

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

**Histomorphologie und Verteilung von TRPC6 in  
pathophysiologischen Schlüsselregionen des  
Herzens – Eine Untersuchung an menschlichem  
Gewebe**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes**

2022

vorgelegt von Jil Gartner

geb. am: 17.08.1999 in Karlsruhe

Tag der Promotion: 31.03.23

Doktorvater: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Betreuer: Dr. med. Jan Federspiel

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

Berichterstattende: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Prof. Dr. med. Adolfo Cavalié



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
3.1	<i>Die TRP-Kanäle</i>	5
3.2	<i>Der TRPC6-Kanal</i>	7
3.2.1	TRPC6 allgemein	7
3.2.2	TRPC6 und Krankheiten	10
3.2.3	TRPC6 und Herz	12
3.3	<i>Fragestellung / Ziele der Arbeit</i>	17
3.4	<i>Auswahl der Proben</i>	18
3.4.1	Rechtes Herzohr (RAA)	18
3.4.2	Übergang der linken unteren Pulmonalvene (PV) auf den linken Vorhof	19
3.4.3	Linker anteriorer Papillarmuskel (PAP)	20
3.4.4	Interventrikuläres Septum (IVS)	20
3.4.5	Trabecula Septomarginalis (SM)	21
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
4.1	<i>Material</i>	23
4.1.1	Substanzen für die Immunhistochemie	23
4.1.2	Chemikalien	23
4.1.3	Geräte	24
4.1.4	Sonstige Materialien	25
4.2	<i>Methoden</i>	25
4.2.1	Fixierung der Leichen	25
4.2.2	Probenentnahme	27

4.2.3	Herstellung von Paraffinschnitten	28
4.2.4	Histologische Färbungen	30
4.2.5	Immunhistochemische Färbung	34
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
5.1	<i>Morphologie</i>	38
5.1.1	Rechtes Herzohr	38
5.1.2	Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof	44
5.1.3	Linker anteriorer Papillarmuskel	52
5.1.4	Interventrikuläres Septum	58
5.1.5	Trabecula Septomarginalis	68
5.2	<i>Immunhistochemie</i>	76
5.2.1	Verdünnungsreihe	76
5.2.2	Allgemeine Beschreibung der immunhistochemischen Färbung	83
5.2.3	Vergleich Vorhof und Kammer	89
5.2.4	Vergleich linkes und rechtes Herz	97
5.2.5	Vergleich ventrikulär septale und nicht-septale Muskulatur	103
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>109</b>
6.1	<i>Diskussion der Methodik</i>	109
6.2	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	111
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>129</b>
8.1	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	129
8.2	<i>Tabellenverzeichnis</i>	131
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>132</b>

<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	<b>134</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>135</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>136</b>
<b>13</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>

# 1 Zusammenfassung

Einige Lokalisationen des menschlichen Herzens stehen mit bestimmten Pathologien dieses Organs in Verbindung. So zum Beispiel der Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof in Bezug auf Entstehung und Therapie von Vorhofflimmern oder das linke Herzohr als möglicher Ausgangspunkt von Thromben.

Der nicht selektive Kationenkanal TRPC6, welcher zur Familie der transient receptor potential (TRP)-Kanäle gehört, ist mit physiologischen und pathologischen Prozessen, wie Hypertrophie, im Herzen assoziiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, das TRPC6-Protein in klinisch relevanten Lokalisationen des menschlichen Herzens nachzuweisen und Aussagen über seine Verteilung treffen zu können. Zu diesem Zweck wurden Proben aus fünf fixierten Körperspendern entnommen, wobei es sich bei den präparierten Bereichen um das rechte Herzohr, die Einmündung der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof, das proximale Interventrikuläre Septum, den linken anterioren Papillarmuskel und die Trabecula septomarginalis handelte.

Nachdem anhand grundlegender histologischer Färbungen Aussagen zu Zustand und Morphologie der Proben getroffen werden konnten, folgte der Nachweis des TRPC6-Kanals mittels immunhistochemischer Färbung. Dafür erfolgte zunächst die Applikation eines Primärantikörpers gegen TRPC6, welcher in der Folge von einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper gebunden wurde. Durch die Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), welches als Substrat der Meerrettichperoxidase diente, konnte der Kanal schließlich in Form von braunen Signalen sichtbar gemacht werden.

Bei der Analyse der gefärbten Schnitte zeigte sich eine deutliche Expression des TRPC6-Proteins in den Kardiomyozyten, wohingegen sich das umgebende Bindegewebe weitestgehend TRPC6-negativ darstellte. Es konnten keine Unterschiede in der Verteilung von TRPC6 in den verschiedenen Entnahmestellen festgestellt werden.

Es kann somit festgehalten werden, dass der TRPC6-Kanal in Myokardbereichen von klinischer Relevanz exprimiert wird und in diesen gleichmäßig verteilt ist.

## 2 Summary

Some localizations of the human heart are associated with certain pathologies of the organ. For example, the junction of the left inferior pulmonary vein with the left atrium in relation to the development and therapy of atrial fibrillation or the left heart ear as a possible origin of thrombi.

The non-selective cation channel TRPC6, which belongs to the family of TRP channels, is linked with physiological and pathological processes, such as hypertrophy, in the heart. Therefore, the aim of the presented study was to detect the TRPC6 protein in clinically relevant localizations of the human heart and to be able to make statements about its distribution. For this purpose, samples were obtained from five fixed body donors, the dissected areas being the right heart ear, the junction of the left inferior pulmonary vein with the left atrium, the proximal interventricular septum, the left anterior papillary muscle, and the septomarginal trabeculation. After conclusions about the condition and morphology of the specimens could be made based on basic histological staining, the TRPC6 channel was detected by immunohistochemical staining. For this purpose, a primary antibody against TRPC6 was first applied, which was subsequently bound by a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Incubation with DAB, which served as a substrate for horseradish peroxidase, finally allowed the channel to be visualized in the form of brown signals.

Analysis of the stained sections showed clear expression of TRPC6 protein in the cardiomyocytes, whereas the surrounding connective tissue was widely TRPC6-negative. No differences in the distribution of TRPC6 could be detected in the different sampling sites.

Thus, it can be concluded that the TRPC6 channel is expressed in myocardial areas of clinical relevance and is equally distributed in these.

## **3 Einleitung**

### **3.1 Die TRP-Kanäle**

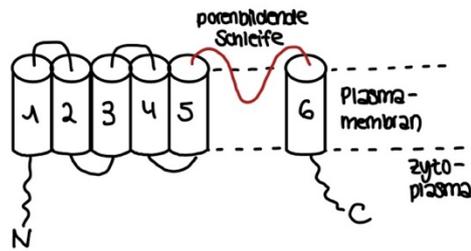
Bei der Transient Receptor Potential (TRP) Superfamilie handelt es sich um integrale Membranproteine, die als nicht-selektive Kationenkanäle fungieren. Sie sind in allen zellulären Membranen vorhanden, mit Ausnahme der Kernhülle und der Mitochondrien. Die meisten TRP-Kanäle befinden sich allerdings in der Plasmamembran, wo sie eine wesentliche Rolle beim Einstrom von Calcium, Magnesium sowie weiteren Ionen in die Zelle spielen. (Nilius & Owsianik, 2011)

Die Entdeckung der TRP-Kanäle stand in Zusammenhang mit einer Kanalopathie, allerdings in einem wirbellosen Tier, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Nilius et al., 2007). Die Phototransduktion des Insekts beinhaltet die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Rhodopsin durch Lichteinfall, was wiederum zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt. In Folge dessen strömen Kationen in die Photorezeptorzelle (Venkatachalam & Montell, 2007). Die Auflösung der Komponenten des lichtinduzierten Stroms (LIC) führte zur Identifizierung einer *Drosophila*-Mutante, die eine transiente Lichtantwort zeigte, im Gegensatz zur anhaltenden Reaktion der Wildtyp-Fliegen. Dieser Mutantenstamm wurde als TRP bezeichnet, für transient receptor potential (Nilius et al., 2007). Mutationen dieses Gens beeinträchtigen den Calciumeinstrom, was eine Beteiligung von TRP am Einstrom des Ions vermuten lässt. (Venkatachalam & Montell, 2007). In der Literatur finden sich keine Angaben, ob oder inwiefern die Durchlässigkeit anderer Ionen durch die Mutation beeinträchtigt wird (Nilius & Owsianik, 2011; Venkatachalam & Montell, 2007).

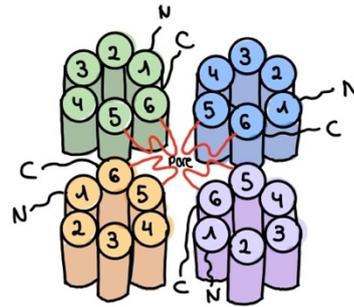
Die TRP-Superfamilie kann auf Basis der Aminosäurehomologie in sieben Unterfamilien, mit jeweils unterschiedlichen Anzahlen von Mitgliedern, unterteilt werden: TRPC (canonical/classical, da diese den in *Drosophila* entdeckten TRP-Kanälen am ähnlichsten sind (Tang et al., 2018)), TRPM (melastin), TRPV (vanilloid), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin) und TRPN (NOMP, No mechanopotential). Letzterer wurde bisher noch nicht im Menschen nachgewiesen. (Nilius et al., 2007)

Die Mitglieder der TRP-Familie weisen mehrere strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Sie besitzen sechs Transmembrandomänen (S1-S6), eine porenbildende Schleife zwischen S5 und S6, sowie intrazellulär lokalisierten Amino- und Carboxyltermini (siehe Abbildung 1A). (Nilius et al., 2007; Venkatachalam & Montell, 2007) Der Aminoterminus enthält je nach Untergruppe eine bestimmte Anzahl von Ankyrin-Wiederholungen, wobei diese Region funktionell an der Interaktion mit Liganden und Partnerproteinen, sowie der Tetramerisierung beteiligt zu sein scheint (Nilius & Owsianik, 2011). Die TRP-Kanäle können vermutlich Homotetramere oder Heterotetramere mit jeweils vier gleichen beziehungsweise vier unterschiedlichen Monomeren bilden (siehe Abbildung 1B) (Malczyk et al., 2017), was potentiell zu einer großen Vielfalt von Kanälen führt. Jedoch ist die Bildung dieser multimeren Kanäle nicht abschließend belegt. (Nilius & Owsianik, 2011)

**A** Monomer



**B** Vermutete tetramere Struktur



*Abbildung 1: Voraussichtliche Topologie TRP-Familie*

**A:** Monomer; TRP-Protein hat 6 Transmembrandomänen und eine mutmaßliche Porenregion zwischen der 5. und 6. Domäne; **B:** Vermutete tetramere Kanalstruktur; Graphik selbst erstellt nach Vorlage von: (Watanabe et al., 2009)

Die Mechanismen, über die die TRP-Kanäle aktiviert und reguliert werden, können nicht verlässlich anhand ihrer Zuordnung zu den Unterfamilien vorhergesagt werden. Trotzdem gibt es Ähnlichkeiten innerhalb mancher Gruppen. So werden zum Beispiel alle TRPC-Kanäle durch Signalwege aktiviert, die zur Stimulation der PLC führen. (Venkatachalam & Montell, 2007) Weitere mögliche Aktivierungsmechanismen sind zum Beispiel Temperaturänderungen, sowie chemischer oder mechanischer Stress (Watanabe et al., 2009).

## 3.2 Der TRPC6-Kanal

### 3.2.1 TRPC6 allgemein

Die kanonischen Transient-Receptor-Potential (TRP)-Kanäle, zu denen TRPC6 gehört, sind die Homologe, die den TRP-Kanälen in *Drosophila* am ähnlichsten sind (Rowell et al., 2010). In Säugetieren wurden sieben TRPC-Kanäle beschrieben, allerdings exprimiert der Mensch nur sechs, da es sich bei TRPC2 um ein

Pseudogen handelt (Venkatachalam & Montell, 2007). Basierend auf ihrer Primärsequenz und ihren Aktivierungsmechanismen bilden menschliche TRPC3-, TRPC6- und TRPC7-Kanäle eine Unterfamilie (Tang et al., 2018). Der Aufbau des TRPC6-Kanals entspricht der allgemeinen Struktur der TRP-Kanäle, wobei der N-Terminus vier Ankyrin-Wiederholungen aufweist (Nilius et al., 2007). Außerdem ist eine Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase G (PKG) vorhanden (Yamaguchi et al., 2017), was im Zusammenhang mit der Rolle von TRPC6 im Herzen steht (siehe Kapitel 1.2.3.2).

Die Aktivierung des TRPC6-Kanals wird über die Aktivierung der PLC durch die Stimulierung von Gq-gekoppelten Rezeptoren eingeleitet. Diese kann zum Beispiel durch Angiotensin 2 und Endothelin-1 erfolgen. Die PLC wandelt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) um, wodurch weitere Signalwege in Gang gesetzt werden. IP<sub>3</sub> bindet an seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), was zur Calciumfreisetzung führt. (Freichel et al., 2005, 2017) Für TRPC6 wurde eine direkte Aktivierung durch DAG beschrieben (Malczyk et al., 2017), allerdings werden auch weitere Aktivierungsmechanismen diskutiert. So zum Beispiel eine Verringerung der PIP<sub>2</sub>-Konzentration und die damit einhergehende Reduktion der durch PIP<sub>2</sub> vermittelten Hemmung, sowie eine direkte Interaktion zwischen TRPC6 und calciumfreisetzenden Kanälen im ER. (Freichel et al., 2005; Venkatachalam & Montell, 2007) Zusätzlich zu diesen Mechanismen wurden alle TRPC-Kanäle als „store-operated channels“ (SOCs) beschrieben, also Kanäle, die durch den Abbau intrazellulärer Calciumspeicher aktiviert werden (Nilius et al., 2007; Rowell et al., 2010; Watanabe et al., 2009). Durch die Aktivierung kommt es schließlich zum Kationeneinstrom, wobei TRPC6 etwa sechs Mal permeabler für

Calcium als für Natrium ist (Malczyk et al., 2017). Die in diesem Absatz beschriebenen Zusammenhänge werden in Abbildung 2 verdeutlicht.

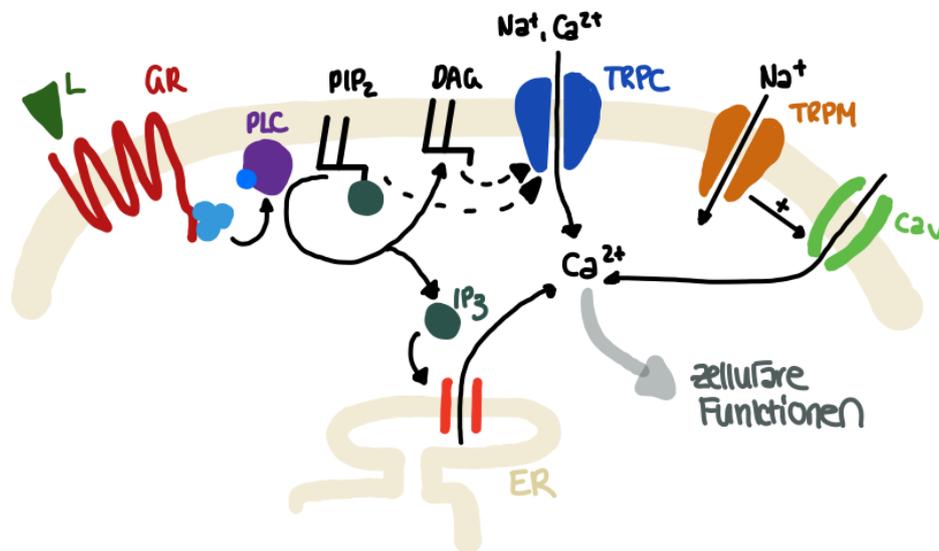


Abbildung 2: Vermutete Regulation und Funktion der TRPC-Proteine bei der Regulierung des Membranpotenzials und der spannungsabhängigen Ionenkanäle

GR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; PLC: Phospholipase C; PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; IP3: Inositol-1,4,5-Trisphosphat; DAG: Diacylglycerin; Cav, spannungsgesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanal; +: Änderung des Membranpotenzials, L: Ligand; Graphik selbst erstellt nach Vorlage von: (Freichel et al., 2005)

Der TRPC6-Kanal wird in einer Vielzahl von Zellen in den unterschiedlichsten Organen und Geweben exprimiert, dazu gehören Lunge, Gehirn, glatte Muskelzellen und das Herz (Freichel et al., 2017). Durch den Kationeneinstrom bei seiner Aktivierung ist er in viele physiologische Prozesse involviert, wie die Depolarisierung der Zellmembran und damit die Aktivierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle, die Calciumhomöostase (Malczyk et al., 2017; Tang et al., 2018) und den Gefäßtonus (Venkatachalam & Montell, 2007). Veränderungen der TRPC6-Expimierung führen somit unter anderem zu Veränderungen der Kontraktilität von

glatten Muskelzellen. So zeigten periphere Blutgefäße, die aus TRPC6-defizienten Mäusen isoliert wurden, schon bei niedrigeren intravasalen Drücken eine kompensatorische Vasokonstriktion im Rahmen der myogenen Autoregulation (sogenannter Bayliss-Effekt<sup>1</sup>). (Freichel et al., 2005; Nilius et al., 2007) Was zunächst paradox erscheinen mag, da es durch die TRPC6-Kanäle eigentlich zum Calcium-Einstrom in die Zelle kommt und dieser so vermindert sein müsste, lässt sich wahrscheinlich durch eine Hochregulation der TRPC3-Kanäle in diesen Zellen erklären (Rowell et al., 2010).

Doch auch bei verschiedenen pathologischen Vorgängen spielt der TRPC6-Kanal eine entscheidende Rolle, worauf im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

### **3.2.2 TRPC6 und Krankheiten**

#### **3.2.2.1 Niere**

Mutationen im TRPC6-Kanal wurden in Zusammenhang gebracht mit der Entwicklung von fokal-segmentaler Glomerulonephritis (FSGS), einer renalen Erkrankung die durch Podozytenschädigung charakterisiert ist und zu Proteinurie und Nierenversagen führt (Bai et al., 2020). 6 Mutationen wurden mit dem late-onset Typ der Erkrankung in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zum early-onset Typ der FSGS sind die Podozytenfortsätze und das Schlitzdiaphragma, welche die glomeruläre Filtrationsbarriere bilden, initial gut entwickelt und funktionieren. Sie verlieren allerdings zwischen der Kindheit und dem späten Erwachsenenalter ihre Integrität. Bei drei der Mutationen handelt es sich um missense Mutationen, die zu

---

<sup>1</sup>Die myogene Autoregulation, auch Bayliss-Effekt genannt, ist ein physiologischer Prozess, welcher die Gefäßdurchblutung konstant hält. Dies wird durch eine kompensatorische Vasokonstriktion bei Blutdruckanstieg gewährleistet. (Grissmer, 2016)

einer verstärkten Funktion der Kanäle führen. (Nilius et al., 2007) Es kommt dadurch zu einem exzessiven Calcium-Einstrom in die Podozyten und damit zur Dysregulation, was die Integrität der Filtrationsbarriere vermindert (Tang et al., 2018).

Alternativ könnten TRPC6-Mutationen auch die Fähigkeit der Podozyten beeinträchtigen, sich an physiologische Bedürfnisse, wie beispielsweise Veränderungen im glomerulären Filtrationsdruck, zu adaptieren (Nilius et al., 2007).

### **3.2.2.2 Lunge**

TRPC6 wird stark im pulmonalen System exprimiert (Nilius et al., 2007). Studien in Nagern legen die Involvierung des Kanals in verschiedene pathophysiologische Prozesse in diesem Organ nahe. So zeigte sich eine entscheidende Rolle von TRPC6 in der akuten Phase der hypoxischen Vasokonstriktion<sup>2</sup>. Diese war in Lungen aus *trpc6*<sup>-/-</sup> - Mäusen komplett aufgehoben, während die zweite Phase sich nicht signifikant zu der in den Wildtyp-Mäusen unterschied. Während der Hypoxie akkumuliert DAG in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (PASMCs) und führt zur Aktivierung von TRPC6. (Malczyk et al., 2017) Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRPC6 in Lungengewebe und PASMCs von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie erhöht ist (Freichel et al., 2005). Die pulmonale Hypertonie wird durch die Nizza-Klassifikation anhand von primär pathophysiologischen Merkmalen in

---

<sup>2</sup> Die hypoxische Vasokonstriktion, auch bekannt als Euler-Liljestrand-Mechanismus, bezeichnet die Zunahme des Gefäßtonus in den Lungengefäßen bei einer Abnahme der Ventilation. So wird ein optimales Verhältnis zwischen Ventilation und Perfusion gewährleistet. Der Mechanismus gliedert sich in zwei Phasen: Eine schnelle, aber transiente Vasokonstriktion, die innerhalb von Sekunden eintritt und eine zweite anhaltende pulmonale Vasokonstriktion. (Malczyk et al., 2017)

fünf Gruppen eingeteilt, wobei dies auch für die Therapie der Erkrankung von Bedeutung ist (Simonneau et al., 2013). Die erste Gruppe der Einteilung stellt dabei die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) dar und umfasst die idiopathische-, hereditäre-, medikamentöse- und die mit anderen Krankheiten assoziierte PAH (Klose et al., 2015).

Die PAH ist eine seltene Erkrankung, die durch pathologische Veränderungen des pulmonalen Gefäßsystems gekennzeichnet ist und zu erhöhtem pulmonal-arteriellem Druck und Rechtsherzversagen führen kann (Montani et al., 2014). Die exzessive Proliferation der PSMCs ist der Hauptgrund für die Hypertrophie der Lungenarterien, was mit einem erhöhten Widerstand in den Gefäßen vergesellschaftet ist und schließlich zur pulmonalen Hypertonie führt. Die Proliferation der PSMCs wird über die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert, wobei eine erhöhte TRPC6-Expression für die erhöhten Calciumspiegel verantwortlich sein könnte. (Malczyk et al., 2017)

### **3.2.3 TRPC6 und Herz**

#### **3.2.3.1 Die Rolle des Calciums im Herzen**

Calcium ist ein wichtiger Second Messenger in der Herzfunktion. Es ist nicht nur entscheidend für die Erregungs-Kontraktions-Kopplung und die Relaxation des Herzens, sondern auch für die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die zum Beispiel für hypertrophes kardiales Remodeling und Herzinsuffizienz verantwortlich sind. (Freichel et al., 2017) Die Signalübertragung über Calcium erfolgt durch transiente Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration, die zwischen 10nmol/L und 10µmol/L gehalten wird. In Kardiomyozyten hat Calcium zwei Ursprünge: den Extrazellulärraum und das sarkoplasmatische Retikulum.

(Watanabe et al., 2009) Das im sarkoplasmatischen Retikulum gespeicherte und daraus freigesetzte Calcium ist somit ein entscheidender Faktor für die Kontraktilität des Herzens (Györke & Carnes, 2008).

TRP-Proteine bilden Natrium- und Calcium-leitende Kanäle, die über verschiedene Wege zur Calciumhomöostase beitragen können. Entweder direkt, indem sie Calcium leiten oder indirekt über die Depolarisation der Zellmembran und die Modulation spannungsabhängiger Calciumkanäle. (Freichel et al., 2017)

Von entscheidender Bedeutung in Bezug auf die Rolle des Calciums am Herzen ist der Bowditch-Effekt, auch bekannt als Treppenphänomen, welcher den Zusammenhang zwischen Inotropie und Herzfrequenz beschreibt (Balcazar et al., 2018). Grundlage ist die Vorstellung, dass es bei jeder Depolarisation zum Einstrom von Calcium-Ionen in die Kardiomyozyten, vor allem aus dem SR, und damit zur Kontraktion des Herzens kommt. Die Zellen entspannen sich erst wieder, wenn der Calcium-Spiegel seinen ursprünglichen Wert erreicht hat, was vor allem durch die Calcium-Aufnahme ins SR durch die SERCA geschieht. (Usman et al., 2021) Bei der Erhöhung der Herzfrequenz kommt es zur Akkumulation von Calcium (Usman et al., 2021) und so zur Steigerung der Inotropie, wodurch das Herz in der Lage ist erhöhte Stoffwechsellanforderungen bei zum Beispiel körperlicher Belastung zu erfüllen (Zhang et al., 2015).

### **3.2.3.2 TRPC6 im Herzen**

TRPC6 wird, genau wie TRPC3, im Herzen hoch exprimiert und ist an der Pathogenese der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz als pathologische Antwort auf chronischen mechanischen Stress beteiligt (Yamaguchi et al., 2017). In Bezug auf die Rolle von TRPC6 bei der Entwicklung dieser pathologischen

Veränderungen spielt der Calcineurin-NFAT-Signalweg eine wichtige Rolle (Onohara et al., 2006). Die Calcium-Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin wirkt durch ihren nachgeschalteten Transkriptionsfaktor NFAT als Schlüsselregulator der Signalübertragung, welche zur Hypertrophie führt. NFAT wird durch Calcineurin dephosphoryliert, was zu einer Kerntranslokation und zur Aktivierung von NFAT-abhängiger Gentranskription führt (Kuwahara et al., 2006). Eine mögliche Quelle für die Aktivierung von Calcineurin ist der Calciumeinstrom durch TRP-Proteine (Onohara et al., 2006), insbesondere auch durch TRPC6 (Yamaguchi et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass TRPC6 in Mäuseherzen als Reaktion auf aktiviertes Calcineurin und Drucküberlastung hochreguliert ist und dass der Knockdown von TRPC6 zu Hypertrophie führende Signalwege reduzierte (Watanabe et al., 2009). In Übereinstimmung mit diesen Befunden enthält der Promotor des TRPC6-Gens zwei NFAT-Bindungsstellen, die zu einer Empfindlichkeit gegenüber Calcineurin-NFAT-Signalen führen (Kuwahara et al., 2006). Es ist daher denkbar, dass aktiviertes NFAT die TRPC6-Kanalexpression durch einen positiven Feedback-Mechanismus stimuliert und so die Entwicklung von kardialer Hypertrophie begünstigt wird (Watanabe et al., 2009). Bekräftigt wird ein Zusammenhang zwischen TRPC6 und Hypertrophie, sowie Remodeling des Herzens außerdem dadurch, dass die Expression der TRPC6 mRNA eng mit der des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) korrelierte - einem empfindlichen Marker für die kardiale Wandspannung (Luchner et al., 2000), kardialen Stress und Hypertrophie (Kuwahara et al., 2006). Zudem war die TRPC6 mRNA-Expression auch in Herzen von menschlichen Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu gesunden Herzen erhöht (Kuwahara et al., 2006). Es gibt allerdings keinen direkten

Beweis, der die Hochregulation von TRPC6 mit der Entwicklung von Herzversagen nach Hypertrophie in Verbindung bringt (Watanabe et al., 2009).

Im Zusammenhang mit dem eben beschriebenen Calcineurin-NFAT-Signalweg und der diesbezüglichen Rolle von TRPC6 ergibt sich ein potenzieller therapeutischer Ansatz unter Verwendung von schon vorhandenen Wirkstoffen. TRPC6 hat mehrere Phosphorylierungstellen, über die seine Aktivität positiv oder negativ reguliert werden kann. (Rowell et al., 2010) Eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase G (PKG) führt zu einer Verminderung des TRPC6-vermittelten Calciumeinstroms und einer Blockade der damit verbundenen Calcineurin-NFAT-Signalübertragung (Freichel et al., 2017). Pharmazeutisch kann dieser Effekt durch Phosphodiesterase-Typ-V-Inhibitoren wie Sildenafil verstärkt werden (Rowell et al., 2010). Diese hemmen den Abbau von cGMP, welches wiederum die PKG aktiviert und so zur Hemmung der TRPC6-Kanalaktivität führt (Freichel et al., 2017).

Die Abbildung 3 fasst die wichtigsten Zusammenhänge, die in diesem Kapitel beschrieben wurden, zusammen.

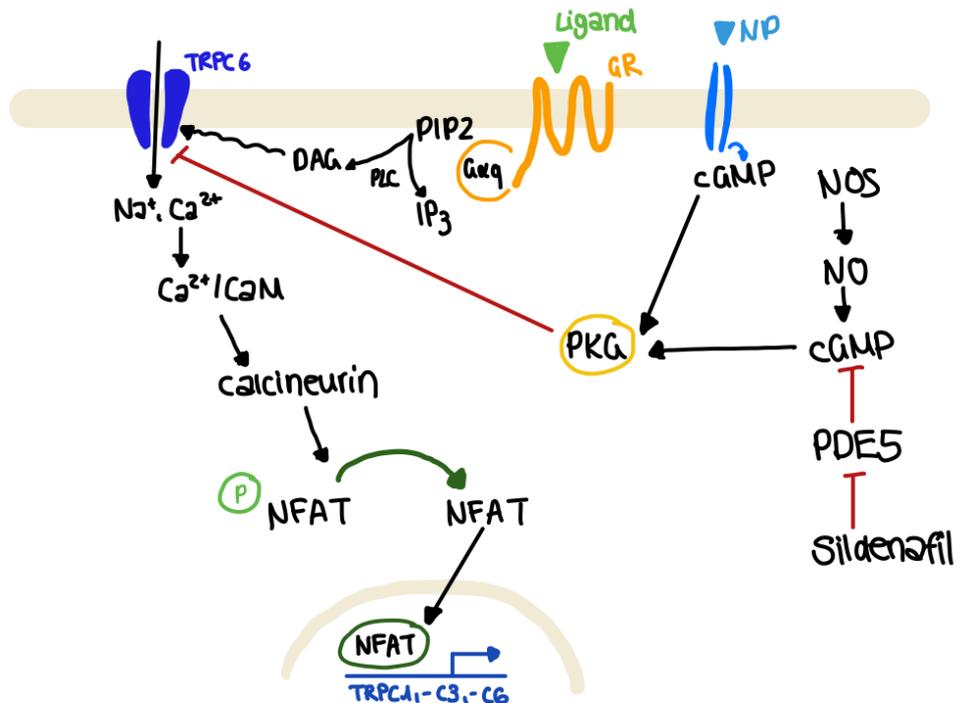


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PKG-Regulierung des TRPC6-Stroms und der Signalübertragung

Dehnung und Gαq-gekoppelte Aktivierung (GR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor) aktiviert den TRPC6-Kanal. Der daraus resultierende Kationeneintritt stimuliert die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (CaM)-abhängige Aktivierung von Calcineurin (Cn). Cn dephosphoryliert NFAT und führt so zu dessen Translokation in den Zellkern, wo es die Gentranskription verändern kann. TRPC1, 3 und 6 reagieren empfindlich auf NFAT und werden bei diesem Prozess hochreguliert. Die Proteinkinase G (PKG) kann über den Weg der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) oder über den Weg des natriuretischen Peptids (NP) aktiviert werden, da beide Wege zur Erhöhung des cGMP-Spiegels führen. Die PKG wiederum hemmt durch Phosphorylierung die TRPC6-Kanalaktivität. Dies blockiert die positive NFAT-Rückkopplungsschleife; Graphik selbst erstellt nach Vorlage von: (Rowell et al., 2010)

Eine Rolle von TRPC6 wurde auch bei der Narbenbildung nach Myokardinfarkt berichtet. Hier zeigte sich, dass TRPC6-Defizienz in Mäusen mit einer erhöhten

Sterblichkeit bei Ligatur des Ramus interventricularis anterior verbunden war. Dies deutet auf einen protektiven Effekt der TRPC6-Aktivität in diesem Zusammenhang hin. (Freichel et al., 2017)

Des Weiteren wird eine Beteiligung von TRPC6 bei der „slow force response“ (SFR) des Herzens vermutet (Yamaguchi et al., 2017). Mechanische Belastung ist ein wichtiger Regulator der Kraft des Herzens. Die Dehnung des atrialen und ventrikulären Myokards löst einen biphasischen Kraftanstieg aus: einen sofortigen (Frank-Starling-Mechanismus) gefolgt von einem weiteren langsamen Anstieg der Zuckungskraft (SFR). (Kockskämper et al., 2008) In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die dehnungsinduzierte SFR in TRPC6-Knockout-Mäusen reduziert (Seo, Rainer, Lee, et al., 2014) oder sogar vollständig aufgehoben war (Yamaguchi et al., 2017). Obwohl sich das Ausmaß der Unterdrückung der SFR in den beiden Studien unterschied, deuten beide Ergebnisse eindeutig darauf hin, dass TRPC6 zu diesem Mechanismus beiträgt (Yamaguchi et al., 2017).

### **3.3 Fragestellung / Ziele der Arbeit**

Die bisher dargestellten Daten zu TRPC6 am Herzen wurden primär durch Studien an Zellkulturen (beispielsweise Gibon et al., 2011) und Tiermodellen (beispielsweise Freichel et al., 2005) gewonnen. Auch eine erste Pilotstudie zur TRPC6-Expression in menschlichem kardialen Gewebe ist nun verfügbar und konnte durch die Untersuchung von Vorhöfen, Ventrikeln und interventrikulärem Septum das ubiquitäre Vorkommen des Kanals im humanen Myokard zeigen (Jacobs et al., 2022).

Unklar bleibt jedoch, ob TRPC6 auch in pathophysiologischen Schlüsselregionen und damit zuverlässig reproduzierbaren Bereichen des menschlichen Herzens

nachgewiesen werden kann. Daher soll in dieser Arbeit die Expression des Proteins in ausgewählten Lokalisationen dieses Organs untersucht werden, was im Hinblick auf kardiale Erkrankungen eine Rolle spielen kann.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Kann TRPC6 mittels immunhistochemischer Färbung in pathophysiologischen Schlüsselregionen des menschlichen Herzens nachgewiesen werden?
- Können durch die Analyse der TRPC6-Expression in pathophysiologischen Schlüsselregionen Unterschiede hinsichtlich der Verteilung des Proteins im menschlichen Herzen festgestellt werden?

### **3.4 Auswahl der Proben**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Stellen des Herzens ausgewählt, die sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch von großer Bedeutung sind.

#### **3.4.1 Rechtes Herzohr (RAA)**

Das rechte Herzohr ist eine Ausstülpung des rechten Atriums und schmiegt sich an die Aorta ascendens an (Schmitz, 2017a). Es unterscheidet sich vom übrigen Vorhof durch seine Auskleidung mit den Musculi (Mm.) Pectinati, was die Grenze zur venösen Komponente des Vorhofs markiert (Mori et al., 2019). In den myoendokrinen Zellen des rechten Atriums, und so auch im rechten Herzohr, wird ANP gebildet, welches bei vermehrter Dehnung der Vorhöfe freigesetzt wird. Es führt zu einer Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate in der Niere und hemmt außerdem die Aldosteronfreisetzung. Es ist somit von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Flüssigkeitshaushalts des Körpers und des Blutdrucks.

(Kurtz & Wagner, 2016)

Klinisch spielt das rechte Herzohr außerdem als Ausgangspunkt von Thromben eine Rolle. Vorhofflimmern und pulmonale Hypertonie sind Faktoren, die mit der Entwicklung von Gerinnseln an diesem Ort einhergehen. (Asensio-Nogueira & Iglesias-Alonso, 2020) Thromben des rechten Atriums können dann in die Lunge verschleppt werden und dort Embolien verursachen (Naeem, 2015). Des Weiteren kann es zur Bildung von Aneurysmen des rechten Herzohrs kommen, welche meist angeboren sind und zu lebensbedrohlichen Komplikationen, wie Herzrhythmusstörungen, führen können (Bornau et al., 2016).

### **3.4.2 Übergang der linken unteren Pulmonalvene (PV) auf den linken Vorhof**

In das linke Atrium münden in der Regel jeweils zwei linke und zwei rechte Lungenvenen, die Vv. Pulmonales, welche sauerstoffreiches Blut aus der Lunge zum Herzen transportieren (Schmitz, 2017b). Der Übergang der Pulmonalvenen auf den linken Vorhof ist klinisch in Bezug auf die Pulmonalvenenisolation im Rahmen der Behandlung von Vorhofflimmern von Bedeutung. Vorhofflimmern ist die häufigste aller anhaltenden Herzrhythmusstörungen und eine der Hauptursachen für Schlaganfälle (Haissaguerre et al., 1998). Das Auftreten dieser Pathologie ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, wobei atriale Ektopien eine wichtige Rolle spielen (Gill, 2004). Hauptquelle dieser ektopischen Schläge scheinen die Pulmonalvenen zu sein (Gill, 2004), was zur nicht-pharmakologischen Therapie der Erkrankung genutzt werden kann (Simmers & Tukkier, 2004). Bei der Pulmonalvenenisolation, welche vor allem bei persistierendem Vorhofflimmern zum Einsatz kommt, wird durch Katheterablation eine Isolierung der Vv.

Pulmonales erreicht, was bei vielen Patienten zu einer erheblichen Besserung des Krankheitsbildes führt (Kirchhof & Calkins, 2017).

### **3.4.3 Linker anteriorer Papillarmuskel (PAP)**

Der linke anteriore Papillarmuskel ist einer der beiden Papillarmuskeln des linken Ventrikels (Chen et al., 2020) und über die Sehnenfäden (Chordae tendinae) mit der Mitralklappe verbunden (Ebata et al., 2020). Das harmonische Zusammenwirken der Chordae tendinae und der Papillarmuskeln ist entscheidend für die normale Funktion der Mitralklappe (Chen et al., 2020). Die muskuläre Verankerung sorgt dafür, dass die Klappe während der systolischen Kontraktion der Ventrikel während eines Herzzyklus nicht in den Vorhof zurück schlagen kann (Schmitz, 2017e).

Eine Ruptur des Papillarmuskels führt fast immer zu einem Prolaps der Klappensegel und so zu einer akuten schweren Mitralinsuffizienz (Chen et al., 2020). Die Papillarmuskelruptur ist zwar ein seltener, aber lebensbedrohlicher Zustand, welche als schwerwiegende Komplikation bei akutem Koronarsyndrom auftreten kann und eine hohe Sterblichkeit aufweist (Hopfgarten et al., 2020).

### **3.4.4 Interventrikuläres Septum (IVS)**

Das interventrikuläre Septum besteht aus zwei Teilen, die während der Entwicklung des Herzens aus unterschiedlichen Strukturen hervorgehen (Schmitz, 2017d): Einem muskulären (pars muscularis) und einem deutlich kleineren bindegewebigen Anteil (pars membranacea), der den kranialen Teil des Septums bildet (Mori et al., 2019). Durch die Herzscheidewand wird so eine Trennung der beiden Ventrikel erreicht, die unter physiologischen Bedingungen keinen Blutdurchfluss erlaubt

(Schmitz, 2017c).

Im Rahmen eines Ventrikelseptumdefekts (VSD), dem häufigsten angeborenen Herzfehler, befindet sich allerdings ein Loch im interventrikulären Septum (Radhakrishna et al., 2019). Diese pathologische Verbindung zwischen den beiden Ventrikeln besteht zu 80% im membranösen Anteil des Septums und führt zur Bildung eines Shunts. Viele VSD schließen sich spontan, doch wenn dies nicht der Fall ist, können große Defekte zu schädlichen Komplikationen wie pulmonal-arterieller Hypertonie, ventrikulärer Dysfunktion und einem erhöhten Risiko für Arrhythmien führen. (Dakkak & Oliver, 2020) VSDs können auch als Komplikation eines Myokardinfakts auftreten (Schlotter et al., 2016).

Im Rahmen der Arbeit wurde der proximale Anteil des interventrikulären Septums, im Übergangsbereich von der Pars membranacea auf die Pars muscularis entnommen. Im linksventrikulären Anteil dieses Areals laufen Komponenten des Erregungsbildungs- und -Leitungssystems des Herzens. (Robert H Anderson et al., 2009). Das His-Bündel passiert das isolierende Gewebe des Herzskeletts, tritt in das interventrikuläre Septum ein und verzweigt sich nach kurzer Zeit in den rechten und linken Tawara-Schenkel, wobei Anteile des Letzteren in der entnommenen Probe verlaufen (Robert H Anderson et al., 2013).

#### **3.4.5 Trabecula Septomarginalis (SM)**

Die Trabecula septomarginalis, auch Moderatorband genannt (Schmitz, 2017f), wurde erstmals 1513 von Leonardo da Vinci beobachtet und beschrieben (Capuani, 2014). Dieser Muskelwulst im rechten Ventrikel entsteht durch eine Verdichtung der Trabeculae carneaе (Capuani, 2014), welche die Herzkammer auskleiden. Sie ist der Ursprung des rechten M. papillaris anterior (Schmitz, 2017f) und begrenzt

den unteren Rand vieler Septumdefekte (Robert H Anderson et al., 1977). Innerhalb des Moderatorbandes verläuft der rechte Tawara-Schenkel, welcher Teil des Reizbildungs- und Leitungssystems des Herzens ist (Robert H Anderson et al., 2009).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

In den folgenden vier Tabellen sind die gebrauchten Materialien aufgeführt.

#### 4.1.1 Substanzen für die Immunhistochemie

Substanz	Hersteller
Primärantikörper (Anti-TRPC6 Antibody)	Ref.: ACC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärantikörper (Anti-rabbit HRP)	Ref.: A10547; Invitrogen, Carlsbad, USA
Kaninchenserum (Normal rabbit serum)	Ref.: PLN5001; Life Technologies, Carlsbad, USA
Kontrollpeptid (TRPC6 Blocking Peptide)	Ref.: BLP-CC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Normales Ziegenserum (NGS)	Ref.: G6767; Sigma Aldrich, Zentr. ChL.

*Tabelle 1: Substanzen für die Immunhistochemische Färbung*

#### 4.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Alcianblau	Ref.: 3082; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citratpuffer	Ref.: ab93678; Abcam, Cambridge, Großbritannien
DAB	Ref.: SK-4103; Vector Laboratories, Burlingame, USA

Eosin	Zentr. ChL., Universität des Saarlandes, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbekit: Masson Goldner Trichrom	Ref.: 12043; Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland
Fixierlösung nach Weigner	Ref.: 27796; Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung	Ref.: 27244; Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Ref.: 1105.1; Carl Roth, Zentr. ChL.
Wasserstoffperoxid	Ref.: 8683.4; Zentr. ChL.

*Tabelle 2: Verwendete Chemikalien*

### 4.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Ausgießstation (MPS/P2)	SLEE medical, Mainz, Deutschland
Einbettautomat (Automatic Tissue Processor MTP)	SLEE medical, Mainz, Deutschland
Feuchtekammer	Panalo-em, Zentr. ChL.
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte	SLEE medical, Mainz, Deutschland

Mikrotom (Microm RM 2025)	Heidelberg Instruments, Heidelberg, Deutschland
Wärmeplatte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wärmeschrank	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), Burgwedel, Deutschland

*Tabelle 3: Verwendete Geräte*

#### 4.1.4 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Dako Pen	Ref.: S200230-2; Agilent, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	Zentralmagazin Universitätsklinikum des Saarlandes, Deutschland
Eindeckmedium RotiHistoKit	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen	Leica-Microsystem, Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

*Tabelle 4: Sonstige Materialien*

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Fixierung der Leichen

Die Probenentnahme erfolgte sowohl aus Formalin- als auch aus N-Ethyl-2-Phyrrolidon (NEP)-fixierten Leichen. Die Fixierung erfolgte dabei durch Injektion

von 10 – 15 l einer der beiden folgenden Fixationslösung folgender Zusammensetzung (siehe Tabelle 5 und 6):

Stoffname	Menge
Leitungswasser	39 l
Karion	12 l
Formaldehyd	6 l
Lysoformin	2,7 l
Natriumchlorid	2400 g
Calciumchlorid	600 g
Thymol	12 g

*Tabelle 5: Formalin-Fixierung nach Basler*

Stoffname	Gewichtsprozent
Ethanol	25 - <35
Polyethylenglykol	10 - <25
Formaldehyd	0,1 - <1
Methanol	0,1 - <1
Demineralisiertes Wasser	Vom Hersteller nicht näher definiert
Nitrit-Pökelsalz	Vom Hersteller nicht näher definiert

*Tabelle 6: NEP-Fixierung nach Weigner*

Diese wurde über die rechte A. femoralis mit einem Druck von 1,5 – 2,0 bar injiziert. Zudem erfolgten Nachinjektionen in die obere und untere Extremität, Regio glutealis und nuchae, sowie in die Finger- und Zehenbeeren mittels Einmalkanülen. Im Anschluss wurde der Leichnam in einer 3–5-prozentigen Formalinlösung über die folgenden vier Monate aufbewahrt und bis zur

Probenentnahme in luft- und wasserdicht verschweißten Phoropack-Särgen bei 14 °C gelagert.

#### **4.2.2 Probenentnahme**

Zur Präparation wurde die Haut in der Medianebene zwischen der Fossa jugularis und der Symphysis pubica unter linksseitiger Umschneidung des Bauchnabels durchtrennt. Nach Abpräparation des subkutanen Fettgewebes von den Faszien der Brust- und Bauchmuskulatur von medial nach lateral bis etwa zur mittleren Axillarlinie, konnten die Mm. Pectoralis major et minor, sowie die schrägen Bauchmuskeln vom knöchernen Brustkorb abgelöst werden. Nun wurde der Bauchraum entlang der Linea alba eröffnet und die Bauchmuskulatur unter Durchtrennung der Ligamenta falciforme hepatis und teres hepatis vom Rippenbogen abgetrennt. Durch scharfe Präparation von kaudal nach kranial entlang der Knorpel-Knochengrenze mit Querdurchtrennung des Sternums zwischen der ersten und zweiten Rippe wurde ein Knochenschild erzeugt, welches anschließend vom Mediastinum anterius und dem Diaphragma abgelöst werden konnte. Es folgte die schichtweise scharfe Präparation bis auf das Perikard, welches dann von der V. brachiocephalica bis zum Diaphragma in der Medianebene eröffnet wurde. Der Schnitt wurde zu beiden Seiten nach lateral hin entlang der Facies diaphragmatica erweitert.

Zunächst wurde das rechte Herzohr entfernt und aus diesem eine Probe entnommen. Anschließend wurde die Umschlagsfalte des Pericardium serosum von der Pars visceralis auf die Pars parietalis bis zum Abgang des Truncus brachiocephalicus präpariert und nachfolgend die großen Arterien abgesetzt, woraufhin das Herz nach kranial luxiert werden konnte. Nach dem scharfen Durchtrennen der Vv.

Pulmonales am Übergang von intraperikardialem auf extraperikardialen Anteil, konnte das Herz schlussendlich durch Absetzen der V. cava superior und inferior aus dem Mediastinum gelöst werden. Nach der Identifikation der linken unteren Lungenvene und der Gewinnung einer Probe in Gefäßlängsachse mit Erfassung der Übergangszone von Vorhof- auf Gefäßwand, wurden das linke Atrium und der linke Ventrikel in Blutstromrichtung eröffnet. Der Schnitt vom Vorhof in die Kammer verlief dabei an der lateralen Wand der Herzkammer und jener vom linken Ventrikel in die Aortenwurzel und die Aorta ascendens parallel zum interventrikulären Septum. Anschließend wurde der M. papillaris anterior der Mitralklappe aufgesucht und sein kranialer Anteil entnommen. Nach Identifikation des Interventrikulären Septums wurde dessen proximaler Anteil unter Erfassung der Pars muscularis und der Pars membranacea ebenfalls entnommen. Analog zur linken Herzhälfte wurde im Anschluss auch die Rechte entsprechend der Blutstromrichtung eröffnet. So konnte mit Blick auf das interventrikuläre Septum der M. Papillaris septalis mit der benachbarten Trabecula septomarginalis zur Probenentnahme identifiziert werden und diese erfolgen.

Nach Entnahme wurden die Gewebeproben zunächst für 24h in vierprozentiger Paraformaldehydlösung (PFA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (pH=7,4) und danach für ebenfalls 24h in PBS bei jeweils 4°C aufbewahrt.

#### **4.2.3 Herstellung von Paraffinschnitten**

Nach einer zweistündigen Wässerung der Proben unter fließendem Leitungswasser erfolgte die Entwässerung durch eine aufsteigenden Alkoholreihe. Zu diesem Zweck wurden die Präparate eine Stunde mit 70%-, jeweils eineinhalb Stunden mit 80%- und 90%- und zweimal eineinhalb Stunden mit 100%-2-Propanol

durchtränkt. Fixierlösung und Wasser konnten so aus dem Gewebe verdrängt werden. Im Anschluss folgte die Behandlung mit dreimal eineinhalb Stunden Methylbenzoat (Synonym: Benzoesäuremethylester). Durch die darauffolgende Überführung in flüssiges Paraffin, in welchem die Proben für zweimal zwei Stunden belassen wurden, konnte erreicht werden, dass zuvor wassergefüllte Räume nun von dem Paraffin eingenommen wurden. Zur Herstellung kleiner Paraffinblöcke, welche die Gewebeproben enthalten, wurden kleine Ausgussförmchen aus Metall benutzt. Der Boden der Formen wurde mit Paraffin bedeckt und die Probe dann darauf in die gewünschte Position gebracht.

- a) **RAA:** Das rechte Herzohr wurde mit der breiten Schnittfläche nach unten auf dem Paraffin ausgerichtet, damit beim Anschneiden mit dem Mikrotom ein Querschnitt der Probe entsteht.
- b) **PV:** Die linke untere Pulmonalvene wurde entlang der Längsachse des Gefäßes ausgeblockt, sodass der Übergang des Atriums auf die Gefäßwand zur Darstellung kommt.
- c) **PAP:** Der Papillarmuskel wurde so auf dem Paraffin ausgerichtet, dass Längsschnitte der Proben entstanden sind. So konnten teilweise Anschnitte der Sehnenfäden auf den Schnitten mit abgebildet werden. Zudem wurde zu besserer Darstellung Myokardmuskulatur exemplarisch ein Querschnitt angefertigt.
- d) **IVS:** Das interventrikuläre Septum wurde ebenfalls entlang seiner Längsachse positioniert, um auf den Anschnitten sowohl den membranösen als auch den muskulären Anteil des Septums darstellen zu können.

- e) **SM:** Die Trabecula Septomarginalis wurde, genau wie das rechte Herzohr, so in den Paraffinblock gestellt, dass die Schnitte Querschnitte der Probe darstellen.

Nach Aushärtung der bis zu diesem Punkt in dem Förmchen befindlichen Menge Paraffin, wurde der Einbettring aufgesetzt und die Form nach und nach vollständig mit Paraffin befüllt. Nach Aushärtung auf einer Kühlplatte bei  $-2,5^{\circ}\text{C}$  wurden die Blöcke bei Raumtemperatur gelagert.

Mit einem Mikrotom konnten nun Schnitte der Gewebeproben mit einer Dicke von  $7\ \mu\text{m}$  erzeugt werden. Diese wurden mit einem Pinsel in ein ungefähr  $40^{\circ}\text{C}$ -warmes Streckbad überführt und nach wenigen Minuten mit einem Objektträger aufgenommen. Die Schnitte trockneten im Anschluss zunächst für 30 Minuten auf einer  $37^{\circ}\text{C}$ -warmen Wärmeplatte und dann über Nacht in einem ebenfalls  $37^{\circ}\text{C}$ -warmen Wärmeschrank. Bis zur Färbung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur gelagert.

#### **4.2.4 Histologische Färbungen**

Um die Morphologie der Schnitte beurteilen zu können, wurden zunächst drei verschiedene histologische Färbungen durchgeführt.

##### **4.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zählt zu den Routine-Verfahren zur Darstellung von Gewebestrukturen im Rahmen der morphologischen Untersuchung. Dabei kommen zwei verschiedene Farbstoffe zum Einsatz: Das Hämalan färbt alle sauren (basophilen) Strukturen, wie beispielsweise Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und Ribosomen, blau. Dabei ist zu beachten, dass

der Farbstoff bei sehr niedrigem pH-Wert bindet und zunächst für eine rötlich-braune Färbung der Strukturen sorgt. Der Farbumschlag in das typische Blau-violett erfolgt durch das Anheben des pH-Wertes (auch Bläuen genannt), was zum Beispiel durch Spülen mit Leitungswasser erreicht wird. Im Anschluss wird Eosin als zweite Farbstoff zur Gegenfärbung eingesetzt und sorgt für eine rote Färbung der basischen (azidophilen) Bestandteile, wie Zytoplasma und Kollagenfasern.

Als erstes wurden die Schnitte entparaffiniert. Dafür wurden sie zunächst drei Mal für jeweils fünf Minuten mit Xylol behandelt. Darauf folgten dann zwei Mal fünf Minuten in 100% 2-Propanol, sowie jeweils fünf Minuten in 90%- beziehungsweise 80% 2-Propanol. Die Proben wurden danach in Hämatoxylin nach Ehrlich (gefiltert) überführt und für acht Minuten darin belassen. Darauf folgte das Spülen in destilliertem Wasser, bis die überschüssige Farbe entfernt war. Im Anschluss wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gebläut, was zu dem oben beschriebenen Farbumschlag führte. Nach 30-sekündigem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin (0,1%), versetzt mit 2 Tropfen Eisessig, für zweieinhalb Minuten. Zum Entwässern wurden die Proben dann zwei bis drei Mal in 90% 2-Propanol gedippt und im Anschluss zwei Mal fünf Minuten mit 100% 2-Propanol behandelt. Zum Klären wurde daraufhin Xylol für drei Mal fünf Minuten verwendet. Abschließend erfolgte das Eindecken mit dem Roti-Histokitt.

Die gefärbten Schnitte konnten dann über Nacht unter dem Abzug trocknen und wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

#### **4.2.4.2 Alcian-HE-Färbung**

Bei der Alcian-Färbung kommt es durch den basischen Farbstoff Alcianblau zur hellblauen Anfärbung von unter anderem sauren Glykosaminoglykanen (früher Mukopolysacchariden) und Proteoglykanen. Durch die Kombination mit der HE-Färbung werden zudem die Zellkerne dunkelblau dargestellt.

Zum Entparaffinieren der Schnitte wurden diese für jeweils fünf Minuten in dreimal Xylol, zwei Mal 100% 2-Propanol, sowie jeweils einmal in 90%-, 80%- und 70% 2-Propanol gegeben. Darauf folgten zweimal fünf Minuten in destilliertem Wasser und fünf Minuten in 3-prozentiger Essigsäure. Die Schnitte wurden nun 45 Minuten mit der Alcianblau-Lösung gefärbt und danach eine Minute in destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin nach Mayer über zehn Minuten und danach erneutes Spülen mit destilliertem Wasser. Nach der Differenzierung in Hcl-Alkohol, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen und eine selektive Anfärbung der einzelnen Strukturen zu gewährleisten, wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser zehn Minuten lang gebläut, mit Eosin drei Minuten gegengefärbt und danach erneut in destilliertem Wasser gespült. Zum jetzt folgenden Entwässern der Schnitte wurden sie zunächst jeweils zwei- bis dreimal in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%) gedippt und daraufhin zweimal für drei Minuten mit 100% 2-Propanol behandelt. Zum Schluss wurden die Proben durch dreimal dreiminütige Behandlung mit Xylol geklärt. Nach dem Eindecken mit dem Roti-Histokitt wurden die fertigen Objektträger bei Raumtemperatur gelagert.

#### 4.2.4.3 Masson-Goldner-Färbung

Die Masson-Goldner-Trichrom- (MGT-) Färbung ermöglicht die differenzierte Darstellung verschiedener Bindegewebsstrukturen. Dabei werden kollagenes Bindegewebe grün, das Zytoplasma rot, die Zellkerne braun bis schwarz und die Erythrozyten orangerot angefärbt. Grundlage der Färbung ist dabei die unterschiedliche Molekülgröße (Disperität) der Farbstoffe. Während die feindispersen Farbstoffe (Ponceau, Orange G) schnell in alle Strukturen eindringen, braucht die grobdisperse Phase (Säurefuchsin, Lichtgrün) deutlich länger, um einzuwirken und färbt zunächst nur die groben Strukturen. Die Färbung muss rechtzeitig unterbrochen werden, da es sonst zur Überfärbung durch die grobdisperse Substanz kommt, wenn diese alle Strukturen durchdrungen hat.

Zunächst wurden die Schnitte entwässert. Zu diesem Zweck erfolgte die Behandlung zuerst mit dreimal jeweils zehn Minuten Xylol und dann mit einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus zweimal 100% 2-Propanol sowie jeweils einmal 90%-, 80%- und 70% 2-Propanol, jeweils für fünf Minuten. Nach zweimaligem Spülen in destilliertem Wasser für jeweils fünf Minuten erfolgte als Erstes die Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin für ein bis zwei Minuten. Nach dem Spülen mit Leitungswasser über zehn Minuten wurde Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin, die erste Färbelösung der Trichromfärbung, appliziert und die Proben dann nach fünf Minuten kurz in 1% Essigsäure gespült. Im nächsten Schritt folgte die Färbung mit Wolframphosphorsäure-Orange für fünf Minuten und danach erneutes kurzes Spülen in 1% Essigsäure. Im letzte Färbeschritt wurden die Proben für fünf Minuten mit Lichtgrün gefärbt und im Anschluss für weitere fünf Minuten mit 1% Essigsäure gespült. Das Entwässern der Proben erfolgte durch mehrmaliges Dippen in zwei 100% 2-Propanol Lösungen. Nach dem Klären in

dreimal Xylol für jeweils fünf Minuten wurden die Schnitte mit dem Roti-Histokitt eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

## **4.2.5 Immunhistochemische Färbung**

### **4.2.5.1 Grundlagen**

Um die TRPC6-Kanäle in den Schnitten nachweisen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Bei dieser Methode können Proteine und andere Strukturen durch den Einsatz von markierten Antikörpern dargestellt werden. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion beziehungsweise die Affinität des Antikörpers zu einem bestimmten Epitop stellt die Grundlage dieser Färbemethode dar. (Libard et al., 2019) Sie kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Variante ist der Primärantikörper selbst mit einem Enzym gekoppelt, welches das nachfolgend hinzugefügte Substrat umsetzt und so zur Färbung führt.

Bei der indirekten immunhistochemischen Färbung, welche bei dieser Arbeit zur Anwendung kam, wird nach Bindung des unkonjugierten Primärantikörpers an sein spezifisches Antigen ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper zugesetzt. Dieser bindet an den Primärantikörper und führt nach Substratzugabe zur Sichtbarmachung des Antigens. (Varghese et al., 2014) Im Falle dieser Arbeit diente 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat für die Meerrettichperoxidase (HRP), mit welcher der Sekundärantikörper gekoppelt war. TRPC6-positive Strukturen zeigen somit ein braunes (positives) Signal unter dem Mikroskop, wohingegen dieses bei TRPC6-negativen Strukturen fehlt.

#### 4.2.5.2 Ablauf

Zu Beginn wurden die Schnitte entparaffiniert. Dies erfolgte durch Behandlung mit dreimal fünf Minuten Xylol, zweimal fünf Minuten 100% 2-Propanol, sowie jeweils fünf Minuten mit 90%-, 80%- und 70% 2-Propanol. Nach weiteren fünf Minuten in destilliertem Wasser wurden die Proben zur Demaskierung in 95°C-warmen Citratpuffer überführt und in diesem für eine Stunde belassen. Auf diese Weise kann die Immunreaktivität der TRPC6-Kanäle, welche durch Fixierung und Einbettung beeinträchtigt wurde, teilweise wieder hergestellt werden. Nachdem die Proben 30 Minuten abkühlen konnten, wurden sie eine Minute in PBS gewaschen und die einzelnen Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet, um ein Auslaufen der im Folgenden applizierten Substanzen zu verhindern. Die Proben wurden nun in eine Feuchtekammer gelegt und dort eine Stunde mit 10% normalem Ziegen Serum (NGS) in PBS inkubiert. Durch diese Blockierlösung wurde eine nicht-spezifische Bindung des Antikörpers an das Gewebe vermieden. Nach der Inkubationszeit wurde die überschüssige Lösung von den Schnitten geklopft und anschließend der gegen TRPC6-gerichtete Primärantikörper auf die Objektträger pipettiert. Dieser wurde zuvor durch Zugabe von Blockierlösung (NGS) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Durch die Durchführung der Färbung mit verschiedenen Primärantikörper-Konzentrationen ergab sich eine optimale Verdünnung von 1:250 für die Schnitte dieser Arbeit. Die Proben wurden dann über Nacht mit dem Primärantikörper in der Feuchtekammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen Primärantikörper durch zwei Waschschriffe von je zwei Minuten in PBS von den Proben entfernt und diese daraufhin für zehn Minuten mit 3% Wasserstoffperoxid in PBS behandelt. Danach wurden die Schnitte erneut zweimal zwei Minuten lang mit PBS durchtränkt. Da

Wasserstoffperoxid mit Peroxidasen einen enzymatisch inaktiven Komplex eingeht, konnten so die endogenen Peroxidasen des Gewebes inaktiviert werden. Im nächsten Schritt wurde der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper (Anti-rabbit HRP), in einer Konzentration von 1:500 appliziert, für 60 Minuten auf den Proben belassen und diese danach für zweimal zwei Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Proben mit einer DAB-Lösung inkubiert, wobei unter dem Mikroskop beobachtet wurde, wann die gewünschte Braun-Färbung erreicht war. Für die in der Arbeit gefärbten Schnitte ergab sich hierbei eine Einwirkzeit von 3 Minuten und 30 Sekunden. Die Reaktion wurde nach Ablauf dieser Zeit durch Überführen in PBS gestoppt. Für die nun folgende Gegenfärbung wurden die Proben zunächst eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen und dann für eine Sekunde in gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich gedippt. Nachdem die überschüssige Farbe durch kurzes Abspülen mit destilliertem Wasser entfernt wurde, wurden die Schnitte fünf Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nun folgte das Entwässern der Schnitte durch Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, wobei die Objektträger jeweils fünf Minuten in 70%-, 80%- und 90% 2-Propanol, sowie zweimal fünf Minuten in 100% 2-Propanol verblieben. Nach dem darauffolgenden Klären mit Xylol für dreimal fünf Minuten konnten die Schnitte abschließend mit dem Roti-Histokitt eingedeckt werden, über Nacht aushärten und wurden dann bei Raumtemperatur gelagert.

#### **4.2.5.3 Negativkontrolle**

Bei jedem Färbedurchgang wurde pro Gewebe eine Negativkontrolle mitgeführt. Auf diese wurde nicht der gegen TRPC6 gerichtete Primärantikörper appliziert, sondern Kaninchenserum (Normal rabbit serum) in einer Konzentration von 1:500,

wobei die Verdünnung mit der Blockierlösung erfolgte. Dieses Serum wurde den Tieren vor der Immunisierung gegen das Protein entnommen und enthielt somit keine Antikörper gegen den TRPC6-Kanal.

#### **4.2.5.4 Peptidkontrolle (Spezifitätsnachweis)**

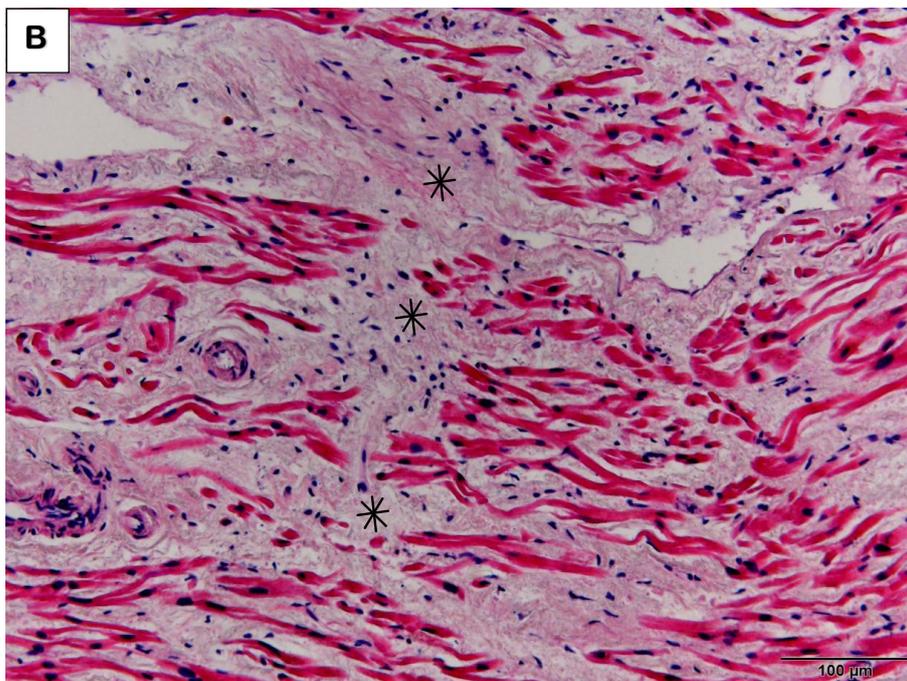
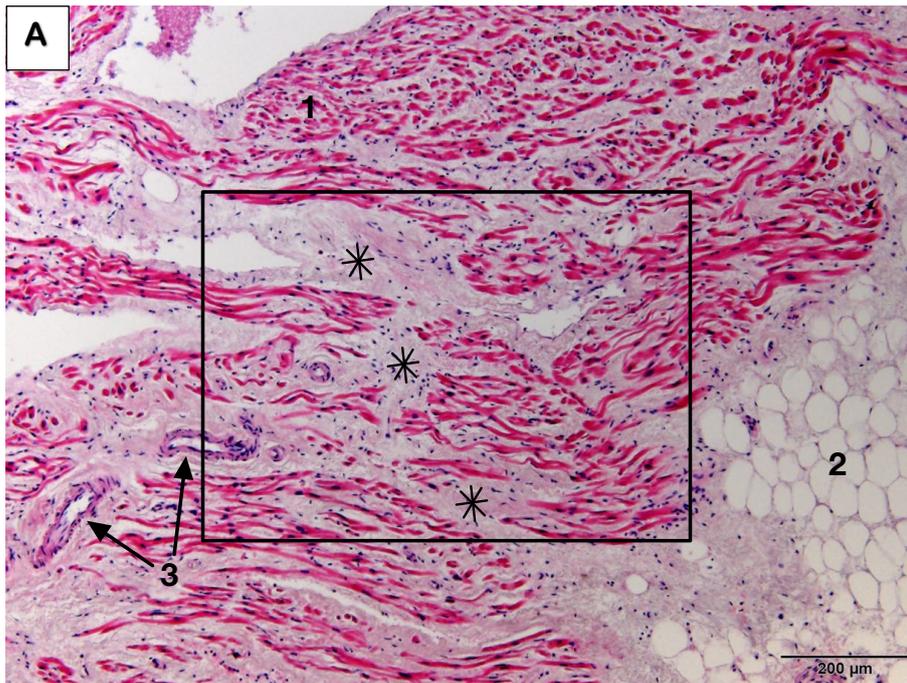
Einmalig wurde für den in der Arbeit verwendeten Anti-TRPC6-Antikörper eine Spezifitätskontrolle durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der 1:100 – verdünnte Primäantikörper zusammen mit 40 µg des Kontrollpeptids, welches zuvor in 20µl PBS aufgelöst worden war, zunächst über Nacht bei 7 Grad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung dann anstelle des Primäantikörpers auf einen der Schnitte pipettiert, welcher bei der immunhistochemischen Färbung ein deutlich positives Ergebnis gezeigt hatte.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Morphologie**

#### **5.1.1 Rechtes Herzohr**

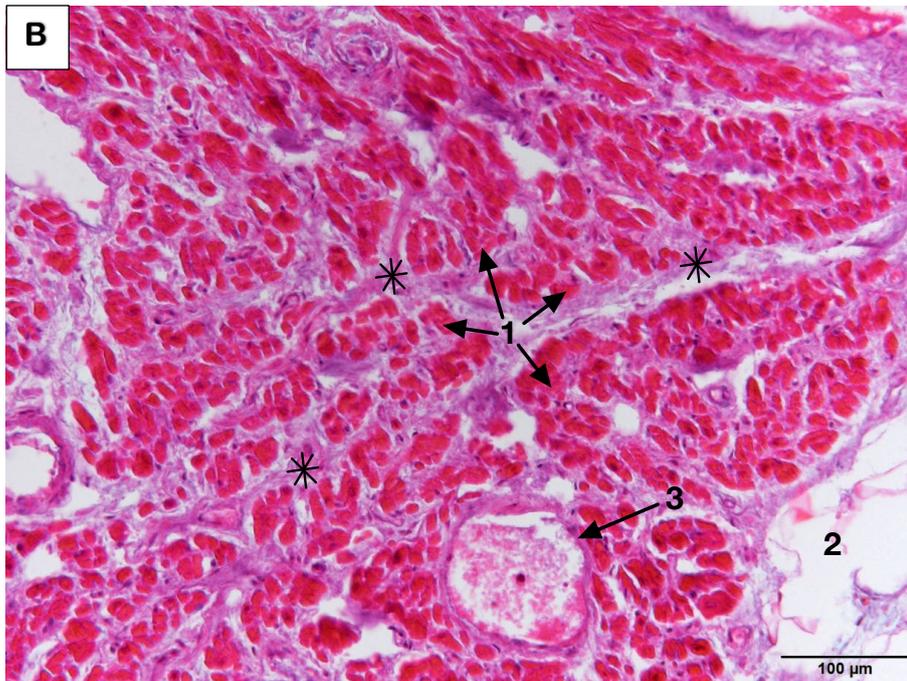
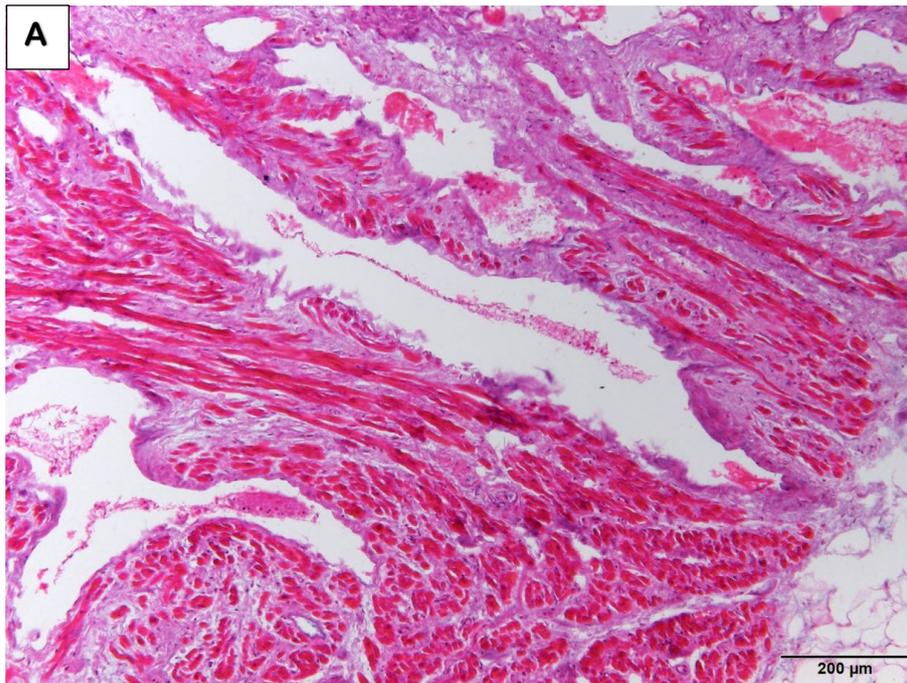
In drei der Individuen zeigte sich ein altersentsprechender Befund, wie in Abbildung 5, Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Bei den zwei anderen untersuchten Körperspendern konnte eine deutliche (siehe Abbildung 4) beziehungsweise eine milde Fibrose (siehe Abbildung 6) des rechten Herzohres festgestellt werden.



*Abbildung 4 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Rechtes Herzohr des Spenders Nummer (Nr.) 1 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die bindegewebige Durchsetzung des Myokards im Rahmen einer deutlich erkennbaren Fibrose ist mit Sternen gekennzeichnet.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Fettgewebe, 3 = Gefäße



*Abbildung 5 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Rechtes Herzohr des Spenders Nr. 2 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B)

Vergrößerung. Die Bilder zeigen einen unauffälligen Befund.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Fettgewebe, 3 = Gefäß mit Erythrozyten im Lumen, Stern = Bindegewebsstränge

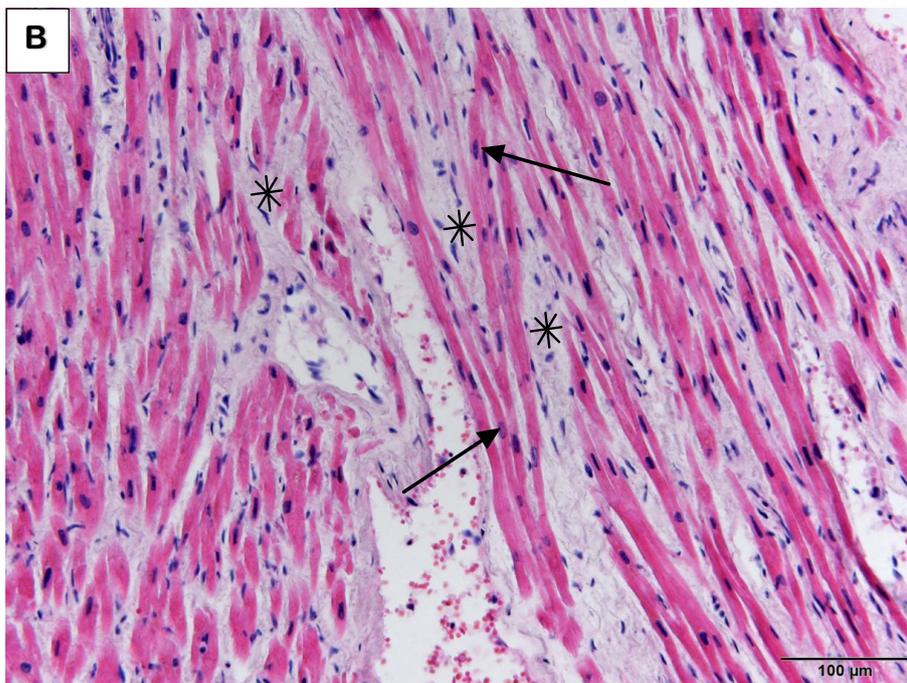
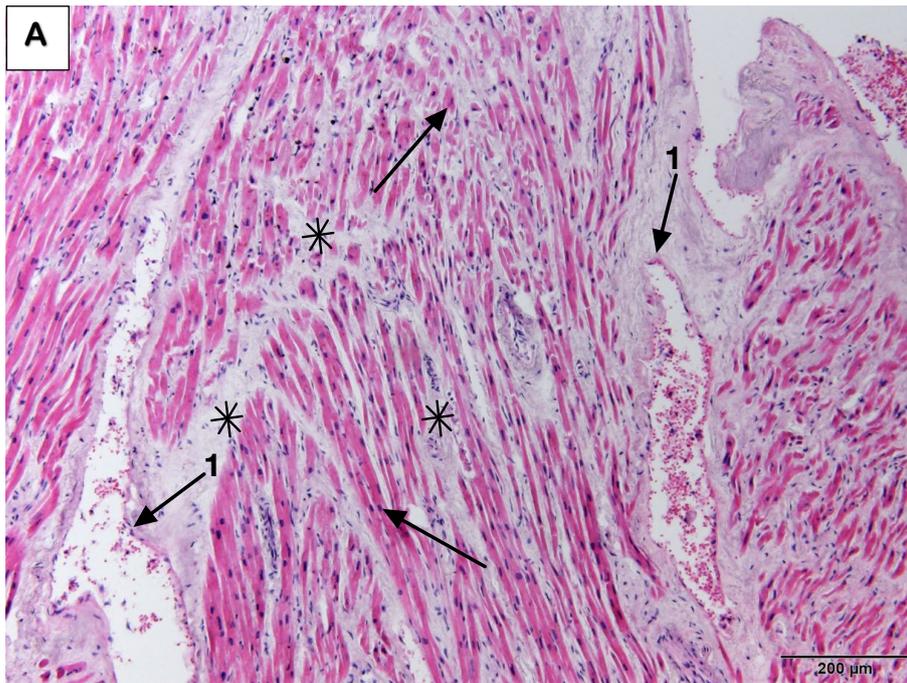


Abbildung 6 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Rechtes Herzohr des Spenders Nr. 3 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Sterne markieren die milde Fibrose des Myokards zwischen den mit Pfeilen exemplarisch gekennzeichneten Kardiomyozyten.

1 = Gefäße mit Erythrozyten im Lumen

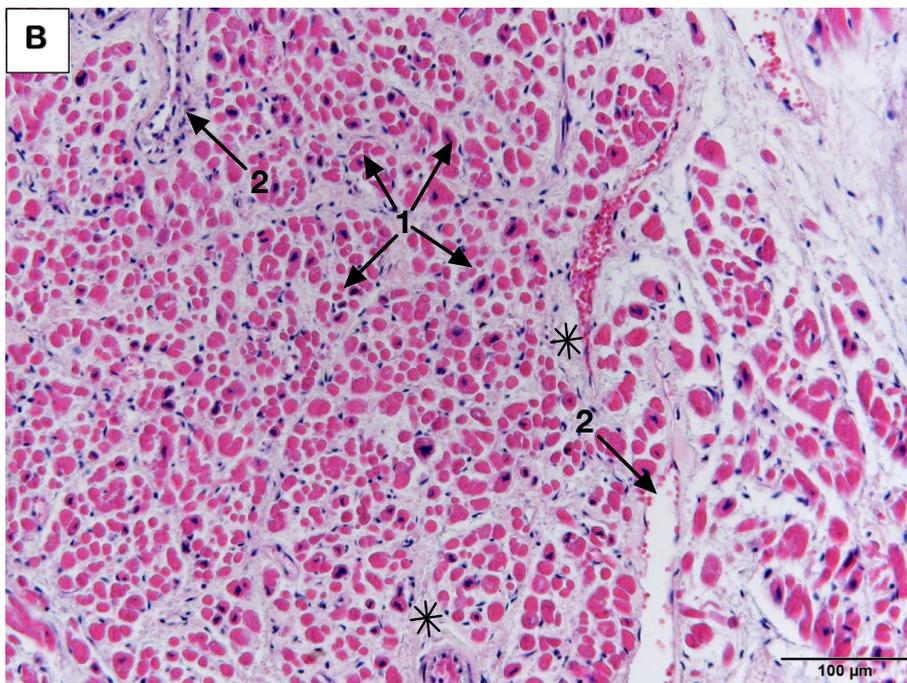
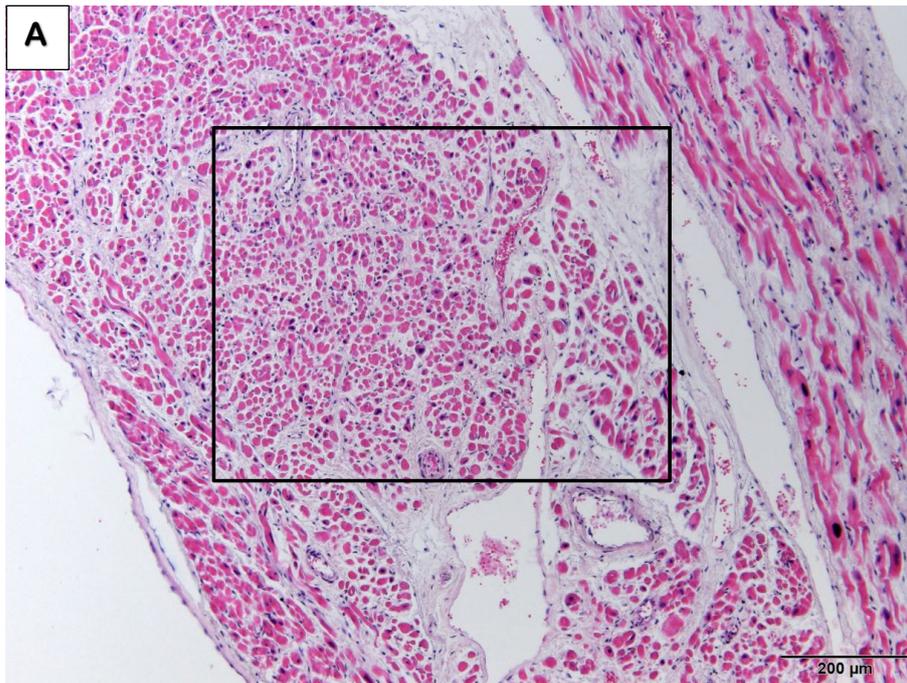


Abbildung 7 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Rechtes Herzohr des Spenders Nr. 4 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B)

Vergrößerung. Es handelt sich um einen altersentsprechenden Befund.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Gefäße, Stern = Bindegewebsstränge

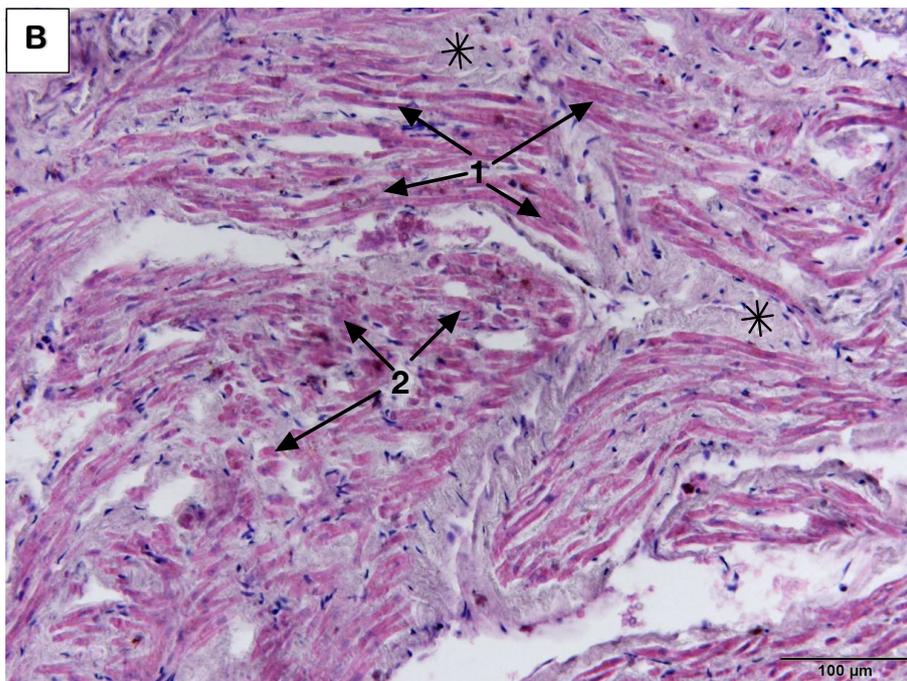
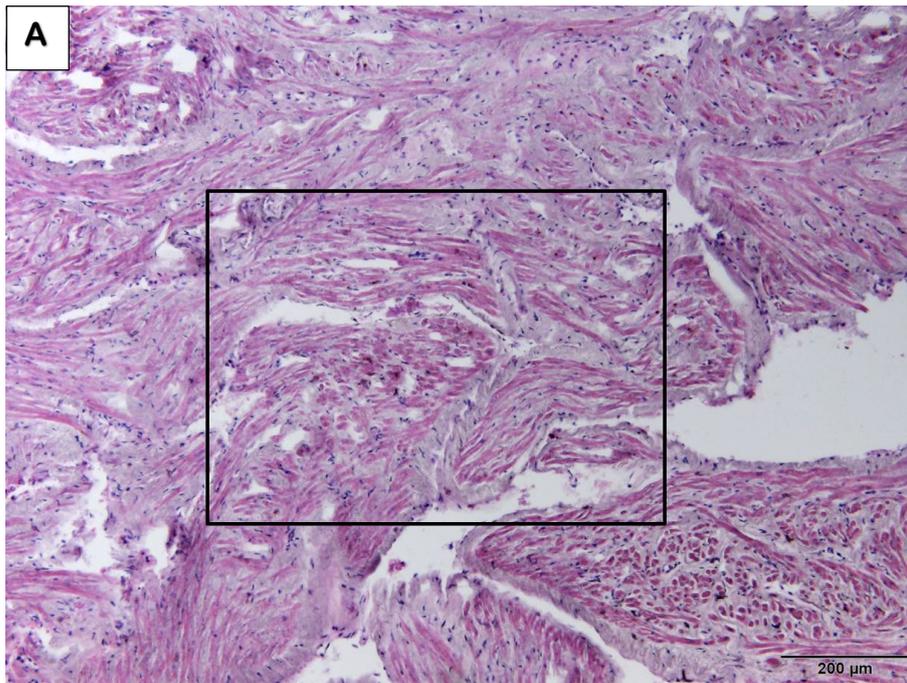


Abbildung 8 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

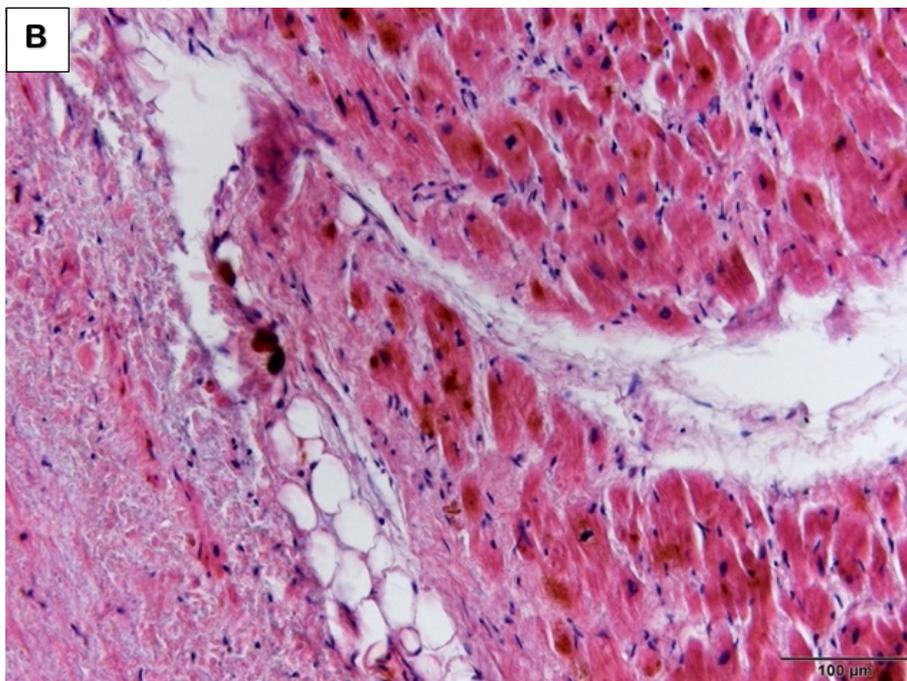
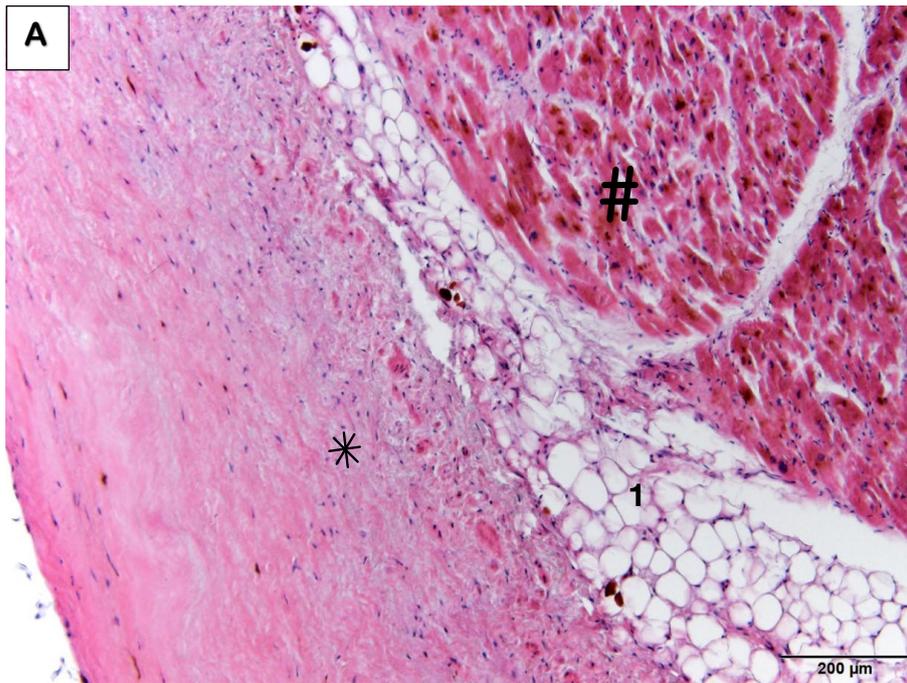
Rechtes Herzohr des Spenders Nr. 5 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B)

Vergrößerung. Es sind keine besonderen Auffälligkeiten erkennbar.

1 = Herzmuskelzellen im Längsschnitt, 2 = Herzmuskelzellen im Querschnitt, Sterne =  
Bindegewebsstränge

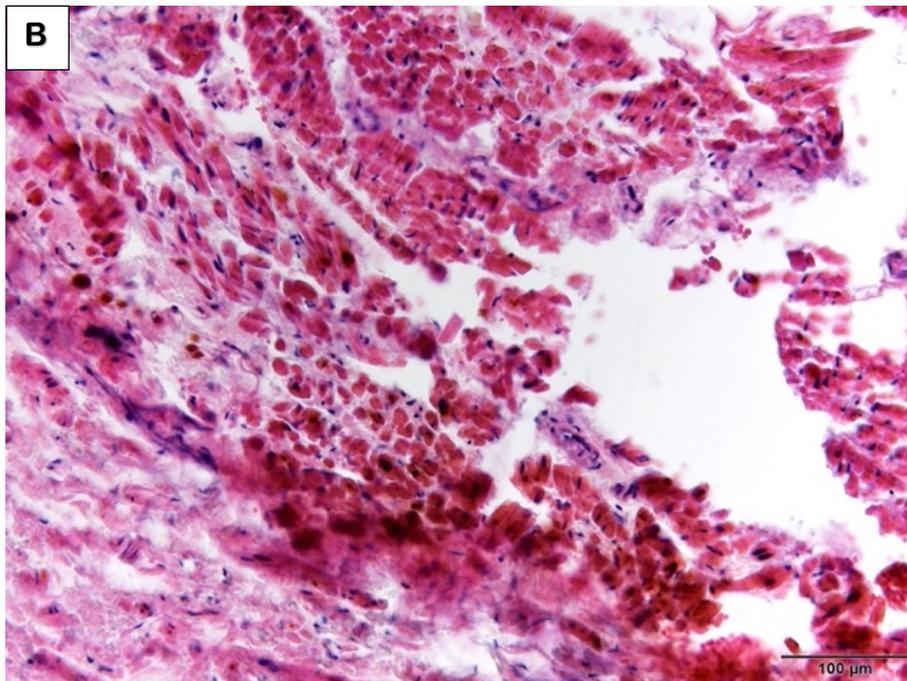
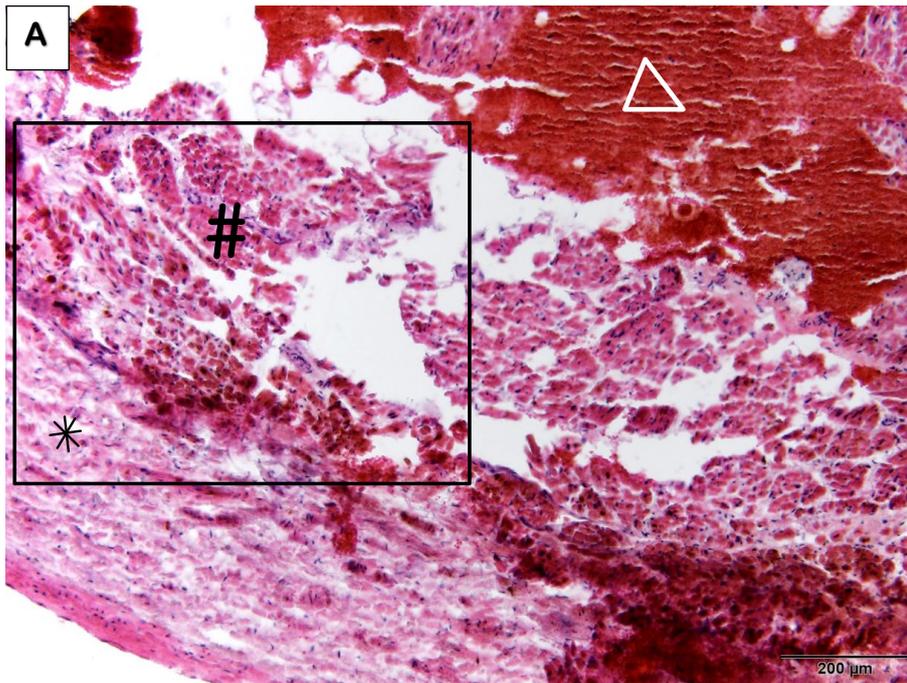
### **5.1.2 Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof**

Bei vier Individuen zeigten sich Befunde ohne besondere Auffälligkeiten, wie in Abbildung 9, Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt. Lediglich bei einem Individuum fand sich ein nicht organisiertes Hämatom im subepikardialen Fett (siehe Abbildung 10). Als Zufallsbefund fand sich bei einem der Spender ein parasympathisches Ganglion, welches in Abbildung 14 gezeigt ist.



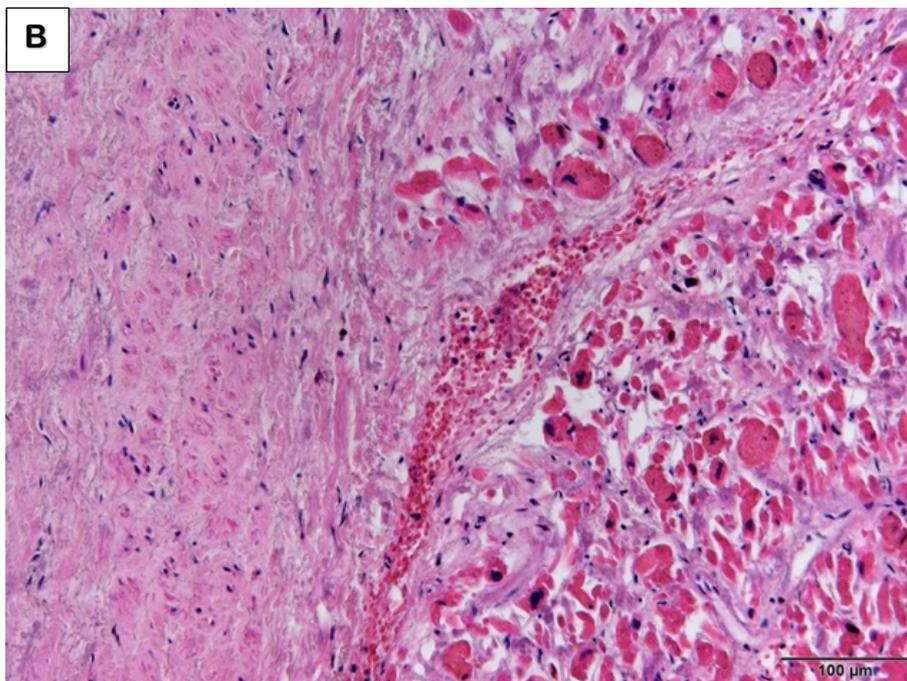
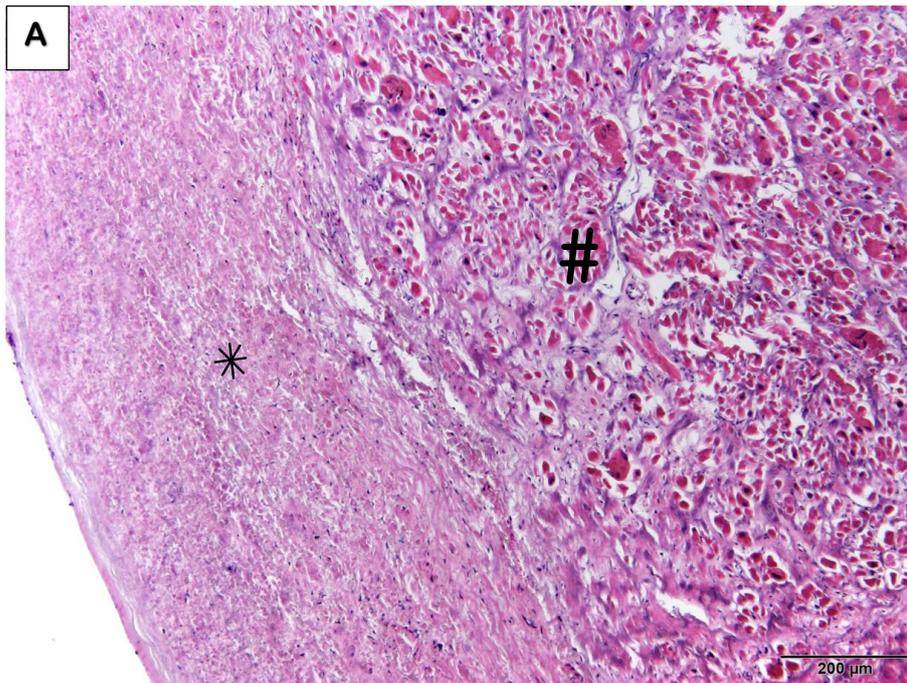
*Abbildung 9 A, B: Pulmonalvene (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders Nr. 1 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Der Stern kennzeichnet die Wand der Pulmonalvene, die Raute markiert das Myokard des linken Atriums. Zwischen den beiden Anteilen ist Fettgewebe (1) erkennbar. Die Abbildungen stellen einen altersentsprechenden Befund dar.



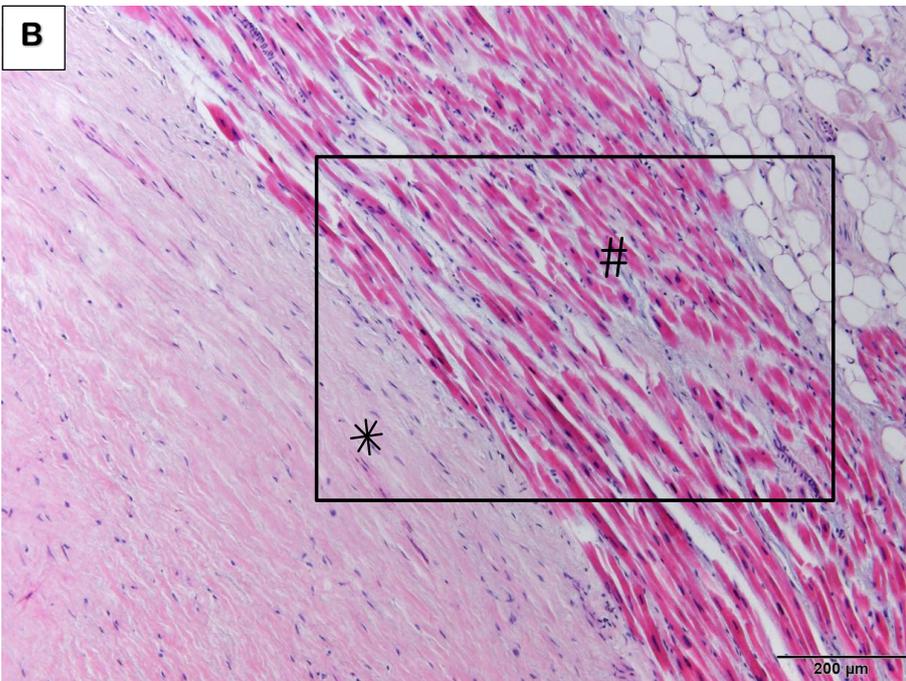
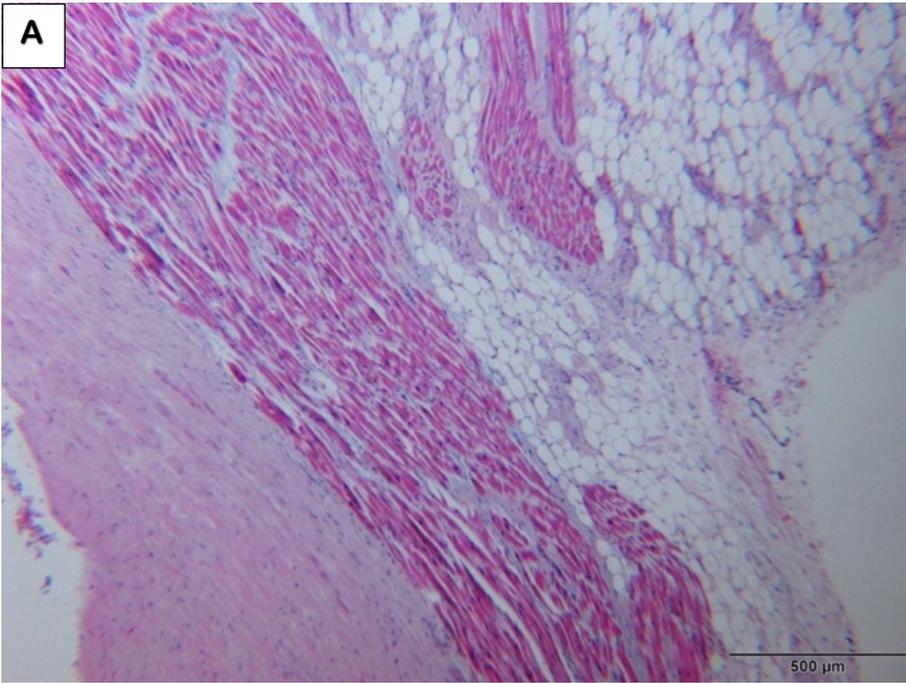
*Abbildung 10 A, B: Pulmonalvene (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

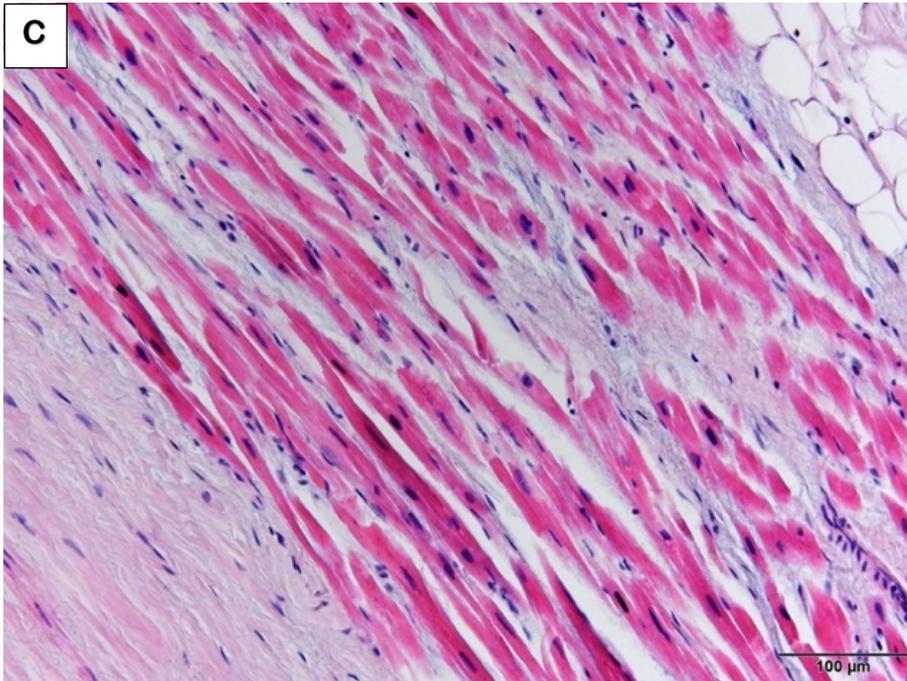
Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders Nr. 2 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Der Stern markiert die Wand der Pulmonalvene, die Raute das Vorhofmyokard. Im Bereich des subepikardialen Fettes des Übergangsbereichs von Gefäß auf Atrium zeigt sich ein nicht organisiertes Hämatom ohne Infiltrate von Entzündungszellen, welches mit einem Dreieck markiert ist.



*Abbildung 11 A, B: Pulmonalvene (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

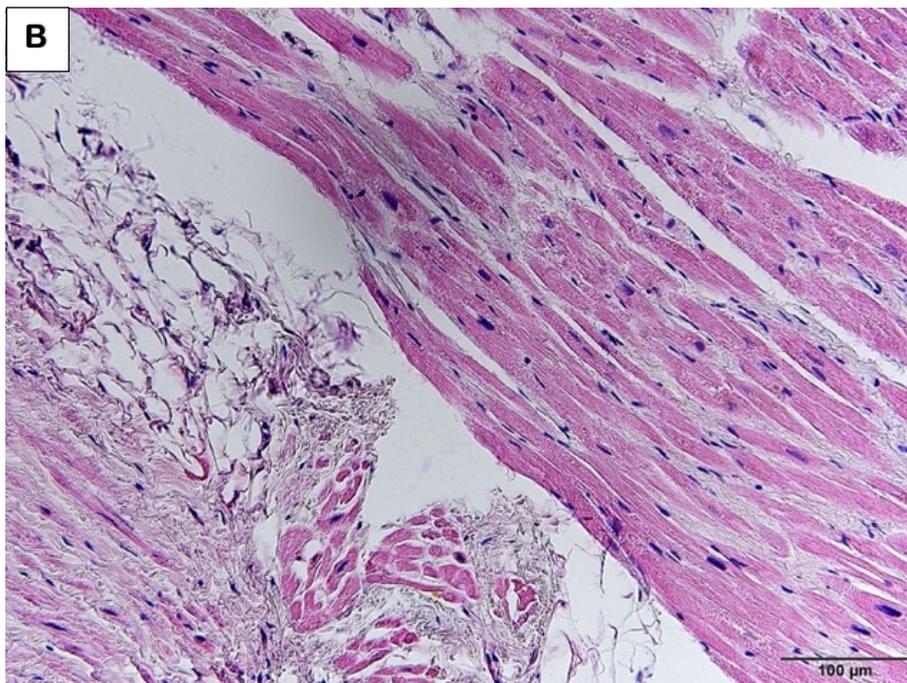
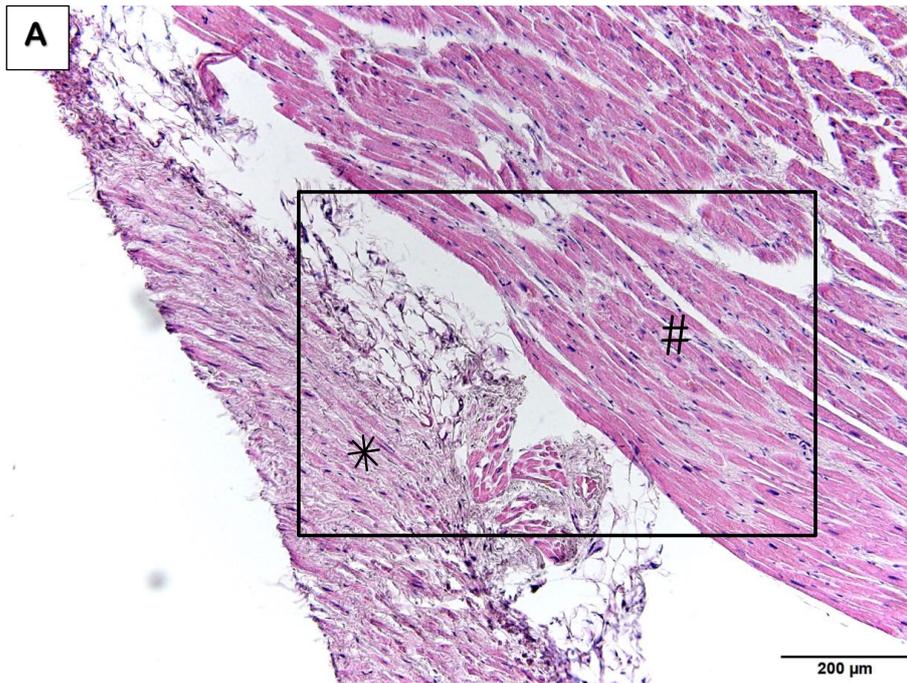
Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders Nr. 3 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Der Stern kennzeichnet die Wand der Pulmonalvene, die Raute markiert das Myokard des linken Atriums. Es handelt sich um einen unauffälligen Befund.





*Abbildung 12 A, B, C: Pulmonalvene (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders Nr. 4 in einer HE-Färbung in 50- (A), 100- (B) und 200-facher (C) Vergrößerung. In der Übersichtsaufnahme zeigt sich, wie sich nach unten hin das Myokard und nach oben hin die Pulmonalvene verjüngt. Der Stern in der 100-fachen Vergrößerung kennzeichnet die Wand der Pulmonalvene, die Raute markiert das Myokard des linken Vorhofs. Es sind keine Auffälligkeiten erkennbar.



*Abbildung 13 A, B: Pulmonalvene (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders Nr. 5 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Der Stern kennzeichnet die Wand der Pulmonalvene, die Raute markiert das Myokard des linken Atriums. Es handelt sich um einen altersentsprechenden Befund.

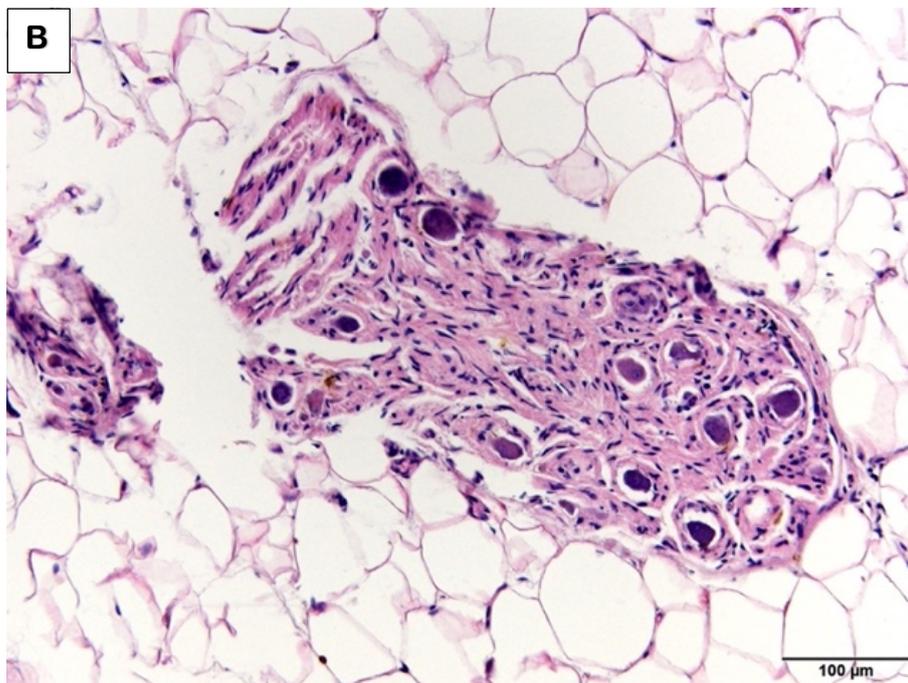
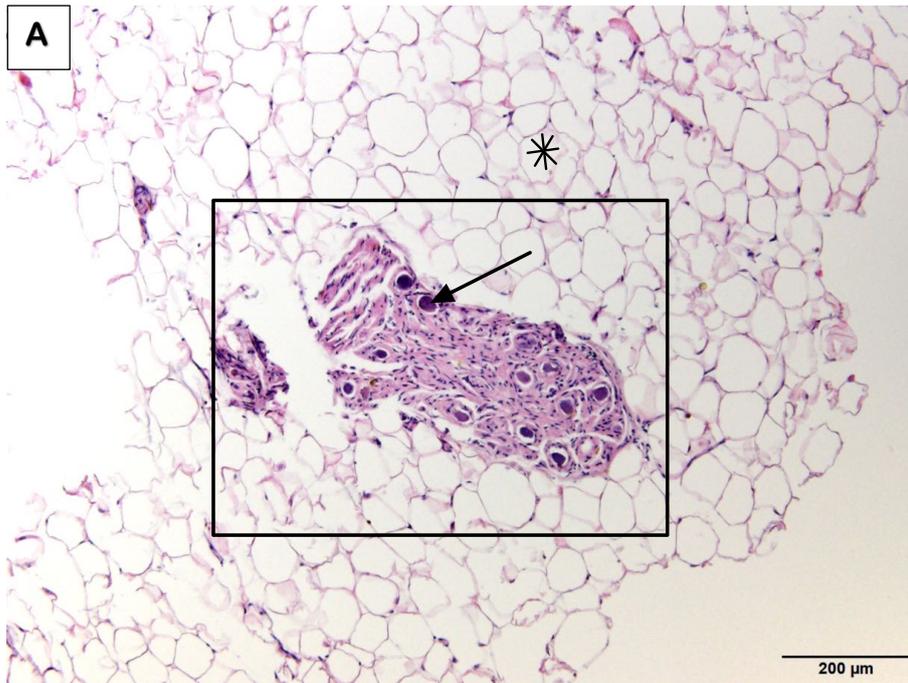
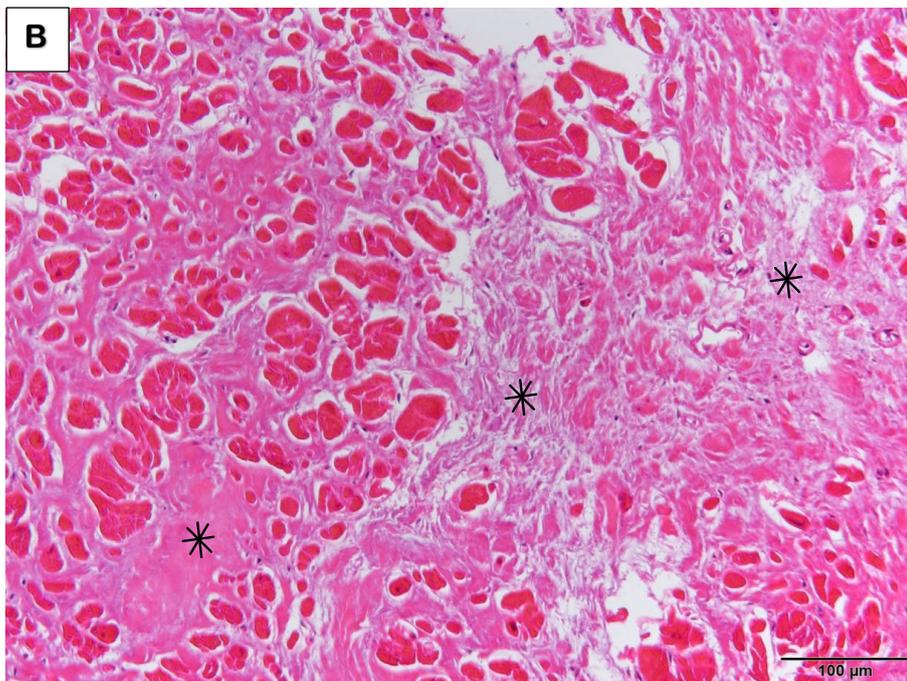
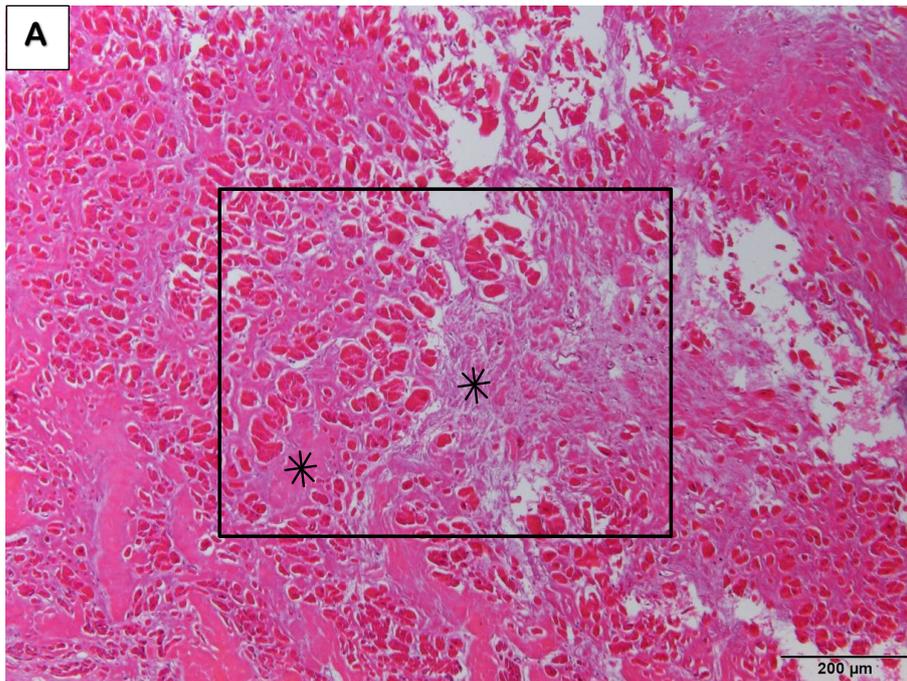


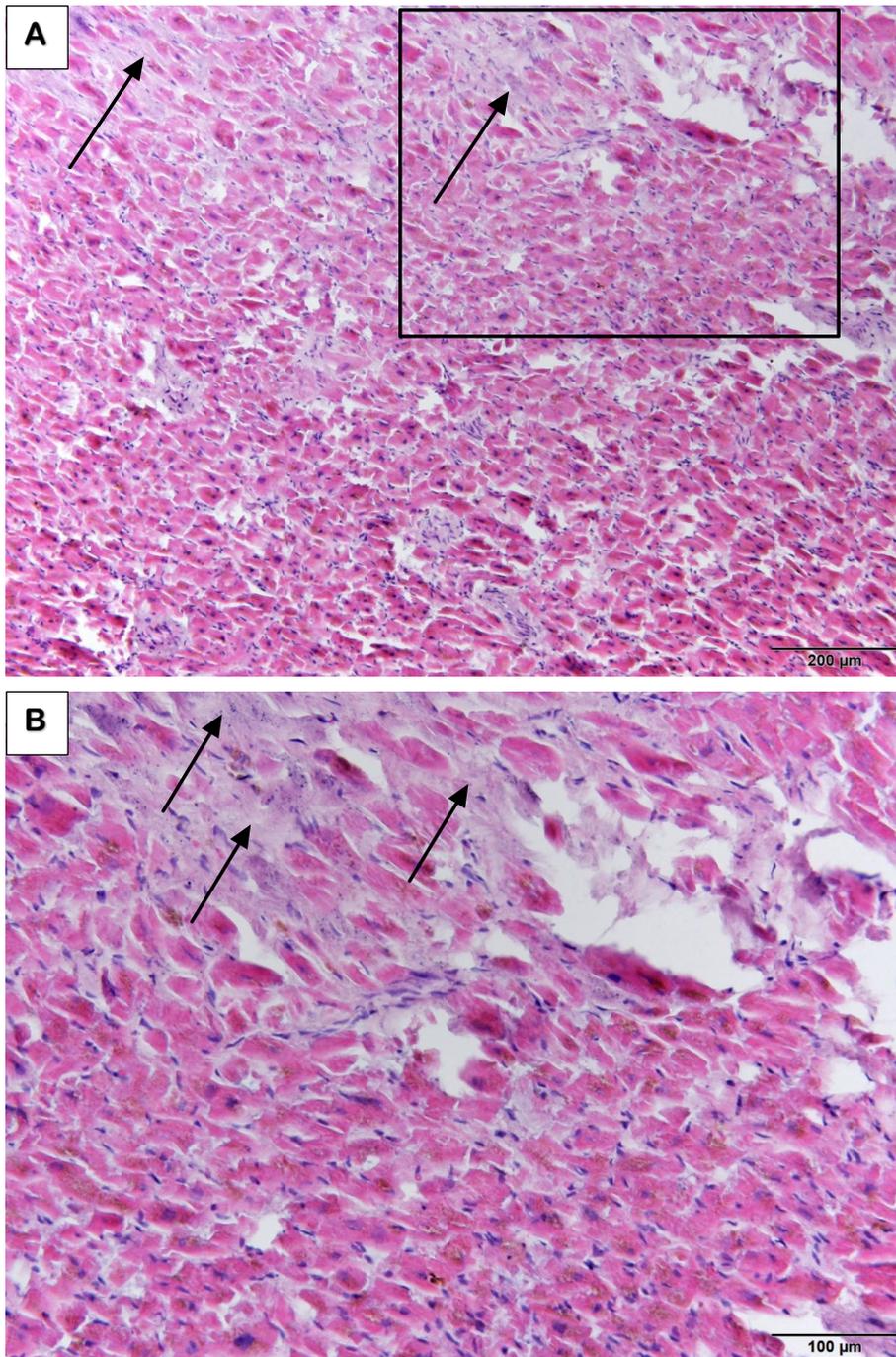
Abbildung 14 A, B: Parasympathisches Ganglion (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung  
 Zufallsbefund eines Parasympathischen Ganglions im subepikardialen Fett (Stern) des  
 Übergangsbereichs der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders  
 Nr. 5 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Der Pfeil markiert  
 einen Nervenzellkörper.

### **5.1.3 Linker anteriorer Papillarmuskel**

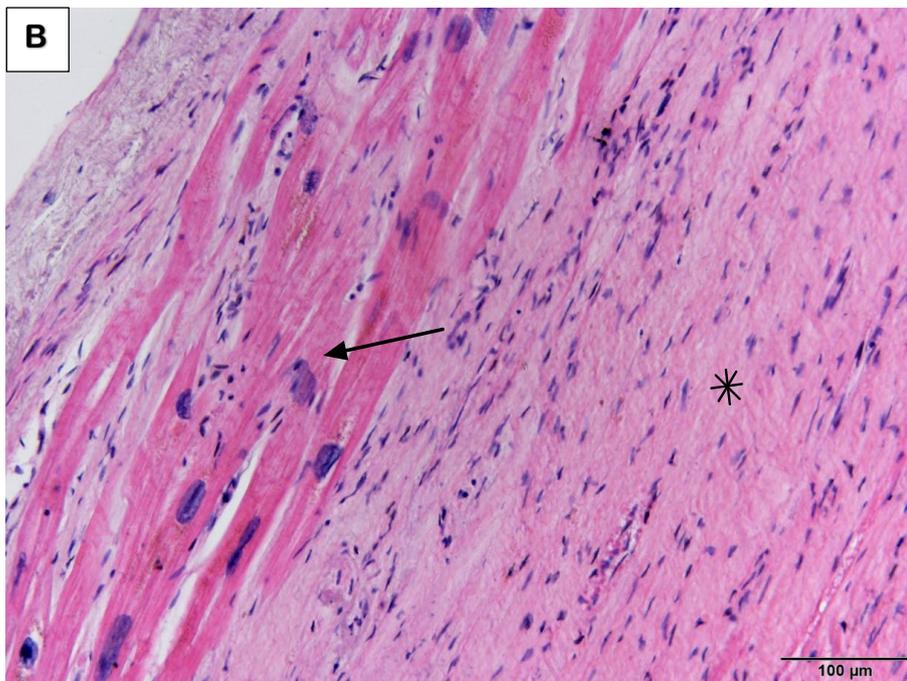
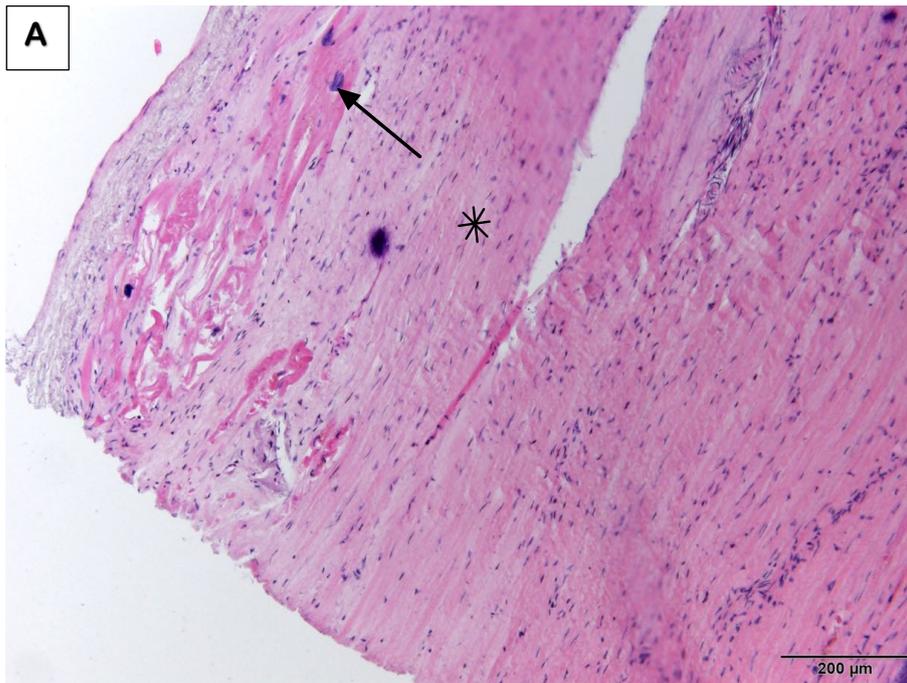
Nur bei einem der Individuen zeigte sich ein unauffälliger Befund, wie in Abbildung 16 dargestellt. Alle anderen weisen eine Kopffibrose in unterschiedlichem Ausmaß auf (siehe Abbildung 15, Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19). Zusätzlich zeigte sich bei einem Individuum ein verdicktes Endokard, was in Abbildung 19 zu sehen ist.



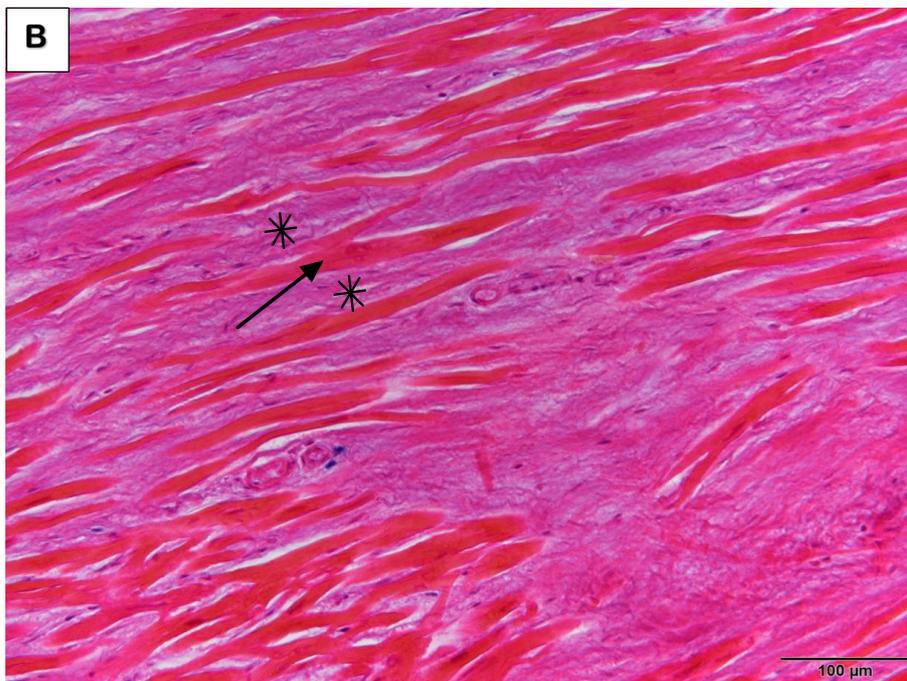
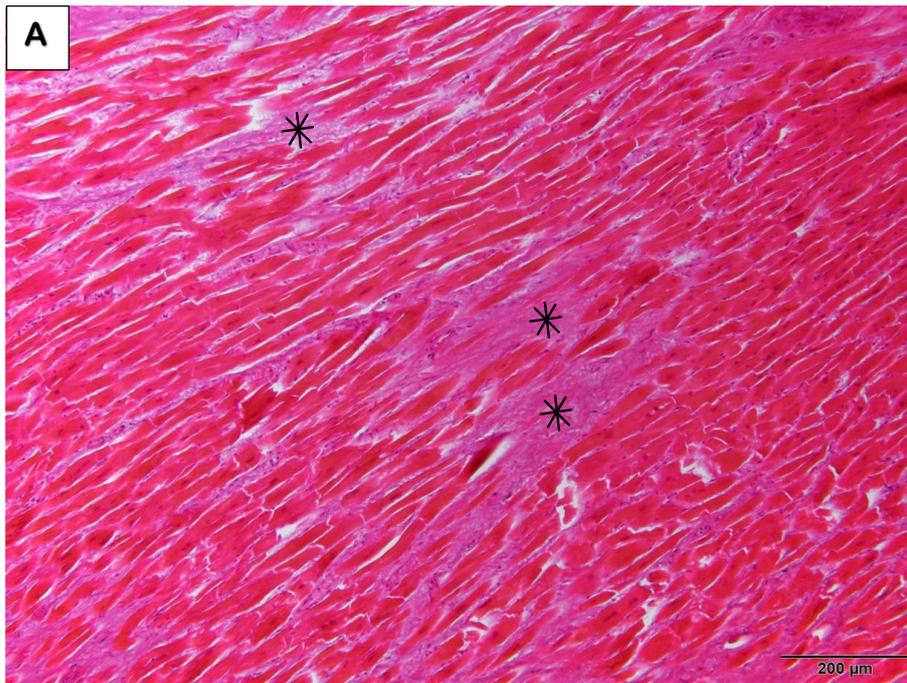
*Abbildung 15 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 1 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Sterne markieren die bindegewebige Durchsetzung des Myokards im Rahmen einer Kopffibrose.



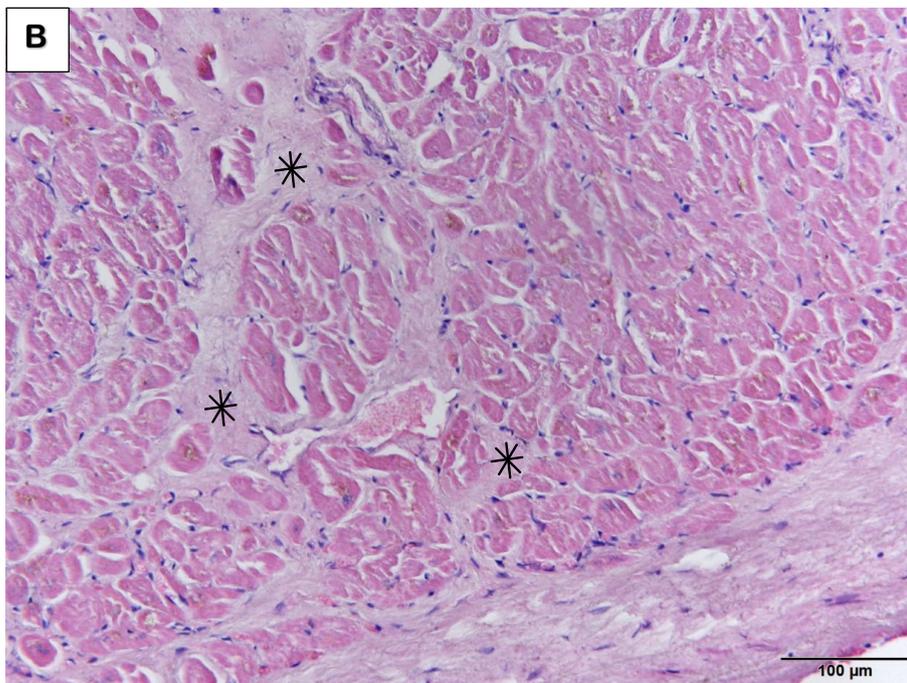
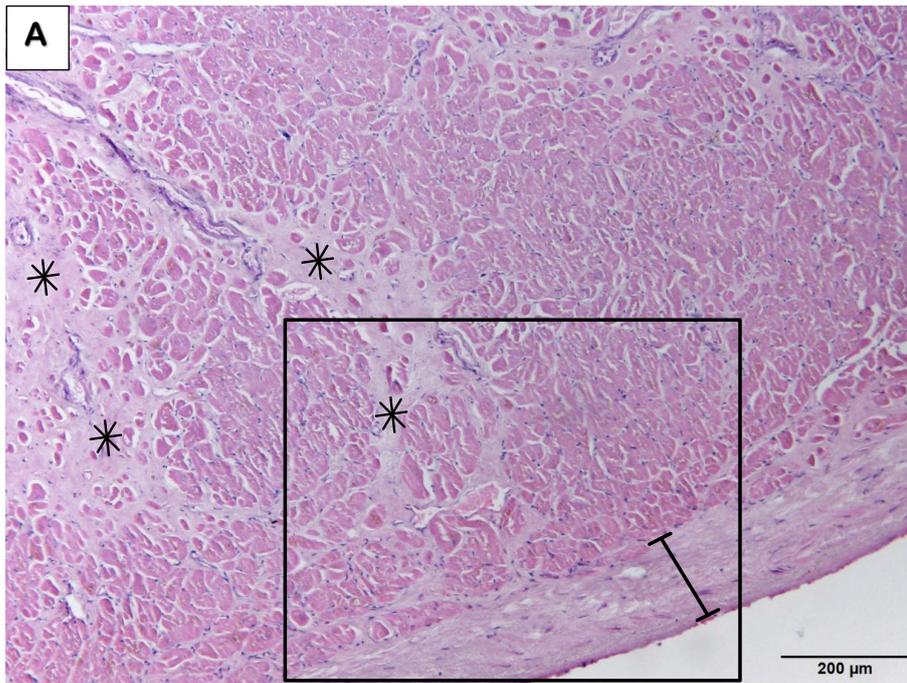
*Abbildung 16 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 2 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Pfeile markieren Bindegewebsstränge, die in Richtung des Abgangs der Sehnenfäden laufen und stellen somit den Ursprung eines Sehnenfadens dar. Es handelt sich um einen altersentsprechenden Befund.



**Abbildung 17 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung**  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 3 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. In dem Präparat sind nur minimale Anteile von Myokard nachzuweisen, wobei der Pfeil exemplarisch einen Kardiomyozyten kennzeichnet. Der Stern markiert den bindegewebigen Anteil, der wahrscheinlich einen Mischbefund aus ausgeprägter Kopffibrose und dem Abgang eines Sehnenfadens darstellt.



*Abbildung 18 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 4 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Sterne markieren Bindegewebsstränge im Rahmen einer leichten Fibrose des Papillarmuskels zwischen den Kardiomyozyten, von denen einer stellvertretend mit einem Pfeil gekennzeichnet ist.



*Abbildung 19 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung*  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 5 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Das Endokard ist verdickt, was durch das Lineal markiert wird. Die Sterne kennzeichnen die Fibrose des Myokards.

#### **5.1.4 Interventrikuläres Septum**

Bei zwei der Individuen zeigten sich altersentsprechende Normalbefunde, was in Abbildung 20 und Abbildung 22 dargestellt ist. Bei zwei Spendern fanden sich Akkumulationen von sauren Mukopolysacchariden, wobei sich diese bei einem der Beiden im Übergangsbereich von muskulärem und membranösem Anteil befanden (siehe Abbildung 21). Bei dem Anderen stellte sich diese Transitionszone unauffällig dar (siehe Abbildung 24), die sauren Mukopolysaccharide zeigten sich im Bereich des Endokards der pars membranacea (siehe Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27). Des Weiteren konnte bei einem Spender eine Verfettung des interventrikulären Septums festgestellt werden (siehe Abbildung 23).

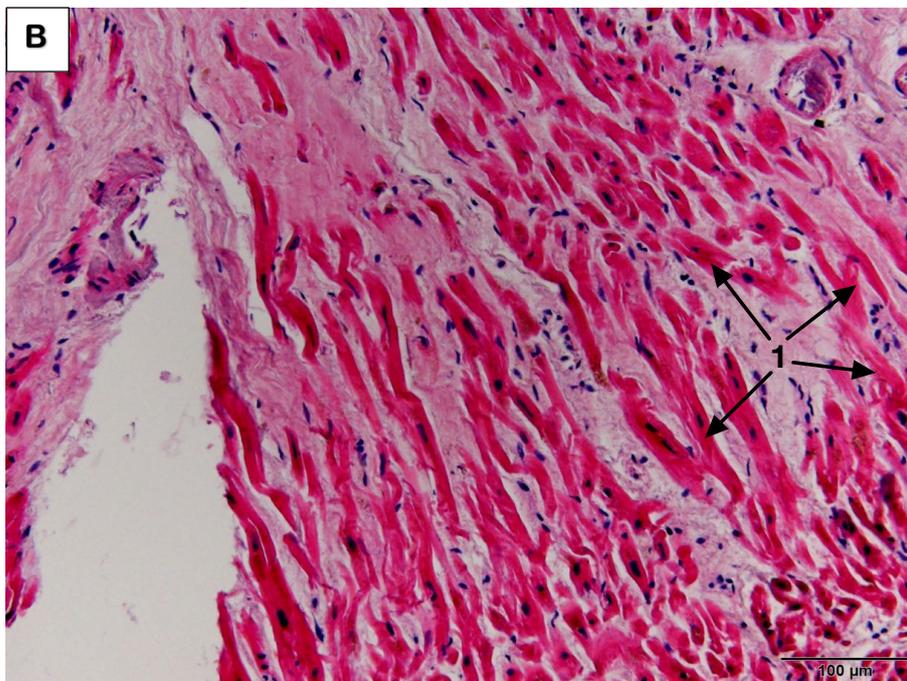
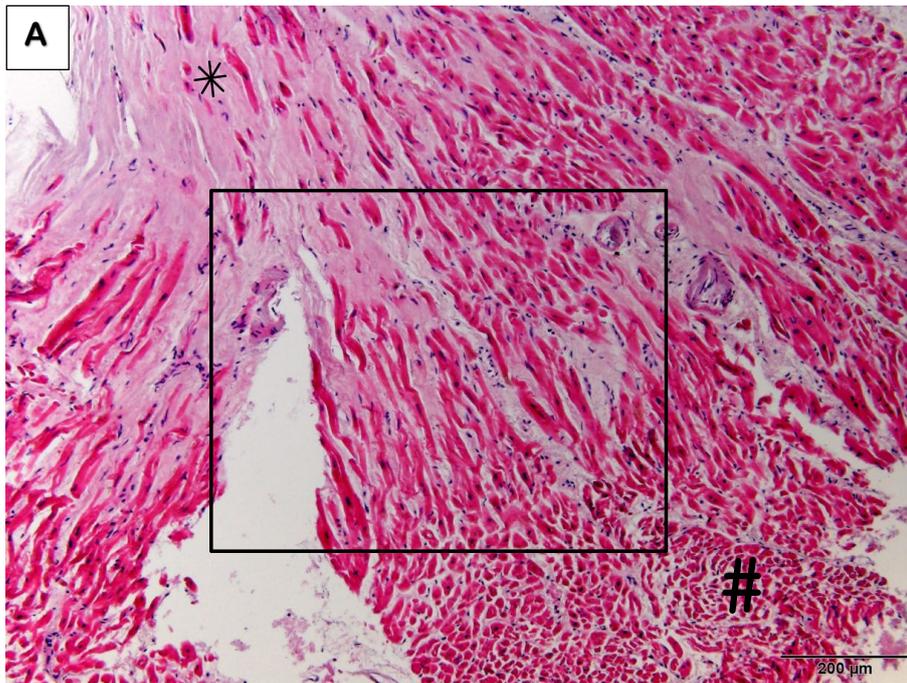
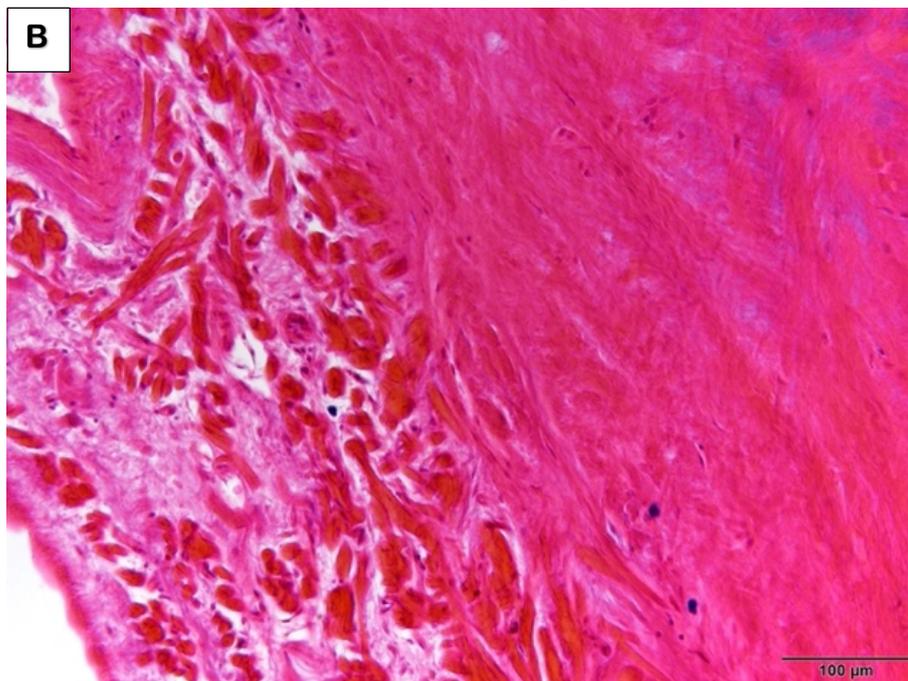
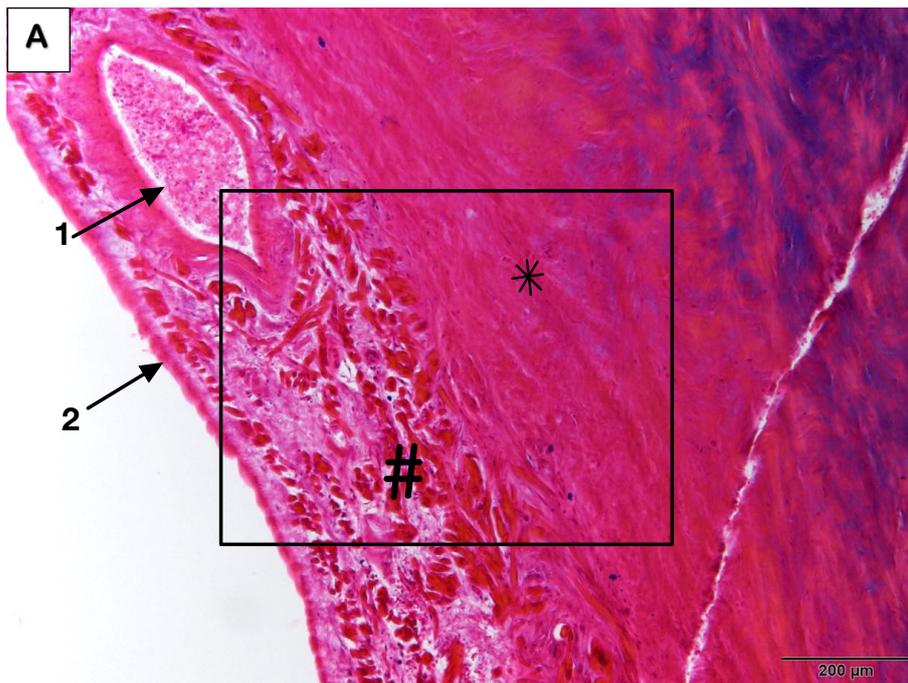


Abbildung 20 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 1 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Der Stern markiert den membranösen Teil des Septums, die Raute den muskulären. Der Übergang der beiden Anteile ineinander ist in der höheren Vergrößerung im Detail dargestellt. Es handelt sich um einen altersentsprechenden Befund.

1 = Kardiomyozyten der pars muscularis



*Abbildung 21 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 2) in Alcian-Hämatoxylin-Eosin-Färbung*  
 Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 2 in einer Alcian-HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Pars muscularis ist mit einer Raute gekennzeichnet, die Pars membranacea mit einem Stern. Im bindegewebigen Teil finden sich blau angefarbte Ansammlungen von sauren Mukopolysacchariden fraglicher Ursache mit unklarem Krankheitswert. Ansonsten sind keine Auffälligkeiten erkennbar.

1 = Gefäß mit Erythrozyten im Lumen, 2 = Endokard

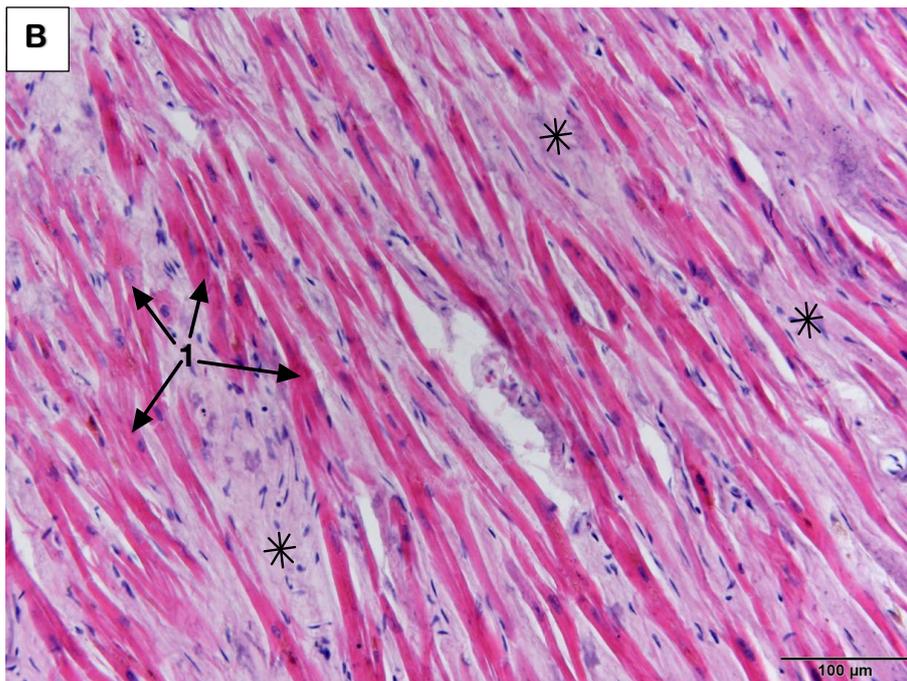
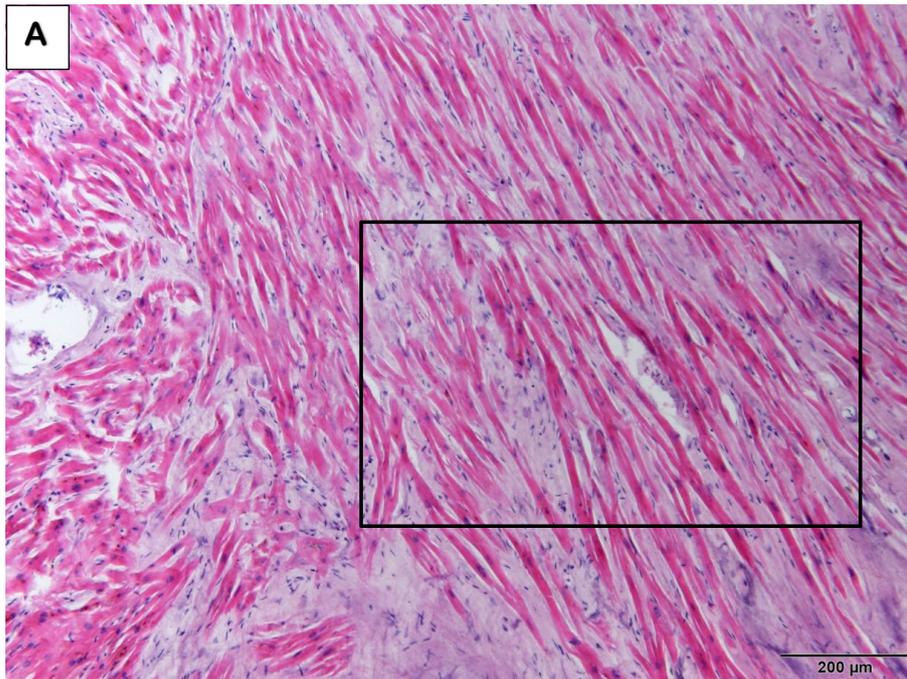
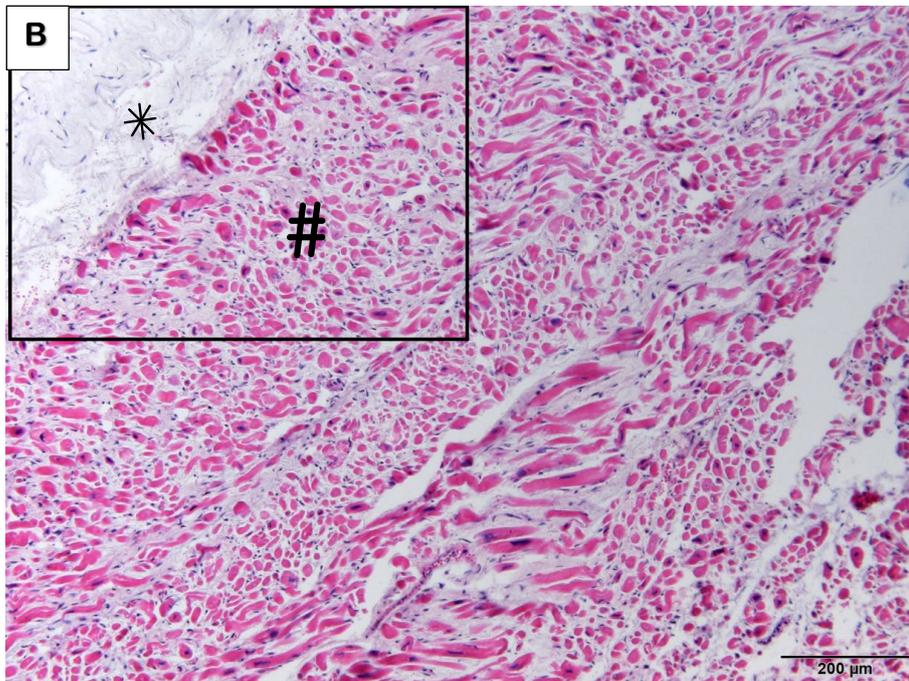
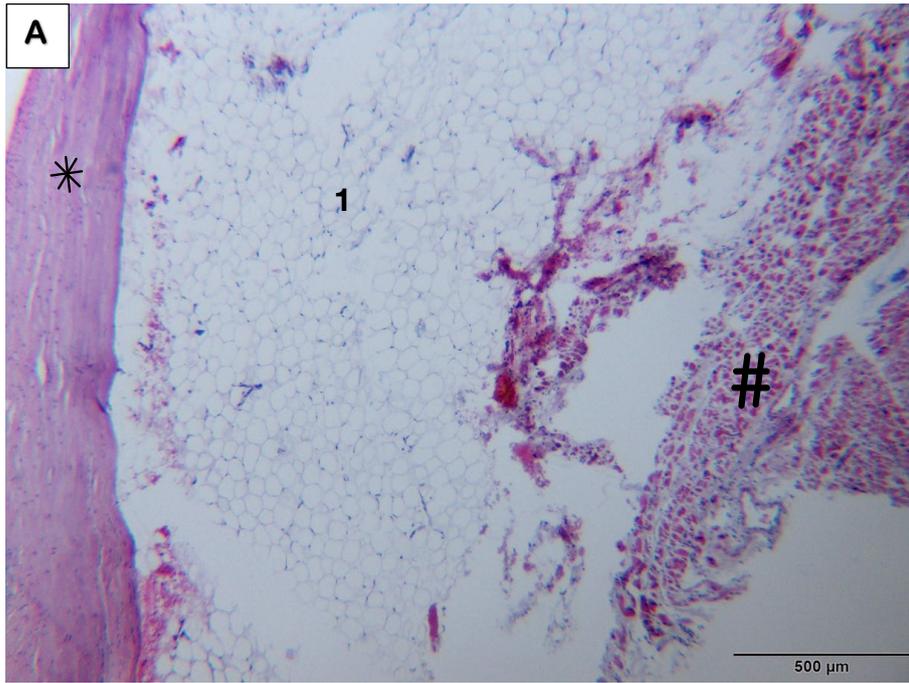


Abbildung 22 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung  
 Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 3 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-  
 facher (B) Vergrößerung. Die Bilder zeigen den Übergangsbereich von muskulärem und  
 membranösem Teil des Septums, wobei ein unauffälliger Befund vorliegt.

1 = Kardiomyozyten (pars muscularis), 2 = Bindegewebsstränge (pars membranacea)



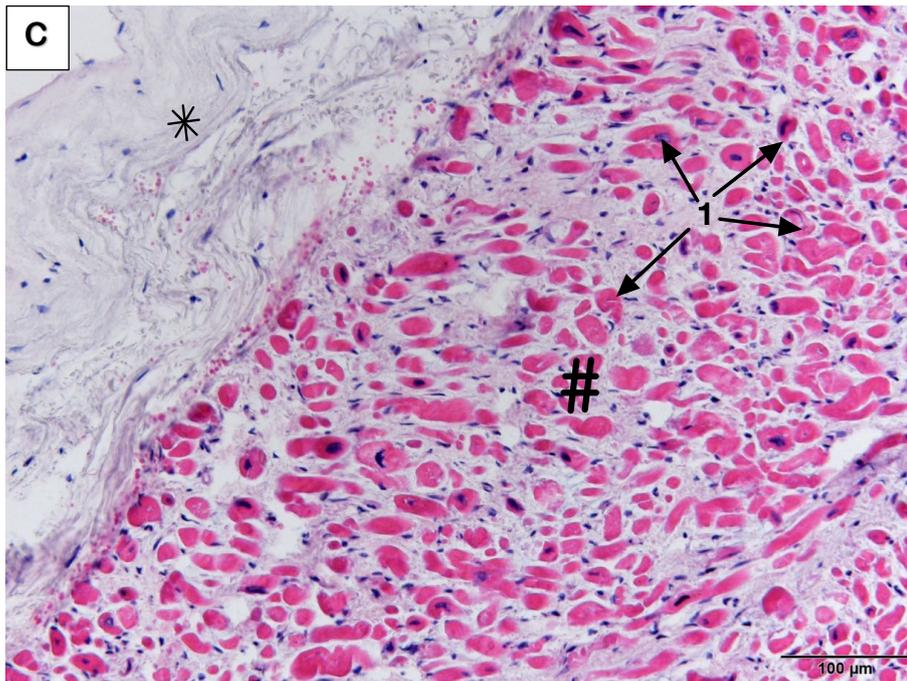


Abbildung 23 A, B, C: Interventrikuläres Septum (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 4 in einer HE-Färbung in 50- (A), 100- (B) und 200-facher (C) Vergrößerung. In der Übersichtsaufnahme ist die Verfettung (1) des Septums zwischen der mit Raute markierten Pars muscularis und der mit Stern gekennzeichneten Pars membranacea erkennbar, weshalb in der 100- und 200-fachen Vergrößerung nur der muskuläre Anteil dargestellt ist.

1 = Herzmuskelzellen der pars muscularis

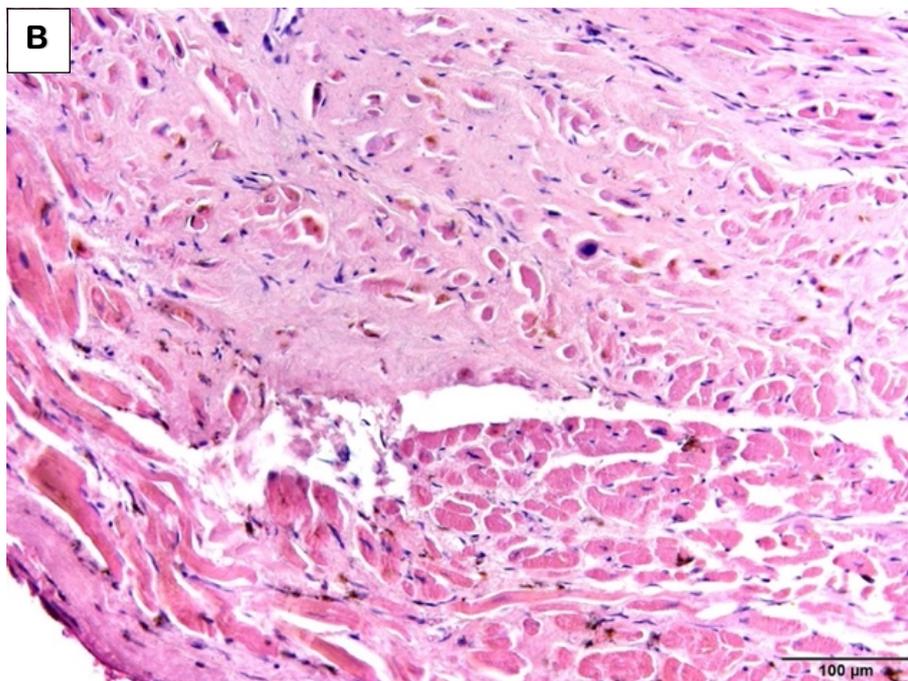
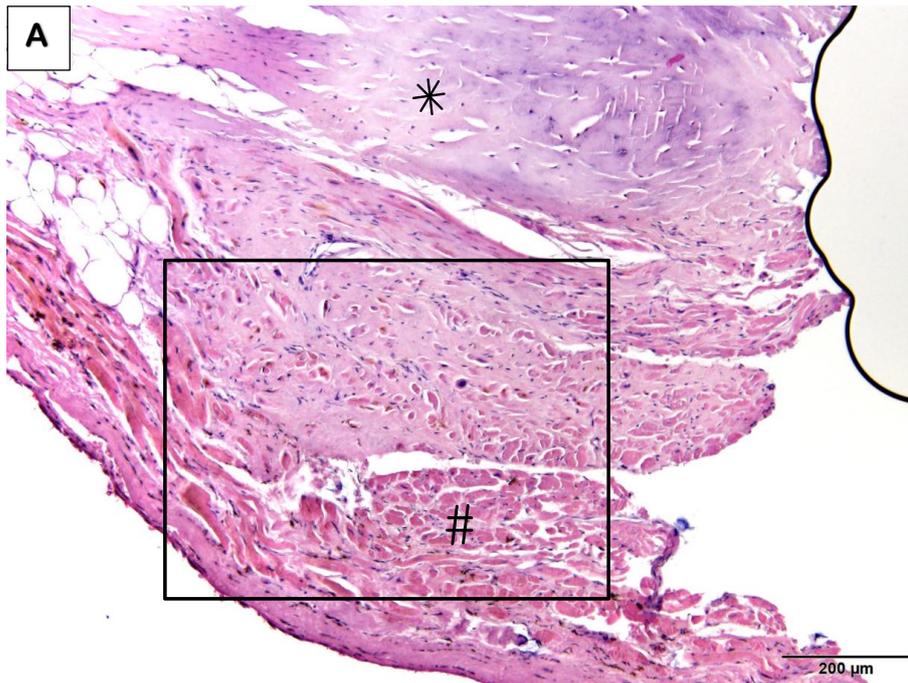


Abbildung 24 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 5 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Raute kennzeichnet den muskulären und der Stern den membranösen Anteil des Septums. In diesem Übergangsbereich sind keine Auffälligkeiten erkennbar.

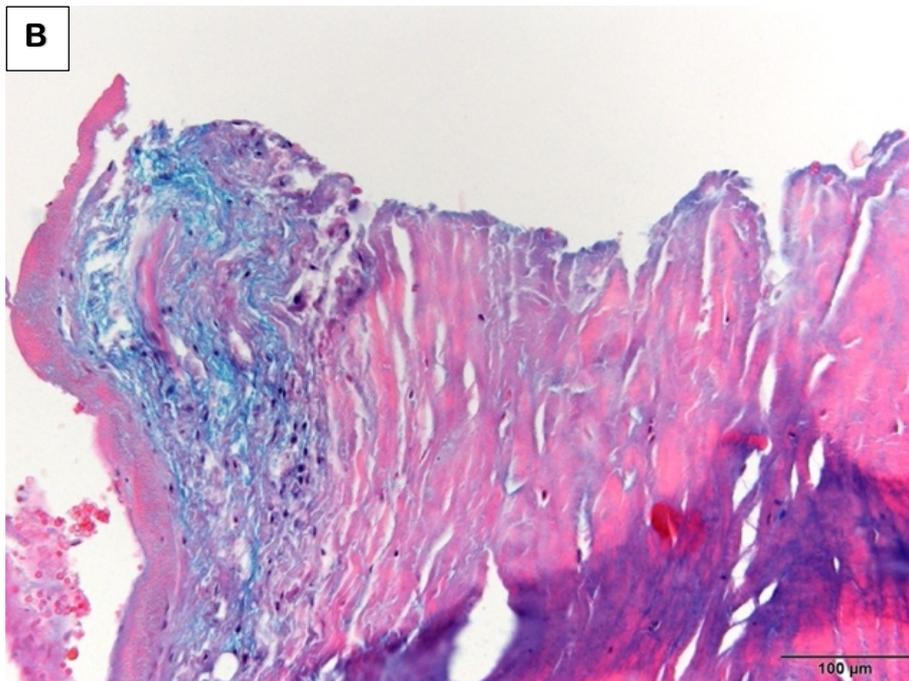
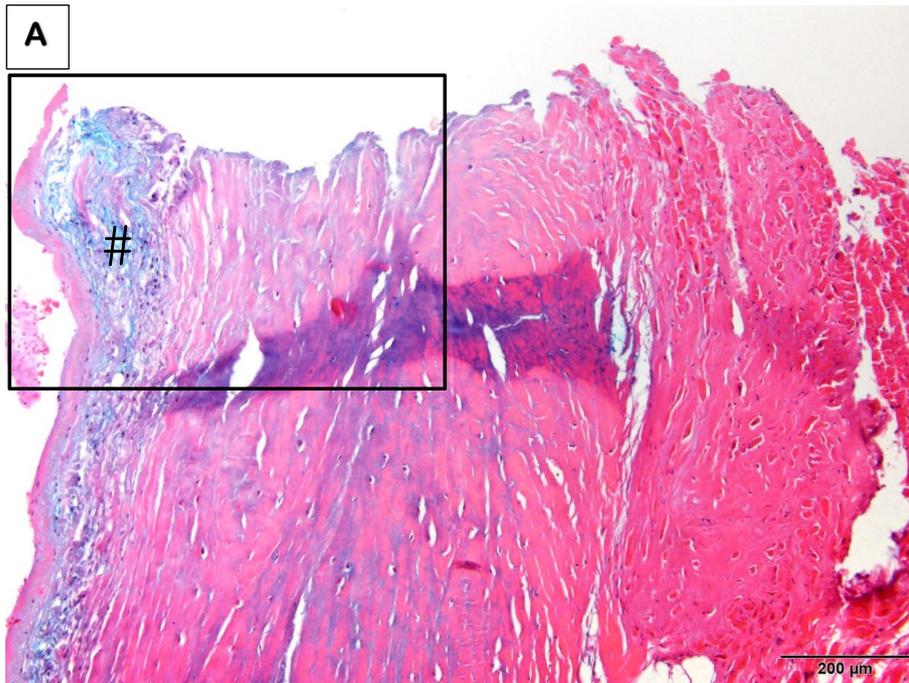
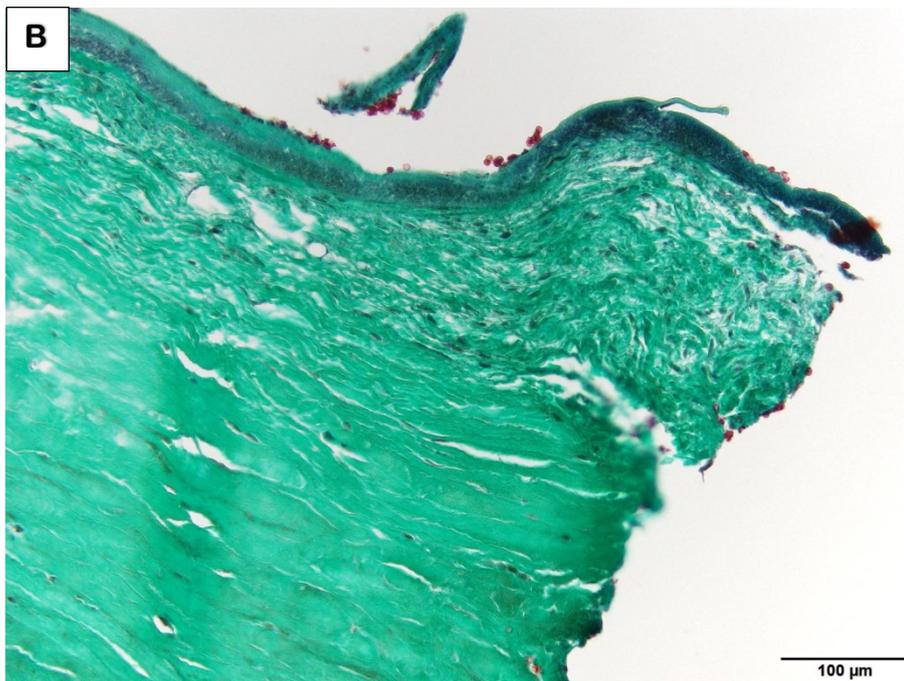
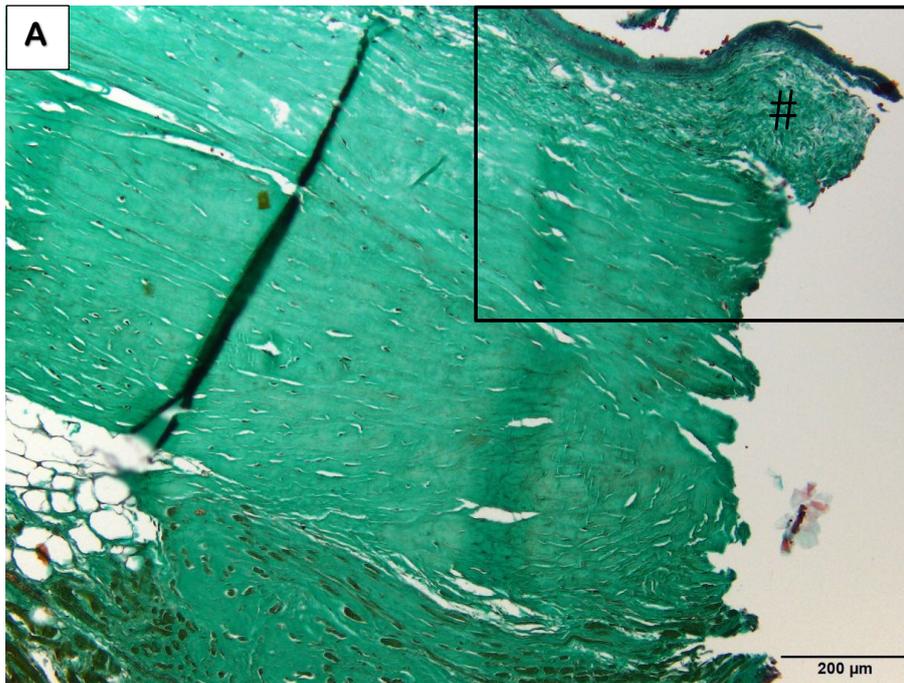
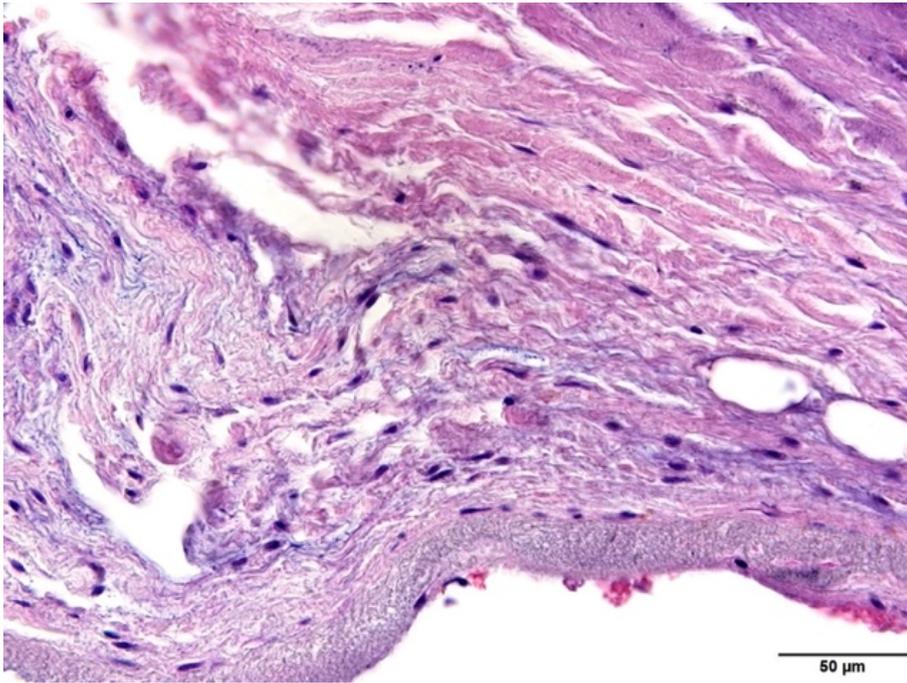


Abbildung 25 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Alcian-Hämatoxylin-Eosin-Färbung  
 Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 5 in einer Alcian-HE-Färbung in 100- (A) und  
 200-facher (B) Vergrößerung. Die Raute markiert einen Bereich mit Akkumulationen von  
 blau angefärbten sauren Mukopolysacchariden unklaren Ursprungs und Krankheitswertes  
 im Bereich des Endokards der pars membranacea.



*Abbildung 26 Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Masson-Goldner-Trichrom-Färbung*

Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 5 in einer Masson-Goldner-Trichrom-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung, wobei derselbe Bereich dargestellt ist, wie in der Alcian-HE-Färbung. Die Raute kennzeichnet das Areal, in dem bei der Alcian-HE-Färbung die Akkumulationen der sauren Mukopolysaccharide erkennbar sind. Die in der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung hell-grün angefärbten Areale in diesem Bereich entsprechen somit den sauren Mukopolysacchariden und stellen kein Bindegewebe dar.



*Abbildung 27 Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Bereich 2*  
Interventrikuläres Septum des Spenders Nr. 5 in einer HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung. Dargestellt ist der zu der Alcian-HE- und der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung korrespondierende Bereich. In der hohen Vergrößerung kommt die aufgelockerte Gewebestruktur in diesem Areal zum Ausdruck.

### **5.1.5 Trabecula Septomarginalis**

In drei der Individuen konnte ein unauffälliger, dem Alter entsprechender Befund erhoben werden, wie in Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33 gezeigt wird. Ein untersuchter Spender zeigte verdickte Äste der Koronarien (siehe Abbildung 28, Abbildung 29 und Abbildung 30), sowie ein Weiterer eine ausgeprägte Verfettung der Trabecula septomarginalis (siehe Abbildung 34).

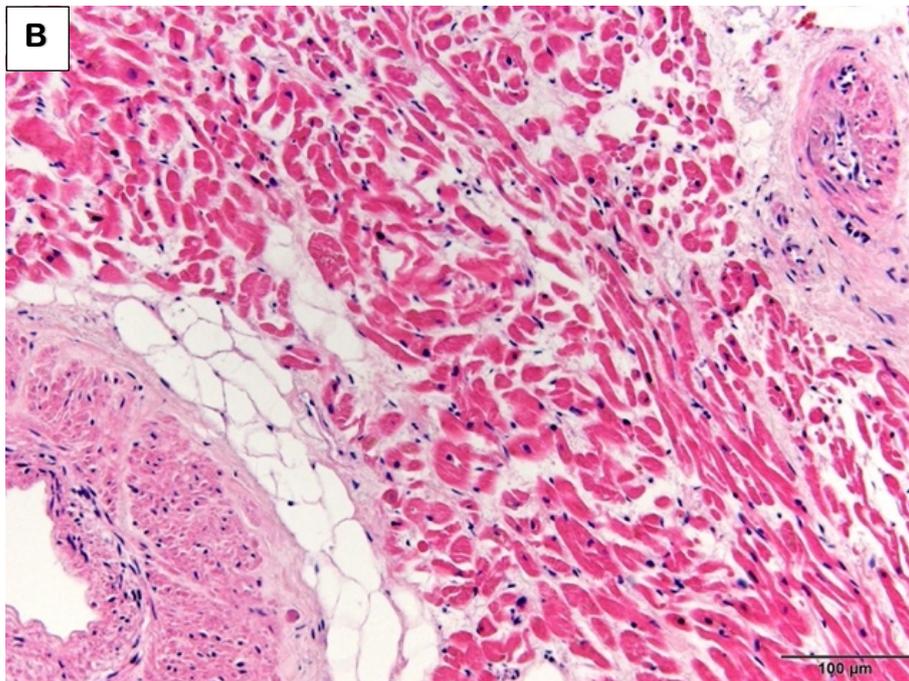
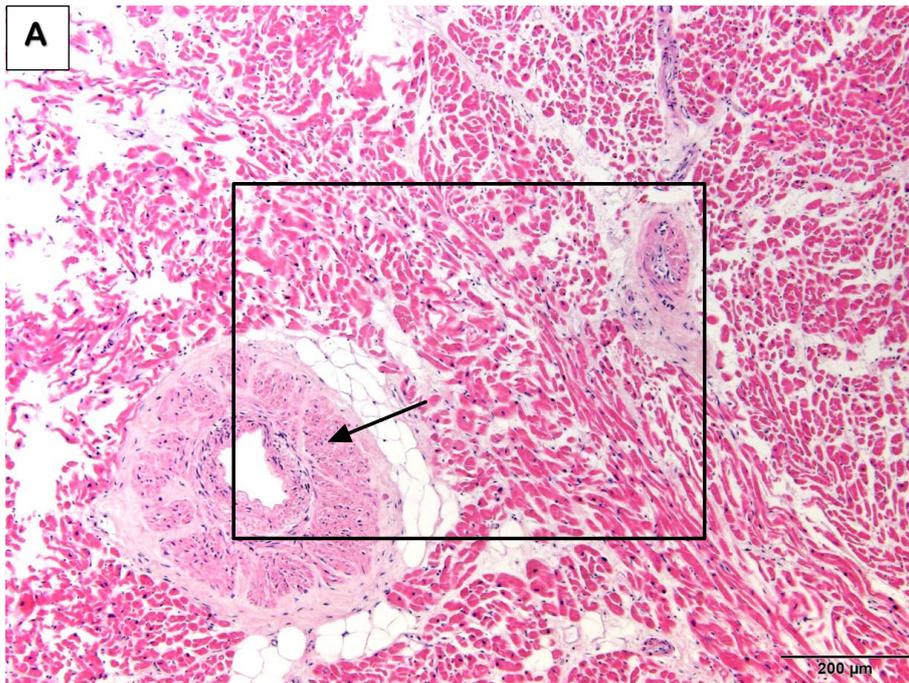


Abbildung 28 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung  
 Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 1 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-  
 facher (B) Vergrößerung. Der Pfeil markiert den krankhaft verdickten Ast einer  
 Koronararterie. Neben diesem zeigen sich Fetteinlagerungen.

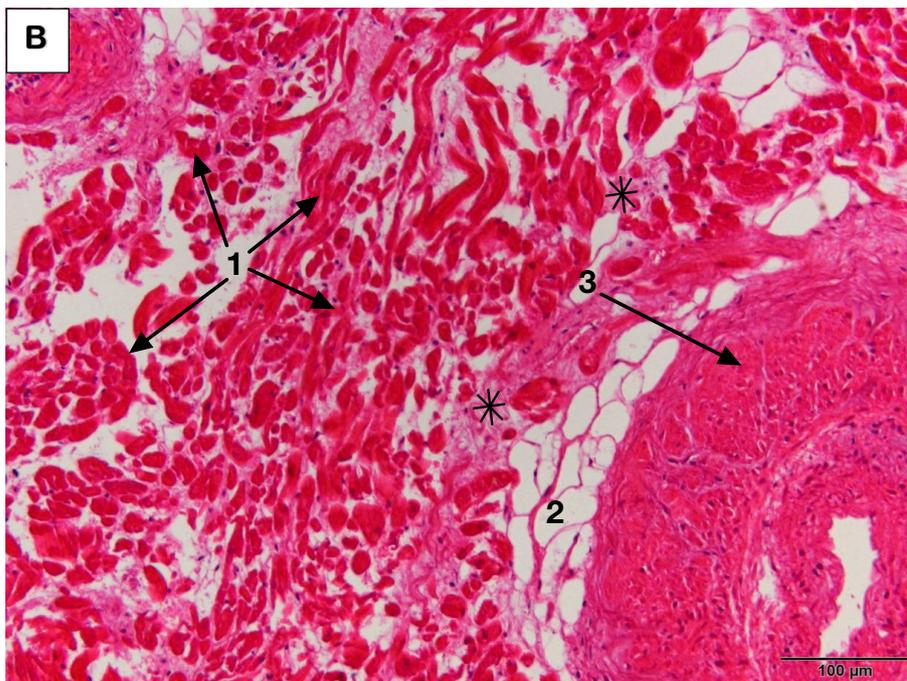
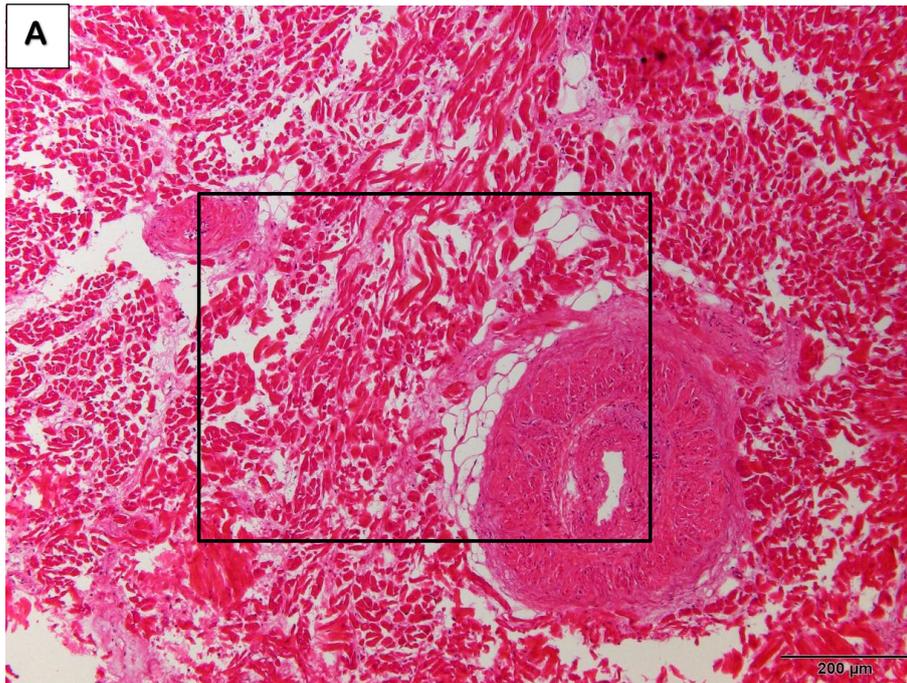


Abbildung 29 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 1) in Alcian-Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 1 in einer Alcian-HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Das Präparat zeigt keine Akkumulation von sauren Mukopolysacchariden und steht stellvertretend für alle Proben für einen unauffälligen Befund dieser Färbung.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Fettgewebe, 3 = verdickter Ast einer Koronararterie, Stern = Bindegewebsstränge

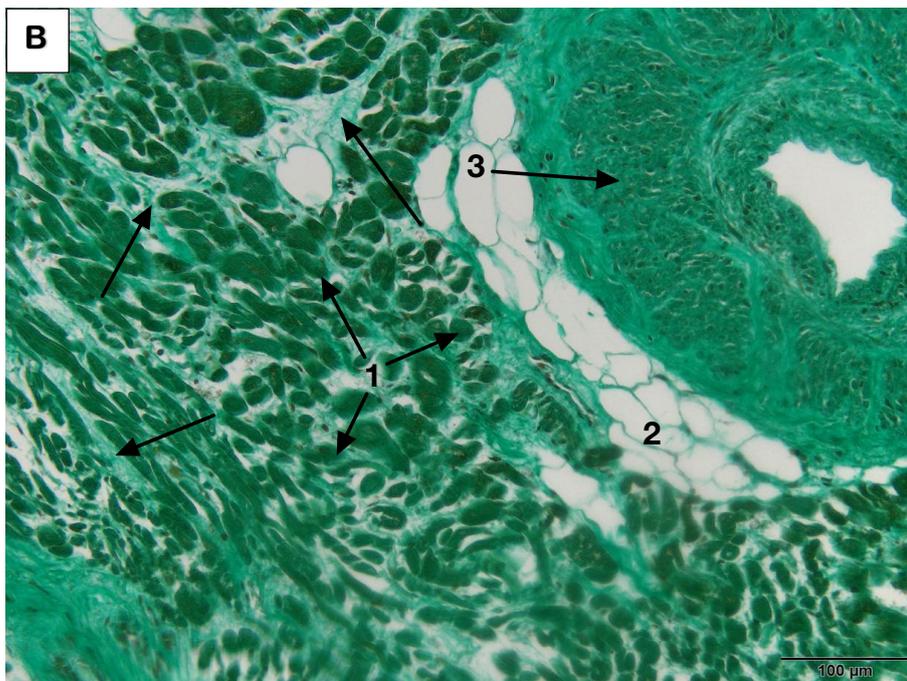
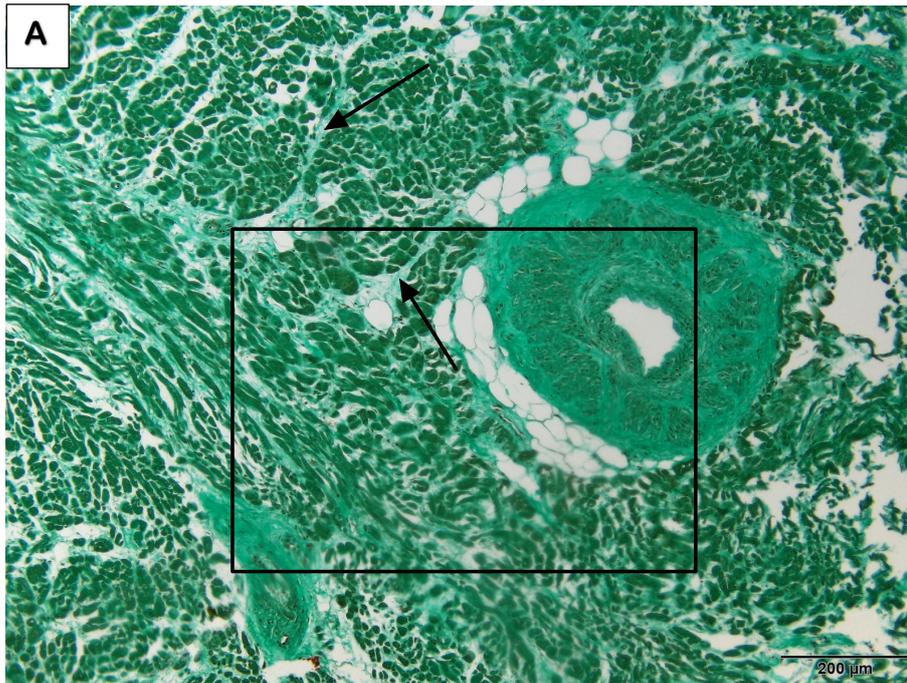


Abbildung 30 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 1) in Masson-Goldner-Trichrom-Färbung  
 Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 1 in einer Masson-Goldner-Trichrom-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Pfeile markieren hell-grün angefärbte Bindegewebsstränge, die das Myokard durchziehen (Fibrose).

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Fettgewebe, 3 = verdickter Ast einer Koronararterie

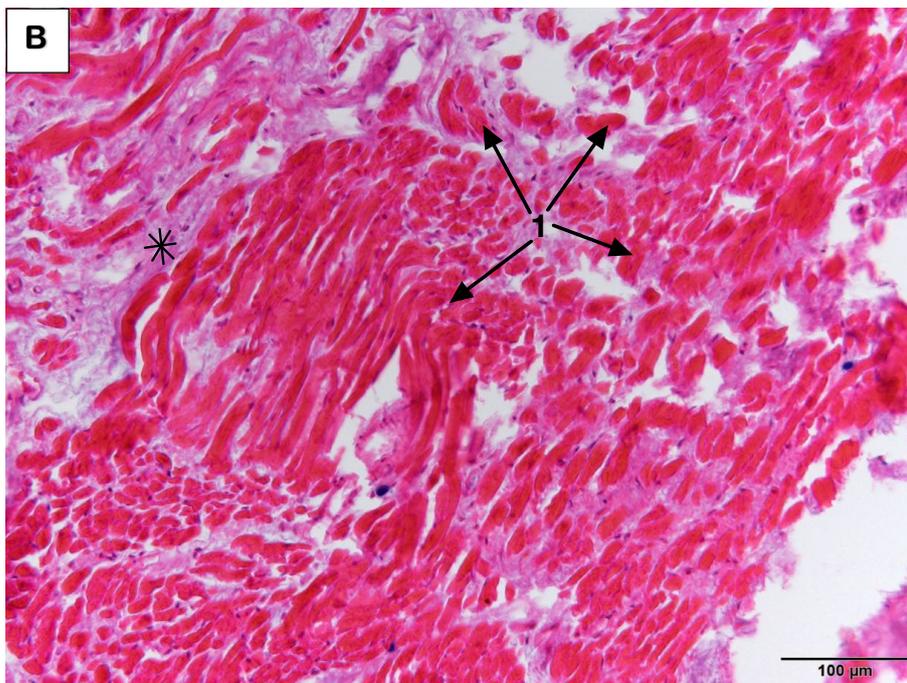
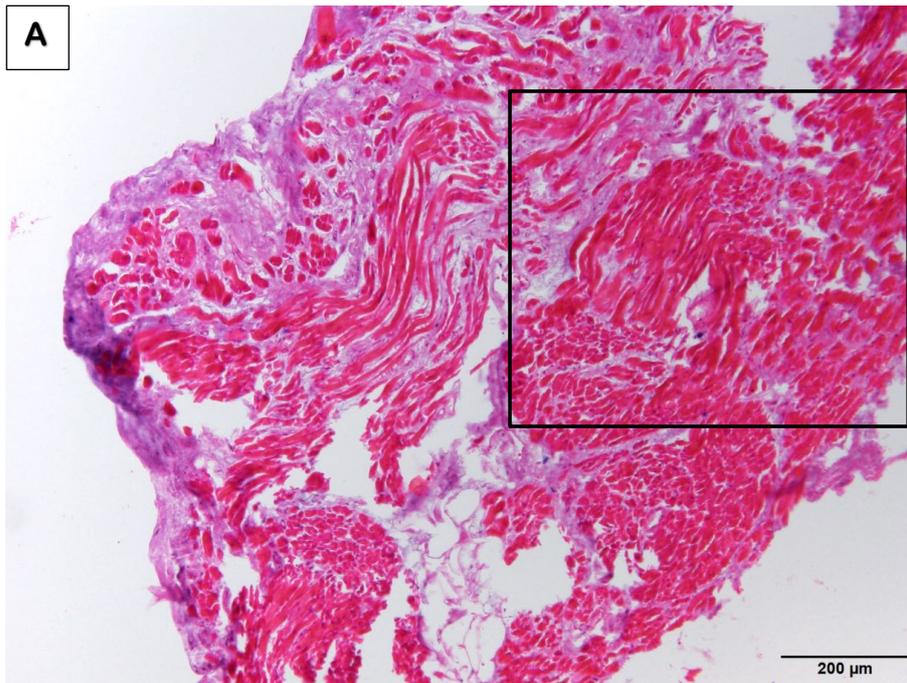


Abbildung 31 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung  
 Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 2 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-  
 facher (B) Vergrößerung. Das Präparat zeigt keine besonderen Auffälligkeiten.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Bindegewebsstränge

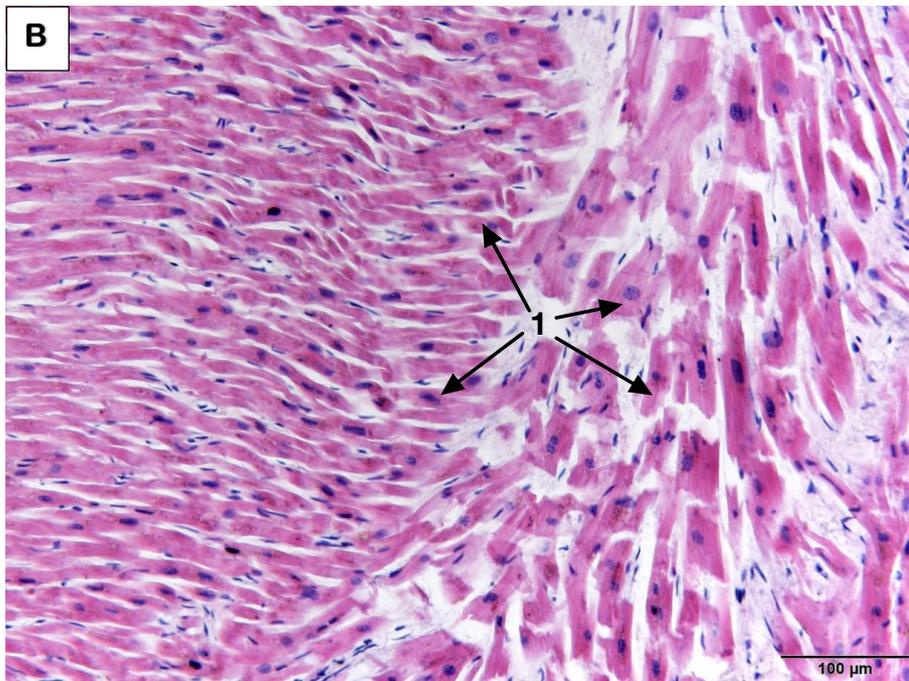
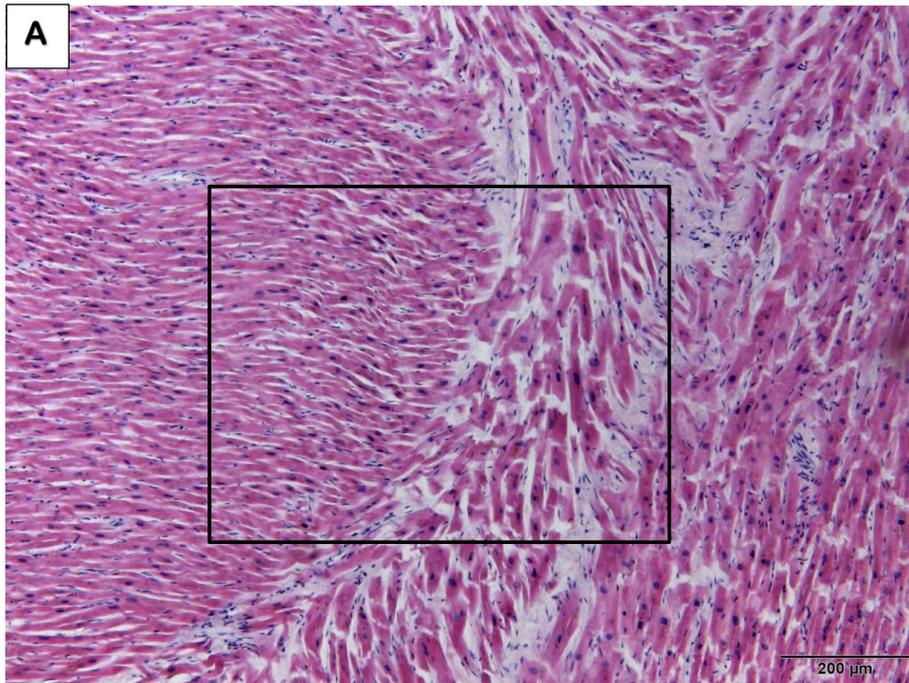


Abbildung 32 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung  
 Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 3 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-  
 facher (B) Vergrößerung. Es handelt sich um einen altersentsprechenden Befund.

1 = Kardiomyozyten

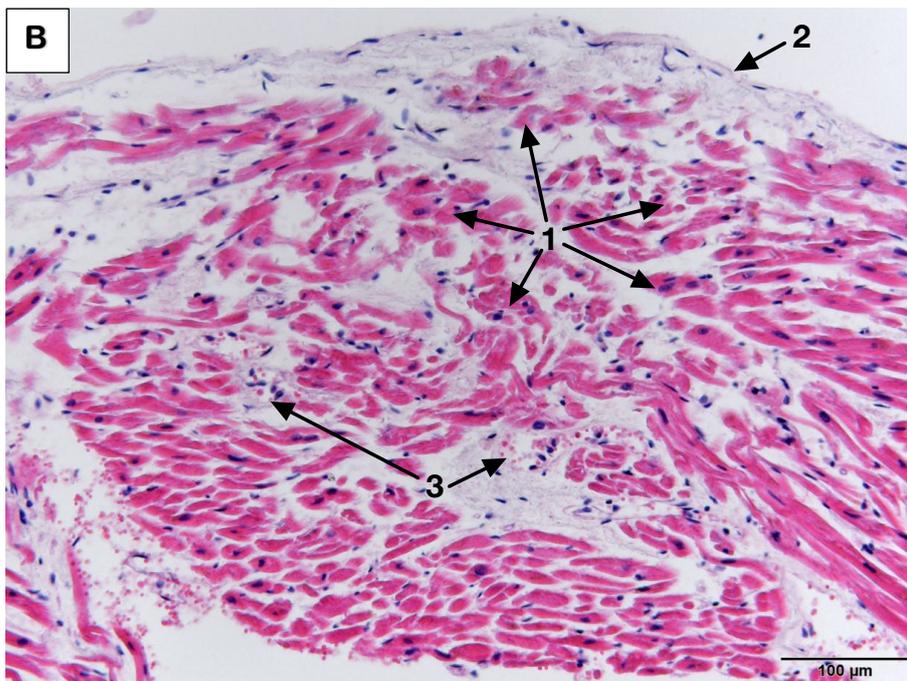
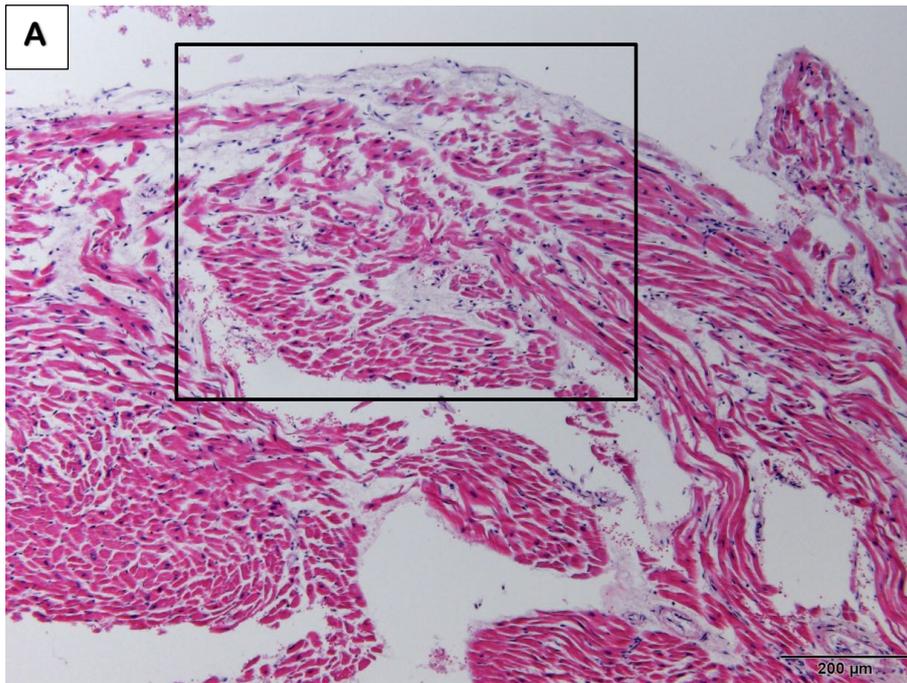


Abbildung 33 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 4 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung ohne auffälligen Befund.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Endokard, 3 = Gefäße mit Erythrozyten im Lumen

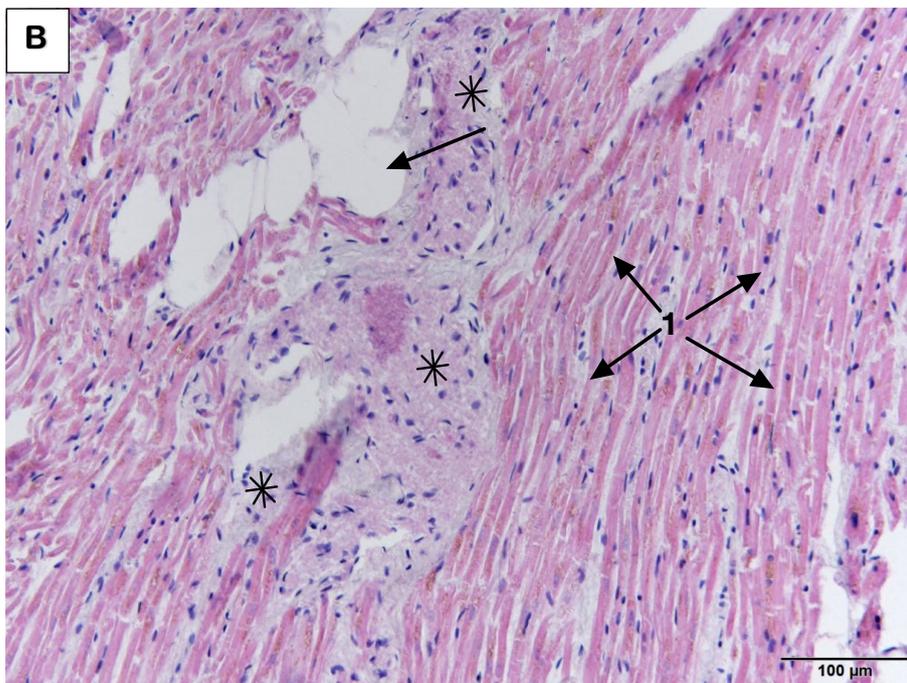
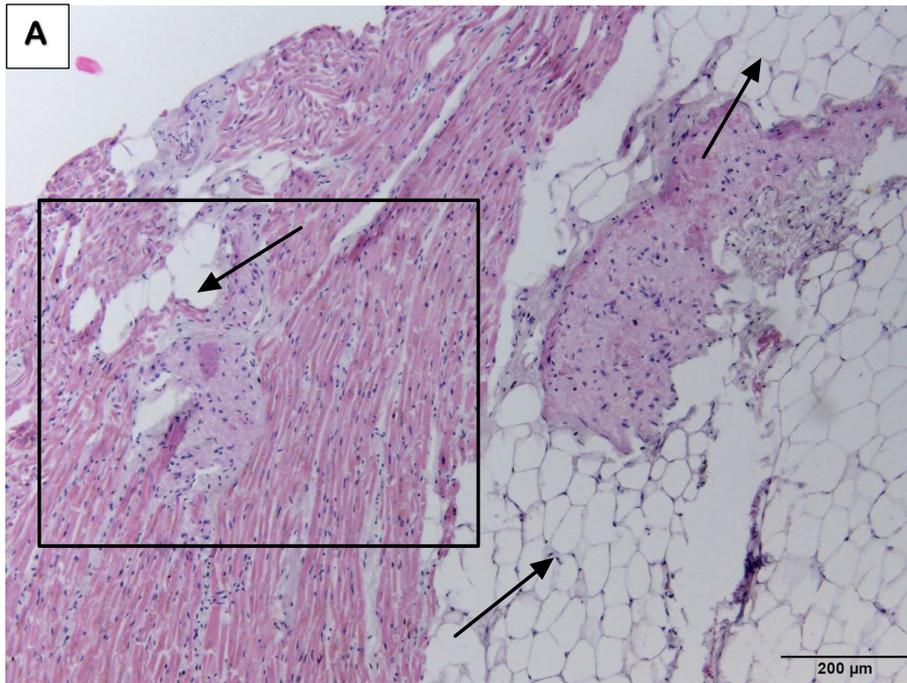


Abbildung 34 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 5 in einer HE-Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Pfeile markieren die ausgeprägte Verfettung des Moderatorbandes, wobei die Myokardarchitektur erhalten ist.

1 = Herzmuskelzellen, Sterne = Bindegewebsstränge

## **5.2 Immunhistochemie**

### **5.2.1 Verdünnungsreihe**

Um die optimale Konzentration des Primärantikörpers für die immunhistochemische Färbung der Schnitte zu finden, wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Hierfür wurden Serienschritte einer exemplarischen Probe (RAA Spender 4) mit einer immer stärkeren Verdünnung des Primärantikörpers gefärbt. Die verwendeten Konzentrationen betragen dabei 1:100 (siehe Abbildung 36), 1:250 (siehe Abbildung 37), 1:500 (siehe Abbildung 38) und 1:1000 (siehe Abbildung 39). Zudem wurde von der entsprechenden Schnittserie eine Negativkontrolle angefertigt (siehe Abbildung 35).

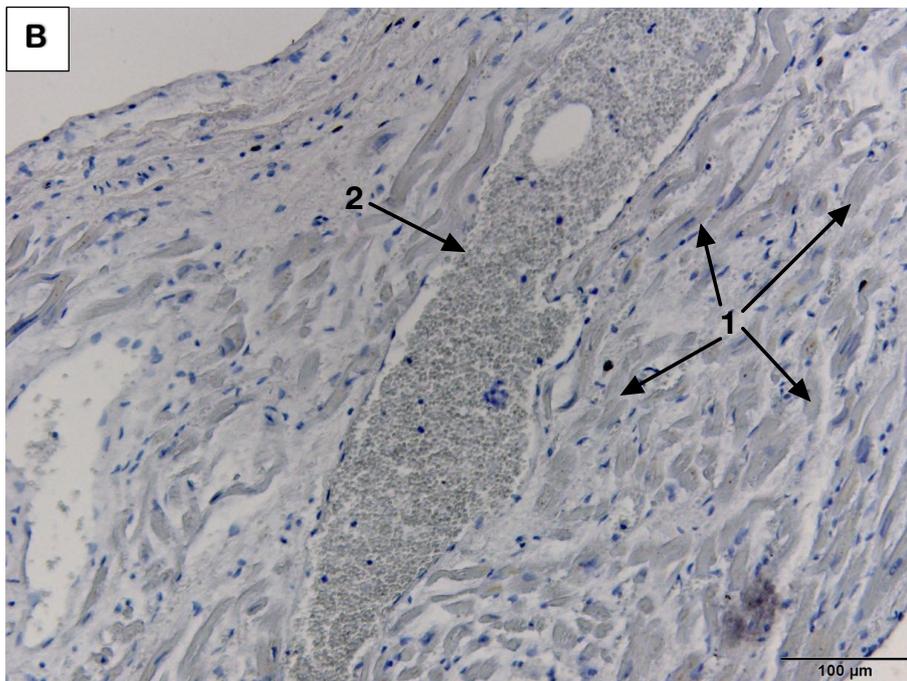
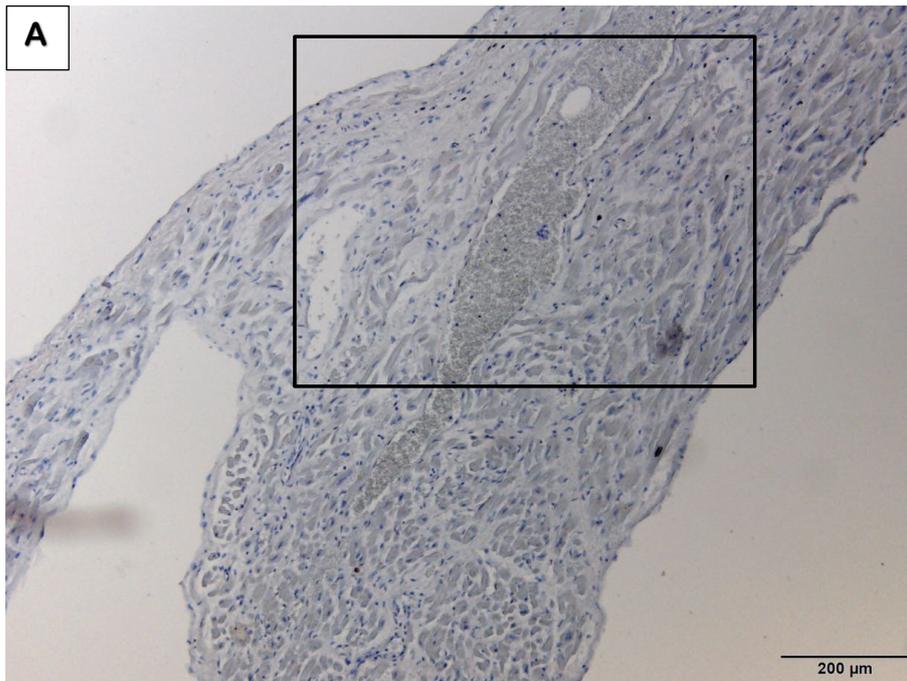


Abbildung 35 A, B: Verdünnungsreihe, Negativkontrolle

Negativkontrolle der Immunhistochemischen Färbung des rechten Herzohres des Spenders Nr. 4 in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Im gesamten Präparat ist kein positives Signal erkennbar, welches sich braun darstellen würde.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Gefäß mit Erythrozyten im Lumen

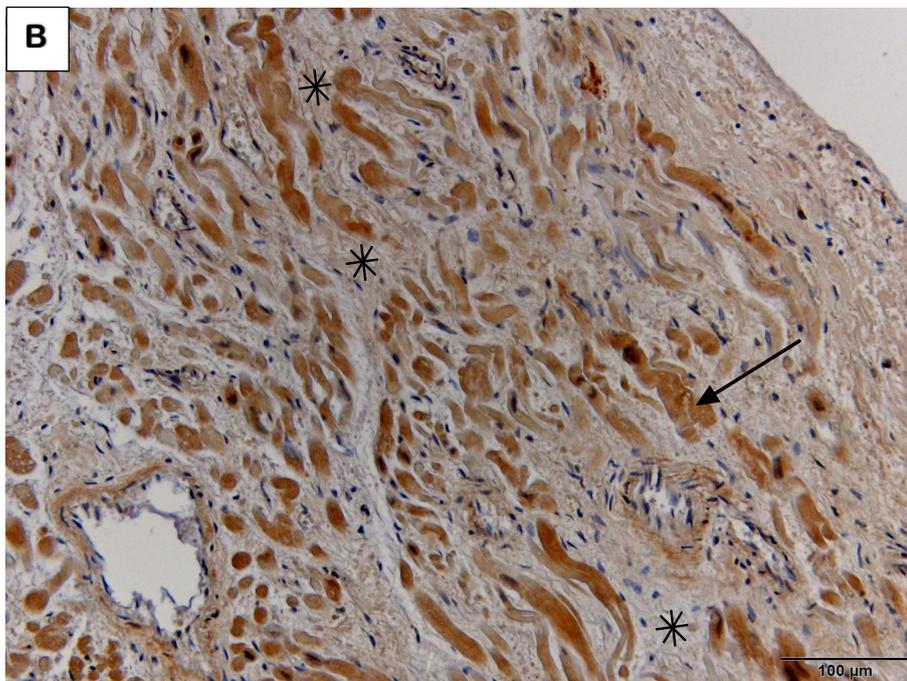
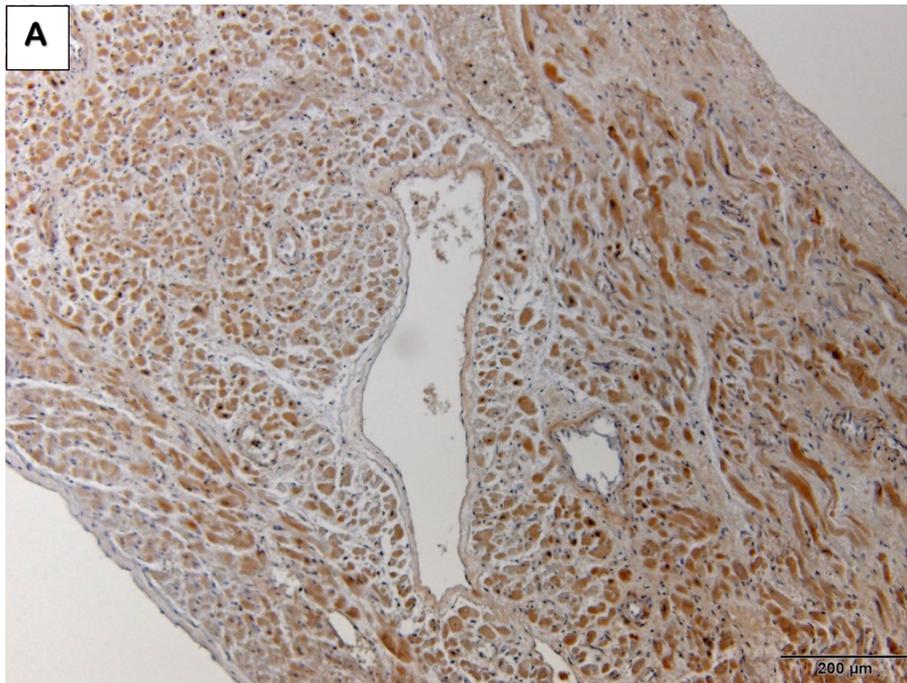
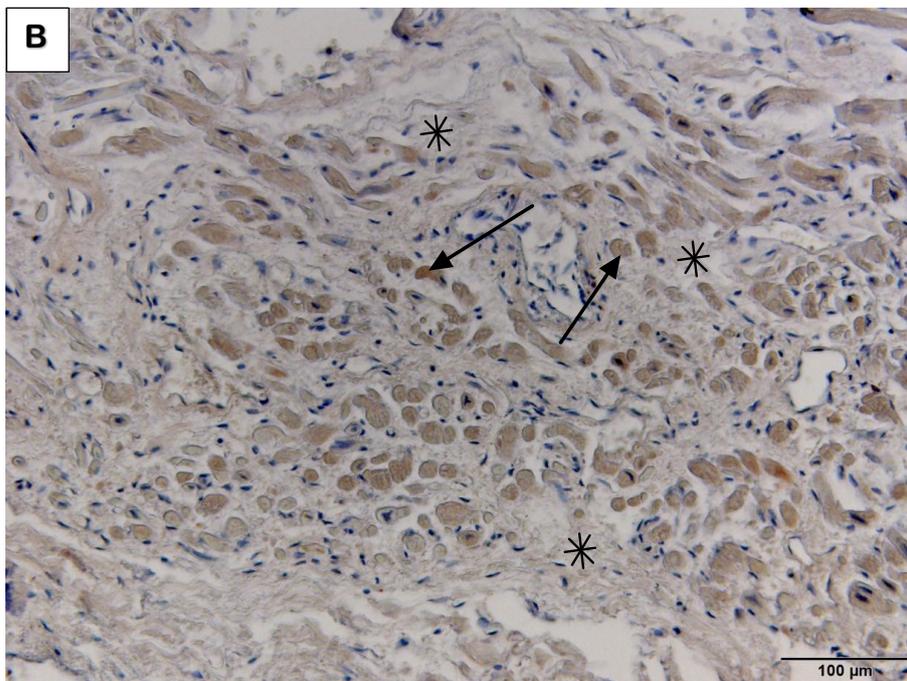
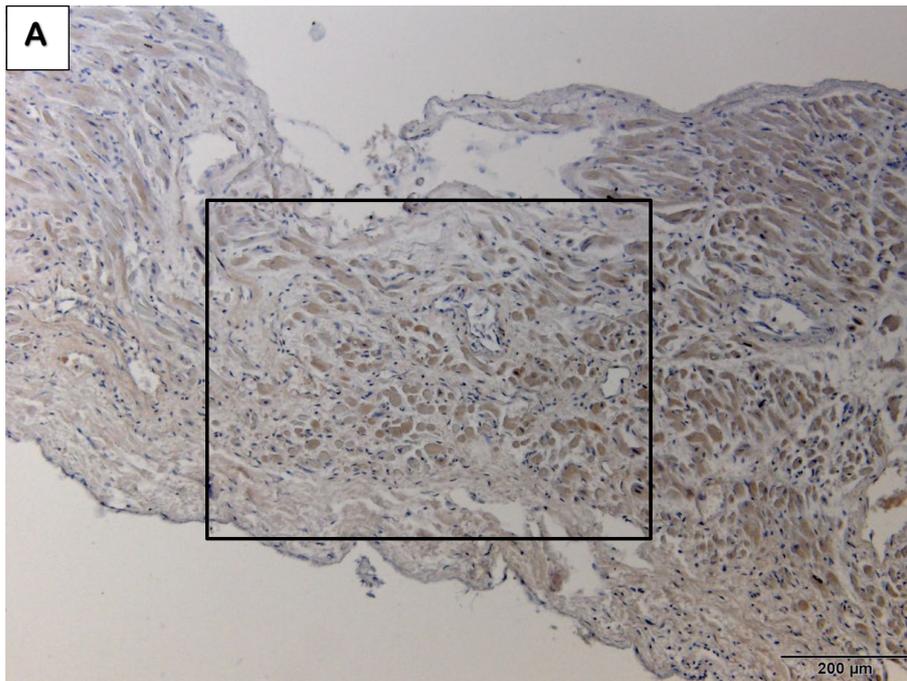


Abbildung 36 A, B: Verdünnungsreihe 1:100

Immunohistochemische Färbung des rechten Herzohres des Spenders Nr. 4 in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung, wobei der Primärantikörper auf 1:100 verdünnt wurde. Die Kardiomyozyten zeigen ein sehr stark positives (braunes) Signal, was exemplarisch mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Allerdings wurden auch TRPC6-negative Strukturen, wie beispielsweise Bindegewebsstränge, diffus braun angefärbt, was die Sterne markieren. Es

zeigt sich somit eine Überfärbung des Präparats, weshalb die Verdünnung des Antikörpers in diesem Fall nicht ausreichend hoch war.



*Abbildung 37 A, B: Verdünnungsreihe 1:250*

Immunohistochemische Färbung des rechten Herzohres des Spenders Nr. 4 in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung, wobei der Primärantikörper auf 1:250 verdünnt wurde. Auch in dieser Konzentration ist ein deutliches Braunsignal der Herzmuskelzellen erkennbar, was die Pfeile exemplarisch markieren. Die Sterne kennzeichnen beispielhaft das umliegende Bindegewebe, welches keine Braunfärbung aufweist, und somit TRPC6-negativ ist. Die Verdünnung 1:250 erwies sich somit als optimal.

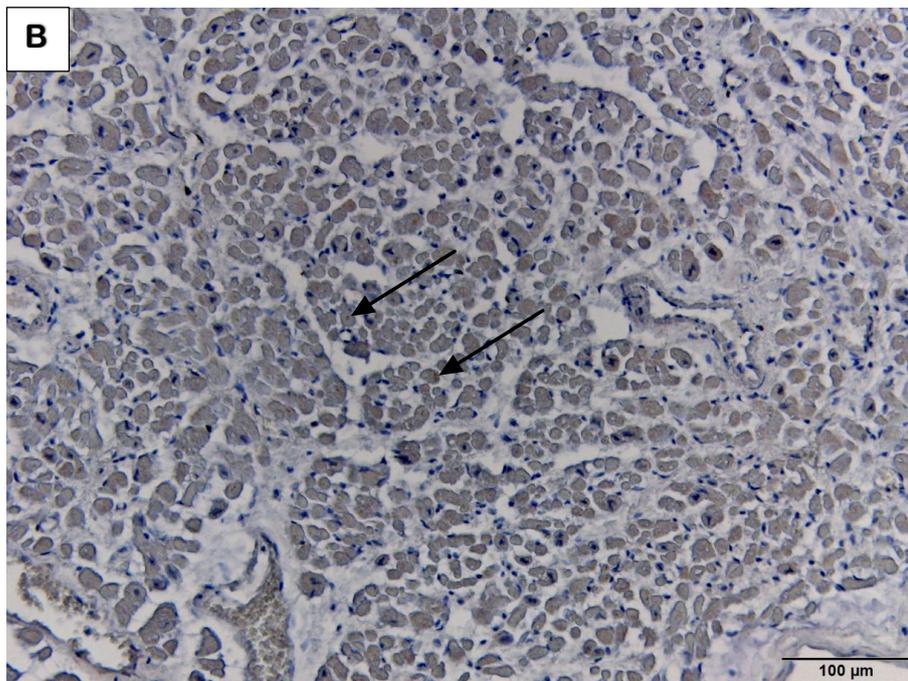
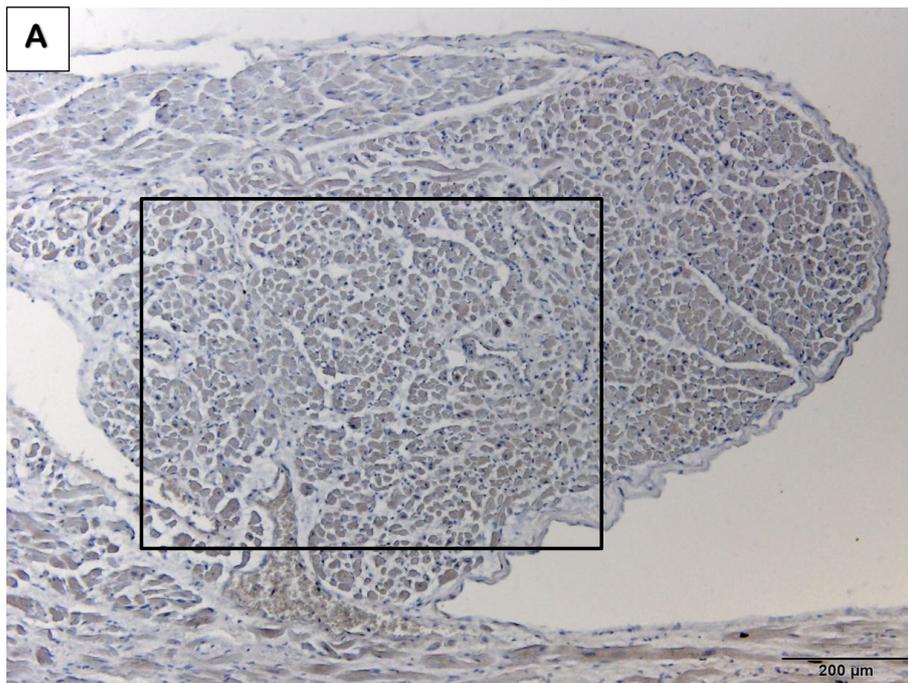


Abbildung 38 A, B: Verdünnungsreihe 1:500

Immunhistochemische Färbung des rechten Herzohres des Spenders Nr. 4 in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung, wobei der Primärantikörper auf 1:500 verdünnt wurde. Es sind nur noch vereinzelt schwach-positive Signale in den Kardiomyozyten erkennbar, wobei zwei stellvertretend mit Pfeilen gekennzeichnet werden. Die Verdünnung des Primärantikörpers ist somit zu hoch.

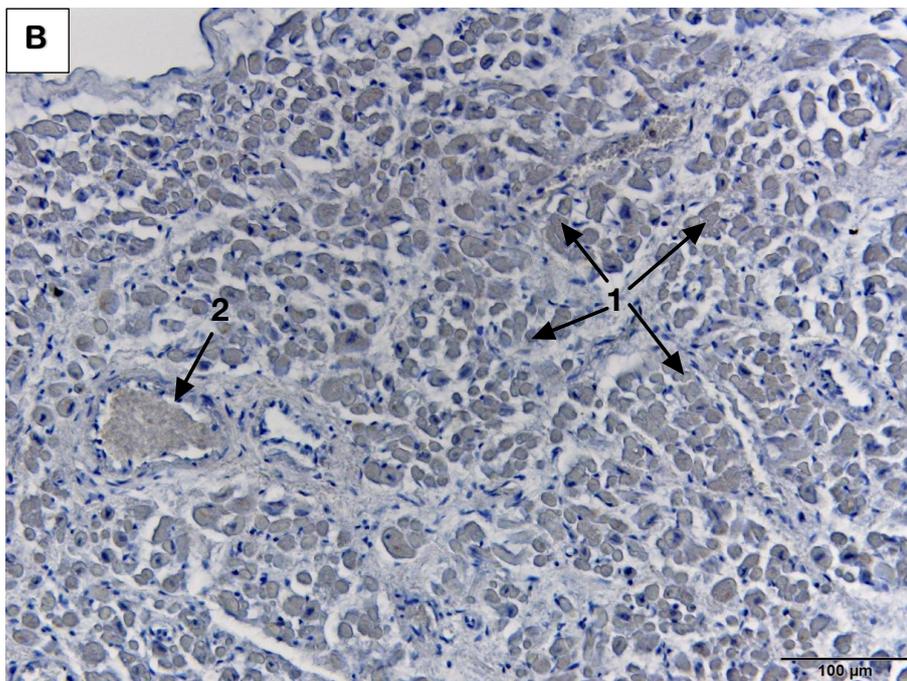
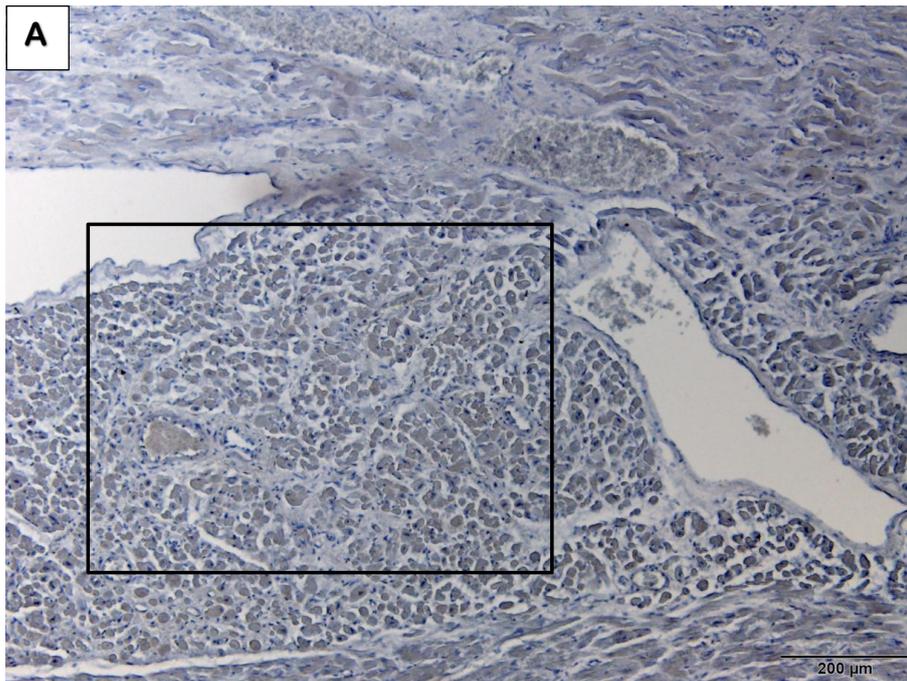


Abbildung 39 A, B: Verdünnungsreihe 1:1000

Immunhistochemische Färbung des rechten Herzohres des Spenders Nr. 4 in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung, wobei der Primärantikörper auf 1:1000 verdünnt wurde. Die Herzmuskelzellen in diesem Präparat zeigen so gut wie keine braune Anfärbung mehr, das Präparat ähnelt insgesamt sehr stark der Negativkontrolle. Der Antikörper wurde dementsprechend deutlich zu stark verdünnt.

1 = Herzmuskelzellen, 2 = Gefäß mit Erythrozyten im Lumen

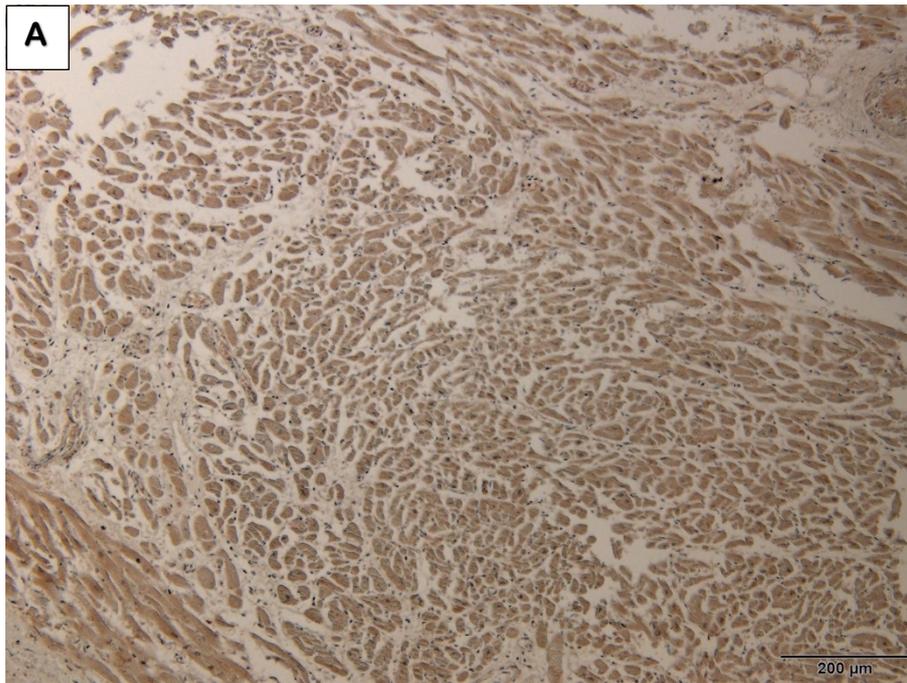
### **5.2.2 Allgemeine Beschreibung der immunhistochemischen Färbung**

In den Kardiomyozyten zeigte sich ein deutliches, homogenes Signal, wohingegen das dazwischen liegende Bindegewebe augenscheinlich keine TRPC6-Expression aufweist. Diese Befunde sind in Abbildung 40 dargestellt.

Das Endokard wies eine TRPC6-Exprimierung in der immunhistochemischen Färbung auf, wie in Abbildung 41 gezeigt wird.

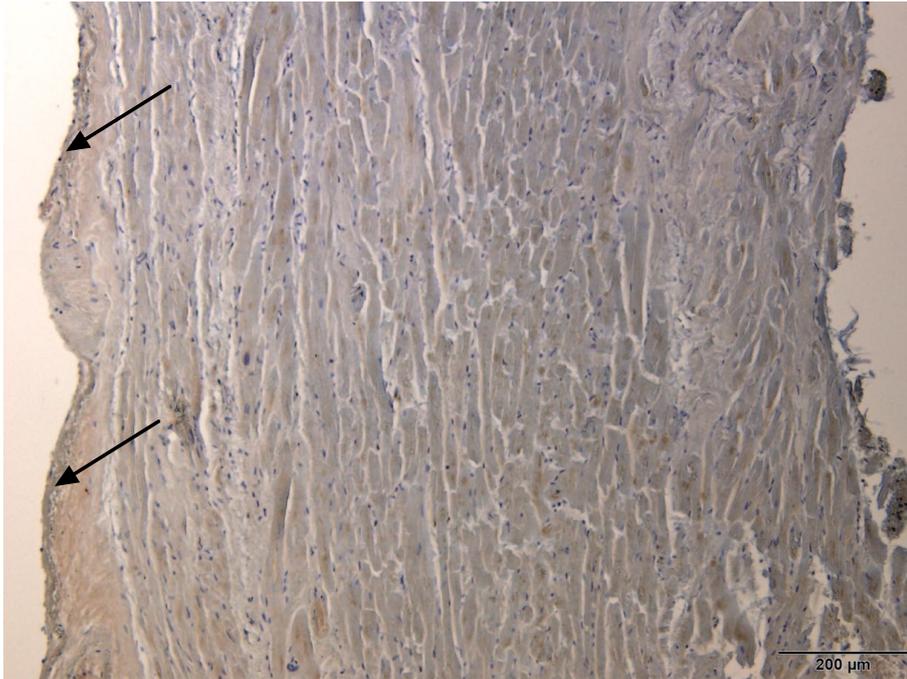
Im Fettgewebe der Proben zeigte sich kein Signal, wohingegen die Nervenzellkörper eines zufällig im subepikardialen Fettgewebe entdeckten parasympathischen Ganglions eine deutliche TRPC6-Expression aufweisen (siehe Abbildung 42).

In Gefäßen, sowohl in den kleinen Gefäßen im Myokard (siehe Abbildung 43) als auch in der Pulmonalvene (siehe Abbildung 44), konnte TRPC6 mittels der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden.



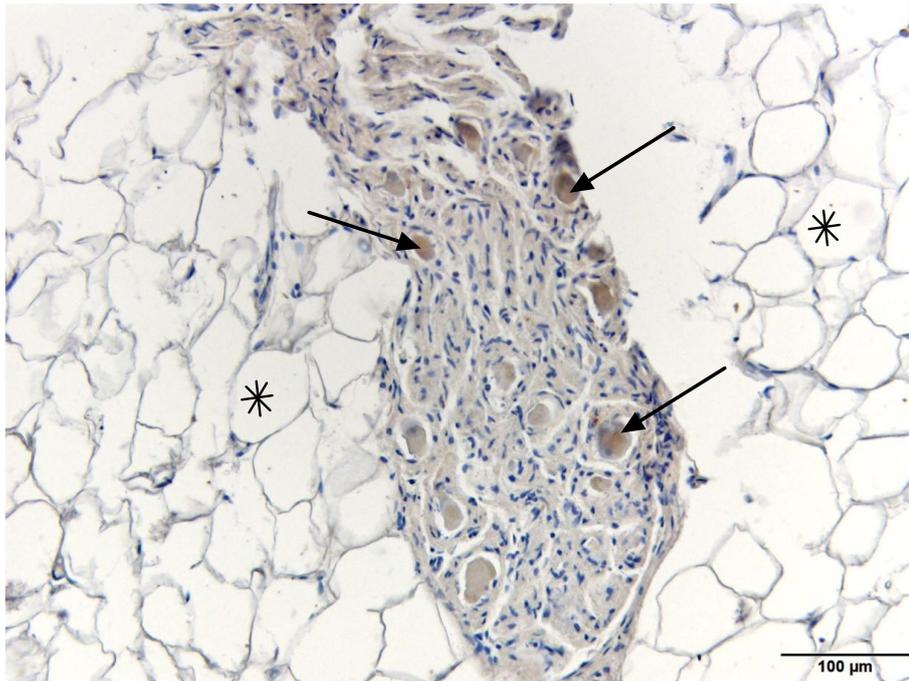
*Abbildung 40 A, B: Signal in den Kardiomyozyten, kein Signal im Bindegewebe*

Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 4 in einer immunhistochemischen Färbung in 100- (A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die Pfeile markieren beispielhaft die braunen Signale in den TRPC6-positiven Herzmuskelzellen, welche in den exemplarisch mit Stern gekennzeichneten septierenden Bindegewebssträngen fehlen. Diese erscheinen hell.



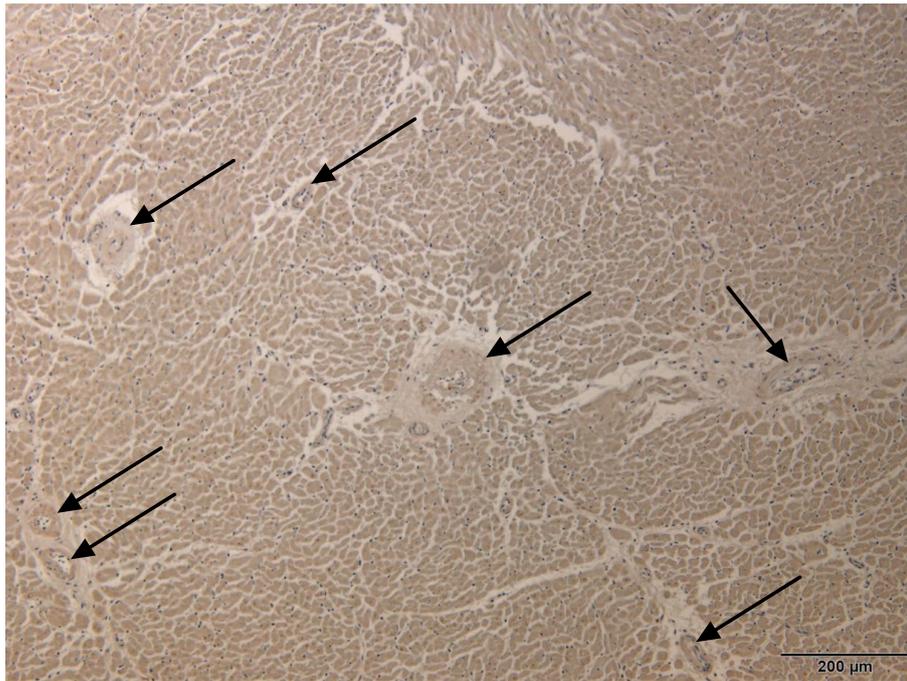
*Abbildung 41: Signal im Endokard*

Pars muscularis des interventrikulären Septums des Spenders Nr. 5 in 100-facher Vergrößerung in einer immunhistochemischen Färbung. Die Pfeile markieren das Endokard, welches genau wie die Kardiomyozyten TRPC6-positiv ist.



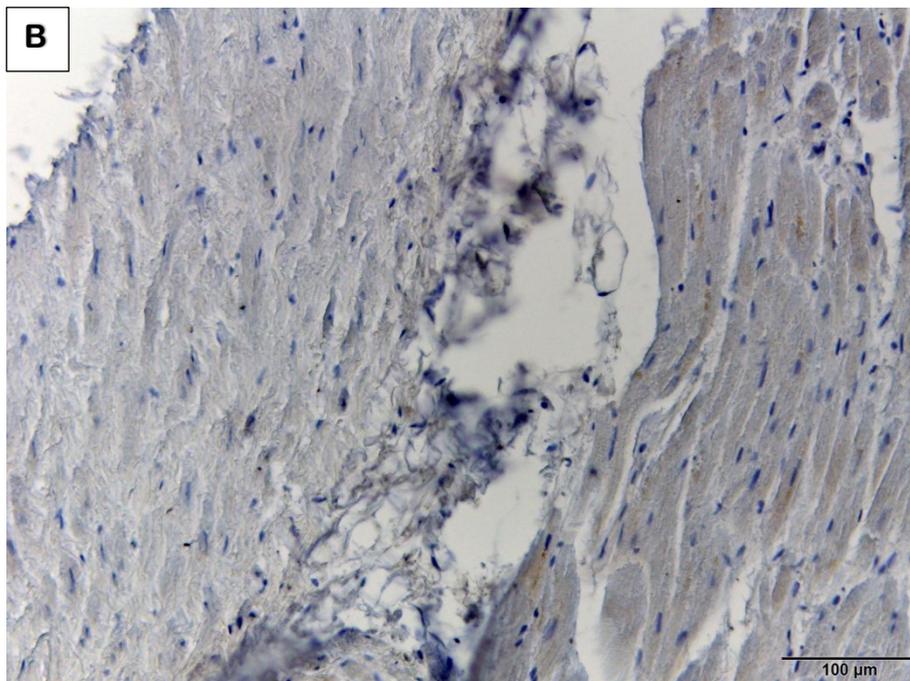
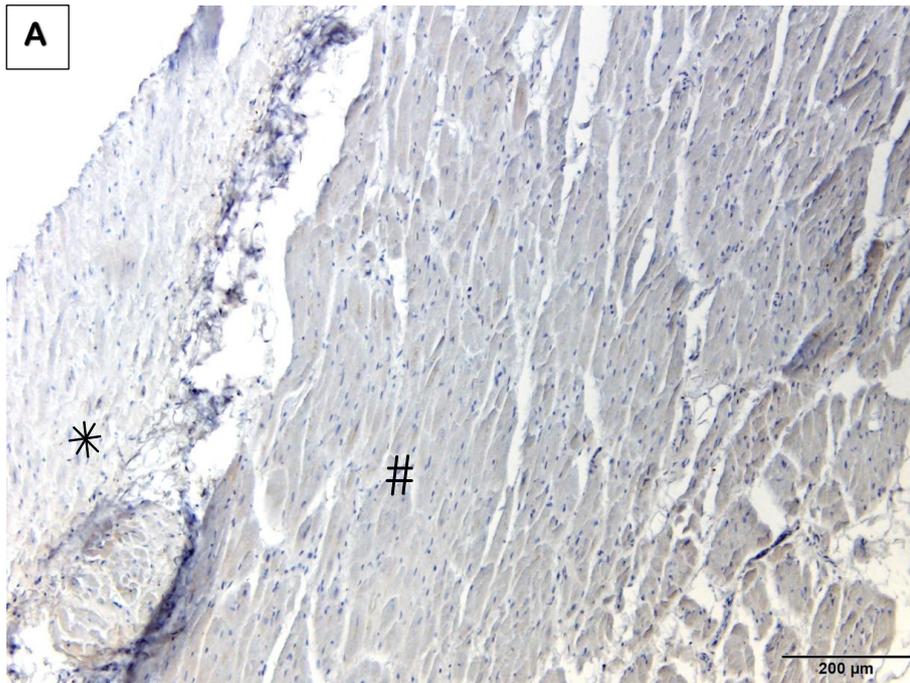
*Abbildung 42: Kein Signal im Fettgewebe, Signal in Nervenzellkörpern*

Zufallsbefund eines Parasympathischen Ganglions im subepikardialen Fett des Übergangsbereichs der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders Nr. 5 in einer immunhistochemischen Färbung in 200-facher Vergrößerung. Das Fettgewebe, welches mit Sternen exemplarisch markiert ist, weist keinerlei Signal auf. Die Nervenzellkörper des Ganglions hingegen sind deutlich TRPC6-positiv, wobei einige mit Pfeilen markiert werden.



*Abbildung 43: Signal in kleinen Gefäßen im Myokard*

Trabecula Septomarginalis des Spenders Nr. 1 in einer immunhistochemischen Färbung in 100- (A) facher Vergrößerung. Die Pfeile im Bild markieren kleinere Gefäße, die sich im Myokard befinden. Die Gefäßwand weist dabei ein positives Signal auf.



*Abbildung 44 A, B: Pulmonalvene (Spender 5) in immunhistochemischer Färbung*

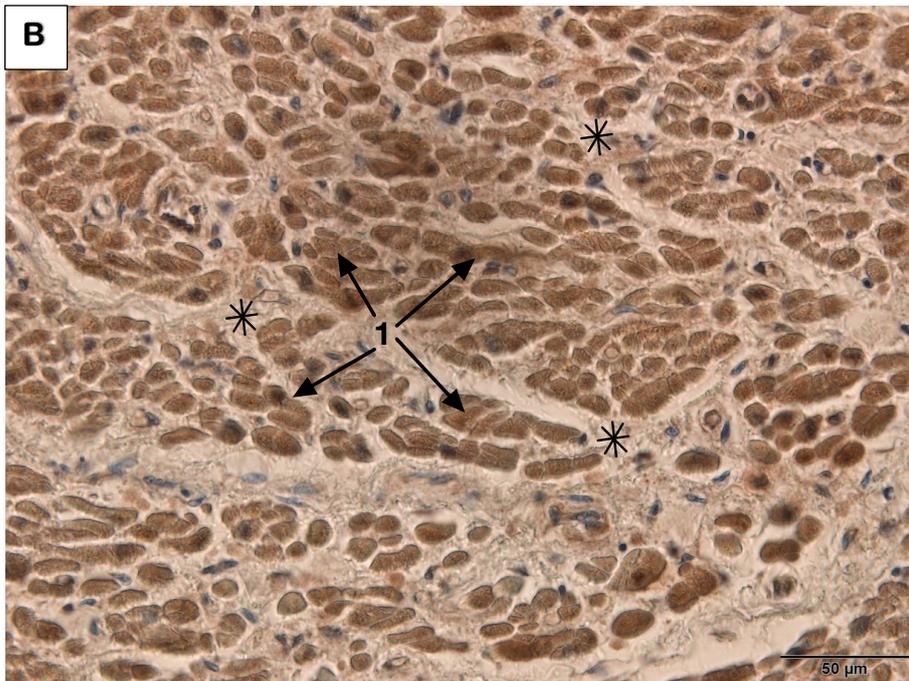
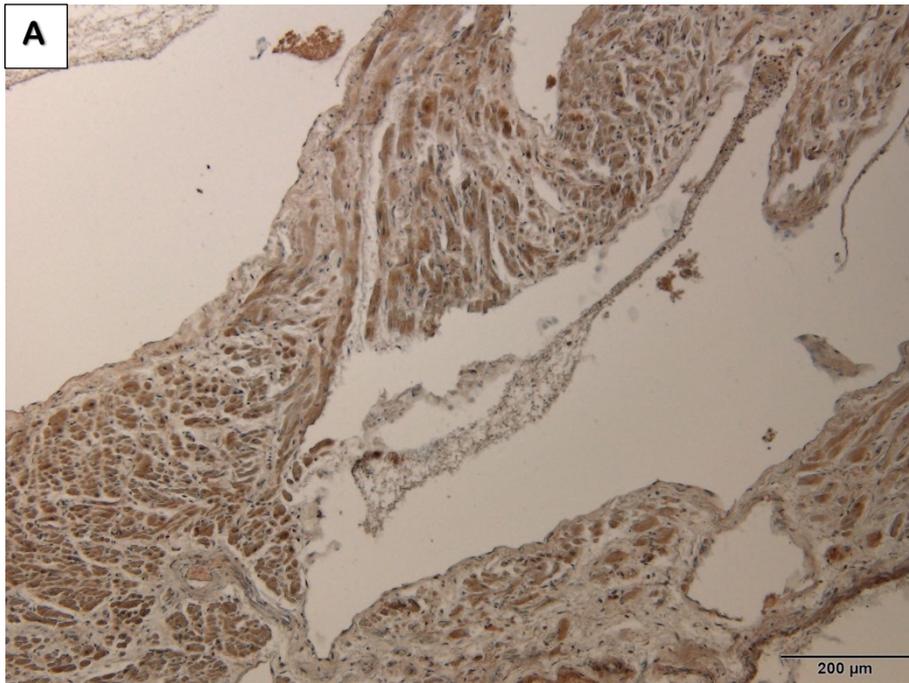
Übergang der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof des Spenders Nr. 5 in einer immunhistochemischen Färbung in 100- (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Die Wand der Pulmonalvene (Stern) zeigt ein braunes Signal, welches allerdings schwächer ist als das des Myokards (Raute).

### **5.2.3 Vergleich Vorhof und Kammer**

Mittels der ausgewählten Proben kann ein Vergleich der TRPC6-Expression in den Herzmuskelzellen zwischen Vorhof und Kammer des Herzens gezogen werden. Hierbei wird das Atrium durch das rechte Herzohr und den Übergangsbereich der linken unteren Pulmonalvene auf den linken Vorhof repräsentiert. Die Analyse der TRPC6-Expression in der Kammer erfolgte anhand des linken anterioren Papillarmuskels, des muskulären Anteils des interventrikulären Septums und der Trabecula septomarginalis. Es konnte dabei kein morphologisch fassbarer Unterschied im Hinblick auf die Verteilung von TRPC6 im Herzen nachgewiesen werden.

#### **5.2.3.1 Vorhof**

Sowohl die Kardiomyozyten des rechte Herzohrs (siehe Abbildung 45) als auch solche im linken Vorhof (siehe Abbildung 46 und Abbildung 47) zeigten deutliche braune Signale.



*Abbildung 45A, B: Rechtes Herzohr (Spender 2) in immunhistochemischer Färbung*

Rechtes Herzohr des Spenders Nr. 2 in einer immunhistochemischen Färbung in 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die Herzmuskelzellen sind deutlich braun gefärbt und somit TRPC6-positiv.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen, Sterne = TRPC6-negative Bindegewebsstränge

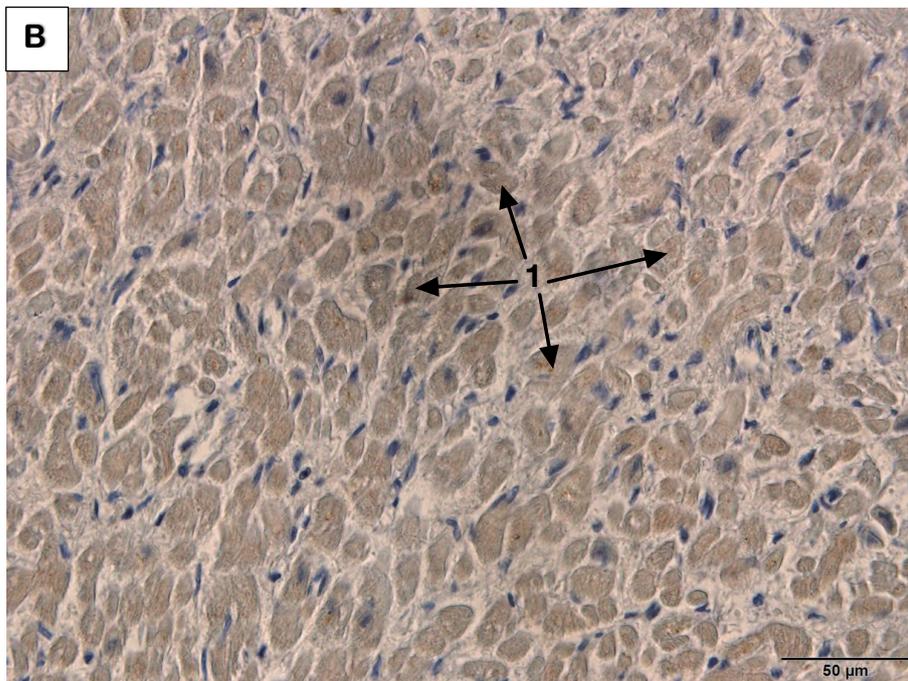
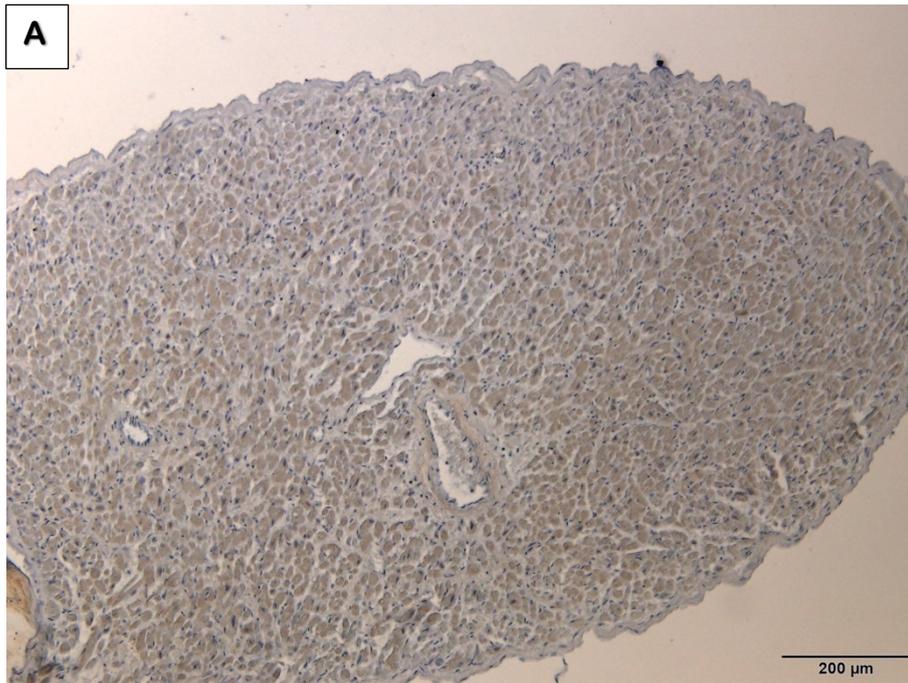
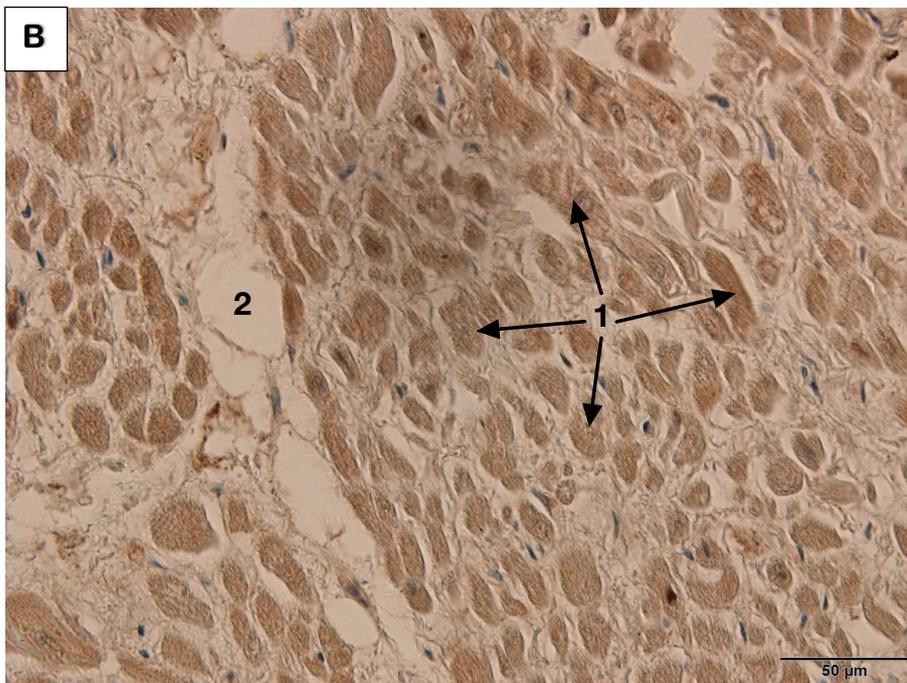
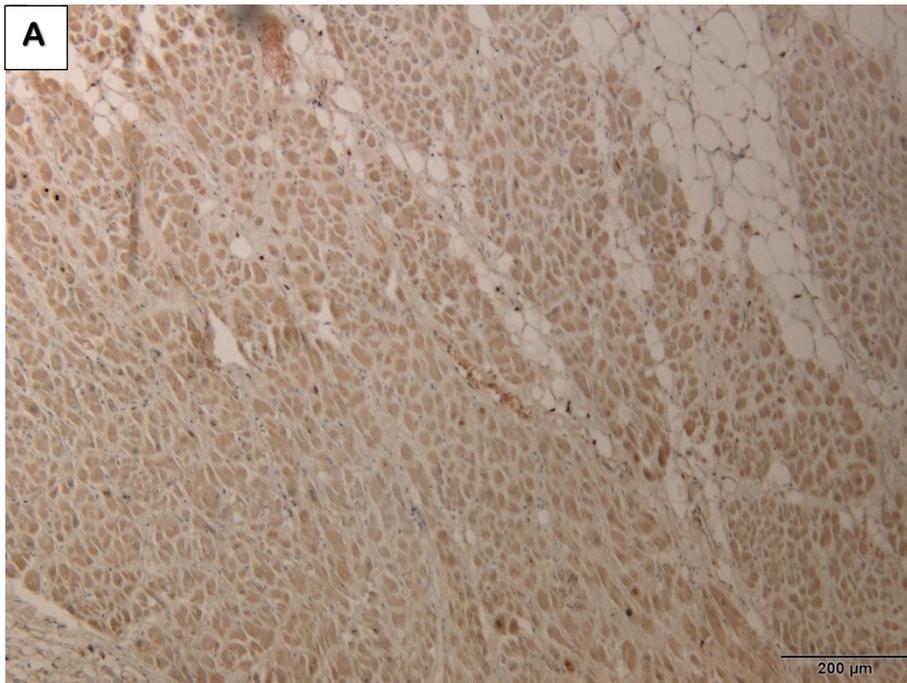


Abbildung 46 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 4) in immunhistochemischer Färbung

Rechtes Herzohr des Spenders Nr. 4 in einer immunhistochemischen Färbung in 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Das Myokard zeigt eindeutig braune Signale.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen



*Abbildung 47 A, B: Myokard linker Vorhof (Spender 3) in immunohistochemischer Färbung*

Myokard des linken Vorhofs im Bereich des Übergangs der linken unteren Pulmonalvene auf das Atrium des Spenders Nr. 3 in einer immunohistochemischen Färbung in 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die Kardiomyozyten sind deutlich braun angefärbt.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen, 2 = TRPC6-negatives Fettgewebe

### **5.2.3.2 Kammer**

Bei allen untersuchten Proben, welche aus dem Bereich der Herzkammern entnommen wurden, konnte eine deutliche TRPC6-Expression festgestellt werden. Dies wird in Abbildung 48, Abbildung 49 und Abbildung 50 dargestellt.

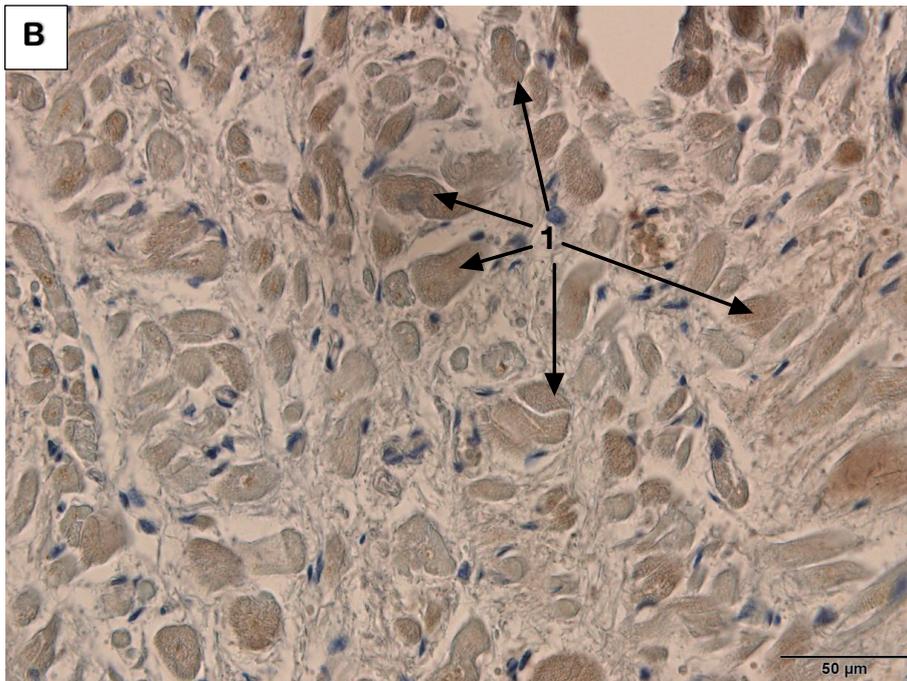
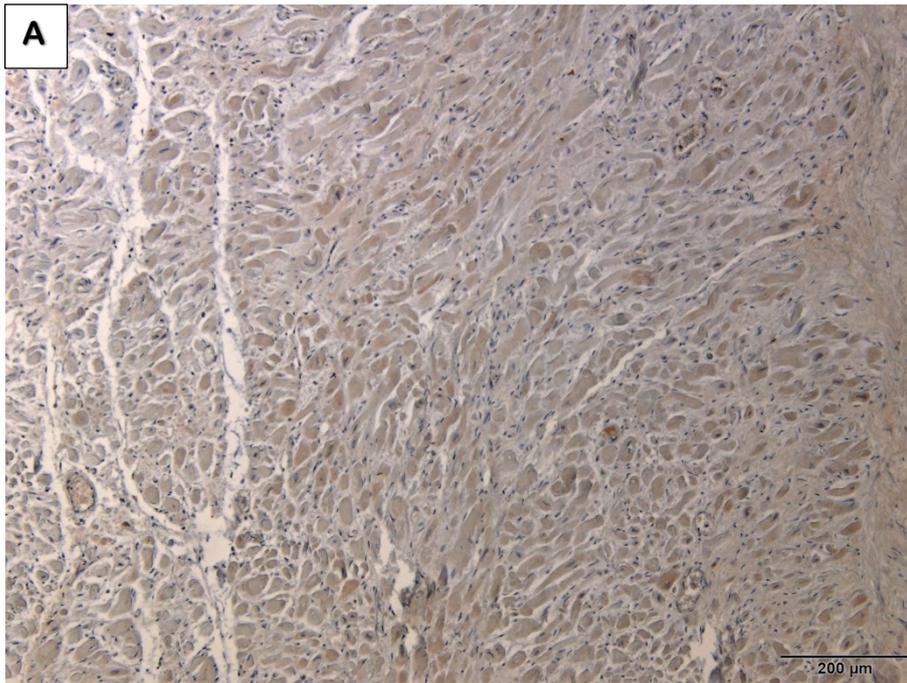


Abbildung 48 A, B: Pars muscularis des interventrikulären Septums (Spender 2) in immunhistochemischer Färbung

Pars muscularis des interventrikulären Septums des Spenders Nr. 2 in einer immunhistochemischen Färbung in 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die Herzmuskelzellen sind kräftig braun gefärbt.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen

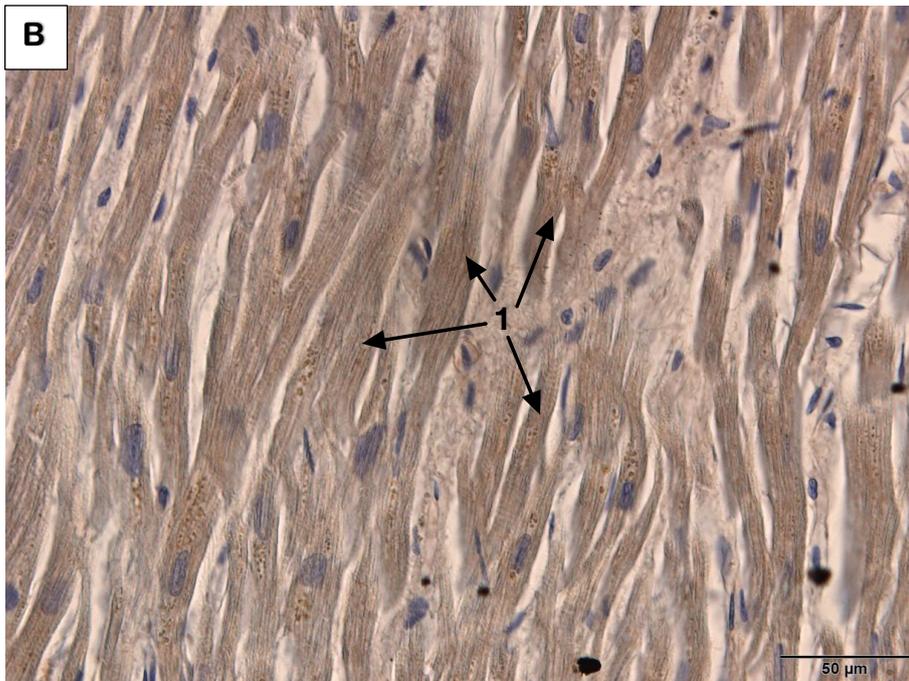
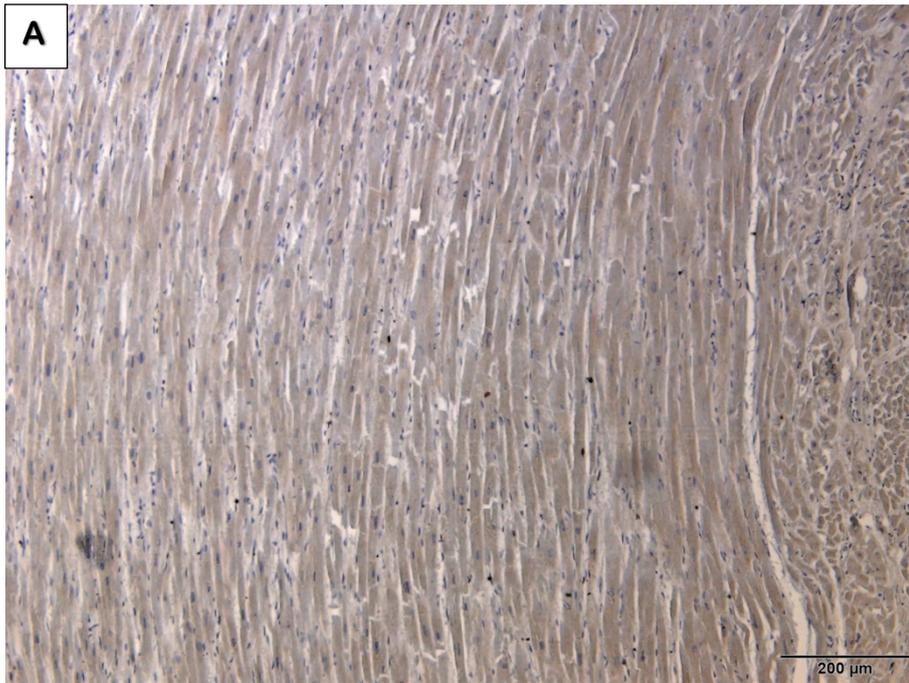
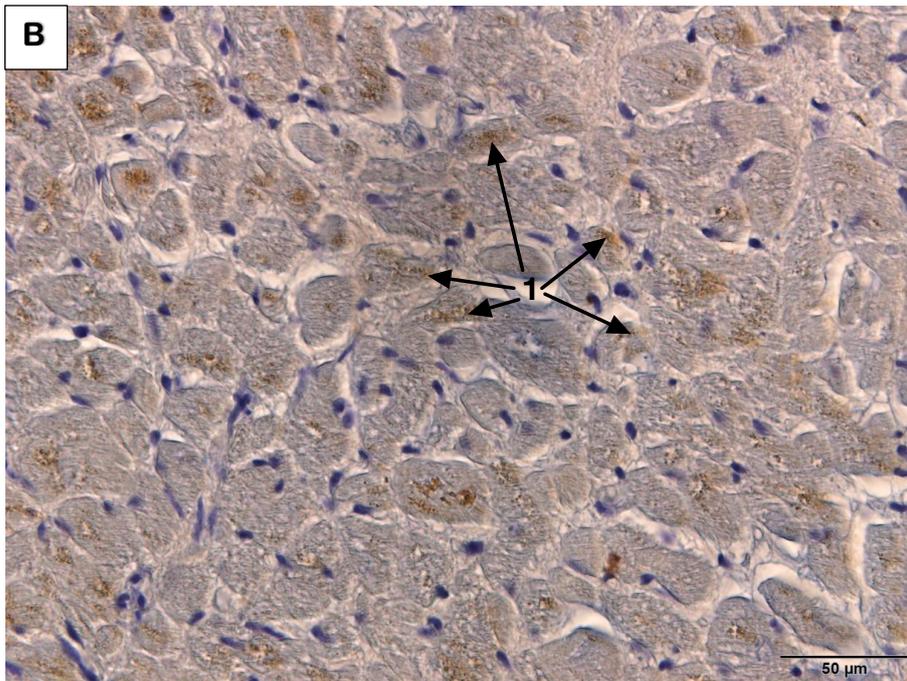
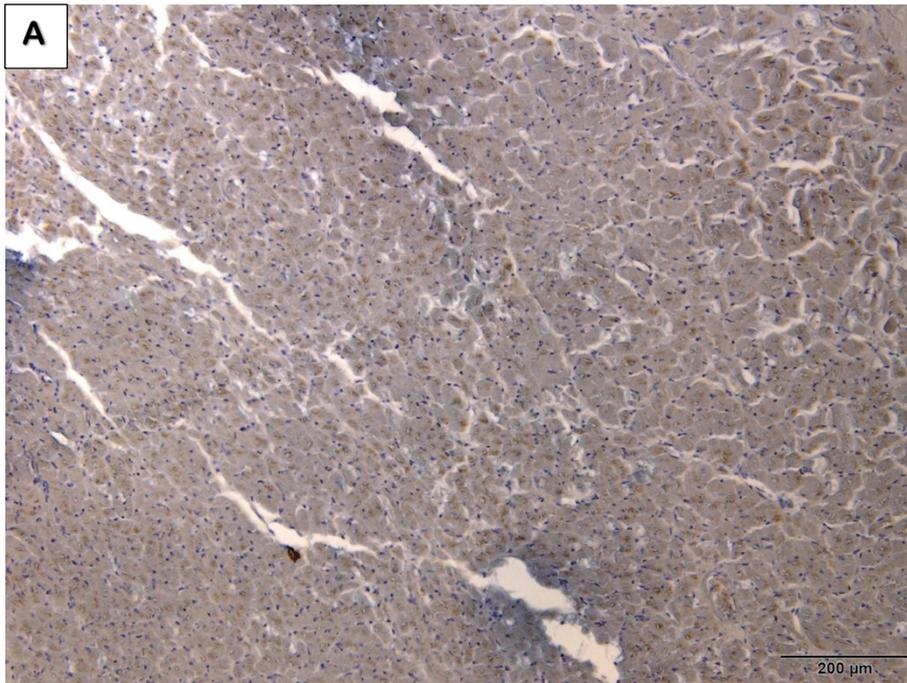


Abbildung 49 A, B: Trabecula septomarginalis (Spender 3) in immunohistochemischer Färbung  
 Trabecula septomarginalis des Spenders Nr. 3 in einer immunohistochemischen Färbung in  
 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Das Myokard weist eine deutliche TRPC6-  
 Expression auf.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen



*Abbildung 50 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 5) in immunhistochemischer Färbung*  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 5 in einer immunhistochemischen Färbung in 100- (A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Eine Braun-Färbung des Gewebes ist erkennbar.

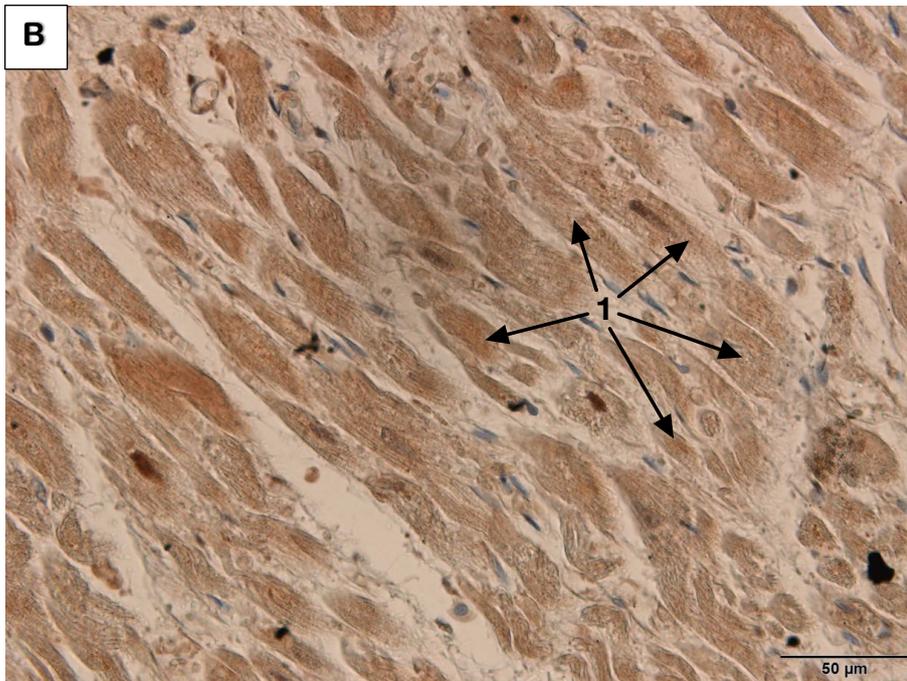
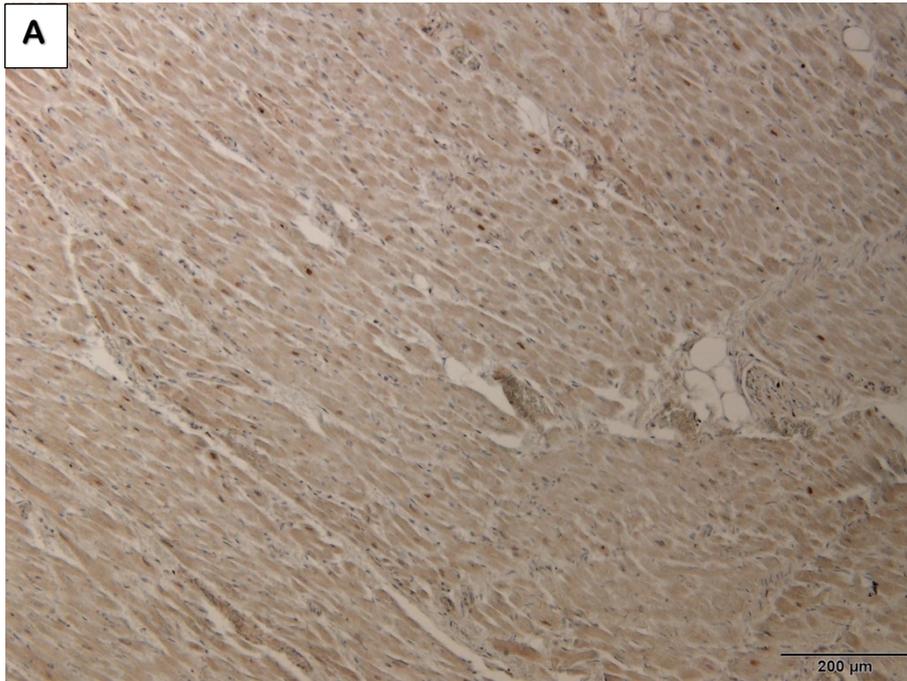
1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen

#### **5.2.4 Vergleich linkes und rechtes Herz**

Ein Vergleich der TRPC6-Expression im linken Vorhofmyokard im Übergangsbereich auf die linke untere Pulmonalvene und dem linken anterioren Papillarmuskel mit der Expression des Proteins im rechten Herzohr und der Trabecula septomarginalis ermöglichte einen Vergleich zwischen linkem und rechtem Herz. Hierbei zeigte sich kein morphologisch fassbarer Unterschied in der Menge der vorhandenen Kationen-Kanäle.

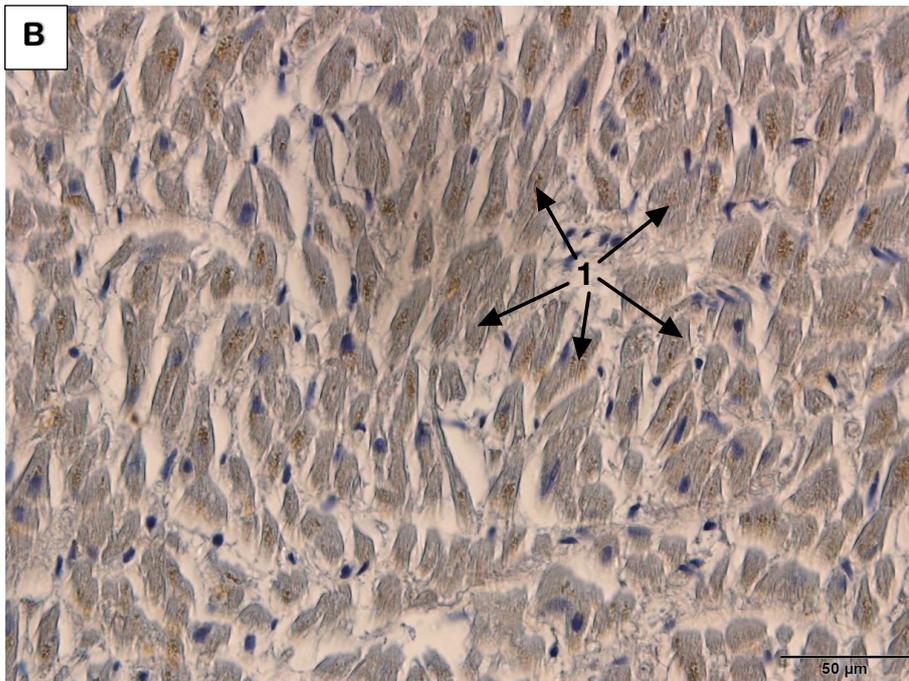
##### **5.2.4.1 Linkes Herz**

Das Myokard des linken Herzens zeigte, sowohl im Vorhof (siehe Abbildung 51) als auch in der Kammer (siehe Abbildung 52), eine deutliche Expression von TRPC6.



*Abbildung 51 A, B: Myokard linker Vorhof (Spender 4) in immunhistochemischer Färbung*  
 Myokard des linken Vorhofs im Bereich des Übergangs der linken unteren Pulmonalvene  
 auf das Atrium des Spenders Nr. 4 in einer immunhistochemischen Färbung in 100-(A) und  
 400-facher (B) Vergrößerung. Die Herzmuskelzellen sind deutlich braun angefärbt.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen

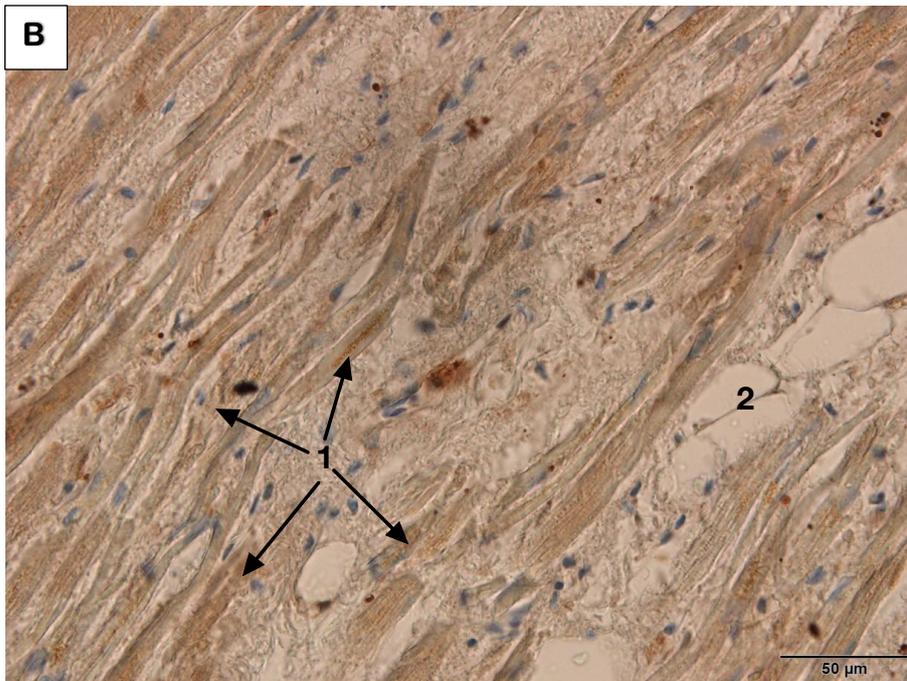
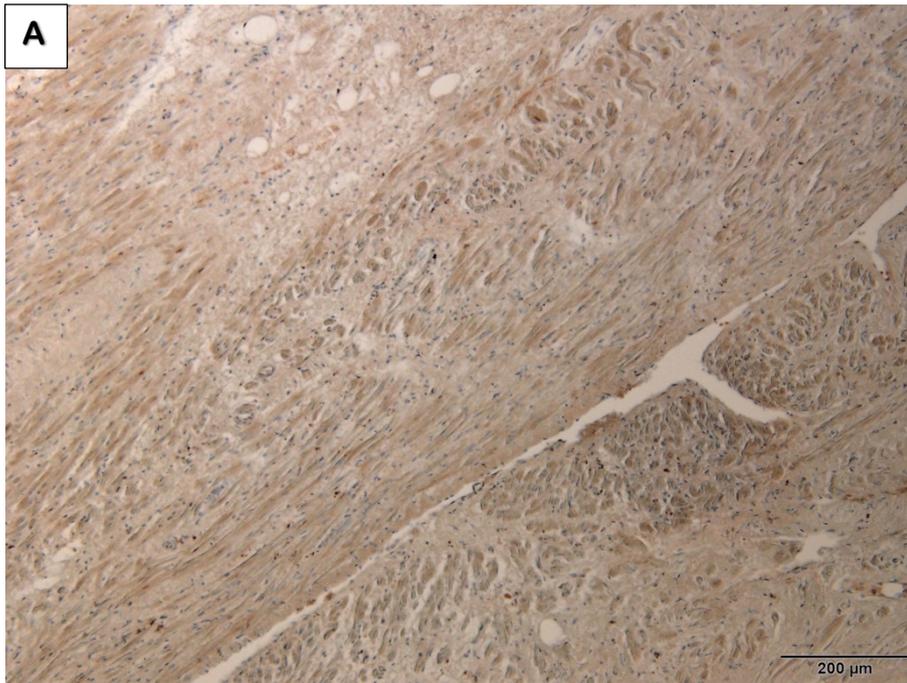


*Abbildung 52 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 1) in immunohistochemischer Färbung*  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 1 in einer immunohistochemischen Färbung in 100- (A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die braunen Signale in den Kardiomyozyten sind erkennbar.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen

#### **5.2.4.2 Rechtes Herz**

Das Myokard in den Proben aus dem rechten Herzen erwies sich insgesamt als TRPC6-positiv (siehe Abbildung 53 und Abbildung 54).



*Abbildung 53 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 1) in immunohistochemischer Färbung*

Rechtes Herzohr des Spenders Nr. 1 in einer immunohistochemischen Färbung in 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die Herzmuskelzellen sind deutlich braun angefärbt.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen, 2 = TRPC6-negatives Fettgewebe

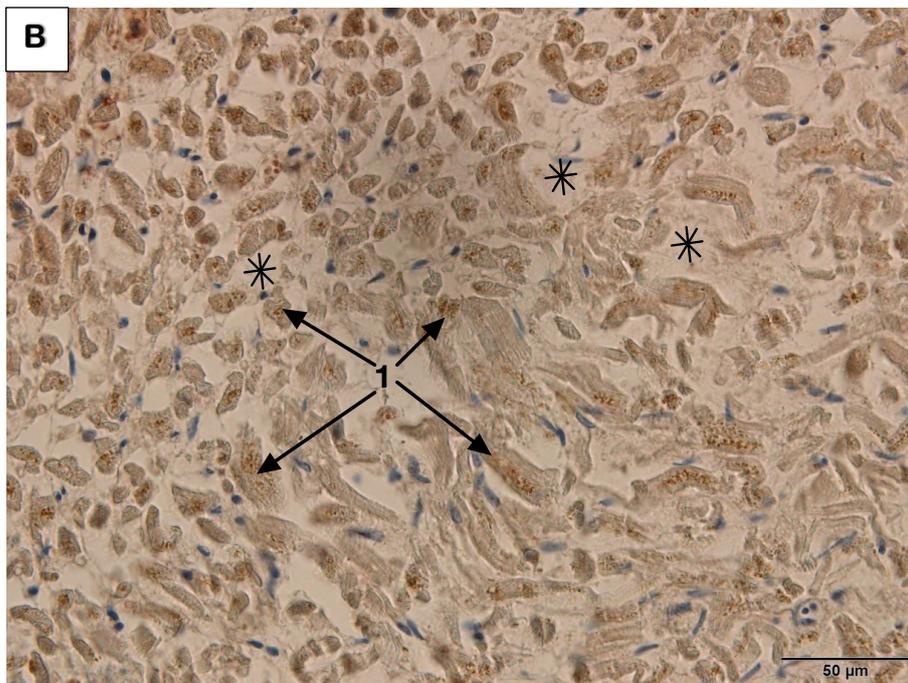
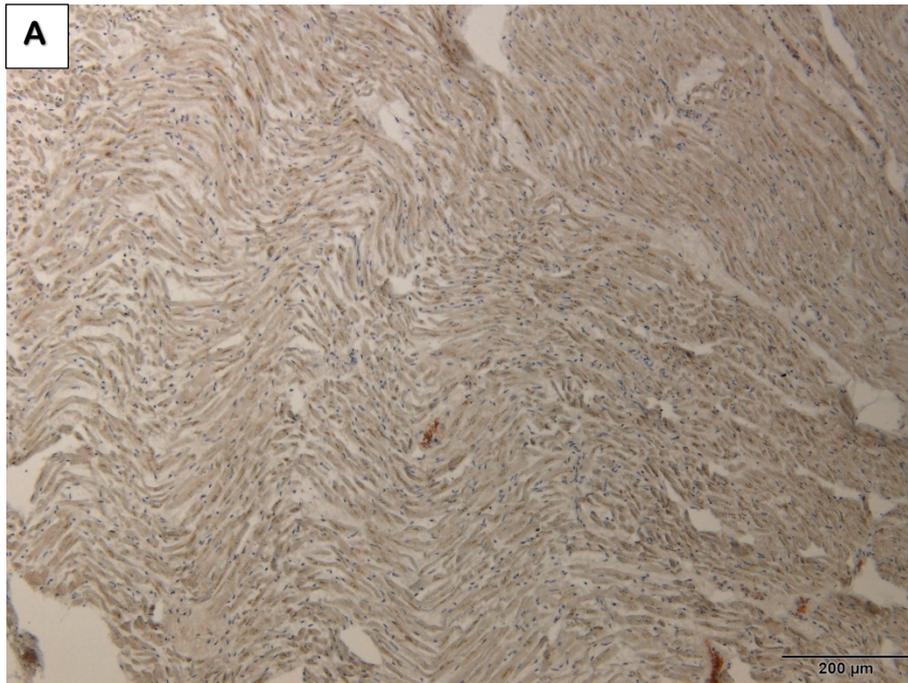


Abbildung 54 A, B: Trabecula septomarginalis (Spender 5) in immunohistochemischer Färbung  
 Trabecula septomarginalis des Spenders Nr. 5 in einer immunohistochemischen Färbung in  
 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Das Myokard weist eine deutliche TRPC6-  
 Expression auf.

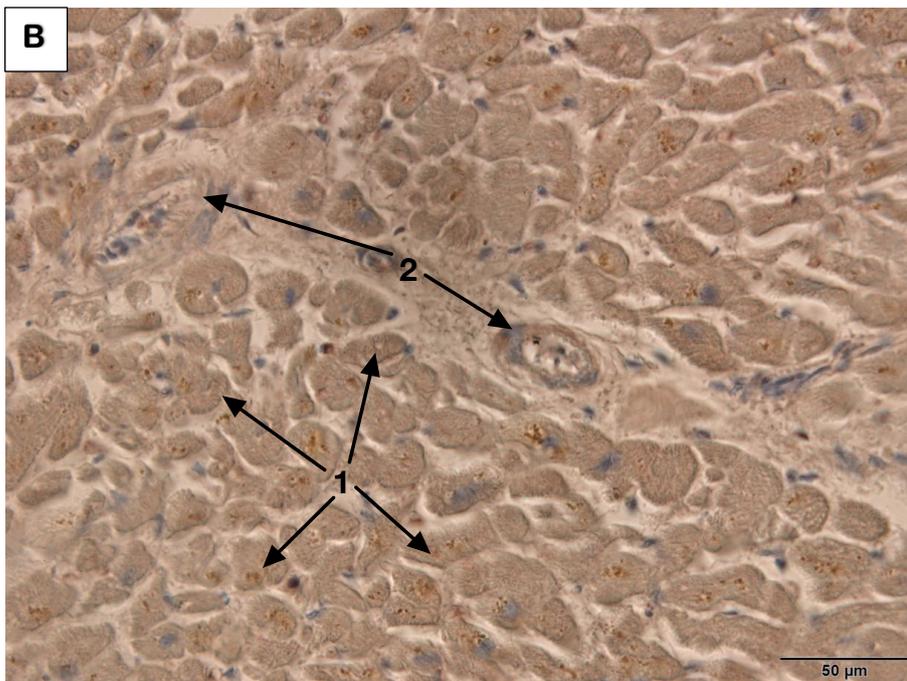
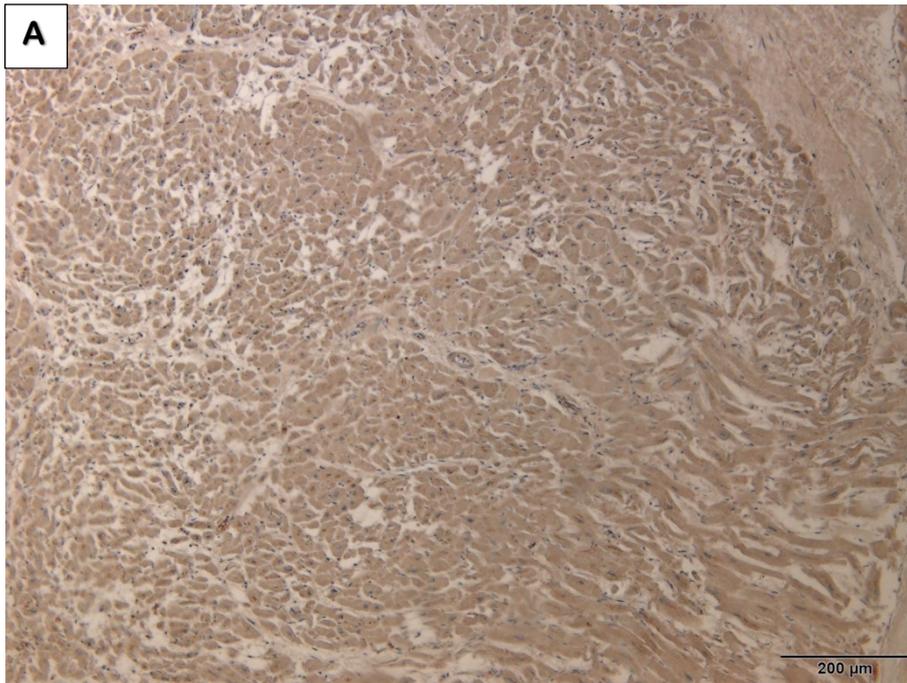
1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen, Sterne = TRPC6-negative Bindegewebsstränge

### **5.2.5 Vergleich ventrikulär septale und nicht-septale Muskulatur**

Die Gegenüberstellung der TRPC6-Exprimierung von muskulärem Anteil des interventrikulären Septums und dem Myokard der Kammern zeigte trotz der unterschiedlichen Aufgaben dieser Herzanteile keine morphologisch fassbaren Unterschiede.

#### **5.2.5.1 Ventrikulär septale Muskulatur**

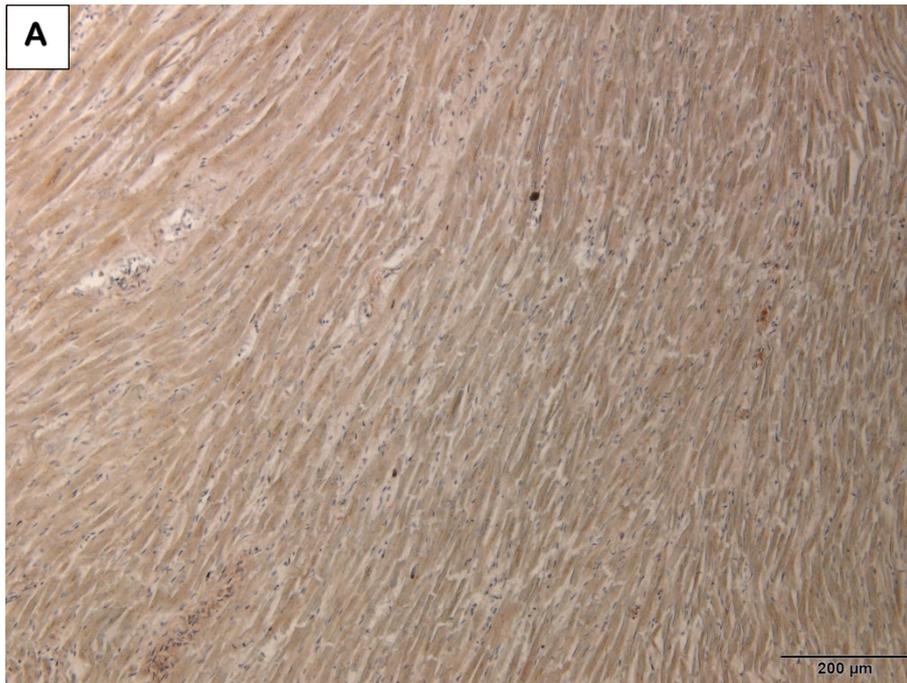
Die pars muscularis des interventrikulären Septums erwies sich als TRPC6-positiv, was Abbildung 55 und Abbildung 56 zeigen.



*Abbildung 55 A, B: Pars muscularis des interventrikulären Septums (Spender 1) in immunhistochemischer Färbung*

Pars muscularis des interventrikulären Septums des Spenders Nr. 1 in einer immunhistochemischen Färbung in 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die Kardiomyozyten sind kräftig braun gefärbt.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen, 2 = TRPC6-positive Gefäße im Myokard



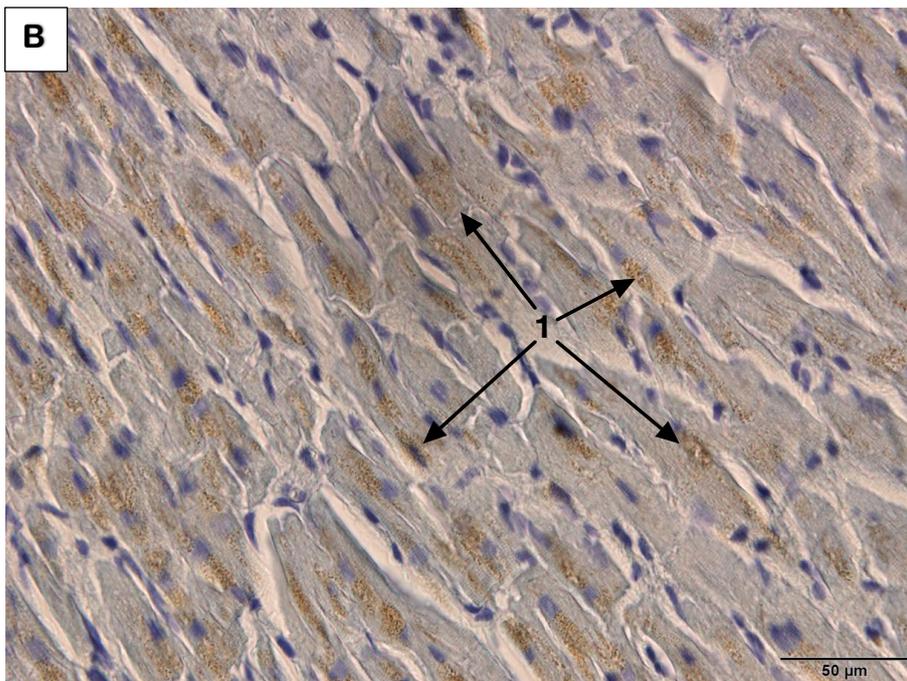
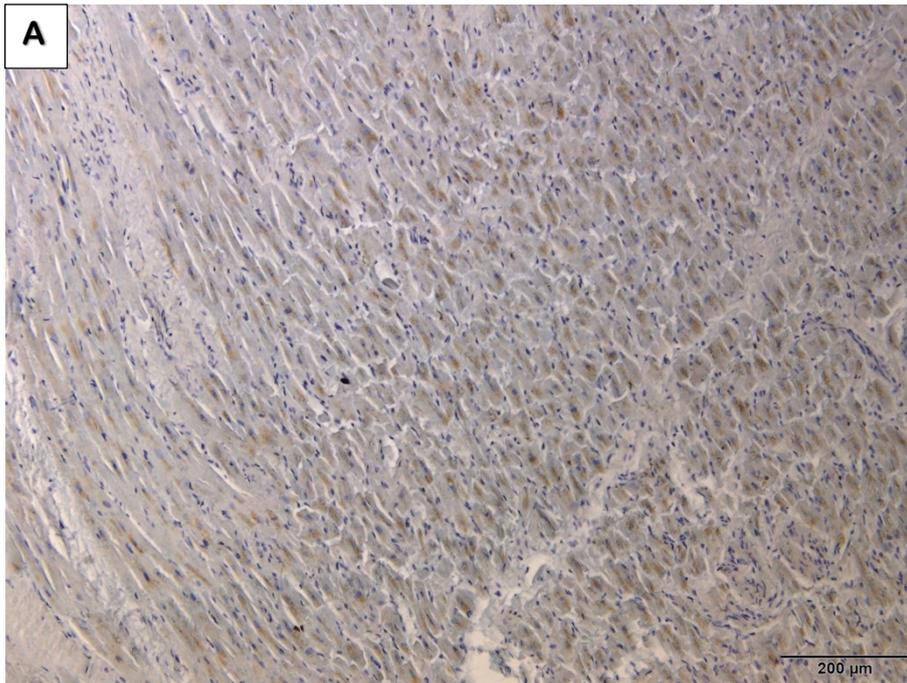
**Abbildung 56 A, B:** Pars muscularis des interventrikulären Septums (Spender 3) in immunohistochemischer Färbung

Pars muscularis des interventrikulären Septums des Spenders Nr. 3 in einer immunohistochemischen Färbung in 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Die Herzmuskelzellen zeigen eine eindeutige TRPC6-Expression.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen

#### **5.2.5.2 Ventrikulär nicht-septale Muskulatur**

Sowohl der linke anteriore Papillarmuskel (siehe Abbildung 57) als auch die Trabecula septomarginalis (siehe Abbildung 58), welche die Ventrikelmuskulatur repräsentieren, zeigten eine deutliche TRPC6-Expression.



*Abbildung 57 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 2) in immunohistochemischer Färbung*  
 Linker anteriorer Papillarmuskel des Spenders Nr. 2 in einer immunohistochemischen Färbung in 100- (A) und 400-facher (B) Vergrößerung. In den Kardiomyozyten sind die braunen Signale erkennbar.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen

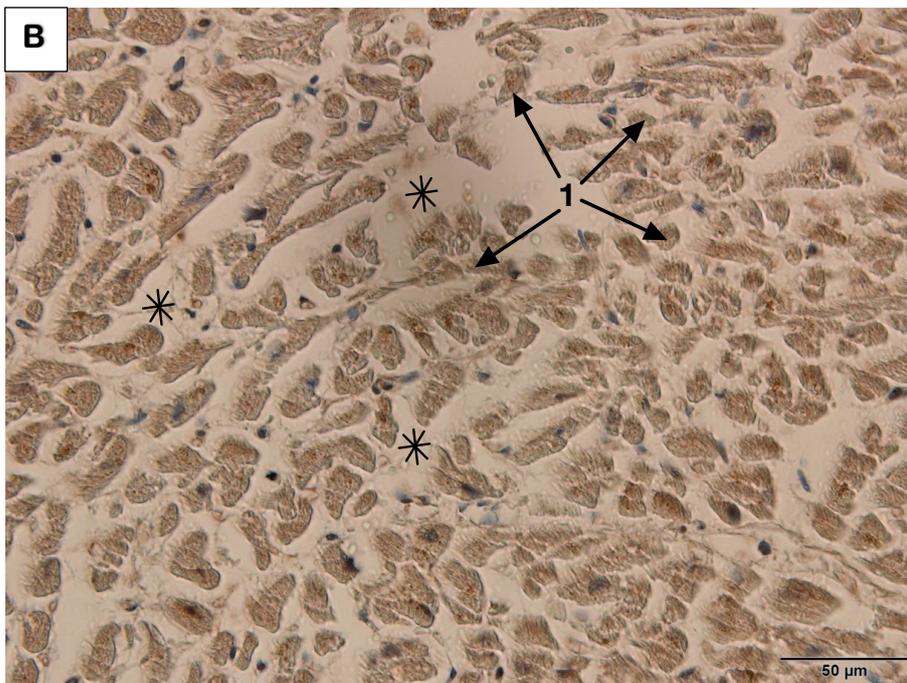
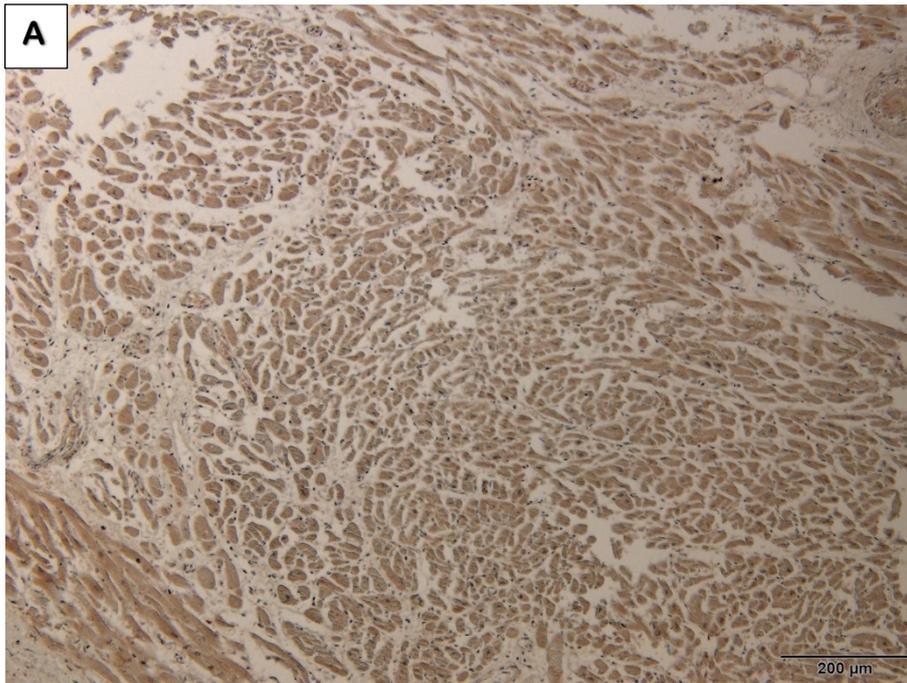


Abbildung 58 A, B: Trabecula septomarginalis (Spender 4) in immunohistochemischer Färbung  
 Trabecula septomarginalis des Spenders Nr. 4 in einer immunohistochemischen Färbung in  
 100-(A) und 400-facher (B) Vergrößerung. Das Myokard ist deutlich TRPC6-positiv.

1 = TRPC6-positive Herzmuskelzellen, 2 = TRPC6-negative Bindegewebsstränge

## **6 Diskussion**

### **6.1 Diskussion der Methodik**

Die Anatomie des Herzens ist bemerkenswert komplex (Mori et al., 2019). Ihr Verständnis ist jedoch die Voraussetzung, um die Herzfunktion verstehen zu können – sowohl beim gesunden Herzen als auch im Rahmen von Erkrankungen und ist somit von hoher klinischer Relevanz (Mori et al., 2015). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit 5 Lokalisationen des Herzens ausgewählt, welche sowohl im Hinblick auf die Physiologie als auch die Pathophysiologie dieses Organs von Bedeutung sind. Die Entnahme der entsprechenden Proben erfolgte aus fünf verschiedenen Körperspendern, wobei vier mit Formaldehyd- und einer mit NEP-Fixierung nach Weigner konserviert worden waren.

Während die Formalinfixierung und Paraffineinbettung die Standardmethode für Gewebelagerung in der Histopathologie darstellt, kann die Fixierung nach Weigner als alternative Konservierungsmethode angesehen werden (Klopfleisch et al., 2013). Im Hinblick auf die Bewertung der Ergebnisse muss in auf die Fixierung der Spender berücksichtigt werden, dass Formaldehyd zur Bildung von kovalenten Bindungen zwischen Proteinen führt (Sutherland et al., 2008). Dadurch wird die Fähigkeit von Antikörpern an Antigene zu binden beeinflusst, indem ihre Epitope blockiert werden (Libard et al., 2019) und ihre Konformation verändert wird (Montero, 2003). Diese Tatsache stellt einen möglichen Einflussfaktor auf den immunhistochemischen Nachweis des TRPC6-Kanals dar. Klopfleisch et al., welche in ihrer Arbeit Proben aus Formalin-fixierten - mit solchen aus NEP-fixierten Organen verglichen, stellten eine bessere immunhistochemische Nachweisbarkeit des CD3-Proteins in letzteren fest (Klopfleisch et al., 2013). Inwiefern die Formaldehyd-induzierten Quervernetzungen von Proteinen auch für

den in dieser Arbeit durchgeführten Nachweis des TRPC6-Kanals von Bedeutung sind, müsste durch eine genauere Analyse der Proteinstruktur geklärt werden. Hierfür stünde als Methode die Massenspektrometrie zur Verfügung (Tayri-Wilk et al., 2020).

Des Weiteren muss eine mögliche Beeinflussung der immunhistochemischen Färbung durch den postmortalen Proteinabbau berücksichtigt werden. Dieser ist von einer Vielzahl von Einflussfaktoren, sowohl aus dem individuellen Körper selbst (unter anderem (u.a.) Alter, Geschlecht, Todesursache), als auch aus der Umwelt (u. a. Vorhandensein und Art der Kleidung, Umweltbedingungen am Sterbeort), abhängig (Zissler et al., 2021). Die visuelle Auswertung der Ergebnisse der Immunhistochemie erbrachte allerdings keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Länge des postmortalen Intervalls bis zur Fixierung und der Detektion von TRPC6 im Herzen.

Auch die Dicke der Paraffinschnitte stellt eine Variable dar, welche Einfluss auf das Ergebnis der IHC hat. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in einem dickeren Schnitt, also in einer dickeren dreidimensionalen Struktur, mehr Protein markiert wird. (Libard et al., 2019) In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von etwa 7  $\mu\text{m}$  verwendet. Eine geringere Schnittdicke hätte so möglicherweise zu einer weniger intensiven Anfärbung der Proben geführt.

Von entscheidender Bedeutung für das Ergebnis des immunhistochemischen Verfahrens ist die Wahl des Antikörpers, da verschiedene Antikörper gegen dasselbe Zielmolekül sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern können (Gown,

2016). Der hier verwendete knockout-validierte Antikörper gegen das Epitop des TRPC6-Proteins konnte den Kanal bereits in anderen Arbeiten sowohl in menschlichem (Abdinghoff et al., 2022), als auch in tierischem Gewebe (He et al., 2022) nachweisen.

## **6.2 Diskussion der Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit war es, den nicht-selektiven Kationenkanal TRPC6 mittels immunhistochemischer Färbung in ausgewählten Lokalisationen des menschlichen Herzens nachzuweisen und Aussagen über seine Verteilung treffen zu können. Die Bewertung der Intensität der Antikörperfärbung erfolgte rein manuell und wurde somit von visuellen Verzerrungen beeinflusst. Da die Objektträger mit DAB gefärbt und dann mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden, erweisen sich Diskrepanzen bei der Beurteilung der genauen Farbintensität als Problem und können daher zu Abweichungen zwischen verschiedenen Beobachtern führen. (Varghese et al., 2014) Somit ist mit dieser Methode keine objektive, exakte quantitative Aussage über die genaue Verteilung von TRPC6 im Herzen möglich. Eine automatisierte digitale Bildanalyse könnte dies gewährleisten und so eine noch detailliertere Auswertung der Ergebnisse ermöglichen.

Die durchgeführte visuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung zeigte eine ubiquitäre Expression des TRPC6-Kanals in den Kardiomyozyten der entnommenen Proben. Es konnten keine Unterschiede bezüglich des Vorkommens des Proteins in Vorhof und Kammer, in linkem und rechtem Herzen, sowie in septaler und nicht-septaler Muskulatur festgestellt werden.

Dieses weit verbreite Vorkommen des Proteins korrespondiert mit seiner Beteiligung an kardiovaskulären Erkrankungen. So spielt TRPC6 eine wichtige Rolle bei verschiedenen Herzerkrankungen (Kuwahara et al., 2006; Watanabe et al., 2009), darunter auch kardiale Hypertrophie (Onohara et al., 2006). Zentral für die Pathogenese der Hypertrophie ist hierbei die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin, welche als Calcium-abhängiger Regulator der Herzhypertrophie fungiert und über die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT dessen Verlagerung in den Zellkern veranlasst. Dies führt zur Aktivierung von Signalwegen, welche Einfluss auf das hypertrophe Wachstum des Herzens haben. (Kinoshita et al., 2010) Der Calcium-Einstrom durch TRP-Proteine, insbesondere auch TRPC3 und 6 (Seo, Rainer, Hahn, et al., 2014) stellt eine mögliche Quelle für die Calcineurinaktivierung dar (Onohara et al., 2006).

Aufgrund der entscheidenden Rolle der nicht spannungsgesteuerten TRPC6-Kanäle für kardiale Pathologien stellen sie ein wichtiges therapeutisches Ziel für die pharmakologische Hemmung dar (Bai et al., 2020; Seo, Rainer, Hahn, et al., 2014). Lin et al. entwickelten mit BI 749327 einen oral bioverfügbaren TRPC6-spezifischen Inhibitor, welcher die Herzfunktion verbessern konnte (Lin et al., 2019). In der Studie von Seo, Rainer, Han et al. erwies sich die selektive kombinierte Hemmung von TRPC3 und 6 als wirksam, um die durch  $G\alpha_q$ -Agonisten stimulierte Hypertrophie in neonatalen und adulten Herzmuskelzellen abzuschwächen (Seo, Rainer, Hahn, et al., 2014).

Doch nicht nur in Bezug auf kardiale Hypertrophie sind die Kanäle und Pumpen, die an der Calciumhomöostase während der Herzaktion beteiligt sind und zu denen

auch TRPC6 gehört relevant, sondern unter anderem auch hinsichtlich der Entwicklung von Herzinsuffizienz (Freichel et al., 2017). Eine Erkrankung, bei der Calcium entscheidend zur Entstehung einer solchen beiträgt, ist die Tachykardiomyopathie (TCMP) (Nakazato, 2002). Der Begriff bezieht sich auf eine Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion in Folge einer chronischen Tachykardie, die teilweise oder vollständig reversibel ist (Mohamed, 2007). Die Mechanismen der TCMP sind bis heute nicht vollständig geklärt, allerdings scheint eine Calciumüberladung an der Pathogenese beteiligt zu sein (Martin & Lambiase, 2017; Stronati et al., 2019). Auf zellulärer Ebene des Herzens sind die Kardiomyozyten elementarer Bestandteil des Organs und für die dessen Krafterzeugung verantwortlich (Mohamed, 2007). Spinale et al. berichteten, dass durch supraventrikuläre Tachykardien hervorgerufene TCMPs wahrscheinlich auf einen primären Defekt der kontraktilen Leistung von isolierten Myozyten zurückzuführen sind. Die verminderte kontraktile Funktion der Zellen war mit Anomalien in der Zytoarchitektur und der Calcium-Reaktivität verbunden. (Spinale et al., 1992) Unter anderem konnte festgestellt werden, dass eine chronische supraventrikuläre Tachykardie zu einer signifikanten Zunahme der Myozytenlänge führt (Mohamed, 2007) und außerdem ihre Kontraktilität aufgrund der verminderten Reaktion auf einen Anstieg des extrazellulären Calciums verringert ist (Nakazato, 2002).

Inwiefern auch der TRPC6-Kanal im Speziellen an der Pathogenese der noch nicht voll verstanden TCMP beteiligt ist, müsste durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Da der derzeitige Wissensstand über die Physiologie und Pathophysiologie des TRPC6-Kanals in den Herzmuskelzellen primär auf Untersuchungen von Zellkulturen mit menschlichen Embryonalzellen, sogenannten HEK-Zellen, (Gibon et al., 2011) und Tiermodellen (u.a. Freichel et al., 2017; Kinoshita et al., 2010; Onohara et al., 2006; Seo, Rainer, Hahn, et al., 2014) beruht, kann diese Arbeit dazu beitragen seine Rolle auch am humanen Herzen genauer zu verstehen. Da das untersuchte Protein als Zielmolekül pharmakologischer Modulationen relevant ist, ergibt sich durch die Bestimmung seiner Lokalisation am Herzen eine mögliche klinische Bedeutung.

Nicht nur die Kardiomyozyten, sondern auch kardiale Fibroblasten spielen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des Herzens (Yue et al., 2011). Im Rahmen des kardialen Remodelings proliferieren und differenzieren sich Fibroblasten zu Myofibroblasten, die kontraktile Proteine exprimieren (Freichel et al., 2017; Ikeda et al., 2013). In ihrer Arbeit an Nagetieren identifizierten Davis et al. TRPC6 als entscheidenden Akteur für diesen Differenzierungsprozess in Bezug auf Wundheilung und nach Verletzungen des Herzens, weshalb gezielte Inhibitoren des Kanals zu einer Hemmung der Zellumwandlung führen könnten (Davis et al., 2012).

Ikeda et al. konnten in ihrer Studie an humanen adulten Herzfibroblasten sowohl TRPC6-mRNA mittels PCR-Analyse, als auch das TRPC6-Protein durch Immunhistochemie und Western-Blot-Analyse nachweisen (Ikeda et al., 2013). Du et al. berichten außerdem von der TRPC6-Expression in humanen Vorhof-Fibroblasten (Du et al., 2010). Im Gegensatz zu den Kardiomyozyten zeigte sich das kardiale Bindegewebe in dieser Arbeit allerdings TRPC6-negativ. Die

Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte möglicherweise dadurch erklärbar sein, dass in den Studien von Ikeda et al., sowie Du et al. isolierte Zellen betrachtet und nicht wie in dieser Arbeit ganze Gewebeschnitte untersucht worden waren. Bei der Isolierung beziehungsweise Kultivierung der Zellen kann es möglicherweise zur Änderung der Funktion von Ionenkanälen und Rezeptoren kommen, weshalb die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf intakte Herzen übertragen werden können (Ikeda et al., 2013).

Davis et al. führten ihre Untersuchungen an Mäusen durch, weshalb sich die Resultate von denen am Menschen unterscheiden könnten. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Extrazellulärmatrix einen großen Anteil des (kardialen) Bindegewebes ausmacht und somit auch zu dessen negativer Färbung geführt haben könnte.

Trotz der Relevanz des TRPC6-Proteins bei Herzerkrankungen konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied in der Verteilung von TRPC6 zwischen Spendern mit kardialer und nicht-kardialer Todesursache festgestellt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass nicht die Verteilung des Kanals im Herzen, sondern vielmehr seine Funktionalität oder seine Interaktion mit anderen Akteuren bei kardialen Erkrankungen entscheidend ist.

Analog zu der ubiquitären Expression von TRPC6 in den Kardiomyozyten in ausgewählten Lokalisationen des menschlichen Herzens konnte der Kanal auch in angefärbten Gefäßen detektiert werden. Sowohl kleinere Gefäße innerhalb des Myokards als auch die Pulmonalvenen zeigten braune Signale. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen von Abdinghoff et al. überein, welche in der großen

Mehrheit der von ihnen untersuchten menschlichen Gefäßproben TRPC6 nachweisen konnten (Abdinghoff et al., 2022).

In Übereinstimmung zu der homogenen Verteilung von TRPC6 im Nervensystem (Riccio et al., 2002) zeigte sich ein im Bereich des linken Vorhofs gefundenes parasympathisches Ganglion TRPC6-positiv. Da das autonome Nervensystem an Herzerkrankungen beteiligt ist (Goldberger et al., 2019), könnte dies ein Hinweis auf einen weiteren Zusammenhang zwischen TRPC6 und Herzerkrankungen sein.

Die geringe Fallzahl der durchgeführten Studie mindert ihre Aussagekraft und die Ergebnisse können so nicht ohne weiteres als allgemeingültig angenommen werden. Die Arbeit kann aber einen ersten Überblick über die Verteilung von TRPC6 in klinisch relevanten Lokalisationen des Herzens gewährleisten und so eine mögliche Basis für tiefergehende Analysen bieten.

Durch die Konzentration auf myokardiale Lokalisationen, die an bestimmten Pathologien beteiligt sind, könnten Schwankungen der TRPC6-Verteilung in anderen Teilen des Herzens übersehen werden. Nichtsdestotrotz ist die Probenentnahme in zuverlässig nachweisbaren Bereichen notwendig, um eine Vergleichbarkeit der Proben zu erreichen und eine mögliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression des TRPC6-Kanals in den hier untersuchten, klinisch relevanten Lokalisationen des menschlichen Herzens mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen und keine Unterschiede in Bezug auf dessen Verteilung festgestellt werden konnten. Aufgrund der Beteiligung des Proteins an multiplen physiologischen und

pathophysiologischen Prozessen im Herzen ergibt sich aus diesen Ergebnissen eine mögliche klinische Relevanz, da TRPC6 beispielsweise einen pharmakologischen Angriffspunkt bei der Behandlung von kardialen Erkrankungen darstellen könnte. Die TRPC6-Expression im menschlichen Herzen ist zwar keine völlig neue Erkenntnis (Jacobs et al., 2022), die Datenlage ist allerdings sehr spärlich. Daher kann die vorliegende Arbeit zu einem tieferen Verständnis der Thematik beitragen und Anlass für weitergehende Analysen bieten, um so in Zukunft die Beteiligung von TRPC6 an Herzerkrankungen des Menschen noch besser verstehen zu können und eine eventuelle Therapie von ihnen durch Modulation genau dieses Kanals zu ermöglichen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abdinghoff, J., Servello, D., Jacobs, T., Beckmann, A., & Tschernig, T. (2022). Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry. *Biomedical Reports*, *16*(5), 1–11.
2. Anderson, Robert H, Becker, A. E., & Van Mierop, L. H. (1977). What should we call the 'crista'? *Heart*, *39*(8), 856–859.
3. Anderson, Robert H, Boyett, M. R., Dobrzynski, H., & Moorman, A. F. M. (2013). The anatomy of the conduction system: implications for the clinical cardiologist. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *6*(2), 187–196.
4. Anderson, Robert H, Yanni, J., Boyett, M. R., Chandler, N. J., & Dobrzynski, H. (2009). The anatomy of the cardiac conduction system. *Clinical Anatomy: The Official Journal of the American Association of Clinical Anatomists and the British Association of Clinical Anatomists*, *22*(1), 99–113.
5. Asensio-Nogueira, J., & Iglesias-Alonso, L. F. (2020). Isolated right atrial appendage thrombus in transoesophageal echocardiogram before invasive intervention. *Cardiology Journal*, *27*(2), 214–215.
6. Bai, Y., Yu, X., Chen, H., Horne, D., White, R., Wu, X., Lee, P., Gu, Y., Ghimire-Rijal, S., Lin, D. C. H., & others. (2020). Structural basis for pharmacological modulation of the TRPC6 channel. *Elife*, *9*, e53311.
7. Balcazar, D., Regge, V., Santalla, M., Meyer, H., Paululat, A., Mattiazzi, A., & Ferrero, P. (2018). SERCA is critical to control the Bowditch effect in the heart. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8.
8. Bornaun, H., Yarta\cs\i Tik, E., Keskindemirci, G., Ekiz, A., Öztarhan, K.,

- Dedeo\u015fl\u00fc, R., & \u00c7etinkaya, M. (2016). Right Atrial Appendage Aneurysm in a Newborn Diagnosed with Fetal Echocardiography. *Case Reports in Pediatrics*, 2016.
9. Capuani, A. (2014). The trabecula septomarginalis (Leonardo's cord) in abnormal ventriculo-arterial connections: anatomic and morphogenetic implications. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 9(1), 1–10.
  10. Chen, S., Sari, C. R., Gao, H., Lei, Y., Segers, P., De Beule, M., Wang, G., & Ma, X. (2020). Mechanical and morphometric study of mitral valve chordae tendineae and related papillary muscle. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 111, 104011.
  11. Dakkak, W., & Oliver, T. I. (2020). Ventricular septal defect. *StatPearls [Internet]*.
  12. Davis, J., Burr, A. R., Davis, G. F., Birnbaumer, L., & Molkentin, J. D. (2012). A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Developmental Cell*, 23(4), 705–715.
  13. Du, J., Xie, J., Zhang, Z., Tsujikawa, H., Fusco, D., Silverman, D., Liang, B., & Yue, L. (2010). TRPM7-mediated Ca<sup>2+</sup> signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circulation Research*, 106(5), 992–1003.
  14. Ebata, Y., Nakagawa, M., Kondo, H., Ezaki, K., Miyazaki, H., Shinohara, T., Teshima, Y., Yufu, K., & Takahashi, N. (2020). Possible association of papillary muscle hypertrophy with the genesis of J-waves. *Journal of Cardiology*, 75(1), 90–96.
  15. Freichel, M., Berlin, M., Sch\u00fcrger, A., Mathar, I., Bacmeister, L., Medert, R., Frede, W., Marx, A., Segin, S., Londo\u00f1o, J. E. C., & others. (2017). TRP Channels in the Heart. *Neurobiology of TRP Channels*, 1, 149–186.

16. Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Stolz, S., Philipp, S. E., Weißgerber, P., & Flockerzi, V. (2005). Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *The Journal of Physiology*, 567(1), 59–66.
17. Gibon, J., Tu, P., Bohic, S., Richaud, P., Arnaud, J., Zhu, M., Boulay, G., & Bouron, A. (2011). The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(12), 2807–2818.
18. Gill, J. S. (2004). How to perform pulmonary vein isolation. *EP Europace*, 6(2), 83–91.
19. Goldberger, J. J., Arora, R., Buckley, U., & Shivkumar, K. (2019). Autonomic nervous system dysfunction: JACC focus seminar. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(10), 1189–1206.
20. Gown, A. M. (2016). Diagnostic immunohistochemistry: what can go wrong and how to prevent it. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 140(9), 893–898.
21. Grissmer, S. (2016). *Regulation der Organdurchblutung* (J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, & E. Wischmeyer (eds.); 3., vollst). Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b-004-132217>
22. Györke, S., & Carnes, C. (2008). Dysregulated sarcoplasmic reticulum calcium release: potential pharmacological target in cardiac disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 119(3), 340–354.
23. Haissaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D. C., Takahashi, A., Hocini, M.,

- Quiniou, G., Garrigue, S., Le Mouroux, A., Le Métayer, P., & Clémenty, J. (1998). Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *New England Journal of Medicine*, 339(10), 659–666.
24. He, C., Li, Q., Cui, Y., Gao, P., Shu, W., Zhou, Q., Wang, L., Li, L., Lu, Z., Zhao, Y., & others. (2022). Recurrent moderate hypoglycemia accelerates the progression of cognitive deficits through impairment of TRPC6/GLUT3 pathway in diabetic APP/PS1 mice. *JCI Insight*.
25. Hopfgarten, J., Christersson, C., & Forsblad, J. (2020). Papillarmuskelruptur-en klinisk kameleont med hög mortalitet. *Läkartidningen*, 117(48), 1590–1593.
26. Ikeda, K., Nakajima, T., Yamamoto, Y., Takano, N., Tanaka, T., Kikuchi, H., Oguri, G., Morita, T., Nakamura, F., & Komuro, I. (2013). Roles of transient receptor potential canonical (TRPC) channels and reverse-mode Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger on cell proliferation in human cardiac fibroblasts: Effects of transforming growth factor  $\beta$ 1. *Cell Calcium*, 54(3), 213–225.
27. Jacobs, T., Abdinghoff, J., & Tschernig, T. (2022). Protein detection and localisation of the non-selective cation channel TRPC6 in the human heart. *European Journal of Pharmacology*, 174972.
28. Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nishida, M., Jian, Z., Rong, X., Kiyonaka, S., Kuwabara, Y., Kurose, H., Inoue, R., Mori, Y., & others. (2010). Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. *Circulation Research*, 106(12), 1849–1860.
29. Kirchhof, P., & Calkins, H. (2017). Catheter ablation in patients with

- persistent atrial fibrillation. *European Heart Journal*, 38(1), 20–26.
30. Klopffleisch, R., Deetzen, M. von, Weiss, A. T., Weigner, J., Weigner, F., Plendl, J., & Gruber, A. D. (2013). Weigners fixative--an alternative to formalin fixation for histology with improved preservation of nucleic acids. *Veterinary Pathology*, 50(1), 191–199.
31. Klose, H., Harbaum, L., Oqueka, T., Simon, M., & Grünig, E. (2015). Therapy of Pulmonary Arterial Hypertension. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 69(8), 483–493.
32. Kockskämper, J., von Lewinski, D., Khafaga, M., Elgner, A., Grimm, M., Eschenhagen, T., Gottlieb, P. A., Sachs, F., & Pieske, B. (2008). The slow force response to stretch in atrial and ventricular myocardium from human heart: functional relevance and subcellular mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 97(2–3), 250–267.
33. Kurtz, A., & Wagner, C. (2016). *Atriales natriuretisches Peptid (ANP)* (J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, & E. Wischmeyer (eds.); 3., vollst). Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b-004-132217>
34. Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., Olson, E. N., & others. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3114–3126.
35. Libard, S., Cerjan, D., & Alafuzoff, I. (2019). Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 151(1), 91–96.

36. Lin, B. L., Matera, D., Doerner, J. F., Zheng, N., Del Camino, D., Mishra, S., Bian, H., Zeveleva, S., Zhen, X., Blair, N. T., & others. (2019). In vivo selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(20), 10156–10161.
37. Luchner, A., Borgeson, D. D., Grantham, J. A., Friedrich, E., Riegger, G. A. J., Burnett Jr, J. C., & Redfield, M. M. (2000). Relationship between left ventricular wall stress and ANP gene expression during the evolution of rapid ventricular pacing-induced heart failure in the dog. *European Journal of Heart Failure*, *2*(4), 379–386.
38. 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*, 707.
39. Martin, C. A., & Lambiase, P. D. (2017). Pathophysiology, diagnosis and treatment of tachycardiomyopathy. *Heart*, *103*(19), 1543–1552.
40. Mohamed, H. A. (2007). Tachycardia-induced cardiomyopathy (Tachycardiomyopathy). *Libyan Journal of Medicine*, *2*(1), 26–29.
41. Montani, D., Chaumais, M.-C., Guignabert, C., Günther, S., Girerd, B., Jaïs, X., Algalarrondo, V., Price, L. C., Savale, L., Sitbon, O., & others. (2014). Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, *141*(2), 172–191.
42. Montero, C. (2003). The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *51*(1), 1–4.

43. Mori, S., Spicer, D. E., & Anderson, R. H. (2015). Revisiting the anatomy of the living heart. *Circulation Journal*, CJ--15.
44. Mori, S., Tretter, J. T., Spicer, D. E., Bolender, D. L., & Anderson, R. H. (2019). What is the real cardiac anatomy? *Clinical Anatomy*, 32(3), 288–309.
45. Naeem, K. (2015). Floating thrombus in the right heart associated with pulmonary embolism: The role of echocardiography. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 31(1), 233.
46. Nakazato, Y. (2002). Tachycardiomyopathy. *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*, 2(4), 104.
47. Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 12(3), 1–11.
48. Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., & Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 165–217.
49. Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., & Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*, 25(22), 5305–5316.
50. Radhakrishna, U., Albayrak, S., Zafra, R., Baraa, A., Vishweswaraiah, S., Veerappa, A. M., Mahishi, D., Saiyed, N., Mishra, N. K., Guda, C., & others. (2019). Placental epigenetics for evaluation of fetal congenital heart defects: Ventricular Septal Defect (VSD). *PloS One*, 14(3), e0200229.
51. 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.
52. Rowell, J., Koitabashi, N., & Kass, D. A. (2010). TRP-ing up heart and vessels: canonical transient receptor potential channels and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 3(5), 516–524.
53. Schlotter, F., de Waha, S., Eitel, I., Desch, S., Fuernau, G., & Thiele, H. (2016). Interventional post-myocardial infarction ventricular septal defect closure: a systematic review of current evidence. *EuroIntervention: Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*, 12(1), 94–102.
54. Schmitz, F. (2017a). *Form, Abschnitte und Lage des Herzens* (G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, G. Wennemuth, W. Wolff, L. J. Wurzinger, & H.-G. Zilch (eds.); 4., aktual). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-005-143674>
55. Schmitz, F. (2017b). *Herzvorhöfe (Atria cordis)* (G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, G. Wennemuth, W. Wolff, L. J. Wurzinger, & H.-G. Zilch (eds.); 4., aktual). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-005-143674>
56. Schmitz, F. (2017c). *Herzsepten (Septa cordis)* (G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, G. Wennemuth, W. Wolff, L. J. Wurzinger, & H.-G. Zilch (eds.); 4., aktual). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-005-143674>

57. Schmitz, F. (2017d). *Trennung und Bildung der Ventrikel mit ihren Ausstrombahnen* (G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, G. Wennemuth, W. Wolff, L. J. Wurzinger, & H.-G. Zilch (eds.); 4., aktual). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-005-143674>
58. Schmitz, F. (2017e). *Herzklappen (Valvae cordis)* (G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, G. Wennemuth, W. Wolff, L. J. Wurzinger, & H.-G. Zilch (eds.); 4., aktual). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-005-143674>
59. Schmitz, F. (2017f). *Herzkammern (Ventriculi cordis)* (G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, G. Wennemuth, W. Wolff, L. J. Wurzinger, & H.-G. Zilch (eds.); 4., aktual). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-005-143674>
60. Seo, K., Rainer, P. P., Hahn, V. S., Lee, D., Jo, S.-H., Andersen, A., Liu, T., Xu, X., Willette, R. N., Lepore, J. J., & others. (2014). Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(4), 1551–1556.
61. Seo, K., Rainer, P. P., Lee, D., Hao, S., Bedja, D., Birnbaumer, L., Cingolani, O. H., & Kass, D. A. (2014). Hyperactive adverse mechanical-stress responses in dystrophic heart are coupled to TRPC6 and blocked by cGMP-PKG modulation. *Circulation Research*, *114*(5), 823.

62. Simmers, T. A., & Tukkie, R. (2004). How to perform pulmonary vein isolation for the treatment of atrial fibrillation: use of the LocaLisa catheter navigation system. *EP Europace*, 6(2), 92–96.
63. Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R. F., & others. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25S), D34--D41.
64. Spinale, F. G., Fulbright, B. M., Mukherjee, R., Tanaka, R., Hu, J., Crawford, F. A., & Zile, M. R. (1992). Relation between ventricular and myocyte function with tachycardia-induced cardiomyopathy. *Circulation Research*, 71(1), 174–187.
65. Stronati, G., Guerra, F., Urbinati, A., Ciliberti, G., Cipolletta, L., & Capucci, A. (2019). Tachycardiomyopathy in patients without underlying structural heart disease. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1411.
66. Sutherland, B. W., Toews, J., & Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein--protein interactions. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(6), 699–715.
67. Tang, Q., Guo, W., Zheng, L., Wu, J.-X., Liu, M., Zhou, X., Zhang, X., & Chen, L. (2018). Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Research*, 28(7), 746–755.
68. Tayri-Wilk, T., Slavin, M., Zamel, J., Blass, A., Cohen, S., Motzik, A., Sun, X., Shalev, D. E., Ram, O., & Kalisman, N. (2020). Mass spectrometry reveals the chemistry of formaldehyde cross-linking in structured proteins. *Nature Communications*, 11(1), 1–9.

69. Usman, A., Gandhi, J., & Gupta, G. (2021). Physiology, Bowditch Effect. *StatPearls [Internet]*.
70. Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., & De, A. (2014). IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*, *9*(5), e96801.
71. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, *76*, 387–417.
72. Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Ono, K., & Ito, H. (2009). The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circulation Journal*, 902040259.
73. 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.
74. Yue, L., Xie, J., & Nattel, S. (2011). Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, *89*(4), 744–753.
75. Zhang, B., Davis, J. P., & Ziolo, M. T. (2015). Cardiac catheterization in mice to measure the pressure volume relationship: investigating the Bowditch effect. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *100*, e52618.
76. Zissler, A., Stoiber, W., Geissenberger, J., Steinbacher, P., Monticelli, F. C., & Pittner, S. (2021). Influencing Factors on Postmortem Protein Degradation for PMI Estimation: A Systematic Review. *Diagnostics*, *11*(7), 1146.

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Voraussichtliche Topologie TRP-Familie</i>	7
<i>Abbildung 2: Vermutete Regulation und Funktion der TRPC-Proteine bei der Regulierung des Membranpotenzials und der spannungsabhängigen Ionenkanäle</i>	9
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der PKG-Regulierung des TRPC6-Stroms und der Signalübertragung</i>	16
<i>Abbildung 4 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	39
<i>Abbildung 5 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	40
<i>Abbildung 6 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	41
<i>Abbildung 7 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	42
<i>Abbildung 8 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	43
<i>Abbildung 9 A, B: Pulmonalvene (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	45
<i>Abbildung 10 A, B: Pulmonalvene (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	46
<i>Abbildung 11 A, B: Pulmonalvene (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	47
<i>Abbildung 12 A, B, C: Pulmonalvene (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	49
<i>Abbildung 13 A, B: Pulmonalvene (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	50
<i>Abbildung 14 A, B: Parasympathisches Ganglion (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	51
<i>Abbildung 15 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	53
<i>Abbildung 16 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	54
<i>Abbildung 17 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	55
<i>Abbildung 18 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	56
<i>Abbildung 19 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	57
<i>Abbildung 20 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	59
<i>Abbildung 21 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 2) in Alcian-Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	60
<i>Abbildung 22 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	61
<i>Abbildung 23 A, B, C: Interventrikuläres Septum (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	63
<i>Abbildung 24 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	64

Abbildung 25 A, B: Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Alcian-Hämatoxylin-Eosin-Färbung	65
Abbildung 26 Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	66
Abbildung 27 Interventrikuläres Septum (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Bereich 2	67
Abbildung 28 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 1) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung	69
Abbildung 29 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 1) in Alcian-Hämatoxylin-Eosin-Färbung	70
Abbildung 30 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 1) in Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	71
Abbildung 31 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 2) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung	72
Abbildung 32 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 3) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung	73
Abbildung 33 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 4) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung	74
Abbildung 34 A, B: Trabecula Septomarginalis (Spender 5) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung	75
Abbildung 35 A, B: Verdünnungsreihe, Negativkontrolle	77
Abbildung 36 A, B: Verdünnungsreihe 1:100	78
Abbildung 37 A, B: Verdünnungsreihe 1:250	80
Abbildung 38 A, B: Verdünnungsreihe 1:500	81
Abbildung 39 A, B: Verdünnungsreihe 1:1000	82
Abbildung 40 A, B: Signal in den Kardiomyozyten, kein Signal im Bindegewebe	84
Abbildung 41: Signal im Endokard	85
Abbildung 42: Kein Signal im Fettgewebe, Signal in Nervenzellkörpern	86
Abbildung 43: Signal in kleinen Gefäßen im Myokard	87
Abbildung 44 A, B: Pulmonalvene (Spender 5) in immunhistochemischer Färbung	88
Abbildung 45A, B: Rechtes Herzohr (Spender 2) in immunhistochemischer Färbung	90
Abbildung 46 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 4) in immunhistochemischer Färbung	91
Abbildung 47 A, B: Myokard linker Vorhof (Spender 3) in immunhistochemischer Färbung	92
Abbildung 48 A, B: Pars muscularis des interventrikulären Septums (Spender 2) in immunhistochemischer Färbung	94
Abbildung 49 A, B: Trabecula septomarginalis (Spender 3) in immunhistochemischer Färbung	95
Abbildung 50 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 5) in immunhistochemischer Färbung	96

<i>Abbildung 51 A, B: Myokard linker Vorhof (Spender 4) in immunhistochemischer Färbung</i>	98
<i>Abbildung 52 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 1) in immunhistochemischer Färbung</i>	99
<i>Abbildung 53 A, B: Rechtes Herzohr (Spender 1) in immunhistochemischer Färbung</i>	101
<i>Abbildung 54 A, B: Trabecula septomarginalis (Spender 5) in immunhistochemischer Färbung</i>	102
<i>Abbildung 55 A, B: Pars muscularis des interventrikulären Septums (Spender 1) in immunhistochemischer Färbung</i>	104
<i>Abbildung 56 A, B: Pars muscularis des interventrikulären Septums (Spender 3) in immunhistochemischer Färbung</i>	105
<i>Abbildung 57 A, B: Linker anteriorer Papillarmuskel (Spender 2) in immunhistochemischer Färbung</i>	107
<i>Abbildung 58 A, B: Trabecula septomarginalis (Spender 4) in immunhistochemischer Färbung</i>	108
<i>Abbildung 59 A, B: Positivkontrolle zu Spezifitätsnachweis</i>	138
<i>Abbildung 60 A, B: Spezifitätsnachweis</i>	139
<i>Abbildung 61 A, B: Negativkontrolle zu Spezifitätsnachweis</i>	140

## **8.2 Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Substanzen für die Immunhistochemische Färbung</i>	23
<i>Tabelle 2: Verwendete Chemikalien</i>	24
<i>Tabelle 3: Verwendete Geräte</i>	25
<i>Tabelle 4: Sonstige Materialien</i>	25
<i>Tabelle 5: Formalin-Fixierung nach Basler</i>	26
<i>Tabelle 6: NEP-Fixierung nach Weigner</i>	26

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Cn	Calcinuerin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IVS	Interventrikuläres Septum
l	Liter
M.	Musculus
MGT	Masson-Goldner-Trichrom
ml	Milliliter
Mm.	Musculi
µm	Mikrometer
NEP	N-Ethyl-2-Phyrrolidon (Nitrat-Ethanol-Pökelsalz)
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NGS	Normal goat serum, normales Ziegenserum
Nr.	Nummer
PAH	Pulmonal-Arterielle Hypertonie
PAP	Papillarmuskel

PASMC	Pulmonary artery smooth muscle cell
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PV	Pulmonalvene
RAA	Right atrial appendage
SERCA	Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase
SFR	Slow force response
SM	Trabecula Septomarginalis
TCMP	Tachykardiomyopathie
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Ankyrin
TRPC	Canonical/classical
TRPM	Melastin
TRPML	Mucolipin
TRPN	No mechanopotential
TRPP	Polycystin
TRPV	Vanilloid
u.a.	Unter anderem
V.	Vena
Vv.	Venae
VSD	Ventrikelseptumdefekt

## 10 Publikationen

Jan M Federspiel, MD; **Jil Gartner**; Peter Lipp, PhD; Matthias W. Laschke, PhD;

Peter Schmidt, MD; Tanja Schwab; Thomas Tschernig, MD (2022). TRPC6 is

equally distributed in clinically relevant myocardial localizations. (eingereicht)

## **11 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die ihren Körper der Wissenschaft gespendet haben, um die medizinische Forschung und Ausbildung zu unterstützen und mir auf diese Weise das Anfertigen meiner Dissertation ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinem Betreuer Dr. med. Jan Federspiel für seine anhaltende Hilfestellung während der gesamten Arbeit. Für seine zahlreichen Ratschläge und Anregungen und für sein immer offenes Ohr.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Tschernig möchte ich mich für die Überlassung des Themas, sowie die konstruktive Zusammenarbeit bedanken.

Frau Tanja Schwab und Frau Irina Scheck danke ich für die Unterstützung bei verschiedenen Laborarbeiten. Außerdem bedanke ich mich bei Tobias Jacobs für die Bereitstellung der Ergebnisse des Spezifitätsnachweis.

Abschließend gilt mein außerordentlicher Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Peggy und Lutz, für die Ermöglichung meines Studiums und die permanente Unterstützung während diesem.

## **12 Lebenslauf**

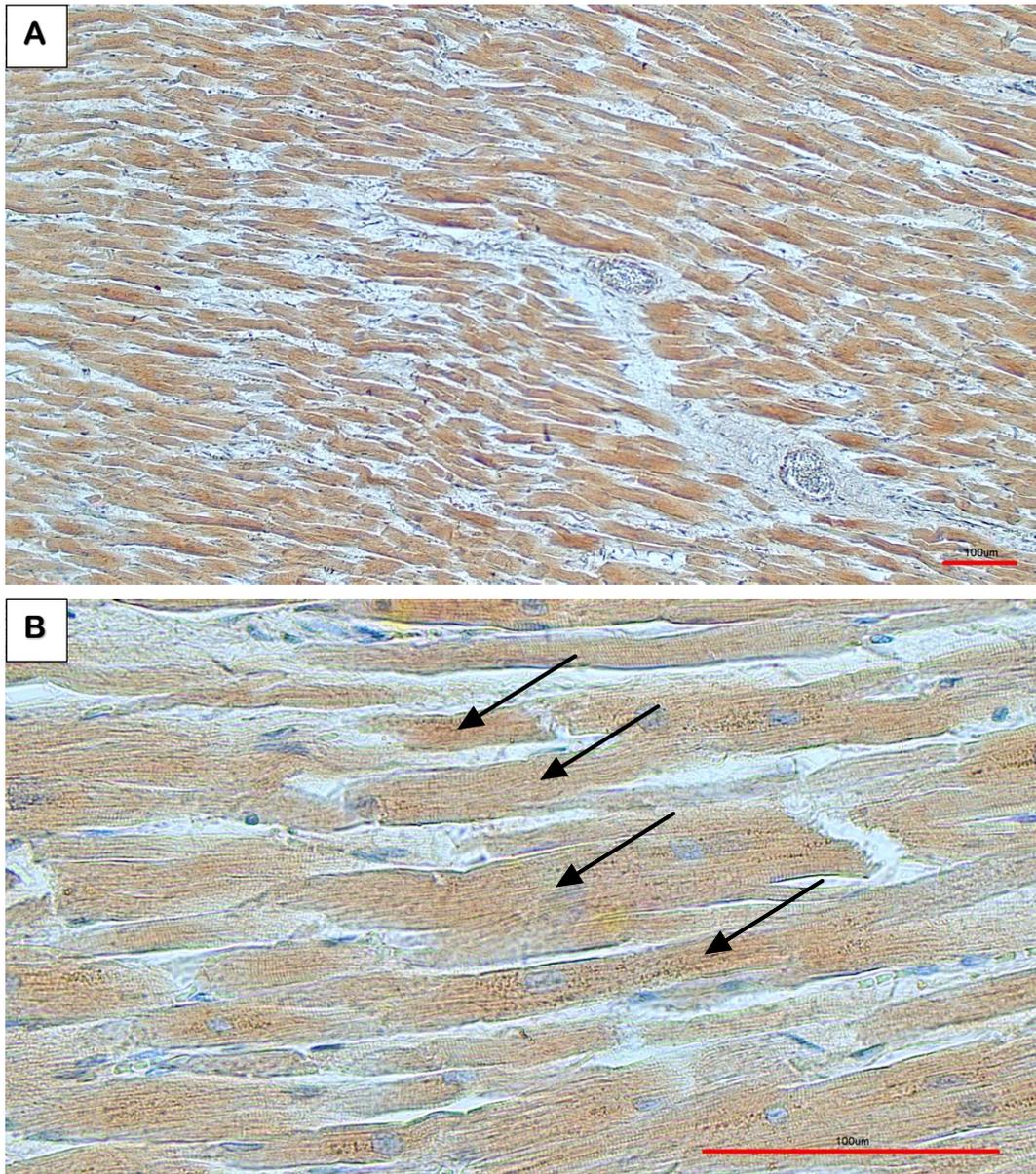
Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

## **13 Anhang**

Einmalig wurde zur Validierung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primärantikörpers ein Spezifitätsnachweis durchgeführt. Hierfür wurde ein Schnitt des muskulären Teils des interventrikulären Septums verwendet, welcher in der immunhistochemischen Färbung eine deutliche Braunfärbung gezeigt hatte (siehe Abbildung 59).

Während der Inkubation des Antikörpers mit dem Kontrollpeptid kam es zur Bindung der beiden Substanzen. Dadurch zeigte sich eine deutlich abgeschwächte Farbreaktion bei der im Anschluss durchgeführten immunhistochemischen Färbung (siehe Abbildung 60), die allerdings stärker war als solche der Negativkontrolle (siehe Abbildung 61).

Die Erstellung der Präparate erfolgte durch Tobias Jacobs im Rahmen seiner Dissertation.



*Abbildung 59 A, B: Positivkontrolle zu Spezifitätsnachweis*

Positivkontrolle der Probe aus dem muskulären Anteil des interventrikulären Septums, die für die Spezifitätskontrolle verwendet wurde. Der Schnitt zeigt eine deutliche Braunfärbung der Kardiomyozyten, wobei die Pfeile diese exemplarisch markieren

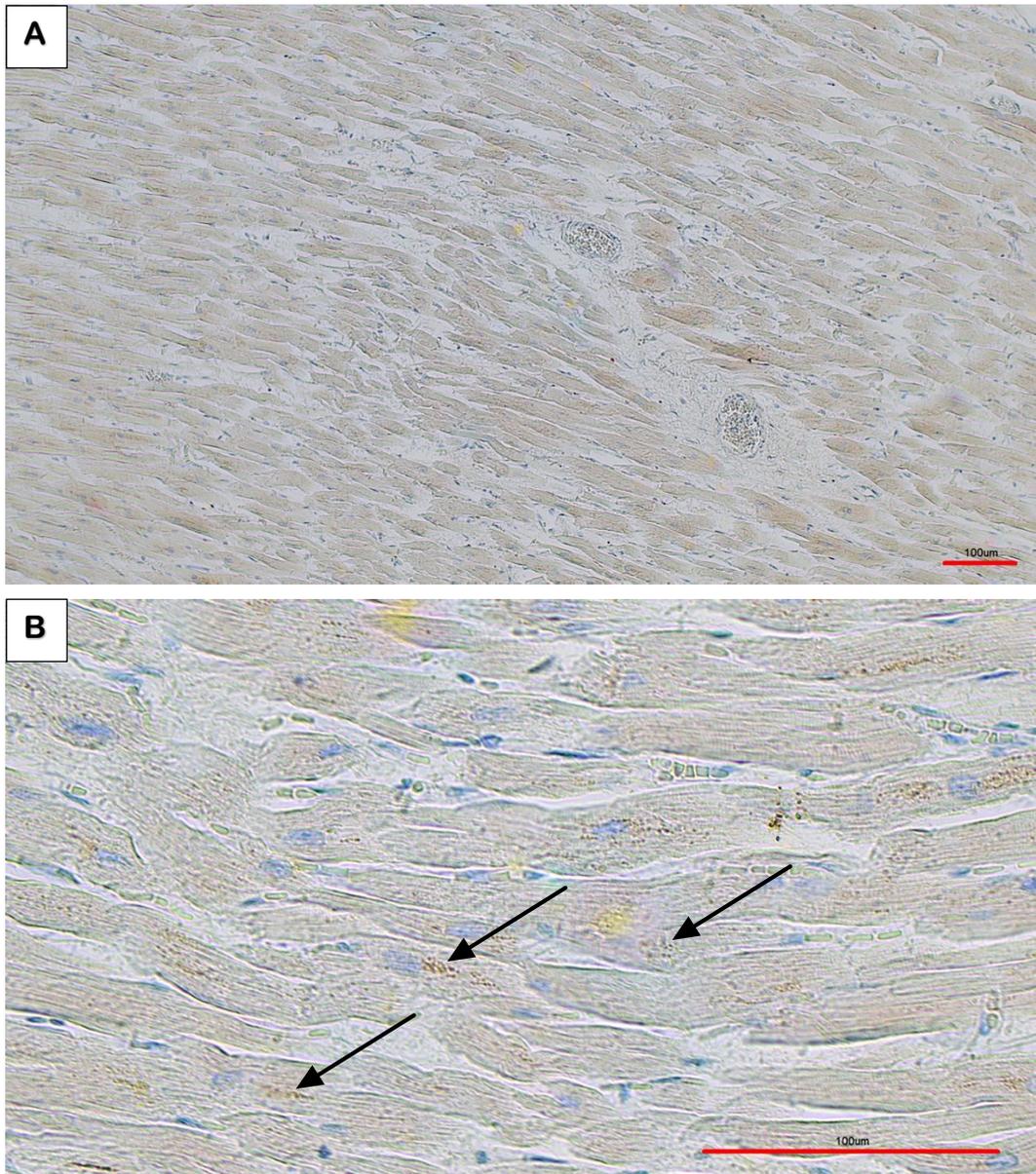
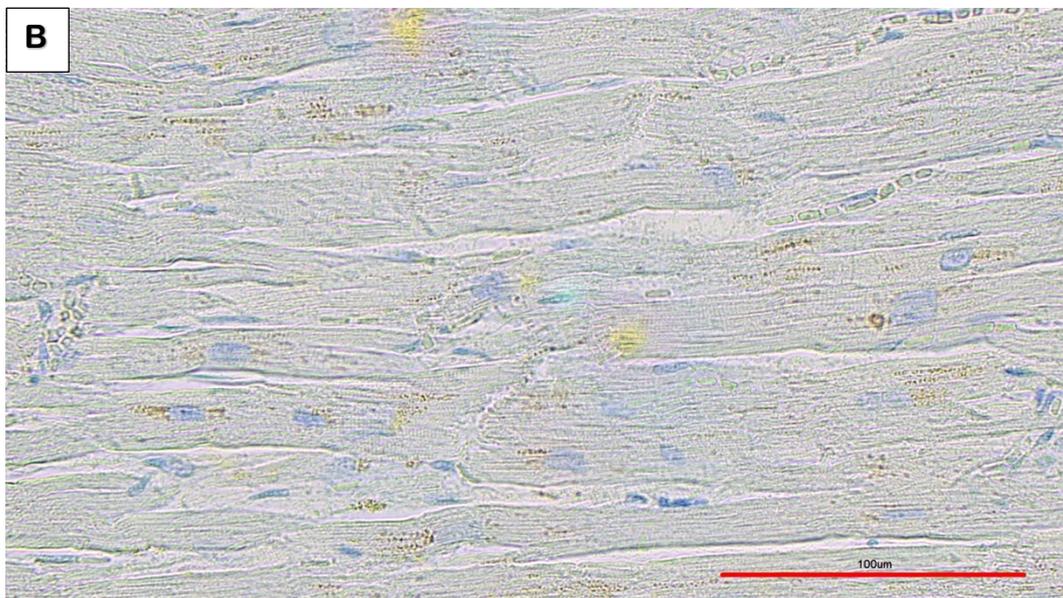
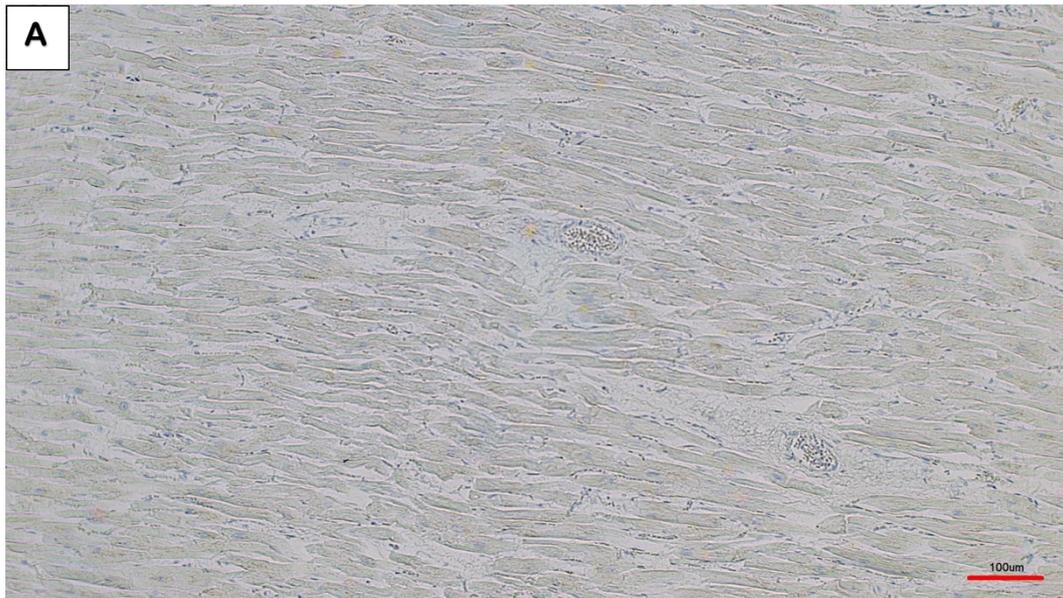


Abbildung 60 A, B: Spezifitätsnachweis

Spezifitätskontrolle zur Validierung des in der Arbeit verwendeten Primärantikörpers. Der Schnitt zeigt eine deutlich schwächere Farbreaktion als die Positivkontrolle, es sind aber dennoch vereinzelt braune Signale sichtbar. Einige von ihnen sind beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet. Es konnte somit gezeigt werden, dass das blockierende Peptid einen Großteil der gegen TRPC6-gerichteten Antikörper gebunden hat.



*Abbildung 61 A, B: Negativkontrolle zu Spezifitätsnachweis*

Negativkontrolle der Probe aus dem muskulären Anteil des interventrikulären Septums, die für die Spezifitätskontrolle verwendet wurde. Das Gewebe weist eine bläuliche Färbung auf und ist somit TRPC6-negativ.