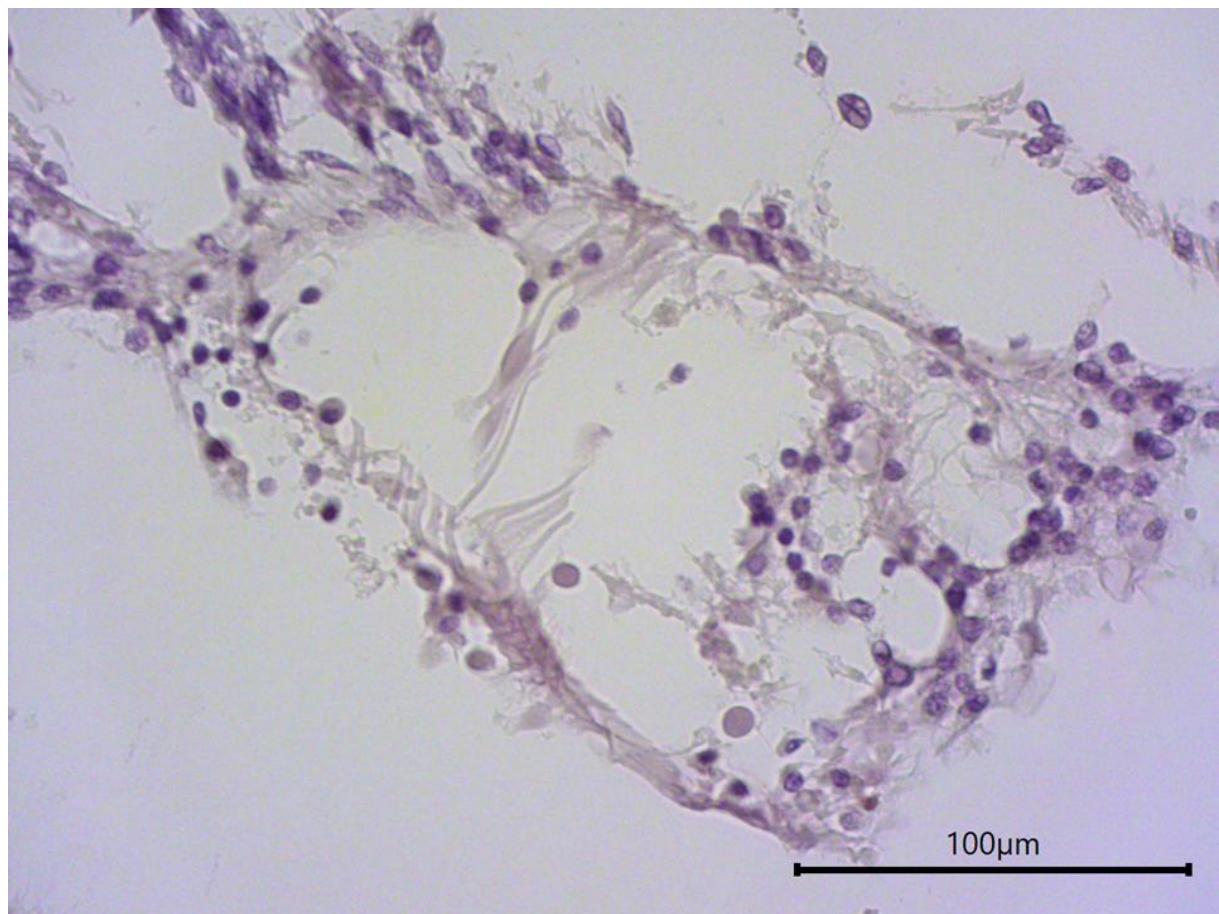


Abbildung 28 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist das Corti-Organ als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde als nicht signifikant (Stufe 0) bewertet.

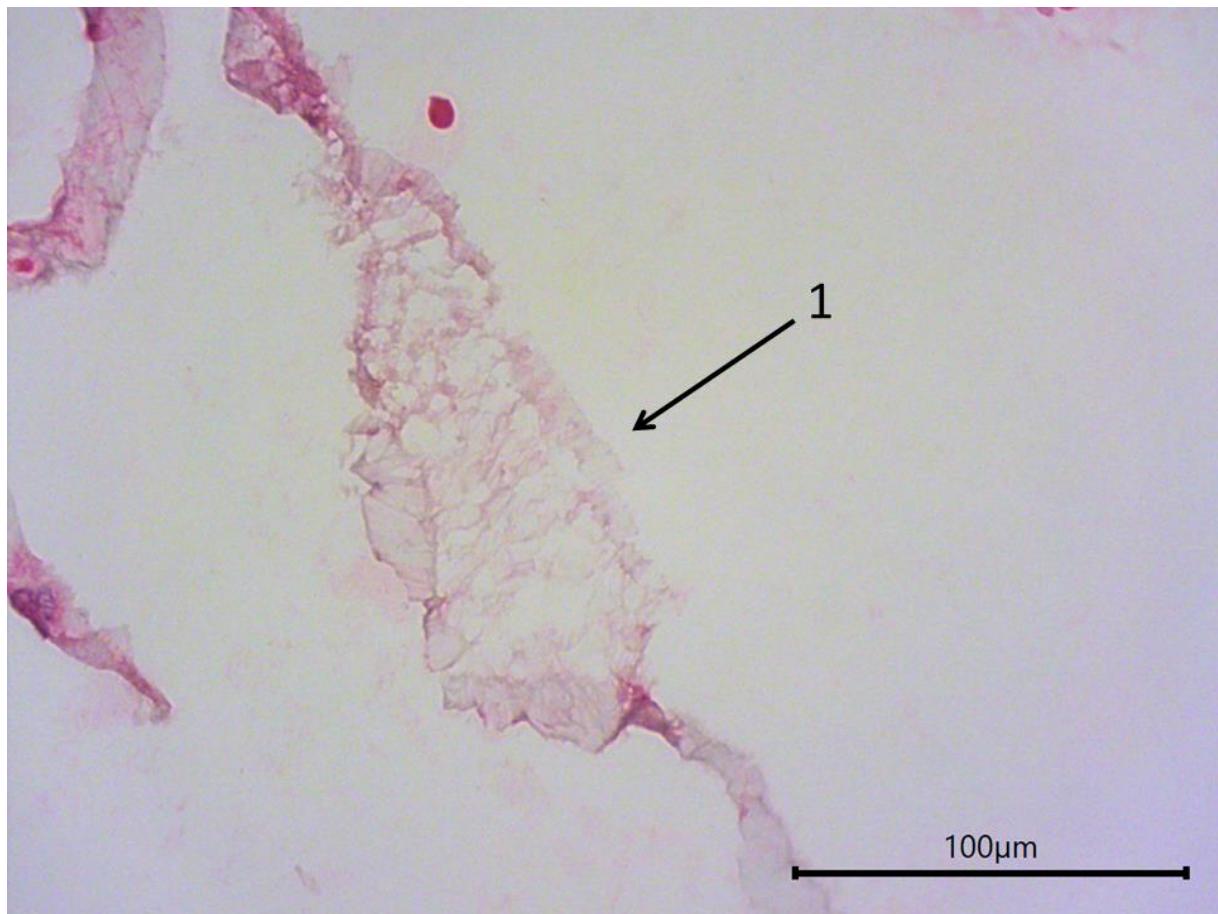


Abbildung 29 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist die Tectorial-Membran (1) als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde hier als nicht signifikant (Stufe 0) gewertet.

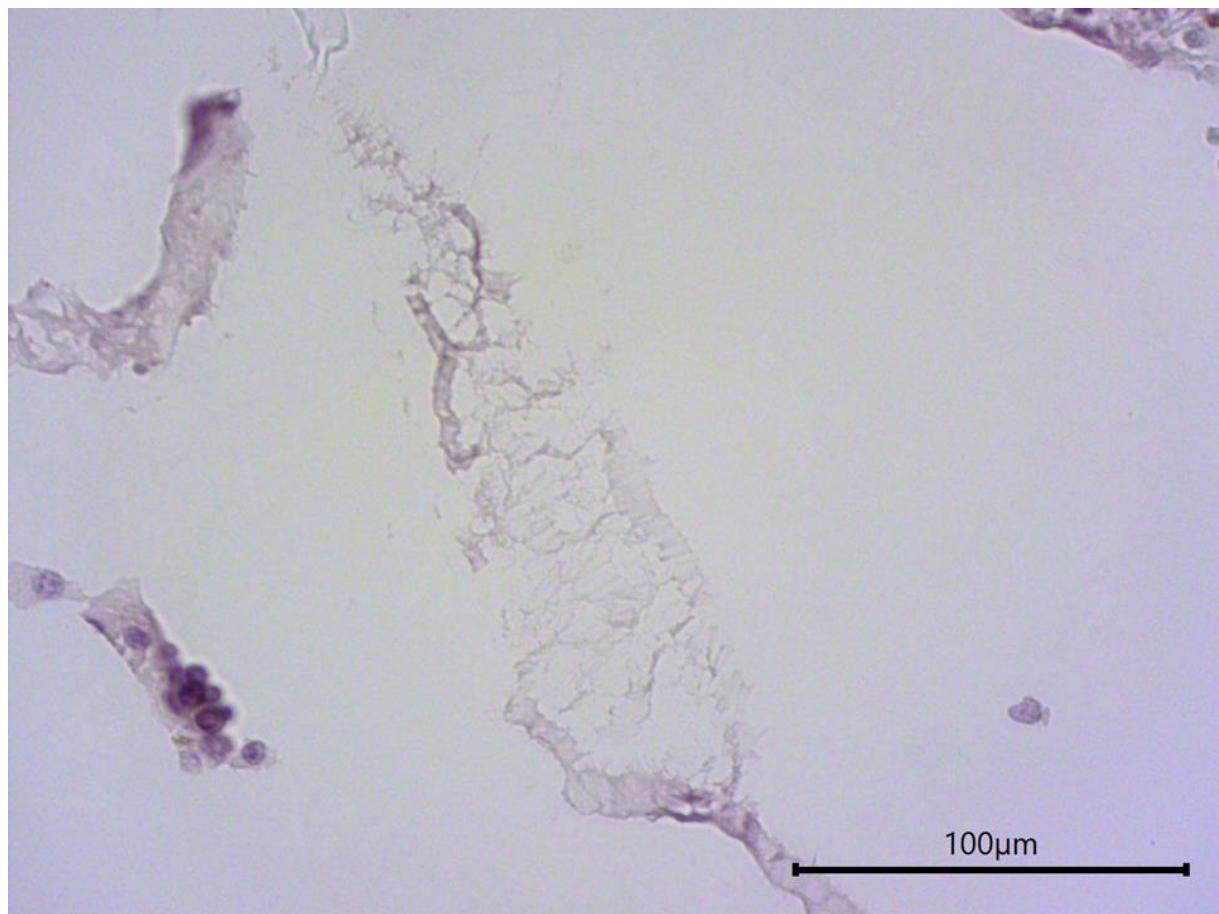


Abbildung 30 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist die Tectorial-Membran als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde hier als nicht signifikant (Stufe 0) gewertet.

6.5.3 Färbeverhalten der Basilar-Membran und Reissner-Membran

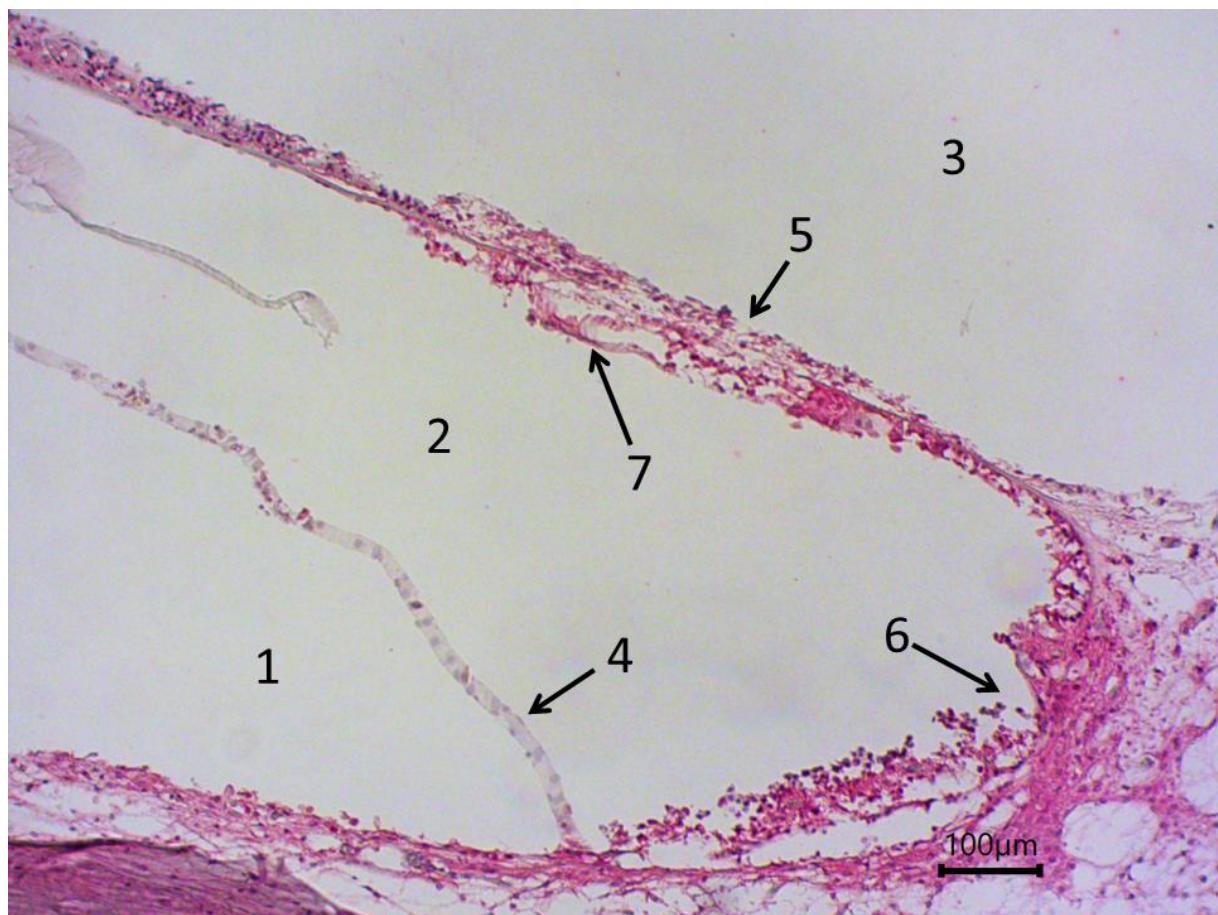


Abbildung 31 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1 = Scala vestibuli

2 = Scala media

3 = Scala tympani

4 = Reissner-Membran

5 = Basilar-Membran

6 = Stria vascularis

7 = Corti-Organ

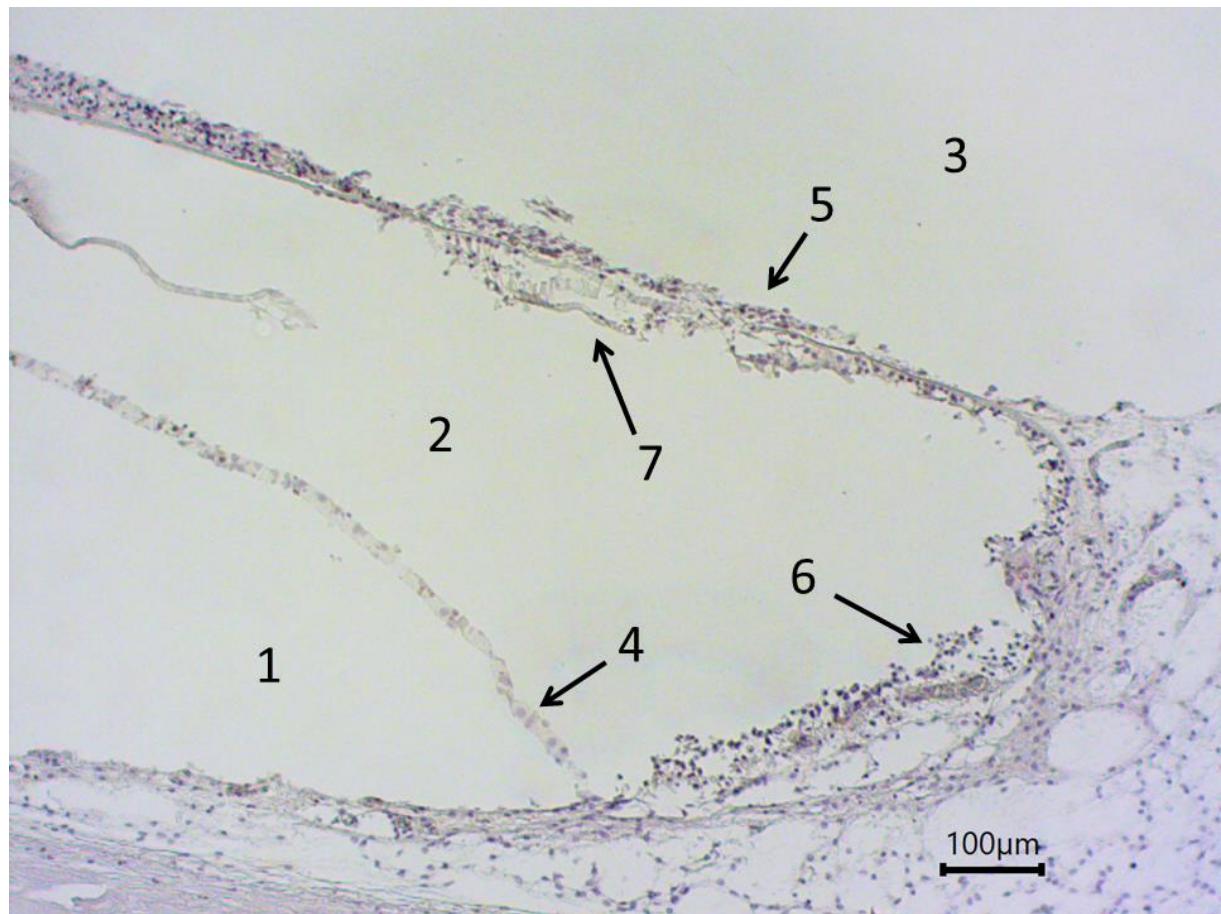


Abbildung 32 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Scala vestibuli

2= Scala media

3= Scala tympani

4= Reissner-Membran

5= Basilar-Membran

6= Stria vascularis

7= Corti-Organ



Abbildung 33 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist die Reissner-Membran als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde hier als schwach positiv (Stufe 1) gewertet.

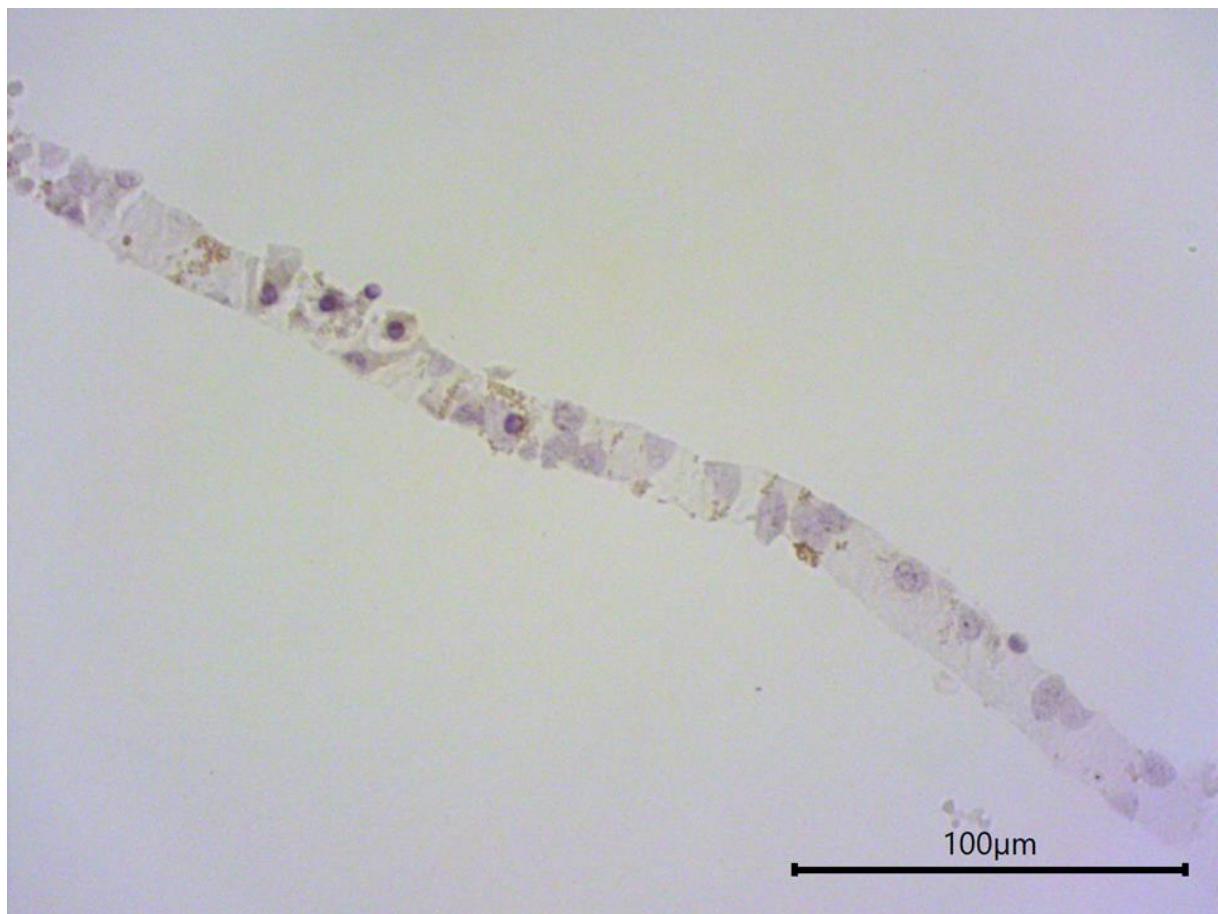


Abbildung 34 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Zu sehen ist die Reissner-Membran als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde als nicht signifikant (Stufe 0) bewertet.

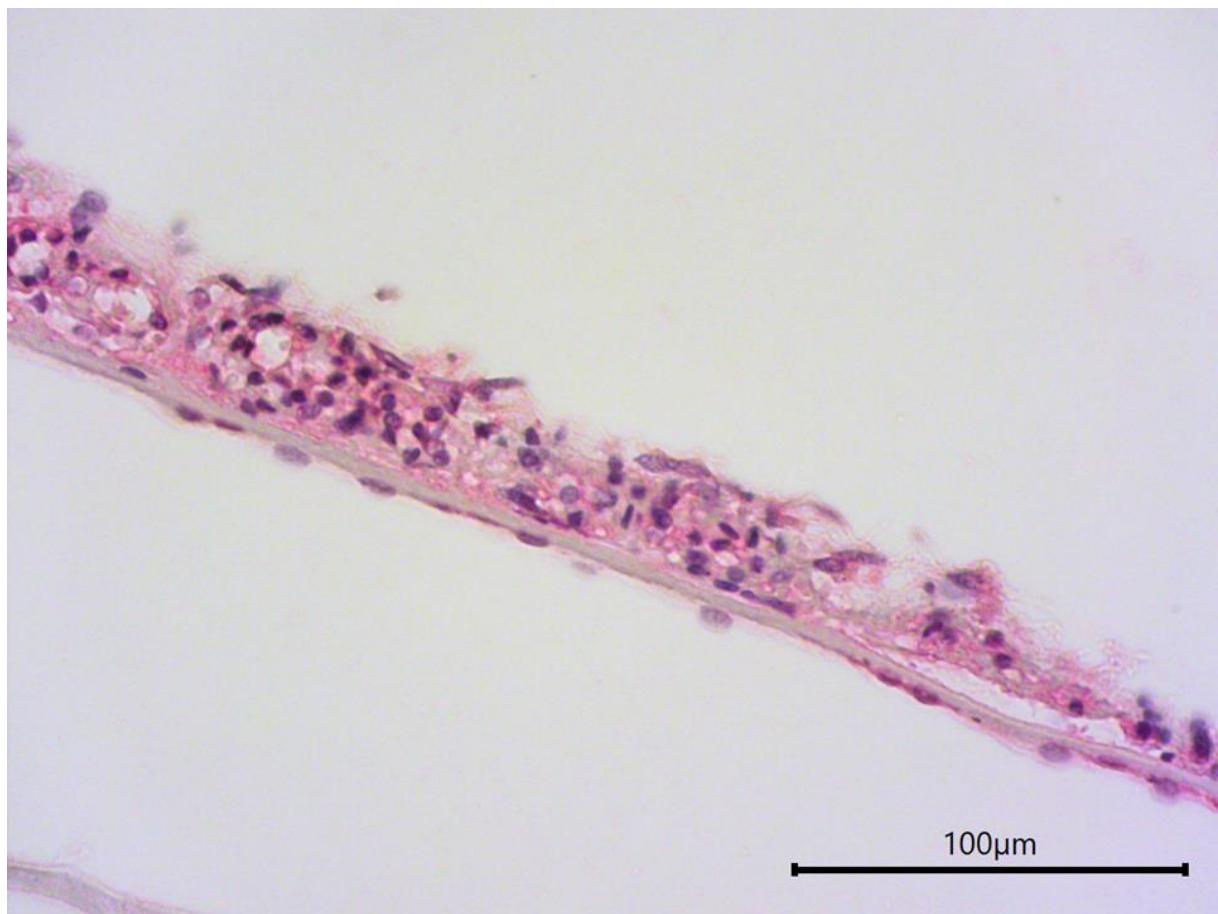


Abbildung 35 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist die Basilar-Membran als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde hier als positiv (Stufe 2) gewertet.

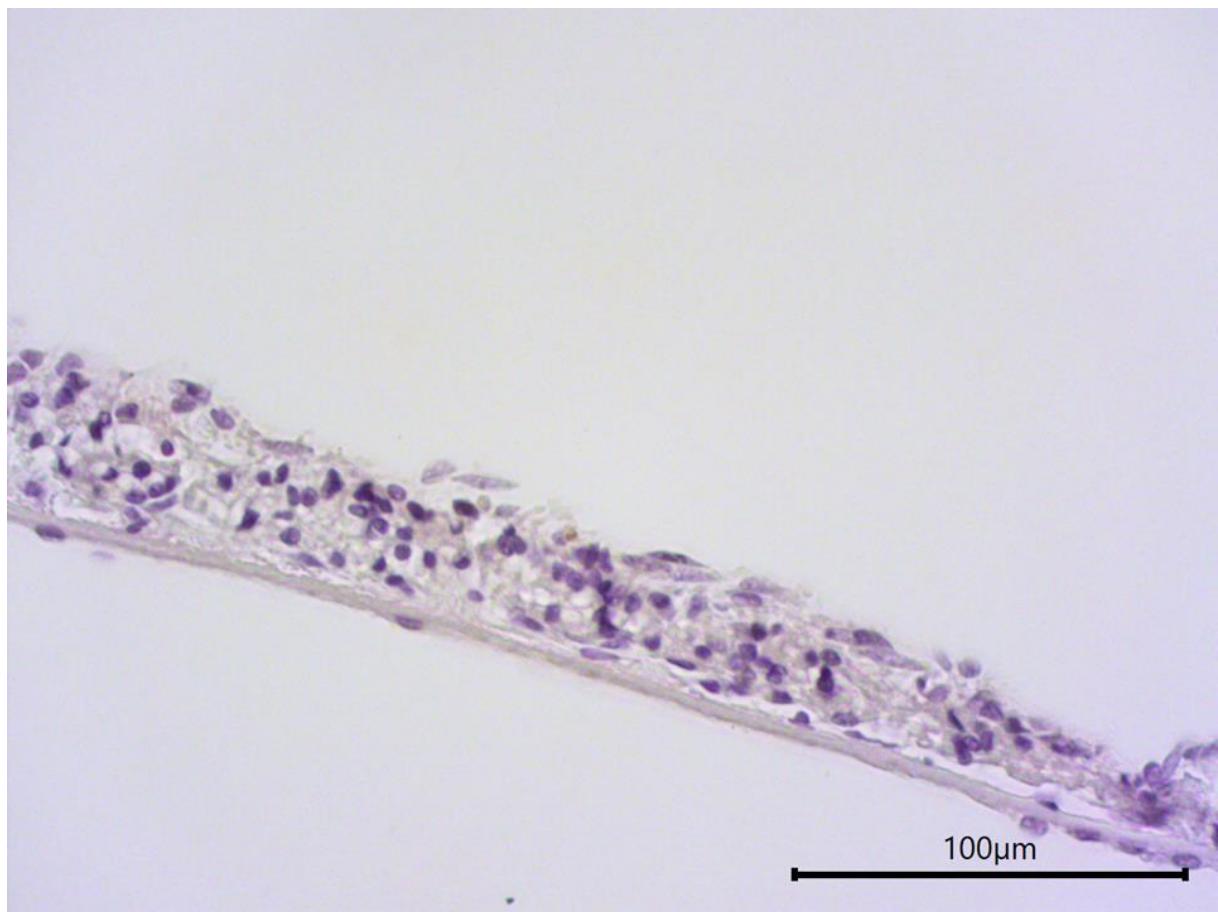


Abbildung 36 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Zu sehen ist die Basilar-Membran als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde als nicht signifikant (Stufe 0) bewertet.

6.5.4 Färbeverhalten des Nervus cochlearis und Ganglion spirale

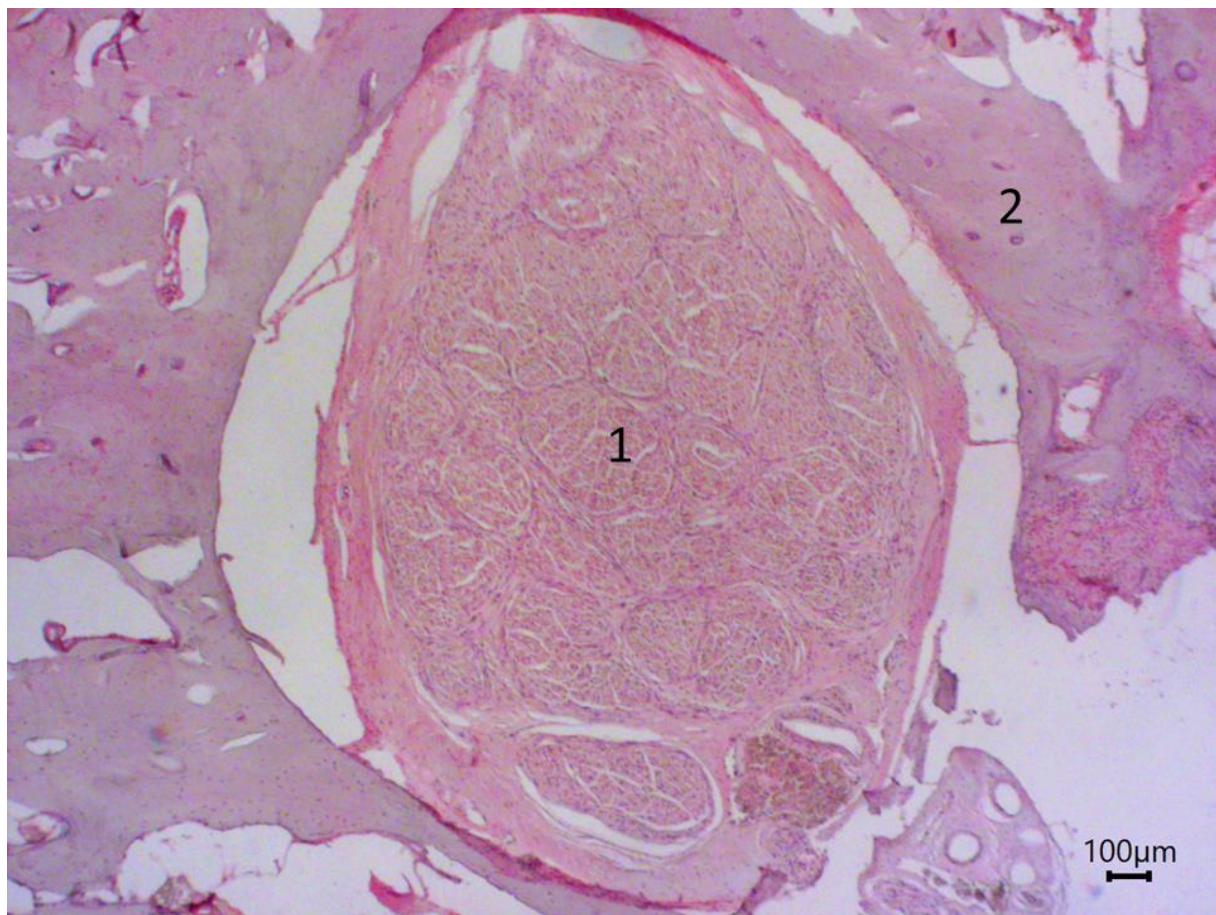


Abbildung 37 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellt ist ein Querschnitt durch den Nervus cochlearis als Übersichtsaufnahme.

Dargestellte Strukturen:

1= Nervus cochlearis

2= Knochengewebe

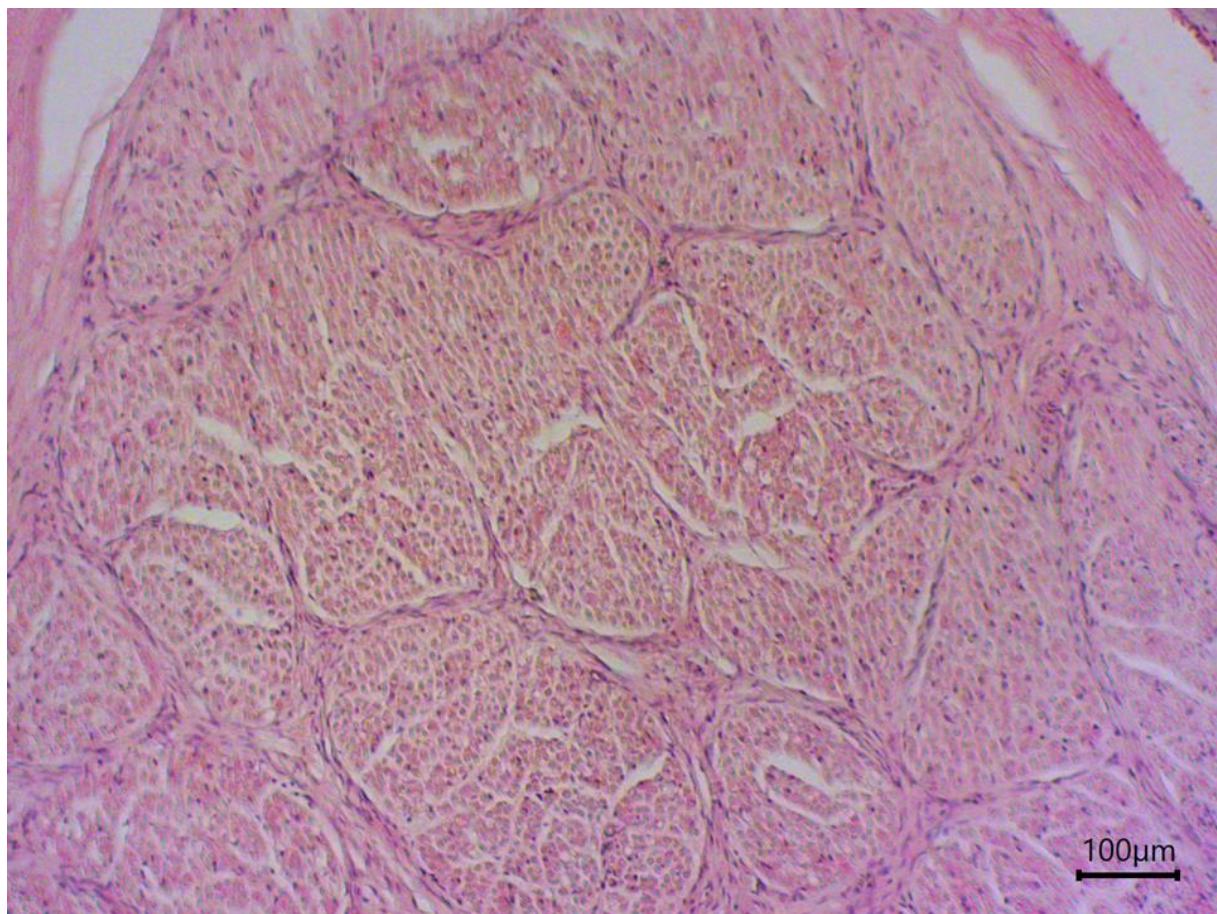


Abbildung 38 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellt ist ein Querschnitt durch den Nervus cochlearis als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde hier mit positiv (Stufe 2) bewertet.

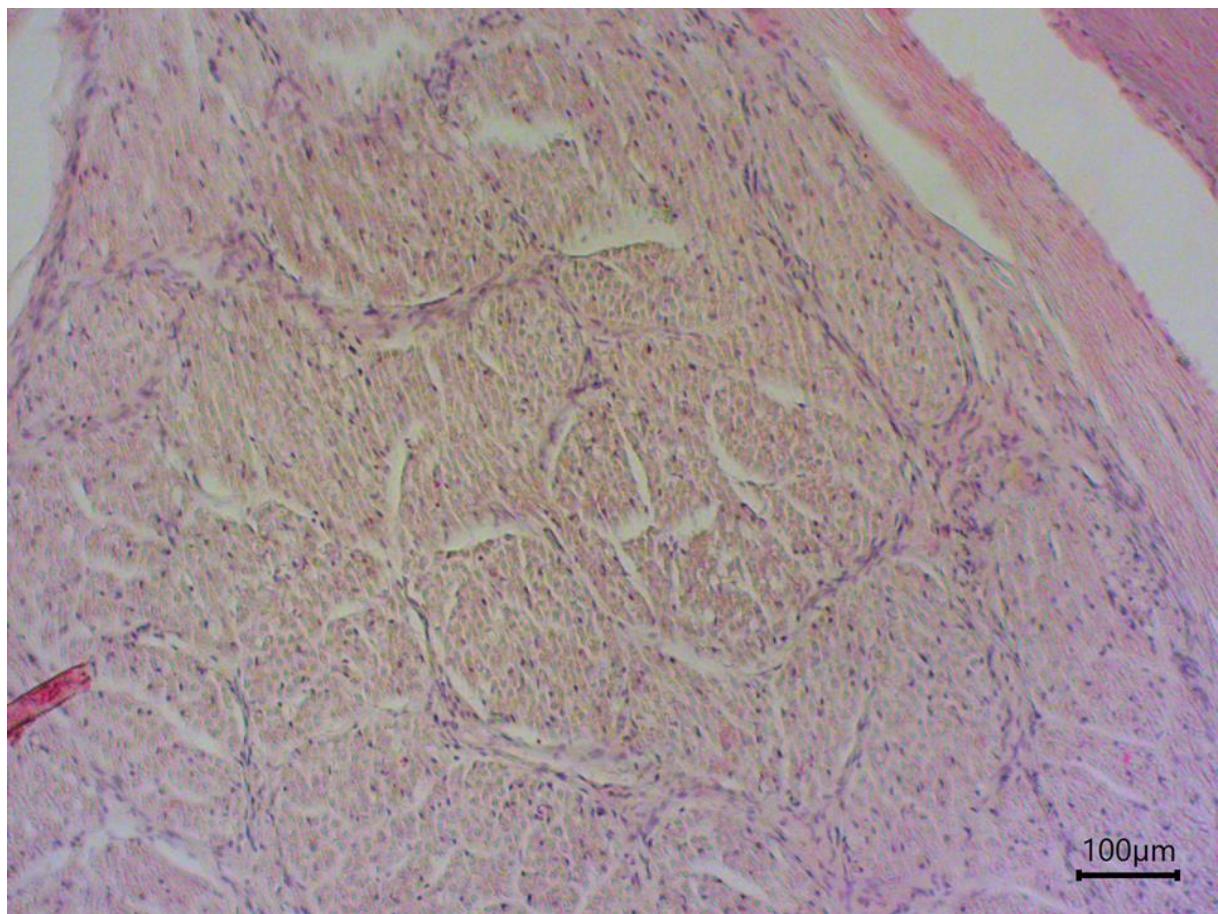


Abbildung 39 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper mit vorheriger Peptidinkubation und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellt ist ein Querschnitt durch den Nervus cochlearis. Bei dieser Aufnahme wurde der verwendete Anti-TRPC6-Antikörper im Rahmen der Spezifitätskontrolle zuvor mit einem Kontrollpeptid inkubiert. Es zeigt sich ein deutlich abgeschwächtes, aber erkennbares Färbesignal im Vergleich mit der Färbung ohne Peptidinkubation. Das Färbesignal wurde hier als schwach positiv (Stufe 1) gewertet.

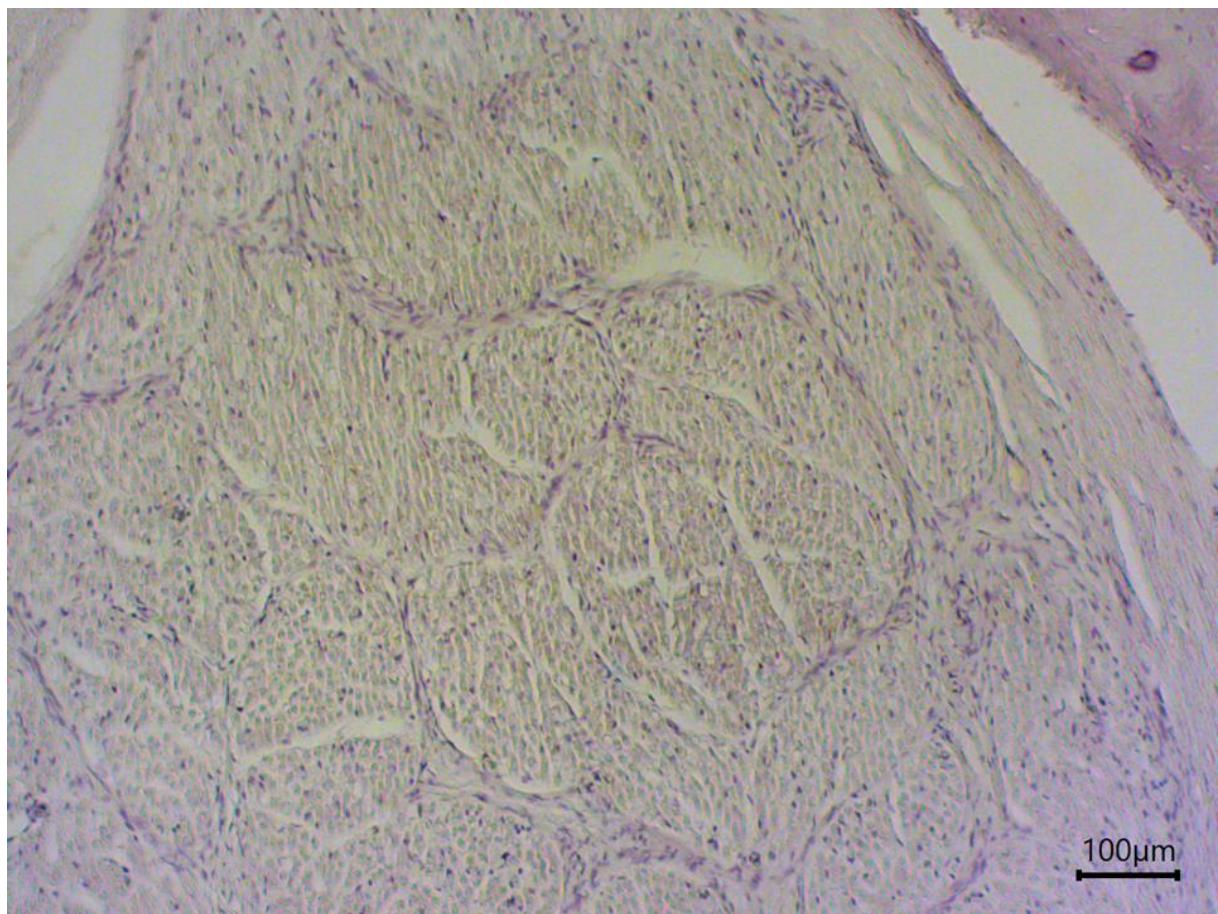


Abbildung 40 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellt ist ein Querschnitt durch den Nervus cochlearis. Es zeigt sich kein signifikantes Färbesignal (Stufe 0).



Abbildung 41 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Scala vestibuli

2= Scala media

3= Scala tympani

4= Reissner-Membran (perforiert)

5= Basilar-Membran mit aufsitzendem Corti-Organ

6= Stria vascularis

7= Nervus cochlearis

8= Ossärer Anteil der Cochlea

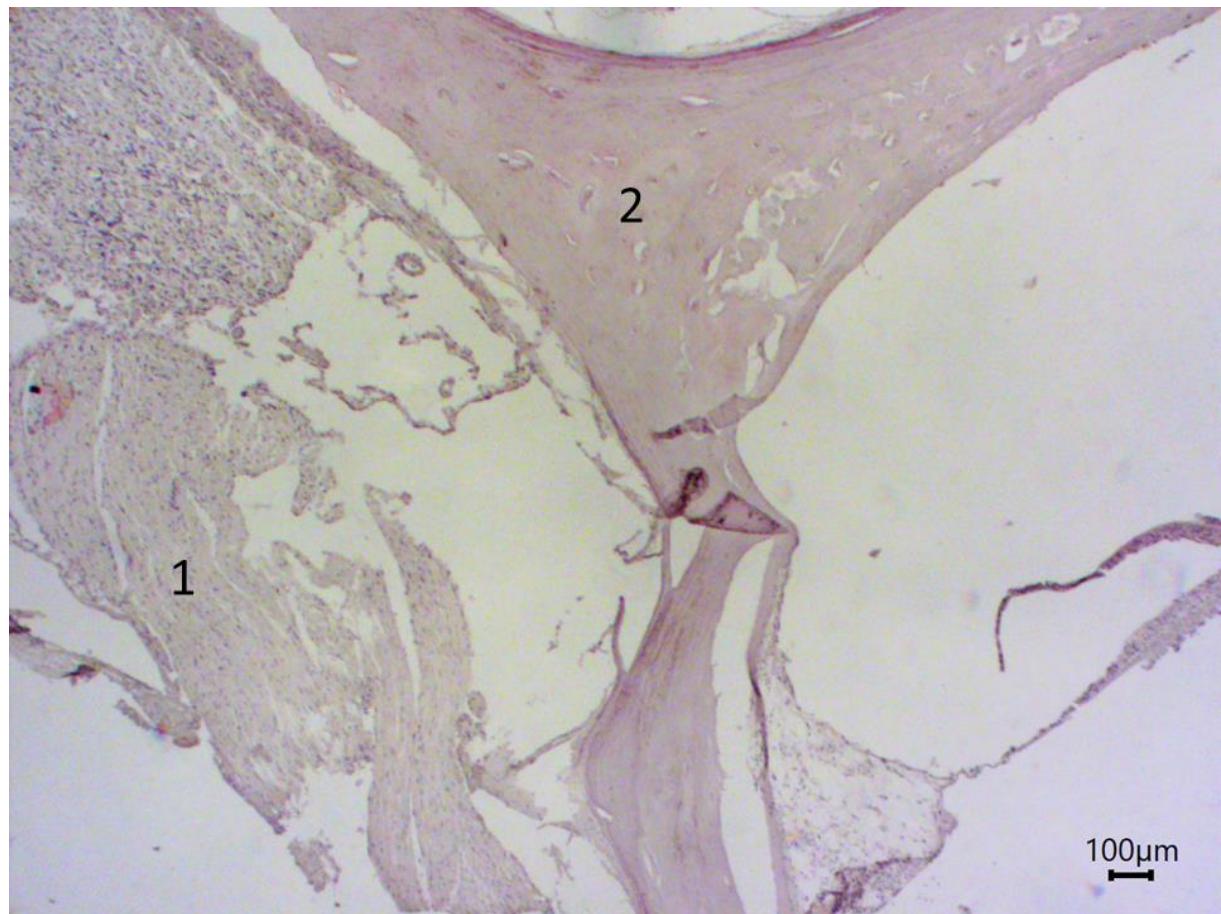


Abbildung 42 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Fasern des Nervus cochlearis

2= Ossärer Anteil der Cochlea

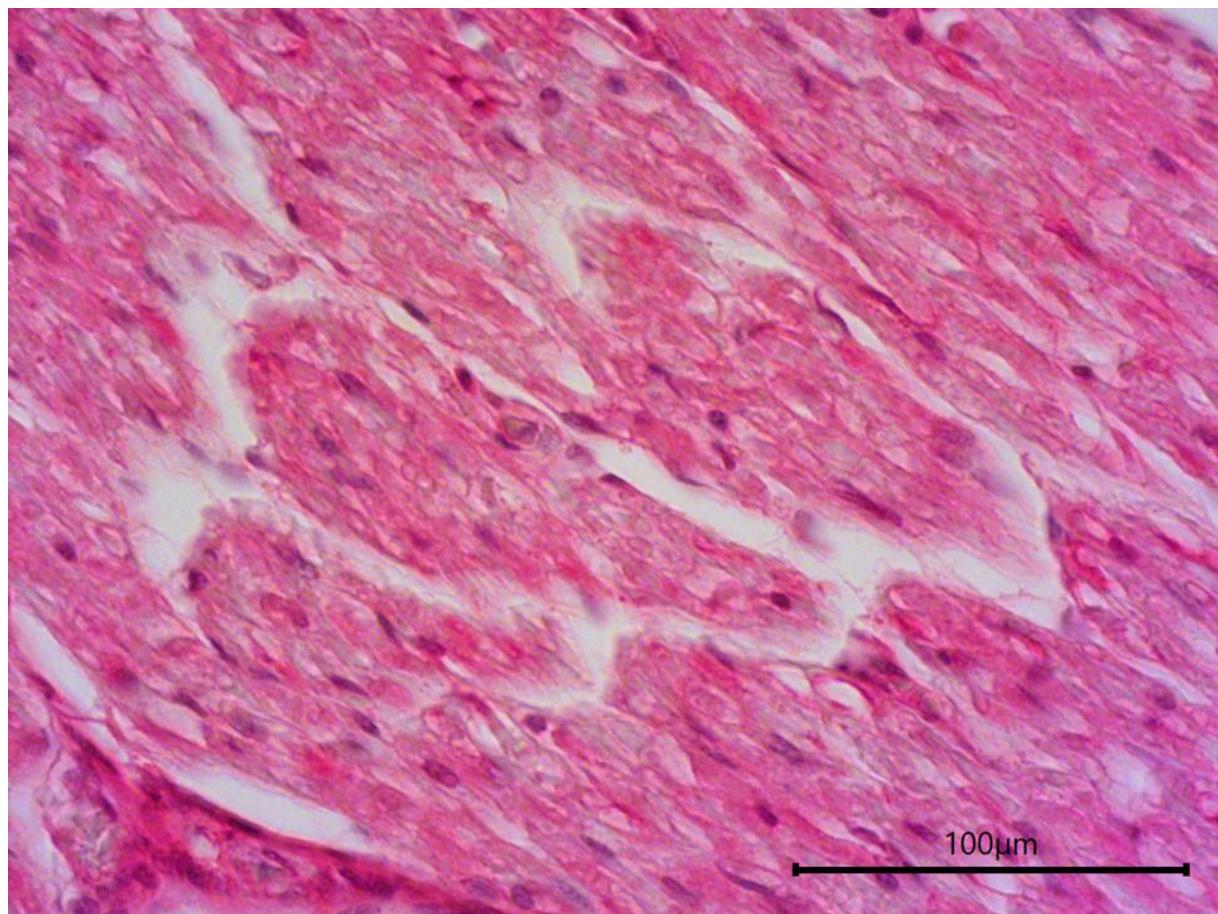


Abbildung 43 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt sind die Axone des Nervus cochlearis als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde hier als positiv (Stufe 2) bewertet.

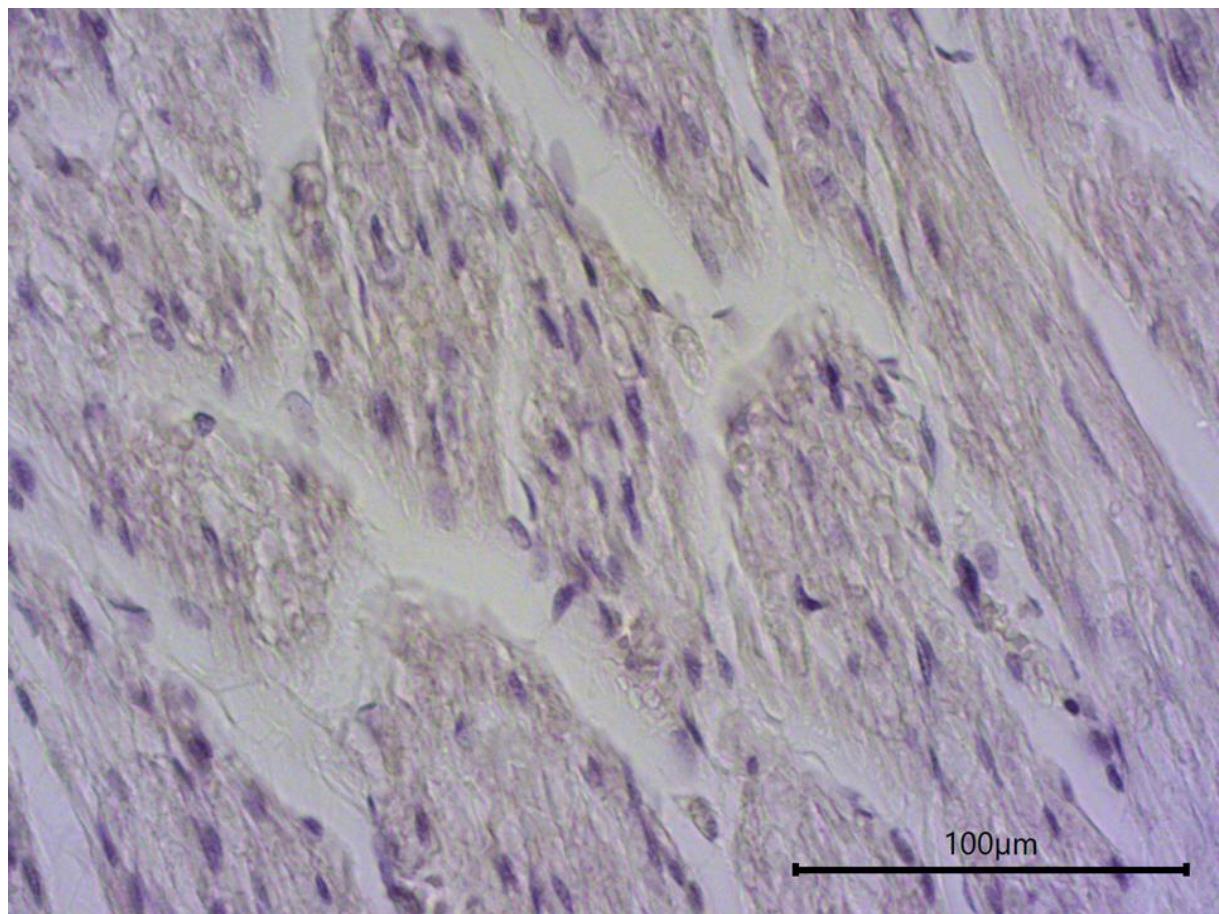


Abbildung 44 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellt sind die Axone des Nervus cochlearis als Detailaufnahme. Das Färbesignal wurde hier als nicht signifikant (Stufe 0) bewertet.

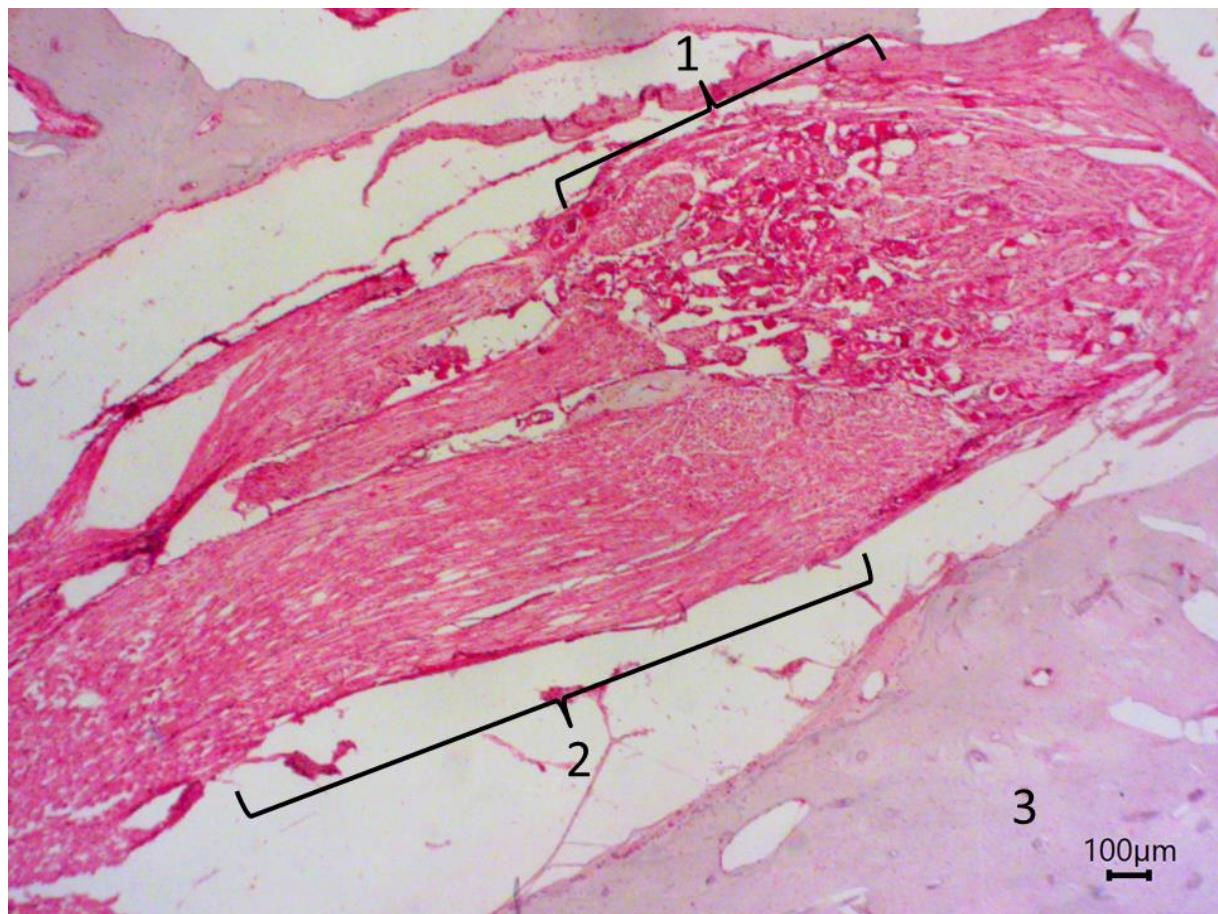


Abbildung 45 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellt sind Fasern des Nervus cochlearis, sowie ein Ganglion spirale. Das Färbesignal beider Strukturen wurde als positiv (Stufe 2) gewertet.

Dargestellte Strukturen:

1= Ganglion spirale

2= Axone des Nervus cochlearis

3= Ossärer Anteil der Cochlea

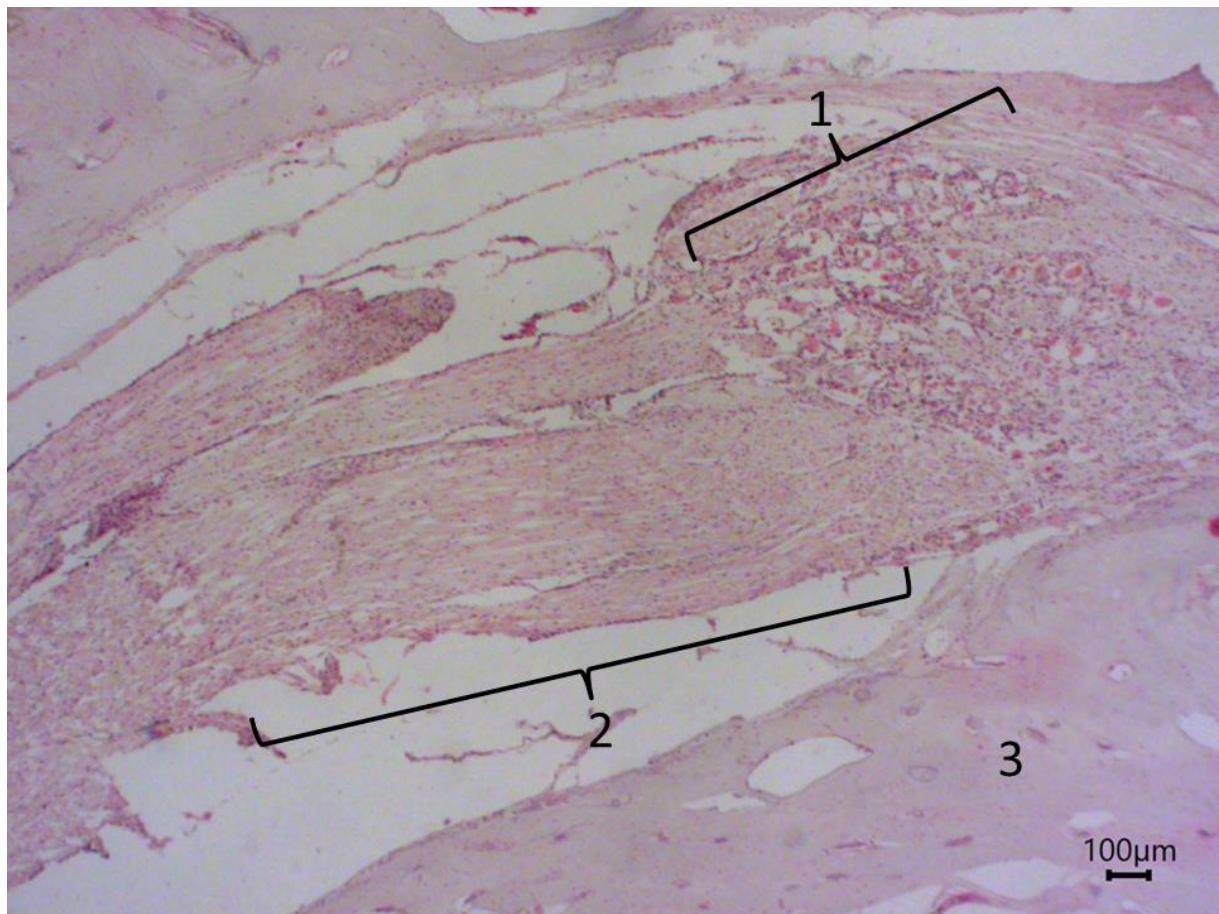


Abbildung 46 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= *Ganglion spirale*

2= *Axone des Nervus cochlearis*

3= *Ossärer Anteil der Cochlea*

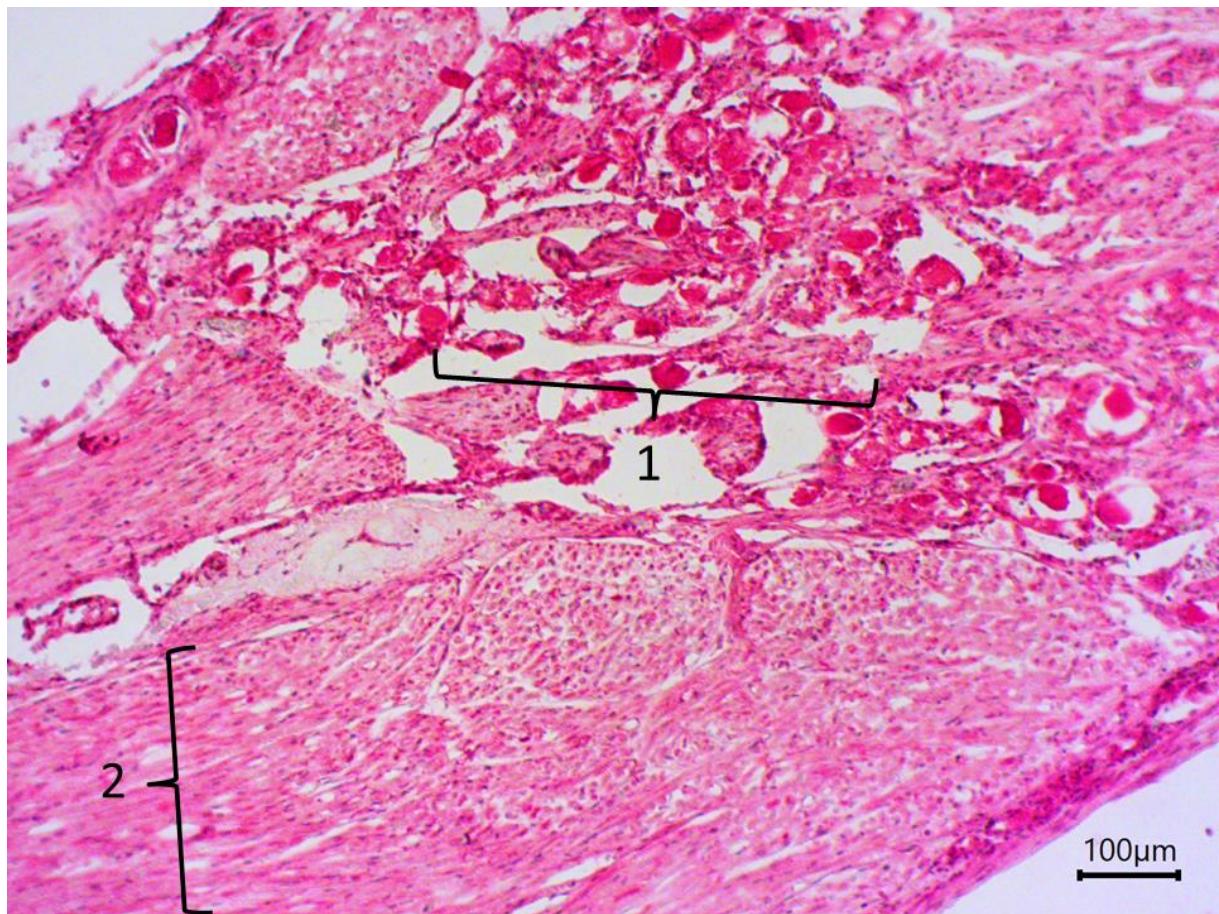


Abbildung 47 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Im oberen Teil der Aufnahme sind die Perikarien (1) des ersten Neurons der menschlichen Hörbahn zu sehen, welche im unteren Teil der Aufnahme mit ihren Axonen (2) als Nervenfasern des Nervus cochlearis nach zentral ziehen. Das Färbesignal wurde für beide Strukturelemente als positiv (Stufe 2) gewertet.

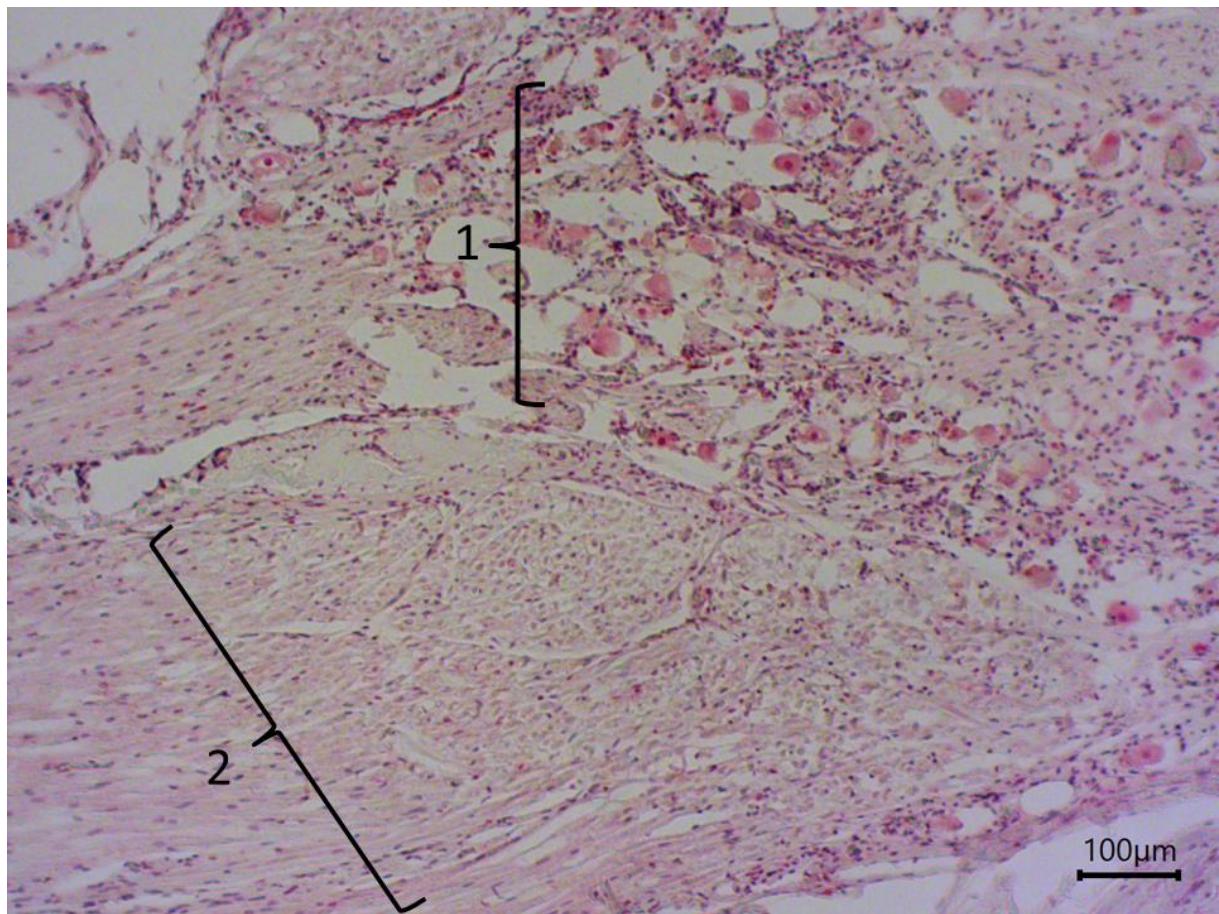


Abbildung 48 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

In dieser Aufnahme wurden sowohl die Axone des Nervus cochlearis (2), als auch das Ganglion spirale (1) als nicht signifikant (Stufe 0) bewertet.

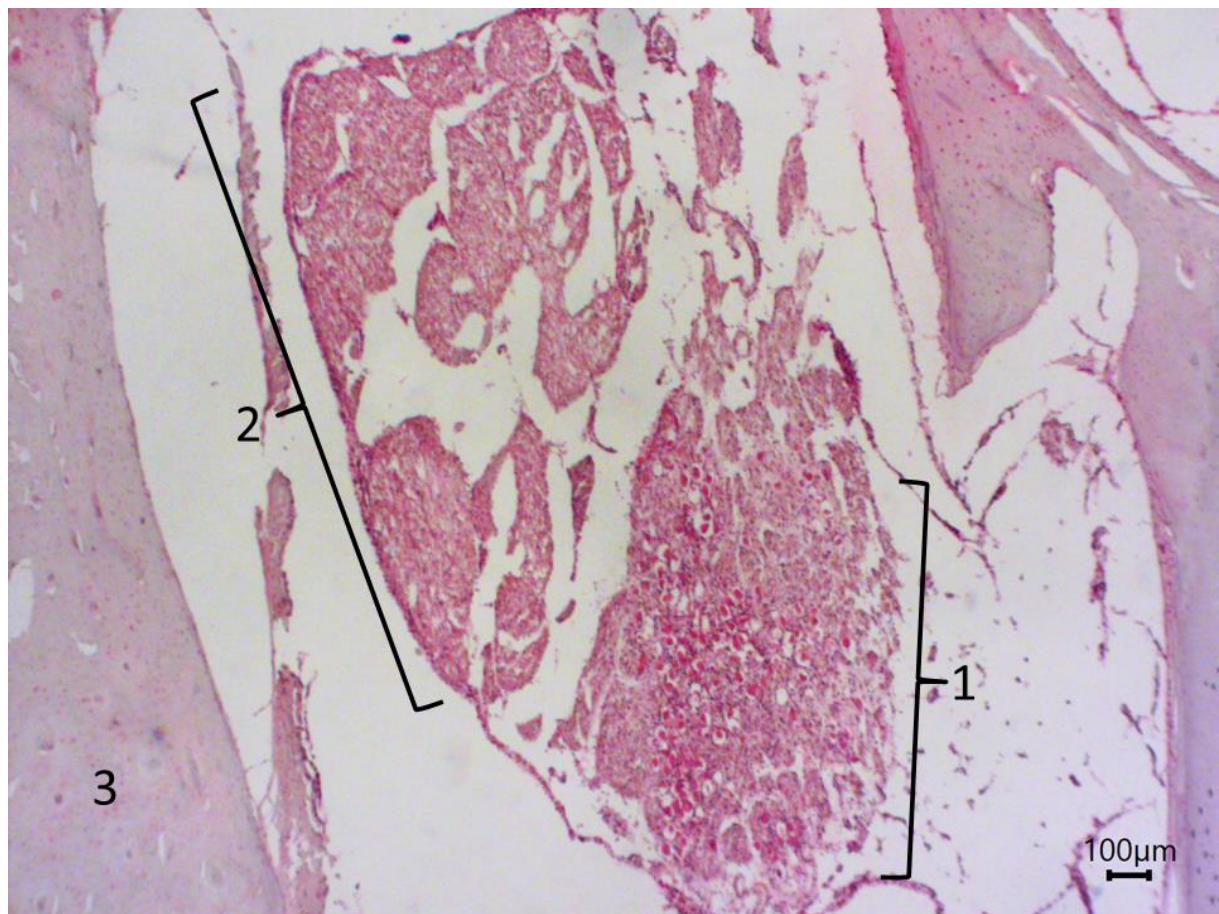


Abbildung 49 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= *Ganglion spirale*

2= *Axone des Nervus cochlearis*

3= *Ossärer Anteil der Cochlea*

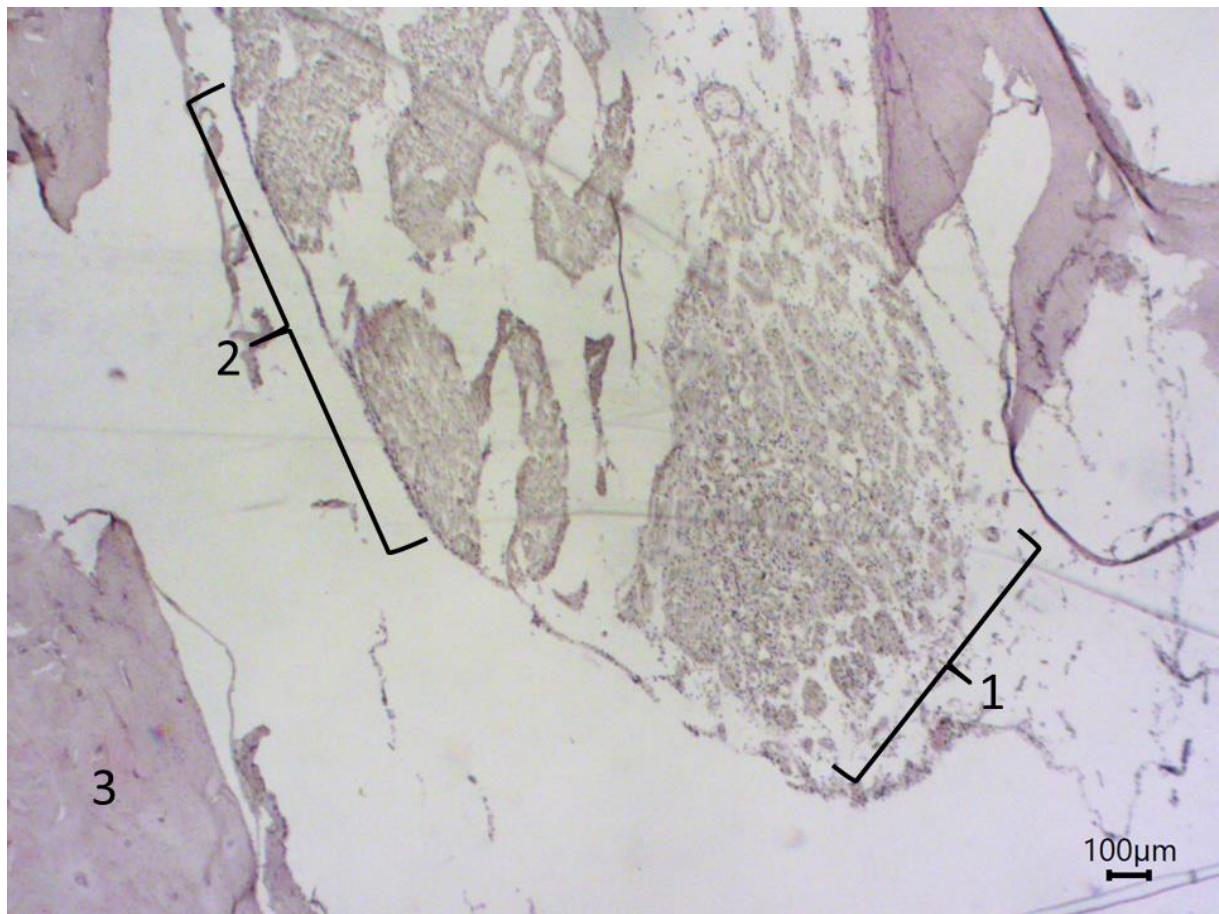


Abbildung 50 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellt sind Fasern des Nervus cochlearis, sowie ein Ganglion spirale.

Dargestellte Strukturen:

1= Ganglion spirale

2= Axone des Nervus cochlearis

3= Ossärer Anteil der Cochlea

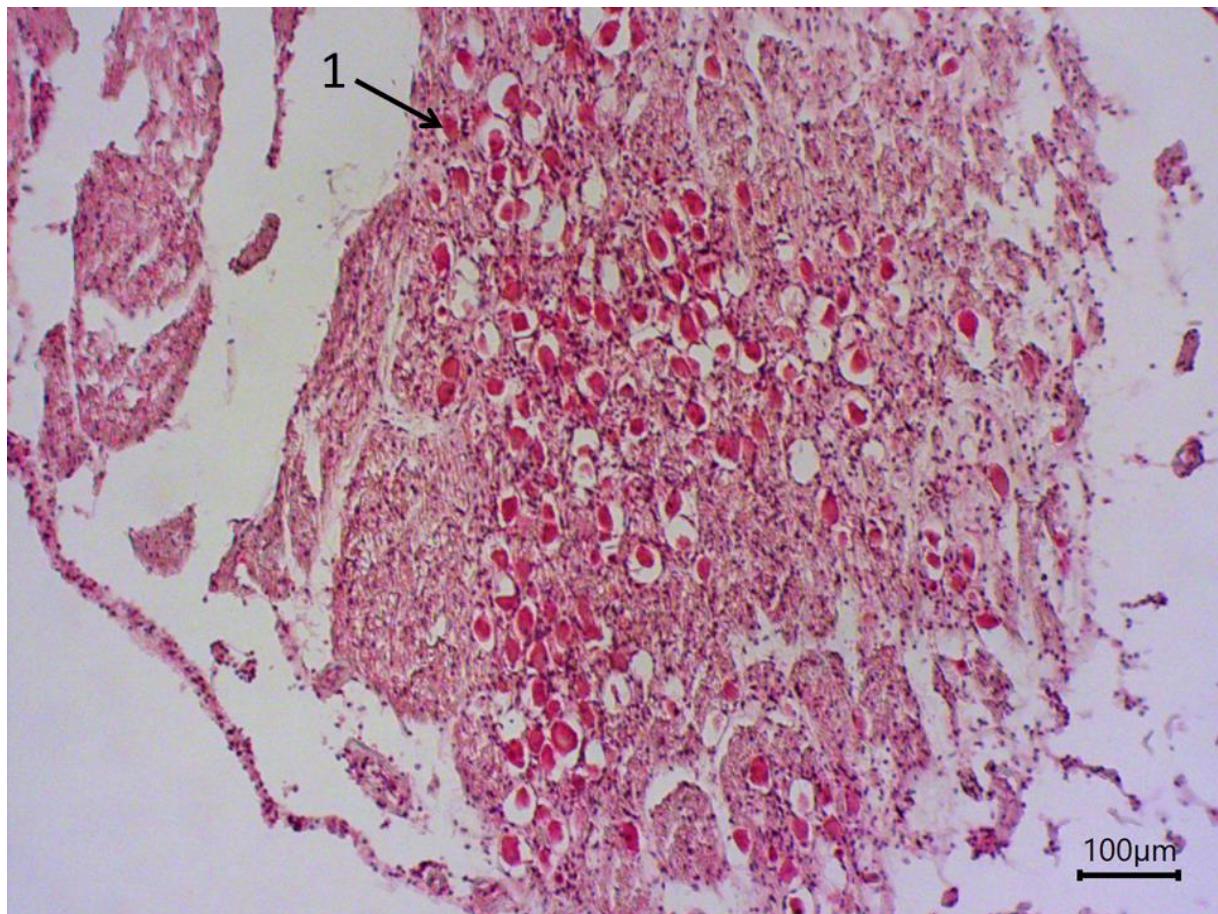


Abbildung 51 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Zu sehen sind zentral im Bild die Perikarien (1- exemplarisch markiert) des ersten Neurons der menschlichen Hörbahn. Das Färbeergebnis wurde als positiv (Stufe 2) bewertet.

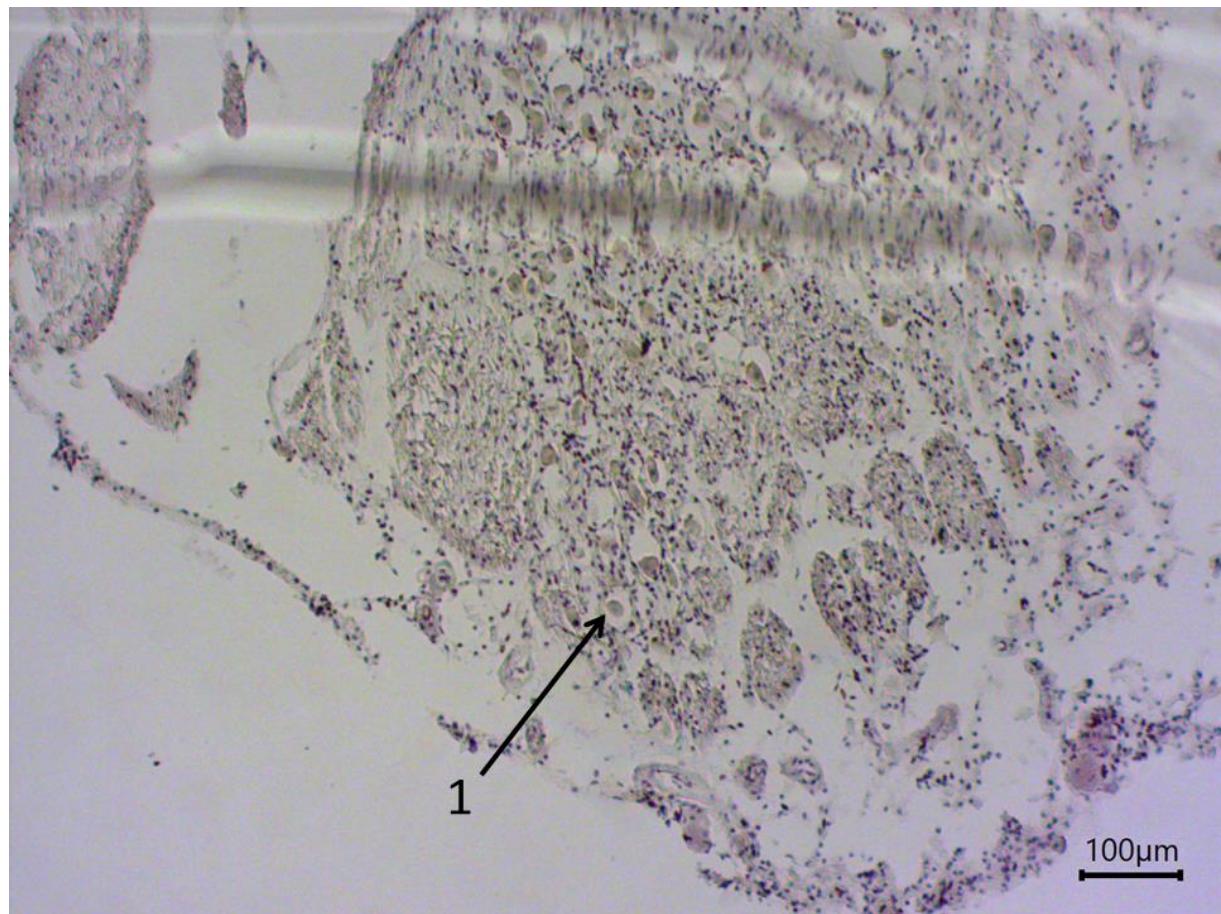


Abbildung 52 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Zu sehen sind zentral im Bild die Perikarien (1- exemplarisch markiert) des ersten Neurons der menschlichen Hörbahn. Das Färbeergebnis wurde hier als nicht signifikant (Stufe 0) bewertet.

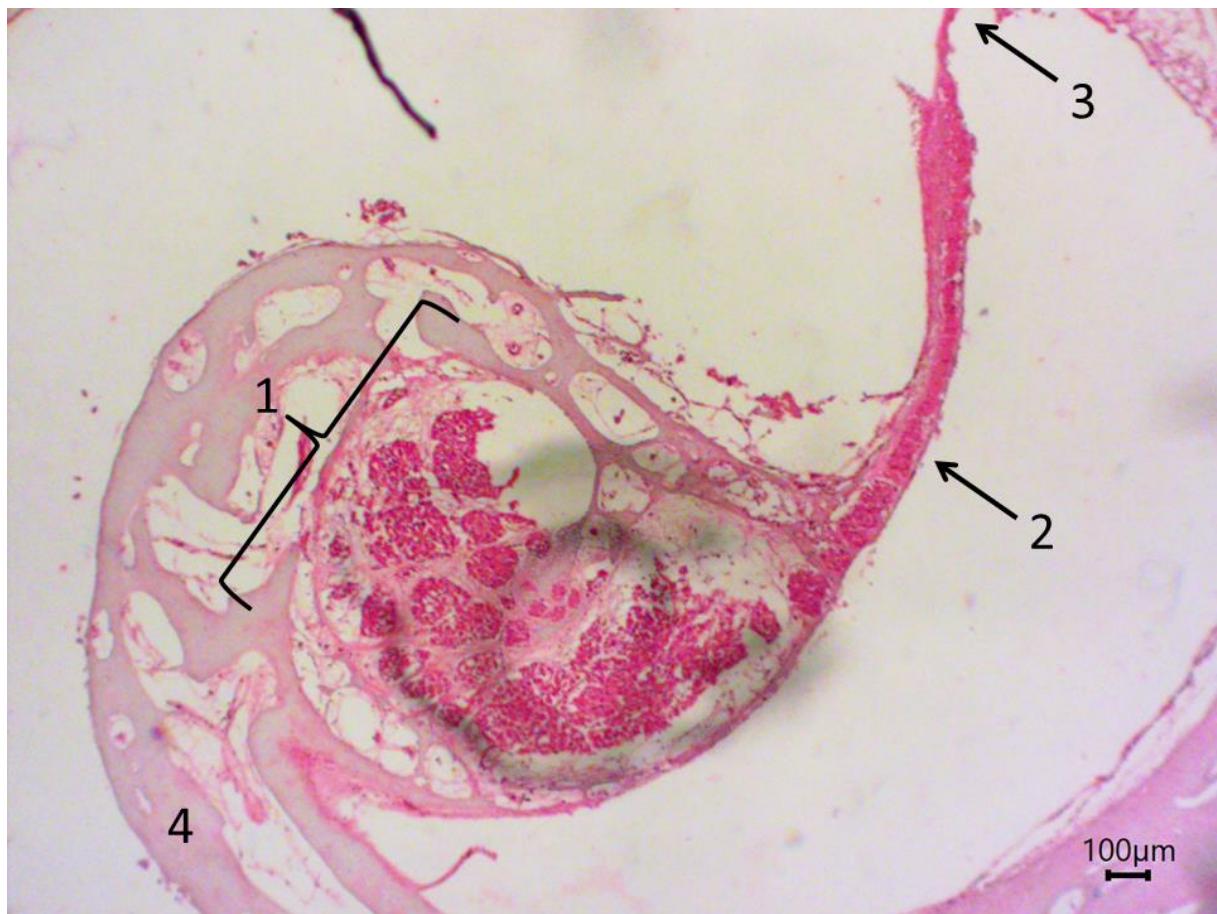


Abbildung 53 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Modiolus mit innenliegendem Nervus cochlearis

2= Lamina spiralis ossea mit innenliegenden Nervenfasern

3= Basilar-Membran

4= Ossäre Anteile der Cochlea

Gut zu erkennen sind anhand des Färbesignals die Nervenfasern, welche von der Basilar-Membran kommend, umgeben vom stützenden, knöchernen Gewebe der Lamina spiralis ossea, in Richtung Modiolus ziehen und sich in seinem Inneren, nach Umschaltung im Ganglion spirale, zum Nervus cochlearis vereinen. Das Färbesignal der nervalen Strukturen wurde als positiv (Stufe 2) gewertet.

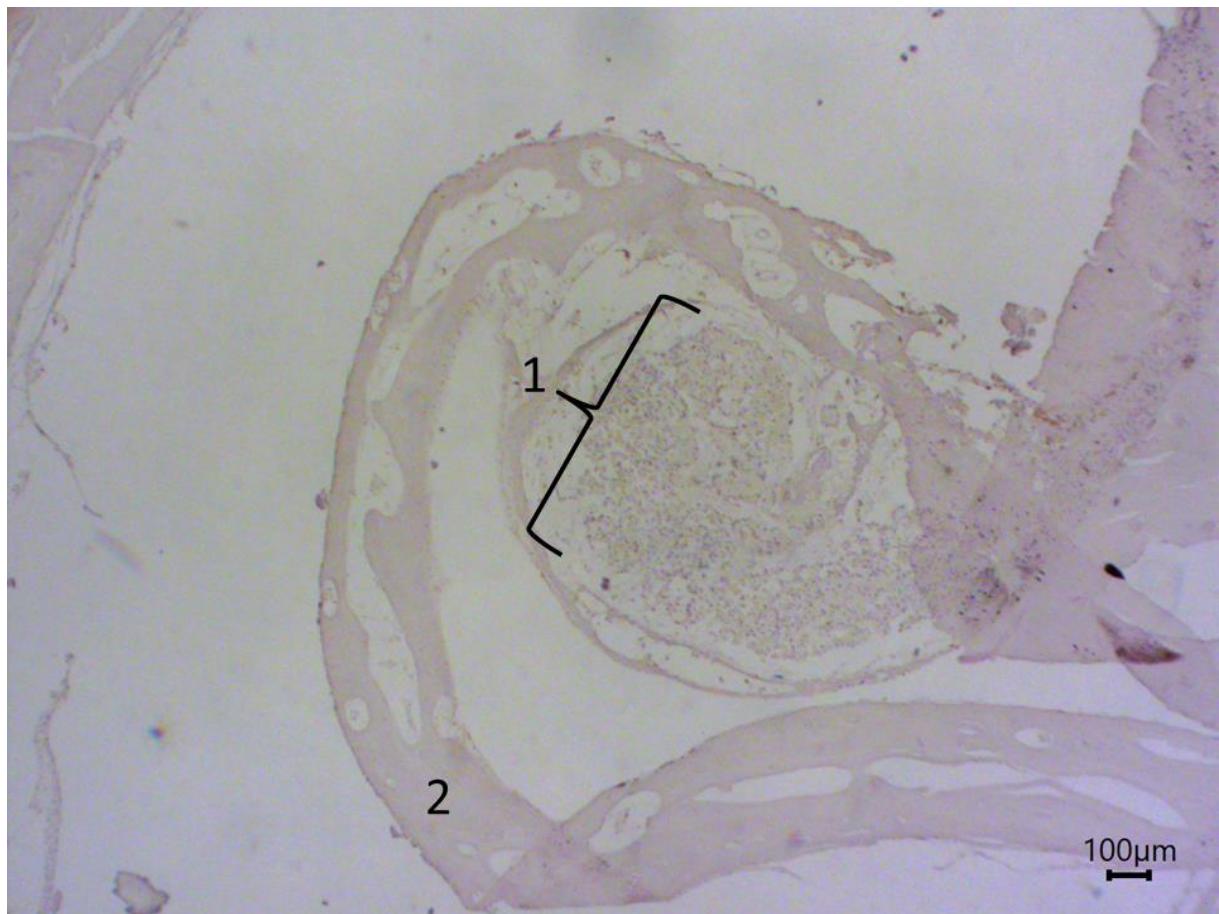


Abbildung 54 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Zu sehen ist der Modiolus in der Negativkontrolle ohne signifikantes Färbesignal (Stufe 0).

Dargestellte Strukturen:

1= Modiolus mit innenliegendem Nervus cochlearis

2= Ossäre Anteile der Cochlea

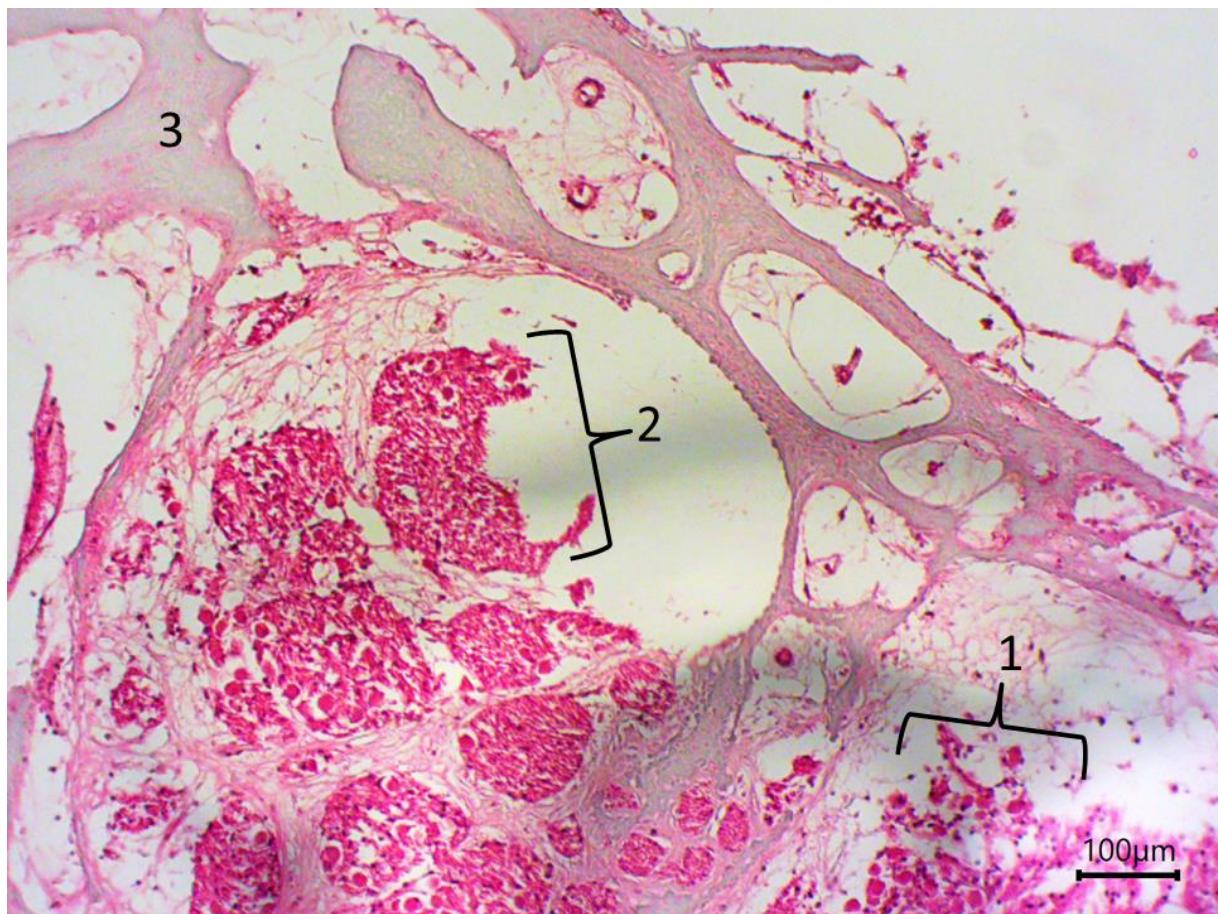


Abbildung 55 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Perikarien des Ganglion spirale

2= Nervus cochlearis im Modiolus

3= Ossäre Anteile der Cochlea

Gezeigt werden zum einen die im Modiolus befindlichen Nervenfasern des Nervus cochlearis (1) als auch im Bereich des rechten unteren und linken unteren Bildrandes, die Perikarien des Ganglion spirale, erkennbar an ihren verhältnismäßig großen Zellkörpern.

Das Färbesignal wurde sowohl für die Fasern des Nervus cochlearis als auch für die Zellen des Ganglion spirale mit positiv (Stufe 2) bewertet.

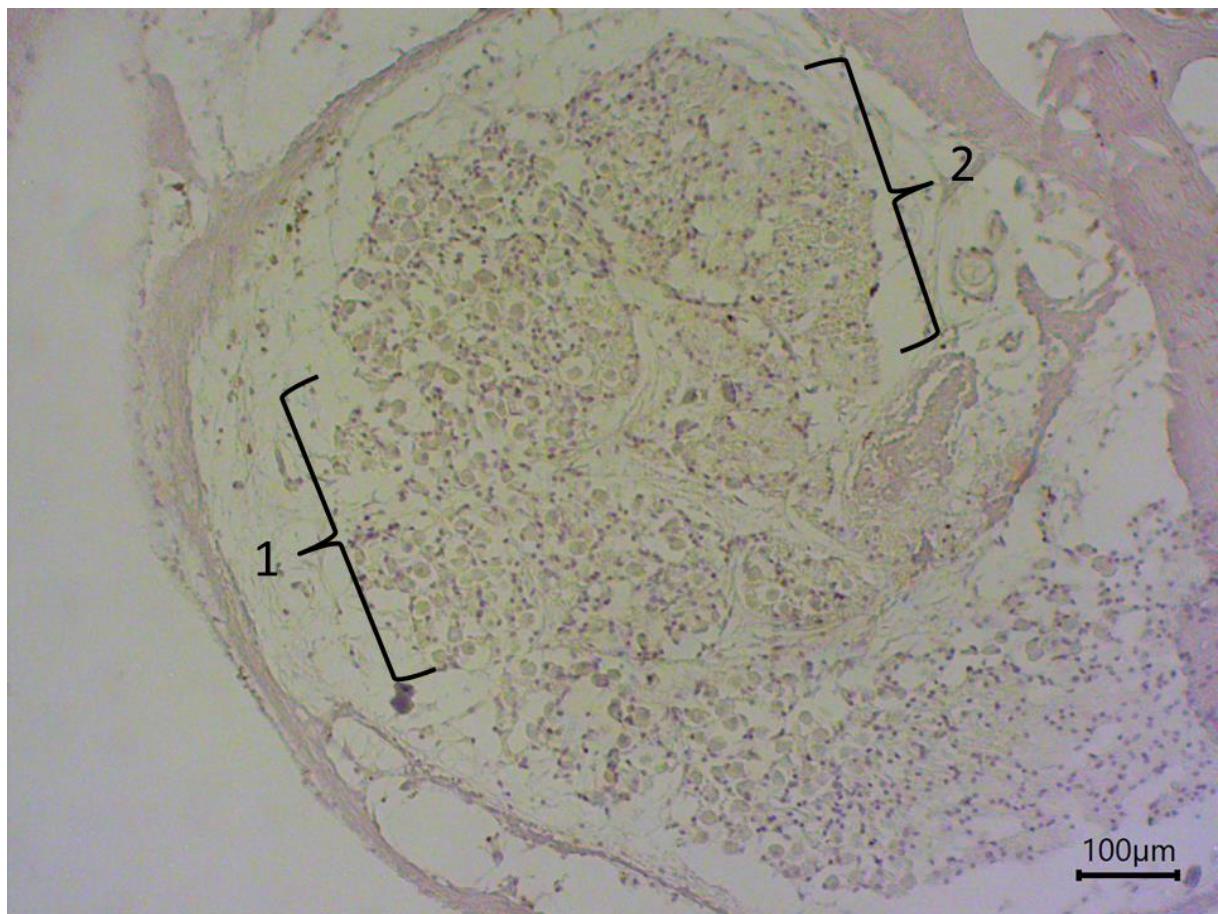


Abbildung 56 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Perikarien des Ganglion spirale

2= Nervus cochlearis im Modiolus

Zu sehen ist eine Negativkontrolle des Modiolus. Sowohl für die Zellkörper im Ganglion spirale, als auch für die Nervenfasern des Nervus cochlearis, konnte hier kein signifikantes Färbesignal erkannt werden (Stufe 0).

6.5.5 Färbeverhalten der Stria vascularis

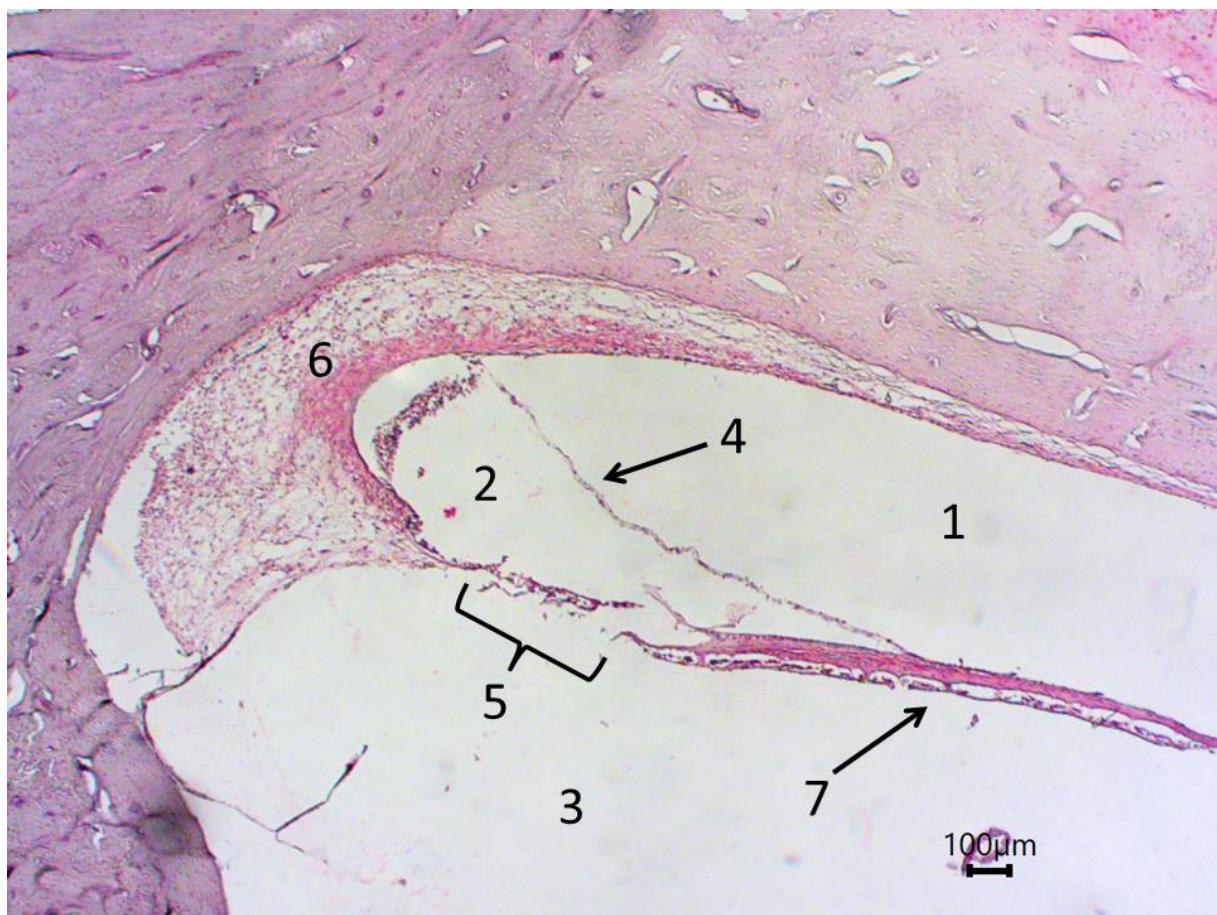


Abbildung 57 57 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Scala vestibuli

2= Scala media

3= Scala tympani

4= Reissner-Membran

5= Überreste von Basilar-Membran und Corti Organ (lokal destruiert)

6= Stria vascularis

7= Lamina spiralis ossea mit innenliegenden Fasern des Nervus cochlearis

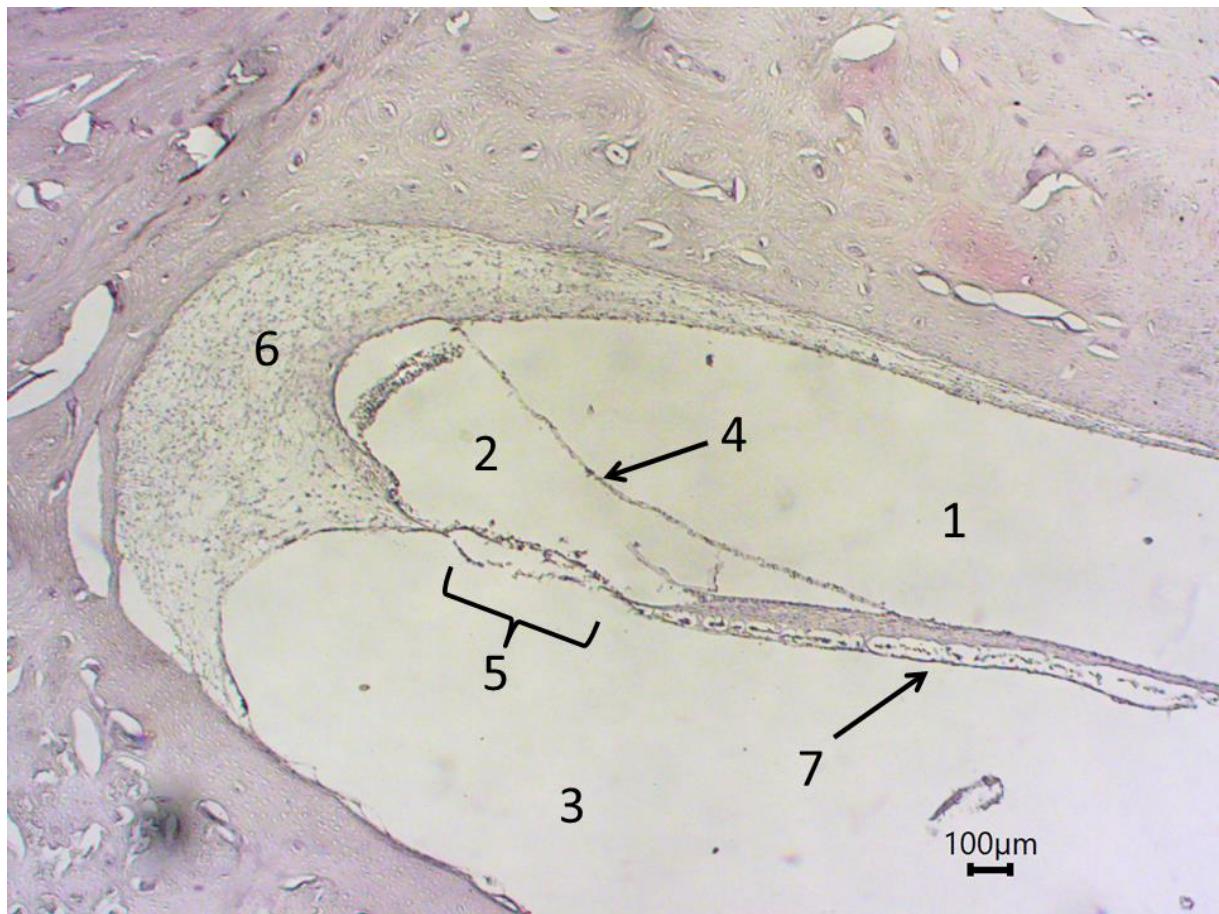


Abbildung 58 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.

Dargestellte Strukturen:

1= Scala vestibuli

2= Scala media

3= Scala tympani

4= Reissner-Membran

5= Überreste von Basilar-Membran und Corti Organ (lokal destruiert)

6= Stria vascularis

7= Lamina spiralis ossea mit innenliegenden Fasern des Nervus cochlearis

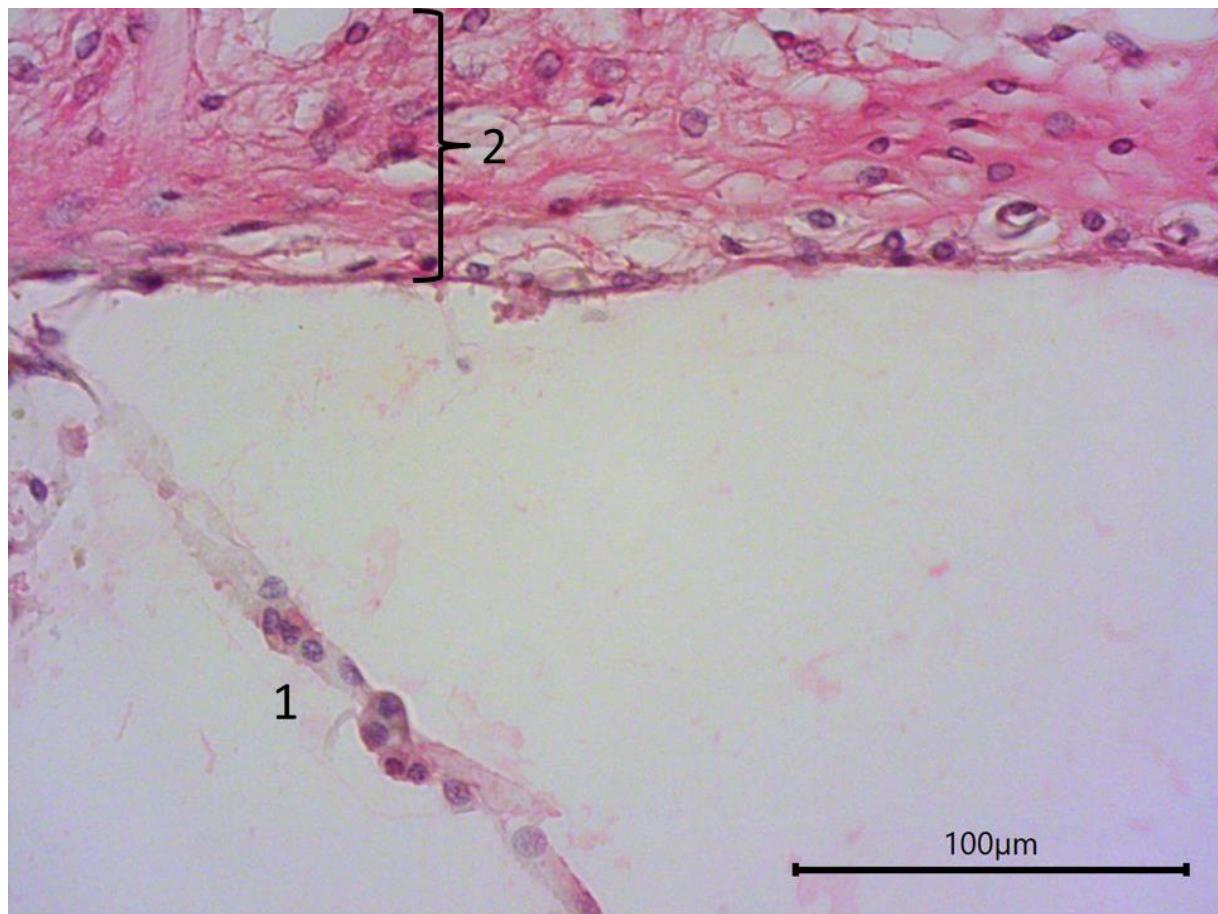


Abbildung 59 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist die Reissner-Membran (1) an ihrer Insertionsstelle an der Stria vascularis (2). Das Färbesignal wurde für die Reissner-Membran mit schwach positiv (Stufe 1) und für die Stria vascularis als positiv (Stufe 2) gewertet.

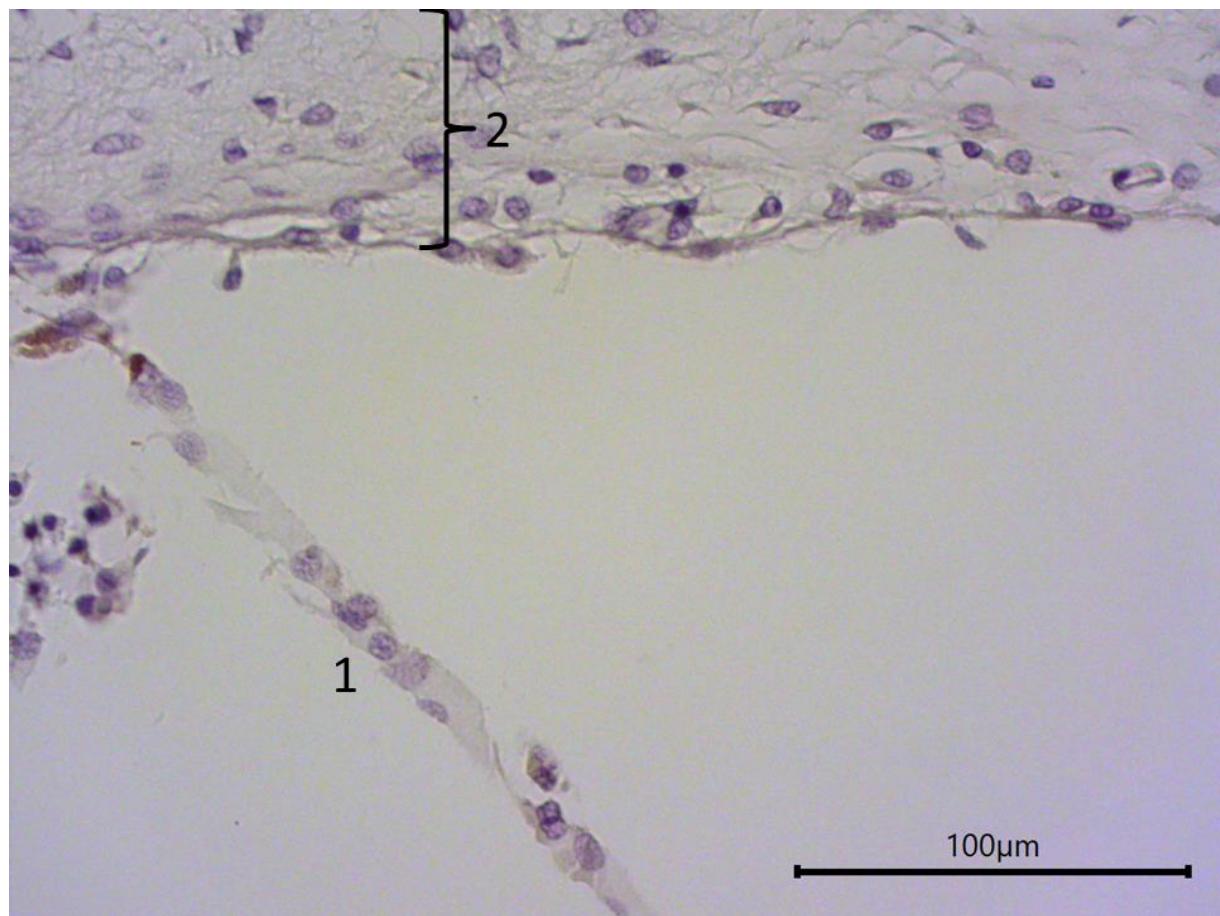


Abbildung 60 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.

Dargestellt ist die Reissner-Membran (1) an ihrer Insertionsstelle an der Stria vascularis (2). Das Färbesignal wurde für beide dargestellten Strukturen als nicht signifikant (Stufe 0) gewertet.

6.6 Ergebnisse der semiquantitativen Bewertung einzelner Leitstrukturen

6.6.1 Statistische Präsentation der semiquantitativen Auswertung

In diesem Teil sollen die Ergebnisse der qualitativen Auswertung der histologischen Untersuchung im Hinblick auf das Färbesignal in Form einer semiquantitativen, statistischen Aufarbeitung dargestellt und veranschaulicht werden. Dazu erfolgt zunächst eine Gegenüberstellung der Auswertungsergebnisse des Autors und der Fremdauswertung. Die Durchführung der Auswertung erfolgte nach dem zuvor dargestellten Schema und unter identischen technischen Bedingungen (gleicher Monitor mit gleichen Einstellungen hinsichtlich Leuchtkraft und Farbspektrum) zwischen den beiden auswertenden Personen.

6.6.2 Statistische Ergebnisse der Eigenauswertung

Identifizierte Leitstruktur	Anzahl histolog. Schnitte mit Nachweis	Anzahl Stufe 0 Färbesignale	Anzahl Stufe 1 Färbesignale	Anzahl Stufe 2 Färbesignale
Corti-Organ	7	0	0	7
Tekorial-Membran	7	4	3	0
Reissner-Membran	9	2	6	1
Basilar-Membran	13	0	1	12
Stria Vascularis	13	0	0	13
Ganglion spirale	4	0	0	4
Nervus cochlearis	8	0	0	8

Tabelle 7 - Darstellung der qualitativen Auswertung des Autors hinsichtlich immunhistochemischer Färbesignale, sortiert nach cochleären Leitstrukturen.

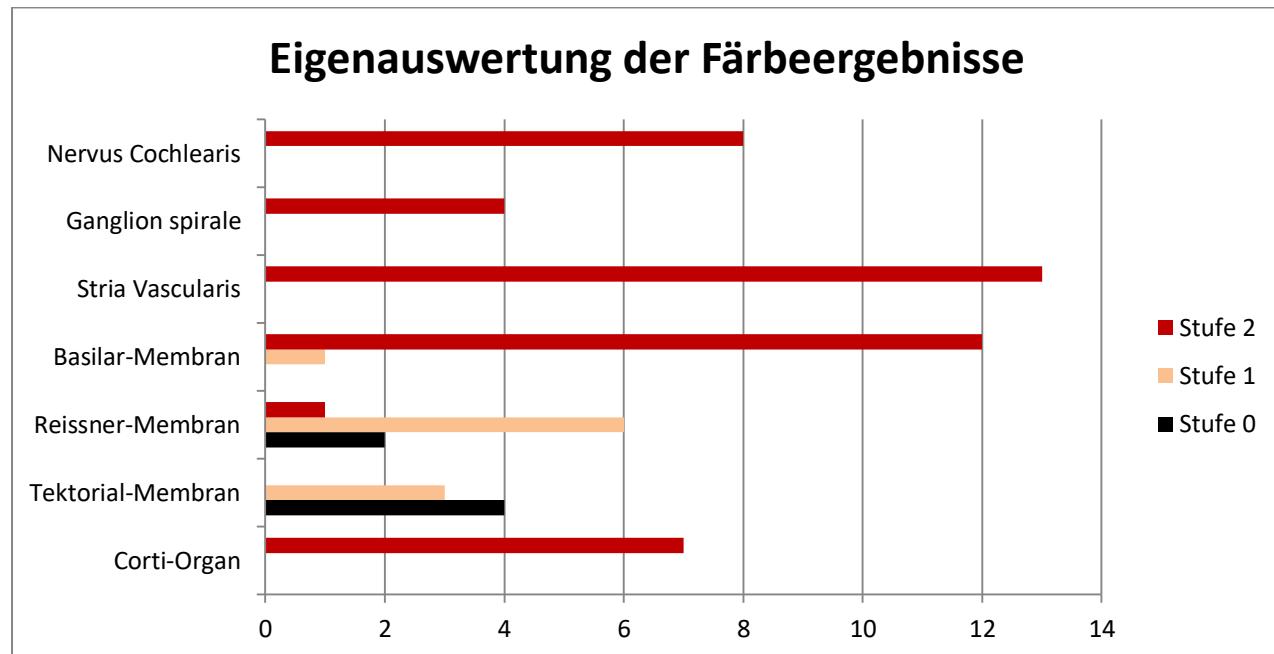


Diagramm 2 - Darstellung der absoluten Anzahl der qualitativen Färbeergebnisse nach Auswertung des Autors, sortiert nach Leitstrukturen.

6.6.3 Statistische Ergebnisse der Fremdauswertung

Identifizierte Leitstruktur	Anzahl histolog. Schnitte mit Nachweis	Anzahl Stufe 0 Färbesignale	Anzahl Stufe 1 Färbesignale	Anzahl Stufe 2 Färbesignale
Corti-Organ	7	0	0	7
Tektorial-Membran	7	3	4	0
Reissner-Membran	9	3	5	1
Basilar-Membran	13	0	0	13
Stria Vascularis	13	0	1	12
Ganglion spirale	4	0	0	4
Nervus cochlearis	8	0	0	8

Tabelle 8 - Darstellung der qualitativen Auswertung der Fremdauswertung hinsichtlich immunhistochemischer Färbesignale, sortiert nach cochleären Leitstrukturen.

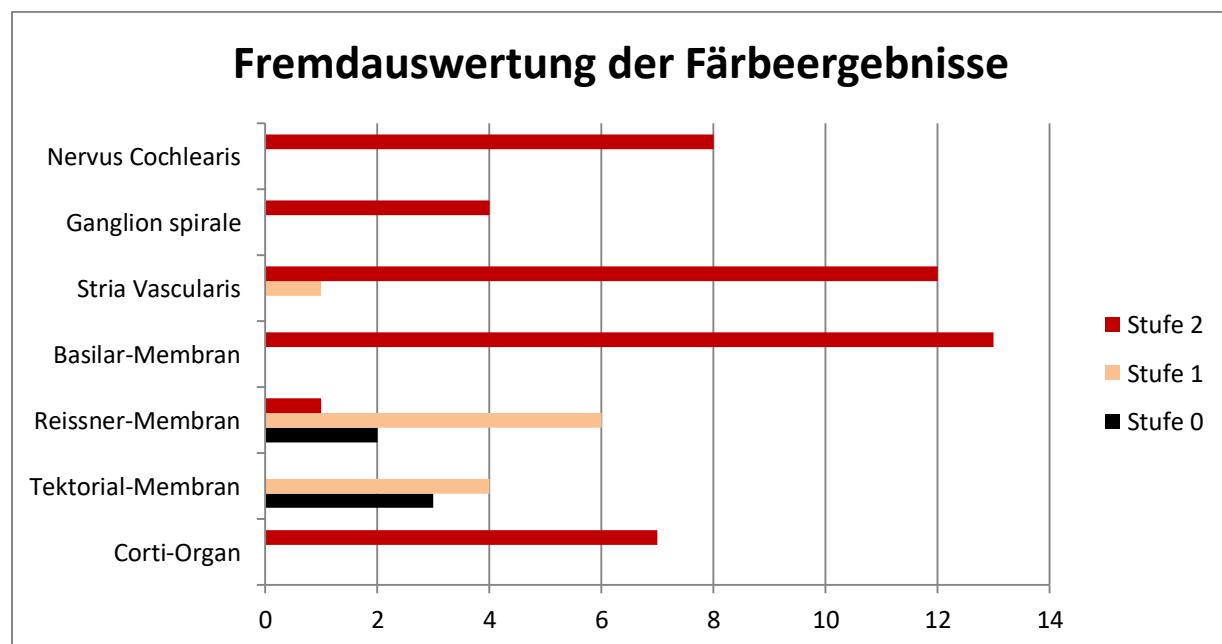


Diagramm 3 - Darstellung der absoluten Anzahl der qualitativen Färbeergebnisse nach Fremdauswertung, sortiert nach Leitstrukturen.

6.7 Interpretation der Ergebnisse aus Eigen- und Fremdauswertung

Um eine qualifizierte Aussage hinsichtlich der Expression von TRPC6-Kanälen in den verschiedenen Leitstrukturen der Cochlea treffen zu können, ist eine Objektivierung der Auswertung unerlässlich. Da die Interpretation einer Färbeintensität jedoch trotzdem eine subjektive Einschätzung ist, war mit einer vollständigen Übereinstimmung der Ergebnisse nicht zu rechnen.

Bei insgesamt 61 (100%) ausgewerteten cochleären Leitstrukturen aus 15 Proben humaner Cochleae kam es bei 4 (6,55%) zu abweichenden Ergebnissen, bei 57 Strukturen (93,45%) stimmten die Auswertungen überein. Die Ergebnisse werden daher als belastbar gewertet.

Insbesondere bei den Leitstrukturen des Corti-Organs, den Fasern der Nervus cochlearis und des Ganglion spirale kam es zu einer vollständigen Übereinstimmung der Eigen- und Fremdauswertung. Dabei fällt auf, dass es sich dabei um die Leitstrukturen handelt, die in sämtlichen histologischen Schnitten (100%), auf welchen sie dargestellt werden konnten, ein durchgängig stark positives (Stufe 2) Färbesignal in Eigen- und Fremdauswertung erbrachten. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass ein Nachweis von TRPC6-Kanälen in diesen Strukturen höchstwahrscheinlich erfolgreich war. Diese Interpretation erscheint im Hinblick auf die bereits stattgehabte Forschung zur Expression von TRPC6-Kanälen in verschiedenen nervalen Strukturen plausibel (Wang et al., 2020; Zhou et al., 2008).

Weiterhin fiel auf, dass die Stria vascularis, welche sich in 87% aller untersuchten Proben darstellen ließ, ebenfalls eine stark positives Expressionsmuster für TRPC6-Kanäle (100% Stufe 2 in der Eigenauswertung und 92% Stufe 2 / 8% Stufe 1 in der Fremdauswertung) zeigte. Für Blutgefäße wurde ebenfalls ein Nachweis von TRPC6-Kanälen erbracht (Abdinghoff et al., 2022) und deren Einfluss auf die Regulation der Gefäßweite und Vaskularisation ist Gegenstand aktueller Forschungen (Numaga-Tomita et al., 2023). Daher erscheint es nachvollziehbar, dass die Stria vascularis (deutsch: „Gefäßstreifen“) mit ihrem histologischen Aufbau aus unter anderem einer Vielzahl von Blutgefäßen, ebenfalls ein solch eindeutiges Färbeergebnis erbringt.

Bei den Leitstrukturen, welche sich primär aus bindegewebigen Zellformationen zusammensetzen (Reissner-Membran und Tectorial-Membran) zeigte sich ein deutlich abweichendes Auswertungsergebnis. Im Rahmen der kombinierten Eigen- und Fremdauswertung wurden 32 dieser Strukturen bewertet (9x Reissner-Membran + 7x Tectorial-Membran) * 2 Auswertern). Dabei kam es in 2 Fällen (6,25%) zu einem als Stufe 2 gewerteten Färbesignal, in 18 Fällen (56,25%) zu einem Stufe 1 Ergebnis und in 12 Fällen (37,5%) zu einem Stufe 0 Ergebnis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Gesamtschau der Ergebnisse ein Nachweis von TRPC6-Kanälen in der menschlichen Cochlea mit hoher Wahrscheinlichkeit gelungen ist.

6.8 Ergebnisse der Spezifitätskontrolle per Peptidinkubation

In zwei Färbedurchgängen wurde jeweils ein zusätzlicher Objektträger nach dem standardisierten Färbeprotokoll gefärbt, wobei zuvor der verwendete Anti-TRPC6-Primärantikörper über Nacht mit einem Kontrollpeptid (TRCP6 Blocking Peptide, Kat.Nr: BLP-CC017, Alomone Labs, Jerusalem, IL) inkubiert wurde. Die Lösung enthielt dabei gelöstes TRCP6-Strukturpeptid, gegen welches der Primärantikörper gerichtet ist. Durch die teilweise Bindung der Primärantikörper an die Kontrollpeptide standen in der anschließenden Färbung des histologischen Schnittes weniger freie Antikörper für die Anhaftung an Antigene-Epitope in der untersuchten Probe zur Verfügung. Dementsprechend wurden in den folgenden Schritten auch weniger Sekundärantikörper und detektierbare Chromogene gebunden. Daher war ein abgeschwächtes Färbesignal im Vergleich zur sonst angewandten immunhistochemischen Färbung gegen TRPC6 zu erwarten.

In beiden durchgeführten Spezifitätskontrollen kam es zu abgeschwächten Färbeergebnissen an den untersuchten Leitstrukturen, die sich jedoch immer noch deutlich von den Negativkontrollen ohne Verwendung eines Primärantikörpers unterschieden.

Daraus lässt sich schließen, dass die verwendete immunhistochemische Färbemethode spezifisch TRPC6-Epitope als Bindungsstelle nutzt, was die Belastbarkeit der erhaltenen Ergebnisse steigert.

Ein unspezifisches Färbeverhalten der verwendeten Methode erscheint anhand der zuvor genannten Ergebnisse als unwahrscheinlich.

6.9 Kritische Bewertung der Ergebnisse und Methoden

6.9.1 Postmortales Intervall, Autolyse und Probenkollektiv

Nach dem Tod setzen natürlicherweise autolytische Zerfallsprozesse im gesamten Körper ein. Diese führen zu mikroskopischer und anschließend auch makroskopischer Gewebedestruktion. Da die Methodik dieser Arbeit essentiell auf die Intaktheit von kleinsten Strukturen (TRPC6-Epitope als Bindungsstelle für die Primärantikörper) angewiesen ist, gilt es diese strukturelle Destruktion nach Möglichkeit einzuschränken. Daher erfolgt eine Fixierung der Körper mit einer geeigneten Fixierlösung.

Das Postmortale Intervall (PMI) beschreibt in dieser Arbeit den Zeitraum zwischen dem Todeszeitpunkt des Körperspenders und der Fixierung mit einem geeigneten Fixans, in diesem Falle NEP- oder Formalin-Lösung. Das PMI gliedert sich weiter in eine Zeitspanne, in der der Körper bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde und eine Zeit in der er der Kühlseinheit des anatomischen Institutes zugeführt wurde. Das Verhältnis der beiden Zeiträume zueinander bestimmt in Zusammenschau mit der gesamten Dauer des PMI das zu erwartende Ausmaß an autolytischen Prozessen. Während die erwähnten Zeiträume, aus denen sich das PMI zusammensetzt, nicht exakt erfasst werden konnten, wurde die Dauer des PMI in Tabelle 1 aufgeführt. Dabei ergab sich im Median ein PMI von 2,8 Tagen. Bisherige Untersuchungen zu postmortalen autolytischen Prozessen im Bereich des auditorischen Systems zogen Vergleiche im Bereich von 5 Minuten bis 300 Minuten (Theopold, 1977) beziehungsweise je nach Genese des Versterbens im Bereich von bis zu 140 Minuten (Nadol & Burgess, 1985) und zeigten dabei bereits in diesen Zeitfenstern deutliche Unterschiede hinsichtlich des Erhalts mikroskopischer Strukturen. Eine weitere Untersuchung konstatierte, dass eine Injektion von Formalin in den Perilymphraum der Cochlea innerhalb eines PMI von 40 Minuten zum bestmöglichen Erhalt der Strukturen zweckmäßig sei (Wright, 1980). Da sich die PMI dieser Arbeit weit außerhalb der zuvor genannten Zeiträume bewegen, ist mit einer fortgeschrittenen Autolyse des Gewebes zu rechnen. Dies erklärt nach Interpretation des Autors auch die verhältnismäßig hohen, für ein bewertbares Färbeergebnis notwendigen Konzentrationen von Primärantikörpern im Vergleich zu ähnlichen Arbeiten zu TRPC6-Kanälen an anderen humanen Geweben.

Es ist durchaus vorstellbar, dass bessere Färbeergebnisse mit weniger Hintergrundfärbung durch unmittelbar postmortale Probenentnahme und Injektion von Fixationslösung in topographischer Nähe der Zielstrukturen zu realisieren wären. Aufgrund der umfangreichen notwendigen Prozeduren im Hinblick auf die Entfernung des Felsenbeines, die Decalzifizierung und grundlegende Akzessibilität von jüngst verstorbenen menschlichen Körpern, erscheint die Umsetzung solcher methodischer Verbesserungen als schwierig.

Weiterhin ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu beachten, dass es sich bei den Körperspendern ausschließlich um Menschen hohen Lebensalters handelt. Statistisch besteht bei etwa 55% der Männer und etwa 45% der Frauen über 80 Jahre eine signifikante Presbyakusis (Minderung des Hörvermögens > 30dB) (Roth et al., 2011). Als Einflussfaktoren der Alterschwerhörigkeit sind unter anderem eine Degeneration neuronaler Strukturen und der Haarzellen innerhalb der Cochlea bekannt (Wang & Puel, 2020). Innerhalb des Kollektivs der Körperspender lag das durchschnittliche Alter bei 76 Jahren. Zwar wurden für diese Arbeit keine gezielten Daten bzgl. bestehender Hörminderungen erfasst, es ist jedoch davon auszugehen, dass diese im Kollektiv ähnlich vertreten waren, wie in der Gesamtbevölkerung. Somit sind die Ergebnisse zwar belastbar für die Betrachtung der älteren Bevölkerungsanteile, für jüngere Menschen jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig.

6.9.2 Auswirkungen der Fixierung

Die Fixierung dient als unerlässlicher, vorbereitender Schritt der Untersuchung der Proben dazu, die autolytischen Prozesse einzudämmen, denen sich ein Organismus nach dem Eintreten des Todes und folglichem Stillstand des physiologischen Stoffwechsels ausgesetzt sieht. Dabei sollen sowohl Strukturen auf mikroskopischer und makroskopischer Ebene erhalten werden, als auch pathogene Erreger abgetötet werden, auch um den Gesundheitsschutz des Untersuchers zu gewährleisten. Es kommt dabei einerseits zur Denaturierung von Proteinen, als auch zur Desinfektion des Körpers, beides hemmt die sonst fortschreitende Autolyse.

Die Durchführung der Fixation wurde bereits in Kapitel 5.1.4 ausführlich beschrieben. An dieser Stelle soll auf die Limitationen des Verfahrens, insbesondere im Hinblick auf die Konservation des Innenohres eingegangen werden.

Da die Fixationslösung initial primär in das vaskuläre System und subkutane Fettgewebe des Körpers appliziert wird, ist mit einer lokoregionär unterschiedlichen Penetration des Gewebes durch das Fixans zu rechnen. Trotz hoher Druckanwendung im Verfahren ist nicht davon auszugehen, dass kapillare Endstromgebiete sicher und suffizient erreicht werden können, um die Zellen des Körpers einheitlich zu konservieren. Gerade im Bereich der Cochlea sind die zuführenden Blutgefäße der Stria vascularis von solch kleinem Lumen (beispielsweise zeigten sich in der Untersuchung an Meerschweinchen Diameter von 12-16 µm (Miles & Nuttall, 1988)), bei verhältnismäßig hoher Länge (in etwa 290 mm je Kapillare (Poorna Pillutla et al., 2019)), dass eine vollständige Penetration durch die intraarterielle Injektion des Fixans, bei vorhandenem intravasalem, koaguliertem Blut, nicht mit Sicherheit gewährleistet werden kann.

Es ist also davon auszugehen, dass die Fixation des untersuchten Gewebes zumindest teilweise, wenn nicht größtenteils über die progrediente Penetration des Körpers während der Immersionsperiode in einer Wanne mit Fixationslösung über Tage bis Monate erfolgte. Da die Zielstrukturen umgeben sind von massivem Knochengewebe mit wenigen Verbindungen zu anderen Körperräumen oder der Umwelt, so etwa über den Meatus acusticus externus und internus, ist mit einem verlängerten Intervall zwischen Applikation des Fixans und Erreichen der Zielstrukturen und Hemmung der Autolyse zu rechnen.

Auch diese Einschränkung der Ergebnisqualität ist nach Ansicht des Autors unumgänglich für die Analyse von humanem cochleärem Gewebe und muss in Kauf genommen werden.

6.9.3 Auswirkungen der Decalzifizierung

Um die Proben der immunhistochemischen Färbung und mikroskopischen Untersuchung zugänglich zu machen, war eine weitestgehende Auflösung der mineralischen Matrix des Knochengewebes unumgänglich. Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Möglichkeiten zur Decalzifizierung wurde bereits in Kapitel 5.4.3 beschrieben.

Um den chemischen Stress auf die Zielstrukturen der Cochlea so gering wie möglich zu halten, wurde sich in dieser Arbeit für eine schonende, wenngleich langwierige Methode der Entkalkung mittels EDTA-Lösung entschieden. Dabei konnte mit pH Werten der Lösung (7,2) gearbeitet werden, die denen des nativen Körpermilieus vergleichbar waren.

Als Folge waren sehr lange Decalzifizierungszeiten von Nöten, um eine Schneidbarkeit mittels Mikrotom zu erreichen. Dabei zeigte sich, dass weniger der häufige Wechsel der Lösungen und die damit verhinderte Aufsättigung der EDTA-Lösung mit aus dem Knochen gelösten Calcium richtungsweisend für den Erfolg des Verfahrens waren, als vielmehr die Verweildauer der Probe in der Lösung.

Trotz einer Decalzifizierungszeit von median 201 Tagen, kam es zu Problemen bei der Anhaftung der Schnitte am Objekträger, zu Schwierigkeiten beim Schneiden mit dem Mikrotom und zu Zerreißungsartefakten auf den histologischen Schnitten.

Grundlegend wäre es nach Ansicht des Autors zweckmäßig, das Probenvolumen so gering wie möglich zu halten. Da es jedoch auch Teil dieser Arbeit war, zunächst eine sichere Entnahmemethode zu entwickeln, war dies nicht von Beginn an möglich. Eine Durchtrennung der Probe entlang der cochleären Längsachse wäre für die Entkalkung ebenfalls zweckmäßig - da dabei jedoch grobe Gewalteinwirkung mittels beispielsweise Band- oder Oszillations-Säge notwendig wäre, wäre bei diesem Vorgehen von einer starken Beschädigung der Strukturen auszugehen.

Optional wäre ein Versuch mit einem aggressiveren Reagenz zur Decalzifizierung vorstellbar, dies könnte die Dauer verkürzen, jedoch durch den niedrigeren pH-Wert der Lösungen auch Schäden an den Eiweißzielstrukturen in den Proben bedingen und das Färbeergebnis beeinträchtigen.

6.10 Auswertung hinsichtlich der Fragestellungen

1. Kann eine Standard-Operating-Procedure (SOP) für die sichere Entnahme der humanen Cochlea etabliert werden?

Durch die Vorbereitung der Probenentnahme per computertomographischer Untersuchung eines exemplarischen Schädelns, konnte bereits im Vorfeld die notwendige Größe des zu entnehmenden Knochenanteils berechnet werden. Es wurden dabei bewusst Sicherheitsabstände hinzugefügt, um die cochleären Zielstrukturen bei der Entfernung mit der oszillierenden Säge nicht zu beschädigen. Nach der erfolgten Erstentnahme wurde der Erfolg der gewählten Methode erneut computertomographisch kontrolliert. In den erhaltenen Proben konnte die vollständige Entnahme der Cochlea sichergestellt werden (vgl. Kapitel 5.3.2). Durch ein Schnittfenster von 35mm x 20mm (medio-laterale Ausmaße x fronto-dorsale Ausmaße), gemessen ab dem Porus acusticus internus, war eine sichere Entnahme der Zielstruktur auch ohne erneute bildgebende Kontrolle möglich. Die anatomischen, interindividuellen Varianzen hinsichtlich Geschlecht und Körpergröße konnten dabei gefahrlos vernachlässigt werden.

Somit ist eine sichere Entnahmetechnik etabliert worden, die auch für weitere Entnahmen in der Zukunft zuverlässig anwendbar ist.

2. Gelingt ein immunhistochemisch basierter Nachweis von TRPC6-Kanälen an der humanen Cochlea?

Nach Auswertung von 15 Proben, konnte die Expression von TRPC6-Kanälen in der humanen Cochlea sicher erbracht werden. Trotz geringfügiger Abweichungen der Färbeintensitäten zwischen Eigen- und Fremdauswertung, sind die Ergebnisse als belastbar zu werten. Die abgeschwächten Färbeergebnisse in der Kontrolle per Peptidinkubation, belegten eine Spezifität der verwendeten Färbemethode hinsichtlich der Bindung an TRPC6-Rezeptoren.

Die Ergebnisse lassen sich dabei mit vorangegangenen Forschungen an Mäusen in Einklang bringen. Insgesamt ist der immunhistochemische Nachweis von TRPC6-Kanälen in verschiedenen Leitstrukturen der humanen Cochlea gelungen.

3. Sind Unterschiede der TRPC6-Expressionsmuster verschiedener cochleärer Strukturen feststellbar?

Wie in Kapitel 6.5 ausführlich dargestellt, unterscheidet sich das Färbeverhalten der verschiedenen Leitstrukturen teils deutlich. Auffällig ist hierbei, dass insbesondere die Strukturen mit einem hohen Anteil an Nervenzellen oder Blutgefäßen ein stark positives Färbeverhalten zeigen. So sind die Ergebnisse hinsichtlich des Corti-Organes mit den inneren und äußeren Haarzellen, dem Nervus cochlearis und des Ganglion spirale, sowie der Stria vascularis mit ihrer Vielzahl an Blutgefäßen deutlich und aussagekräftig. Auch diese Annahme ist hinsichtlich früherer Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Expression von TRPC6-Kanälen in Blutgefäßen und Nerven schlüssig. Es ist anzunehmen, dass in diesen Strukturen die Dichte an TRPC6-Kanälen deutlich höher ist, als bspw. in bindegewebigen Strukturen wie der Reissner- oder Tectorial-Membran. Eine signifikante Varianz der verschiedenen Gewebe und Strukturen hinsichtlich ihrer TRPC6-Expression konnte festgestellt werden.

6.11 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick in die Zukunft

Die vielfältigen Rollen von TRPC6-Kanälen im menschlichen Körper sind bis heute nicht vollumfänglich erforscht und verstanden. Für verschiedene Organe und ihre Funktionen ist die Teilhabe von TRPC6-Kanälen an physiologischen Vorgängen und pathophysiologischen Veränderungen jedoch hinreichend belegt. So konnte beispielweise der Einfluss dieser Kanäle auf die Entstehung und den Progress der Niereninsuffizienz (Y.-L. Wu et al., 2017) und der fokalen-segmentalen-Glomerulussklerose (FSGS) (Dryer & Reiser, 2010; Winn et al., 2005) belegt werden. Selektive TRPC6-Inhibitoren als medikamentöse Therapie befinden sich in der Erprobung in Tierversuchen (Mukerji et al., 2007). Darüber hinaus konnten TRPC6-Kanäle auch als Kontributoren bei der Ausbildung hypertropher Herzerkrankungen identifiziert werden (Yamaguchi et al., 2017) und auch dort werden sie als potentielle therapeutische Zielstruktur diskutiert. Auch in sensorischen Nervenfasern, wie beispielsweise den Spinalganglien (Quick et al., 2012), konnte eine Expression von TRPC6-Kanälen, sowie deren Beteiligung an der Entstehung neuropathischer Schmerzen (Alessandri-Haber et al., 2009), nachgewiesen werden. Hierbei ist mit der Verbindung Larixyl-Acetat sogar bereits ein selektiver Antagonist bekannt, welche als therapeutische Option bei neuropathischen Schmerzen in Betracht kommen könnte (Wang et al., 2020).

Über die Expression in der humanen Cochlea, als auch über die pathophysiologische Relevanz hinsichtlich des Hörvorganges existieren bisher nur wenige wissenschaftliche Erkenntnisse.

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein direkter Nachweis von TRPC6-Kanälen an den Strukturen der menschlichen Cochlea erbracht werden. Takumida et.al. konnten eine Expression im Innenohr von Mäusen bereits 2009 per Immunfluoreszenz nachweisen (Takumida & Anniko, 2009). Quick et. al. zeigten 2012 einen Nachweis der Kanäle per *in situ*-Hybridisierung im Innenohr von Mäusen, sowie sensorische Defizite hinsichtlich des Hörempfindens bei TRPC3/TRPC6 double-knock-out Mäusen (Quick et al., 2012). Sie zogen aus ihren Forschungsergebnissen den Schluss, dass TRPC6-Kanäle in den cochleären Haarzellen maßgeblich an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind. Es wurde angenommen, dass die TRPC6-Kanäle als MET („mechano-elektrical-transducer“)-Kanäle fungieren und somit den Ioneninflux in die Haarzelle, sowie den konsekutiven exzitatorischen elektrischen Reiz maßgeblich mit verantworten.

In darauffolgenden Untersuchungen kam sowohl die gleiche (Sexton et al., 2016) als auch eine andere Forschungsgruppe (X. Wu et al., 2016) jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen: Die bei TRPC3/TRPC6 defizienten Mäusen gemessenen Ströme in die äußeren Haarzellen nach Stimulation durch einen akustischen Reiz, unterschieden sich nicht signifikant von denen der Wildtyp Mäuse. Die sensorischen Ergebnisse, gemessen mittels Hirnstammaudiometrie, zeigten jedoch Defizite in den Double-knock-out Mäusen und noch deutlichere Defizite in den Quadrupel-knock-out (TRPC1/TRPC3/TRPC5/TRPC6) Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Es lässt sich daraus schließen, dass die TRPC6-Kanäle insbesondere im Verbund mit anderen Vertretern der TRPC-Familie eine Rolle für die Schallempfindung im Innenohr spielen, aber dass diese nicht durch die Funktion als MET realisiert wird.

Die genaue Ermittlung der Funktion der TRPC6-Kanäle für den Hörvorgang steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus, ebenso wie die Frage ob eine gezielte Therapie, wie sie bereits in anderen Organsystemen erprobt wird, eine therapeutische Option bei Erkrankungen des auditiven Systems darstellen könnte.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist zum ersten Mal ein direkter Nachweis von TRPC6-Kanälen an verschiedenen, für den Hörvorgang unverzichtbaren, Strukturen im humanen Innenohr gelungen. Die Integration dieser Ergebnisse könnte einen relevanten Beitrag zu zukünftigen Forschungen und eventuellen therapeutischen Maßnahmen liefern.

7. Quellenverzeichnis

- Abdinghoff, J., Servello, D., Jacobs, T., Beckmann, A., & Tschernig, T. (2022). Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry. *Biomedical Reports*, 16(5), 42. <https://doi.org/10.3892/br.2022.1525>
- Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Chen, X., & Levine, J. D. (2009). TRPC1 and TRPC6 Channels Cooperate with TRPV4 to Mediate Mechanical Hyperalgesia and Nociceptor Sensitization. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6217–6228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-09.2009>
- Assad, J. A., & Corey, D. P. (1992). An active motor model for adaptation by vertebrate hair cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(9), 3291–3309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1527581>
- Bauwens, L. J. J. M., Veldman, J. E., Ramaekers, F. C. S., Bouman, H., & Huizing, E. H. (1991). Expression of Intermediate Filament Proteins in the Adult Human Cochlea. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 100(3), 211–218. <https://doi.org/10.1177/000348949110000309>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- 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 Gq class of G protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29672–29680. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29672>
- Brathauer, G. L. (2010). The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 588, 257–270. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_26
- Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nature Cell Biology*, 11(6), 669–677. <https://doi.org/10.1038/ncb0609-669>

Ciuman, R. R. (2009). Stria vascularis and vestibular dark cells: characterisation of main structures responsible for inner-ear homeostasis, and their pathophysiological relations. *The Journal of Laryngology and Otology*, 123(2), 151–162.
<https://doi.org/10.1017/S0022215108002624>

Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517–524.
<https://doi.org/10.1038/nature02196>

Corey, D. P., & Hudspeth, A. J. (1983). Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 3(5), 962–976. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601694>

Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216), 285–287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>

Crawford, A. C., Evans, M. G., & Fettiplace, R. (1991). The actions of calcium on the mechano-electrical transducer current of turtle hair cells. *The Journal of Physiology*, 434, 369–398. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018475>

Dallos, P. (2008). Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(4), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.016>

Dietrich, A., & Gudermann, T. (n.d.). TRPC6. In *Transient Receptor Potential (TRP) Channels* (pp. 125–141). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_7

Dietrich, Alexander, & Gudermann, T. (2014). TRPC6: Physiological function and pathophysiological relevance. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 222. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_7

Dietrich, Alexander, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47842–47852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302983200>

Dryer, S. E., & Reiser, J. (2010). TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 299(4), F689–F701. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00298.2010>

Eatock, R. A., Corey, D. P., & Hudspeth, A. J. (1987). Adaptation of mechanoelectrical transduction in hair cells of the bullfrog's sacculus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 7(9), 2821–2836.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3498016>

Eckhard, A. H., O'Malley, J. T., Nadol, J. B., & Adams, J. C. (2019). Mechanical Compression of Coverslipped Tissue Sections During Heat-induced Antigen Retrieval Prevents Section Detachment and Preserves Tissue Morphology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 67(6), 441–452.
<https://doi.org/10.1369/0022155419826940>

EULER, U. S. v., & LILJESTRAND, G. (1946). Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 12(4), 301–320.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1946.tb00389.x>

Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). *Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining* (pp. 31–43). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3

Fettiplace, R. (2017). Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Comprehensive Physiology*, 7(4), 1197–1227.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160049>

Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Hoffmann, M., Müller, C., Stolz, S., Scheunemann, J., Weissgerber, P., & Flockerzi, V. (2004). Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4), 1352–1358. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.041>

Gagov, H., Chichova, M., & Mladenov, M. (2018). Endolymph composition: paradigm or inevitability? *Physiological Research*, 67(2), 175–179.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.933684>

Gawlitz, J., Steinhäuser, J., Bücker, A., Krasteva-Christ, G., & Tschernig, T. (2021). Time is bone - Quantitative comparison of decalcification solvents in human femur samples using dual-X-ray-absorptiometry and computed tomography. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 235, 151696.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151696>

Gillespie, P. G., & Cyr, J. L. (2004). Myosin-1c, the Hair Cell's Adaptation Motor. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 521–545.

<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.112842>

Gillespie, P. G., & Müller, U. (2009). Mechanotransduction by Hair Cells: Models, Molecules, and Mechanisms. *Cell*, 139(1), 33–44.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.010>

He, X., Li, S., Liu, B., Susperreguy, S., Formoso, K., Yao, J., Kang, J., Shi, A., Birnbaumer, L., & Liao, Y. (2017). Major contribution of the 3/6/7 class of TRPC channels to myocardial ischemia/reperfusion and cellular hypoxia/reoxygenation injuries.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(23), E4582–E4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621384114>

Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., & Kurachi, Y. (2010). How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 459(4), 521–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0754-z>

Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716), 259–263. <https://doi.org/10.1038/16711>

Howard, J., & Hudspeth, A. J. (1987). Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechanoelectrical transduction by the bullfrog's saccular hair cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(9), 3064–3068. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.3064>

Hudspeth, A. J. (1985). The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4727), 745–752. <https://doi.org/10.1126/science.2414845>

Jacobs, T., Abdinghoff, J., & Tschernig, T. (2022). Protein detection and localization of the non-selective cation channel TRPC6 in the human heart. *European Journal of Pharmacology*, 924, 174972. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174972>

Jain, P. P., Lai, N., Xiong, M., Chen, J., Babicheva, A., Zhao, T., Parmisano, S., Zhao, M., Paquin, C., Matti, M., Powers, R., Balistrieri, A., Kim, N. H., Valdez-Jasso, D., Thistlethwaite, P. A., Shyy, J. Y.-J., Wang, J., Garcia, J. G. N., Makino, A., & Yuan, J. X.-J. (2021). TRPC6, a therapeutic target for pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 321(6), L1161–L1182. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00159.2021>

Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, J. A., Mielczarski, E., & Rai, B. (2010). Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(1), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.007>

Koike, K., Yoo, S.-J., Bleymehl, K., Omura, M., Zapiec, B., Pyrski, M., Blum, T., Khan, M., Bai, Z., Leinders-Zufall, T., Mombaerts, P., & Zufall, F. (2021). Danger perception and stress response through an olfactory sensor for the bacterial metabolite hydrogen sulfide. *Neuron*, 109(15), 2469-2484.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.05.032>

Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D. L., & Birnbaumer, L. (2007). Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4682–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611692104>

Liu, H., Zhu, R., Liu, C., Ma, R., Wang, L., Chen, B., Li, L., Niu, J., Zhao, D., Mo, F., Fu, M., Brömmme, D., Zhang, D., & Gao, S. (2017). Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. *BioMed Research International*, 2017, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/9050754>

Madsen, C. P., Klausen, T. K., Fabian, A., Hansen, B. J., Pedersen, S. F., & Hoffmann, E. K. (2012). On the role of TRPC1 in control of Ca²⁺ influx, cell volume, and cell cycle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 303(6), C625-34. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2011>

Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). *An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry* (pp. 289–298). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

Malczyk, M., Erb, A., Veith, C., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Gudermann, T., Dietrich, A., Weissmann, N., & Sydykov, A. (2017). The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00707>

Michalski, N., Michel, V., Caberlotto, E., Lefèvre, G. M., van Aken, A. F. J., Tinevez, J.-Y., Bizard, E., Houbron, C., Weil, D., Hardelin, J.-P., Richardson, G. P., Kros, C. J., Martin, P., & Petit, C. (2009). Harmonin-b, an actin-binding scaffold protein, is involved in the adaptation of mechanoelectrical transduction by sensory hair cells. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 459(1), 115–130. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0711-x>

Miles, F. P., & Nuttall, A. L. (1988). In vivo capillary diameters in the stria vascularis and spiral ligament of the guinea pig cochlea. *Hearing Research*, 33(2), 191–200. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(88\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-5955(88)90032-9)

Miquelestorena-Standley, E., Jourdan, M.-L., Collin, C., Bouvier, C., Larousserie, F., Aubert, S., Gomez-Brouchet, A., Guinebretière, J.-M., Tallegas, M., Brulin, B., Le Nail, L.-R., Tallet, A., Le Loarer, F., Massiere, J., Galant, C., & de Pinieux, G. (2020). Effect of decalcification protocols on immunohistochemistry and molecular analyses of bone samples. *Modern Pathology*, 33(8), 1505–1517. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0503-6>

Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X)

Moser, T., & Zenner, H.-P. (2019). *Peripheres Auditorisches System* (pp. 685–700). https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4_52

Mukerji, N., Damodaran, T. V., & Winn, M. P. (2007). TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772(8), 859–868. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2007.03.005>

Nadol, J. B., & Burgess, B. (1985). A study of postmortem autolysis in the human organ of Corti. *The Journal of Comparative Neurology*, 237(3), 333–342. <https://doi.org/10.1002/cne.902370305>

- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 12(3), 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
- Numaga-Tomita, T., Shimauchi, T., Kato, Y., Nishiyama, K., Nishimura, A., Sakata, K., Inada, H., Kita, S., Iwamoto, T., Nabekura, J., Birnbaumer, L., Mori, Y., & Nishida, M. (2023). Inhibition of transient receptor potential cation channel 6 promotes capillary arterialization during post-ischaemic blood flow recovery. *British Journal of Pharmacology*, 180(1), 94–110. <https://doi.org/10.1111/bph.15942>
- Oghalai, J. S. (2004). The cochlear amplifier: augmentation of the traveling wave within the inner ear. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 12(5), 431–438. <https://doi.org/10.1097/01.moo.0000134449.05454.82>
- Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kuroasaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., & Mori, Y. (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27359–27370. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27359>
- Ottersen, O. P., Takumi, Y., Matsubara, A., Landsend, A. S., Laake, J. H., & Usami, S. (1998). Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Progress in Neurobiology*, 54(2), 127–148. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00054-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00054-3)
- Pileri, S. A., Roncador, G., Ceccarelli, C., Piccioli, M., Briskomatis, A., Sabattini, E., Ascani, S., Santini, D., Piccaluga, P. P., Leone, O., Damiani, S., Ercolelli, C., Sandri, F., Pieri, F., Leoncini, L., & Falini, B. (1997). Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *The Journal of Pathology*, 183(1), 116–123. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199709\)183:1<116::AID-PATH1087>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199709)183:1<116::AID-PATH1087>3.0.CO;2-2)
- Poorna Pillutla, S. V., Kaur, C., Roy, T. S., & Jacob, T. G. (2019). Estimation of Volume of Stria Vascularis and the Length of Its Capillaries in the Human Cochlea. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 7(3), 117–123. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_12_19

- Quick, K., Zhao, J., Eijkelkamp, N., Linley, J. E., Rugiero, F., Cox, J. J., Raouf, R., Gringhuis, M., Sexton, J. E., Abramowitz, J., Taylor, R., Forge, A., Ashmore, J., Kirkwood, N., Kros, C. J., Richardson, G. P., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., & Wood, J. N. (2012). TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. *Open Biology*, 2(MAY). <https://doi.org/10.1098/rsob.120068>
- Ramos-Vara, J. A. (2011). *Principles and Methods of Immunohistochemistry* (pp. 83–96). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5
- Rhode, W. S., & Geisler, C. D. (1967). Model of the displacement between opposing points on the tectorial membrane and reticular lamina. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 42(1), 185–190. <https://doi.org/10.1121/1.1910547>
- Ricci, A. J., & Fettiplace, R. (1997). The effects of calcium buffering and cyclic AMP on mechano-electrical transduction in turtle auditory hair cells. *The Journal of Physiology*, 501 (Pt 1, 111–124. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.111bo.x>
- Riccio, A., Li, Y., Moon, J., Kim, K.-S., Smith, K. S., Rudolph, U., Gapon, S., Yao, G. L., Tsvetkov, E., Rodig, S. J., Van't Veer, A., Meloni, E. G., Carlezon, W. A., Bolshakov, V. Y., & Clapham, D. E. (2009). Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell*, 137(4), 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.039>
- Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kelsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D., Benham, C. D., & Pangalos, M. N. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, 109(1–2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00527-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00527-2)
- Roth, T. N., Hanebuth, D., & Probst, R. (2011). Prevalence of age-related hearing loss in Europe: a review. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 268(8), 1101–1107. <https://doi.org/10.1007/s00405-011-1597-8>
- Sakaguchi, H., Tokita, J., Müller, U., & Kachar, B. (2009). Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 17(5), 388–393. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e3283303472>

- Servello, D., Abdinghoff, J., Grissmer, A., & Tscherig, T. (2022). Transient receptor potential channel 6 in human skeletal muscle fibers: Investigation in fresh and conserved tissue samples. *Biomedical Reports*, 17(1), 60. <https://doi.org/10.3892/br.2022.1543>
- Sexton, J. E., Desmonds, T., Quick, K., Taylor, R., Abramowitz, J., Forge, A., Kros, C. J., Birnbaumer, L., & Wood, J. N. (2016). The contribution of TRPC1, TRPC3, TRPC5 and TRPC6 to touch and hearing. *Neuroscience Letters*, 610. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.052>
- Shi, S. R., Imam, S. A., Young, L., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (1995). Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 43(2), 193–201. <https://doi.org/10.1177/43.2.7822775>
- Stanzione, R., Forte, M., Cotugno, M., Bianchi, F., Marchitti, S., & Rubattu, S. (2022). Relevance of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in experimental and human stroke. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 474(1), 141–153. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02636-w>
- Takumida, M., & Anniko, M. (2009). Expression of canonical transient receptor potential channel (TRPC) 1–7 in the mouse inner ear. *Acta Oto-Laryngologica*, 129(12), 1351–1358. <https://doi.org/10.3109/00016480902798350>
- Theopold, H. M. (1977). [Postmortem changes of fine structure in the auditory pathways (organ of Corti and nucleus cochlearis of the guinea pig (author's transl))]. *Laryngologie, Rhinologie, Otologie*, 56(3), 207–215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/140960>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Wang, J., & Puel, J.-L. (2020). Presbycusis: An Update on Cochlear Mechanisms and Therapies. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jcm9010218>
- Wang, J., Zhao, M., Jia, P., Liu, F.-F., Chen, K., Meng, F.-Y., Hong, J.-H., Zhang, T., Jin, X.-H., & Shi, J. (2020). The analgesic action of larynx acetate, a potent TRPC6 inhibitor, in rat neuropathic pain model induced by spared nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01767-8>

- Weissmann, N., Sydykov, A., Kalwa, H., Storch, U., Fuchs, B., Mederos y Schnitzler, M., Brandes, R. P., Grimminger, F., Meissner, M., Freichel, M., Offermanns, S., Veit, F., Pak, O., Krause, K.-H., Schermuly, R. T., Brewer, A. C., Schmidt, H. H. H. W., Seeger, W., Shah, A. M., ... Dietrich, A. (2012). Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nature Communications*, 3, 649. <https://doi.org/10.1038/ncomms1660>
- Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T., & Brayden, J. E. (2002). Transient Receptor Potential Channels Regulate Myogenic Tone of Resistance Arteries. *Circulation Research*, 90(3), 248–250. <https://doi.org/10.1161/hh0302.105662>
- Wilhelm, T., Stelzer, T., Wiegand, S., Güldner, C., Teymoortash, A., Günzel, T., & Hagen, R. (2015). Toxic inner ear lesion following otitis media with effusion: a comparative CT-study regarding the morphology of the inner ear. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology : Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 272(12), 3635–3643. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3425-4>
- Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L., Pericak-Vance, M. A., Howell, D. N., Vance, J. M., & Rosenberg, P. B. (2005). A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), 1801–1804. <https://doi.org/10.1126/science.1106215>
- Woudenberg-Vrenken, T. E., Bindels, R. J. M., & Hoenderop, J. G. J. (2009). The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nature Reviews. Nephrology*, 5(8), 441–449. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.100>
- Wright, A. (1980). Scanning electron microscopy of the human cochlea--postmortem autolysis artefacts. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 228(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF00455888>
- Wu, X., Indzhykulian, A. A., Niksch, P. D., Webber, R. M., Garcia-Gonzalez, M., Watnick, T., Zhou, J., Vollrath, M. A., & Corey, D. P. (2016). Hair-cell mechanotransduction persists in TRP channel knockout mice. *PLoS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155577>

- Wu, Y.-L., Xie, J., An, S.-W., Oliver, N., Barrezueta, N. X., Lin, M.-H., Birnbaumer, L., & Huang, C.-L. (2017). Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. *Kidney International*, 91(4), 830–841. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.039>
- Xia, Y., Yang, X.-R., Fu, Z., Paudel, O., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., & Sham, J. S. K. (2014). Classical Transient Receptor Potential 1 and 6 Contribute to Hypoxic Pulmonary Hypertension Through Differential Regulation of Pulmonary Vascular Functions. *Hypertension*, 63(1), 173–180. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01902>
- Yamaguchi, Y., Iribe, G., Nishida, M., & Naruse, K. (2017). Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 130, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.06.010>
- Yamashita, S., & Katsumata, O. (2017). *Heat-Induced Antigen Retrieval in Immunohistochemistry: Mechanisms and Applications* (pp. 147–161). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6788-9_10
- Yuan, J. P., Kim, M. S., Zeng, W., Shin, D. M., Huang, G., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels*, 3(4), 221–225. <https://doi.org/10.4161/chan.3.4.9198>
- Zheng, W., & Holt, J. R. (2021). The Mechanosensory Transduction Machinery in Inner Ear Hair Cells. *Annual Review of Biophysics*, 50, 31–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062420-081842>
- Zhou, J., Du, W., Zhou, K., Tai, Y., Yao, H., Jia, Y., Ding, Y., & Wang, Y. (2008). Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 11(7), 741–743. <https://doi.org/10.1038/nn.2127>

8. Tabellen/Diagramm-Verzeichnis

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Übersicht über die Körperspender mit Journalnummern	27
Tabelle 2 - Übersicht über die Decalzifizierungsprozesse der einzelnen Proben	42
Tabelle 3 - Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung Tag 1	61
Tabelle 4 - Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung Tag 2	62
Tabelle 5 - Übersicht über die verwendeten Geräte	64
Tabelle 6 - Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Antikörper	65
Tabelle 7 - Auswertungsschema für die Beurteilung der Färbesignale und damit verbunden Expression von TRPC6-Kanälen in den immunhistochemischen Färbungen.	68
Tabelle 8 - Darstellung der Ergebnisse der Auswertung der histologischen Schnitte im Hinblick auf die identifizierbaren cochleären Leitstrukturen, geordnet nach Journalnummer des betreffenden Körperspenders.	74
Tabelle 9 - Darstellung der qualitativen Auswertung des Autors hinsichtlich immunhistochemischer Färbesignale, sortiert nach cochleären Leitstrukturen.	119
Tabelle 10 - Darstellung der qualitativen Auswertung der Fremdauswertung hinsichtlich immunhistochemischer Färbesignale, sortiert nach cochleären Leitstrukturen.	120

8.2 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 - Darstellung der absoluten Anzahl der Nachweise einzelner cochleärer Leitstrukturen in den untersuchten Proben in Form eines Balkendiagramms.	75
Diagramm 2 - Darstellung der absoluten Anzahl der qualitativen Färbeergebnisse nach Auswertung des Autors, sortiert nach Leitstrukturen.	119
Diagramm 3 - Darstellung der absoluten Anzahl der qualitativen Färbeergebnisse nach Fremdauswertung, sortiert nach Leitstrukturen.	120

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Schematischer Aufbau eines TRP Kanal Monomers	10
Abbildung 2 - Schematischer Aufbau eines TRP Kanal Tetramers	11
Abbildung 3 - Schematische Darstellung eine TRPC6 Monomers mit Strukturelementen	14
Abbildung 4 - Schematische Darstellung der Partizipation von TRCP6 Kanälen am ROCE und SOCE	16
Abbildung 5 - Schematischer Querschnitt durch das Lumen des cochleären Gangsystems mit Leitstrukturen (frei nach (Moser & Zenner, 2019))	20
Abbildung 6 - Schematischer Arbeitsablauf	24
Abbildung 7 - Computertomographische Aufnahme der knöchernen Strukturen des rechten Hemikraniums in coronarer Schnittführung.	29
Abbildung 8 - Blick in den eröffneten Schädel situs in kranio-kaudaler Richtung nach Entfernung des Groß- und Kleinhirns.	32
Abbildung 9 - Blick in den Schädel situs in kranio-kaudaler Richtung nach Heraussägen der Probe	33
Abbildung 10 - Computertomographische Aufnahme des entnommenen Teils der Pars petrosa ossis temporale	35
Abbildung 11 - Lagerung der Proben im Wärmeschüttelschrank in Schraubgläsern mit EDTA-Lösung	40
Abbildung 12 - Aufsicht auf den Präparatekasten	44
Abbildung 13 - Schematische Darstellung der indirekten immunhistochemischen Färbung...	46
Abbildung 14 - Schematische Darstellung der verwendeten Streptavidin-Biotin-Methode zur Amplifikation der indirekten immunhistochemischen Färbung.	51
Abbildung 15 - Vorbereitung der Objektträger vor der Demaskierung mithilfe von PTFE-Folie und spezieller Klammern.	56
Abbildung 16 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2193R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.	70
Abbildung 17 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2193R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	71
Abbildung 18 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.	72

Abbildung 19 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	73
Abbildung 20 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Niere (Journalnummer 2151) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	77
Abbildung 21 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Niere (Journalnummer 2151) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	78
Abbildung 22 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.	79
Abbildung 23 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	80
Abbildung 24 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper mit vorheriger Peptidinkubation und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	81
Abbildung 25 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	82
Abbildung 26 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	83
Abbildung 27 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper mit vorheriger Peptidinkubation und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	84
Abbildung 28 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	85
Abbildung 29 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	86

Abbildung 30 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	87
Abbildung 31 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	88
Abbildung 32 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	89
Abbildung 33 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	90
Abbildung 34 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	91
Abbildung 35 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	92
Abbildung 36 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	93
Abbildung 37 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung	94
Abbildung 38 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	95
Abbildung 39 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper mit vorheriger Peptidinkubation und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	96
Abbildung 40– Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2145L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	97

Abbildung 41 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung	98
Abbildung 42 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	99
Abbildung 43 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	100
Abbildung 44 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2221L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	101
Abbildung 45 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.	102
Abbildung 46 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	103
Abbildung 47 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	104
Abbildung 48 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	105
Abbildung 49 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.	106
Abbildung 50 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	107
Abbildung 51 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	108

Abbildung 52 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2156R) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	109
Abbildung 53 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung	110
Abbildung 54 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	111
Abbildung 55 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	112
Abbildung 56 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2146L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 10x Vergrößerung.....	113
Abbildung 57 57 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung	114
Abbildung 58 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 4x Vergrößerung.....	115
Abbildung 59 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach immunhistochemischer Färbung mittels TRPC6-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	116
Abbildung 60 – Mikroskopische Aufnahme aus einer humanen Cochlea (Journalnummer 2220L) nach Inkubation mit 1% BSA-Lösung als Negativkontrolle und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in 40x Vergrößerung.....	117

10. Danksagung

Ich schätze mich glücklich und bin sehr dankbar, auf dem Weg des Erstellens dieser Arbeit von vielen Menschen auf verschiedene Arten und Weisen unterstützt worden zu sein. An dieser Stelle sollen einige gesondert Beachtung finden.

Größter Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Tschernig dafür, dass er mir die Möglichkeit der Promotion eröffnet hat und auch für seine Geduld, eine stets zugewandte Zusammenarbeit und umfangreiche Unterstützung in jeder Phase dieses Projektes.

Weiterhin dem gesamten Team des Forschungslabors der HNO-Klinik der Universität des Saarlandes. Namentlich Frau Carolin Bick, Frau Dr. rer. nat. Silke Wemmert und Frau Prof. Dr. Dr. Gentiana Wenzel. Ohne ihre Unterstützung bei der Aufarbeitung der Proben, Etablierung eines zuverlässigen Färbeprotokolls und umfangreiche Anleitung bei der selbstständigen Durchführung der Laborarbeiten, wäre die Umsetzung dieser Forschungsarbeit schwer vorstellbar gewesen.

Bezüglich der Bereitstellung und Fixation der Körperspender bin ich auch Frau Irina Schenk, Mitarbeiterin der Prosektur des anatomischen Institutes, für Ihre Unterstützung sehr dankbar.

Auch Herrn Dr. med. Joshua Gawlitzas möchte ich für die in dieser Arbeit verwendeten computertomographischen Bildgebungen, sowie für seine Forschungsergebnisse hinsichtlich des Decalzifizierungsprozesses ausdrücklich danken.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie für die Ratschläge bei dem Verfassen wissenschaftlicher Texte, zahlreiche Stunden des Korrekturlesens und aufmunternde Worte in Phasen der Frustration.

Nicht zuletzt soll sich mein Dank auch an alle Körperspender richten – an jene, deren Körper für diese Arbeit verwendet wurden, aber auch an jene, die sich in Zukunft bereit erklären, nach ihrem Tode einen unschätzbareren Beitrag zur Ausbildung und Forschung in der Medizin zu leisten. Ohne die selbstlose Bereitstellung ihrer Körper zum Dienste der Wissenschaft wäre diese und viele andere Arbeiten unmöglich gewesen wäre.

11. Publikationen

Englisch CN, Steinhäuser J, Wemmert S, Jung M, Gawlitza J, Wenzel G, Schick B, Tschernig T. Immunohistochemistry Reveals TRPC Channels in the Human Hearing Organ—A Novel CT-Guided Approach to the Cochlea. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(11):9290.
<https://doi.org/10.3390/ijms24119290>

Gawlitza, J., Steinhäuser, J., Bücker, A., Krasteva-Christ, G., & Tschernig, T. (2021). Time is bone - Quantitative comparison of decalcification solvents in human femur samples using dual-X-ray-absorptiometry and computed tomography. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 235, 151696.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151696>

12. Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 27.06.2024

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Tschernig

Prof. Dr. Markus Hoth