

Aus dem Anatomischen Institut

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

**Immunhistochemischer Nachweis des nicht-selektiven  
Kationenkanals TRPC6 in lymphatischen Geweben des Menschen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von Felix Daum  
geboren am 11.08.1998 in Aschaffenburg

Tag der Promotion: 28.11.2024

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Univ.-Prof. Dr. med. Veit Flockerzi

Felix Daum

Universität des Saarlandes

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Kirrberger Straße 100, Geb. 61

66421 Homburg/Saar, Deutschland

E-Mail: [felixdaum1998@outlook.de](mailto:felixdaum1998@outlook.de)

*- Meinen Eltern Claudia und Volker -*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>VII</b>
<b>II. Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 TRP-Entdeckung und historische Aspekte .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 TRP-Superfamilie.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 TRPC6 Aufbau und Regulation .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4 TRPC6 und assoziierte Krankheiten.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5 Lymphatische Organe .....</b>	<b>9</b>
2.5.1 Genereller Aufbau von sekundären lymphatischen Organen .....	10
2.5.2 Lymphknoten.....	10
2.5.3 Milz .....	11
2.5.4 MALT .....	11
2.5.5 Thymus .....	12
<b>2.6 TRPC6 in lymphatischen Geweben.....</b>	<b>13</b>
<b>2.7 Fragestellungen dieser Arbeit.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Material &amp; Methoden .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Material und Geräte .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Generelles methodisches Vorgehen.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Ethikvotum.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Fixierung der Körperspender .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Entnahme der Proben.....</b>	<b>21</b>
3.5.1 Lymphknoten.....	21
3.5.2 Milz .....	21
3.5.3 Ileum.....	22
3.5.4 Appendix.....	22
3.5.5 Thymus .....	22
3.5.6 Tonsilla palatina.....	23
3.5.7 Übersicht der Proben .....	23
3.5.8 Vorbereitung der Einbettung der Proben.....	24
<b>3.6 Einbettung der Proben in Paraffin.....</b>	<b>24</b>

<b>3.7 Ausgießen der Proben .....</b>	<b>24</b>
<b>3.8 Anfertigung von Paraffinschnitten .....</b>	<b>25</b>
<b>3.9 Färbungen und Auswahl der Proben .....</b>	<b>25</b>
3.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	25
3.9.2 IHC-Färbung .....	29
<b>3.10 Auswertung und Statistik.....</b>	<b>33</b>
<b>4. <i>Ergebnisse.....</i></b>	<b>34</b>
<b>4.1. Lymphknoten .....</b>	<b>36</b>
4.1.1 Lymphknoten 1 - Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	36
4.1.2 Lymphknoten 1 - Immunhistochemie positiv.....	37
4.1.3 Lymphknoten 1 - Immunhistochemie negativ.....	38
4.1.4 Lymphknoten 2 - Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	39
4.1.5 Lymphknoten 2 - Immunhistochemie positiv .....	40
4.1.6 Lymphknoten 3 - Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	41
4.1.7 Lymphknoten 3 - Immunhistochemie positiv .....	42
4.1.8 Auswertung Lymphknoten .....	43
4.1.9 weitere nicht ausgewertete Beobachtungen - Lymphgefäß.....	44
<b>4.2 Milz .....</b>	<b>45</b>
4.2.1 Milz - Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	45
4.2.2 Milz - Immunhistochemie positiv .....	46
4.2.3 Milz - Immunhistochemie negativ .....	47
4.2.4 Auswertung Milz.....	48
<b>4.3 Tonsilla palatina .....</b>	<b>49</b>
4.3.1 Tonsilla palatina - Sekundärfollikel - Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	49
4.3.2 Tonsilla palatina - Sekundärfollikel - Immunhistochemie positiv .....	50
4.3.3 Tonsilla palatina - Sekundärfollikel - Immunhistochemie negativ.....	51
4.3.4 Tonsilla palatina - Krypte mit FAE - Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	52
4.3.5 Tonsilla palatina - Krypte mit FAE - Immunhistochemie positiv .....	53
4.3.6 Tonsilla palatina - Krypte mit FAE - Immunhistochemie negativ .....	54
4.3.7 Tonsilla palatina - HEV - Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	55
4.3.8 Tonsilla palatina - HEV - Immunhistochemie positiv .....	56
4.3.9 Tonsilla palatina - HEV - Immunhistochemie negativ .....	57
4.3.10 Auswertung Tonsilla palatina .....	58
4.3.11 Weitere nicht ausgewertete Beobachtungen - Bindegewebe im Vergleich zur Speicheldrüse .....	59
<b>4.4 Ileum (gut-associated lymphatic tissue) .....</b>	<b>60</b>
4.4.1 Ileum - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 4x.....	60
4.4.2 Ileum - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 10x.....	61
4.4.3 Ileum - Immunhistochemie - positiv - 4x .....	62
4.4.4 Ileum - Immunhistochemie - positiv - 10x .....	63

4.4.5 Ileum - Immunhistochemie - negativ - 4x.....	64
4.4.6 Ileum - Immunhistochemie - negativ - 10x.....	65
4.4.7 Auswertung Ileum .....	66
<b>4.5 Appendix (gut-associated lymphatic tissue).....</b>	<b>67</b>
4.5.1 Appendix - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 4x.....	67
4.5.2 Appendix - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 10x.....	68
4.5.3 Appendix - Immunhistochemie - positiv - 4x.....	69
4.5.4 Appendix - Immunhistochemie - positiv - 10x.....	70
4.5.5 Appendix - Immunhistochemie - negativ - 4x.....	71
4.5.6 Appendix - Immunhistochemie - negativ - 10x.....	72
4.5.7 Auswertung Appendix .....	73
4.5.8 weitere nicht ausgewertete Beobachtungen - FALC .....	74
<b>4.6 Thymus.....</b>	<b>75</b>
4.6.1 Thymus - Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	75
4.6.2 Thymus - Immunhistochemie - positiv .....	76
4.6.3 Thymus - Immunhistochemie - negativ .....	77
4.6.4 Auswertung Thymus.....	78
<b>5. <i>Diskussion</i>.....</b>	<b>79</b>
<b>5.1 Ergebnisdiskussion .....</b>	<b>79</b>
5.1.1 Lymphozyten .....	79
5.1.2 Peyer-Patches und FAE in MALT.....	80
5.1.3 Bindegewebe.....	80
5.1.4 Gefäße .....	80
5.1.5 HEV .....	80
5.1.6 Lymphknoten.....	81
5.1.7 Thymus .....	81
<b>5.2 Methodendiskussion .....</b>	<b>81</b>
<b>5.3 Zusammenfassung und Perspektive.....</b>	<b>83</b>
<b>6. <i>Literaturverzeichnis</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>7. <i>Publikationen</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>8. <i>Dank</i> .....</b>	<b>93</b>
<b>9. <i>Lebenslauf</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>10. <i>Anhang</i> .....</b>	<b>95</b>

# I. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

## Abbildungen

Abbildung 1 - TRPC6 Aufbau in Untereinheit und Homotetramer .....	7
Abbildung 2 - TRPC6 Aktivierung ROCE .....	8
Abbildung 3 - methodisches Vorgehen.....	19
Abbildung 4 - Präparation der Arteria femoralis superficialis.....	20
Abbildung 5 - Probeentnahmestellen der untersuchten Organe.....	21
Abbildung 6 - sichtbarer Thymus .....	22
Abbildung 7 - schematische Darstellung der Entparaffinierung bei der HE-Färbung.....	26
Abbildung 8 - schematische Darstellung der HE-Färbung .....	27
Abbildung 9 - schematische Darstellung der Entwässerung bei der HE-Färbung.....	27
Abbildung 10 - schematische Darstellung der Eindeckung der HE-Färbung .....	28
Abbildung 11 - indirekte Immunhistochemie schematische Darstellung .....	29
Abbildung 12 - schematische Darstellung der Entparaffinierung bei der IHC-Färbung .....	30
Abbildung 13 - schematische Darstellung der Blockierung .....	31
Abbildung 14 - schematische Darstellung des Auftragens der NGS-Lösung.....	31
Abbildung 15 - schematische Darstellung des Auftragens des Primärantikörpers .....	32
Abbildung 16 - Auswertungsschema der IHC-Färbungen.....	34
Abbildung 17 - Lymphknoten 1 - HE-Färbung.....	36
Abbildung 18 - Lymphknoten 1 - IHC-Färbung positiv .....	37
Abbildung 19 - Lymphknoten 1 - IHC-Färbung negativ .....	38
Abbildung 20 - Lymphknoten 2 - HE-Färbung.....	39
Abbildung 21 - Lymphknoten 2 - IHC-Färbung positiv .....	40
Abbildung 22 - Lymphknoten 3 - HE-Färbung.....	41
Abbildung 23 - Lymphknoten 3 - IHC-Färbung positiv .....	42
Abbildung 24 - Auswertung Lymphknoten .....	43
Abbildung 25 - Lymphknoten 3 mit efferentem Lymphgefäß.....	44
Abbildung 26 - Milz 1 HE-Färbung.....	45
Abbildung 27 - Milz 1 IHC-Färbung .....	46
Abbildung 28 - Milz 1 Negativkontrolle.....	47
Abbildung 29 - Auswertung der IHC-Färbung der Milz .....	48
Abbildung 30 - Tonsilla palatina 1 - Follikel - HE-Färbung .....	49
Abbildung 31 - Tonsilla palatina 1 - Follikel - IHC-Färbung positiv .....	50
Abbildung 32 - Tonsilla palatina 1 - Follikel - IHC-Färbung negativ .....	51
Abbildung 33 - Tonsilla palatina 1 - Krypte mit FAE - HE-Färbung.....	52
Abbildung 34 - Tonsilla palatina 1 - Krypte mit FAE - IHC-Färbung positiv .....	53
Abbildung 35 - Tonsilla palatina 1 - Krypte mit FAE - IHC-Färbung negativ.....	54

Abbildung 36 - Tonsilla palatina 1 - HEV - HE-Färbung.....	55
Abbildung 37 - Tonsilla palatina 1 - HEV - IHC-Färbung positiv .....	56
Abbildung 38 - Tonsilla palatina 1 - HEV - IHC-Färbung negativ .....	57
Abbildung 39 - Auswertung der IHC-Färbung der Tonsilla palatina .....	58
Abbildung 40 - Bindegewebe der Tonsilla palatina 3 im Vergleich zur Speicheldrüse .....	59
Abbildung 41 - Ileum 1 - HE-Färbung - 4x .....	60
Abbildung 42 - Ileum 1 - HE-Färbung - 10x .....	61
Abbildung 43 - Ileum 1 - IHC-Färbung - positiv - 4x.....	62
Abbildung 44 - Ileum 1 - IHC-Färbung - positiv - 10x.....	63
Abbildung 45 - Ileum 1 - IHC-Färbung - negativ - 4x.....	64
Abbildung 46 - Ileum 1 - IHC-Färbung - negativ - 10x.....	65
Abbildung 47 - Auswertung der IHC-Färbung des Ileums .....	66
Abbildung 48 - Appendix 1 - HE-Färbung - 4x.....	67
Abbildung 49 - Appendix 1 - HE-Färbung - 10x.....	68
Abbildung 50 - Appendix 1 - IHC-Färbung - positiv - 4x .....	69
Abbildung 51 - Appendix 1 - IHC-Färbung - positiv - 10x .....	70
Abbildung 52 - Appendix 1 - IHC-Färbung - negativ - 4x .....	71
Abbildung 53 - Appendix 1 - IHC-Färbung - negativ - 10x .....	72
Abbildung 54 - Auswertung der IHC-Färbung der Appendix .....	73
Abbildung 55 - FALC im Meso der Appendix 1 .....	74
Abbildung 56 - Thymus 1 - HE-Färbung .....	75
Abbildung 57 - Thymus 1 - IHC-Färbung - positiv .....	76
Abbildung 58 - Thymus 1 - IHC-Färbung - negativ .....	77
Abbildung 59 - Auswertung der IHC-Färbung des Thymus.....	78

## Tabellen

Tabelle 1 - verwendete Geräte .....	16
Tabelle 2 - verwendete Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 3 - verwendete Lösungen, Chemikalien und Antikörper .....	18
Tabelle 4 - Übersicht der Proben .....	23
Tabelle 5 - Stationen am Karussellgewebeeinbetter .....	24
Tabelle 6 - Zuordnung der Körperspender und Patienten der ausgewerteten Proben.....	35

## II. Verzeichnis der Abkürzungen

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>ca.</b>	circa
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calciumkationen
<b>Cs<sup>+</sup></b>	Caesiumkationen
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
<b>ERK</b>	extrazellulär regulierte Kinase
<b>FALC</b>	fat-associated lymphoid cluster
<b>FAE</b>	Follikel assoziiertes Epithel
<b>FSGS</b>	fokale und segmentale Glomerulosklerose
<b>G</b>	Gauge
<b>GALT</b>	gut-associated lymphatic tissue
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HEV</b>	hochendotheliale Venole
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>IL-13</b>	Interleukin-13
<b>IL-5</b>	Interleukin-5
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
<b>IPAH</b>	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
<b>K<sup>+</sup></b>	Kaliumkationen
<b>La<sup>3+</sup></b>	Lanthankationen
<b>M-Zellen</b>	Microfold-Zellen
<b>MALT</b>	mucosa associated lymphoid tissue
<b>min</b>	Minuten
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natriumkationen
<b>MZ</b>	Marginalzone
<b>NPSLE</b>	neuropsychiatrischer systemischer Lupus Erythematoses
<b>PALS</b>	periarterioläre Lymphozyten Scheide
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PIP<sub>2</sub></b>	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>ROCE</b>	receptor-operated Ca <sup>2+</sup> entry
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<b>SOCE</b>	store-operated Ca <sup>2+</sup> entry
<b>Th2</b>	T-Helferzelle 2
<b>TRP</b>	transient receptor potential

# 1. Zusammenfassung

**Hintergrund:** TRPC6 ist ein von Diacylglycerin aktiverter unselektiver Kationenkanal, der hauptsächlich für Calciumionen durchlässig ist. Er ist der Teil der TRP-Superfamilie, wird in den meisten Geweben exprimiert und kann im Rahmen physiologischer aber auch pathophysiologischer Calciumsignale mit Erkrankungen wie der fokal-segmentalen Glomerulosklerose, idiopathischer pulmonal arterieller Hypertonie oder kardialer Hypertrophie in Verbindung gebracht werden. Auch an malignen Prozessen wie der Proliferation von Brust oder Magenkrebszellen ist der Kanal beteiligt. Die Differenzierung von Bindegewebe steht ebenfalls mit TRPC6 in Verbindung. Der Kationenkanal scheint jedoch auch immunologische Funktionen innezuhaben, da er die Permeabilität von Endothelien reguliert, mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wird und die Proliferation von B-Zell Lymphomzellen fördert. In menschlichen lymphatischen Geweben ist der Kanal bisher nur auf mRNA-Niveau oder in vereinzelten lymphatischen Zellreihen mittels Western Blot erforscht, ein direkter Nachweis konnte bisher nicht erfolgen, deshalb soll in dieser Arbeit das menschliche lymphatische Gewebe mittels Immunhistochemie untersucht werden.

**Methoden:** Die Untersuchung der lymphatischen Gewebe auf den TRPC6 Kanal erfolgte an Körperspendern des anatomischen Instituts Homburg. Betrachtet wurden die lymphatischen Organe Lymphknoten, Milz, Tonsilla palatina, gut-associated lymphoid tissues (Ileum und Appendix veriformis) sowie Thymus. Insgesamt wurden 102 Proben gewonnen, die der HE-Färbung zugeführt werden konnten. Die HE-Färbung diente der Identifizierung der besten fünf Proben (sortiert nach morphologischer Beurteilbarkeit und Autolyse) des jeweiligen Organs, die dann der immunhistochemischen Färbung zugeführt wurden. Eine Ausnahme stellten die Proben der Tonsilla palatina dar, die von der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikum des Saarlandes bereitgestellt wurden. Hier erfolgte die immunhistochemische Untersuchung aller drei zur Verfügung gestellten Präparate. Die Immunfärbung erfolgte mit einem Knockout-validierten Anti-TRPC6 Antikörper, einem mit Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundärantikörper sowie Diaminobenzidin als Chromogen.

Alle Arbeitsschritte von Organentnahme über Paraffineinbettung, Schneiden mit dem Mikrotom, HE- und immunhistochemische Färbung bis zur Eideckung und lichtmikroskopischer Auswertung wurden von mir selbst durchgeführt mit der Ausnahme der Tonsillen Proben, die bereits im paraffinierten Zustand übergeben wurden.

**Ergebnisse:** Die durchgeführten Immunfärbungen belegen das Vorkommen von TRPC6 in allen untersuchten lymphatischen Geweben. Lymphozyten in Lymphknoten, Milz, Tonsilla palatina, Thymus und gut-associated lymphatic tissues in Ileum und Appendix veriformis zeigten ein positives Färbesignal, wobei das Signal im Thymus durchschnittlich am schwächsten war. Auch das folikelassoziierte Epithel der Tonsilla palatina, des Ileums und der Appendix wies einen braunen Farbumschlag des Chromogens auf. Alle angeschnittenen Gefäße lymphatischer Organe, insbesondere

die Trabekelarterien der Milz, die submukösen Gefäße der Appendix und des Ileums sowie die angeschnittenen Lymphgefäß der Lymphknoten zeigten ein positives Farbsignal. Auch in den hochendothelialen Venolen, die in der Tonsille beobachtet werden konnten, manifestierte sich eine braune Färbung.

**Schlussfolgerung und Ausblick:**

Die durchgeführten Experimente weisen auf ein ubiquitärer Vorkommen des TRPC6-Kanals in lymphatischen Geweben hin, welches mit dem aktuellen Stand der TRPC6-Forschung in Einklang zu bringen ist und die physiologische, aber auch pathophysiologische Relevanz des TRPC6-vermittelten Calciumeinstroms in die Zelle und der dadurch beeinflussten Signalwege unterstreicht. Die größte Limitation der Studie stellt das hohe Alter der Körperspender dar, sodass hier weitere Untersuchungen an jungen humanen Geweben notwendig sind, um den Störfaktor der altersbedingten histomorphologischen Veränderungen auszuschalten.

## Abstract

**Background:** TRPC6 is a non-selective cation channel that is activated by diacylglycerol and is mainly permeable to calcium ions. It belongs to the TRP superfamily, is expressed in most tissues, and has been associated with diseases such as focal segmental glomerulosclerosis, idiopathic pulmonary arterial hypertension, and cardiac hypertrophy in the context of both physiological and pathophysiological calcium signaling. The TRPC6 channel is involved in various processes, including the proliferation of breast or gastric cancer cells and the differentiation of connective tissue. Additionally, it has immunological functions, regulating the permeability of endothelia and promoting the proliferation of B-cell lymphoma cells. It is also associated with autoimmune diseases. The investigation of the channel in human lymphoid tissues has so far been limited to mRNA analysis or Western blotting of isolated lymphoid cell lines. This study aims to directly detect the channel in human lymphoid tissue using immunohistochemistry.

**Methods:** The TRPC6 channel in lymphatic tissues was analyzed using body donors from the Homburg Anatomical Institute. The lymphatic organs analyzed included lymph nodes, spleen, palatine tonsil, gut-associated lymphoid tissues (ileum and veriform appendix), and thymus. A total of 102 samples were obtained and subjected to HE staining. The purpose of HE staining was to identify the five best samples of the respective organ, sorted according to morphological assessability and autolysis. These samples were then subjected to immunohistochemical staining. The samples of the palatine tonsil, provided by the Department of Otorhinolaryngology at Saarland University Hospital, are an exception. Here, all three specimens were subjected to immunohistochemical examination. Immunostaining was carried out using a knockout-validated anti-TRPC6 antibody and a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. Diaminobenzidine was used as a chromogen.

All steps, including sample collecting, paraffin embedding, microtome sectioning, HE and immunohistochemical staining, mounting, and light microscopic analysis were performed by the author, except for the tonsil samples, which were provided in a paraffin-embedded state.

**Results:** The conducted immunostainings confirmed the presence of TRPC6 in all the examined lymphatic tissues. Lymphocytes in lymph nodes, spleen, palatine tonsil, thymus, and gut-associated lymphatic tissues in ileum and veriform appendix exhibited a positive staining signal, with the signal in the thymus being the weakest on average. The follicle-associated epithelium of the palatine tonsil, ileum, and appendix also demonstrated a brown color change in the chromogen. All incised vessels of lymphatic organs, particularly the trabecular arteries of the spleen, the submucosal vessels of the appendix and ileum, as well as the incised lymphatic vessels of the lymph nodes, exhibited a positive color signal. The high endothelial venules, which could be observed in the tonsil, also demonstrated a brown coloration.

## Conclusion and outlook:

The experiments performed indicate a ubiquitous occurrence of the TRPC6 channel in lymphoid tissues, which is consistent with the current state of TRPC6 research and underlines the physiological and

pathophysiological relevance of TRPC6-mediated calcium influx into the cell and the signaling pathways influenced by it. The greatest limitation of the study is the advanced age of the body donors, so further investigations on young human tissues are necessary to eliminate the confounding factor of age-related histomorphological changes.

## 2. Einleitung

Die TRP-Kanalfamilie ist eine Familie unselektiver Kationenkanäle, von denen die meisten für Calciumkationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) durchlässig sind [1]. Änderungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration spielen eine zentrale Rolle bei grundlegenden Prozessen in der Zelle. Dazu gehören z.B. die Muskelkontraktion, die Freisetzung von Transmittern, aber auch Signale für Zellproliferation, Gentranskription und Zelltod [2]. TRP-Kanäle sind an der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt, entweder durch direkten Calciumeinstrom oder durch Modulation des Membranpotentials [3].

TRP-Kanäle werden in den meisten menschlichen Geweben und Organen exprimiert und mit verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in Verbindung gebracht.

In Lymphozyten spielen TRP-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Entzündungsreaktion des Immunsystems [4]. Die Kanäle sind daher Gegenstand aktueller Forschung.

### 2.1 TRP-Entdeckung und historische Aspekte

Die Entdeckung der TRP-Kanäle im Jahre 1969 geht auf eine Mutante der *Drosophila melanogaster* Fruchtfliege zurück, die unter anhaltender Lichteinstrahlung eine nachlassende Photorezeptorantwort bis hin zur Blindheit zeigte [5]. Im Gegensatz zur Wildtypfliege zeigte diese Mutante einen transienten und nicht anhaltenden Strom und wurde deswegen TRP (transient receptor potential) Mutante genannt [6]. In gedimmtem Licht konnte dieses Phänomen jedoch nicht beobachtet werden, sodass man davon ausging, dass es sich bei dem in der Mutante veränderten Rezeptor nicht um eine direkten Photorezeptor handelte, sondern eine Veränderung im weiteren Verlauf der Signalkaskade [7].

Im Jahre 1988 konnte von *Bloomquist* durch biochemische Analysen nachgewiesen werden, dass die Phototransduktion der *Drosophila* durch die Phospholipase C (PLC) vermittelt wird [8]. Ein Jahr später wurde von *Montell* und *Rubin* nachgewiesen, dass das TRP-Gen für ein Polypeptid mit 6-8 Membranhelices kodiert, das Ähnlichkeiten zu Rezeptoren bzw. Transportproteinen wie dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zeigt [9]. Die zeitgleiche Erkenntnis von *Hochstrate*, dass kleine Konzentrationen von Lanthankationen ( $\text{La}^{3+}$ ) den TRP-Phänotyp der *Drosophila* in der Schmeißfliege nachahmen konnte, lieferte Hinweise darauf, dass es sich bei dem TRP-Kanal um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Membrankanal handeln könnte, da  $\text{La}^{3+}$  ein Inhibitor des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist [10]. In Zusammenschau damit, dass bei der Mutante niedrigere Spiegel von  $\text{Ca}^{2+}$  vorlagen, konnte somit die Vermutung aufgestellt werden, dass es sich um einen Kanal handeln muss, der die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration aufrecht erhält [11]. Durch technischen Fortschritt gelang es 1991 *Hardie* nachzuweisen, dass ein ausgelöster Strom über den lichtsensiblen Kanal der *Drosophila* primär selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  war [12]. Diese Erkenntnis warf ein Paradoxon auf, da die TRP-Mutante nach wie vor eine elektrische Reaktion auf einen gedimmten Lichtreiz zeigte und man deswegen weiter davon ausging, dass die TRP-Mutation nicht direkt den Photorezeptor betreffen konnte. Wenn jedoch der lichtsensible Kanal primär selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  ist, gibt es keine Erklärung für einen Kanal, der die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher aufrecht erhält [13]. Eine Lösung dieses Paradoxons ging unter anderem durch Forschungsarbeit an anderen wirbellosen Tieren wie des *Limulus* hervor, bei dem mehrere Photorezeptoren beschrieben wurden und somit bei Ausfall

oder Blockierung eines der Rezeptoren trotzdem noch eine, wenn doch eine veränderte, Antwort auf einen Lichtreiz gemessen werden konnte [14].

Somit kamen *Minke* und *Hardie* schlussendlich zur Erkenntnis, dass der TRP-Kanal ein Transmembranprotein mit den Eigenschaften eines Ionenkanals darstellt, der Signalwege der PLC aktiviert wird und primär Calcium transportiert [15].

1995 konnte im Labor von *Birnbaumer* und gleichzeitig im Labor von *Montell* der erste TRP-Kanal im Säugetier nachgewiesen werden, der eine Ähnlichkeit zu dem der *Drosophila* zeigte und deswegen zunächst „classical“ TRPC1 genannt wurde [16], [17]. Die sechs weiteren Familien der TRP-Superfamilie wurden zwischen den Jahren 1997 und 2003 entdeckt [13].

## 2.2 TRP-Superfamilie

Die TRP-Superfamilie wird in sieben Familien unterteilt. Die Mitglieder einer Familie zeigen jeweils die größte Ähnlichkeit innerhalb der Transmembrandomänen [3]. Die Familie mit der größten Homologie zu dem in der *Drosophila* entdeckten Kanal wird als TRPC (canonical – „vorschriftsmäßig, anerkannt“) bezeichnet. Die Familie TRPV (vanilloid) ist nach dem ersten Mitglied dieser Familie benannt, das den Namen TRPV1 (früher vanilloid receptor 1) trägt. Die Familie mit Homologie zum melastin-1 wird als TRPM bezeichnet. Die Familie TRPP und TRPML bekommen ihre Namen, da sie Polycystin und Mucolipin beinhalten. Die TRPA-Familie ist nach ihrer Vielzahl von ankryin repeats benannt [18]. Zuletzt ist die TRPN-Familie (NOMP, no mechanopotential) zu nennen, bei der Genomuntersuchungen darauf hinweisen, dass dieser Kanal im Säugetier nicht exprimiert wird [3].

## 2.3 TRPC6 Aufbau und Regulation

Im Säugetier wurden bis jetzt sieben Untereinheiten der TRPC-Familie beschrieben (TRPC1-7), wobei TRPC2 im Menschen ein Pseudogen darstellt und somit nicht exprimiert wird [16]. Die Subfamilie kann nochmals aufgrund von Homologien in den Aminosäuresequenzen unterkategorisiert werden: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 [19]. Alle TRPC-Kanäle sind aus sechs transmembran  $\alpha$  Helices aufgebaut (S1-S6) von denen die ersten vier eine Domäne bilden, die ähnlich der Spannungssensordomäne eines spannungsgesteuerten Ionenkanals ist, wie beispielsweise des spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Die beiden letzten dienen der Bildung einer Pore, die der Leitung von Ionen dient. Auch diese Domäne ist von spannungsgesteuerten Kanälen bekannt [20]. Diese sechs Transmembrandomänen bilden ein Monomer. Vier dieser Monomere setzen sich dann zu einem Tetramer zusammen, dass den funktionellen TRPC-Kanal bildet [21]. Hierbei sind sowohl die Bildung von Homotetrameren, wie beispielsweise viermal TRPC6 als auch Heterotetramere möglich, wobei sich die Heterotetramerbildung auf die einzelnen Subgruppierungen beschränkt (beispielsweise TRPC3/6/7) [22].

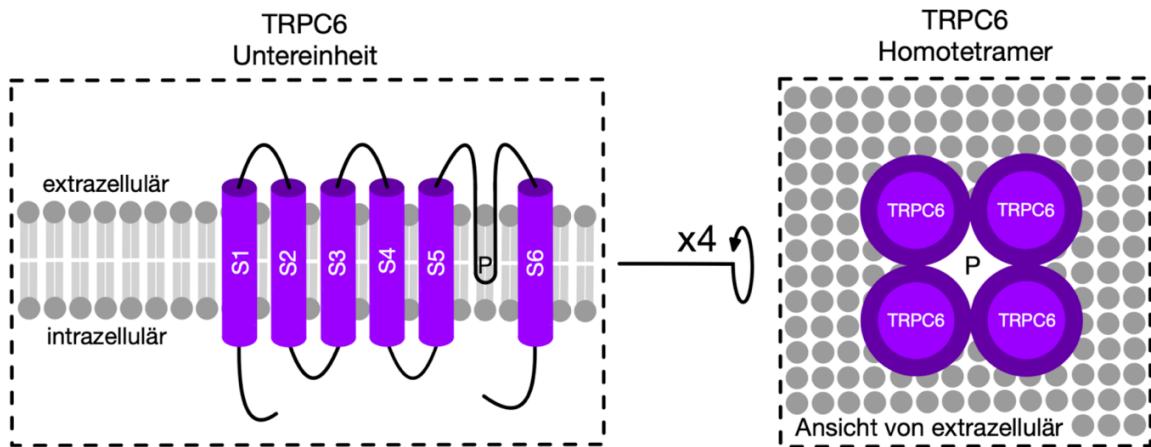


Abbildung 1 - TRPC6 Aufbau in Untereinheit und Homotetramer

Abbildung 1 zeigt den Aufbau einer TRPC6-Untereinheit mit ihren sechs transmembranären  $\alpha$ -Helices (S1-S6), die zwischen S5 und S6 liegende Pore (P) sowie die Zusammensetzung vier dieser Untereinheiten in einen funktionellen TRPC6-Kanal als Homotetramer in Anlehnung an [23], [24]. Die Regulation der TRPC-Kanäle stellt ein komplexes Studienfeld dar, bei dem verschiedenste Mechanismen diskutiert werden [20]. Alle TRP-Kanäle und so auch TRPC6 benötigen PLC zur Aktivierung [25], [26]. Am ehesten durch einen  $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptor wird der PLC Pathway gestartet und arbeitet über die Hydrolyse von phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) an der Plasmamembran zu inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) und diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> kann dann IP<sub>3</sub>-Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum aktivieren [20]. DAG zeigt sich als direkter Aktivator des TRPC6 Kanals [27]. Diese Form der Aktivierung und der so bedingte  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Zelle wird als receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (ROCE) bezeichnet [28]. Jedoch scheint DAG nicht die einzige Möglichkeit zur Aktivierung der Kanäle zu sein [29]. Eine weitere Möglichkeit könnte eine Aktivierung im Rahmen des store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) zu sein, bei dem die TRPC-Kanäle zusammen mit den Orai-Kanälen eine Einheit bilden könnte, die bei einem Nachlass der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration in intrazellulären Speichern aktiviert wird [30]. Diese Möglichkeit der Aktivierung wird jedoch sehr kontrovers diskutiert, da sie nie endgültig im elektrophysiologischen Experiment bewiesen werden konnte [20].

Der TRPC6 ist primär permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ , jedoch konnte auch eine Durchlässigkeit für monovalente Kationen wie Caesium ( $\text{Cs}^+$ ), Natrium ( $\text{Na}^+$ ), und Kalium ( $\text{K}^+$ ) gezeigt werden. Die Durchlässigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  ist hierbei ungefähr fünfmal so hoch wie für  $\text{Na}^+$  [27].

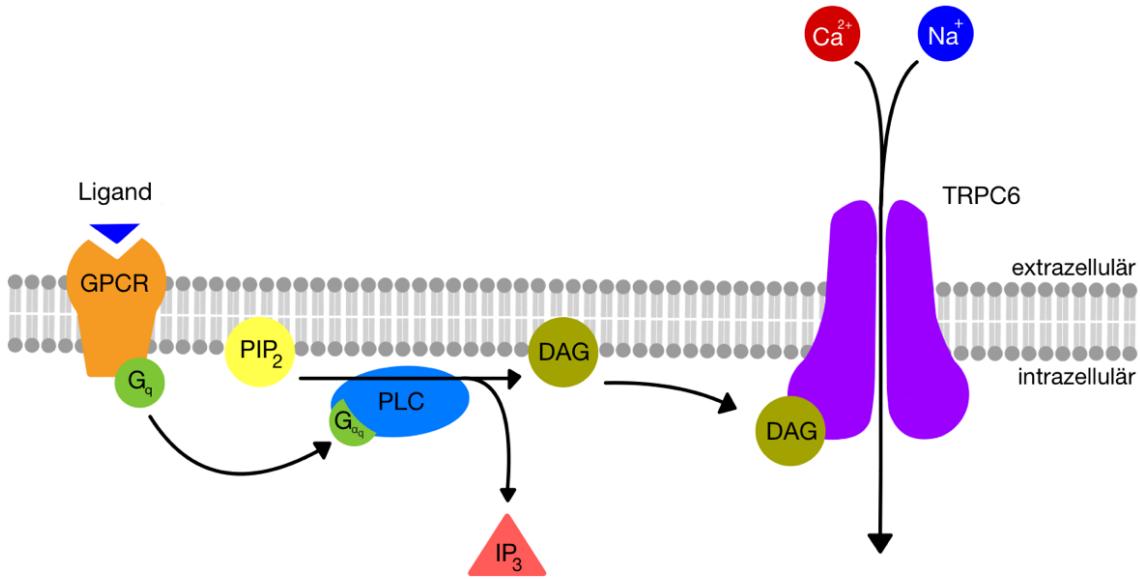


Abbildung 2 - TRPC6 Aktivierung ROCE

Abbildung 2 zeigt die Aktivierung des TRPC6 Kanals im Rahmen des ROCE in Anlehnung an [31].

## 2.4 TRPC6 und assoziierte Krankheiten

TRPC6 kann mit mehreren Erkrankungen in Beziehung gebracht werden, wobei bisher nur wenige Krankheitsbilder auf eine direkte Channelopathie zurückgeführt werden konnten [3]. Eines dieser wenigen Krankheitsbilder stellt die fokale und segmentale Glomerulosklerose (FSGS) dar. TRPC6 ist ein wesentlicher Bestandteil der Schlitzmembran der Niere. Bei entsprechender Mutation des TRPC6-Gens kommt es zur Erkrankung, wobei ein möglicher Pathomechanismus ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Overload der Zelle im Rahmen einer gain of function Mutation zu sein scheint [32], [33].

Außerdem sind verschiedenste indirekte Zusammenhänge des TRPC6 Kanals mit Krankheitsbildern beschrieben, wie durch Symptome von TRPC6-Knockout Mäusen oder erhöhte TRPC6-Expression bei Patienten oder Versuchstieren mit der jeweiligen Erkrankung [3].

So wird TRPC6 mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie (PAH) in Verbindung gebracht. Die TRPC6-Expression ist bei Patienten mit PAH signifikant erhöht. Diese Überexpression scheint zu Proliferation von glatter Muskulatur in den Lungenarterien zu führen [34]. Außerdem wurde eine Verbindung zwischen TRPC6 und der Angiotensin-2 vermittelten Herzhypertrophie beschrieben [35]. TRPC6 scheint außerdem eine wichtige Rolle in denen mit Krebs assoziierten Signalwegen der Zelle, wie Differenzierung, Proliferation oder Zelltod, zu spielen [36]. Es konnte nachgewiesen werden, dass TRPC6 in Tumorzellen des Brustkrebses überexprimiert wird und mit der Proliferation der Zellen in Verbindung steht. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme in die Tumorzellen scheinen erhöht zu sein, wobei die genauen Signalwege weitestgehend unbekannt sind [24].

Die Entdeckung verschiedenster Aktivatoren des TRPC6-Kanals, wie beispielsweise Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine, und dessen experimentelle Testung als Kandidat für ein Antikrebs Therapeutikum zeigen

einen Zusammenhang zwischen TRPC6 und Magenkrebs sowie das riesige Potential hinter der TRP-Forschung auf [37].

Eine wesentliche Rolle scheint TRPC6 außerdem in der Aktivierung von Fibroblasten und Bildung von Fibrose im menschlichen dermalen- sowie murinen Lungen- Bindegewebe zu spielen [38], [39]. In intestinale Fibroblasten in der Niere der Maus scheint der Kanal ebenfalls an der Fibrosebildung beteiligt zu sein [40].

Dies liefert Hinweise darauf, dass TRPC6 wohlmöglich ubiquitär im Bindegewebe exprimiert wird. Ein direkter Nachweis des Proteins im menschlichen Bindegewebe lymphatischer Organe ist jedoch bisher noch nicht erfolgt.

Eine Rolle von TRPC6 wird außerdem in der Ätiologie von Autoimmunerkrankungen gesehen. Es konnte ein Nachweis erbracht werden, dass TRPC6 mit der Entstehung der neuropsychiatrischen Manifestation des systemischen Lupus Erythematodes (NPSLE) in Verbindung steht. Ein entsprechender SNP (Single Nucleotide Polymorphism) scheint vor der Entstehung des NPSLEs zu schützen [41].

In einer 2016 durchgeführten Studie zum chronischen Fatigue-Syndrom, konnte an B-Lymphozyten gezeigt werden, dass manche Patienten über SNPs auf dem TRPC6 Gen verfügten. Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer durch den TRPC6 SNP bedingten Calciumdysregulation wird von den Autoren vermutet [42].

Außerdem konnte in einer 2014 angefertigten Studie zum Zusammenhang von Statinen und der Proliferation humaner Burkitt-Lymphom Zellen der Nachweis erbracht werden, dass eine verminderte TRPC6 Expression die Proliferation maligner B-Lymphozyten inhibiert. Die Autoren vermuten, dass der durch TRPC6 vermittelte Anstieg an  $\text{Ca}^{2+}$  die Proliferation der Zelle fördert [43].

## 2.5 Lymphatische Organe

Es folgt eine kurze Einführung zu den lymphatischen Organen mit Aufbau und Funktion in Anlehnung an das von Aust verfasste Kapitel „Blut und lymphatische Organe – Grundlagen“ der 5. Auflage der dualen Reihe – Anatomie [44]. Inhalte aus anderen Publikationen oder Werken sind mit entsprechenden Referenzen markiert.

Die lymphatischen Organe werden unterteilt in primäre und sekundäre lymphatische Organe. Die Primären namentlich der Thymus und das Knochenmark dienen der Bildung und Reifung der Immunzellen während die Sekundären begrenzten Räume der Immunantwort darstellen. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen die Lymphknoten, Milz, Tonsillen jedoch auch jede Form von Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT). Im Rahmen dieser Arbeit von besonderer Bedeutung sind die Peyer-Patches im Ileum, die zum Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) gehören, das dem MALT zugeordnet wird. Von manchen Autoren werden die eingelagerten Lymphfollikel in der Appendix veriformis ebenfalls als Peyer-Patches bezeichnet, sodass diese Zuordnung in dieser Arbeit übernommen wird [45].

## 2.5.1 Genereller Aufbau von sekundären lymphatischen Organen

Nach Verlassen der primären lymphatischen Organe treten die Lymphozyten über die hochendothelialen Venolen (HEV), außer in der Milz, in die sekundären lymphatischen Organe ein. Die Lymphozyten rezirkulieren hierbei ständig zwischen dem Blut und den sekundären lymphatischen Organen. Man unterscheidet zwischen den aus dem Thymus stammenden T-Lymphozyten und den aus dem Knochenmark (engl. Bonemarrow) stammenden B-Lymphozyten, die entsprechend der Namensgebung die B- und T-Zone bilden. In der B-Zone sind Lymphfollikel angesammelt, die nach Antigenkontakt ein Keimzentrum ausbilden und zum Sekundärfollikel werden. Die T-Zone befindet sich in direkter Nachbarschaft zur B-Zone. Hier befinden sich die HEVs. Im Alter wird eine strukturelle Desorganisation der Grenze zwischen T und B-Zone beschrieben [46].

## 2.5.2 Lymphknoten

Lymphknoten sind wenige Millimeter bis ca. 1,5 Zentimeter große Organe, die in Rinde (Cortex), Parakortex und Mark (Medulla) unterteilt werden, wobei sich die Sekundärfollikel hauptsächlich in der Rindenregion befinden. Im Parakortex befinden sich dicht jedoch ungeordnet angelagerte T-Lymphozyten. Die Lymphknoten sind mit einem großen efferenten und mehreren kleineren afferenten Lymphgefäßen versorgt, über die die Lymphflüssigkeit zum Lymphknoten transportiert wird. Diese Zwischenstationen der Lymphbahn dienen der Präsentation von Antigenen, die mit der Lymphe transportiert werden. Nach dem Eintritt über die afferenten Gefäße wird die Lymphe über das fenestrierte Endothel des Randsinus, des Intermediärsinus und des Marksinus verteilt, um dann wieder über das efferente Gefäß abzufließen. Auf diesem Weg können Antigene von Makrophagen prozessiert und den Lymphozyten präsentiert werden. Der Randsinus, der Intermediärsinus und damit auch der Marksinus bestehen aus Sinusendothelzellen, die an retikulären Fasern haften. Zum Mark hin werden die Sinusendothelzellen von fibroblastischen Retikulumzellen überlagert [45]. Diese Zellen scheinen mit den Endothelzellen der Lymphgefäße verwandt zu sein [45], [47]. Die Lymphozyten sind zwischen den von der Kapsel ausgehenden Trabekeln in retikuläres Bindegewebe eingebettet.

Die beschriebene Morphologie der Lymphknoten ändert sich jedoch stark im Alter. Sie geht mit Störung in den definierten Lymphknotenregionen sowie in der Anordnung der Immunzellen in diesen Zonen einher [48]. Das Kortexgewebe wird stetig kleiner und geht in eine Morphologie über, in der nur noch kleine Inseln übrigbleiben, die von medullärem Gewebe umgeben sind [49]. Besonders bei peripheren Lymphknoten degeneriert das Kortexgewebe, während es beispielsweise bei mesenterialen Lymphknoten noch am meisten erhalten bleibt. Das Vorkommen von Keimzentren, und damit von Sekundärfollikeln, nimmt ebenfalls im Alter stark ab [50]. Ein Verlust von HEVs sowie ein fibrotischer Umbau im Alter wird ebenfalls beschrieben [51]. All diese Prozesse können im Rahmen der Immunseneszenz gesehen und beispielweise mit dem Auftreten von Neoplasien oder der gehemmten Immunantwort auf Impfstoffe im Alter gebracht werden [48].

### 2.5.3 Milz

Die Milz ist ein etwa zwölf Zentimeter langes Organ im linken Oberbauch, das sowohl lymphatische Funktionen als auch den Abbau überalterter Erythrozyten übernimmt. Man unterscheidet zwischen roter und weißer Pulpa, wobei die weiße Pulpa die immunologische Funktion übernimmt. Die rote Pulpa besteht aus fenestriertem Endothel, den venösen Milzsinus mit eingelagerten roten Blutkörperchen, die der Erythrozyten-Mauserung dienen. Mit 1/3 des lymphatischen Gewebes des Körpers ist die Milz das größte lymphatische Organ. Aus der bindegewebigen Kapsel ragen Trabekel in das Organinnere. Zwischen den Trabekeln befindet sich ein Netz aus retikulärem Bindegewebe, in das das Parenchym eingelagert ist. Die weiße Pulpa macht etwa 15 Prozent des Parenchyms aus. Um die zentralen Arterien herum befindet sich die peripherielle Lymphozytenscheide (PALS), die hauptsächlich aus T-Lymphozyten besteht. Auf der PALS aufgelagert befinden sich Lymphfollikel, die nach Antigenkontakt zu Sekundärfollikeln werden können. Da die Milz nicht über HEVs verfügt, ist die gängigste Theorie, dass die Lymphozyten an den Zentralarterien nachgeschalteten offen endenden Pinselarteriolen austreten und sich dann an die Zentralarterie anlagern. Der Austrittsort zwischen weißer und roter Pulpa, an dem die Ateriole endet, wird Marginalzone genannt [45]. Wie die T-Lymphozyten von der Marginalzone (MZ) zur PALS der Zentralarteriole gelangen, war jedoch lange weitestgehend unbekannt. *Cheveau* beschreibt 2020 diesen Weg der Lymphozytenwanderung, nach passivem Austritt aus dem Gefäß, als über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor vermittelt [52].

### 2.5.4 MALT

Die kurze Übersicht über das MALT wird in Anlehnung an das von Lüllmann-Rauch verfasste Werk Taschenlehrbuch-Histologie verfasst [45]. Inhalte anderer Publikation sind auch hier mit entsprechenden Referenzen markiert.

Das MALT befindet sich in respiratorischen und der Verdauung dienenden Schleimhäuten. Es stellt unter dem Epithel angeordnete Anhäufungen lymphatischen Gewebes dar. Der Aufbau dieses Gewebes ist an den verschiedenen Regionen gleich. Es besteht aus retikulärem Bindegewebe in das Lymphozyten eingelagert sind. Speziell unterscheidet man zwischen Lymphfollikeln mit B-Lymphozyten und zwischen den Follikeln gelagerte T-Lymphozyten. Das Epithel wird als Follikel assoziiertes Epithel (FAE) bezeichnet und beinhaltet spezielle Microfold-Zellen (M-Zellen), die der Transcytose von Antigenen dienen. Die M-Zellen wurden zuerst im Verdauungstrakt bei den Peyer-Patches nachgewiesen, jedoch auch bei der Tonsilla palatina beschrieben [53]. Die genauen molekularen Prozesse dieses Antigentransports sind bis jetzt weitestgehend unverstanden [54]. Lediglich eine Reihe von potenziellen Kandidaten für antigenbindenden Rezeptoren wurden identifiziert, wie beispielsweise der GP2 Rezeptor [55].

### Tonsilla palatina

Die Tonsillen bilden den lymphatischen Rachenring im oberen Teil des Pharynx (Waldeyer-Ring). Über ihr Epithel können sie Antigene direkt aus der Atemluft und Nahrung aufnehmen. Eine dieser Tonsillen ist die paarig angelegte Tonsilla palatina (Gaumenmandel), die ein mit mehrschichtigem unverhorntem

Plattenepithel bedecktes Organ darstellt, in das von der Oberfläche tiefe Krypten in das Organinnere einziehen. In diesen Krypten ist das Epithel lockerer angeordnet und kann als FAE bezeichnet werden, da darunter die Sekundärfollikel gelagert sind. Die diskontinuierliche Basalmembran scheint ebenfalls den Eintritt von Antigenen zu erleichtern. Auf der Rückseite des Organs befindet sich eine bindegewebige Kapsel.

### **GALT in Ileum und Appendix veriformis**

Das GALT hat die Aufgabe der immunologischen Abwehr von mit der Nahrung über den Verdauungstrakt aufgenommen Erregern. Speziell handelt es sich um die Peyer-Patches, die in das der Verdauung dienenden Darmgewebe eingelagert sind. Hauptsächlich findet man die Peyer-Patches im terminalen Ileum gegenüber des mesenterialen Ansatzes und in der Appendix veriformis. Diese Patches bestehen aus in der Mukosa und Submukosa eingelagerten Lymphfollikeln, die von FAE bedeckt sind. Das FAE wird hier als Domepithel bezeichnet und unterscheidet sich wesentlich von dem normalen Darmepithel. Es finden sich weder Bürstenzellen noch Becherzellen.

Im Alter nimmt die Anzahl der Peyer-Patches stetig ab. Die Morphologie verändert sich ebenfalls. Von einer papillären Struktur im Kindesalter mit Lymphfollikeln, verlieren die Patches im Alter ihre Form sowie die Follikel innerhalb der Lymphozytenansammlung [56].

### **2.5.5 Thymus**

Der Thymus ist ein sich im oberen Mediastinum befindendes Organ, das sich in zwei Lappen aufteilt, die sich nochmals weiter durch Bindegewebssepten in einzelne Läppchen unterteilen. Das Grundgerüst des Organs besteht aus epithelialen Zellen, in die die reifenden Lymphozyten (Thymozyten) eingebettet sind. Die Interaktion dieser beiden Zelltypen dient der Reifung der Lymphozyten, die zuvor durch die Blutbahn aus dem Knochenmark in den Thymus eingewandert sind.

Im Laufe des Lebens unterliegt der Thymus einer deutlichen Involution, sodass er von bei der Geburt mit circa 30g im Vergleich zum Erwachsenen auf circa 18g schrumpft. Das Gewebe wird stetig durch Fettgewebe und oder Bindegewebe ersetzt. Der im Rahmen der Involution auftretende, im peripheren Blut nachweisbare Abfall von naiven T-Lymphozyten [57] kann als Prozess im Rahmen der Immunenesenz gesehen werden [58]. In einer Studie von *Moritz* wird eine Involution von mehr als 90 Prozent des Thymusgewebes innerhalb der ersten fünf Lebensdekaden beschrieben. Danach verringert sich das Gewebe bis zum 90. Lebensjahr nur noch minimalst. Sie beschreibt außerdem, dass ab dem 70. Lebensjahr keine Hassallkörperchen mehr nachweisbar waren. *Moritz* definiert in ihrer Studie verschiedene Altersgruppen bei der die letzte 61 Jahre und älter darstellt. In dieser Gruppe bestand 95 Prozent des analysierten Gewebes nur noch aus Fettgewebe. Wenn thymales Restgewebe nachweisbar war, dann nur Stränge von atrophischem Epithel sowie Inseln von angedeuteten kortikalen Strukturen mit eingelagerten Lymphozyten [59]. Die Nachweise von *Moritz* für die Morphologie des Thymus im Alter sind im Rahmen dieser Arbeit relevant, da die Untersuchungen des Thymus ausschließlich an Körperspendern stattfinden, die der letzten ihrer definierten Studiengruppen (61 Jahre und älter) zugeordnet werden.

## 2.6 TRPC6 in lymphatischen Geweben

Nachdem die complementary DNA (cDNA) des humanen TRPC6-Kanals 1999 erstmals aus der Plazenta isoliert werden konnte [27] und das zugehörige Gen auf Chromosom 11 q21-q22 lokalisiert wurde [60], konnte 2000 erstmals ein Nachweis im menschlichen lymphatischen Gewebe explizit in der Milz im Rahmen eines Northern Blots erfolgen [61].

*Gamberucci* konnte einen DAG-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in humanen Jurkat T-Lymphozyten sowie in peripheren Blut T-Lymphozyten nachweisen. Mittels reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) gelang ihr außerdem der Nachweis der TRPC6 mRNA sowohl in der Jurkat-Zelllinie als auch in peripheren Blut-T-Lymphozyten. Außerdem gelang ihr der Nachweis des TRPC6-Proteins in beiden Zelllinien mittels Western Blot [62].

*Wenning* konnte 2011 dieses Ergebnis reproduzieren, indem sie TRPC6 mittels RT-PCR in humanen peripheren Blut-Lymphozyten, nicht jedoch in naiven CD3+ T-Lymphozyten nachweisen konnte [63]. TRPC6 scheint eine wichtige Rolle in den Zellprozessen der T-Lymphozyten zu spielen, da TRPC6<sup>-/-</sup> Knockout Mäuse eine verminderte allergische Atemwegsantwort zeigen. Dies konnte anhand verminderter IgE Spiegel sowie einer verringerten Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13) Sekretion der T-Helfer-Zelle 2 (Th2) bewiesen werden [64]. Die T-Zell Aktivierung konnte mit dem TRPC6 Kanal in Verbindung gebracht werden [65].

An murinem Gewebe konnten Unterschiede in der TRPC6 mRNA Expression mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die TRPC6 mRNA Expression scheint in B-Lymphozyten deutlich stärker zu sein als in T-Lymphozyten. Ebenfalls konnten Differenzen zwischen den Lymphozyten verschiedener lymphatischer Organe nachgewiesen werden. Die Splenozyten zeigten in diesen Untersuchungen eine robustere Expression als Immunozyten aus dem Lymphknoten oder dem Thymus. Generell zeigten in dieser Studie jedoch Thymus, Milz und Lymphknoten einen positiven Nachweis auf TRPC6 mRNA [66].

Eine weitere Möglichkeit der TRPC6 Funktionen im lymphatischen Gewebe scheint bei der Beteiligung der Leukozytenmigration über Endothelbarrieren zu sein [67]. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass TRPC6 im Lungengefäßendothel an der Erhöhung der vaskulären Permeabilität beteiligt ist [68]. *Weber* konnte 2015 nachweisen, dass TRPC6 der wesentliche Kanal ist, der die transendotheliale Leukozytenmigration reguliert [69], nachdem schon seit längerem bekannt war, dass ein transienter Anstieg vom intrazellulären freiem  $\text{Ca}^{2+}$  der Endothelzelle eine wesentliche Rolle in diesem Prozess spielt [70]. Die über TRPC6 und  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelten Signale scheinen den extrazellulär regulierte Kinase Pathway (ERK-Pathway) zu aktivieren und somit eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen, speziell auch Lymphozyten, zu spielen. Gezeigt werden konnte dies über TRPC6<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse, die eine verringerte Immunzellen Rekrutierung zeigten [71]. TRPC6 ist außerdem in den Muskelzellen der Lymphgefäß im murinen Gewebe vorhanden und an der Kontraktion beteiligt [72]. Generell wird vermutet, dass das flache Sinusendothel der Lymphgefäß mit dem der Lymphsinus verwandt ist [45].

Die aktuelle Literatur zeigt somit Hinweise darauf, dass ein ubiquitäres Vorkommen des TRPC6 Kanals in humanen lymphatischen Geweben in verschiedensten Funktionen möglich sein könnte. Ein direkter Nachweis des Proteins mittels Immunhistochemie ist bisher nicht erfolgt.

## 2.7 Fragestellungen dieser Arbeit

Aus diesem aktuellen Forschungsstand resultieren folgende Fragestellungen dieser Arbeit:

- i. Zeigt sich ein Nachweis von TRPC6 in den lymphatischen Geweben des Menschen in der immunhistochemischen Färbung?
  - a. Zeigt sich ein Nachweis in den Lymphozyten?
  - b. Zeigt sich ein Nachweis im Follikel assoziierten Epithel?
  - c. Zeigt sich ein Nachweis im Bindegewebe?
  - d. Sind Unterschiede zwischen den einzelnen Strukturen im Färbeverhalten darstellbar?
- ii. Sind die geleisteten immunhistochemischen Nachweise mit dem aktuellen Wissensstand von TRPC6 im lymphatischen Gewebe vereinbar?
- iii. Welchen Einfluss hat das hohe Alter der Körperspender auf die Morphologie der lymphatischen Gewebe und den Nachweis des Proteins?

### 3. Material & Methoden

Um die in der Einleitung erarbeiteten Forschungsfragen zu beantworten, wurden mehrere Gewebeproben aus unterschiedlichen lymphatischen Organen entnommen und den im Folgenden dargestellten Experimenten und Arbeitsabläufen zugeführt.

#### 3.1 Material und Geräte

Für die durchgeführte Methodik wurden die in den folgenden Tabellen Materialien und Geräte verwendet.

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

*Tabelle 1 - verwendete Geräte*

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Sterile Skalpellklingen Nr.22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Discofix® Drei-Wege-Hahn	Ref.: 4095111, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bovivet Einmalkanülen 14G 2,1x60mm	Kruuse, Langeskov, Dänemark
ACU-Punch®Biopsie-Stanze 8/10mm	Acuderm inc., Fort Lauderdale, USA
Einbettkassetten Macro, weiß	Ref.: M512, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
PROLENE 1,0 Nahtmaterial	Ethicon US LLC, Cincinnati, USA
Einbettringe	Ref.: M460, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Roti® -Plast Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen DB80	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R.Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Filtrerpapiere	Ref.: 534018, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
Histologischer Kleber Roti-Histokitt©	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 22x22m / 24x50mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DakoPen Fettstift	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 20 – 200µl 100 – 1000µl	VWR International, Pennsylvania, USA
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR®Tubes 15ml Zentrifugenröhrchen 50ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 2 - verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Lösungen, Chemikalien und Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Formalinlösung nach Basler	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5 -3,7%	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Roti®fair 10x PBS 7.4	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
2-Propanol 97%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Methylbenzoat 99%	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
Xylol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin 0,1%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Citratpuffer	Ref.: ab93678, Abcam, Cambridge, Großbritannien
NGS-Blockierlösung	Ref.: 01-6201, Invitrogen AG, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, USA
Kaninchenserum	Ref.: PLN5001, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, USA
Wasserstoffperoxid 35%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAB	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Bestellnummer: SK-4103)
Primärantikörper: Anti-TRPC6-Antikörper	Ref.: ACC-017, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärantikörper: HRP goat anti rabbit	Ref.: A10547, Invitrogen AG, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, USA

*Tabelle 3 - verwendete Lösungen, Chemikalien und Antikörper*

### 3.2 Generelles methodisches Vorgehen

Ziel der Methodik war geeignetes humanes Gewebe zu identifizieren, das anschließend der immunhistochemischen Färbung (IHC-Färbung) zugeführt werden konnte, um es auf den TRPC6 Kanal zu untersuchen. Dafür wurden Gewebeproben aus den lymphatischen Organen Lymphknoten, Milz, Appendix vermiciformis, Ileum und Thymus an Körperspendern des anatomischen Instituts Homburg entnommen. Proben der Tonsilla palatina wurden aus der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes bereitgestellt. Die gewonnenen Proben wurden zunächst eingebettet, ausgegossen und mit dem Mikrotom geschnitten, bevor sie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zugeführt wurden. Die HE-Färbung, als etablierte Standardfärbung, diente der Beurteilung der Präparate in Gewebemorphologie und Autolyse. Die Gewebeschnitte der besten fünf Präparate des jeweiligen Organs wurden dann der Immunfärbung zugeführt. Wenn keine geeigneten Schnitte in der HE-Färbung identifiziert werden konnten, wurden nochmals weitere Gewebeproben entnommen. Bis auf die Fixierung der Körperspender, die nur beigewohnt wurde, wurden alle folgenden Arbeitsschritte eigenständig durchgeführt. Die angewandte Methodik soll in Abbildung 3 verdeutlicht werden.

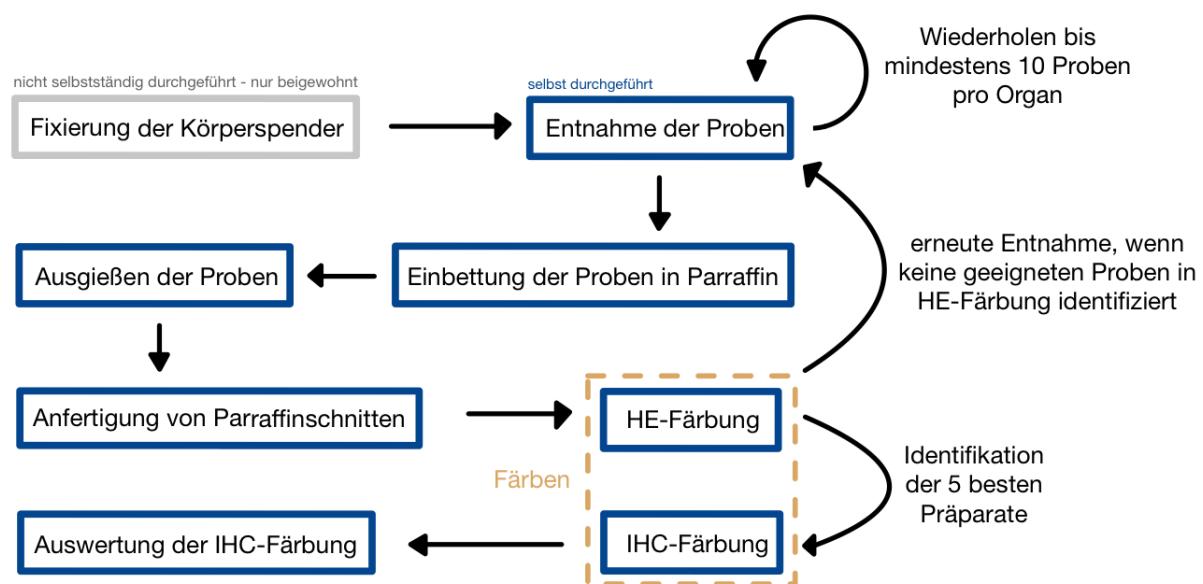


Abbildung 3 - methodisches Vorgehen

Die Körperspender des anatomischen Instituts, an denen die Entnahme der Proben erfolgte, dienen hier chirurgischen Aus- und Weiterbildungskursen. Teilweise konnten auch Proben von Präparaten gewonnen werden, die im Kursus der makroskopischen Anatomie zu Lehrzwecken bereitstanden. Es handelt sich um Menschen, die sich zu Lebzeiten dazu entschieden haben, ihren Körper nach ihrem Tod für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung zu stellen. Nach dem Ableben der Personen wird der Leichnam in die Prosektur des anatomischen Instituts gebracht, um dort fixiert zu werden. Pro Jahr werden im anatomischen Institut ca. 100 Körperspender fixiert.

### 3.3 Ethikvotum

Die für die Untersuchung von humanen Geweben obligatorische Einholung eines Ethikvotums wurde bei der zuständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes durchgeführt und unter der Kennziffer 163/20 die Untersuchung von Ionenkanälen an dem Gewebe der Körperspender des anatomischen Instituts Homburg erlaubt. Des Weiteren haben die Patienten des Fachbereichs Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes schriftlich ihre Einwilligung zur Verwendung ihrer Gewebematerialien zu wissenschaftlichen Zwecken erteilt.

### 3.4 Fixierung der Körperspender

Die Fixierung erfolgte innerhalb 72 Stunden post mortem nach einem festen Protokoll. Zu Beginn wurde der jeweilige Spender entkleidet und mit einer Kranwaage abgewogen.

Danach wurde der Körperspender auf den Fixierungstisch gebracht und rasiert. Es erfolgte die Zuweisung einer Journalnummer, um die Identifikation weiterhin gewährleisten zu können. Die Nummer setzt sich aus dem jeweiligen Jahr und der Rangfolge des Spenders im Jahr zusammen (beispielsweise 22/11 – Im Jahre 2022 der 11. Körperspender). Es folgte die Präparation der Arteria femoralis superficialis. Die Präparation der Haut wurde anhand eines circa 5cm langen Längsschnittes auf der medialen Seite des rechten Oberschenkels durchgeführt (siehe Abbildung 4 – Teil A). Ebenfalls mit einem Längsschnitt wurde dann die Arterie eröffnet (siehe Abbildung 4 – Teil B).

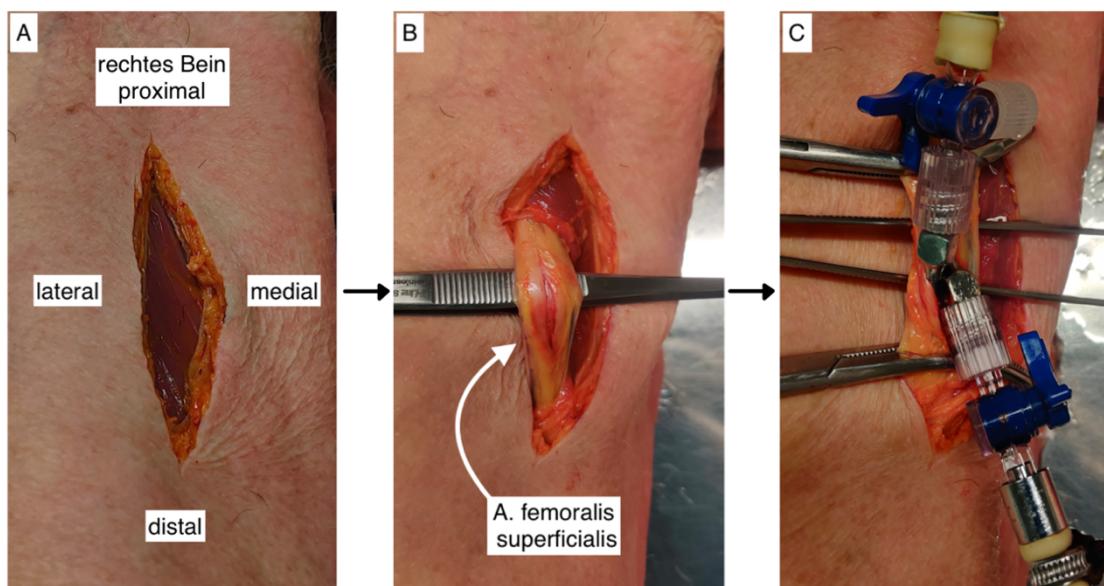


Abbildung 4 - Präparation der Arteria femoralis superficialis

Das Gefäß wurde dann nach proximal und distal mit einer Kanüle mit Knopfende kanüliert und abgebunden, um ein Verrutschen zu verhindern (siehe Abbildung 4 – Teil C). Als Fixierungsmittel dient Formalinlösung nach Basler. Da gewisse Bereiche durch diese Art von Fixierung nicht gut erreicht werden konnten, wurden diese mit einer 18G Einmalkanüle nachfixiert. Hierbei handelte es sich um Weichteilregionen wie beispielsweise die Glutealregion, die gesamte Region des Musculus latissimus

dorsi oder des Bereichs des Musculus triceps und biceps. Die Fixierung erfolgte hier durch Einstechen der Kanüle und nachfolgende Infiltration der Basler Lösung.

Insgesamt wurden 10-15 Liter der Lösung in den Körper infundiert. Nach dieser als innere Fixierung oder Perfusionsfixierung bezeichneten Methode erfolgte abschließend die äußere Fixierung, wobei der Körperspender in 3-5 %iger Formalinlösung in einer Wanne für vier Monate aufbewahrt wurde.

### 3.5 Entnahme der Proben

Die Entnahme erfolgte für die folgenden Organe: Lymphknoten, Milz, Ileum, Appendix vermiformis und Thymus. Tonsillenproben wurden freundlicherweise von Frau Dr. Wemmert aus dem Forschungslabor der Klinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes bereitgestellt. Die Organe sind in Abbildung 5 veranschaulicht.

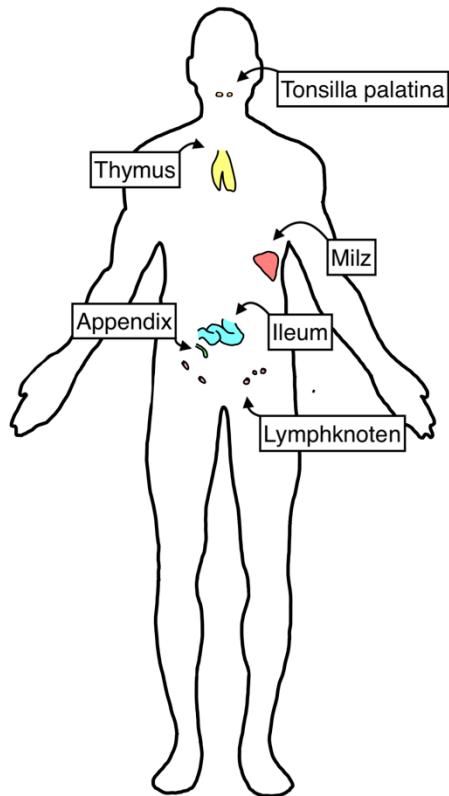


Abbildung 5 - Probeentnahmestellen der untersuchten Organe

#### 3.5.1 Lymphknoten

Der einfachste Zugang zu den Lymphknoten zeigte sich in der Leiste, dazu erfolgte ein Zugang auf Höhe der Arteria femoralis communis. Die Lymphknoten zeigten sich hierbei medial zu Arteria femoralis communis. Zu einem späteren Zeitpunkt zeigte sich, dass auch im retrosternalen Fettgewebe Lymphknoten und Einlagerungen von lymphatischem Gewebe gefunden werden konnten.

#### 3.5.2 Milz

Der Zugang erfolgte bei den noch ungeöffneten Körperspendern durch eine mediane Laparotomie. Die Milz wurde danach aus dem umliegenden Bindegewebe präpariert und eine Probe entnommen, die Milzkapsel und Parenchym enthält.

### 3.5.3 Ileum

Die Entnahme der Ileumproben erfolgte nach medianer Laparotomie im distalsten Abschnitt des Ileums, um das Auftreten von Peyer-Patches zu erhöhen. Orientiert wurde sich hierbei an der Bauhin Klappe.

### 3.5.4 Appendix

Die Entnahme der Appendices erfolgte ebenfalls nach medianer Laparotomie. Orientiert wurde sich hierbei am Ceacum. Es zeigte sich die Komplikation, dass bei den Körperspendern in den meisten Fällen (ca. 60 Prozent) eine Appendektomie stattgefunden hatte.

### 3.5.5 Thymus

Um sich Zugang zum Mediastinum und dem Thymus zu verschaffen, erfolgte bei den ungeöffneten Körperspendern eine Sternotomie. Danach wurde eine Probe aus dem retrosternalen Fettgewebe entnommen. Nachdem die erste Charge von Proben dieser Art entnommen wurde, zeigte sich in der HE-Färbung, dass durch das erhöhte Alter der Körperspender (durchschnittlich 83 Jahre) und stattgefunder Thymusinvolution nur sehr schwer Thymusgewebe gefunden werden konnte. Es folgte deswegen eine zweite Entnahmerekie von Thymusgewebe. Auch hier zeigte sich erneut eine schwere Auffindbarkeit von Thymusgewebe. Makroskopisch ließ sich im retrosternalen Fettgewebe keine Struktur abgrenzen, weshalb die Entnahme aus diesem Gewebe sporadisch erfolgte. Bei einem der beobachteten 44 Körperspender zeigte sich makroskopisch ein Thymus. Insgesamt zeigte sich bei 42% der Körperspender Thymusrestgewebe in der histologischen Untersuchung.

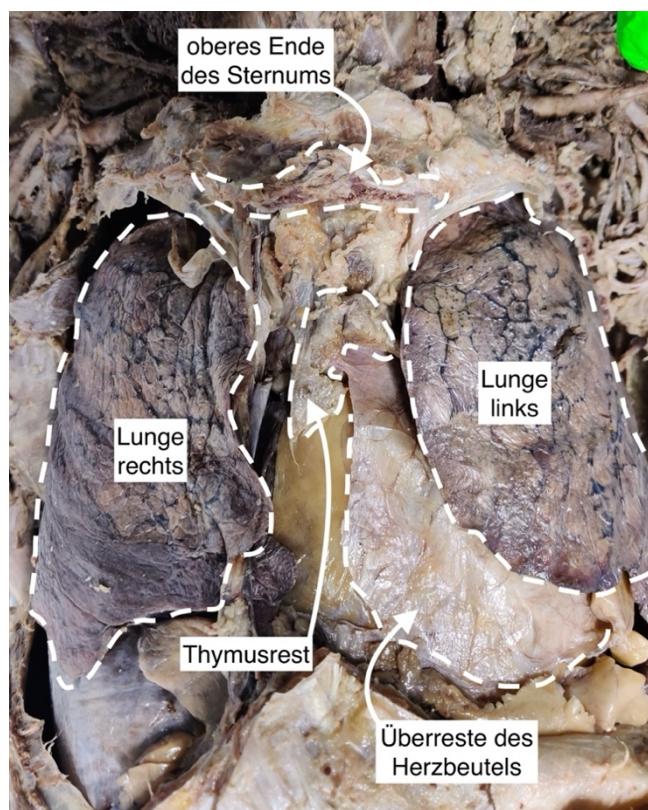


Abbildung 6 - sichtbarer Thymus

Abbildung 6 zeigt einen makroskopisch sichtbaren Thymus des Körperspenders 20/65. Da es sich um ein Präparat aus dem Kurs für makroskopische Anatomie handelte, wurde hier bereits die ganze vordere Thoraxwand abgenommen. Es zeigt sich ein Thymus, bei dem zum Zeitpunkt der Fotografie der linke Lappen bereits entnommen wurde. Das Präparat wurde später der HE- und IHC-Färbung zugeführt. Die sichtbaren anatomischen Strukturen der Fotografie sind zur Orientierung beschriftet. Trotz des makroskopisch vielversprechenden Präparates zeigte sich später auch hier eine massive Thymusinvolution (siehe Ergebnisteil 4.6 Thymus).

### 3.5.6 Tonsilla palatina

Die von Frau Dr. Wemmert aus dem Forschungslabor bereitgestellten Proben waren bereits in Paraffin eingegossen und konnten somit direkt der HE- und später der IHC-Färbung zugeführt werden. Jedoch handelte es sich hierbei lediglich um drei Proben, die im Rahmen einer Tonsillektomie entstanden waren.

### 3.5.7 Übersicht der Proben

Ziel war es, von jedem Organ mindestens 10 auswertbare Proben zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde die erste Entnahmeserie durchgeführt. Es zeigte sich die bereits beschriebene Problematik der Appendektomien der Körperspender. Darüber hinaus erwies es sich als schwierig Thymusgewebe zu finden, da die Thymusinvolution bei den Körperspendern weit fortgeschritten war. Bei den Ileumpräparaten trat nach der ersten Serie von Gewebeentnahmen in der HE-Färbung das Problem auf, dass die Peyer Patches im mikroskopischen Ileumpräparat schwer zu finden waren. Die Entnahme von Milz und Lymphknoten verlief komplikationslos. Um den Mangel an Thymus- und Appendixproben sowie die schwierige Auffindbarkeit der Peyer Patches im Ileum auszugleichen, wurde für diese Organe eine zweite Entnahmeserie durchgeführt. Insgesamt konnten so 102 Proben gewonnen werden, die sich wie folgt verteilen:

	Erste Entnahmereihe	Zweite Entnahmereihe	insgesamt
Lymphknoten	10	-	10
Milz	13	-	13
Ileum	10	10	20
Appendix	4	8	12
Thymus	10	34	44
Tonsille (aus HNO)	3	-	3

Tabelle 4 - Übersicht der Proben

### 3.5.8 Vorbereitung der Einbettung der Proben

Nach der Entnahme wurden die Proben in Einbettkassetten gelegt. Jede Einbettkassette wurde mit der Journalnummer des Körperspenders und des entnommenen Organs beschriftet. Alle Kassetten wurden dann in einen Eimer gelegt, der mit einer 3,5-3,7%iger Formalinlösung gefüllt war. Dieser Eimer wurde über Nacht in einem Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Formalinlösung durch eine PBS-Lösung (Phosphate buffered saline) ersetzt, die im Gegensatz zur Formalinlösung nicht zur Fixierung, sondern zum Waschen der Proben diente. Die Proben verblieben weitere 24 Stunden in dieser Lösung und wurden dann mindestens drei Stunden unter dem laufenden Wasserhahn mit Leitungswasser gewaschen.

### 3.6 Einbettung der Proben in Paraffin

Die Einbettung der Proben erfolgte in einem sogenannten Karussellgewebeeinbetter. Dazu wurden die Proben aus dem Eimer in einen Korb überführt, um dann vollautomatisiert die verschiedenen Lösungen des Einbettters zu durchlaufen. Hierzu wurde das Programm 01 am Automaten ausgewählt. Folgende Lösungen wurden hierbei für bestimmte Zeiten durchlaufen:

Station	Lösung	Dauer
1	70% 2-Propanol	3h
2	80% 2-Propanol	1,5h
3	90% 2-Propanol	1,5h
4	100% 2-Propanol	1,5h
5	100% 2-Propanol	1,5h
6	Methylbenzoat	1,5h
7	Methylbenzoat	1,5h
8	Methylbenzoat	1,5h
9	Paraffin	2h
10	Paraffin	2h

*Tabelle 5 - Stationen am Karussellgewebeeinbetter*

Das Programm war nach 17h 30min durchlaufen und die Proben standen dann für den nächsten Arbeitsschritt bereit. Vom letzten Behälter des Einbettautomaten wurden die Proben dann in ein separates mit flüssigem Paraffin gefülltes Gefäß überführt und von dort direkt zum Ausgießen gebracht.

### 3.7 Ausgießen der Proben

Zum Ausgießen der Proben wurde eine Paraffin-Ausgießstation verwendet. Diese verflüssigt automatisiert Paraffin und gibt es über einen Hahn mit Betätigungsmechanismus aus. Ein Ausgießschälchen wurde mit flüssigem Paraffin gefüllt, bis der Boden bedeckt war. Dann wurde mit einer Pinzette die Probe in der gewünschten Orientierung in das Schälchen gelegt und ein Einbettring

aufgelegt. Im Anschluss erfolgte die Befüllung des Schälchens bis der Einbettring ebenfalls befüllt war. Das Schälchen mit Einbettring wurde dann auf die Kälteplatte der Ausgießstation gestellt, um dort auszuhärten. Nach der Aushärtung konnte der Einbettring mit paraffinierter Probe aus dem Schälchen entnommen werden. Die jeweilige Beschriftung der Einbettkassette wurde hierbei auf den Einbettring übertragen, um weiterhin eine Identifikation und Zuordnung der Probe zu gewährleisten.

### **3.8 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Nachdem die Proben in Paraffin eingegossen wurden, erfolgte der Arbeitsschritt des Schneidens der Proben. Die Schnitte wurden mit einem Mikrotom angefertigt. Das Mikrotom ist ein Instrument, das das Schneiden des Paraffinblocks in wenige  $\mu\text{m}$ -dicke Schnitte erlaubt. Dazu wurde das Paraffinblöckchen in das Mikrotom eingespannt und durch Drehen an einer Kurbel an der rechten Seite des Gerätes in periodischen Bewegungen jeweils 7  $\mu\text{m}$ -dicke Schnitte der Probe abgetragen. Diese Schnitte wurden zunächst auf Risse gesichtet. Falls der Schnitt verwertbar war, wurde er mithilfe einer Pinzette in ein Wasserbad gelegt, das auf 37°C vorgeheizt war. Dieser Arbeitsschritt diente der Streckung des Präparates. Nachdem der Schnitt für einige Minute im Streckbad lag, wurde er mit einem Objektträger aufgenommen. Der Objektträger wurde mit der jeweiligen Journalnummer und Organbezeichnung beschriftet und dann auf eine auf 37°C vorgeheizte Heizplatte für 30 Minuten gelegt, um dort zu trocknen. Danach wurden die fertigen Schnitte zusammen in eine Küvette gestellt und über Nacht im Inkubator ebenfalls bei 37°C weiter getrocknet. Eine nicht ausreichende Trocknung des Präparates stellt eine Fehlerquelle für die späteren Färbungen dar, sodass hier darauf zu achten war, dass die Präparate über Nacht mindestens 12 Stunden im Inkubator verweilen. Für jede Probe wurden insgesamt 4-8 Schnitte hergestellt, die dann der HE- und später der IHC-Färbungen bereitstanden.

### **3.9 Färbungen und Auswahl der Proben**

Im Rahmen der Methodik dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Färbungen zum Einsatz: die HE-Färbung und die IHC-Färbung. Die HE-Färbung diente als Orientierungsfärbung der Beurteilung der Präparate und Sortierung anhand Gewebemorphologie und Autolyse. Sie wurde zusammen mit meinem Betreuer Prof. Dr. med Thomas Tschernig ausgewertet. Die fünf besten Präparate jedes lymphatischen Organs wurden dann der IHC-Färbung zugeführt. Falls die Auswertung der HE-Färbung ergab, dass keine geeigneten Proben identifiziert werden konnten, wurden nochmals weitere Proben entnommen und die entsprechenden dargestellten Arbeitsschritte bis zur HE-Färbung wiederholt (siehe Kapitel 3.5.7 Übersicht über die Proben). Es erfolgte dann nochmals eine Auswertung der HE-gefärbten Präparate zusammen mit meinem Betreuer. Die drei Proben der Tonsilla palatina aus der Klinik für Hals- Nasen und Ohrenheilkunde wurden alle der IHC-Färbung zugeführt.

#### **3.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Ziel der HE-Färbung war eine Routinefärbung für alle Gewebe zu finden, die gut reproduzierbar ist und somit einen guten Vergleich zwischen den verschiedenen Schnitten der gleichen Gewebeart gewährleistete, um beim späteren Vergleich der Schnitte eine Entscheidung treffen zu können, welche Schnitte der immunhistochemischen Färbung zugeführt werden [73].

Im Labor der Anatomie war bereits eine Färbeprotokoll für die HE-Färbung etabliert, das problemlos übernommen werden konnte [74].

### Durchführung

Zunächst wurden 10 Objektträger ausgewählt, die in einen Objektträgerkorb gegeben wurden. Diese 10 Schnitte wurden im Anschluss dem festen Protokoll unterzogen. Die Durchführung gliederte sich in folgende Punkte:

1. Entparaffinierung
2. Färben
3. Entwässern
4. Eindecken

Bei der Entparaffinierung wurde der Objektträgerkorb mit den Objektträgern nacheinander in Küvetten verschiedener Lösungen (Xylol (100%), Propanol (80-100%)) eingetaucht und für eine definierte Zeit verweilen gelassen. Diese Arbeitsschritte der Entparaffinierung fanden alle unter dem Abzug statt. Die Arbeitsschritte sind im Folgenden Abbildung 7 zu entnehmen.

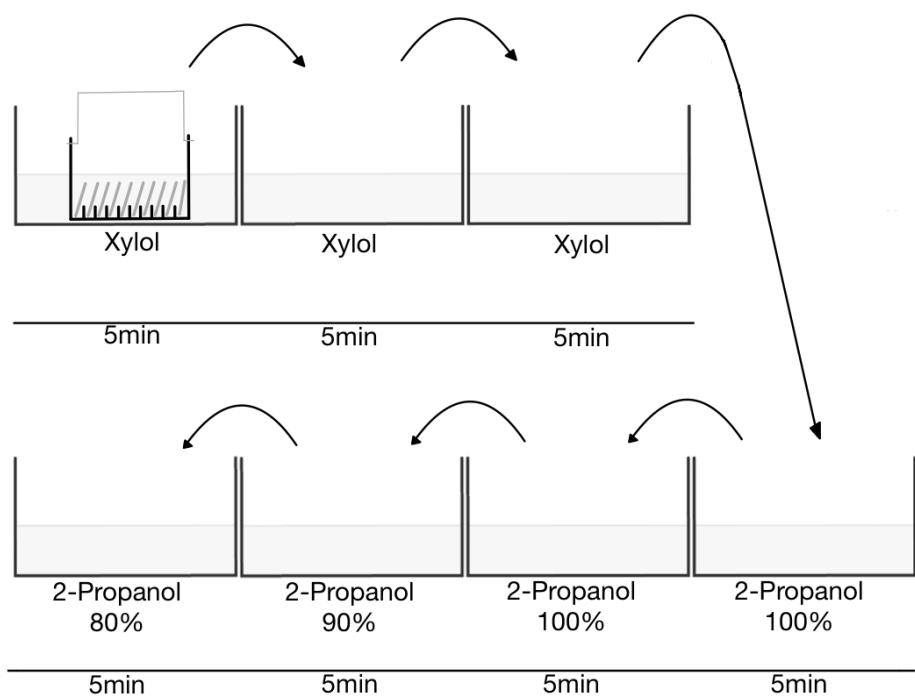


Abbildung 7 - schematische Darstellung der Entparaffinierung bei der HE-Färbung

Nachdem die Schnitte entparaffiniert waren, wurde der Objektträgerkorb aus dem Abzug herausgenommen und es begann der eigentliche Färbevorgang. Dafür wurden wieder verschiedene Chemikalien in Küvetten gefüllt und die Schnitte in diese im Objektträgerkorb für definierte Zeiten eingetaucht. Die Arbeitsschritte sind der im Folgenden Abbildung 8 zu entnehmen.

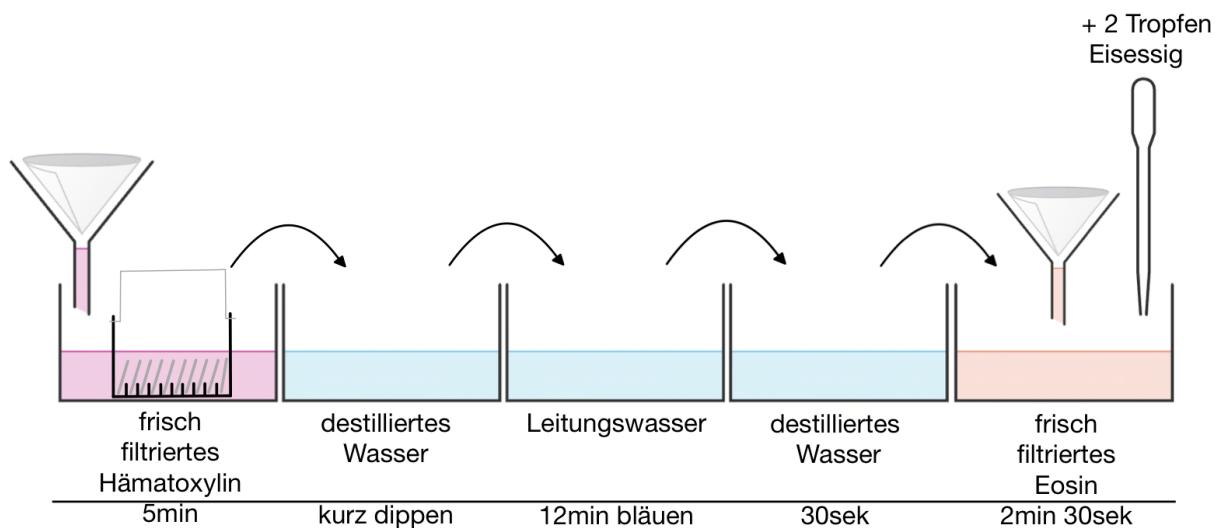


Abbildung 8 - schematische Darstellung der HE-Färbung

Nach dem Durchlaufen der Färbung, mussten die histologischen Schnitte wieder entwässert werden. Dies funktionierte mithilfe einer erneuten Lösungsreihe von Propanol (90-100%) und Xylol (100%). Vom Eosin wurde der Objektträgerkorb also direkt in 90-%iges Propanol überführt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden wieder unter dem Abzug durchlaufen und sind in Abbildung 9 veranschaulicht.

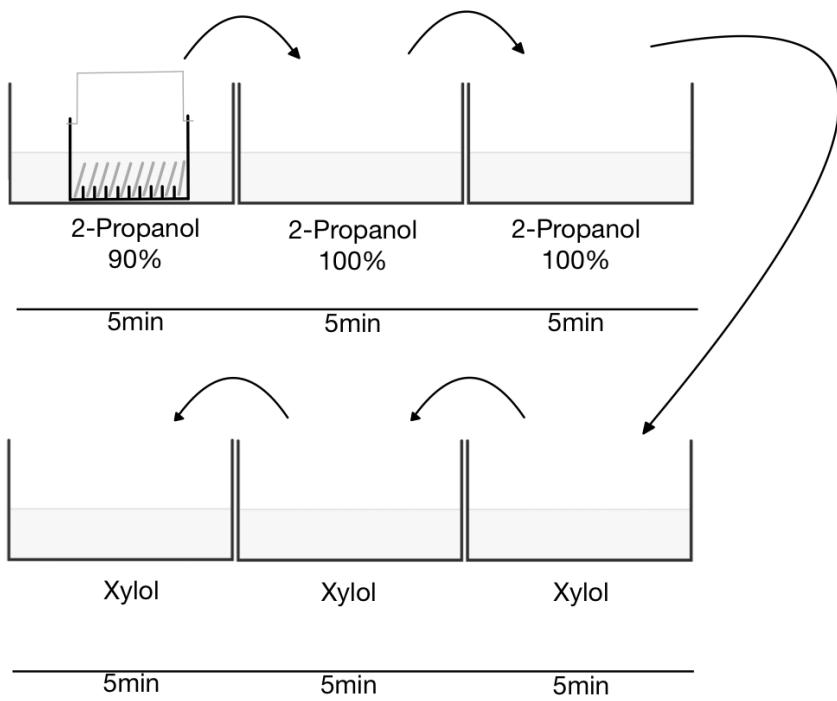


Abbildung 9 - schematische Darstellung der Entwässerung bei der HE-Färbung

An die Entwässerung schloss sich der Prozess des Eindeckens mittels Roti-Histokitt an. Dafür wurden nacheinander die Objektträger aus der letzten Xylol Küvette entnommen und abgeklopft, um überschüssiges Xylol zu entfernen. Mit einem Tupfer wurde dieser Prozess noch verfeinert. Danach wurden 2-3 Tropfen des Klebers aufgetragen und ein Deckglas mit einer Präpariernadel sorgfältig

aufgelegt, um das Entstehen von Bläschen zu vermeiden. Die fertigen Schnitte standen nach der Trocknung des Klebers über Nacht unter dem Abzug für die Beurteilung parat. Abbildung 10 veranschaulicht die Arbeitsschritte des Eindeckens.

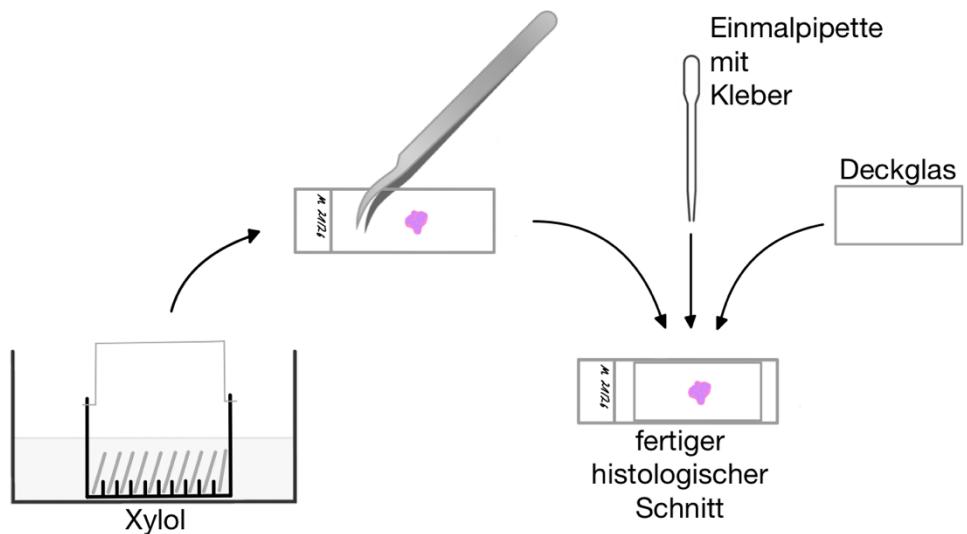


Abbildung 10 - schematische Darstellung der Eindeckung der HE-Färbung

### 3.9.2 IHC-Färbung

Die IHC-Färbung diente dem Nachweis der TRPC6 Kanäle in den verschiedenen zuvor mit der HE-Färbung untersuchten Geweben. Zum Einsatz kam hierbei die Methode der indirekten Immunhistochemie, bei der zwei verschiedene Antikörper zum Einsatz kamen. Biochemisch läuft der Färbevorgang bei der indirekten Immunhistochemie wie folgt ab:

Der Primärantikörper bindet mit seinem  $F_{ab}$ -Teil an dem N-Terminus des TRPC6 Proteins, den man als Epitop bezeichnen kann. An dem  $F_c$ -Teil des Primärantikörpers kann dann der Sekundärantikörper mit seinem  $F_{ab}$ -Teil binden, der seinerseits an seinem  $F_c$ -Teil das Enzym Horseradish Peroxidase (kurz: HRP; deutsch: Meerrettichperoxidase) gebunden hat, das mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) die Oxidation des Chromogens DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) katalysiert und somit an den Stellen, an denen das TRPC6 Protein vorhanden ist, einen braunen Farbumschlag entstehen lässt. Der Ablauf dieser Reaktion ist in Abbildung 11 dargestellt:

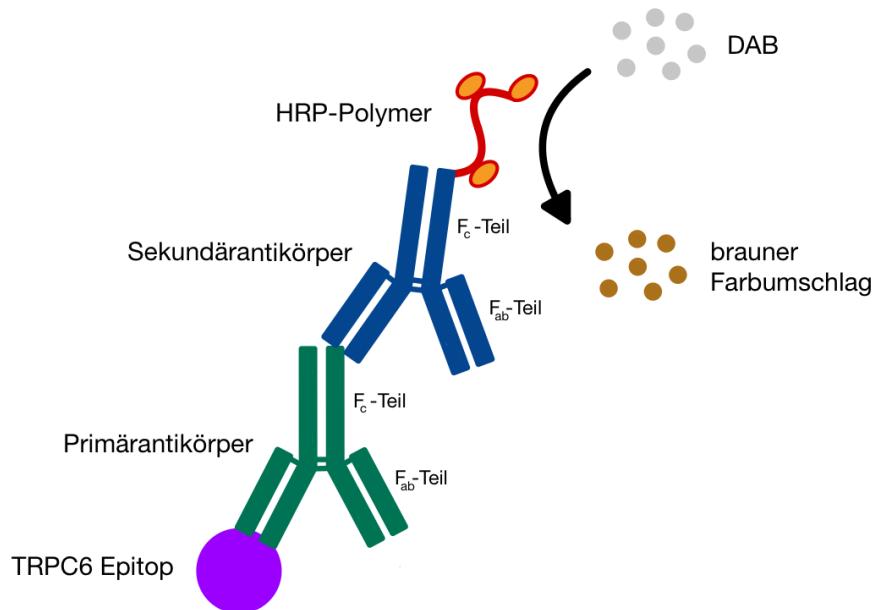


Abbildung 11 - indirekte Immunhistochemie schematische Darstellung

### Durchführung

Für die IHC-Färbung war im Labor der Anatomie ebenfalls eine Färbeprotokoll durch vorausgegangene Arbeiten etabliert worden [74]. Im Gegensatz zu HE-Färbung beinhaltete die IHC-Färbung deutlich mehr Arbeitsschritte und zog sich deshalb über zwei Tage.

Das Protokoll gliederte sich in folgende Punkte:

- Tag 1:
1. Vorbereitung (Citrat-Puffer)
  2. Entparaffinierung
  3. Demaskierung
  4. Blockierung
  5. Färbung
    - i. Primärantikörper

- Tag 2:
- ii. Peroxidaseinaktivierung
  - iii. Sekundärantikörper
  - iv. DAB-Färbung
  - v. Gegenfärbung
6. Entwässern
7. Eindecken

Zu Beginn des ersten Tages wurden die Schnitte für die IHC-Färbung ausgewählt. Es konnten 10 Schnitte auf einmal gefärbt werden, wobei jeweils eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle pro Charge mit gefärbt wurden, die sorgfältig mit einem Plus beziehungsweise Minus gekennzeichnet wurden. Diese Schnitte mussten nun entparaffiniert werden. Die Arbeitsschritte waren nahezu identisch mit denen der HE-Färbung. Nach den ersten beiden Durchgängen der IHC-Färbung wurde festgestellt, dass die Entparaffinierung nicht ausreichend funktioniert hatte, so dass nach Rücksprache mit meinem Betreuer Prof. Dr. med. Thomas Tschernig die Verweilzeit in Xylol auf 8 Minuten erhöht wurde. Zusätzlich wurde im Gegensatz zu Entparaffinierung bei der HE-Färbung eine weitere Verweilzeit von 5 Minuten in 70%igem Propanol durchgeführt, sodass die in Abbildung 12 dargestellten Arbeitsschritte etabliert werden konnten:

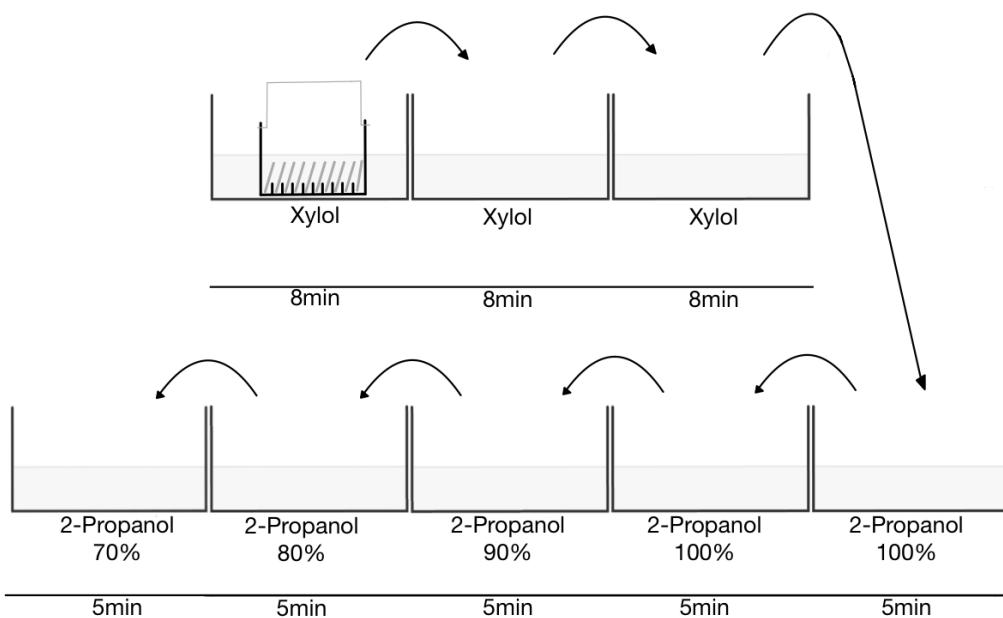


Abbildung 12 - schematische Darstellung der Entparaffinierung bei der IHC-Färbung

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte 5 Minuten lang in destilliertem Wasser gewaschen und dann der Demaskierung zugeführt. Dafür wurden diese in eine Citratpufferlösung bestehend aus 5ml Citratpuffer und 495ml destilliertem Wasser in einer Küvette in einen auf 95°C vorgeheizten Wärmeschrank gestellt und dort eine Stunde lang inkubiert. Dieser Arbeitsschritt diente der teilweisen Reaktivierung der Immunaktivität der TRPC6-Kanäle, die durch die Fixierung beeinträchtigt wurde. Anschließend wurde die Küvette aus dem Wärmeschrank herausgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Schnitte eine Minute lang in PBS

gewaschen, um den Citratpuffer von den Präparaten zu entfernen. In Abbildung 13 sind diese Arbeitsschritte illustriert.

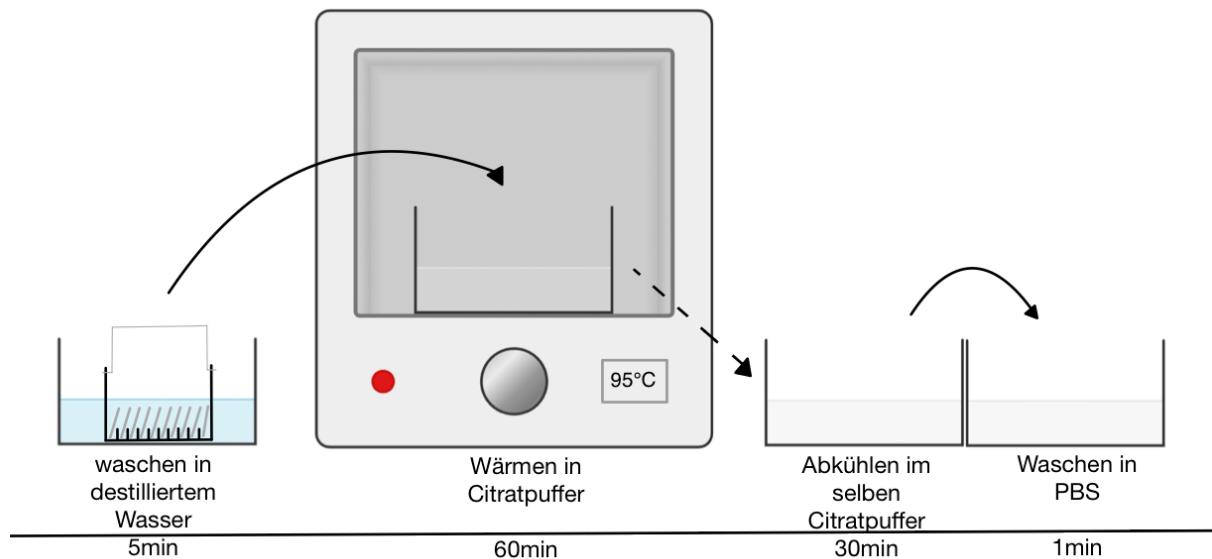


Abbildung 13 - schematische Darstellung der Blockierung

Als nächster Arbeitsschritt erfolgte die Blockierung. Dazu wurde zunächst mit einem Fettstift (DakoPen) eine Umrandung um das jeweilige Präparat gezogen, das von nun an als Abflussgrenzen für die später aufgetragenen Lösungen diente. Dazu wurde das PBS sorgfältig vom Objektträger abgeklopft, um einen trockenen Untergrund für den Fettring zu schaffen. Danach wurde je nach Größe des Präparates ca. 150-250µl 10 %iges NGS (Normal Goat Serum) in PBS auf die Objektträger pipettiert, bis das ganze Präparat bedeckt war. Als nächstes wurden die umrandeten und mit 10%igem NGS bedeckten Objektträger für eine Stunde in eine Feuchtekammer gelegt. Die Prozesse sind in Abbildung 14 dargestellt:

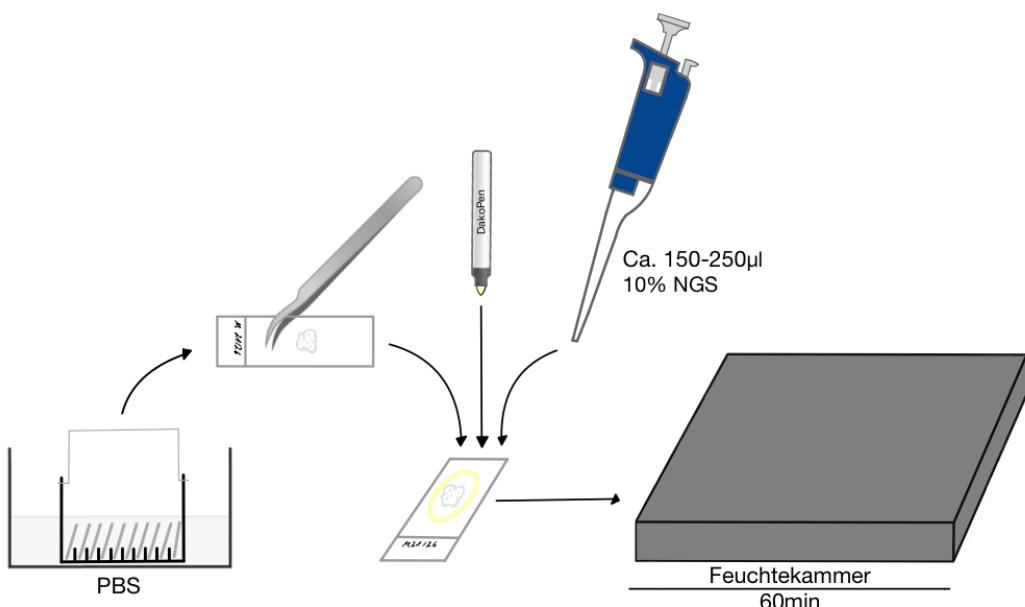


Abbildung 14 - schematische Darstellung des Auftragens der NGS-Lösung

Nachdem die Objektträger 60 Minuten lang in der Feuchtekammer inkubiert wurden, wurde die NGS-Lösung von den Objektträgern abgeklopft und mit dem Auftragen des Primärantikörpers begonnen. Hierbei war streng darauf zu achten, dass die Negativkontrolle als Einzige der Proben, nicht mit dem Antikörper, sondern mit einem Kaninchenserum in PBS in der Konzentration 1:500 benetzt wurde. Die Primärantikörperlösung lag bereits in einer Lösung von 1:50 sowie 1:100 in NGS im Gefrierschrank in Mikroreaktionsgefäßchen vor. Auch das Kaninchenserum lag bereits in einer Verdünnung von 1:50 im Gefrierschrank vor, sodass aus der Mischung von 50 $\mu$ l und 24.950 $\mu$ l (=24,95ml) PBS die Verdünnung 1:500 entstand. Die Präparate wurden dann über Nacht erneut in der Feuchtekammer inkubiert. Der Ablauf dieser Arbeitsschritte ist in Abbildung 15 dargestellt:

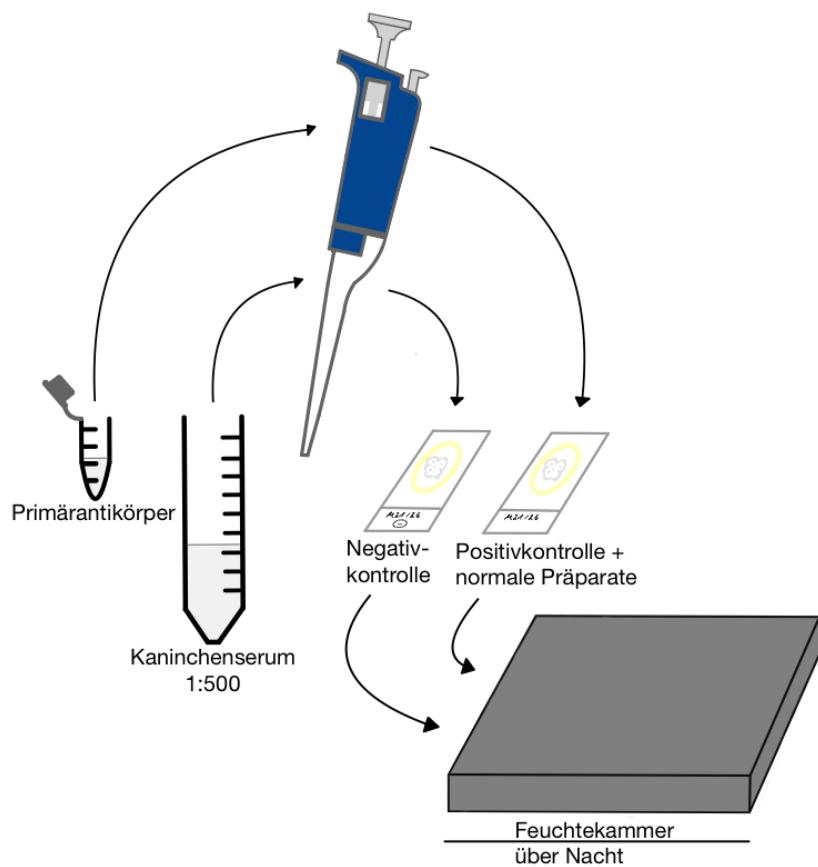


Abbildung 15 - schematische Darstellung des Auftragens des Primärantikörpers

Am nächsten Tag wurde die Lösung von den Schnitten erneut abgeklopft und zweimal zwei Minuten in PBS (Verdünnung 1:10 in destilliertem Wasser) gewaschen, um den Antikörper gänzlich von den Proben zu entfernen. Danach wurde eine Lösung aus 3%igem Wasserstoffperoxid hergestellt und auf die Schnitte pipettiert, um die endogenen Peroxidasen zu inaktivieren. Diese Peroxidlösung wird für zehn Minuten auf den Proben belassen und danach wieder zweimal zwei Minuten durch PBS ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurde der mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugierte Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:500 auf die Proben pipettiert und 60 Minuten inkubiert. Danach erfolgte erneut ein Waschgang in zweimal zwei Minuten PBS. Der Ablauf dieses Arbeitsschrittes ähnelte dabei sehr dem des in Abbildung 15 dargestellten Auftragens des Primärantikörpers.

Als nächstes wurde die DAB-Lösung (Diaminobenzidin) auf die Proben aufgetragen und unter dem Mikroskop kontrolliert, wann die gewünschte Braunfärbung vorliegt. Für die in dieser Arbeit gefärbten Schnitte wurde eine Färbezeit von 10 Minuten festgelegt. Die Reaktion wurde anschließend durch Eintauchen in eine PBS-Lösung gestoppt und nochmals eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Dafür wurden die Schnitte sehr kurz (höchstens eine Sekunde) in Hämatoxylin gedippt und anschließend in destilliertem Wasser die überschüssige Farbe ausgewaschen und danach fünf Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Wie bei der HE-Färbung schloss sich die Entwässerung in aufsteigendem Alkoholreihen an, wobei die Proben jeweils fünf Minuten in 70%--, 80%--, 90%igem 2-Propanol, zweimal fünf Minuten in 100%igem 2-Propanol und dreimal fünf Minuten in 100%igem Xylol belassen wurden. Es schloss sich das Einbetten mittels Roti-Histokitt an. Über Nacht härteten die Schnitte aus und wurden dann sorgfältig bei Raumtemperatur gelagert.

### **Peptidinkubation (Spezifitätsnachweis)**

Im Rahmen anderer Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Thomas Tschernig konnten bereits Peptidinkubationen mit dem TRPC6 Antikörper durchgeführt werden, sodass die Spezifität des TRPC6 Antikörpers als nachgewiesen vorausgesetzt wird [75]. Bei den vorausgegangenen Peptidinkubationen wurde das Kontrollpeptid zusammen mit dem Primärantikörper inkubiert und dann auf eine ausgewählte Probe pipettiert. Alle anderen Schritte wurden analog zum IHC-Färbeprotokoll durchlaufen. Biochemisch läuft der Spezifitätsnachweis wie folgt ab:

Das Kontrollpeptid bindet den  $F_{ab}$ -Teil des Primärantikörpers. Dieser Teil bindet sonst an das TRPC6 Protein, sodass bei einer Bindung zwischen Peptid und Antikörper, keine Bindung zwischen Antikörper und TRPC6 Protein entstehen kann und somit auch keine Bindung an den Sekundärantikörper entsteht. Letztendlich kommt es dabei dann zu keiner Färbung. Der Antikörper gilt als spezifisch beziehungsweise die Peptidinkubation als erfolgreich, wenn die mit dem Peptid inkubierte Probe im Vergleich zu anderen Proben, die nur mit dem Primärantikörper behandelt wurden, weniger positiv ist oder die charakteristische Braunfärbung gänzlich ausbleibt. Die Ergebnisse der Peptidinkubationen des TRPC6 Antikörpers am Myokard von Jacobs im direkten Vergleich zu meinen Positivkontrollen des Herzmuskels sind im Kapitel 9 Anhang dargestellt [75].

## **3.10 Auswertung und Statistik**

Für die untersuchten Gewebearten (Lymphknoten, Milz, Ileum, Appendix und Thymus) erfolgte die Auswertung von fünf immunhistochemisch gefärbten Proben. Aufgrund der begrenzten Anzahl von Tonsillenpräparaten konnten hier nur drei Schnitte ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach einem erarbeiteten Auswertungsschema (siehe Kapitel 4 Ergebnisse) und wurde durch die Zweitauswertung einer fachkundigen Person objektiviert. Es handelt sich um eine deskriptive Studie mit semiquantitativen Ergebnissen. Eine statistische Auswertung war daher nicht sinnvoll.

## 4. Ergebnisse

Das folgende Kapitel dient der Darstellung der erarbeiteten Ergebnisse und ist nach den jeweiligen lymphatischen Organen aufgeteilt. In jedem Kapitel werden beispielhaft einzelne Fotografien von Schnitten aufgezeigt, wobei nicht alle ausgewerteten Präparate aus Gründen der Übersichtlichkeit abgebildet werden.

Jedem Kapitel folgt eine schematische Darstellung aller ausgewerteten Proben des Organs in Form eines Balkendiagramms. Zur Orientierung innerhalb der Fotografie dient der jeweilige HE gefärbte Schnitt desselben Präparates mit entsprechender Markierung, der später im Balkendiagramm ausgewerteten Strukturen. Außerdem werden die entsprechenden Negativkontrollen der Gewebeart aufgeführt.

Wenn Beobachtungen nur bei einzelnen Präparaten gemacht werden konnten, werden diese qualitativ mit Fotografie ohne Auswertung im Diagramm am Ende des jeweiligen Kapitels angehängt.

Die Auswertung des Färbeverhaltens erfolgt nach einem festen Schema im direkten Vergleich mit denen bei der Färbung mitgeführten Negativkontrollen, bei denen keine Behandlung mit Primärantikörper stattgefunden hat.

Die dargestellten Ergebnisse sind die zusammengeführten Ergebnisse beider voneinander unabhängigen Auswertungen.

Der Nachweis des TRPC6 Proteins wird korrelierend zum jeweiligen Färbeergebnis angenommen.



*Abbildung 16 - Auswertungsschema der IHC-Färbungen*

Das Färbeverhalten als Ergebnis der Peroxidase Reaktion des DABs wird unterteilt in negativ (0), einfach positiv (+) und stark positives Färbeverhalten (++), wie in Abbildung 16 dargestellt.

Die folgende Tabelle präsentiert eine Übersicht der ausgewerteten Proben und deren zugehörigen Körperspendern. Eine Zuordnung der Patienten der Tonsillenproben wird ebenfalls aufgeführt. Die Tabelle zeigt das Todesalter der Körperspender beziehungsweise das Alter des Patienten bei Organentnahme, die Todesursache (entfällt bei den Tonsillenproben) sowie das Geschlecht. Die Todesursache wurde dem Totenschein entnommen. Zusätzlich wird jedem Präparat ein Alias zugewiesen, das für die Darstellung der Ergebnisse des jeweiligen Organs herangezogen wird.

	Journalnr.	Alias	Geschlecht	Alter	Todesursache
Lymph-knoten	22/13	1	w	81	Herzstillstand bei vorliegender Demenz
	22/12	2	w	87	Multiorganversagen bei arterieller Verschlusskrankheit mit Nekrosen
	21/26	3	w	83	cerebrale Herniation bei Basilaristhrombose
	20/26	4	m	98	Herzstillstand bei vorliegender Demenz
	22/09	5	m	85	Kardiopulmonalversagen bei Herzinsuffizienz
Milz	22/12	1	w	87	Multiorganversagen bei arterieller Verschlusskrankheit mit Nekrosen
	22/18	2	w	79	Multiorganversagen bei Plasmazellleukämie
	22/09	3	w	85	Kardiopulmonalversagen bei Herzinsuffizienz
	22/23	4	w	90	Verbrauchskoagulopathie bei Mesenterialembolie
	22/13	5	w	81	Herzstillstand bei vorliegender Demenz
Tonsilla palatina	1664/5	1	m	47	-
	1636/B	2	w	18	-
	1640C	3	m	32	-
Ileum	22/23	1	w	90	Verbrauchskoagulopathie bei Mesenterialembolie
	22/12	2	w	87	Multiorganversagen bei arterieller Verschlusskrankheit mit Nekrosen
	20/47	3	m	72	cerebrale Hypoxie bei Anämie und akuter myeloischer Leukämie
	22/83	4	w	75	fortgeschrittenes Analkarzinom
	20/65	5	w	84	Multiorganversagen bei Herzinsuffizienz
Appendix	20/47	1	m	72	cerebrale Hypoxie bei Anämie und akuter myeloischer Leukämie
	21/72	2	m	81	Aspirationspneumonie bei Hirninfarkt
	22/83	3	w	75	fortgeschrittenes Analkarzinom
	21/48	4	m	92	septisches Multiorganversagen bei bronchopulmonalem Infekt
	20/68	5	w	82	Altersmorbidität
Thymus	20/65_1	1	w	84	Multiorganversagen bei Herzinsuffizienz
	20/65_2	2	w	84	Multiorganversagen bei Herzinsuffizienz
	20/83	3	m	80	Herzkreislaufversagen bei Glioblastom und Panzytopenie
	20/59	4	w	89	Herzstillstand bei Cor pulmonale
	21/48	5	m	92	septisches Multiorganversagen bei bronchopulmonalem Infekt

Tabelle 6 - Zuordnung der Körperspender und Patienten der ausgewerteten Proben

## 4.1. Lymphknoten

### 4.1.1 Lymphknoten 1 - Hämatoxylin-Eosin-Färbung

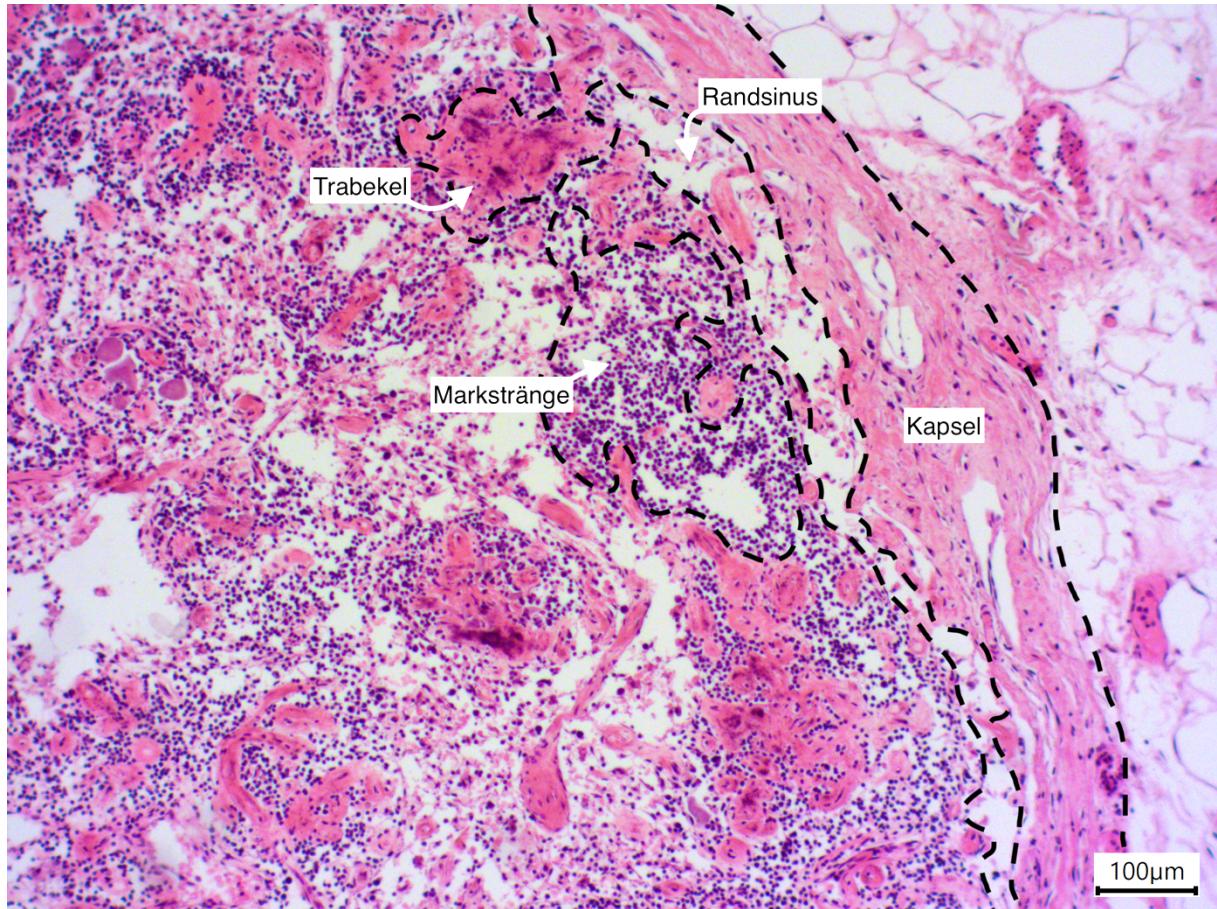


Abbildung 17 - Lymphknoten 1 - HE-Färbung

Abbildung 17 zeigt einen inguinalen Lymphknoten des Körperspenders 22/13 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: bindegewebige Kapsel mit Übergang in Trabekel, der Randsinus und die Lymphozytenansammlung (hier im Rahmen der Markstränge).

Es ist eine altersbedingte Degeneration des Lymphknotens zu beobachten, die am ehesten postinfektionell zu erklären ist. Außerdem zeigt sich eine autolytisch bedingte Auflockerung des Gewebes. Angeschnitten ist ausschließlich der Markbereich, da dieser sich im Alter zu Ungunsten des Rindenbereichs vergrößert. Sekundärfollikel können ebenfalls nicht beobachtet werden.

#### 4.1.2 Lymphknoten 1 - Immunhistochemie positiv

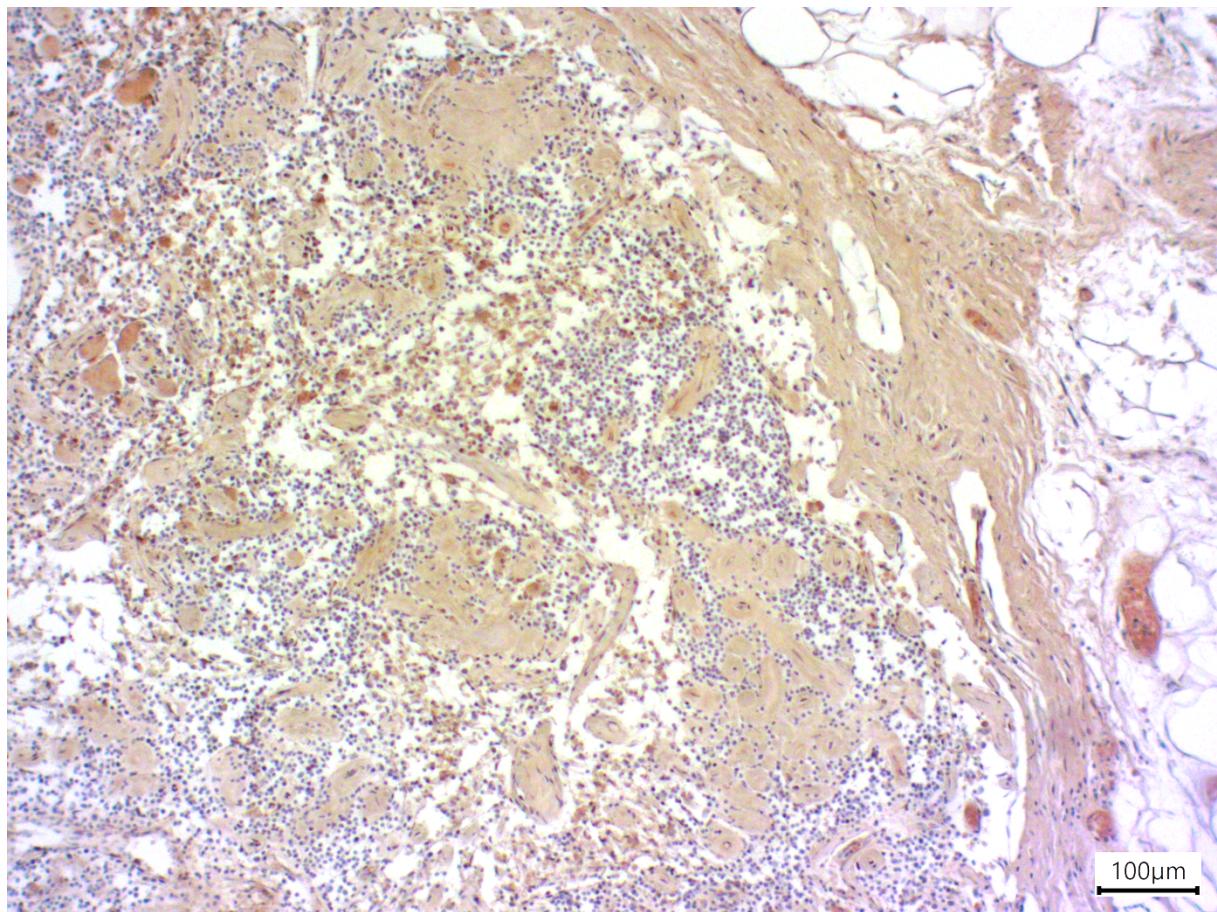


Abbildung 18 - Lymphknoten 1 - IHC-Färbung positiv

Abbildung 18 zeigt einen inguinalen Lymphknoten des Körperspenders 22/13 in immunhistochemischer Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

In direktem Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 19) ist zu beobachten, dass sowohl die Kapsel und Trabekel ein positives Ergebnis bei der IHC liefern (+). Der Randsinus ist ebenfalls leicht braun gefärbt (+). Der Bereich der Markstränge mit den angehäuften Lymphozyten ist hier als negativ zu werten (0).

Vereinzelt lässt sich beobachten, dass die fibroblastischen Retikulumzellen im Randsinus ein positives Ergebnis liefern.

#### 4.1.3 Lymphknoten 1 - Immunhistochemie negativ

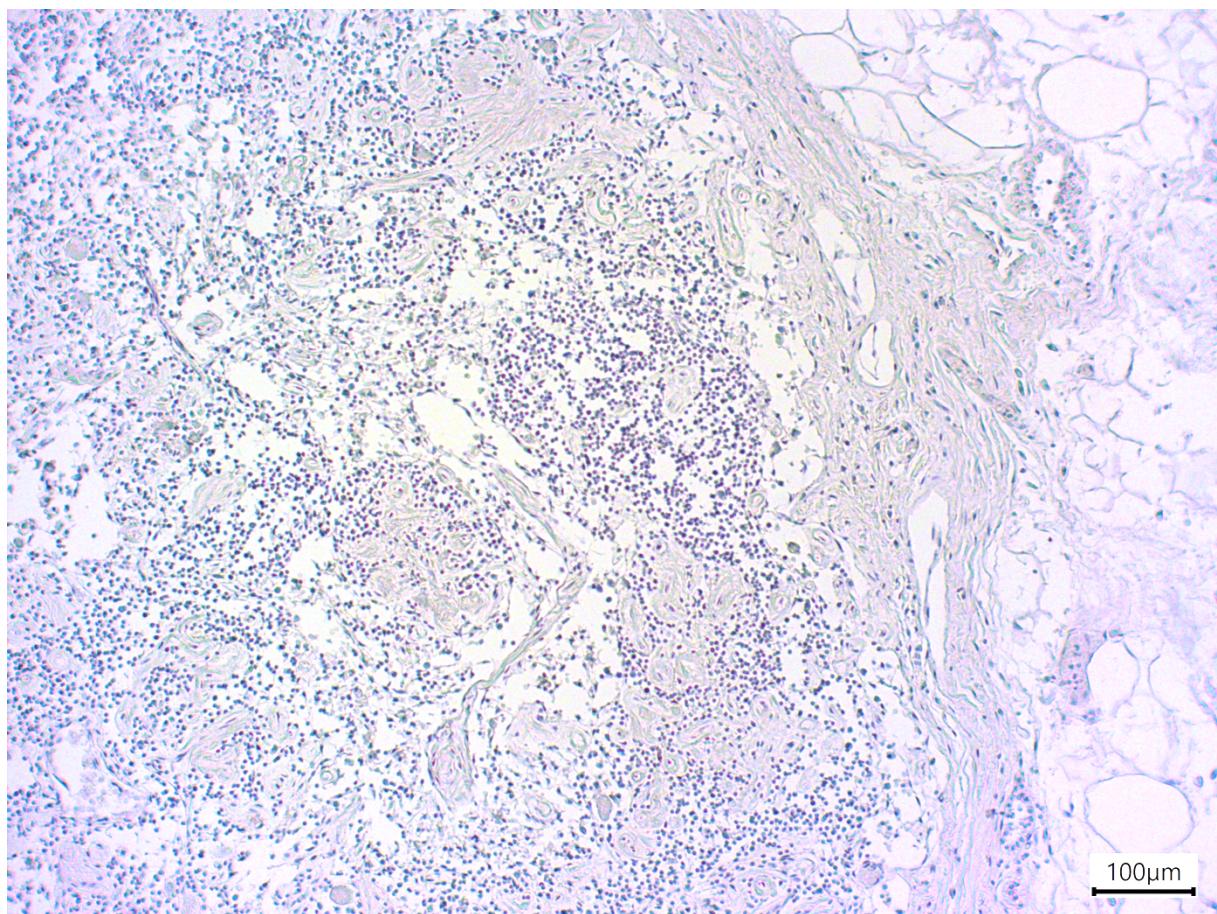


Abbildung 19 - Lymphknoten 1 - IHC-Färbung negativ

Abbildung 19 zeigt einen inguinalen Lymphknoten des Körperspenders 22/13 in immunhistochemischer Färbung ohne Primärantikörper (Negativkontrolle) in 10x Objektivvergrößerung.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass lediglich die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist.

#### 4.1.4 Lymphknoten 2 - Hämatoxylin-Eosin-Färbung



Abbildung 20 - Lymphknoten 2 - HE-Färbung

Abbildung 20 zeigt einen inguinalen Lymphknoten des Körperspenders 22/12 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: Kapsel mit Übergang in Trabekel sowie die Lymphozytenansammlung (hier im Rahmen der Markstränge). Der Randsinus ist in dieser Färbung nicht abgrenzbar. Ähnlich wie bei dem ersten dargestellten Lymphknoten wird hierbei eine infektiöse Genese dieser Veränderung angenommen.

#### 4.1.5 Lymphknoten 2 - Immunhistochemie positiv

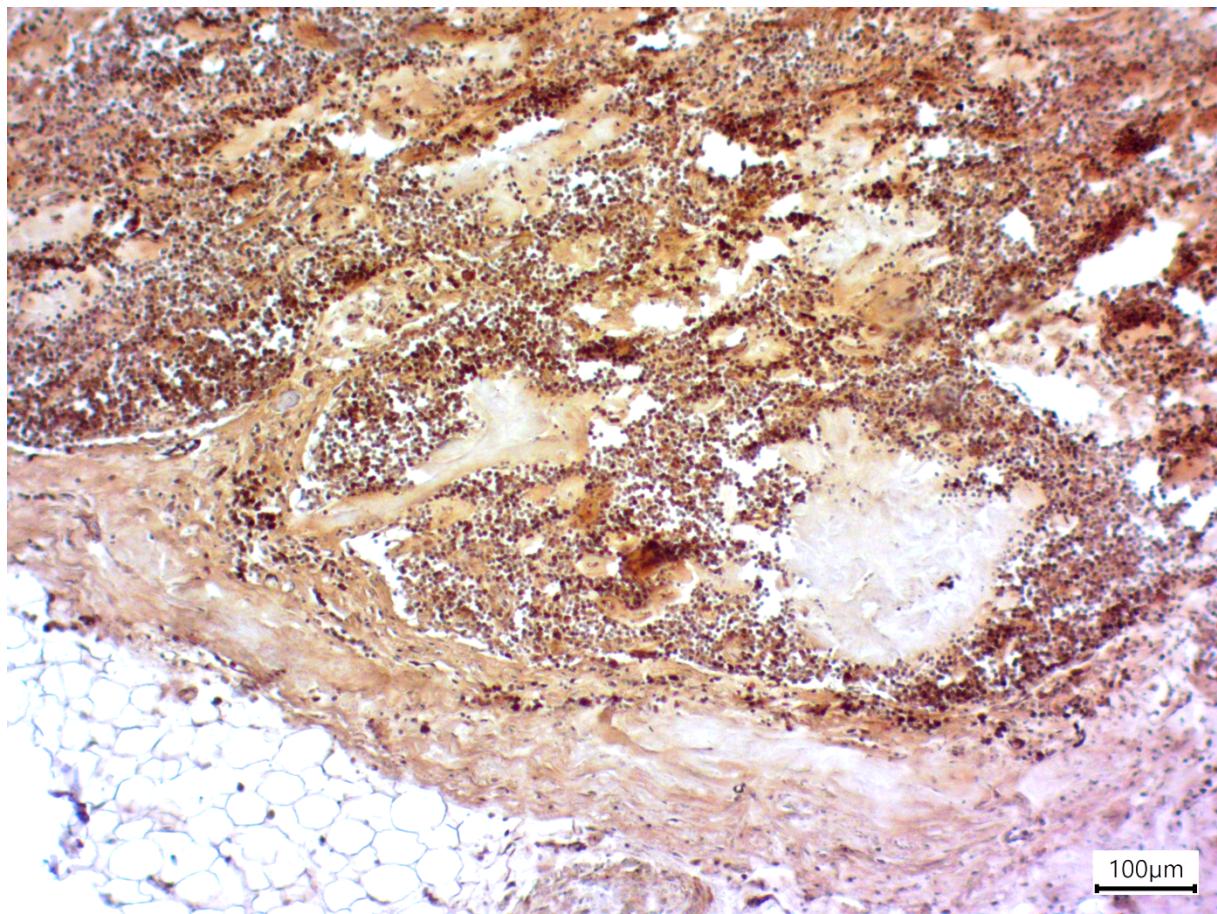


Abbildung 21 - Lymphknoten 2 - IHC-Färbung positiv

Abbildung 21 zeigt einen inguinalen Lymphknoten des Körperspenders 22/12 in immunhistochemischer Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Wie bereits beim ersten dargestellten Lymphknoten lässt sich eine durchweg positive Färbung der Kapsel und Trabekel erkennen (+). Eine Beurteilung des Randsinus ist in diesem Präparat nicht möglich. Der Bereich der Markstränge zeigt hier unter allen Lymphknotenpräparaten das deutlich positivste Ergebnis mit braun gefärbten Lymphozyten (++) . Wie beim ersten beobachteten Lymphknoten sind die fibroblastischen Retikulumzellen angefärbt.

#### 4.1.6 Lymphknoten 3 - Hämatoxylin-Eosin-Färbung

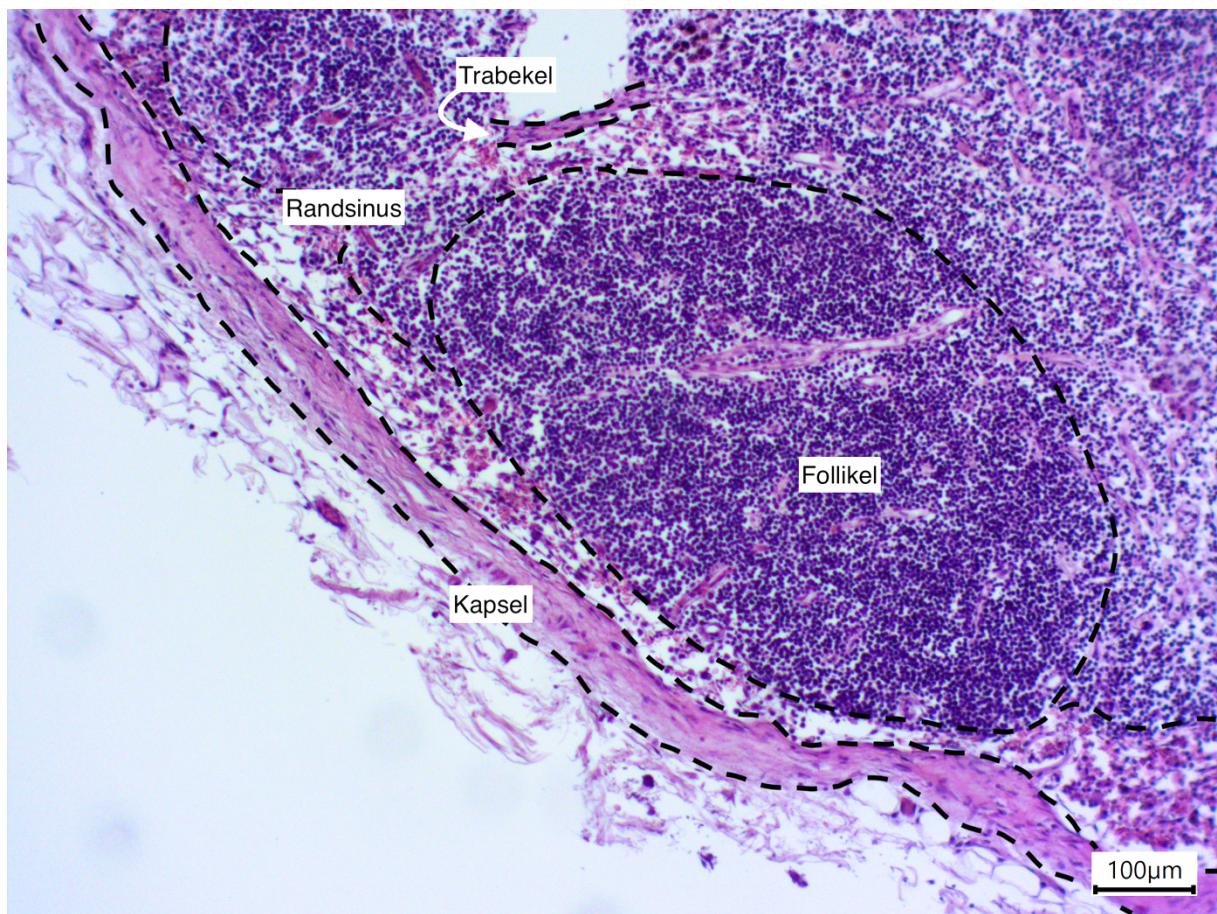


Abbildung 22 - Lymphknoten 3 - HE-Färbung

Abbildung 22 zeigt einen mediastinalen Lymphknoten des Körperspenders 21/26 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: Kapsel, Trabekel, Randsinus und die Lymphozytenansammlung (hier im Rahmen eines Follikels). Im Gegensatz zu den ersten beiden dargestellten Lymphknoten handelt es sich hierbei um einen mediastinalen Lymphknoten, der im Gegensatz zu den inguinalen Lymphknoten weniger fibrotischen Umbau sowie eine bessere Abgrenzbarkeit von Follikeln aufweist.

#### 4.1.7 Lymphknoten 3 - Immunhistochemie positiv

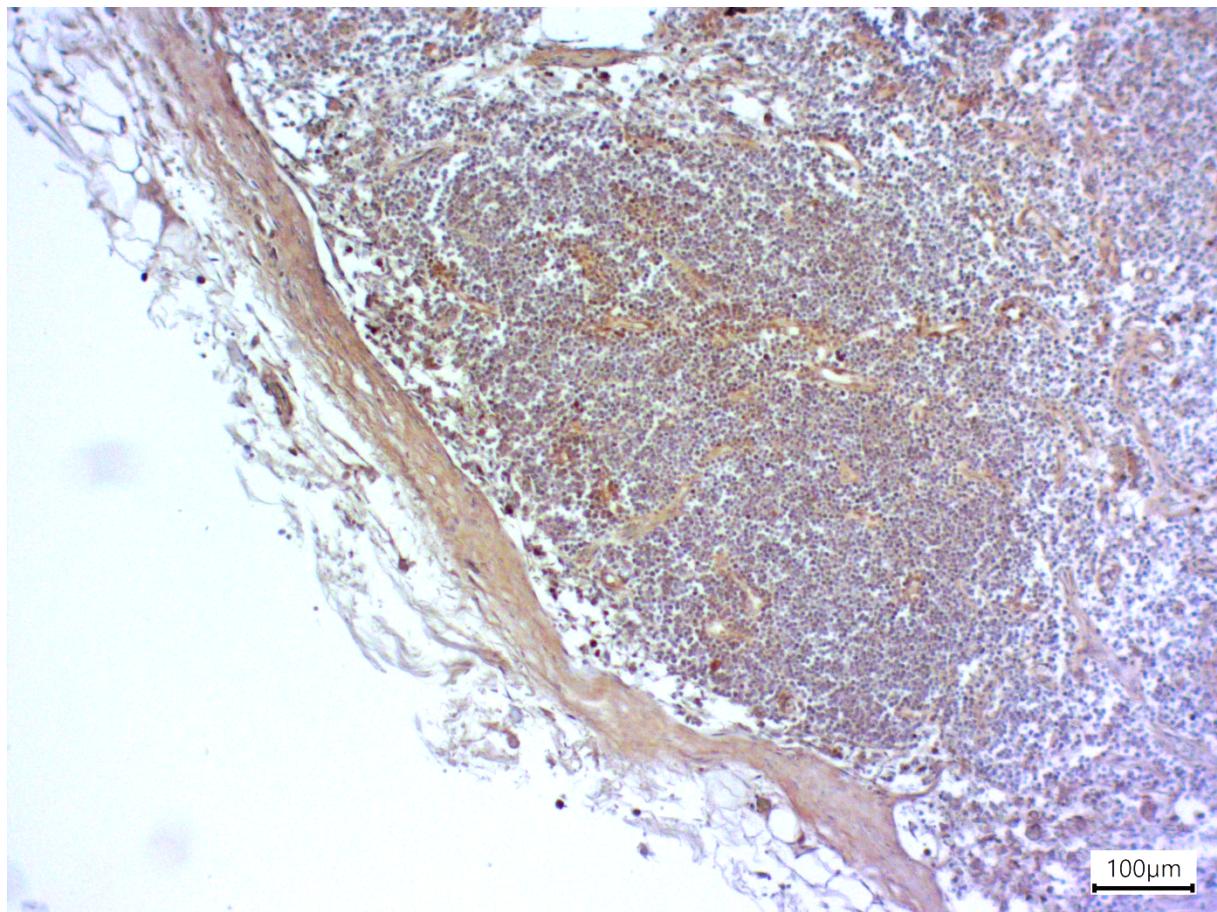


Abbildung 23 - Lymphknoten 3 - IHC-Färbung positiv

Abbildung 23 zeigt einen mediastinalen Lymphknoten des Körperspenders 21/26 in immunhistochemischer Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Ähnlich zu den beiden vorausgegangen dargestellten Lymphknoten zeigen Trabekel und Kapsel ein durchweg positives Färbeergebnis (+). Die Zellen im Randsinus sind ebenfalls braun angefärbt (+). Vereinzelt lässt sich beobachten, dass die fibroblastischen Retikulumzellen ein positives Ergebnis liefern. Auch Lymphozyten im Bereich des Follikels zeigen ein positives Ergebnis (+).

#### 4.1.8 Auswertung Lymphknoten

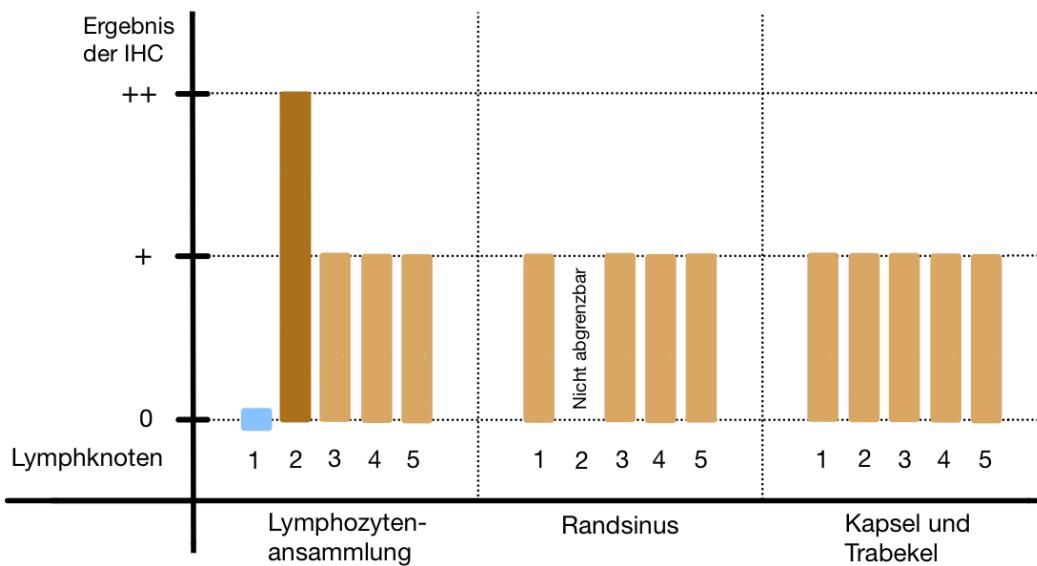


Abbildung 24 - Auswertung Lymphknoten

Abbildung 24 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf den TRPC6 Kanal der Lymphknoten. Auf der y-Achse wird unterteilt in negativ (0), einfach- (+) und stark positives Färbeverhalten (++) . Auf der x-Achse sind die ausgewerteten Strukturen der jeweils fünf untersuchten Lymphknoten dargestellt. Wenn die Struktur im jeweiligen Präparat nicht gut darstellbar war, ist dies als „Nicht abgrenzbar“ dargestellt.

Die Ansammlung der Lymphozyten zeigen die größte Varianz im Färbeverhalten. Hier sind sowohl negative (siehe Abbildung 6), aber auch einfach- (siehe Abbildung 23) und stark positive Färbungen (siehe Abbildung 21) zu beobachten.

Der Randsinus zeigt ein einfach positives Färbeverhalten (+) (siehe Abbildung 18). Hier lassen sich am besten die fibroblastischen Retikulumzellen abgrenzen.

Bindegewebige Kapsel und Trabekel zeigen ebenfalls ein einfach positives Färbeverhalten (siehe Abbildung 21).

#### 4.1.9 weitere nicht ausgewertete Beobachtungen - Lymphgefäß

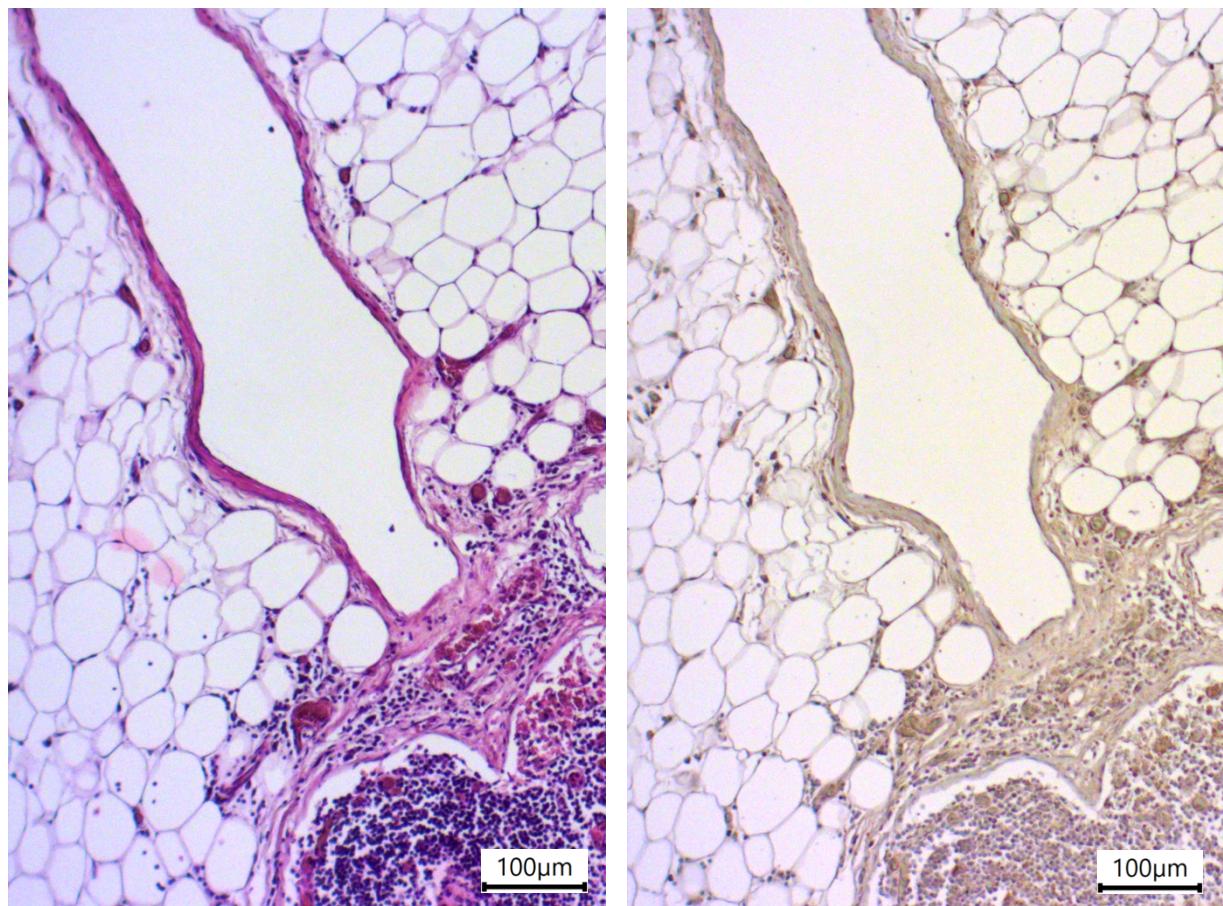


Abbildung 25 - Lymphknoten 3 mit efferentem Lymphgefäß  
HE- (links) & IHC-Färbung (rechts)

Abbildung 25 zeigt einen Lymphknoten am ehesten mit efferentem Lymphgefäß des Körperspenders 21/26 in IHC-Färbung und HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Zu beobachten ist ein brauner Farbumschlag des Chromogens an dem angeschnittenen Lymphgefäß (+). An den anderen gefärbten Lymphknoten sind keine Lymphgefäß ange schnitten, sodass keine dezidierte Auswertung stattfinden konnte.

## 4.2 Milz

### 4.2.1 Milz - Hämatoxylin-Eosin-Färbung



Abbildung 26 - Milz 1 HE-Färbung

Abbildung 26 zeigt einen Milzanschnitt des Körperspenders 22/12 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: Bindegewebe hier im Rahmen der Trabekel, eine Trabekelarterie, weiße und rote Pulpa.

#### 4.2.2 Milz - Immunhistochemie positiv

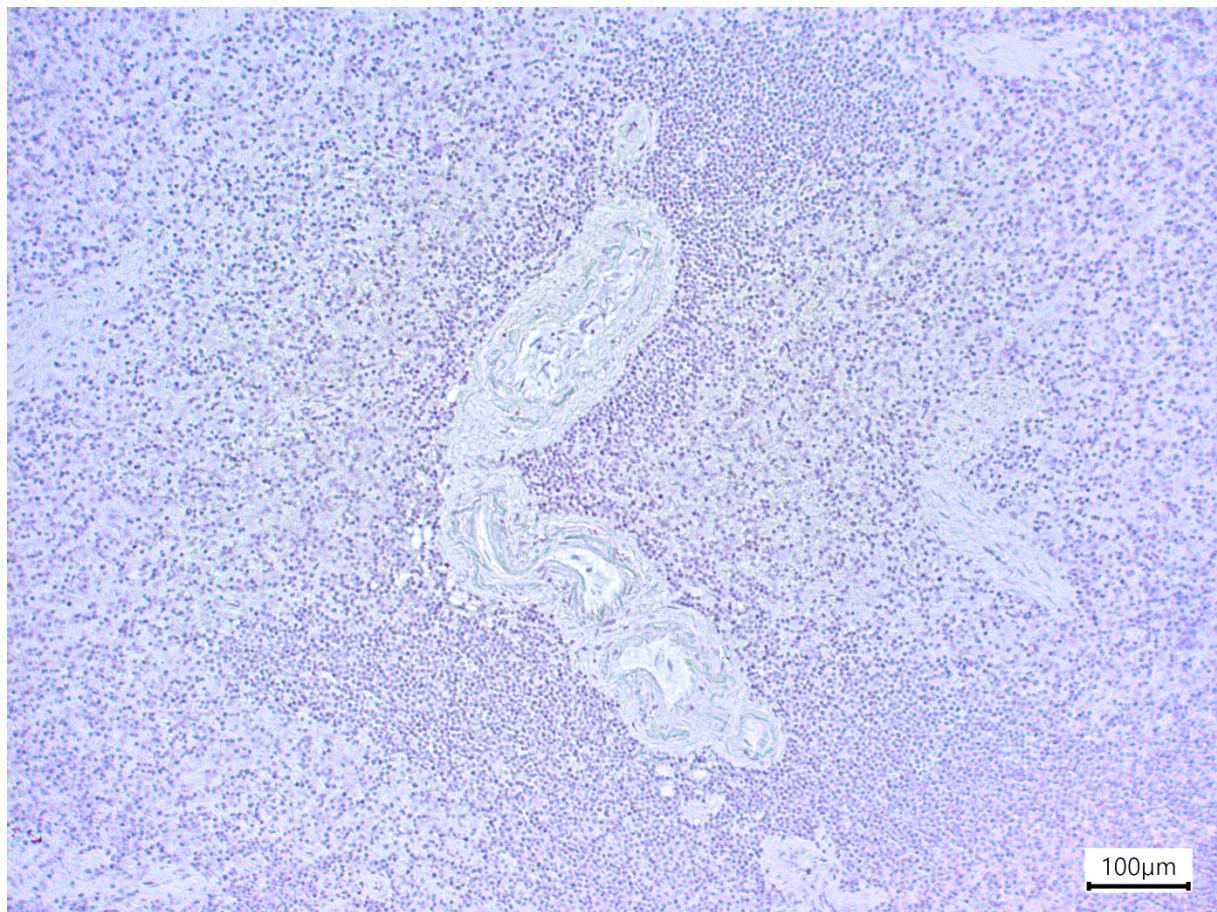


Abbildung 27 - Milz 1 IHC-Färbung

Abbildung 27 zeigt einen Milzanschnitt des Körperspenders 22/12 in immunhistochemischer Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Die weiße Pulpa mit denen dort angelagerten Lymphozyten zeigt ein deutlich positives Färbergebnis (++). Die rote Pulpa sowie das Bindegewebe in den Trabekeln sind leichter braun angefärbt (+). Die in dem Trabekel angelagerte Trabekelarterie zeigt ebenfalls ein einfach positives Färbergebnis (+).

#### 4.2.3 Milz - Immunhistochemie negativ



*Abbildung 28 - Milz I Negativkontrolle*

Abbildung 28 zeigt einen Milzanschnitt des Körperspenders 22/12 in immunhistochemischer-Färbung ohne Primärantikörper in 10x Objektivvergrößerung.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass lediglich die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist.

#### 4.2.4 Auswertung Milz

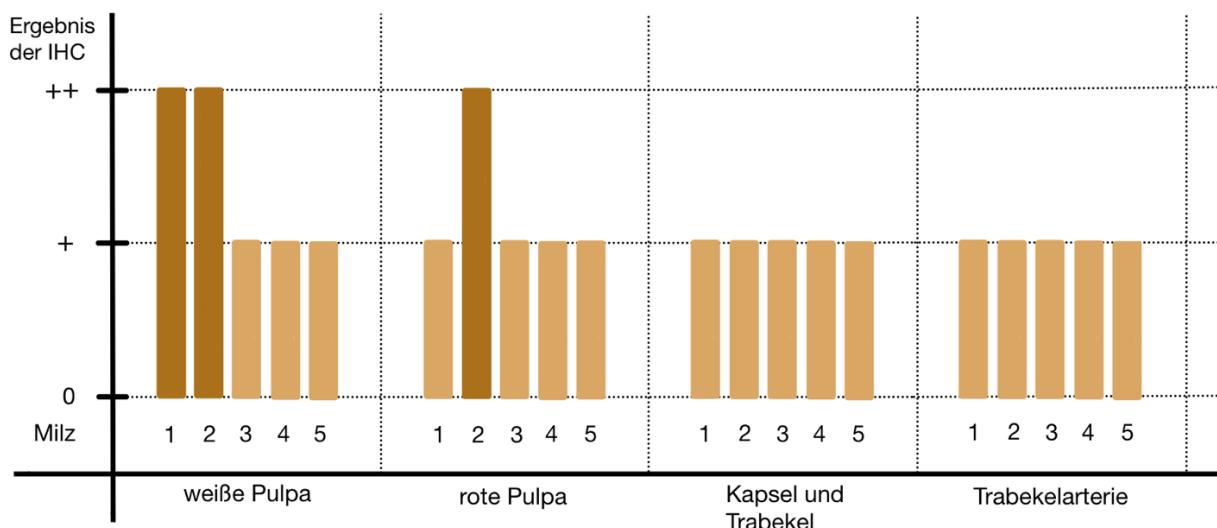


Abbildung 29 - Auswertung der IHC-Färbung der Milz

Abbildung 29 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf den TRPC6 Kanal der Milz. Auf der y-Achse wird unterteilt in negativ (0), einfach- (+) und stark positives Färbeverhalten (++) . Auf der x-Achse sind die ausgewerteten Strukturen der jeweils fünf untersuchten Milzanschnitte dargestellt.

Die weiße Pulpa zeigt ein durchweg positives, teilweise auch stark positives Färbergebnis (siehe Abbildung 27).

Die rote Pulpa färbt sich ebenfalls kontinuierlich braun an (siehe Abbildung 27).

Bei Kapsel und Trabekel sind ebenfalls durchweg ein einfache positives Färbeverhalten zu beobachten (siehe Abbildung 27).

Ein positives Färbeergebnis ist in den Trabekelarterien, besonders in der Tunica Intima und Tunica Adventitia zu beobachten (siehe Abbildung 27).

## 4.3 Tonsilla palatina

Bei der Tonsilla palatina waren nicht alle ausgewerteten Strukturen auf einer Fotografie darstellbar, deshalb wird unterteilt in die Darstellung eines Sekundärfollikels, die Darstellung einer Krypten mit FAE sowie der Abbildung einer HEV. Zu diesen drei Sequenzen folgende wieder HE- und IHC-Färbung sowie die Negativkontrolle desselben Präparates.

### 4.3.1 Tonsilla palatina - Sekundärfollikel - Hämatoxylin-Eosin Färbung

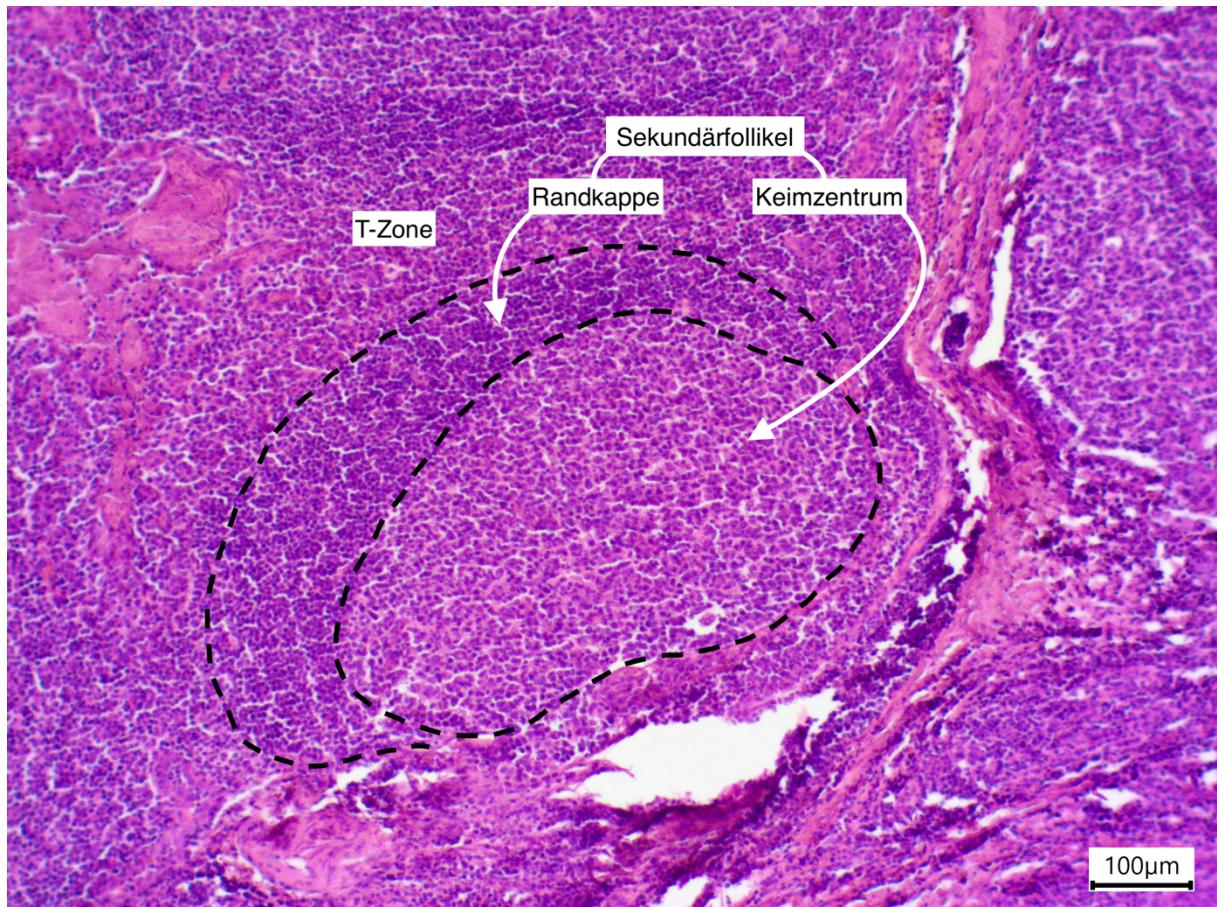


Abbildung 30 - Tonsilla palatina I - Follikel - HE-Färbung

Abbildung 30 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: Sekundärfollikel und T-Zone. Die anderen ausgewerteten Strukturen (FAE, HEV und Bindegewebe) sind in den folgenden Sequenzen markiert.

#### 4.3.2 Tonsilla palatina - Sekundärfollikel - Immunhistochemie positiv

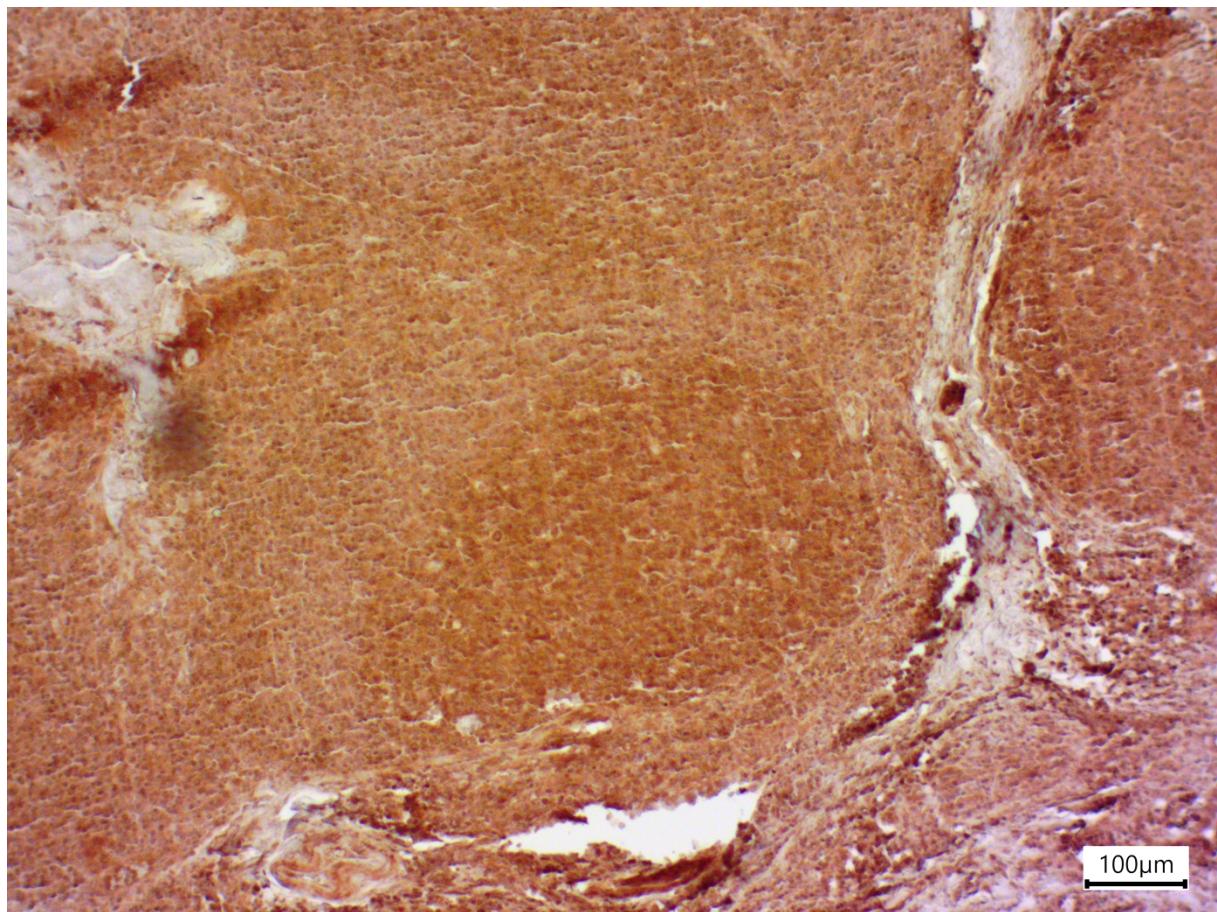


Abbildung 31 - *Tonsilla palatina 1 - Follikel - IHC-Färbung positiv*

Abbildung 31 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in IHC-Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Es ist zu beobachten, dass der Sekundärfollikel ein positives Färbeverhalten zeigt (++) wobei die Randkappe und die angelagerte T-Zone (+) eine leichteres braun zeigt als das Keimzentrum.

#### 4.3.3 Tonsilla palatina - Sekundärfollikel - Immunhistochemie negativ

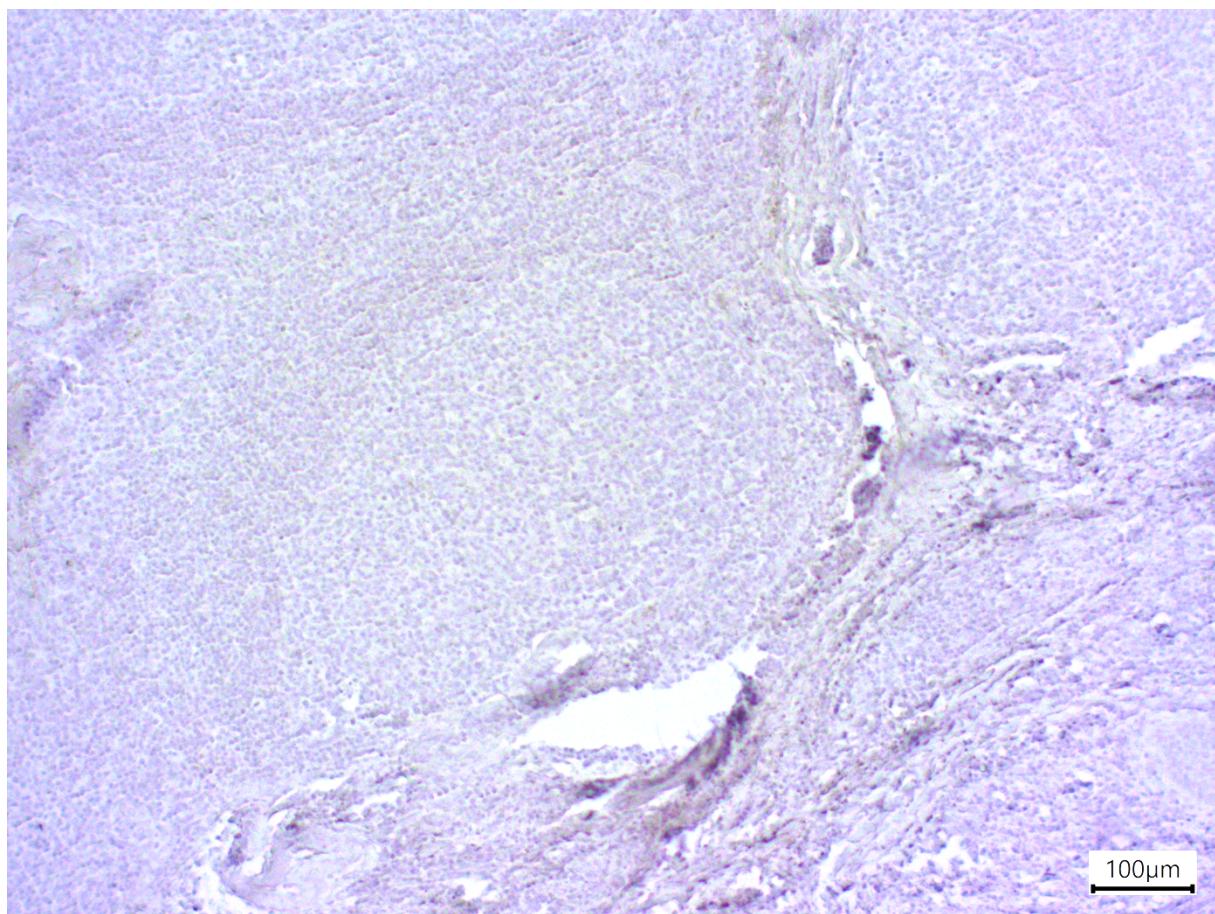


Abbildung 32 - *Tonsilla palatina I - Follikel - IHC-Färbung negativ*

Abbildung 32 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in IHC-Färbung in 10x Objektivvergrößerung ohne Behandlung mit dem Primärantikörper.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass lediglich die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist.

#### 4.3.4 Tonsilla palatina - Krypte mit FAE - Hämatoxylin-Eosin Färbung

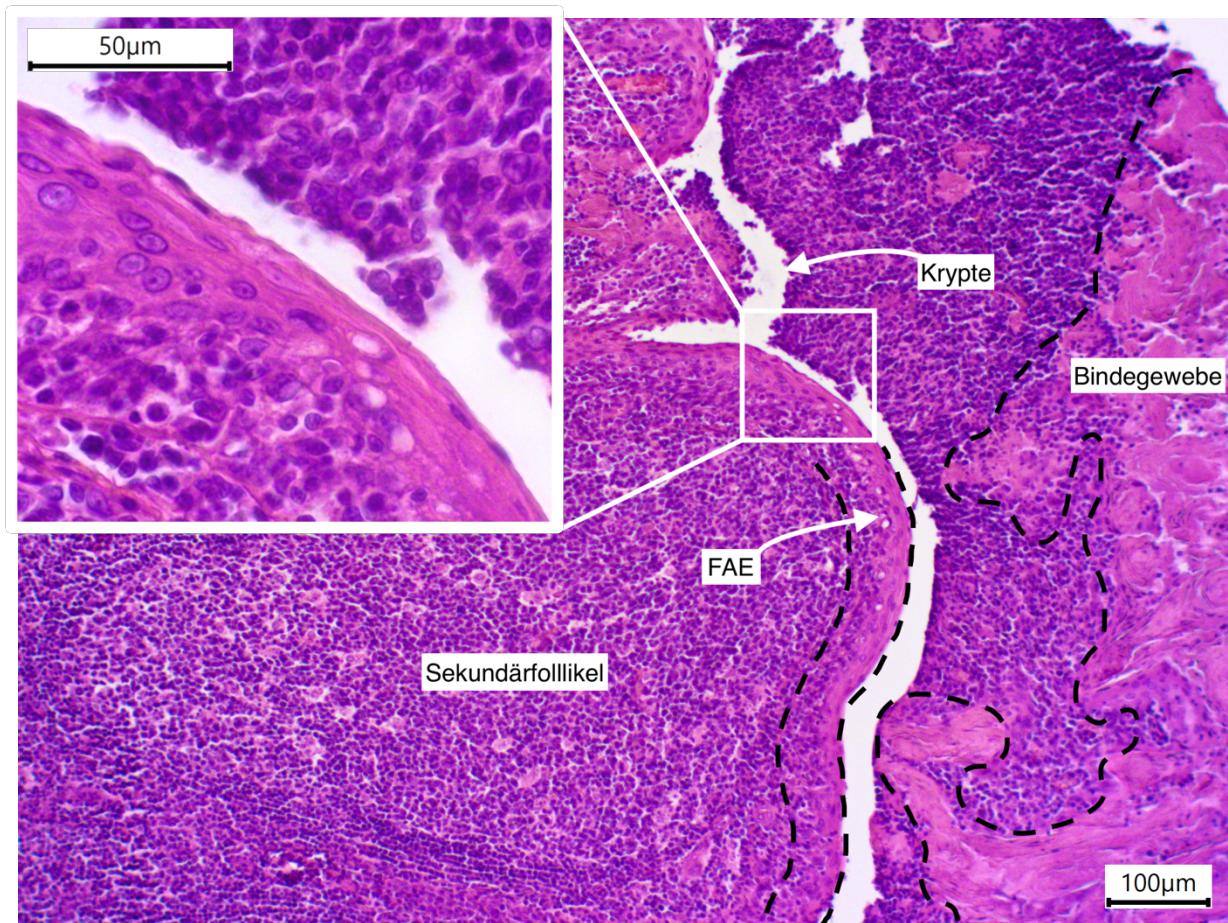


Abbildung 33 - Tonsilla palatina 1 - Krypte mit FAE - HE-Färbung

Abbildung 33 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in HE-Färbung in 10x sowie in 40x Objektivvergrößerung. Der in der 40x Objektivvergrößerung betrachtete Bereich ist entsprechend markiert.

Da keine gleichzeitige Darstellung aller bei der IHC ausgewerteten Strukturen (Sekundärfollikel mit Randwall, Krypte mit FAE und HEV) möglich war, dient diese Aufnahme der Orientierung im Hinblick auf das FAE der Krypten.

#### 4.3.5 Tonsilla palatina - Krypten mit FAE - Immunhistochemie positiv

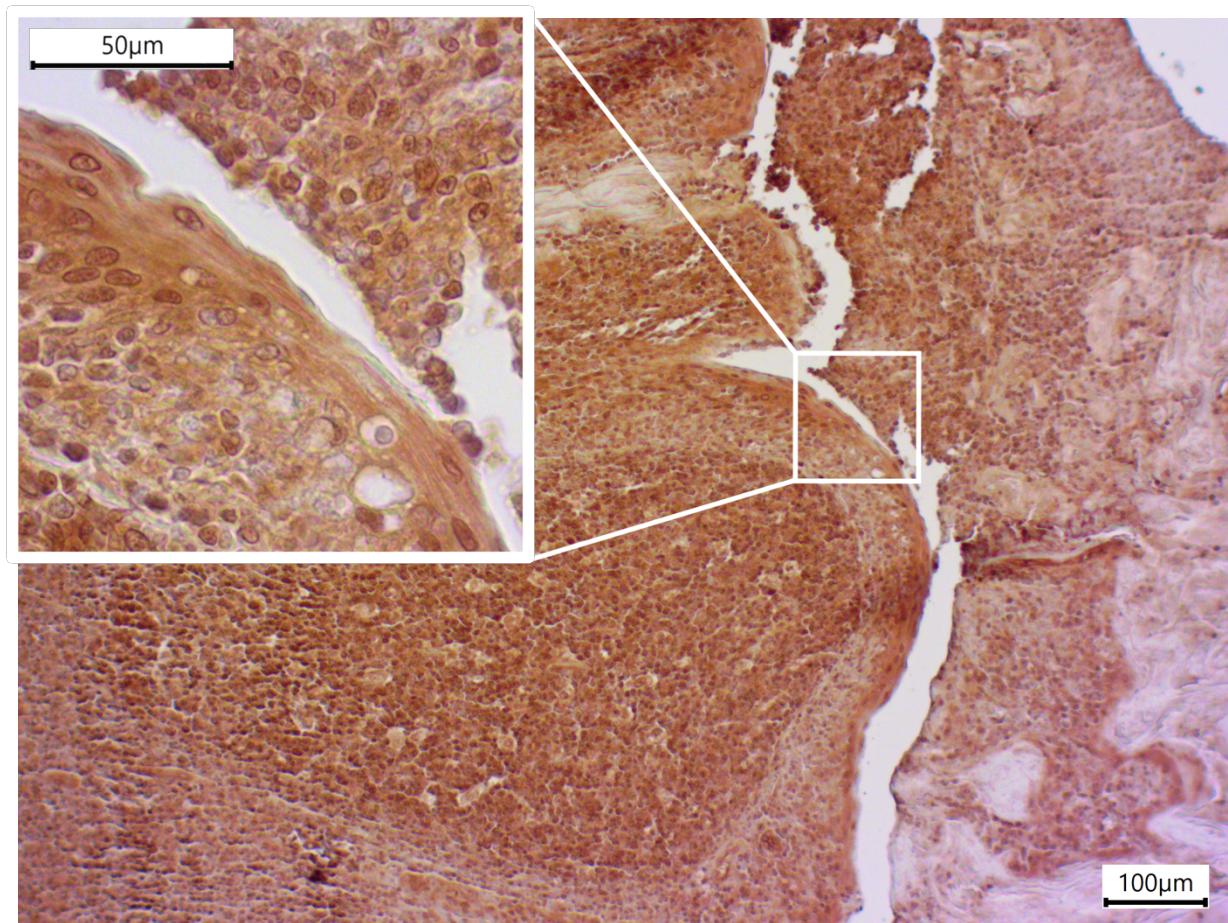


Abbildung 34 - Tonsilla palatina 1 - Krypten mit FAE - IHC-Färbung positiv

Abbildung 34 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in IHC-Färbung in 10x sowie in 40x Objektivvergrößerung. Der in der 40x Objektivvergrößerung betrachtete Bereich ist entsprechend markiert. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Es ist zu beobachten, dass das FAE ein stark positives Färbeverhalten zeigt (++).

Das angeschnittene Bindegewebe zeigt ebenfalls einen Farbumschlag des DAB-Chromogens (+).

#### 4.3.6 Tonsilla palatina - Krypte mit FAE - Immunhistochemie negativ

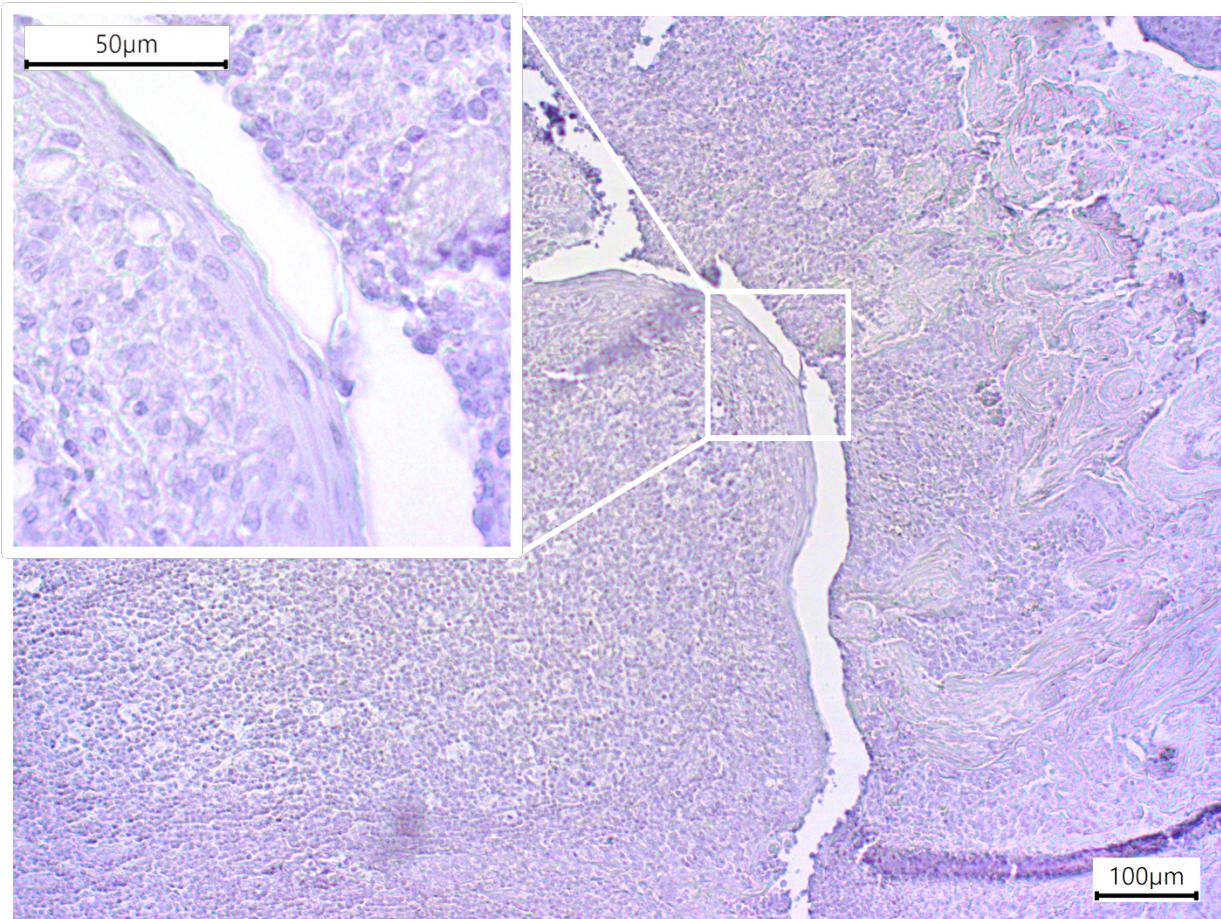


Abbildung 35 - Tonsilla palatina 1 - Krypte mit FAE - IHC-Färbung negativ

Abbildung 35 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in IHC-Färbung in 10x sowie in 40x Objektivvergrößerung ohne Behandlung mit dem Primärantikörper. Der in der 40x Objektivvergrößerung betrachtete Bereich ist entsprechend markiert.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass lediglich die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist.

#### 4.3.7 Tonsilla palatina - HEV - Hämatoxylin-Eosin Färbung

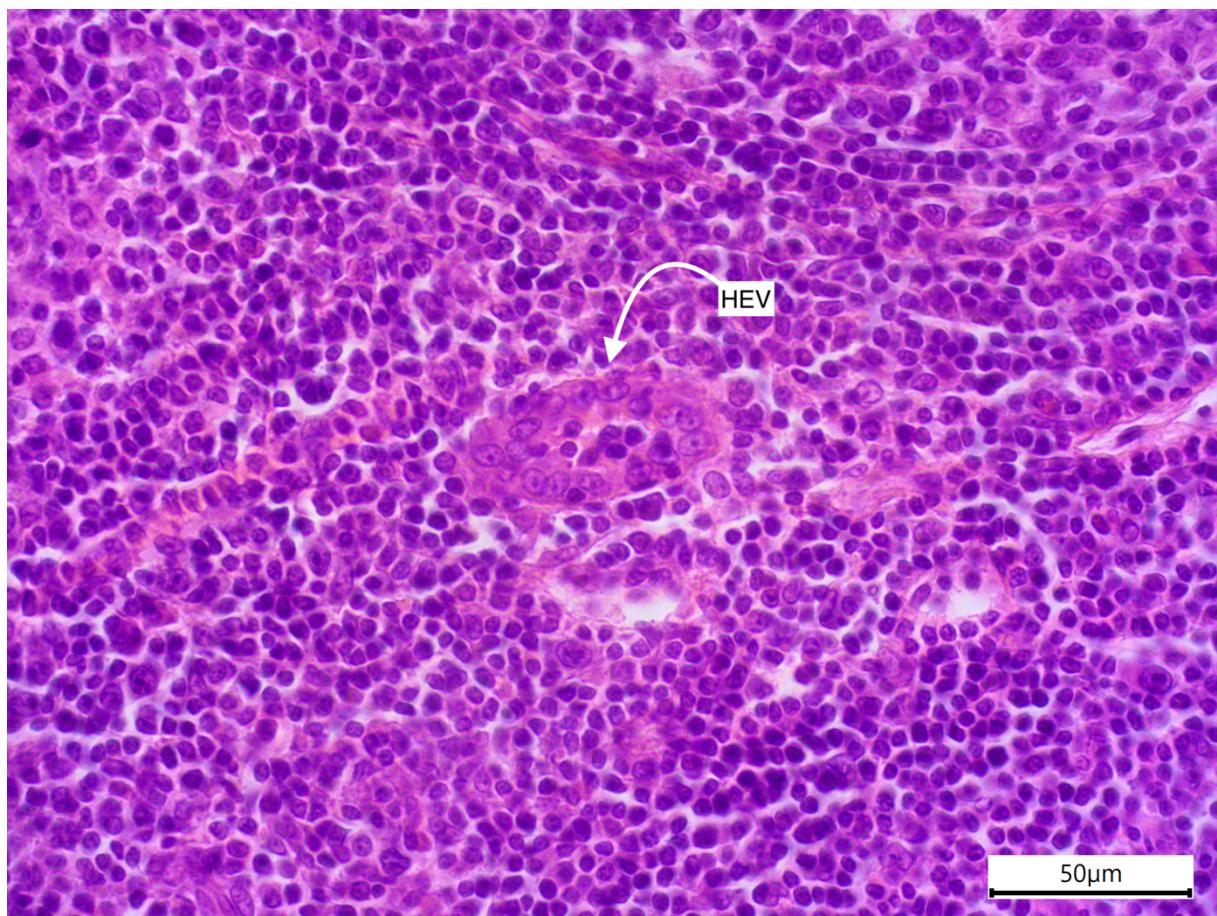


Abbildung 36 - *Tonsilla palatina 1 - HEV - HE-Färbung*

Abbildung 36 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in HE-Färbung in 40x Objektivvergrößerung.

Da keine gleichzeitige Darstellung der bei der IHC ausgewerteten Strukturen (Sekundärfollikel mit Randwall, Krypte mit FAE sowie HEV) möglich war, dient diese Aufnahme der Orientierung im Hinblick auf die HEV. Es ist eine HEV zu beobachten, bei der aktiv Lymphozyten durch das Endothel migrierieren.

#### 4.3.8 Tonsilla palatina - HEV - Immunhistochemie positiv

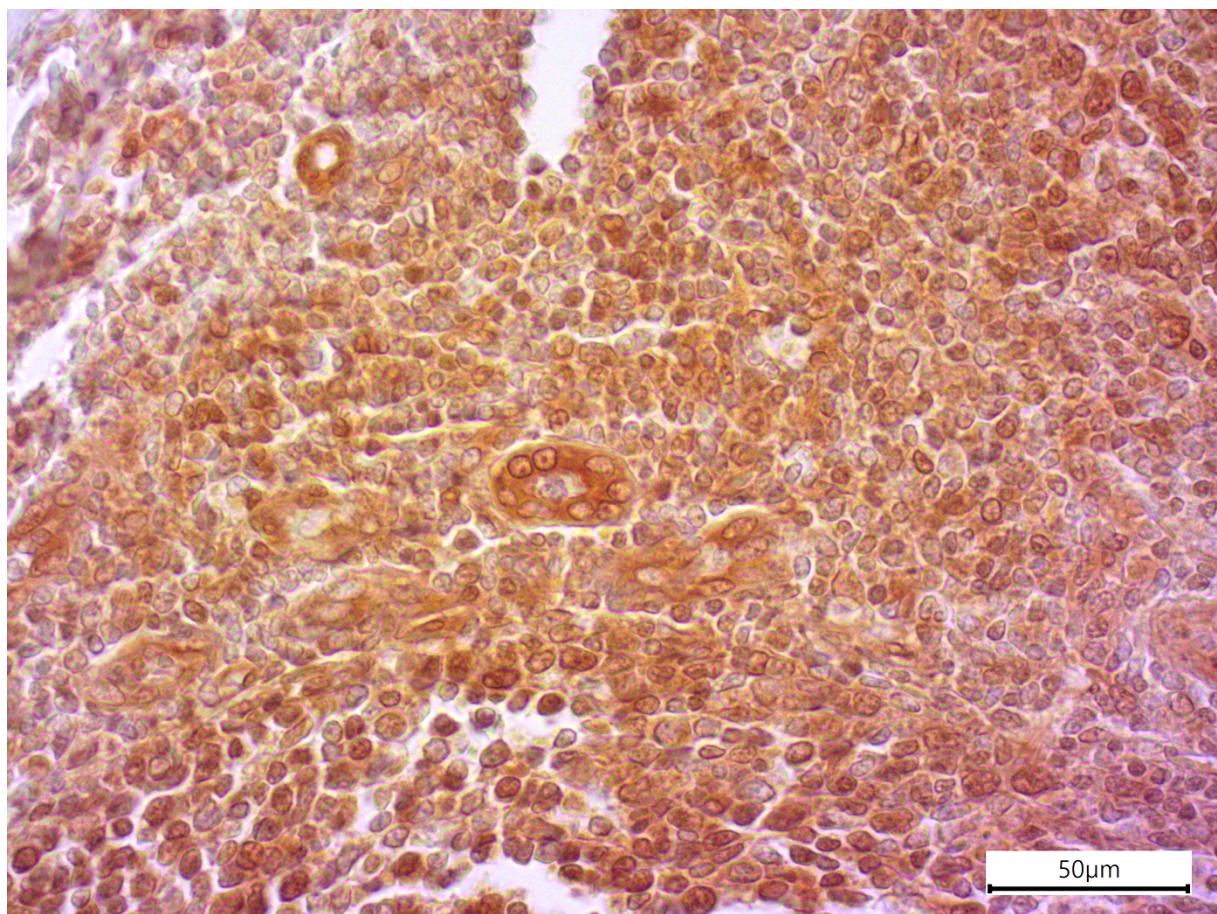


Abbildung 37 - *Tonsilla palatina I - HEV - IHC-Färbung positiv*

Abbildung 37 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in IHC-Färbung in 40x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Die HEV zeigt einen stark positiven Chromogenumschlag (++).

#### 4.3.9 Tonsilla palatina - HEV - Immunhistochemie negativ

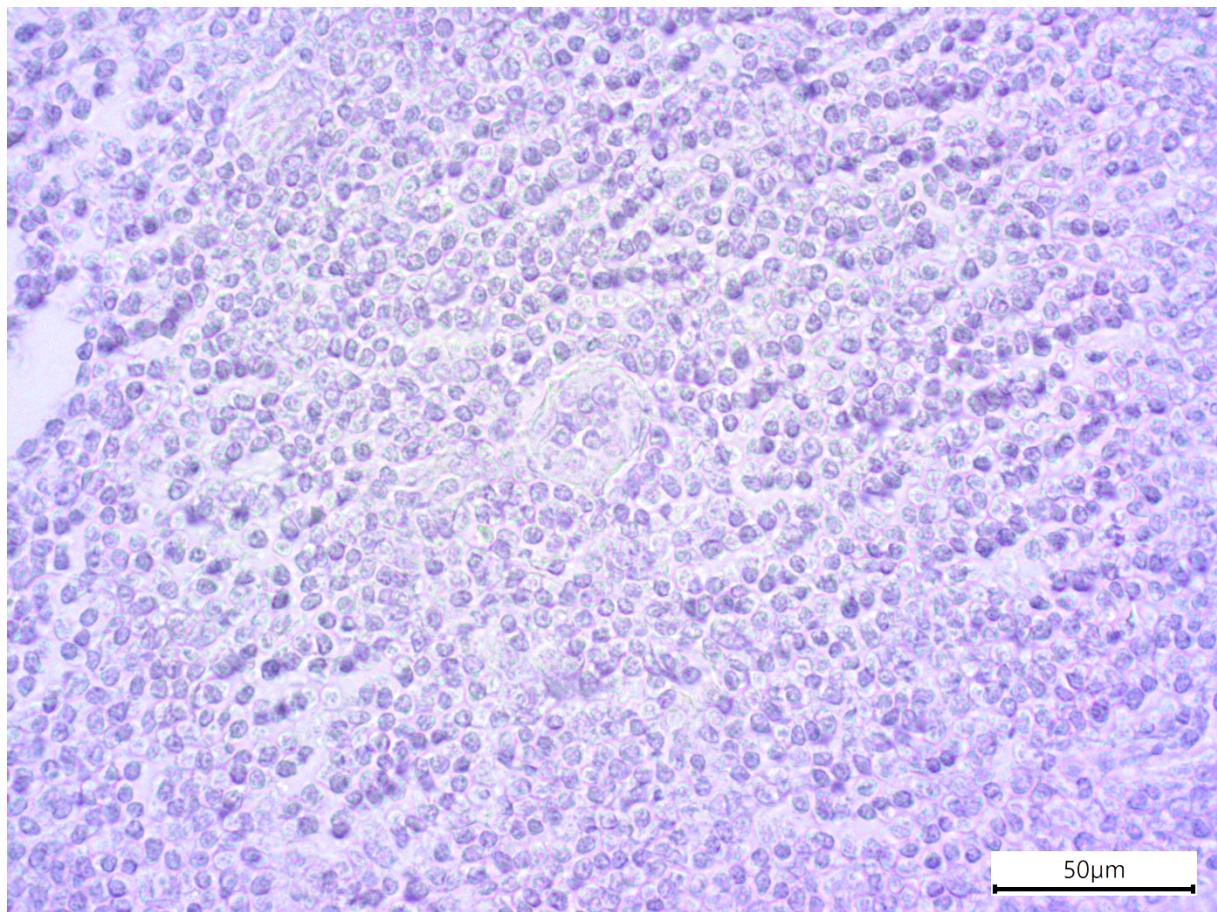


Abbildung 38 - *Tonsilla palatina 1 - HEV - IHC-Färbung negativ*

Abbildung 38 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1636-B in immunhistochemischer-Färbung ohne Primärantikörper in 40x Objektivvergrößerung.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass lediglich die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist.

#### 4.3.10 Auswertung Tonsilla palatina

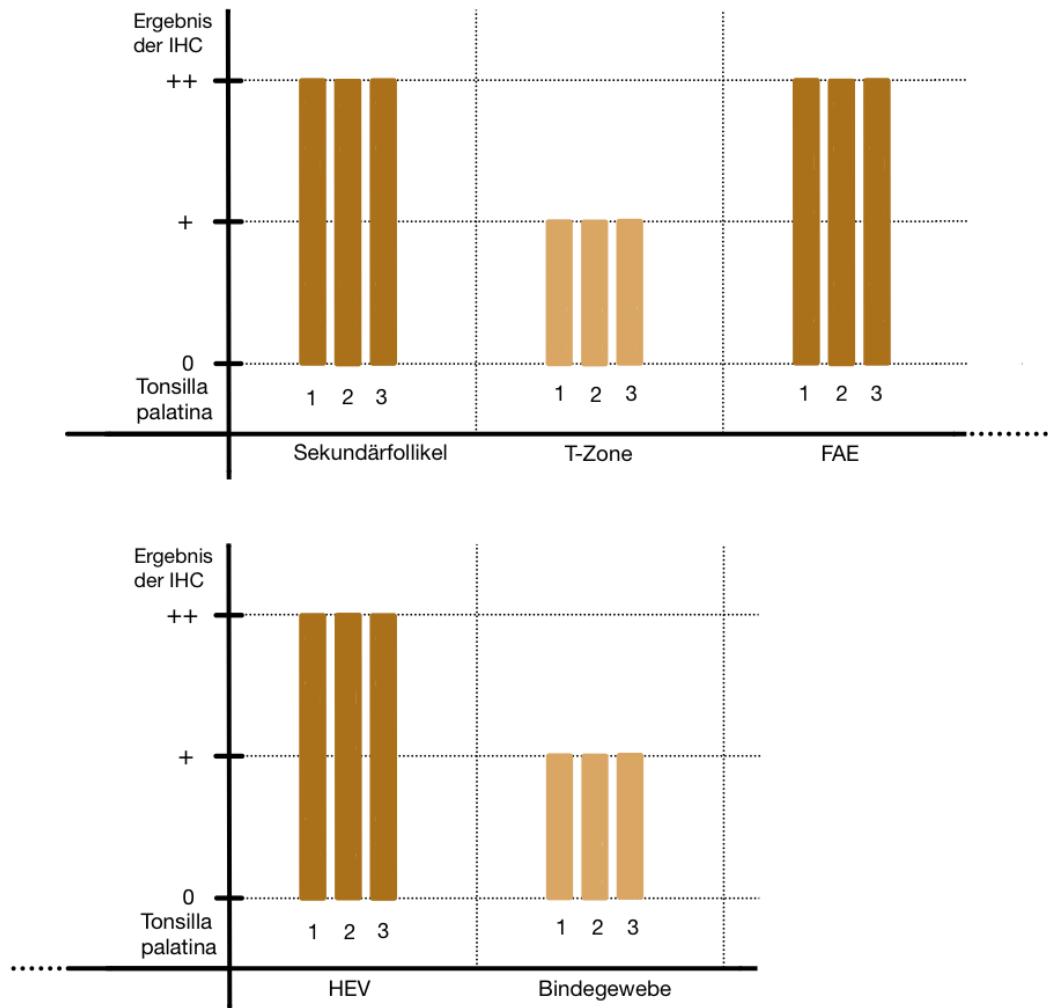


Abbildung 39 - Auswertung der IHC-Färbung der Tonsilla palatina

Abbildung 39 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf den TRPC6 Kanal der Gaumenmandel. Auf der y-Achse wird unterteilt in negativ (0), einfach- (+) und stark positives Färbeverhalten (++) . Auf der x-Achse sind die ausgewerteten Strukturen der jeweils drei untersuchten Gaumenmandelanschnitte dargestellt.

Die Sekundärfollikel zeigen durchweg ein stark positives Färbeverhalten (++) (siehe Abbildung 31). Besonders die Keimzentren färben sich stark braun an.

Die T-Zone zeigt eine einfach positive Färbung (+) (siehe Abbildung 31).

Das angeschnittene Bindegewebe zeigt ebenfalls ein positives Färbeverhalten (+) (siehe Abbildung 34).

Die HEV sowie das FAE zeigen einen starken Umschlag des Chromogens (++) (siehe Abbildung 34 + 37).

#### 4.3.11 Weitere nicht ausgewertete Beobachtungen - Bindegewebe im Vergleich zur Speicheldrüse

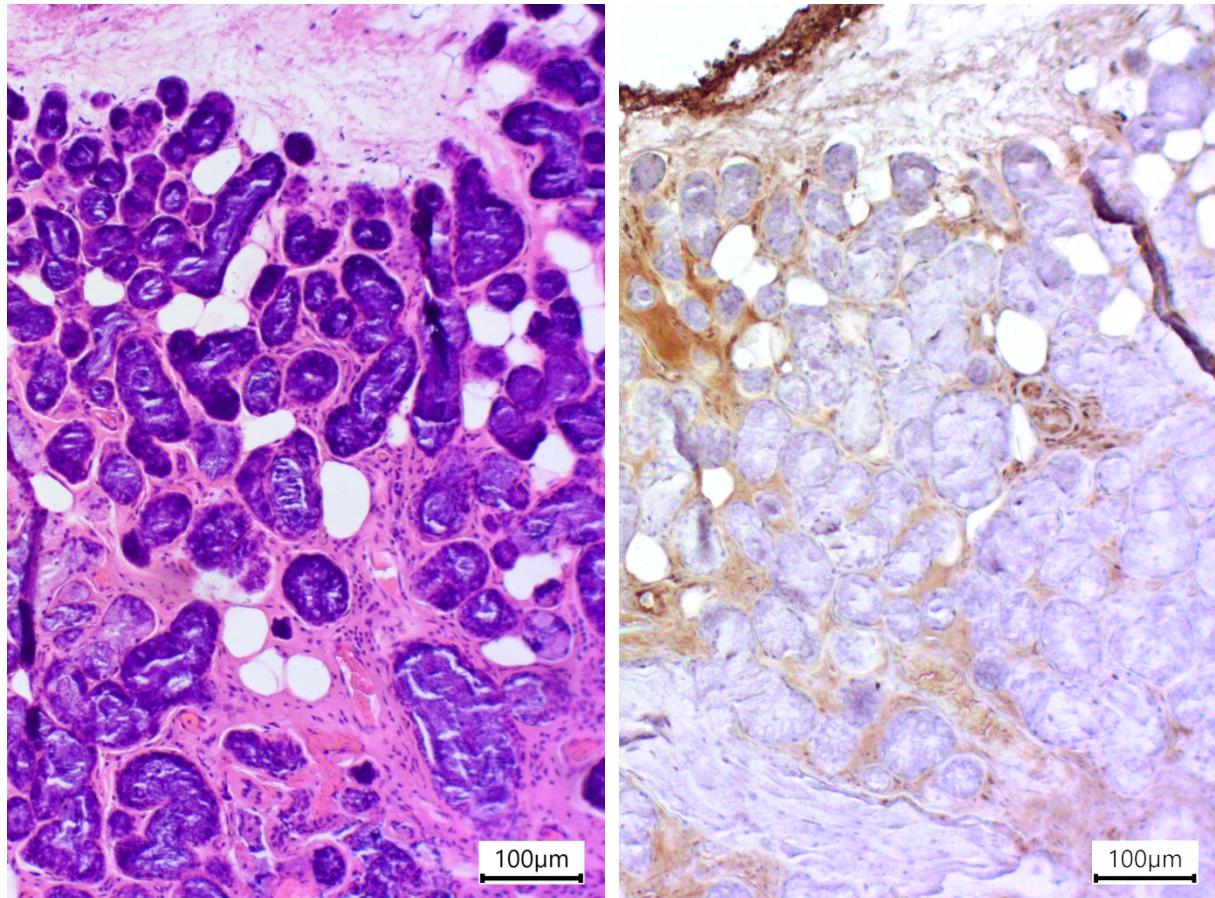


Abbildung 40 - Bindegewebe der Tonsilla palatina 3 im Vergleich zur Speicheldrüse  
HE- (links) & IHC-Färbung (rechts)

Abbildung 40 zeigt einen Anschnitt der Gaumenmandel des Patienten 1640L in IHC-Färbung und HE-Färbung im direkten Vergleich in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50. Es ist der braune Farbumschlag des Chromogens an den Fibroblasten (+) im direkten Vergleich zu den fast negativen Drüsenendstücken der Speicheldrüse (0) zu beobachten.

## 4.4 Ileum (gut-associated lymphatic tissue)

Im Gegensatz zu den anderen dargestellten Geweben, werden jeweils zwei Abbildungen des Ileums in vier- und zehnfacher Objektivvergrößerung dargestellt, um die Orientierung innerhalb des Präparates zu gewährleisten.

### 4.4.1 Ileum - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 4x

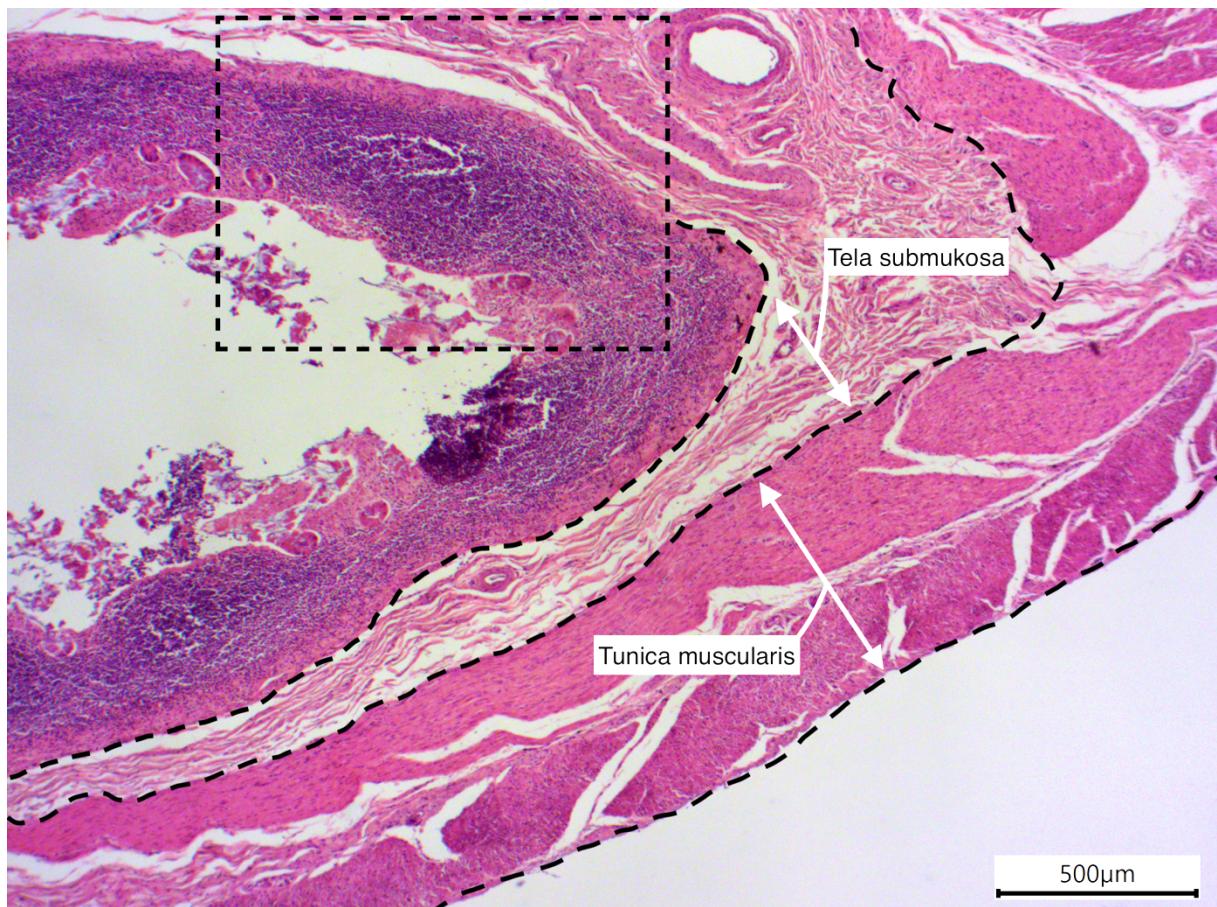


Abbildung 41 - Ileum 1 - HE-Färbung - 4x

Abbildung 41 zeigt einen Querschnitt des terminalen Ileums des Körperspenders 22/23 in HE-Färbung in 4x Objektivvergrößerung.

Da keine gleichzeitige Darstellung der bei der IHC ausgewerteten Strukturen (Lymphfollikel, Domepithel, Tela submukosa, Tunica muscularis und Gefäße) in zehnfacher Objektivvergrößerung möglich war, beziehungsweise kleine Strukturen wie das Domepithel nur schwer in vierfacher Objektivvergrößerung erkennbar sind, dient diese Aufnahme der Orientierung im Präparat sowie der Darstellung der glatten Muskulatur im Rahmen der Tunica muscularis und des Bindegewebes der Tela submukosa.

Der in der nächsten Abbildung weiter vergrößerte Ausschnitt (siehe Abbildung 42) ist markiert.

#### 4.4.2 Ileum - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 10x

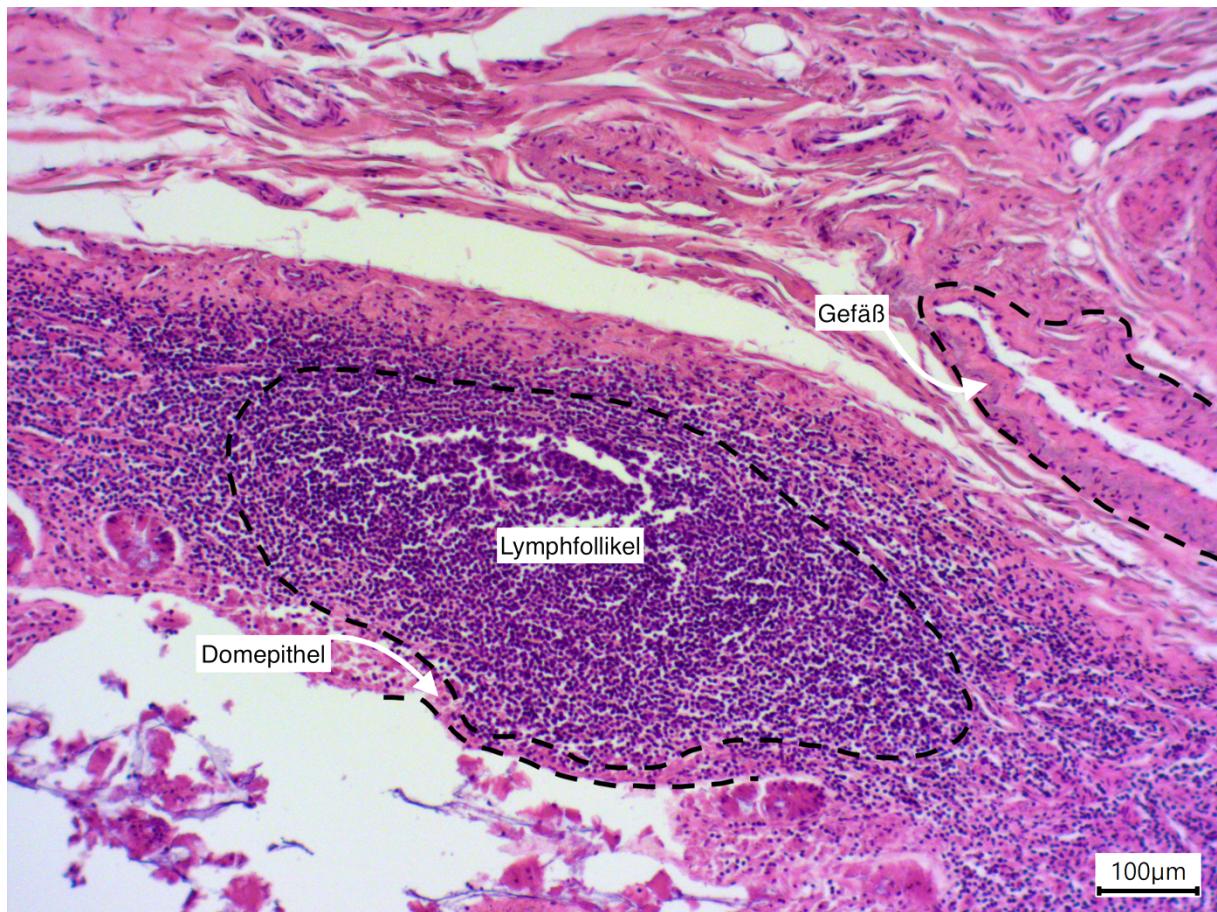


Abbildung 42 - Ileum 1 - HE-Färbung - 10x

Abbildung 42 zeigt einen Querschnitt des terminalen Ileums des Körperspenders 22/23 in HE-Färbung in 10x Objektiv.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: Lymphfollikel, Domepithel und Gefäße.

Die simultane Darstellung der glatten Muskulatur der Tunica muscularis sowie des Bindegewebes der Tela submukosa gleichzeitig zu den Peyer-Patches ist in dieser Objektivvergrößerung nicht möglich. Zur Darstellung der Tunica muscularis und Tela submukosa siehe Abbildung 41.

Die Peyer-Patches setzen sich zusammen aus dem Follikel-assoziiertes Epithel (Domepithel) und den Lymphfollikeln.

#### 4.4.3 Ileum - Immunhistochemie - positiv - 4x

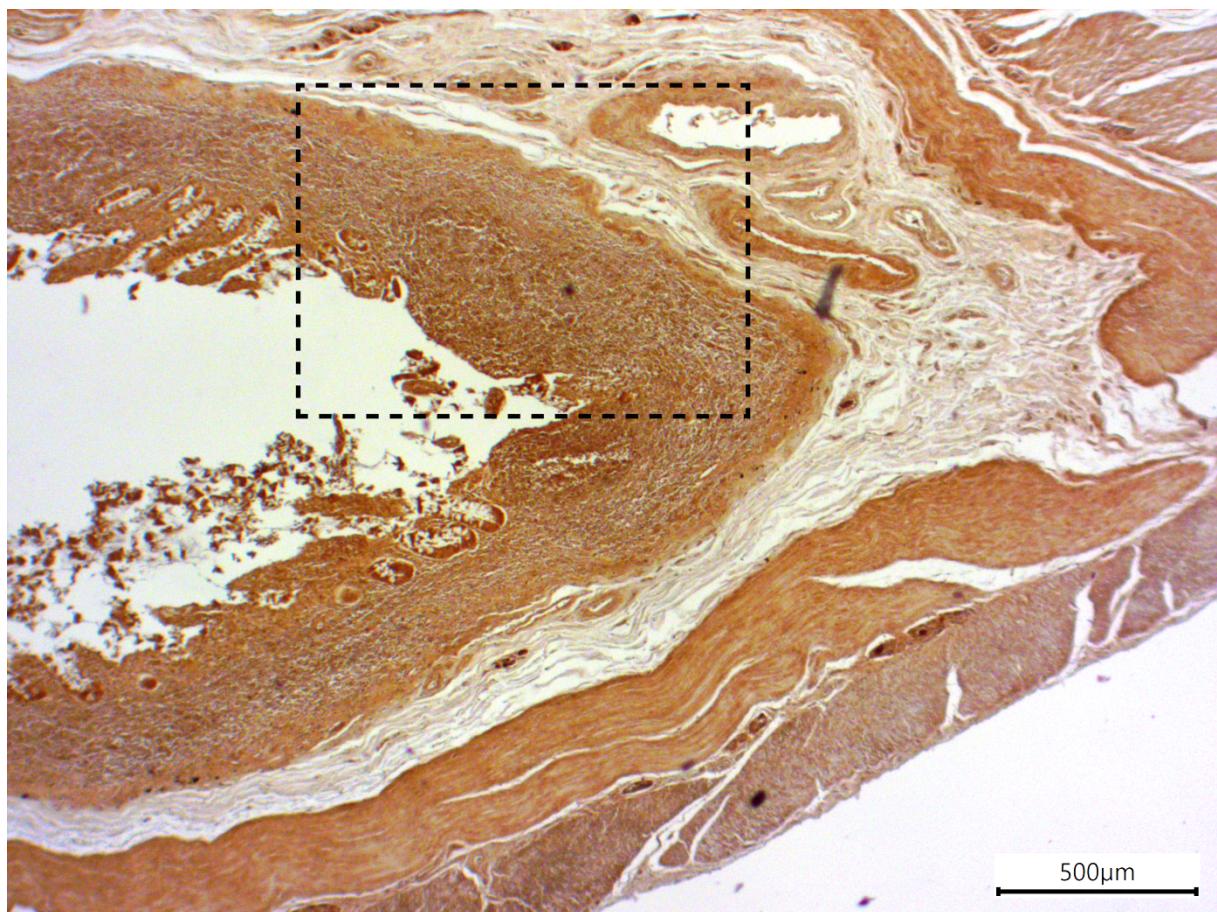


Abbildung 43 - Ileum 1 - IHC-Färbung - positiv - 4x

Abbildung 43 zeigt einen Querschnitt des terminalen Ileums des Körperspenders 22/23 in IHC-Färbung in 4x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Es ist zu beobachten, dass die glatte Muskulatur der Tunica muscularis sowie das Bindegewebe der Tela submukosa sich braun anfärbt (+). Alle anderen ausgewerteten Strukturen (Lymphfollikel, Domepithel und Gefäße) sind in der Beschriftung der nächsten Abbildung beschrieben (siehe Abbildung 44).

Der in der nächsten Abbildung weiter vergrößerte Ausschnitt ist markiert.

#### 4.4.4 Ileum - Immunhistochemie - positiv - 10x

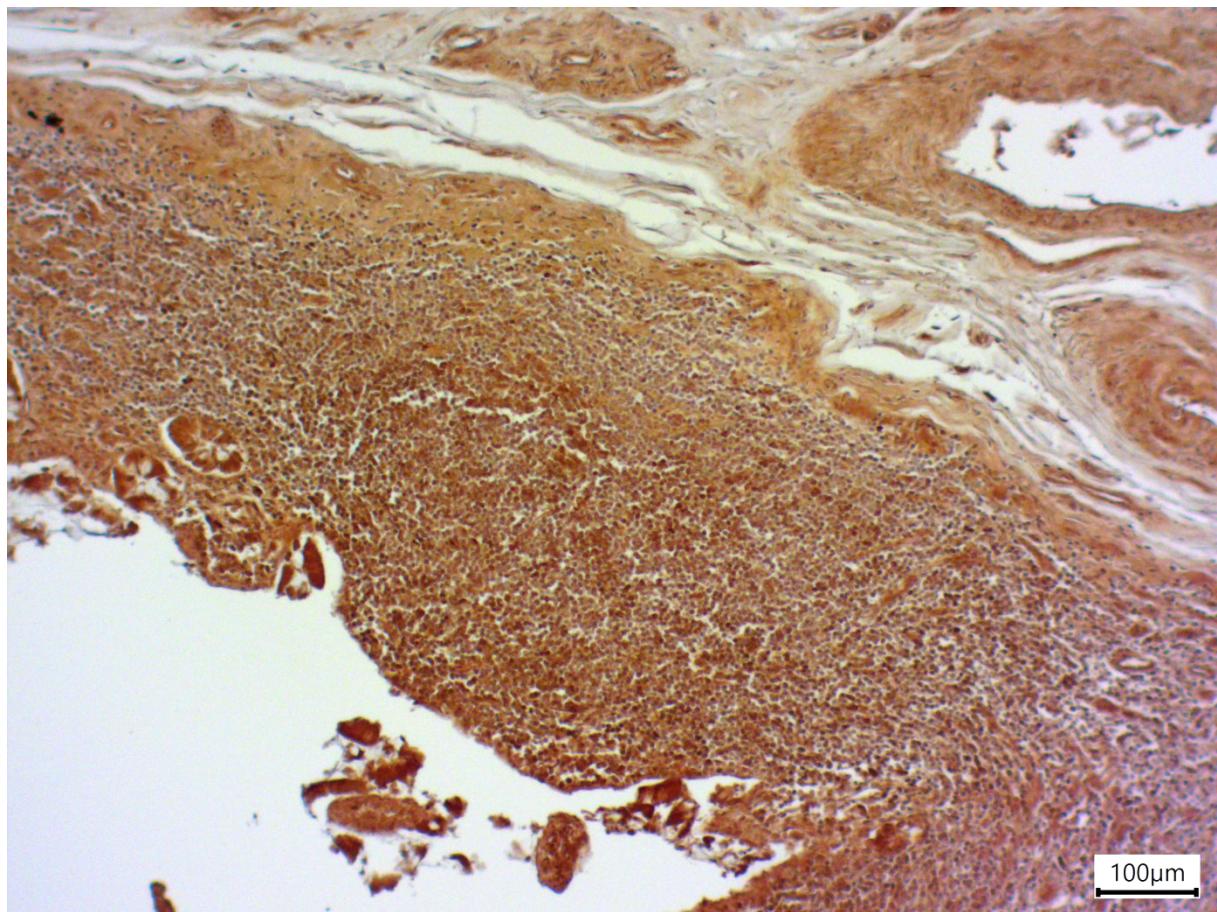


Abbildung 44 - Ileum 1 - IHC-Färbung - positiv - 10x

Abbildung 44 zeigt einen Querschnitt des terminalen Ileums des Körperspenders 22/23 in IHC-Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Das Domepithel färbt sich kräftig braun an (++) . Der darunter gelagerte Lymphfollikel zeigt eine weniger deutliche Färbung (+). Gefäße sind wie in allen anderen beobachteten Geweben kontinuierlich braun gefärbt (+).

#### 4.4.5 Ileum - Immunhistochemie - negativ - 4x

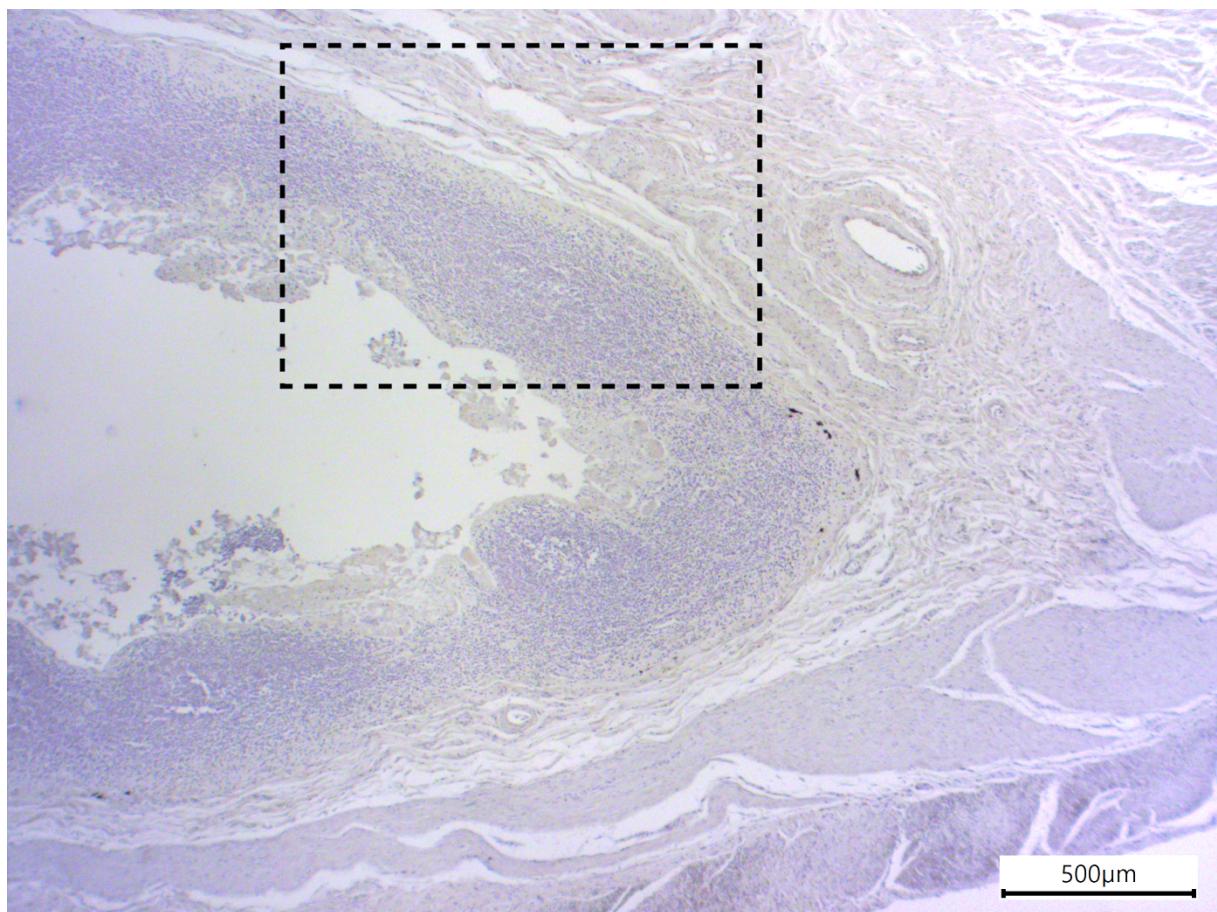


Abbildung 45 - Ileum 1 - IHC-Färbung - negativ - 4x

Abbildung 45 zeigt einen Querschnitt des terminalen Ileums des Körperspenders 22/23 in IHC-Färbung in 4x Objektivvergrößerung ohne Behandlung mit dem Primärantikörper.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass lediglich die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist. Für die Negativkontrolle in höherer Auflösung siehe Abbildung 46.

Der in der nächsten Abbildung weiter vergrößerte Ausschnitt ist markiert.

#### 4.4.6 Ileum - Immunhistochemie - negativ - 10x

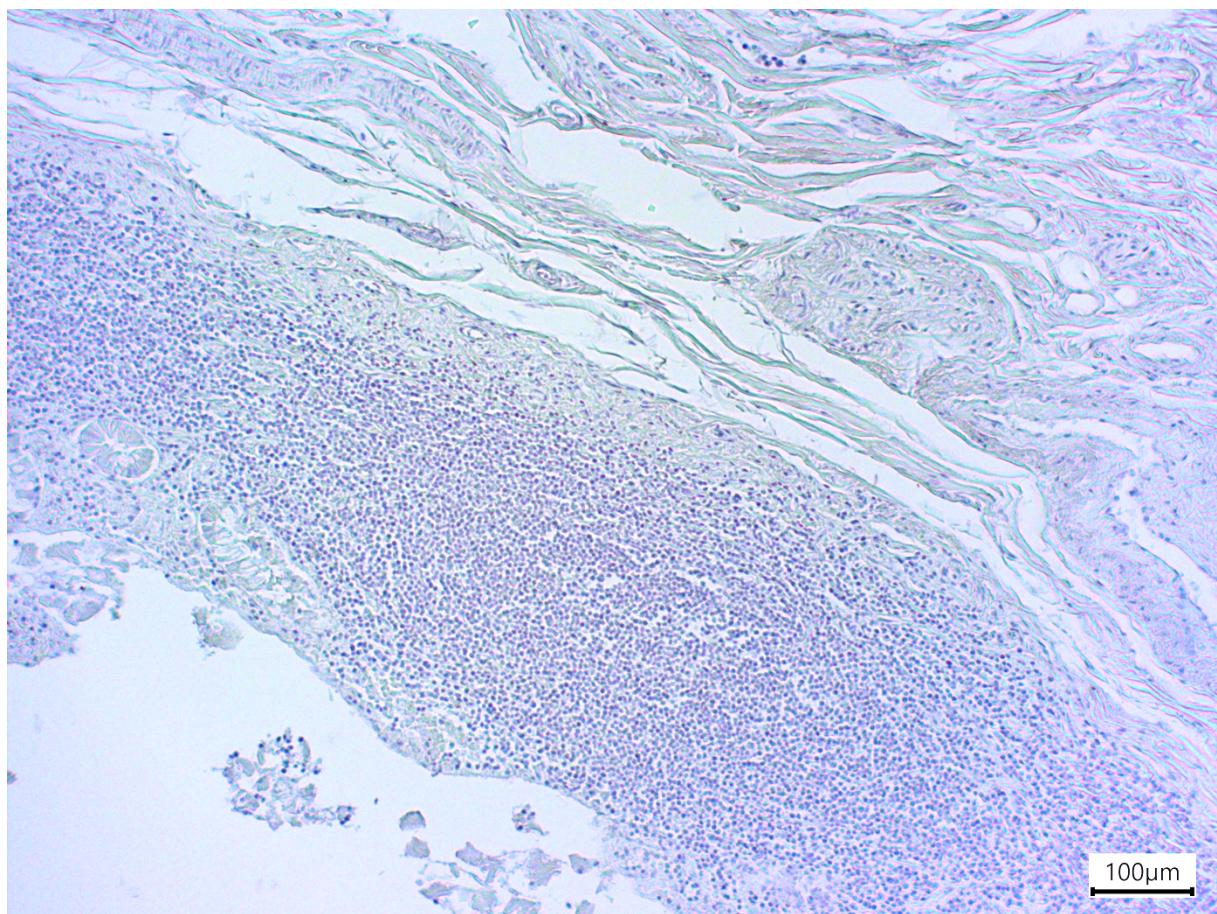


Abbildung 46 - Ileum 1 - IHC-Färbung - negativ - 10x

Abbildung 46 zeigt einen Querschnitt des terminalen Ileums des Körperspenders 22/23 in IHC-Färbung in 10x Objektivvergrößerung ohne Behandlung mit dem Primärantikörper.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass lediglich die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist.

#### 4.4.7 Auswertung Ileum

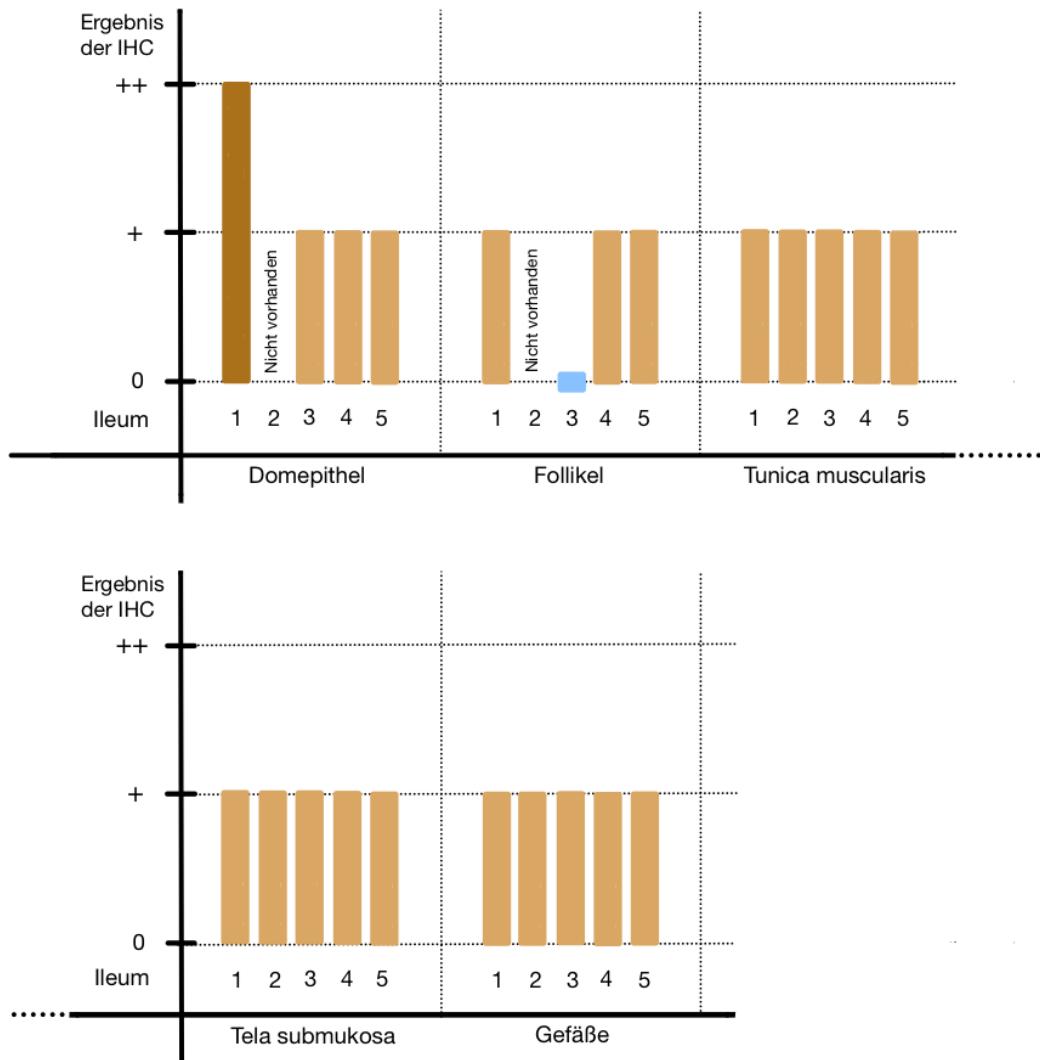


Abbildung 47 - Auswertung der IHC-Färbung des Ileums

Abbildung 47 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf den TRPC6 Kanal des terminalen Ileums. Auf der y-Achse wird unterteilt in negativ (0), einfach- (+) und stark positives Färbeverhalten (++) . Auf der x-Achse sind die ausgewerteten Strukturen der jeweils fünf untersuchten Ileumquerschnitte dargestellt.

Zu beachten ist, dass bei Probe 2 keine Peyer-Patches gefunden wurden und somit keine Auswertung von Follikel und Domepithel erfolgen konnte.

Das Domepithel zeigt in den meisten Fällen ein positives Färbeverhalten (+ oder++) (siehe Abbildung 44). Der unter dem Epithel angelagerte Lymphfollikel variiert in seinem Färbeverhalten. In den meisten Fällen zeigt sich jedoch ein positives Färbeergebnis (+) (siehe Abbildung 44). Gefäße färben sich ebenfalls braun an (+) (siehe Abbildung 44). Die glatte Muskulatur der Tunica muscularis sowie das Bindegewebe der Tela submukosa zeigt ebenfalls ein positives Färbeergebnis (+) (siehe Abbildung 43).

## 4.5 Appendix (gut-associated lymphatic tissue)

Die Auswertung der Appendixanschnitte erfolgt analog zu den Schnitten des terminalen Ileums, da es sich in beiden Fällen um gut-associated lymphatic tissue (GALT) handelt. Es werden jeweils zwei Abbildungen in vier- und zehnfacher Objektivvergrößerung dargestellt, um die Orientierung innerhalb des Präparates zu gewährleisten.

### 4.5.1 Appendix - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 4x

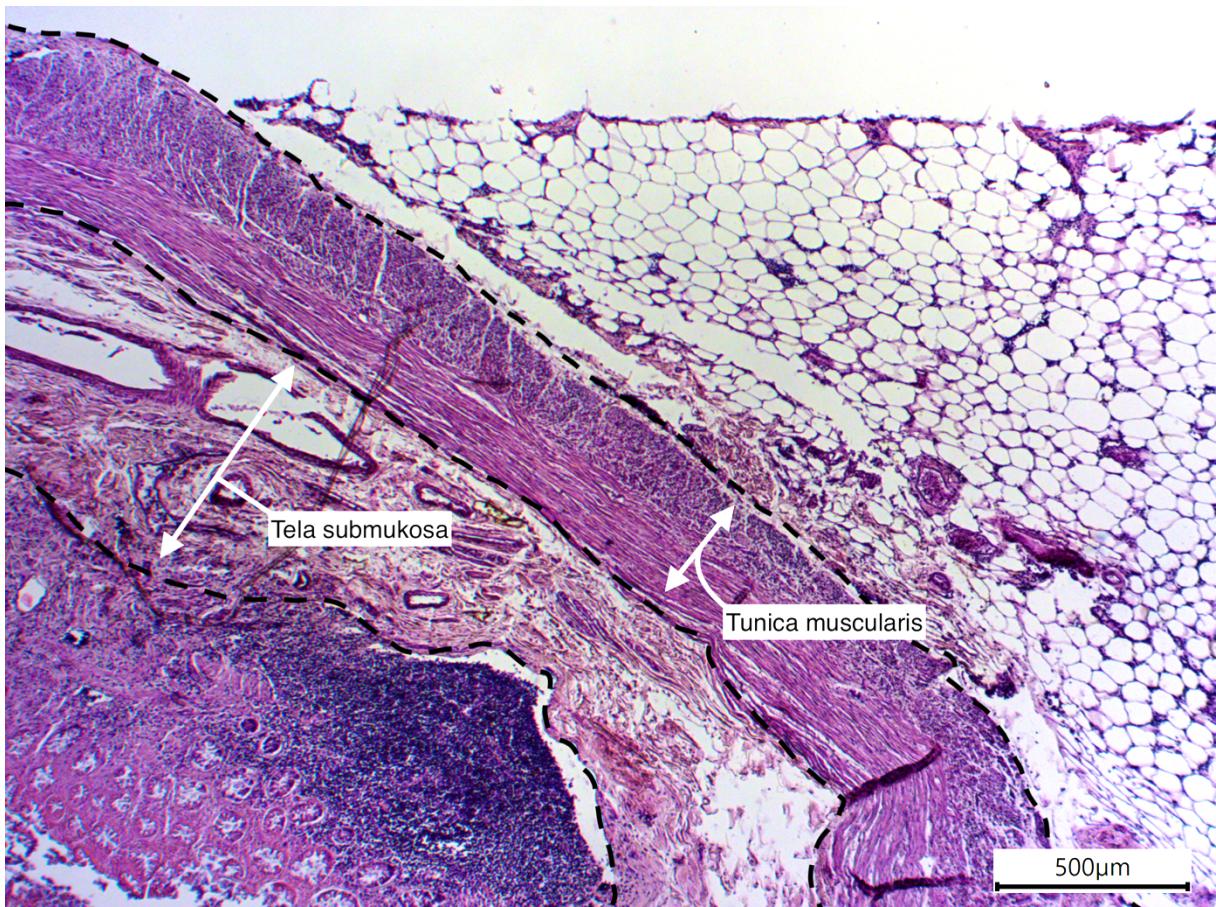


Abbildung 48 - Appendix I - HE-Färbung - 4x

Abbildung 48 zeigt einen Querschnitt durch die Appendix vermicularis des Körperspenders 20/47 in HE-Färbung in 4x Objektivvergrößerung.

Da keine gleichzeitige Darstellung der bei der IHC ausgewerteten Strukturen (Domepithel, Lymphfollikel, Tunica muscularis, Tela submukosa und Gefäße) in zehnfacher Objektivvergrößerung möglich war, beziehungsweise kleine Strukturen wie das Domepithel nur schwer in vierfacher Objektivvergrößerung erkennbar sind, dient diese Aufnahme der Orientierung im Präparat sowie der Darstellung der Tunica muscularis und der Tela submukosa.

#### 4.5.2 Appendix - Hämatoxylin-Eosin Färbung - 10x

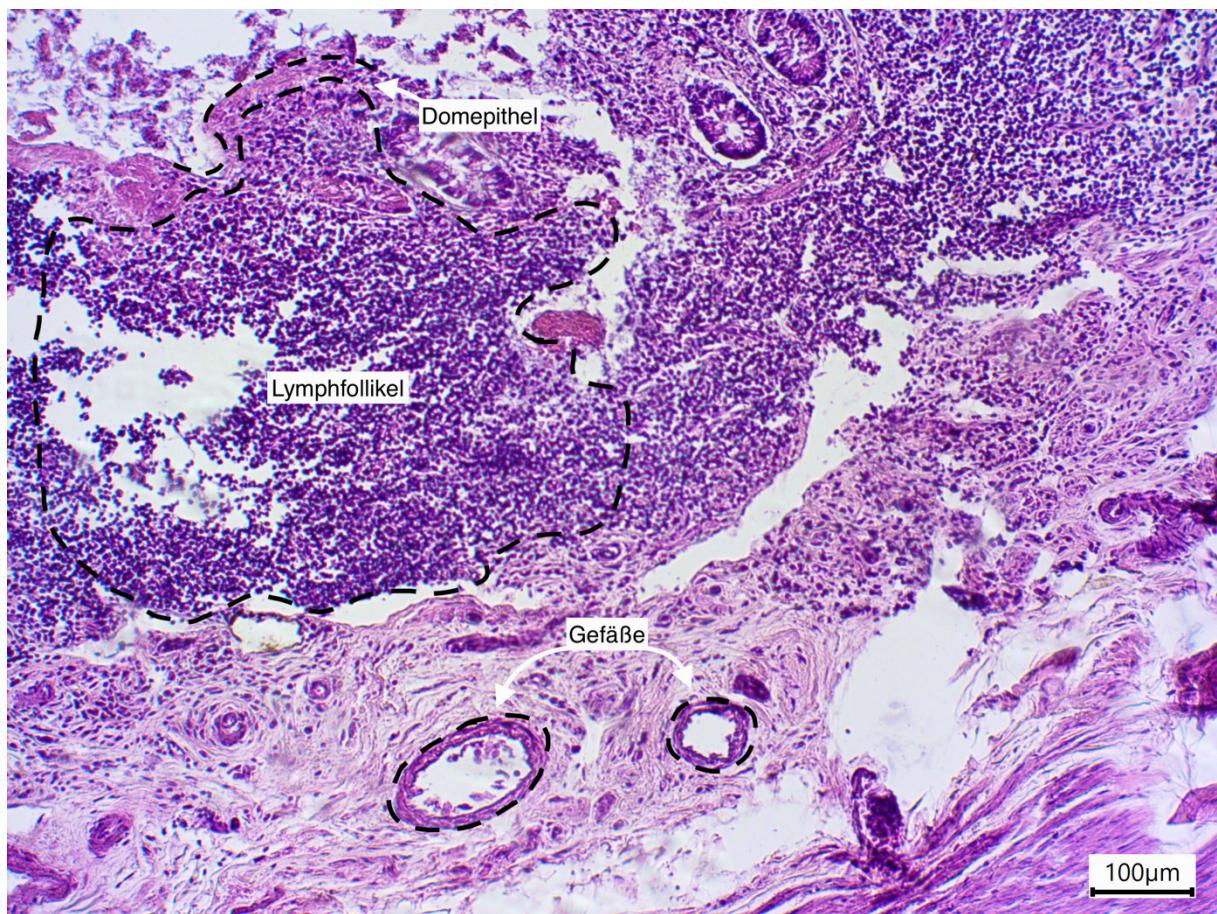


Abbildung 49 - Appendix 1 - HE-Färbung - 10x

Abbildung 49 zeigt einen Querschnitt durch die Appendix des Körperspenders 20/47 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Es handelt sich hierbei um eine Vergrößerung aus dem Bereich der Mukosa bis zum Übergang in die Submukosa des Appendixanschnittes.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: Lymphfollikel, Domepithel und Gefäße.

Die Darstellung der Tunica muscularis und Tela submukosa gleichzeitig zu den Peyer-Patches ist in dieser Vergrößerung nicht möglich. Zur Darstellung der Tunica muscularis und Tela submukosa siehe Abbildung 48.

Die Peyer-Patches setzen sich zusammen aus dem Follikel-assoziiertes Epithel (Domepithel) und den Lymphfollikeln.

#### 4.5.3 Appendix - Immunhistochemie - positiv - 4x

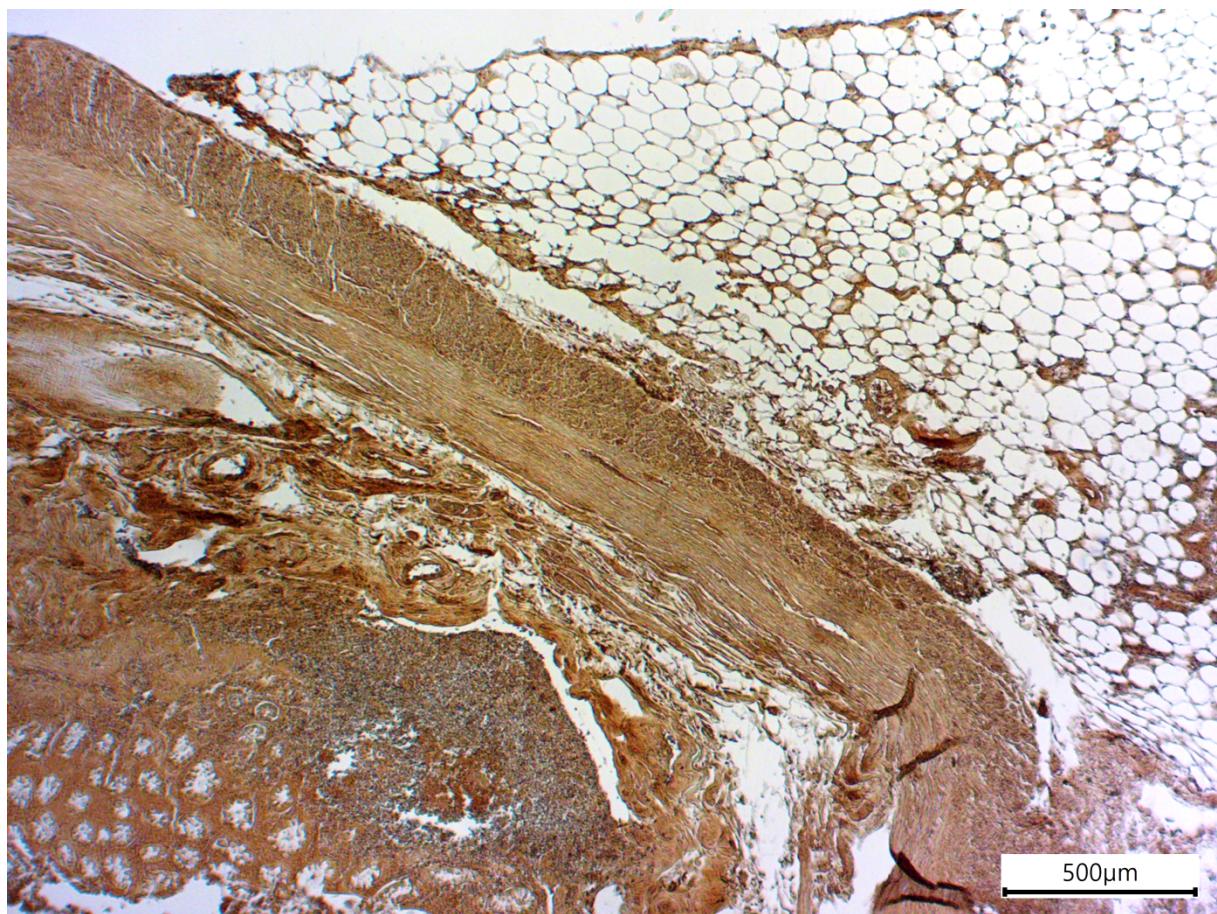


Abbildung 50 - Appendix 1 - IHC-Färbung - positiv - 4x

Abbildung 50 zeigt einen Querschnitt der Appendix des Körperspenders 20/47 in IHC-Färbung in 4x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Es ist zu beobachten, dass die glatte Muskulatur in der Tunica muscularis sich braun anfärbt (+). Die Gefäße färben sich ebenfalls konstant braun an (+). Alle anderen ausgewerteten Strukturen sind in der Beschriftung der nächsten Abbildung beschrieben (siehe Abbildung 51).

#### 4.5.4 Appendix - Immunhistochemie - positiv - 10x

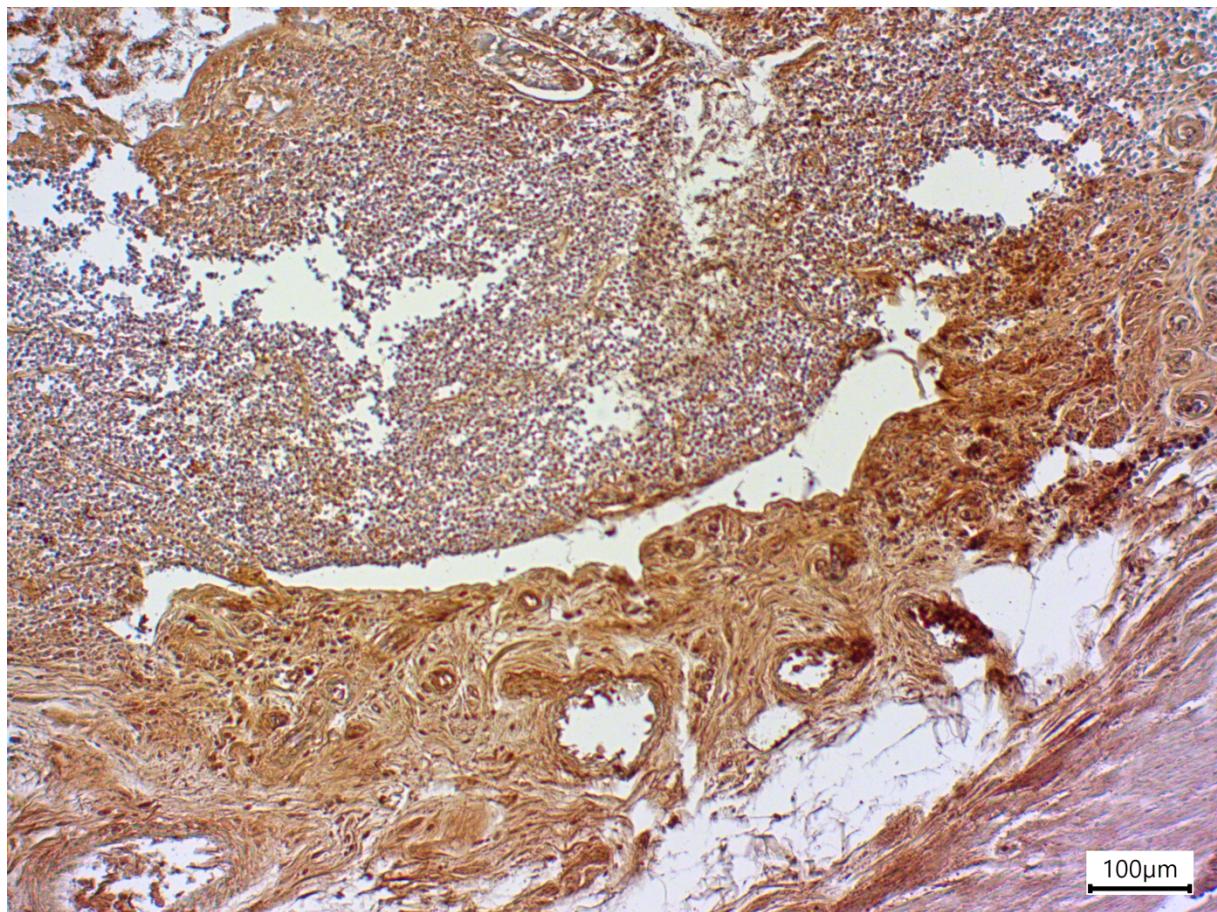


Abbildung 51 - Appendix 1 - IHC-Färbung - positiv - 10x

Abbildung 51 zeigt einen Querschnitt der Appendix des Körperspenders 20/47 in IHC-Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Es handelt sich hierbei um eine Vergrößerung aus dem Bereich der Mukosa bis zum Übergang in die Submukosa des Appendixanschnittes. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Das Domepithel färbt sich kräftig braun an (++) . Der darunter gelagerte Lymphfollikel zeigt eine weniger deutliche Färbung (+). Die Gefäße der Submukosa zeigen einen braunen Umschlag des Chromogens (+).

#### 4.5.5 Appendix - Immunhistochemie - negativ - 4x

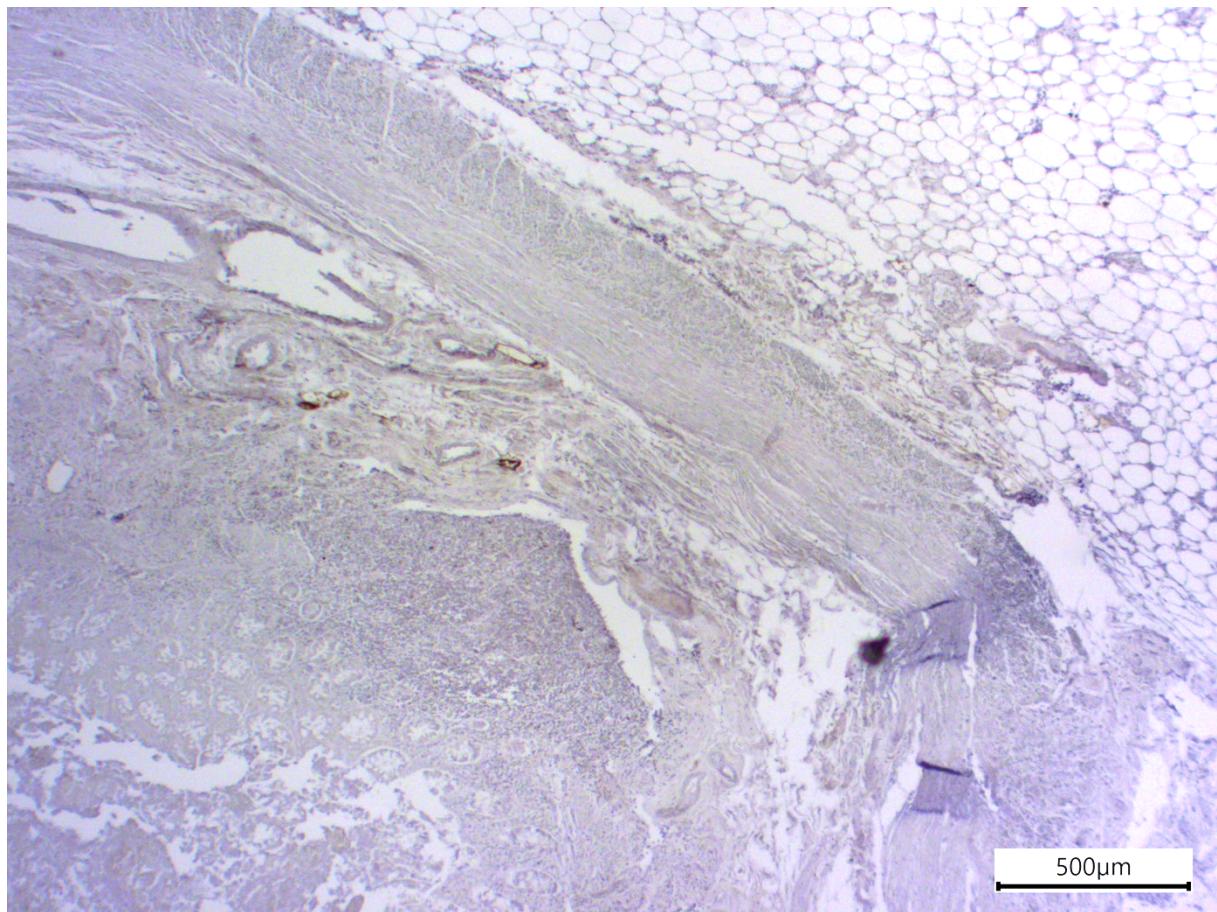


Abbildung 52 - Appendix 1 - IHC-Färbung - negativ - 4x

Abbildung 52 zeigt einen Querschnitt der Appendix des Körperspenders 20/47 in IHC-Färbung in 4x Objektivvergrößerung ohne Behandlung mit dem Primärantikörper.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass bis auf leichte Verunreinigungen, nur die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist. Im Besonderen ist hier die ausschließliche negative Färbung der glatten Muskulatur und Gefäße zu beobachten. Für die Kontrolle der anderen ausgewerteten Strukturen siehe Abbildung 53 in höherer Vergrößerung.

#### 4.5.6 Appendix - Immunhistochemie - negativ - 10x

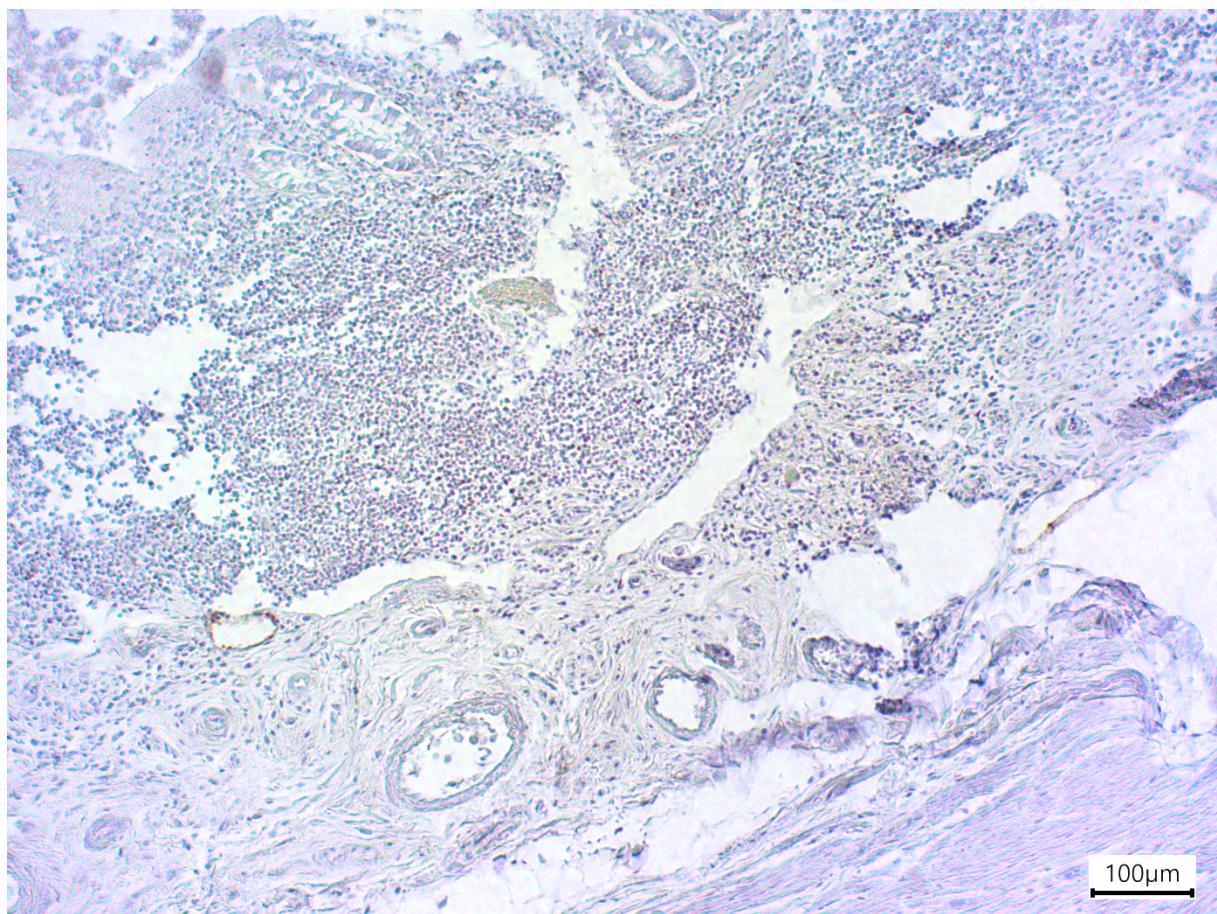


Abbildung 53 - Appendix 1 - IHC-Färbung - negativ - 10x

Abbildung 53 zeigt einen Querschnitt der Appendix des Körperspenders 20/47 in IHC-Färbung in 10x Objektivvergrößerung ohne Behandlung mit dem Primärantikörper. Es handelt sich hierbei um eine Vergrößerung aus dem Bereich der Mukosa bis zum Übergang in die Submukosa des Appendixanschnittes.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass bis auf leichte Verunreinigungen, nur die Hämatoxylin Gegenfärbung zu beobachten ist.

#### 4.5.7 Auswertung Appendix

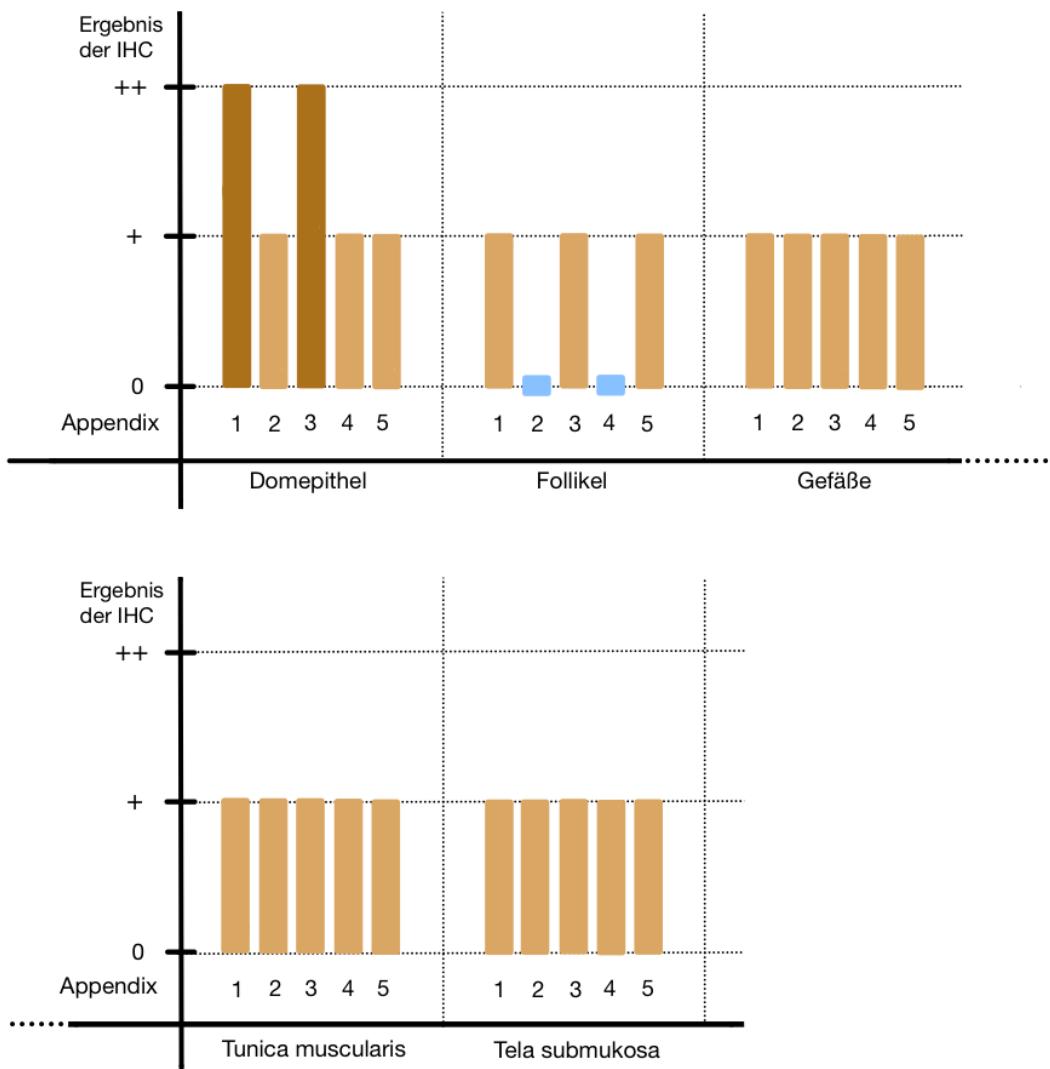
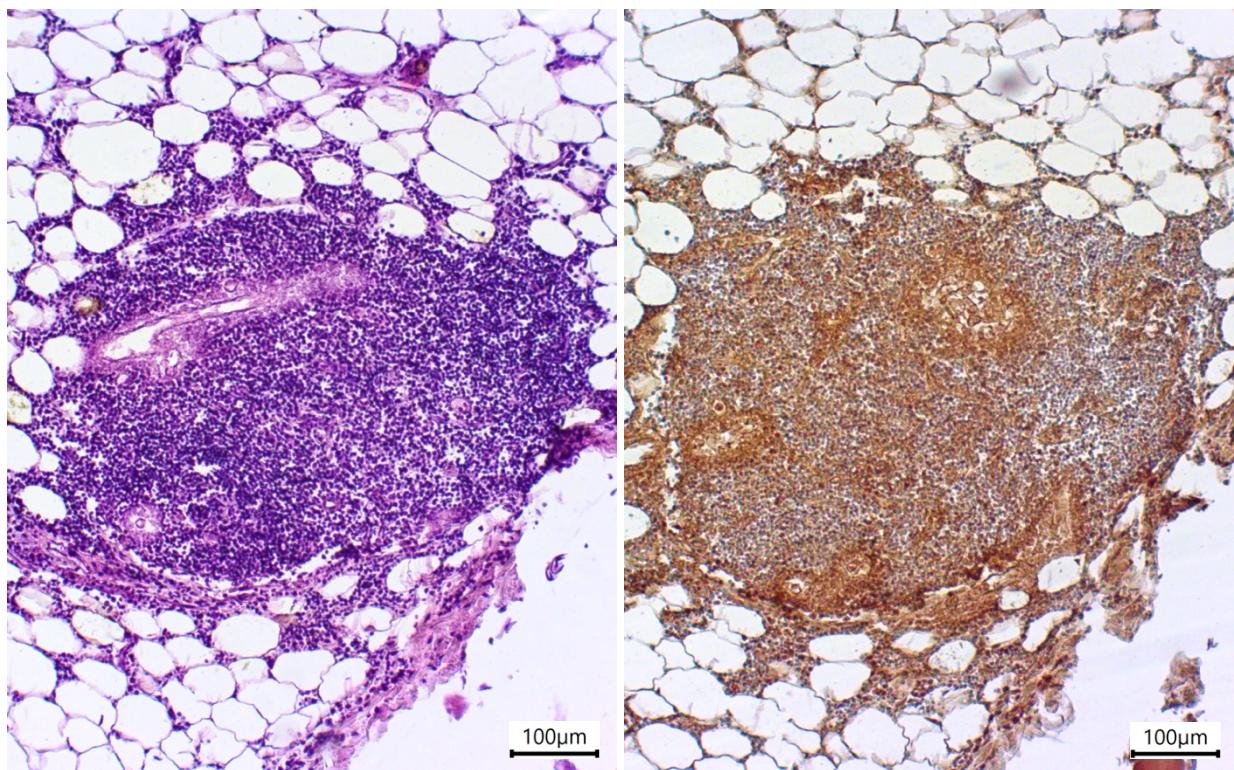


Abbildung 54 - Auswertung der IHC-Färbung der Appendix

Abbildung 54 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf den TRPC6 Kanal der Appendix. Auf der y-Achse wird unterteilt in negativ (0), einfach- (+) und stark positives Färbeverhalten (++) . Auf der x-Achse sind die ausgewerteten Strukturen der jeweils fünf untersuchten Appendixquerschnitte dargestellt.

Das Domepithel zeigt in den meisten Fällen ein positives Färbeverhalten (+ oder++) (siehe Abbildung 51). Der unter dem Epithel angelagerte Lymphfollikel variiert in seinem Färbeverhalten. In den meisten Fällen zeigt sich ein leicht positives Färbeverhalten (+ oder 0). Gefäße färben sich konstant braun an (+) (siehe Abbildung 51). Die glatte Muskulatur der Tunica muscularis sowie das Bindegewebe der Tela submukosa zeigt ebenfalls ein positives Färbeergebnis (+) (siehe Abbildung 50). Insgesamt sind die Ergebnisse mit denen des terminalen Ileums vergleichbar.

#### 4.5.8 weitere nicht ausgewertete Beobachtungen - FALC



*Abbildung 55 - FALC im Meso der Appendix 1*  
HE- (links) & IHC-Färbung (rechts)

Abbildung 55 zeigt einen Ausschnitt des Fettgewebes des Mesos der Appendix vermiciformis des Körperspenders 20/47 im direkten Vergleich von IHC- und HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Es ist eine Ansammlung von Lymphozyten zu beobachten, die als Fat-associated lymphoid cluster (FALC) bezeichnet werden kann. Die Ansammlung zeigt mehrere HEVs mit deutlich positivem Ergebnis der Immunfärbung (++) sowie einfach positiv gefärbte Lymphozyten (+).

## 4.6 Thymus

Beim Thymusgewebe fiel die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen auf den TRPC6 Kanal am schwersten, da das aufgesuchte Gewebe im Rahmen der Thymusinvolution atrophiert ist. Eine Orientierung an der HE-Färbung ist hier ebenfalls erschwert, da das beobachtete Gewebe so klein ist, dass sich die Morphologie zwischen zwei benachbarten und dann unterschiedlich gefärbten Schnitten (HE bzw. IHC-Färbung) unterscheidet.

### 4.6.1 Thymus - Hämatoxylin-Eosin Färbung

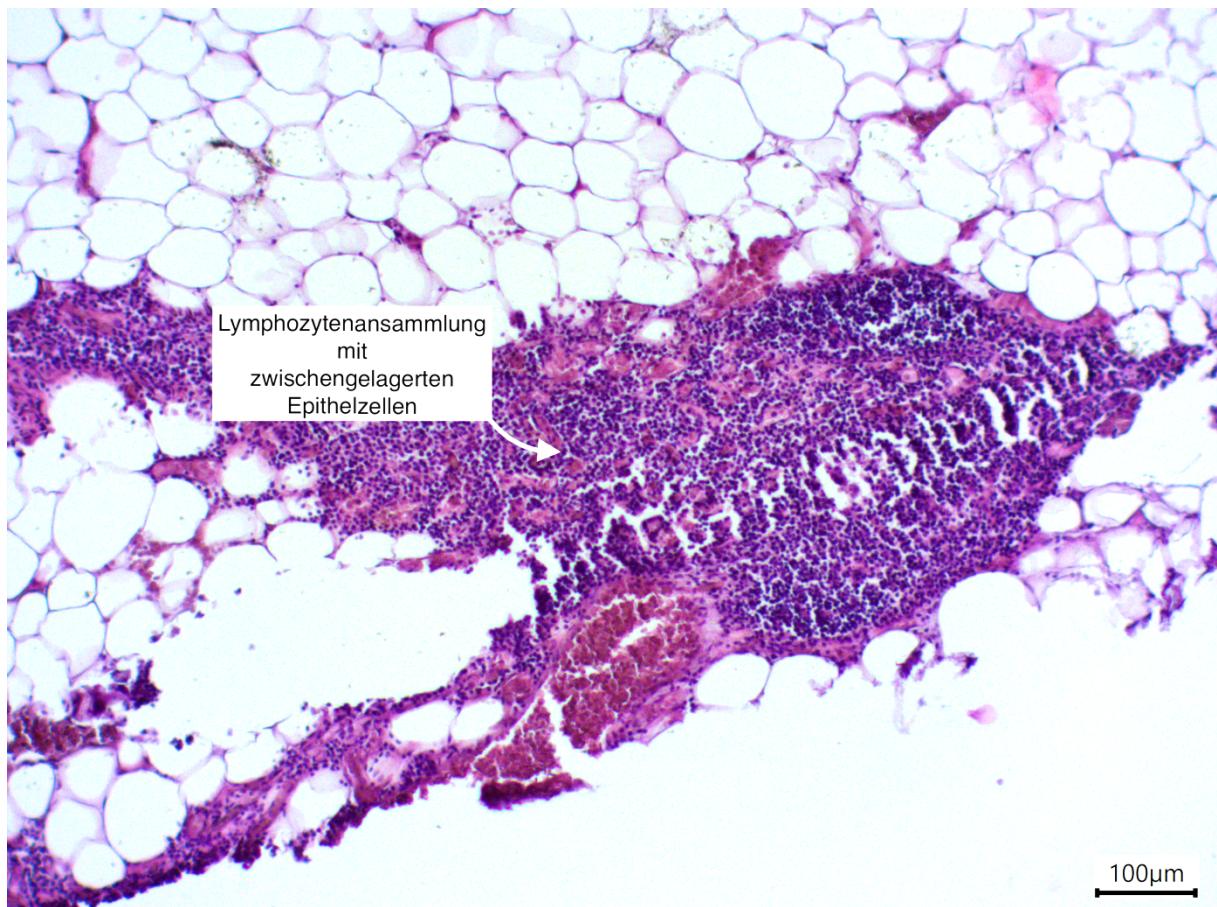


Abbildung 56 - Thymus 1 - HE-Färbung

Abbildung 56 zeigt einen Anschnitt des Thymusrestgewebes des Körperspenders 20/65 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung.

Angezeichnet sind die später in der IHC ausgewerteten Strukturen: Lymphozytenansammlung und Epithelzellen. Eine Differenzierung in weitere Strukturen ist hier nicht möglich.

#### 4.6.2 Thymus - Immunhistochemie - positiv

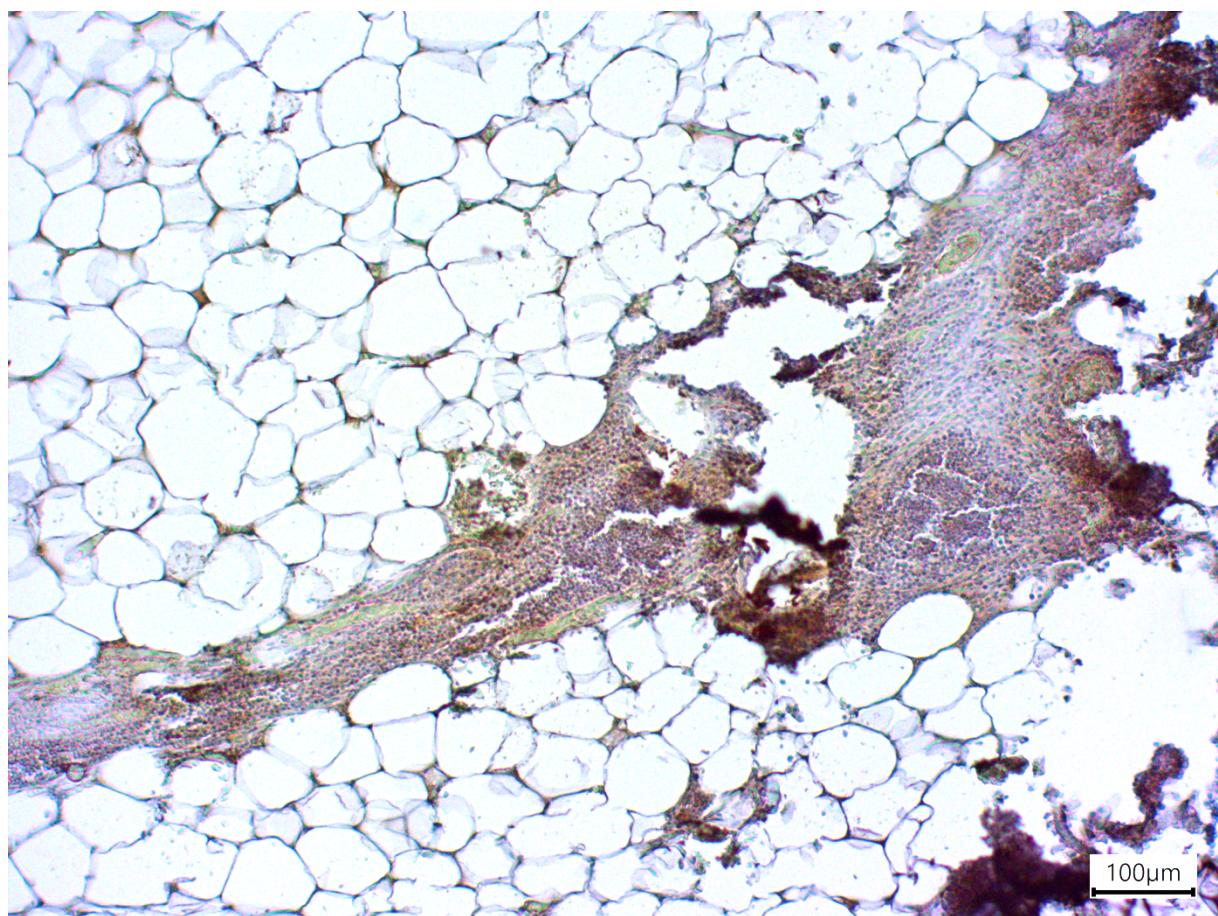


Abbildung 57 - Thymus 1 - IHC-Färbung - positiv

Abbildung 57 zeigt einen Anschnitt des Thymusrestgewebes des Körperspenders 20/65 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:50.

Die Lymphozytenansammlung färbt sich im Vergleich mit der Negativkontrolle (siehe Abbildung 41) sehr leicht positiv an (+). Die zwischengelagerten Epithelzellen zeigen ebenfalls ein positives Färbeergebnis (+).

#### 4.6.3 Thymus - Immunhistochemie - negativ

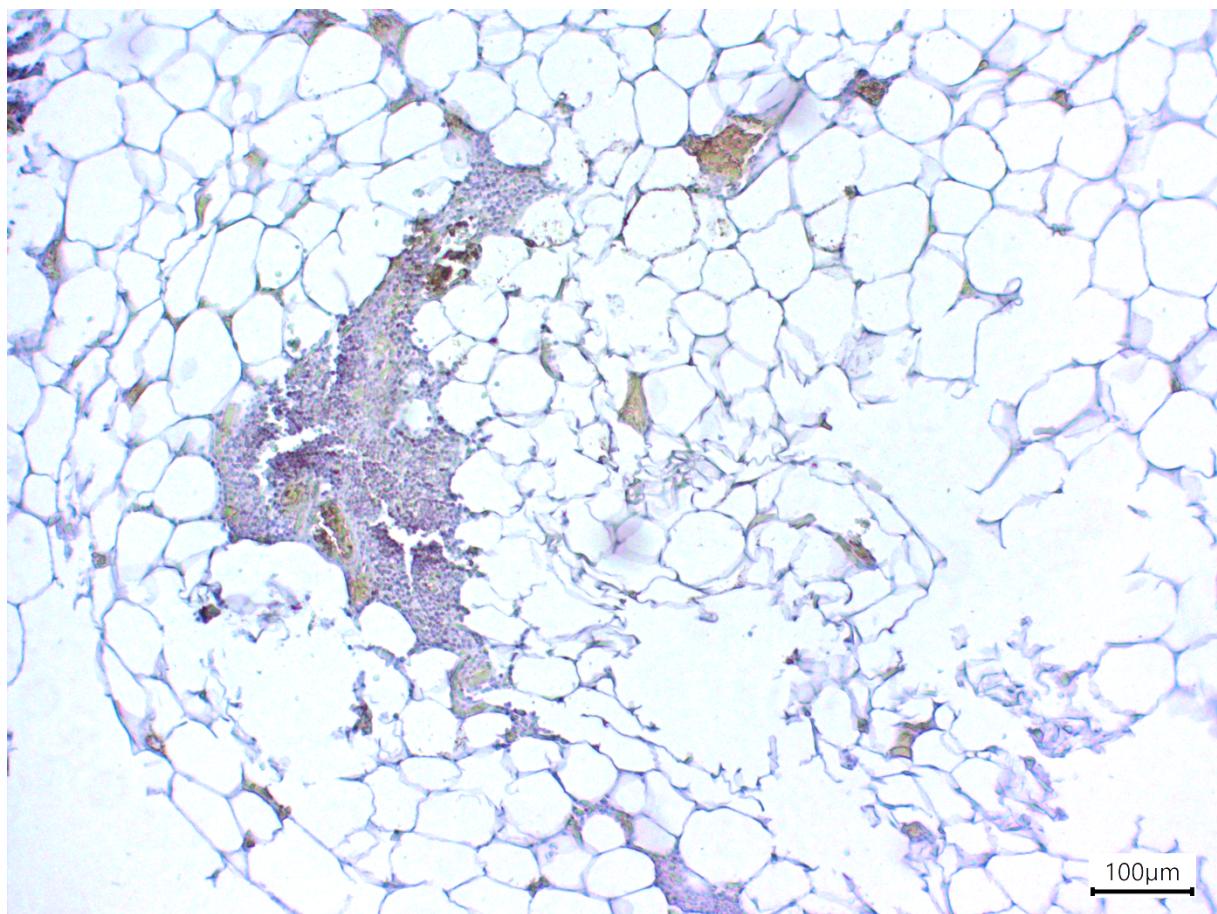


Abbildung 58 - Thymus 1 - IHC-Färbung - negativ

Abbildung 58 zeigt einen Anschnitt des Thymusrestgewebes des Körperspenders 20/65 in HE-Färbung in 10x Objektivvergrößerung ohne Behandlung mit dem Primärantikörper.

Diese Darstellung dient der Kontrolle der Färbemethode sowie der Auswertung der mit Primärantikörper behandelten Proben. Es zeigt sich im Vergleich, dass eine deutlich stärkere Gegenfärbung zu beobachten ist. Im Kontrast zu den anderen Negativkontrollen sind hier jedoch deutlich auch braune Färbungen zu erkennen.

#### 4.6.4 Auswertung Thymus

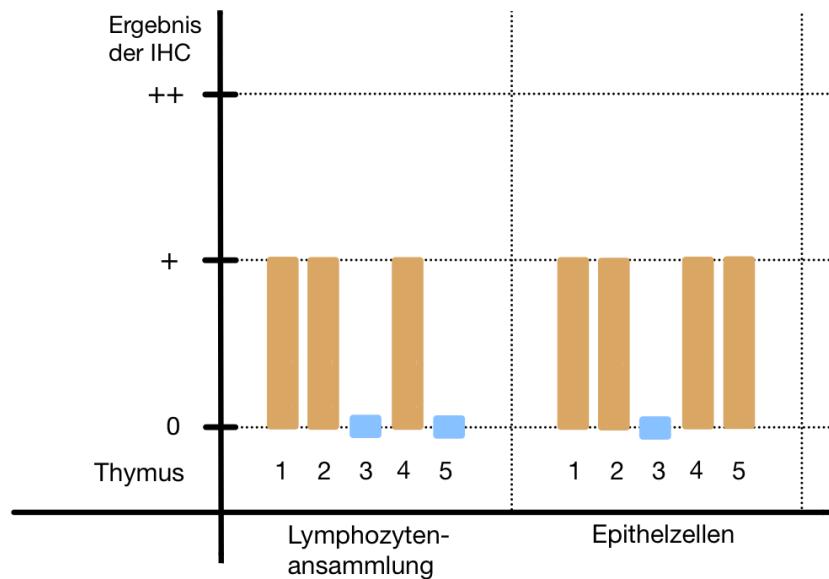


Abbildung 59 - Auswertung der IHC-Färbung des Thymus

Abbildung 59 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf den TRPC6 Kanal des Thymus. Auf der y-Achse wird unterteilt in negativ (0), einfach- (+) und stark positives Färbeverhalten (++) . Auf der x-Achse sind die ausgewerteten Strukturen der jeweils fünf untersuchten Thymusschnitte dargestellt.

Die Lymphozyten zeigen in den meisten Fällen ein leicht positives Färbeverhalten (+) (siehe Abbildung 57). Die zwischen den Lymphozyten liegenden Epithelzellen zeigen ebenfalls eine braune Färbung (+) (siehe Abbildung 57).

Im Gegensatz zu allen anderen beobachteten Geweben ist die IHC-Färbung beim Thymusgewebe am schwächsten. Ebenfalls ist zu beachten, dass die ersten beiden ausgewerteten Proben aus dem Körperspender mit dem makroskopisch gut sichtbaren Thymus stammen (siehe Kapitel 3.5.5 Thymus – Abbildung 6).

## 5. Diskussion

Nachdem die Ergebnisse im vorigen Kapitel beschrieben wurden, soll dieses Kapitel der Einordnung und Diskussion dieser im wissenschaftlichen Kontext dienen. Außerdem soll die in dieser Arbeit genutzte Methodik kritisch betrachtet werden, sowie die genannten Forschungsfragen beantwortet werden.

### 5.1 Ergebnisdiskussion

Wie einleitend erwähnt wurde, sind nach dem aktuellen Wissensstand verschiedenste Funktionen des TRPC6-Kanals und damit verbundene Expressionen im lymphatischen Gewebe denkbar.

Nachdem der Kanal 2000 erstmals im Rahmen eines Northern Blots in der menschlichen Milz nachgewiesen wurde [61] und anhand des Nachweises der entsprechenden mRNA in Lymphknoten, Thymus und Milz die Expression des Proteins in diesen murinen Geweben bewiesen werden konnte [76], ist bisher noch kein direkter immunhistochemischer Nachweis des Proteins im menschlichen lymphatischen Gewebe beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Nachweis erbracht werden. Sowohl die Milz als auch Thymus, Appendix veriformis, Ileum, Tonsilla palatina und die Lymphknoten zeigten ein positives Färbeverhalten gegenüber den Negativkontrollen auf das TRPC6 Protein.

#### 5.1.1 Lymphozyten

In allen betrachteten Geweben konnte auf Lymphozyten das TRPC6 Protein nachgewiesen werden, wobei Unterschiede in den Färbungen gesehen wurden. In der Milz war die Immunfärbung der weißen Pulpa kräftiger als in den Lymphozytenansammlungen in Lymphknoten, Ileum, Appendix und Thymus, was mit denen in murinen lymphatischen Geweben beschriebenen Expressionen des TRPC6-Gens korreliert [76].

Die beschriebenen Unterschiede der TRPC6 Expression in murinen Geweben zwischen T- und B-Lymphozyten [66] waren im Rahmen der Methodik dieser Studie schwer nachvollziehbar, da die betrachteten Gewebe aus Körperspendern mit hohem Alter (durchschnittlich 83 Jahre) entnommen wurden, bei denen die bereits vorbeschriebene Degenerationen des Lymphgewebes eingesetzt hatte. Speziell handelte es sich hierbei um die morphologische Unterscheidung zwischen T- und B-Zone, die im Alter miteinander verschmelzen sowie die Abnahme von Sekundärfollikeln mit Keimzentren [46], [50]. Am ehesten konnte in den betrachteten Immunfärbungen der Tonsilla palatina eine Differenz in den verschiedenen Anteilen des Lymphgewebes beobachtet werden, da es sich hierbei um Tonsillektomie Präparate junger Patienten handelte. Die Tonsillenpräparate zeigten eine dunklere Färbung im Bereich des Keimzentrums im Vergleich zur Randkappe und der T-Zone. Dies liefert einen Hinweis auf eine Konzentrationsdifferenz von TRPC6 in den verschiedenen Bereichen. Hier wären weitere Studien an den Lymphgeweben junger Menschen notwendig.

### **5.1.2 Peyer-Patches und FAE in MALT**

Nachdem in allen betrachteten Präparaten des GALT das Domepithel sowie das FAE der Krypten der Tonsilla palatina eine deutliche Immunfärbung auf das TRPC6 Protein zeigten, kann hier von einem Nachweis des Proteins in den dort beteiligten Zellen ausgegangen werden. Eine mögliche Funktion von TRPC6 im Follikel assoziierte Epithel ist bisher nicht beschrieben. Da die molekularen Mechanismen der Antigentranszytose weitestgehend unbekannt sind [54], soll an dieser Stelle die Vermutung aufgestellt werden, dass der TRPC6-Kanal hiermit in Verbindung stehen könnte. Die aktuelle Forschung zeigt hierfür bisher keine Beschreibungen. Ein eindeutiger Nachweis der Verbindung zwischen Transzytose und TRPC6 kann mit der Methodik dieser Arbeit nicht erfolgen.

Limitiert wird die Aussage über das Vorkommen des TRPC6 Kanals in den Peyer-Patches über das Alter der untersuchten Körperspender, da wie vorbeschrieben eine erhebliche morphologische Degeneration des GALTs im Alter vorlag [56].

### **5.1.3 Bindegewebe**

Die in allen Präparaten beobachtete braune Anfärbung von Bindegewebe kann in Einklang mit der Feststellung gebracht werden, dass TRPC6 an der Aktivierung von Fibroblasten beteiligt ist [38], [39]. Besonders gut konnte eine Färbung fibroblastischer Retikulumzellen in den Randsinus der Lymphknoten nachvollzogen werden.

### **5.1.4 Gefäße**

Analog zu vorausgegangenen Arbeiten über den Nachweis des TRPC6-Kanals in menschlichen Gefäßen, konnte an allen betrachteten immungefärbten Schnitten mit Gefäßen, namentlich die Trabekelarterien in der Milz sowie die submukösen Gefäße in Appendix veriformis und Ileum, das Protein nachgewiesen werden. An den Trabekelarterien war das von *Abdinghoff* beschriebene Färbeverhalten reproduzierbar, bei dem sich die Intima und Adventitia am stärksten anfärbt [77]. Nachdem der TRPC6 Kanal bereits in den murinen Lymphgefäßen nachgewiesen ist [72], konnte im Rahmen dieser Studie ein Nachweis des TRPC6-Kanals an humanem Lymphgefäßen erbracht werden. Jedoch muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass nur in vereinzelten Anschnitten den Lymphknoten versorgende Gefäße beobachtet werden konnten. Eine strukturelle Analyse der Lymphknoten, bei dem alle Schnitte durch den Knoten untersucht werden, wäre hier notwendig, um mehr Anschnitte der Lymphgefäße zu erhalten und eine dezidiertere Aussage über die TRPC6 Verteilung in den Lymphgefäßen des Menschen treffen zu können. Vorstellbar wäre auch die Untersuchung größerer Lymphbahnen wie des Ductus thoracicus.

### **5.1.5 HEV**

Hochendotheliale Venolen konnten nur im Gewebe der Tonsilla palatina beobachtet werden. Am ehesten kann das Fehlen der HEVs in den anderen Geweben besonders im Lymphknoten auf die in der Literatur vorbeschriebene Abnahme der HEVs im Alter zurückgeführt werden [51]. Die beobachteten HEVs in der Tonsille zeigten jedoch durchweg ein positives Färbeverhalten auf den TRPC6 Kanal. TRPC6 ist der vermittelnde Kanal der Leukozytenmigration [69]. Diese Aussage bezieht sich jedoch

auf die Granulozyten im Rahmen der inflammatorischen Immunantwort. Eine Beteiligung des TRPC6 Kanals an der Lymphozytendiapedese ist nicht vorbeschrieben. Die Funktion von TRPC6 in den HEVs bleibt damit unbekannt.

### 5.1.6 Lymphknoten

Die gefärbten Schnitte der Lymphknoten zeigten eine altersentsprechende in der Literatur vorbeschriebene Degeneration des Gewebes, da diese bei Körperspendern mit hohem Alter entnommen wurden (durchschnittlich 83 Jahre). In den Lymphknoten zeigte sich eine Verschiebung der Rinden-Mark Grenze, ein fibrotischer Umbau, ein Nachlass der Anzahl von HEVs sowie Sekundärfollikeln [48], [49], [50], [51]. Reproduzierbar war ebenfalls, dass sich diese Degenerationsprozesse mehr in peripheren als in zentralen Lymphknoten zeigen [50].

### 5.1.7 Thymus

Die einleitend von *Moritz* beschriebene Unterteilung von Altersgruppen und korrelierende Thymusdegeneration konnte im Rahmen dieser Arbeit nachvollzogen werden. Alle betrachteten Präparate wurden an Körperspendern aus der Altersgruppe 61 und älter entnommen. Sogar makroskopisch vielversprechende Präparate (siehe Kapitel 3.5.5) zeigten die von *Moritz* vorbeschriebene Thymusinvolution inklusive des Verschwindens von Hasall-Körperchen und der nur noch straßenartigen Anordnung von thymalen Restgewebes [59]. Die Aussagekraft des erbrachten TRPC6 Nachweises ist bei diesem Gewebe, trotz des erheblichen Aufwands innerhalb dieser Arbeit geeignetes Gewebe zu finden, folglich am schwächsten. Weitere Studien an dem schwer zugänglichen thymalen Gewebe junger Menschen auf das TRPC6 Protein sind hier definitiv notwendig.

## 5.2 Methodendiskussion

Im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methodik sind verschiedene Fehlerquellen mit Auswirkung auf die dargestellten Färbergebnisse denkbar, deshalb sollen die angewandten Arbeitsschritte an dieser Stelle nochmals kritisch betrachtet und diskutiert werden.

Die Mehrzahl der betrachteten Proben wurden bei Körperspendern aus dem anatomischen Institut in Homburg entnommen. Die Fixierung des betrachteten Gewebes erfolgte innerhalb eines 72-stündigen Intervalls post mortem mittels Perfusionsfixierung und anschließend mittels Immersionsfixierung des kompletten Körpers. In direktem Gegensatz hierzu stehen die im Rahmen einer Tonsillektomie entstandenen Proben der Tonsilla palatina. Sie wurden direkt nach der Entnahme im Rahmen einer Immersionsfixierung fixiert. Für die Immunhistochemie ist die Methodik der Fixierung insofern relevant, da sie die Gewebemorphologie, Antigenimmobilisation, Antigenimmunoreaktivität und die Durchgängigkeit der Immunoreagenzien beeinflusst. Die ersten beiden genannten Faktoren erfordern eine möglichst schnelle und starke Fixierung. Die letzten beiden benötigen eher eine möglichst schwache Fixierung [78]. Da bei der angewandten Perfusionsfixierung das Fixans über die Gefäße eingespült wurde, ist eine gleichförmige Fixierung aller betrachteten lymphatischen Organe und auch verschiedener Organstationen wie bei den Lymphknoten in verschiedenen Bereichen des Körpers nicht

möglich. Die Fixierung stellte somit eine Fehlerquelle für die Vergleichbarkeit der Immunfärbung in Stärke der Färbung aber auch in Organmorphologie dar.

Auch die genaue Zeitspanne zwischen Tod und Fixierung beeinflusst das Ergebnis durch die einsetzende Autolyse, ein Prozess, der durch das Austreten von hydrolytischen zellulären Enzymen entsteht [79]. Die Autolyse beeinflusst ebenfalls die Morphologie des jeweiligen Organes, aber auch die Antigen Präservation, die das Ergebnis der IHC beeinflusst [80]. Da die Autolyse selbst von einigen Faktoren abhängt, wie beispielsweise der Temperatur in der Umgebung des Ablebens oder der Zeitraum bis zur Einkühlung [79], die im Rahmen der Methodik dieser Studie nicht nachvollzogen wurden, stellt dies eine mögliche Fehlerquelle dar.

Bei der Entnahme der Proben traten bei Thymus, sowie Ileum und Appendix veriformis Komplikationen auf. Thymusgewebe und Peyer-Patches im Ileum waren nach HE-Färbung der ersten Entnahmeserie, wie in der Literatur beschrieben, schwer nachweisbar [56], [59]. Viele Körperspender mussten sich außerdem in ihren Lebzeiten einer Appendektomie unterziehen, sodass für die Appendix, Ileum und Thymus eine zweite Entnahmerekord erfolgte. Beim Thymus zeigte sich auch nach dieser zweiten Entnahmerekord nur sehr wenig verwertbares Gewebe, aufgrund der stattgefunden Thymusinvolution.

Nachdem geeignete Proben durch die HE-Färbung identifiziert waren, entstand bei der IHC-Färbung die Problematik der nicht ausreichenden Deparaffinierung. Xylol wird in den meisten Färbeprotokollen zur Entparaffinierung genutzt, da Paraffin generell alkoholunlöslich ist [73]. Durch die Erhöhung der Verweilzeit des Paraffins von dreimal fünf Minuten auf dreimal acht Minuten konnte dieses Problem gelöst werden.

Eine weitere Schwierigkeit der Immunfärbung stellte die Gegenfärbung dar. Hierfür wird häufig und so auch in dieser Arbeit Hämatoxylin verwendet [81]. Die Gegenfärbung kann die Auswertung der IHC-Ergebnisse erschweren, da sie die IHC-Färbung überlagern kann [82]. Die Auswertung der Lymphozyten in meiner Arbeit stellte sich als problematisch dar, da Lymphozyten nur über ein sehr geringes Zellplasma verfügen und Hämatoxylin hauptsächlich die Nucleinsäuren des Zellkerns anfärbt [83], wodurch eine Überlagerung der Strukturen nicht ausgeschlossen werden konnte. Lösen konnte ich dieses Problem mit sehr kurzen Gegenfärbzeiten (unter einer Sekunde).

Die Spezifität der beobachteten Immunfärbung konnte durch mehrere Experimente nachgewiesen werden. Die Inkubation des Primärantikörpers mit einem Peptid, das der Zielregion des Antikörpers entspricht und das danach abgeschwächte Färbergebnis im Vergleich zu Präparaten, die mit dem Primärantikörper behandelt wurden, kann die Spezifität beweisen [84]. Da im Rahmen dieser Arbeit eine Peptidinkubation nicht stattgefunden hat, sondern im Rahmen vorgegangen Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, die den identischen Primärantikörper von Alomone-Labs an anderem Gewebe nutzten, wird die Peptidinkubation aus dieser Arbeit referenziert [75]. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den vorausgegangenen Arbeiten und die dort abgehandelten Spezifitätsnachweise gewährleisten zu können, wurde stets eine Positiv- als auch eine

Negativkontrolle der Präparate vorausgegangener Studien bei jeder Immunfärbung mitgeführt. Speziell handelte es sich hierbei um Präparate des Herzmuskels aus den Forschungen von *Jacobs* [75] (für das Ergebnis meiner Positivkontrollen und Negativkontrollen im Vergleich zu den Färbeergebnissen von *Jacobs* und seines Spezifitätsnachweises siehe Kapitel 9 Anhang).

Ein weiterer Nachweis der Spezifität des angewandten Antikörpers (Anti-TRPC6-Antibody, Alomone-Labs, Ref.: ACC-017) [85] ist die von *Kistler* durchgeführte TRPC6<sup>-/-</sup>-Knockout Validierung, bei der im Rahmen eines Western Blots von glomerulären Lysaten keinerlei Nachweis des TRPC6 Proteins im Gegensatz zum Wildtyp gezeigt wurde [86].

Zuletzt ist anzumerken, dass die Auswertung zwar durch eine fachkundige Person validiert wurde, es sich jedoch um eine manuelle Auswertung handelt, bei der Fehler nicht auszuschließen sind.

### **5.3 Zusammenfassung und Perspektive**

Im Folgenden sollen die erbrachten Ergebnisse kurz zusammengefasst und Möglichkeiten für weitere Forschung auf dem Gebiet gegeben werden.

Die vorliegenden Ergebnisse geben Hinweise auf ein ubiquitäres Vorkommen des TRPC6 Kanals in lymphatischen Geweben und damit in den verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Rollen. Das Protein konnte in Lymphknoten, Milz, Tonsilla palatina, Thymus sowie GALT des Ileums und der Appendix veriformis nachgewiesen werden.

TRPC6 kann mit der Differenzierung von Fibroblasten in Verbindung gebracht werden [39]. Der hier erbrachte Nachweis des Vorkommens im menschlichen Bindegewebe der lymphatischen Organe ist damit in Einklang mit dem aktuellen Wissenstand zu bringen. In den angeschnittenen Gefäßen der betrachteten Organe konnte ebenfalls das TRPC6 Protein nachgewiesen werden. Dies konnte bereits in vorausgegangen Arbeiten an größeren menschlichen Gefäßen beschrieben werden [77]. Eine ähnliche Beteiligung des Kanals an Lymphgefäßen ist denkbar. Ein Nachweis des Kanals in murinen Lymphgefäßen ist bereits beschrieben [72]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Nachweis des Kanals an menschlichen Lymphgefäßen erbracht werden. Eine wichtige Erkenntnis ist der Nachweis des Kanals im FAE, besonders im Domänenepithel der Peyer-Patches sowie dem FAE der Krypten in Tonsilla palatina. Eine Funktion des TRPC6-Kanals im Rahmen der Antigentranszytose kann vermutet werden, ist jedoch nicht vorbeschrieben. Ebenso ergab die Immunfärbung ein positives Ergebnis bei den HEVs in der Tonsilla palatina. Eine Beteiligung an der Leukozytendiapedese wäre denkbar, nachdem TRPC6 der vermittelnde Kanal der Leukozytenmigration ist [69]. Eine Beteiligung an der Diapedese ist jedoch nicht vorbeschrieben und kann ebenfalls nur vermutet werden. Die an humanen Geweben vorbeschriebene Expression von TRPC6 auf T-Lymphozyten aber auch der direkte Nachweis des Proteins durch einen Western Blot [62] konnte im Rahmen dieser Arbeit mit einem direkten Nachweis des Proteins mittels IHC untermauert werden. Der durch DAG getriggerte und mittels TRPC6 vermittelte Calcium Einstrom scheint eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen zu spielen [65]. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass Mutationen des TRPC6 Gens vor der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie des neuropsychiatrischen systemischen Lupus Erythematodes, durch einen nicht verstandenen Prozess,

schützen [41]. Zu den B-Lymphozyten ist zu erwähnen, dass der über TRPC6 vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom scheinbar Proliferationsprozesse in Burkitt-Lymphom Zellen fördert. Im Rahmen dieser Studie von *Song* wurde TRPC6 auf den B-Lymphomzellen mittels Western Blot nachgewiesen [43]. Die an murinen Lymphozyten nachgewiesene Expression von TRPC6 in verschiedenen lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, Thymus) konnte im Rahmen meiner Arbeit nachvollzogen werden [66]. Alle dort untersuchten Organe zeigten ein positives Färbeergebnis in den IHC-Färbungen meiner Studie. Der dort beschriebene Unterschied zwischen B- und T-Lymphozyten in der TRPC6 Expression bringt mich zuletzt zur größten Limitation meiner Arbeit, die durch die Methodik bestimmt war und an dieser Stelle nochmals hervorgehoben werden soll. Ein Unterschied zwischen der B- und T-Zone und damit eine eindeutige Differenzierung zwischen B- und T-Lymphozyten konnte schwer nachvollzogen werden. Die Zonen in den beobachteten Geweben waren, aufgrund des hohen Alters der in meine Forschungen einbezogenen Körperspender, ineinander verschmolzen. Außerdem kommt es in lymphatischen Geweben zu weiteren altersmorphologischen Veränderungen [46], [50], [56]. Am ehesten war eine Differenzierung an dem betrachteten Gewebe der Tonsilla palatina zu beobachten, da dieses von jungen Patienten stammte.

Daraus folgend wären weitere Forschungen an dem Gewebe von jüngeren Menschen notwendig, um eine dezidiertere Aussage über die einzelnen Bereiche des Lymphgewebes treffen zu können. Besonders wichtig wäre auch die immunhistochemische Untersuchung von nicht involviertem Thymusgewebe. Außerdem wäre eine Betrachtung von pathologischem Gewebe, besonders in dem von Lymphomen, im Vergleich zu gesundem lymphatischem Gewebe notwendig, um Hinweise über die mögliche Veränderung in Konzentration des TRPC6 Kanals zu finden.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] S. F. Pedersen, G. Owsianik, und B. Nilius, „TRP channels: An overview“, *Cell Calcium*, Bd. 38, Nr. 3–4, S. 233–252, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.028.
- [2] M. J. Berridge, P. Lipp, und M. D. Bootman, „The versatility and universality of calcium signalling“, *Nat Rev Mol Cell Biol*, Bd. 1, Nr. 1, S. 11–21, Okt. 2000, doi: 10.1038/35036035.
- [3] B. Nilius, G. Owsianik, T. Voets, und J. A. Peters, „Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease“, *Physiol Rev*, Bd. 87, Nr. 1, S. 165–217, Jan. 2007, doi: 10.1152/physrev.00021.2006.
- [4] Q. Wu *u. a.*, „Activation of calcium-sensing receptor increases TRPC3/6 expression in T lymphocyte in sepsis“, *Mol Immunol*, Bd. 64, Nr. 1, S. 18–25, März 2015, doi: 10.1016/j.molimm.2014.10.018.
- [5] D. J. COSENS und A. MANNING, „Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant“, *Nature*, Bd. 224, Nr. 5216, S. 285–287, Okt. 1969, doi: 10.1038/224285a0.
- [6] B. MINKE, C.-F. WU, und W. L. PAK, „Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant“, *Nature*, Bd. 258, Nr. 5530, S. 84–87, Nov. 1975, doi: 10.1038/258084a0.
- [7] B. Minke, „Light-induced reduction in excitation efficiency in the trp mutant of Drosophila.“, *J Gen Physiol*, Bd. 79, Nr. 3, S. 361–385, März 1982, doi: 10.1085/jgp.79.3.361.
- [8] B. T. Bloomquist *u. a.*, „Isolation of a putative phospholipase c gene of drosophila, norpA, and its role in phototransduction“, *Cell*, Bd. 54, Nr. 5, S. 723–733, Aug. 1988, doi: 10.1016/S0092-8674(88)80017-5.
- [9] C. Montell und G. M. Rubin, „Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction“, *Neuron*, Bd. 2, Nr. 4, S. 1313–1323, Apr. 1989, doi: 10.1016/0896-6273(89)90069-X.
- [10] P. Hochstrate, „Lanthanum mimicks the trp photoreceptor mutant of Drosophila in the blowfly Calliphora“, *Journal of Comparative Physiology A*, Bd. 166, Nr. 2, Dez. 1989, doi: 10.1007/BF00193462.
- [11] B. Minke und Z. Selinger, „Chapter 5 Inositol lipid pathway in fly photoreceptors: Excitation, calcium mobilization and retinal degeneration“, *Progress in Retinal Research*, Bd. 11, S. 99–124, Jan. 1991, doi: 10.1016/0278-4327(91)90026-X.
- [12] R. C. Hardie, „Whole-cell recordings of the light induced current in dissociated *Drosophila* photoreceptors: evidence for feedback by calcium permeating the light-sensitive channels“, *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, Bd. 245, Nr. 1314, S. 203–210, Sep. 1991, doi: 10.1098/rspb.1991.0110.
- [13] R. C. Hardie, „A brief history of trp: commentary and personal perspective“, *Pflugers Arch*, Bd. 461, Nr. 5, S. 493–498, Mai 2011, doi: 10.1007/s00424-011-0922-9.
- [14] K. Nagy, „Biophysical processes in invertebrate photoreceptors: recent progress and a critical overview based on *Limulus* photoreceptors“, *Q Rev Biophys*, Bd. 24, Nr. 2, S. 165–226, Mai 1991, doi: 10.1017/S0033583500003401.

- [15] R. C. Hardie und B. Minke, „The *trp* gene is essential for a light-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel in *Drosophila* photoreceptors“, *Neuron*, Bd. 8, Nr. 4, S. 643–651, Apr. 1992, doi: 10.1016/0896-6273(92)90086-S.
- [16] P. D. Wes, J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, und C. Montell, „TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 92, Nr. 21, S. 9652–9656, Okt. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.21.9652.
- [17] X. Zhu, P. B. Chu, M. Peyton, und L. Birnbaumer, „Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene“, *FEBS Lett*, Bd. 373, Nr. 3, S. 193–198, Okt. 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)01038-G.
- [18] B. Nilius und G. Owsianik, „The transient receptor potential family of ion channels“, *Genome Biol*, Bd. 12, Nr. 3, S. 218, 2011, doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218.
- [19] K. Venkatachalam und C. Montell, „TRP Channels“, *Annu Rev Biochem*, Bd. 76, Nr. 1, S. 387–417, Juni 2007, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- [20] H. Wang *u. a.*, „TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes“, *Pharmacol Ther*, Bd. 209, S. 107497, Mai 2020, doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107497.
- [21] I. S. Ramsey, M. Delling, und D. E. Clapham, „AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS“, *Annu Rev Physiol*, Bd. 68, Nr. 1, S. 619–647, Jan. 2006, doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431.
- [22] T. Hofmann, M. Schaefer, G. Schultz, und T. Gudermann, „Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 99, Nr. 11, S. 7461–7466, Mai 2002, doi: 10.1073/pnas.102596199.
- [23] Q. Tang *u. a.*, „Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels“, *Cell Res*, Bd. 28, Nr. 7, S. 746–755, Juli 2018, doi: 10.1038/s41422-018-0038-2.
- [24] I. Jardin, J. Nieto, G. M. Salido, und J. A. Rosado, „TRPC6 channel and its implications in breast cancer: an overview“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bd. 1867, Nr. 12, S. 118828, Dez. 2020, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118828.
- [25] C. Montell, „The TRP Superfamily of Cation Channels“, *Science's STKE*, Bd. 2005, Nr. 272, Feb. 2005, doi: 10.1126/stke.2722005re3.
- [26] M. Trebak, G. Vazquez, G. St. J. Bird, und J. W. Putney, „The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels“, *Cell Calcium*, Bd. 33, Nr. 5–6, S. 451–461, Mai 2003, doi: 10.1016/S0143-4160(03)00056-3.
- [27] T. Hofmann, A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, und G. Schultz, „Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol“, *Nature*, Bd. 397, Nr. 6716, S. 259–263, Jan. 1999, doi: 10.1038/16711.

- [28] J. Abramowitz und L. Birnbaumer, „Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels“, *The FASEB Journal*, Bd. 23, Nr. 2, S. 297–328, Feb. 2009, doi: 10.1096/fj.08-119495.
- [29] J. Shi *u. a.*, „Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells“, *J Physiol*, Bd. 561, Nr. 2, S. 415–432, Dez. 2004, doi: 10.1113/jphysiol.2004.075051.
- [30] Y. Liao *u. a.*, „Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 105, Nr. 8, S. 2895–2900, Feb. 2008, doi: 10.1073/pnas.0712288105.
- [31] M. Schaefer und N. Urban, „TRP-Kanäle: vielseitige zelluläre Sensoren und Effektoren“, *BIOspektrum*, Bd. 19, Nr. 2, S. 143–145, März 2013, doi: 10.1007/s12268-013-0284-2.
- [32] J. Reiser *u. a.*, „TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function“, *Nat Genet*, Bd. 37, Nr. 7, S. 739–744, Juli 2005, doi: 10.1038/ng1592.
- [33] M. P. Winn *u. a.*, „A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis“, *Science (1979)*, Bd. 308, Nr. 5729, S. 1801–1804, Juni 2005, doi: 10.1126/science.1106215.
- [34] Y. Yu *u. a.*, „Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 101, Nr. 38, S. 13861–13866, Sep. 2004, doi: 10.1073/pnas.0405908101.
- [35] N. Onohara *u. a.*, „TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy“, *EMBO J*, Bd. 25, Nr. 22, S. 5305–5316, Nov. 2006, doi: 10.1038/sj.emboj.7601417.
- [36] A. Dietrich und T. Gudermann, „TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance“, 2014, S. 157–188. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2\_7.
- [37] M. Ding *u. a.*, „Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine TRPC6 antagonists for the treatment of gastric cancer“, *Cancer Lett*, Bd. 432, S. 47–55, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.041.
- [38] J. Davis, A. R. Burr, G. F. Davis, L. Birnbaumer, und J. D. Molkentin, „A TRPC6-Dependent Pathway for Myofibroblast Transdifferentiation and Wound Healing In Vivo“, *Dev Cell*, Bd. 23, Nr. 4, S. 705–715, Okt. 2012, doi: 10.1016/j.devcel.2012.08.017.
- [39] K. Hofmann *u. a.*, „Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Bd. 1863, Nr. 2, S. 560–568, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.bbadi.2016.12.002.
- [40] Y.-L. Wu *u. a.*, „Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho“, *Kidney Int*, Bd. 91, Nr. 4, S. 830–841, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.kint.2016.09.039.

- [41] G. A. Ramirez *u. a.*, „TRPC6 gene variants and neuropsychiatric lupus“, *J Neuroimmunol*, Bd. 288, S. 21–24, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.08.015.
- [42] S. Marshall-Gradisnik, S. Johnston, A. Chacko, T. Nguyen, P. Smith, und D. Staines, „Single nucleotide polymorphisms and genotypes of transient receptor potential ion channel and acetylcholine receptor genes from isolated B lymphocytes in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients“, *Journal of International Medical Research*, Bd. 44, Nr. 6, S. 1381–1394, Dez. 2016, doi: 10.1177/0300060516671622.
- [43] X. Song *u. a.*, „Lovastatin inhibits human B lymphoma cell proliferation by reducing intracellular ROS and TRPC6 expression“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bd. 1843, Nr. 5, S. 894–901, Mai 2014, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.02.002.
- [44] G. Aumüller *u. a.*, „2 Blut und lymphatische Organe – Grundlagen“, in *Duale Reihe Anatomie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2020, S. 165–193. doi: 10.1055/b-0040-175159.
- [45] R. Lüllmann-Rauch und E. Asan, „13 Lymphatische Organe (I)“, in *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2019. doi: 10.1055/b-0039-166974.
- [46] T. Kwok *u. a.*, „Age-Associated Changes to Lymph Node Fibroblastic Reticular Cells“, *Frontiers in Aging*, Bd. 3, Jan. 2022, doi: 10.3389/fragi.2022.838943.
- [47] R. Lüllmann-Rauch und E. Asan, „11 Kreislauforgane“, in *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2019. doi: 10.1055/b-0039-166972.
- [48] M. Cakala-Jakimowicz, P. Kolodziej-Wojnar, und M. Puzianowska-Kuznicka, „Aging-Related Cellular, Structural and Functional Changes in the Lymph Nodes: A Significant Component of Immunosenescence? An Overview“, *Cells*, Bd. 10, Nr. 11, S. 3148, Nov. 2021, doi: 10.3390/cells10113148.
- [49] F. A. Denz, „Age changes in lymph nodes“, *J Pathol Bacteriol*, Bd. 59, Nr. 4, S. 575–591, Okt. 1947, doi: 10.1002/path.1700590409.
- [50] P. Luscieli, T. Hubschmid, H. Cottier, M. W. Hess, und L. H. Sabin, „Human lymph node morphology as a function of age and site.“, *J Clin Pathol*, Bd. 33, Nr. 5, S. 454–461, Mai 1980, doi: 10.1136/jcp.33.5.454.
- [51] C. Hadamitzky, H. Spohr, A. S. Debertin, S. Guddat, M. Tsokos, und R. Pabst, „Age-dependent histoarchitectural changes in human lymph nodes: an underestimated process with clinical relevance?“, *J Anat*, Bd. 216, Nr. 5, S. 556–562, Mai 2010, doi: 10.1111/j.1469-7580.2010.01213.x.
- [52] A. Chauveau *u. a.*, „Visualization of T Cell Migration in the Spleen Reveals a Network of Perivascular Pathways that Guide Entry into T Zones“, *Immunity*, Bd. 52, Nr. 5, S. 794-807.e7, Mai 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.010.
- [53] H. Miniggio, „Biological significance of palatine tonsillar epithelium: microstructure and disease“, *J Dent Assoc S Afr*, Bd. 71, S. 496–499, März 2016.

- [54] S. Kimura, „Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues“, *Anat Sci Int*, Bd. 93, Nr. 1, S. 23–34, Jan. 2018, doi: 10.1007/s12565-017-0418-6.
- [55] K. Hase *u. a.*, „Uptake through glycoprotein 2 of FimH<sup>+</sup> bacteria by M cells initiates mucosal immune response“, *Nature*, Bd. 462, Nr. 7270, S. 226–230, Nov. 2009, doi: 10.1038/nature08529.
- [56] J. S. Cornes, „Number, size, and distribution of Peyer’s patches in the human small intestine: Part II The effect of age on Peyer’s patches“, *Gut*, Bd. 6, Nr. 3, S. 230–233, Juni 1965, doi: 10.1136/gut.6.3.230.
- [57] D. C. Douek *u. a.*, „Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection“, *Nature*, Bd. 396, Nr. 6712, S. 690–695, Dez. 1998, doi: 10.1038/25374.
- [58] F. Luciani, G. Turchetti, C. Franceschi, und S. Valensin, „A mathematical model for the immunosenescence.“, *Riv Biol*, Bd. 94, Nr. 2, S. 305–18, 2001.
- [59] R. Moritz, „Morphologie und Pathologie des menschlichen Thymus im Alter und bei Myasthenia gravis: eine morphometrische Studie.“, 2005. URN: urn:nbn:de:bvb:20-opus-16210
- [60] M. D’Esposito *u. a.*, „Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21→q22“, *Cytogenet Genome Res*, Bd. 83, Nr. 1–2, S. 46–47, 1998, doi: 10.1159/000015165.
- [61] T. Hofmann, M. Schaefer, G. Schultz, und T. Gudermann, „Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry“, *J Mol Med*, Bd. 78, Nr. 1, S. 14–25, Jan. 2000, doi: 10.1007/s001099900070.
- [62] A. GAMBERUCCI *u. a.*, „Diacylglycerol activates the influx of extracellular cations in T-lymphocytes independently of intracellular calcium-store depletion and possibly involving endogenous TRP6 gene products“, *Biochemical Journal*, Bd. 364, Nr. 1, S. 245–254, Mai 2002, doi: 10.1042/bj3640245.
- [63] A. S. Wenning *u. a.*, „TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bd. 1813, Nr. 3, S. 412–423, März 2011, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.022.
- [64] S. Sel *u. a.*, „Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response“, *Clinical & Experimental Allergy*, Bd. 38, Nr. 9, S. 1548–1558, Sep. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03043.x.
- [65] C. Carrillo *u. a.*, „Diacylglycerol-containing oleic acid induces increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> via TRPC3/6 channels in human T-cells“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Bd. 1821, Nr. 4, S. 618–626, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.bbaliip.2012.01.008.
- [66] H. Inada, T. Iida, und M. Tominaga, „Different expression patterns of TRP genes in murine B and T lymphocytes“, *Biochem Biophys Res Commun*, Bd. 350, Nr. 3, S. 762–767, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.111.

- [67] E. W. Weber und W. A. Muller, „Roles of transient receptor potential channels in regulation of vascular and epithelial barriers“, *Tissue Barriers*, Bd. 5, Nr. 2, S. e1331722, Apr. 2017, doi: 10.1080/21688370.2017.1331722.
- [68] M. Tauseef *u. a.*, „TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation“, *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 209, Nr. 11, S. 1953–1968, Okt. 2012, doi: 10.1084/jem.20111355.
- [69] E. W. Weber, F. Han, M. Tauseef, L. Birnbaumer, D. Mehta, und W. A. Muller, „TRPC6 is the endothelial calcium channel that regulates leukocyte transendothelial migration during the inflammatory response“, *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 212, Nr. 11, S. 1883–1899, Okt. 2015, doi: 10.1084/jem.20150353.
- [70] A. J. Huang, J. E. Manning, T. M. Bandak, M. C. Ratau, K. R. Hanser, und S. C. Silverstein, „Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells.“, *J Cell Biol*, Bd. 120, Nr. 6, S. 1371–1380, März 1993, doi: 10.1083/jcb.120.6.1371.
- [71] Q. Chen *u. a.*, „TRPC6-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling mediates airway inflammation in response to oxidative stress via ERK pathway.“, *Cell Death Dis*, Bd. 11, Nr. 3, S. 170, März 2020, doi: 10.1038/s41419-020-2360-0.
- [72] M. J. Davis, J. A. Castorena-Gonzalez, und S. D. Zawieja, „Electric field stimulation unmasks a subtle role for T-type calcium channels in regulating lymphatic contraction.“, *Res Sq*, Juni 2023, doi: 10.21203/rs.3.rs-2938440/v1.
- [73] G. Lang, „Histotechnik“, Vienna: Springer Vienna, 2013. doi: 10.1007/978-3-7091-1190-1.
- [74] D. Servello, „Immunhistochemischer Nachweis des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC6 im Skelettmuskelgewebe des Menschen“. doi: doi:10.22028/D291-36458.
- [75] T. J. Jacobs, „Proteinnachweis und Lokalisation des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC6 am menschlichen Herzen“, 2022. doi: doi:10.22028/D291-36491.
- [76] Y. Jang, Y. Lee, S. M. Kim, Y. D. Yang, J. Jung, und U. Oh, „Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs.“, *Arch Pharm Res*, Bd. 35, Nr. 10, S. 1823–30, Okt. 2012, doi: 10.1007/s12272-012-1016-8.
- [77] J. Abdinghoff, D. Servello, T. Jacobs, A. Beckmann, und T. Tschernig, „Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry“, *Biomed Rep*, Bd. 16, Nr. 5, S. 42, März 2022, doi: 10.3892/br.2022.1525.
- [78] A. Berod, B. K. Hartman, und J. F. Pujol, „Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase.“, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Bd. 29, Nr. 7, S. 844–850, Juli 1981, doi: 10.1177/29.7.6167611.
- [79] A. M. Almulhim und R. G. Menezes, *Evaluation of Postmortem Changes*. 2024.

- [80] R. J. Pelstring, D. C. Allred, R. J. Esther, S. R. Lampkin, und P. M. Banks, „Differential antigen preservation during tissue autolysis“, *Hum Pathol*, Bd. 22, Nr. 3, S. 237–241, März 1991, doi: 10.1016/0046-8177(91)90156-J.
- [81] S. Magaki, S. A. Hojat, B. Wei, A. So, und W. H. Yong, „An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry“, 2019, S. 289–298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_25.
- [82] S. P. Zehntner, M. M. Chakravarty, R. J. Bolovan, C. Chan, und B. J. Bedell, „Synergistic Tissue Counterstaining and Image Segmentation Techniques for Accurate, Quantitative Immunohistochemistry“, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Bd. 56, Nr. 10, S. 873–880, Okt. 2008, doi: 10.1369/jhc.2008.950345.
- [83] A. H. Fischer, K. A. Jacobson, J. Rose, und R. Zeller, „Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections“, *Cold Spring Harb Protoc*, Bd. 2008, Nr. 5, S. pdb.prot4986, Mai 2008, doi: 10.1101/pdb.prot4986.
- [84] J. Bordeaux *u. a.*, „Antibody validation“, *Biotechniques*, Bd. 48, Nr. 3, S. 197–209, März 2010, doi: 10.2144/000113382.
- [85] „Anti-TRPC6 Antibody, Alomone Labs, Jerusalem“. Zugegriffen: 13. März 2024. [Online]. Verfügbare unter: [https://www.alomone.com/p/anti-trpc6/ACC-017?gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQjw-r-vBhC-ARIsAGgUO2CFeRTvIqbme9D66w7FrGaYj\\_IVAcPPJb9qXI8jCXOM5ijV\\_raoSw4aAqyWEALw\\_wcB#citation](https://www.alomone.com/p/anti-trpc6/ACC-017?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw-r-vBhC-ARIsAGgUO2CFeRTvIqbme9D66w7FrGaYj_IVAcPPJb9qXI8jCXOM5ijV_raoSw4aAqyWEALw_wcB#citation)
- [86] A. D. Kistler *u. a.*, „Transient receptor potential channel 6 (TRPC6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease.“, *J Biol Chem*, Bd. 288, Nr. 51, S. 36598–609, Dez. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.488122.

## 7. Publikationen

Daum F, Flockerzi F, Bozzato A, Schick B, Tscherig T. TRPC6 is ubiquitously present in lymphatic tissues: A study using samples from body donors. *Med Int (Lond)*. 2024 Aug 2;4(6):62.  
doi: 10.3892/mi.2024.186. PMID: 39161881; PMCID: PMC11332316.

## 8. Dank

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Thomas Tschernig nicht nur für das Überlassen des Themas dieser Dissertation, sondern auch für seine unkomplizierte Art, Zugänglichkeit und stetige Erreichbarkeit bedanken. Er ermutigte mich zur Selbstständigkeit und gab mir den Freiraum zur Einteilung und Orientierung meiner Zeit und Gedanken, was mich auch in meiner persönlichen Entwicklung deutlich weitergebracht hat. Vielen Dank!

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Irina Scheck und Katja Schäfer für Ihre ständige Unterstützung im Labor zu jeder Tageszeit bedanken. Ohne Ihre Hilfe wäre das Erlernen der labortechnischen Verfahren dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Frau Dr. rer. nat. Silke Wemmert bedanke ich mich für das unkomplizierte Überlassen der Tonsillenproben.

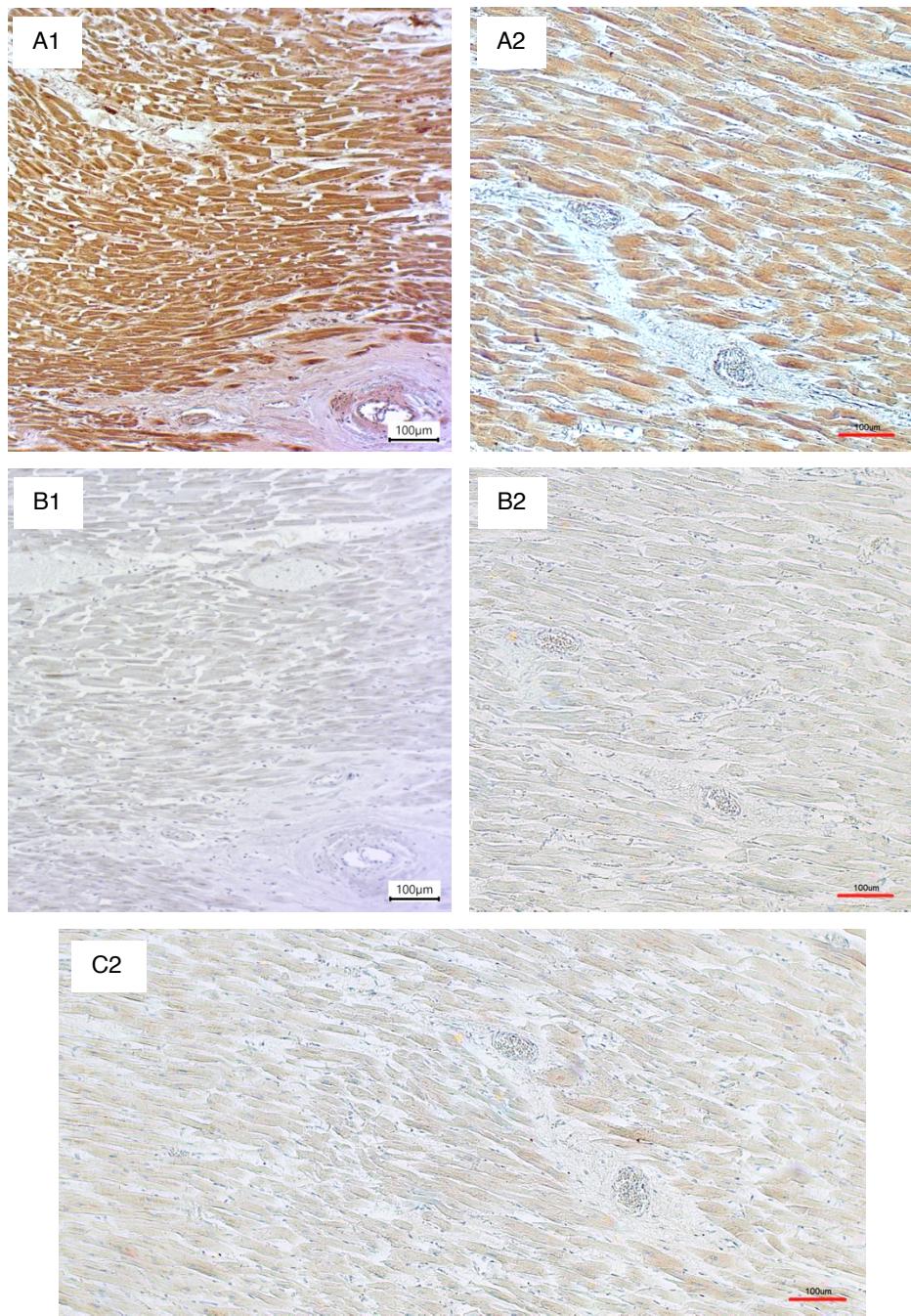
Mein Dank gilt außerdem Dr. med. Fidelis Flockerzi für seinen hilfreichen Rat und seine pathologische Beurteilung meiner angefertigten histologischen Schnitte.

Zuletzt will ich mich bei meinen Eltern Volker und Claudia, meinem Bruder Jonas und meiner Freundin Clara bedanken, die mich nicht nur moralisch bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützten, sondern maßgeblich dazu betragen, dass ich die Person werden konnte, die ich heute bin.

## 9. Lebenslauf

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

## 10. Anhang



Direkter Vergleich zwischen **A**: Positivkontrollen, **B**: Negativkontrollen und **C**: Spezifitätsnachweis durch Inkubation mit Kontrollpeptid von *Tobias Jacobs* aus einer vorausgegangen Studie zu TRPC6 am Herzmuskel [75] und meinen Ergebnissen. Alle mit **1** beschrifteten Fotografien stammen von Positivkontrollen aus meiner Arbeit. Alle mit **2** beschrifteten Fotografien stammen aus der Arbeit von *Jacobs*. Die in meiner Studie verwendeten Positivkontrollen stammen aus dem Herzen des Körperspenders 19/29. Es ist zu beobachten, dass ein vergleichbares Ergebnis in sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen vorliegt. Der Spezifitätsnachweis kann so als übertragbar angenommen werden.