

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

Der nichtselektive Kationenkanal TRPC3 im menschlichen und murinen Nierengewebe:

eine immunhistochemische Untersuchung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Coline Marguerite Diebolt

geboren am 08.06.2000 in Wissembourg, Frankreich

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	1
2	<u>SUMMARY</u>	3
3	<u>EINLEITUNG</u>	4
3.1	PHYSIOLOGIE DER NIERE.....	4
3.2	MAKROSKOPISCHE ANATOMIE DER NIERE	4
3.3	MIKROSKOPISCHE ANATOMIE DER NIERE	5
3.4	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL-KANÄLE	8
3.5	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CANONICAL-KANÄLE	10
3.6	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CANONICAL-3	10
3.6.1	VORKOMMEN UND BEDEUTUNG	10
3.6.2	AUFBAU	12
3.6.3	REGULIERUNG.....	14
3.7	ZIELE DER ARBEIT	18
4	<u>MATERIAL UND METHODIK</u>	19
4.1	PROBENMATERIAL.....	19
4.1.1	KÖRPERSPENDER.....	19
4.1.2	NIEREN AUS DER UROLOGIE	21
4.1.3	NIEREN AUS DER PATHOLOGIE – NEPHROKALZINOSEN	22
4.1.4	TIERISCHE NIEREN	24
4.2	ÜBERSICHT DER HISTOLOGISCHEN ARBEITSSCHRITTE	25
4.3	FIXIERUNG	25

4.3.1	FORMALINFIXIERUNG.....	26
4.3.2	NITRITPÖKELSALZ-ETHANOL-POLYETHYLENGLYCOL-FIXIERUNG.....	26
4.4	EINBETTUNGSPROZESS UND GEWEBEVERARBEITUNG.....	27
4.5	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	28
4.5.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG	28
4.5.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	30
4.5.3	VON-KOSSA FÄRBUNG.....	33
4.5.4	TITRIERUNG.....	34
4.6	QUALITÄTSKONTROLLEN.....	34
4.6.1	PEPTIDKONTROLLE.....	34
4.6.2	NEGATIVKONTROLLE	35
4.7	HISTOLOGISCHE IDENTIFIZIERUNG DER TUBULUSABSCHNITTE.....	35
4.7.1	PROXIMALER TUBULUS.....	36
4.7.2	INTERMEDIÄRTUBULUS	36
4.7.3	DISTALER TUBULUS.....	36
4.7.4	SAMMELROHR	36
4.8	MASCHINELLE AUSWERTUNG	39
4.8.1	ABLAUF.....	39
4.8.2	ETABLIERUNG DER SKALENBEGRENZUNGEN.....	42
4.9	MANUELLE AUSWERTUNG.....	44
4.10	STATISTISCHE ANALYSE	46
4.11	MATERIAL.....	47
4.11.1	GERÄTE.....	47
4.11.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	48
4.11.3	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN.....	49
4.11.4	SUBSTANZEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE	50

4.11.5 PROGRAMME	50
5 ERGEBNISSE.....	51
5.1 HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG	51
5.2 FORMALINFISSIERTE PROBEN	54
5.2.1 MANUELLE AUSWERTUNG.....	54
5.2.2 MASCHINELLE AUSWERTUNG.....	61
5.2.3 VERGLEICH DER FORMALINFISSIERTEN KÖRPERSPENDER- UND OP-PROBEN	61
5.3 NEP-FIXIERTE KÖRPERSPENDERPROBEN.....	63
5.3.1 MANUELLE AUSWERTUNG.....	63
5.3.2 MASCHINELLE AUSWERTUNG.....	69
5.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER KÖRPERSPENDER.....	69
5.5 OP- UND TIERPROBEN	70
5.5.1 DESKRIPTIVE GESAMTANALYSE DER MAUSNIEREN	70
5.5.2 MASCHINELLE ANALYSE DER OP- UND MAUSNIEREN	72
5.6 PEPTIDKONTROLLE	78
5.7 PATHOLOGISCHE PROBEN-NEPHROKALZINOSEN	80
5.7.1 VERGLEICH DER ENTKALKTEN UND NICHT-ENTKALKTEN PATHOLOGISCHEN PROBEN	80
5.7.2 VERGLEICH DER PATHOLOGISCHEN PROBEN MIT DEN OP-PROBEN	85
6 DISKUSSION.....	88
6.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODIK	88
6.1.1 PROBENSAMMLUNG	88
6.1.2 FIXIERUNG.....	89
6.1.3 FÄRBUNG	90

6.1.4	ANTIKÖRPER	90
6.1.5	AUSWERTUNG	91
6.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	92
6.2.1	ERGEBNISSE VON KÖRPERSPENDER, OP- UND MAUSPROBEN	92
6.2.2	ERGEBNISSE DER NEPHROKALZINOSEPROBEN	94
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	<u>97</u>
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>98</u>
9	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>104</u>
10	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>105</u>
11	<u>DIAGRAMMVERZEICHNIS</u>	<u>106</u>
12	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>107</u>
13	<u>PUBLIKATIONEN</u>	<u>110</u>
14	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>111</u>
15	<u>LEBENSLAUF</u>	<u>113</u>

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Rolle des nichtselektiven Kationenkanals TRPC3 wurde unter funktionellen und pathophysiologischen Aspekten bereits durch unterschiedliche Forschungsgruppen hervorgehoben. Studien weisen darauf hin, dass eine TRPC3-Fehlexpression an der Entstehung von Hyperkalziurien, Nephrokalzinosen und in der Folge an der Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen beteiligt sein kann. Die bereits bestehende anatomische Beschreibung der TRPC3-Verteilung in der Niere beruht jedoch meist auf tierischen Modellen oder Zellkulturen, wobei sich die hierzu vorliegenden Studien teilweise widersprechen. In dieser Arbeit wird die Lokalisierung von TRPC3 in menschlichen und tierischen Nieren mithilfe von immunhistochemischen Methoden beleuchtet. Es wird untersucht, inwiefern sich Ergebnisse aus bestehenden Studien, die an Tiermodellen gewonnen wurden, auf menschliche Proben übertragen lassen. Darauf hinaus werden Färbungen von Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe durchgeführt, um den möglichen Einfluss dieser Pathologie auf die anti-TRPC3-Färbung zu untersuchen.

Methoden: Die immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe von spezifischen Knockout-getesteten Antikörpern durchgeführt. Anhand von Peptidkontrollen konnte eine gute Antigen-Spezifität nachgewiesen werden. Es wurden Färbungen von Nierenproben von fixierten Körperspendern ($n = 16$), von Nephrektomien ($n = 10$), sowie von Mäusen angefertigt ($n = 7$). Weiterhin wurden Färbungen von pathologischen Nephrokalzinose-betroffenen Nierenproben durchgeführt ($n = 5$). Die Auswertung erfolgte semiquantitativ teils manuell durch visuelle Analyse an einem Lichtmikroskop, teils maschinell mithilfe einer computergestützten Analyse. Ein gewichteter Diaminobenzidin-Score, ähnlich dem H-Score von Pixel wurde benutzt, um die Intensität der Färbungen zu beschreiben.

Ergebnisse: Die Ergebnisse zeigten niedrige Färbeintensitäten für TRPC3 in den Glomeruli, unabhängig von der Spezies. Proximale Tubuli aus der Rinde und dem Mark waren meistens stark gefärbt. Distale Tubuli zeigten – je nach Lokalisation – diskrete Variationen in der Färbung, wiesen aber insgesamt eine intensive Färbung auf. Die Sammelrohre, im Gegensatz zu den Intermediärtubuli wiesen ebenfalls eine starke Färbung auf. Die untersuchten Nephrokalzinose-Präparate zeigten im Vergleich zum gesunden Gewebe eine statistisch signifikant schwächere Färbung in den proximalen Tubuli aber nicht in den Sammelrohren.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend wird hier eine systematische Analyse der Verteilung der TRPC3-Kanäle in der menschlichen Niere präsentiert, die bisher unbekannte Aspekte hervorhebt. Unterschiede in der Qualität des Gewebes waren zwischen Körperspender- und OP-Nieren zu beobachten. Meine Ergebnisse unterstützen weitestgehend die für Tiere bereits vorhandenen Forschungsergebnisse sowie die Translation derselben auf den Menschen. Die Ergebnisse, die im

Zusammenhang mit den pathologischen Nephrokalzinose-Proben erzielt wurden, stärken ebenso bereits vorhandene Forschungsergebnisse von anderen Arbeitsgruppen, die eine nephroprotektive Rolle von TRPC3 im proximalen Tubulus andeuten. Jedoch sind weitere Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen notwendig. Weiterhin werden in Zukunft diese ersten Ergebnisse mithilfe anderer Techniken bestätigt werden müssen. Andererseits werden auch funktionale Aspekte tiefer zu erforschen sein, um das Verständnis und die Behandlung des Krankheitsbildes der Nephrokalzinose zu verbessern.

2 Summary

Background: The role of the non-selective cation channel TRPC3 has already been highlighted under functional and pathophysiological aspects by various research groups. Studies indicate that impaired TRPC3 expression might be involved in the development of hypercalciuria, nephrocalcinosis, and subsequently in the development of chronic kidney disease. However, the existing anatomical description of the TRPC3 distribution in the kidney is mostly based on animal models or cell cultures, whereby the available studies are partially contradictory. In this work, the localization of the TRPC3 protein is examined in human and animal kidneys using immunohistochemical methods. The extent to which results from existing studies obtained in animal models can be transferred to human samples is ultimately investigated. In addition, staining of nephrocalcinosis-affected tissue is performed to investigate the potential impact of this pathology on anti-TRPC3 immunolabeling.

Methods: Immunohistochemical staining was performed using specific knockout-tested antibodies. Peptide controls demonstrated their antigen specificity. Staining was performed on kidney samples obtained from fixed body donors ($n = 16$), from nephrectomies ($n = 10$), and from mice ($n = 7$). In addition, staining of pathological kidneys affected by nephrocalcinosis was performed ($n = 5$). The evaluation was carried out semi-quantitatively, partly manually, by visual analysis on a light microscope and partly automatically using a software-based analysis. A weighted diaminobenzidine score, similar to Pixel's H-score, was used to describe the intensity of the staining.

Results: The results showed low staining intensities for TRPC3 in the glomeruli, regardless of species. Proximal tubules from the cortex and medulla were mostly intensively stained. Distal tubules showed – depending on localization – discrete variations in staining, but overall showed intense staining. The collecting ducts, in contrast to the intermediate tubules, displayed a strong coloration. The examined nephrocalcinosis specimens showed statistically significantly weaker staining in the proximal tubules but not in the collecting ducts compared to healthy tissue.

Conclusion: In summary, a systematic analysis of the distribution of TRPC3-channels in the human kidney is presented here, highlighting previously unknown aspects. Differences in tissue quality were observed between body donor and surgical kidneys. My results largely support the results already available for animals and the translation of these to humans. The results obtained in connection with the pathological nephrocalcinosis samples also strengthen existing results from other research groups suggesting a nephroprotective role of TRPC3 in the proximal tubule. However, further studies with larger numbers of patients are necessary. In the future, the results will have to be further confirmed using other techniques. On the other hand, functional aspects need to be investigated in greater depth to improve the understanding and the treatment of nephrocalcinosis.

3 Einleitung

3.1 Physiologie der Niere

Die Bedeutung der Nieren als unverzichtbare Komponenten des komplexen Systems, das unseren Körper am Laufen hält, ist enorm. Die unterschiedlichen Dialyseverfahren werden oft als lebensrettende Maßnahme bei schwerkranken Patienten angewendet und zeigen, welche Fortschritte in diesem Bereich schon erreicht worden sind (Hans-Christian Pape, 2014). Zu ihren Aufgaben gehört die Regulierung des Wasser-, Elektrolyt- und des Säure-Basen-Haushaltes. Sie sind beteiligt an der Entgiftung und Ausscheidung von Stoffen und erfüllen endokrine Funktionen (Hans-Christian Pape, 2014). Wir konzentrieren uns in dieser Arbeit auf die Anatomie der Niere. Physiologische Aspekte werden in den folgenden Kapiteln implementiert. Tiefergehende Beschreibungen der Physiologie der Niere können in spezialisierter Literatur nachgeschlagen werden (Hans-Christian Pape, 2014).

3.2 Makroskopische Anatomie der Niere

Die paarig angelegten retroperitoneal liegenden Organe, beinhalten die essenziellen harnbildenden Strukturen (Drenkhahn, 2008, Sampaio, 2000). Sie besitzen einen superioren sowie einen inferioren Pol. Die laterale Seite ist konvex und die mediale konkav geformt (Sampaio, 2000). Von innen nach außen ist jede Niere von drei Kapseln umhüllt. Die erste ist eine derbe Kapsel, die zweite eine lockere Fettgewebskapsel, die auch die Nebennieren umfasst. Die dritte ist die Nierenfazie, auch Gerota-Fazie genannt (Sampaio, 2000). Jede Niere liegt in einer Nische zwischen den jeweiligen Musculus psoas major und Musculus quadratus lumborum (Sampaio, 2000). Sie haben eine topografische Verbindung zu dem Zwerchfell, den Nebennieren und lateral zu dem jeweiligen Musculus transversus abdominis. Die rechte Niere liegt dem aszendierende Colon an, sowie einem Teil des Duodenums und der Leber (Drenkhahn, 2008). Die linke Niere liegt dem deszendierenden Colon (Soriano *et al.*, 2022), dem Magen, der Milz und dem Pankreas an. An der posterioren Seite beider Nieren verlaufen periphere Nerven des Plexus lumbosacralis (Drenkhahn, 2008).

Das Nierengewebe wird in Rinde (Cortex) und Mark (Medulla) unterteilt. Die Rinde befindet sich oberflächennah (Hans-Christian Pape, 2014), während das Mark dreiecksförmig mit der breiteren Seite ihr zugewendet ist (Drenkhahn, 2008). Die Spitzen der Dreiecke ragen als Nierenpapillen in das Nierenbecken (siehe **Abbildung 1**) (Drenkhahn, 2008). Im Nierenhilus liegen die großen Äste der jeweils versorgenden Arterien, Venen, Nerven und Lymphgefäße, sowie der Harnleiter, über den der Harn in die Harnblase gelangt. Von dort aus kann der gesammelte Harn über die Harnröhre ausgeschieden werden. Als Lobus renalis wird der funktionelle Abschnitt der menschlichen Niere beschrieben, also die Markpyramide mit dem zugehörigen Rindenabschnitt. Die menschliche

multipapilläre Niere beinhaltet etwa vierzehn davon, die Mausniere dagegen ist eine unipapilläre Niere (Drenkhahn, 2008).

3.3 Mikroskopische Anatomie der Niere

In jeder Niere befinden sich mehr als eine Million Nephrene. Diese kleinste funktionelle Einheit der Niere besteht aus dem Nierenkörperchen, bekannt als Corpusculum renale, und dem dazugehörigen Tubulussystem (Drenkhahn, 2008, Hans-Christian Pape, 2014). Dieses mündet in ein Sammelrohr, über welches es Zugang zu dem Beckenkelchsystem und den ableitenden Harnwegen hat (Drenkhahn, 2008).

Die Nierenrinde in der menschlichen Niere ist etwa einen Zentimeter (cm) dick und umfasst unter anderem Nierenkörperchen, Nierengefäße sowie Abschnitte des Tubulussystems (Drenkhahn, 2008). Das Mark kann in ein äußeres, mit Außenstreifen und Innenstreifen, sowie ein inneres eingeteilt werden. In die Rinde ragende Markstrahlen weisen die gleiche Tubuluskomposition wie der Außenstreifen auf (Drenkhahn, 2008). Die Einteilung der Niere ist in **Abbildung 1.** dargestellt.

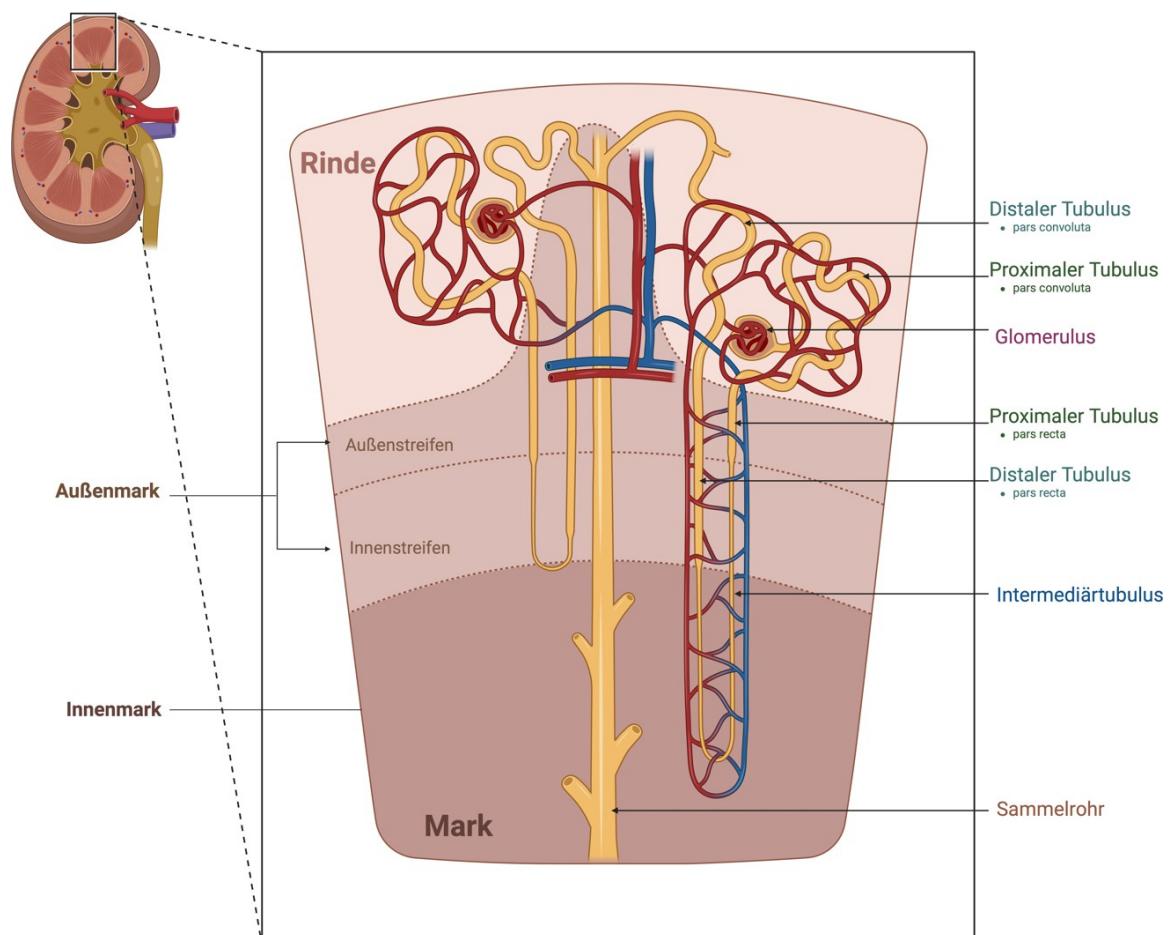


Abbildung 1. Schematische Darstellung und Einteilung der Niere und des Nephrons. Eine ausführliche Erläuterung ist den umliegenden Textabschnitten zu entnehmen. “Created with BioRender.com”. Agreement Number: WU26W5UKIH.

Eine der wichtigsten Funktionen der Niere ist die Bildung des Harns. Im Kapillarsystem des Nierenkörperchens, das auch als Glomerulus bezeichnet wird, erfolgt die Filtration des Blutplasmas zu einem proteinfreien Ultrafiltrat, das auch als Primärharn bezeichnet wird. Der durchschnittliche renale Plasmafluss beträgt 600 ml/Minute. Die glomeruläre Filtrationsrate wird dadurch definiert, dass pro Minute in den Glomeruli beider Nieren 120 ml Primärharn pro $1,73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche physiologischerweise entstehen. Dem Blut wird ein Fünftel seines Plasmawassers entzogen, was die besondere Bedeutung des Glomerulus für die Funktion der Niere untermauert (Hans-Christian Pape, 2014).

Wir werden im folgenden Abschnitt näher auf den histologischen Aufbau der Strukturen und ihrer jeweiligen physiologischen Funktionen eingehen. In **Abbildung 1.** und **Abbildung 2.** sind die beschriebenen Strukturen schematisch dargestellt.

Das Nierenkörperchen ist aus dem genannten Kapillarknäuel und der Bowman-Kapsel aufgebaut. Letztere besteht aus einem viszeralen und einem parietalen Blatt. Dazwischen befindet sich das Lumen der Bowman-Kapsel, auch Harnraum genannt (Drenkhahn, 2008). Jedes Nierenkörperchen hat einen Gefäßpol, an dem eine afferente Arteriole zum Nierenkörperchen führt, sich in ein Kapillarknäuel verzweigt und dann zu einer efferenten Arteriole wird, sowie einen Harnpol, an dem das gewonnene Ultrafiltrat in das Tubulussystem abfließt (Drenkhahn, 2008). Zwischen den zu- und abführenden Arteriolen befinden sich extraglomeruläre Mesangiumzellen, juxtaglomeruläre Zellen sowie die Macula densa Zellen im Bereich des dem Glomerulus zugewendeten distalen Tubulus (Hans-Christian Pape, 2014). Am Gefäßpol geht das parietale- in das -viszerale Blatt der Bowman Kapsel über. Dort wird die parietale Basalmembran zur viszeralen glomerulären Basalmembran (GBM). Sie verläuft zwischen den Podozyten und den Kapillaren und umhüllt auch intraglomeruläre Mesangiumzellen. Diese dünne Extrazellulärmatrix verleiht dem Kapillarknäuel mechanische Stabilität und spielt für die Filtrierung eine wichtige Rolle (Drenkhahn, 2008, Hans-Christian Pape, 2014). Das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel besteht aus Zellfortsätzen der Podozyten und liegt den Kapillaren an. Die Podozyten haben einen Zellkörper und zahlreiche miteinander verzahnte Fortsätze, mit denen sie an der GBM verankert sind (Drenkhahn, 2008). Dabei werden Schlitze freigelassen, die mit einer nephrinhaltigen Schlitzmembran überbrückt sind, die für den Filtrationsvorgang wichtig sind (Hans-Christian Pape, 2014). Die Blut-Harn-Schanke besteht aus Podozyten, Endothelzellen der Kapillaren und der GBM (Drenkhahn, 2008, Hans-Christian Pape, 2014). Die Filtrationsvorgänge erklären sich aufgrund von Ladungs- und Größenselektivität. Das parietale Blatt der Bowman-Kapsel besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel und einer Basalmembran an der Außenseite. Es begrenzt den Kapselraum zum Nierenparenchym hin (Drenkhahn, 2008). Das Tubulussystem der Niere ist aus feinen Kanälchen mit einschichtigem Epithel aufgebaut. Bei Durchfluss des Primärharns wird durch unterschiedliche substanzspezifische Resorptionsvorgänge der endgültige Harn entstehen

(Drenkhahn, 2008). Nierenkörperchennah findet man Abschnitte des gewundenen proximalen Tubulus (pars convoluta), der zu Beginn der Henle Schleife als gerader Anteil (pars recta) in den äußeren Streifen des Nierenmarks absteigt (Hans-Christian Pape, 2014). Im proximalen Tubulus werden 95% des filtrierten Bikarbonats resorbiert. Auch mehr als die Hälfte des filtrierten Natrium (Na^+), Chlorid (Cl^-) und Wassers, sowie der Hauptteil der Aminosäuren und die filtrierte Glucose werden rückresorbiert (Drenkhahn, 2008). Der proximale Tubulus setzt sich in den intermediären Tubulus fort, der in Gänze zu dem dünnen Teil der Henle-Schleife gehört. Die haarnadelförmige Henle-Schleife dient der Erzeugung eines osmotischen Gradienten als Voraussetzung für die Konzentrierung des Urins und besteht aus geradem Teil des proximalen, intermediär- und geradem Teil des distalen Tubulus (Hans-Christian Pape, 2014). Der Intermediärtubulus setzt sich in den geraden Anteil (pars recta) des distalen Tubulus fort, der später als gewundener Anteil (pars convoluta) in der Nierenrinde zu dem zugehörigen Nierenkörperchen zurück kommt (Drenkhahn, 2008). An dieser Stelle befinden sich auch die Macula densa, welche spezielle Zellen beherbergt, die für die Messung der Cl^- -Konzentration verantwortlich sind und gegebenenfalls eine Anpassung im Sinne des sogenannten tubuloglomerulären Feedbacks veranlassen kann (Drenkhahn, 2008).

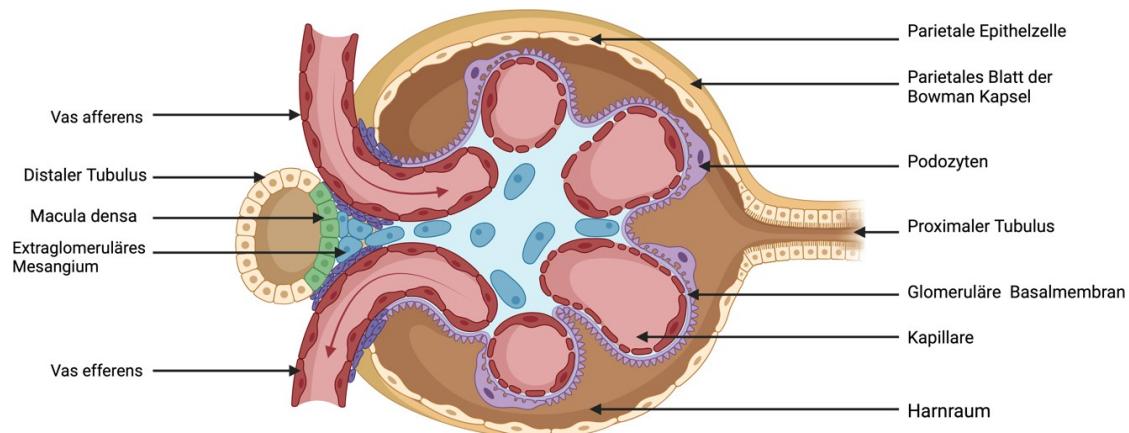


Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Nierenkörperchens. Eine ausführliche Erläuterung ist den umliegenden Textabschnitten zu entnehmen. Auf der linken Seite des Glomerulus befindet sich der Gefäßpol, auf der rechten der Harnpol. „Created with BioRender.com“. Agreement Number: KR26Y1F9U8.

Der distale Tubulus ist weitestgehend wasserundurchlässig (Drenkhahn, 2008). Über ein Verbindungstubulus wird der Primärharn dem Sammelrohr zugeführt. Im Umkehrbild sammelt ein einziges Sammelrohr Harn von durchschnittlich elf unterschiedlichen Nephronen. Die zahlreichen so entstehenden Sammelrohre laufen von ihrem Ursprung in der Rinde durch das Mark und vereinigen sich an der Papille, wo sie als Ductus papillaris in das Nierenbecken münden (Drenkhahn, 2008). Die oben angesprochene Einteilung des Marks beruht auf der Zusammensetzung der jeweils beinhalteten Tubulusabschnitte. Im Außenstreifen des äußeren Marks befinden sich Sammelrohre, Verbindungs-

und Intermediärtubuli sowie die geraden Abschnitte der proximalen und distalen Tubuli. Die Markstrahlen stammen – wie ihr Name es erahnen lässt – aus dem Mark, und ziehen sich als längsgestreckte Strukturen durch die Rinde (Drenkhahn, 2008). Im Innenstreifen lassen sich die gleichen Strukturen finden, ausgenommen die proximalen Tubuli. Im Innenmark wird die Anzahl der Strukturen immer spärlicher, je tiefer man in Richtung des Nierenbeckens geht (Drenkhahn, 2008). Hier lassen sich vor allem Intermediärtubuli und Sammelrohre finden, wobei letztere aus zwei Zelltypen bestehen und für die Salz und Wasserregulierung wichtig sind (Drenkhahn, 2008). Die Hauptzellen besitzen an der luminalen Seite Aquaporine-2 (AQP2) und -3 (AQP3), die unter Einfluss des antidiuretischen Hormons (ADH) eingebaut werden. Unter Aldosteroneinfluss werden an der luminalen Plasmamembranseite Na^+ und Kalium (K^+) Kanäle eingebaut. Basal, findet man in den Membranefaltung Na^+/K^+ -ATP-Asen (ATP = Adenosintriphosphat) (Drenkhahn, 2008). Im inneren Mark bestehen die Sammelrohre fast nur noch aus Hauptzellen, die bei der Harnkonzentrierung eine entscheidende Rolle spielen (Drenkhahn, 2008). Der zweite Zelltyp, die Schaltzellen, – auch interkalierende Zellen (IC-Zellen) – genannt, sind für den Säure-Base-Haushalt von Relevanz. Sie können in zwei mitochondrienreiche Zelltypen eingeteilt werden (Drenkhahn, 2008). Die Typ-A Zellen sezernieren Säure und besitzen Protonen (H^+)-Pumpen in der luminalen Membran. Sie kommen im gesamten Verbindungstubulus und im Sammelrohr vor, mit Ausnahme des inneren Marks (Drenkhahn, 2008). Die Typ-B Zellen sezernieren Bikarbonat und besitzen H^+ -Pumpen in der basolateralen Membran. Sie kommen im Verbindungstubulus sowie in kortikalen Abschnitten des Sammelrohrs vor (Drenkhahn, 2008, Rao *et al.*, 2019).

3.4 Transient Receptor Potential-Kanäle

Im Jahre 2021 wurde der Nobelpreis für Physiologie und Medizin zwei Wissenschaftlern für ihre Forschung im Zusammenhang mit den Transient Receptor Potential (TRP)-Kanälen verliehen, was die Tragweite und Bedeutung der Forschung in diesem Themengebiet unterstreicht (Earley *et al.*, 2022, Fallah *et al.*, 2022). Ein verbessertes Verständnis der physiologischen und pathologischen Funktionen dieser Kanäle wurde erzielt (Kaneko und Szallasi, 2014, Pedersen *et al.*, 2005, Venkatachalam und Montell, 2007). Dennoch bleiben einige Aspekte zu erforschen und es gibt Unklarheiten, über die berichtet wurde: die Möglichkeit der Bildung von heteromultimeren Kanälen (Hofmann *et al.*, 2002), die Verteilung der TRPC3-Kanäle in der Niere (Khayyat *et al.*, 2020), oder das mikromolekulare Verständnis der Aktivierung- und Funktionsweise der Kanäle, um nur einige Beispiele zu nennen.

Die TRP-Superfamilie steht heutzutage für eine breite Gruppe an Ionenkanälen. Basierend auf der Grundlage der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen (Kaneko und Szallasi, 2014) lassen sich folgende Untergruppen unterscheiden: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM

(melastatin), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPN (Drosophila NO-MPC) (Englisch *et al.*, 2023a, Kaneko und Szallasi, 2014, Nilius und Owsianik, 2011) und TRPY (Fallah *et al.*, 2022, Venkatachalam und Montell, 2007). Aufgrund topologischer und sequenzieller Unterschiede kann die TRP-Familie in zwei weitere Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPN und ist morphologisch dem ursprünglichen Drosophila TRP-Kanal am ähnlichsten. Die zweite Gruppe besteht aus TRPP und TRPML (Venkatachalam und Montell, 2007). Durch ihre Beteiligung an der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie chronischen Schmerzen (TRPV1), Diabetes (TRPV1, TRPM4), chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (chronic obstructive pulmonary disease = COPD; TRPV4), kardialer Hypertrophie (TRPC6), Morbus Alzheimer (TRPM7) oder Krebs (TRPC6, TRPV2 und TRPM8), bieten TRP-Kanäle pharmakologische Angriffspunkte für die Behandlung dieser Krankheiten (Fallah *et al.*, 2022, Kaneko und Szallasi, 2014). Der Begriff der „TRP-Channelopathien“ bezeichnet Mutationen in TRP-Genen, die zu vererbbarer Krankheiten führen können. Beispiele hierfür sind die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS), in welche TRC6, TRPM6 und TRPP2 involviert sind (Pedersen *et al.*, 2005), oder die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) (Kaneko und Szallasi, 2014, Nilius und Owsianik, 2010).

Zwei Fruchtfliegen der Gattung *Drosophila Melanogaster* wurden im Jahre 1969 durch Wissenschaftler namens Cossens und Manning untersucht. Im Elektroretinogramm wies die Wildtyp Fliege unter starker Beleuchtung eine anhaltende Depolarisation auf. Im Gegensatz hierzu wies die mutierte Fruchtfliege unter gleichen Bedingungen nur eine vorübergehende, „transiente“ Depolarisierung auf (Chen *et al.*, 2020, Cossens und Manning, 1969). Sie wurde „transient receptor potential mutant“ (*trp*) genannt (Minke *et al.*, 1975). Die Klonierung des *trp*-Gens wurde im Jahre 1989 durch zwei unabhängige Forschergruppen erreicht, namentlich Wong *et al.* und Montell and Rubin (Chen *et al.*, 2020, Montell und Rubin, 1989, Wong *et al.*, 1989). Nachdem die Vermutung aufgestellt wurde, dass das *trp*-Gen für ein Kationenkanal kodiert (Montell und Rubin, 1989), konnte im Jahr 1992 experimentell nachgewiesen werden, dass die TRP-Proteine für einen lichtsensitiven Kationenkanal in den Photorezeptorzellen der Fruchtfliege stehen (Hardie und Minke, 1992). So wurde die TRP-Superfamilie benannt. Die TRP-Kanäle kommen in zahlreichen Geweben und Zelltypen, unter anderem in Menschen, Würmern, Mäusen, Fruchtfliegen und Zebrafischen vor (Asghar und Tornquist, 2020, Venkatachalam und Montell, 2007). Sie befinden sich meist in Zellmembranen, wo sie für den transzellulären Transport von Ionen wie Magnesium (Mg^{2+}) oder Calcium (Ca^{2+}) zuständig sind (Fallah *et al.*, 2022, Nilius und Owsianik, 2011, Venkatachalam und Montell, 2007, Zhang *et al.*, 2018). Um einen Kanal zu bilden, interagieren vier TRP-Untereinheiten zu einem funktionalen Tetramer (Moran, 2018, Rosasco und Gordon, 2017). Sie spielen bei der Wahrnehmung sinnesbezogener Reize (olfaktorisch, visuell, auditiv, gustativ), Temperatur sowie Nozizeption eine Rolle (Koivisto *et al.*, 2022, Nilius und Owsianik, 2011, Venkatachalam und Montell, 2007). Zusätzlich

zu den traditionellen Sinnesreizen haben TRP-Kanäle auch wichtige homöostatische Funktionen. Sie sind in der Regulation des osmotischen Gleichgewichts und bei der Muskelkontraktion beteiligt (Nilius und Owsianik, 2011). Die vielseitigen Aktivierungsmechanismen von TRP-Kanälen können unter anderem bereits genannte physiologische Konsequenzen und Aktivierung von Signalkaskaden nach sich ziehen, die je nach Zelltyp und TRP-Vertreter variieren (Khayyat *et al.*, 2020, Venkatachalam und Montell, 2007). Die Depolarisation der Zellmembran oder Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration können auf regulatorischer Ebene ebenso eine Rolle spielen (Nilius und Owsianik, 2011, Venkatachalam und Montell, 2007).

3.5 Transient Receptor Potential Canonical-Kanäle

Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)-Kanäle sind nicht selektive Kationenkanäle, die für mono- und -divalente Kationen, darunter bevorzugt für Na^+ , Ca^{2+} und K^+ permeabel sind (Asghar und Tornquist, 2020, Feng, 2017). Die Bezeichnung "klassisch" oder "kanonisch" (= „classical, canonical“), erhielten sie aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem ursprünglich in der Fruchtfliege entdeckten TRP-Protein (Venkatachalam und Montell, 2007, Wang *et al.*, 2020). Im menschlichen Organismus sind sechs der sieben Vertreter vorhanden (TRPC1-7), wobei TRPC2 als Pseudogen eine Ausnahme darstellt (Asghar und Tornquist, 2020, Venkatachalam und Montell, 2007). Aufgrund ihrer funktionellen Merkmale und Aminosäuresequenzen können die TRPC-Kanäle in weitere Untergruppen unterteilt werden, darunter TRPC1, TRPC4/5 und TRPC3/6/7 (Dryer *et al.*, 2019, Venkatachalam und Montell, 2007).

Der Schwerpunkt dieser Abhandlung liegt auf TRPC3.

3.6 Transient Receptor Potential Canonical-3

3.6.1 Vorkommen und Bedeutung

TRPC3 wurde in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, wobei besonders hohe Expressionswerte im Gehirn festgestellt wurden (Hartmann *et al.*, 2008, Lichtenegger und Groschner, 2014, Zhu *et al.*, 1996). Bei Menschen mit pulmonaler Hypertonie wurden TRPC3-Kanäle sowohl im Herzen als auch in Lungenzellen identifiziert (Goel *et al.*, 2007b, Wang *et al.*, 2020). TRPC3 wurde beispielsweise auch in Leber, Gallenblase, Nebenschilddrüse, Pankreas und Innenohr von menschlichen Proben nachgewiesen (Englisch *et al.*, 2024, Englisch *et al.*, 2023b, Kaul *et al.*, 2023, Kirstein *et al.*, 2024). In Nieren von Nagetieren wurden TRPC3-Kanäle ebenso nachgewiesen (Goel *et al.*, 2006, Goel *et al.*, 2007a). Im proximalen Tubulus und im Sammelrohr schienen sie exprimiert zu sein (Awuah Boadi *et al.*, 2021, Goel *et al.*, 2006, Ibeh *et al.*, 2019, Khayyat *et al.*, 2020). Berichte über die menschliche Expression von TRPC3 in der Niere sind jedoch selten (Letavernier *et al.*, 2012).

Im Hinblick auf die Niere konzentrieren wir uns im folgenden Abschnitt auf die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Rolle der TRPC3-Kanäle. Die genauen mikromolekularen Mechanismen, welche der Funktionsweise von TRPC3 zugrundeliegen, werden immer noch intensiv erforscht. TRPC3-Kanäle sollen zur transzellulären Ca^{2+} -Rückresorption sowohl im proximalen Tubulus als auch im Sammelrohr beitragen (Englisch *et al.*, 2023a, Gombedza *et al.*, 2019). Ihnen wird eine Rolle in der Wasserhomöostase zugeschrieben. In der Tat scheinen sie die Osmosensitivität der Hauptzellen im Sammelrohr zu vermitteln und eine Rolle bei der Vasopressin-induzierten Membranverschiebung von AQP2 zu spielen. AQP2 ist ein Protein, das die Permeabilität von Wasser durch Zellmembranen erleichtert. Somit kann die Osmolarität des Urins angepasst werden, um die Wasserhomöostase im Körper aufrechtzuerhalten. Dieser Mechanismus spielt für die Regulation des Wasserhaushalts zur Aufrechterhaltung eines normalen Flüssigkeitsgleichgewichts im Körper eine wichtige Rolle (Englisch *et al.*, 2023a, Goel und Schilling, 2010).

Forschungsergebnisse legen nahe, dass TRPC3-Kanäle an der Entstehung der ADPKD beteiligt sind. Eine nachteilige Rolle wird ihnen in diesem Zusammenhang zugeschrieben (Englisch *et al.*, 2023a, Miyagi *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass eine Hochregulierung von TRPC3 in ADPKD-Zuständen vorliegt (Li *et al.*, 2019).

Die Nephrokalzinose ist ein heterogenes und komplexes Krankheitsbild (Sayer *et al.*, 2004). Meistens liegt der Nephrokalzinose eine Hyperkalziurie, also einen erhöhten Ca^{2+} -Gehalt der Niere zugrunde, der sich funktionell, mikroskopisch oder makroskopisch (radiologisch sichtbar) durch Ablagerungen von Kristallen aus Kalziumoxalat oder Kalziumphosphat bemerkbar macht (Oliveira *et al.*, 2016, Sayer *et al.*, 2004, Vaidya *et al.*, 2024). Diese können sich interstitiell (selten kortikal, meistens medullär (Oliveira *et al.*, 2016)) oder tubulär ablagern (Vervaet *et al.*, 2009). Diese Zustände können zu unterschiedlichen Graden von Nierenschädigung führen (Sayer *et al.*, 2004). Die Hyperkalziurie kann renale oder extrarenale Ursachen haben. Eine breite Palette erworbener und erblicher Krankheiten können dafür ursächlich sein (Linda Shavit, 2015). Die häufigste erworbene Ursache der Hyperkalzämie ist der primäre Hyperparathyreoidismus (Oliveira *et al.*, 2016). Der Präsenz von TRPC3 wurde ein protektiver Effekt im Verlauf chronischer Nierenerkrankungen im Zusammenhang mit Nephrokalzinose und Nephrolithiasis zugeschrieben (Awuah Boadi *et al.*, 2021). In Versuchen mit TRPC3-Knockout-Mäusen führte der Mangel an TRPC3 zu Hyperkalziurie (Ibeh *et al.*, 2019). Insbesondere begünstigte dieser Mangel im proximalen Tubulus dessen Schädigung und Kristallbildung, was wiederum Verkalkung, Fibrose und Entzündungen hervorrief. Entsprechende Zusammenhänge verdeutlichen die kritische Rolle von TRPC3 im Ca^{2+} -Haushalt.

Diese Zusammenhänge unterstreichen die Bedeutung von TRPC3 als wichtigen pharmakologischen Angriffspunkt in der Therapie verschiedener Krankheiten, die in chronischer Nierenerkrankung

enden können und somit eine große Relevanz haben, insbesondere der Nephrokalzinose. Ein verbessertes Verständnis der Rolle von TRPC3 könnte dazu beitragen, die Therapie bestimmter Krankheiten in Zukunft zu verbessern (Tiapko und Groschner, 2018). In diesem Zusammenhang werde ich die TRPC3-Expression in Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe untersuchen und mit „gesunden“ Proben die aus dem Operationssaal (= „OP-Proben“) stammen, vergleichen.

3.6.2 Aufbau

Der gemeinsame Aufbau der TRPC-Ionenkanäle besteht aus vier Monomeren in vierfach-Symmetrie (Chen *et al.*, 2020, Duan *et al.*, 2019). Die vier Untereinheiten könnten entweder aus gleichen oder aus verschiedenen TRPC-Monomeren bestehen. Je nachdem, welche TRPC-Vertreter verbunden sind, könnte den Kanälen besondere Eigenschaften bezüglich der Aktivierungswege zugeschrieben werden. Ob TRPC-Kanäle überhaupt heteropolymerisieren können, ist jedoch umstritten (Hofmann *et al.*, 2002).

Ein TRPC-Monomer besteht, basierend auf seine Sequenzmerkmale, aus einer Transmembrandomäne und zwei intrazellulären Domänen (Tang *et al.*, 2018). Im nächsten Abschnitt werden wir zunächst den Aufbau der Transmembrandomäne und anschließend den der intrazellulären Domänen von TRPC3 erläutern. Eine schematische Darstellung von dem TRPC3-Kanal befindet sich in **Abbildung 3**.

Die Transmembrandomäne von TRPC3 besteht aus sechs α -Helices (S1–S6), die durch Verbindungsstücke miteinander verbunden sind. Letztere werden auch „Linker“ genannt (Tang *et al.*, 2018). Fan *et al.* untersuchte in der Cryo-Elektronenmikroskopie ein Modell eines humanen TRPC3-Kanals in der Auflösung 3.3 Ångström (Fan *et al.*, 2018), woraus sich wichtige Einsichten in die räumliche Anordnung des Kanals ergaben. Die kationenpermeable Pore wird durch die jeweiligen Verbindungsstücke zwischen S5 und S6 der vier Einheiten des Tetramers gebildet (auch „P-Domain“ = „Porendomäne“ genannt) (Englisch *et al.*, 2023a). Das Erzeugen eines negativ geladenen elektrostatischen Umfeldes durch Aminosäurereste in der Nähe dieser Stelle, wirke wie ein Filtersystem auf Kationen. Durch einen ähnlichen Mechanismus würden sie dann in das Zytosol weitergeleitet werden, da andere Aminosäurereste diese negative Ladung aufrechthalten (Fan *et al.*, 2018). Ein struktureller Vergleich konnte durch eine Überlagerung von TRPC3 mit anderen TRPC-Kanälen erreicht werden (Duan *et al.*, 2019). Die Transmembrandomäne von TRPC3 ähnelt insgesamt der anderer TRPCs. Die bemerkenswert große Länge von S3 unterscheidet sie jedoch maßgeblich von anderen TRPCs. Diese bildet extrazellulär eine taschenähnliche Domäne, die funktionell wichtig ist, indem sie unter anderem als Sensor für mechanische Stimuli dienen könnte (Fan *et al.*, 2018, Khayyat *et al.*, 2020). Zusammen mit dem „S1-S2-Linker“ und dem „S3-S4-Linker“ bildet sie eine extrazelluläre Domäne (ECD), deren Funktion jedoch noch weitestgehend ungeklärt ist (Fan *et al.*, 2018,

Vazquez *et al.*, 2004). Zwei Lipidbindestellen wurden in der TRPC3 Struktur erkannt. Diese stellen möglicherweise die direkten Bindungsstellen für Diacyglycerol (DAG) dar (Fan *et al.*, 2018, Khayyat *et al.*, 2020). Eine erste Lipidbindestelle wurde vor S1 beschrieben. Eine zweite wurde in der Nähe der ionenleitenden Pore zwischen S5 und S6 identifiziert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Porendomäne könnte letztere auch zur Strukturerhaltung des Kanals beitragen. Zwischen S1 und S2 wurde eine Glykosylierungsstelle identifiziert, die auf die Aktivität des Kanals einen Einfluss haben könnte (Fan *et al.*, 2018).

Die zytosolischen Carboxy- und Aminotermini weisen einen speziellen Aufbau auf, der funktional relevant ist und im nächsten Abschnitt näher erläutert wird (Asghar und Tornquist, 2020).

Am Carboxyterminus schließen sich mehrere Strukturen an S6. Darunter befindet sich eine TRP-Domäne, die bei der Bildung von Isoformen eine Bindungsstelle für andere TRP-Kanäle darstellt (Asghar und Tornquist, 2020, Englisch *et al.*, 2023a). Sie besteht strikt gesehen aus zwei Helices (Fan *et al.*, 2018). Weiterhin schließt sich an die TRP-Domäne eine Verbindungshelix an sowie eine gewundene Domäne, die auch „coiled-coil“ Domäne genannt wird (Chen *et al.*, 2020). Im Anschluss findet sich ein Calmodulin- und ein IP₃-Bindungsort (Inositol-1,4,-5-triphosphat) (auch CIRB genannt: calmodulin/IP₃ receptor binding site). Diese können die Aktivierung und die Inhibierung des Kanals regulieren (Asghar und Tornquist, 2020, Birnbaumer, 2009, Englisch *et al.*, 2023a, Venkatachalam und Montell, 2007).

Eine gewundene Domäne verbindet die Transmembrandomäne mit mehreren endständigen Ankyrin-Wiederholungen (ARD = Ankyrin repeated domain) am Aminoterminus (Asghar und Tornquist, 2020, Chen *et al.*, 2020, Venkatachalam und Montell, 2007). Diese Strukturen erleichtern Proteininteraktionen und sind an der Regulierung der Kanalfunktion durch Tetramerisierung der Untereinheiten beteiligt (Englisch *et al.*, 2023a, Lepage *et al.*, 2006).

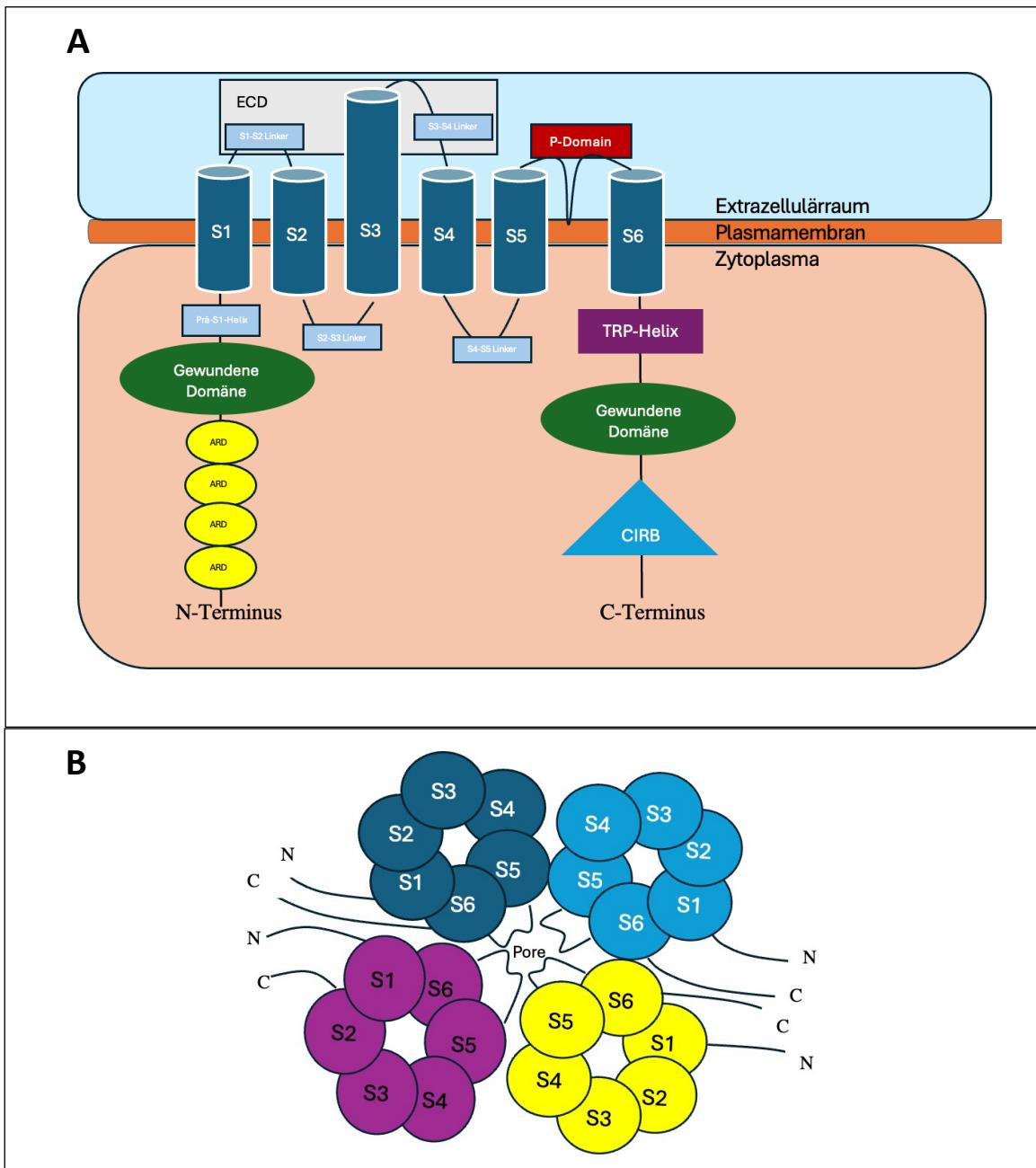


Abbildung 3. Schematischer Aufbau von TRPC3. (A) In Anlehnung an Fan *et al.* (Fan *et al.*, 2018). Schematische Darstellung eines TRPC-Monomers. Eine ausführliche Erläuterung ist den vorausgehenden Textabschnitten zu entnehmen. ECD = Extrazellulärdomäne, ARD = Ankyrin repeated domain, P-Domain = Poren-domäne. (B) In Anlehnung an Englisch *et al.* (Englisch *et al.*, 2023a). **Schematische Bildung eines Kanals aus vier TRPC-Monomeren** (in jeweils unterschiedlichen Farben gekennzeichnet) in der Ansicht von oben. Die kationpermeable Pore ist in der Mitte durch die Verbindungshelices zwischen S5 und S6 gebildet. „C“ und „N“ bezeichnen die jeweiligen Termini (Carboxy- und Aminoterminus).

3.6.3 Regulierung

Im folgenden Abschnitt werden wir uns näher mit den vielfältigen Öffnungs- und Aktivierungsmechanismen der TRPC3-Kanäle befassen. In den vergangenen Jahrzehnten hat sich in Bezug auf dieses Thema vieles verändert. Einige Aspekte sind nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussionen. Die Frage, welche TRPC-Vertreter durch welche Mechanismen geöffnet werden, konnte bis

heute nicht vollständig geklärt werden, so dass eine strikte Einteilung derzeit nicht möglich ist. In Zukunft ist zusätzliche Forschungsarbeit in diesem Bereich erforderlich, um das mikromolekulare Verständnis zu verbessern (Chen *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020).

TRPC3-Kanäle können als rezeptorgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, auch „Receptor Operated Calcium Entry“ (ROCE) genannt, fungieren (Okada *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2020, Zhu *et al.*, 1998). Die entsprechende schematische Darstellung befindet sich in **Abbildung 4**. Die in diesem Prozess involvierten $\text{G}_{11/\text{q}}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren bestehen auf intrazellulärer Seite aus drei Untereinheiten (α , β , γ). Bei extrazellulärer Bindung eines Liganden kommt es zur Strukturveränderung des Rezeptors selbst. Daraufhin trennen sich die Untereinheiten voneinander. Die α -Untereinheit aktiviert die Phospholipase-C (PLC), welche über Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat (PIP_2) zu DAG und IP_3 Produktion führt. TRPC3 sowie andere Vertreter (Storch *et al.*, 2017) können durch das lipophile, in der Zellmembran verbleibende DAG direkt aktiviert werden. Bei der Aktivierung von Rezeptoren mit gekoppelten Tyrosinkinasen kommt es durch Aktivierung einer PLC in der Folge zur gleichen beschriebenen Signalkaskade. Durch Bindung des hydrophilen IP_3 an IP_3 -Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER), kommt es zu einer IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Freigabe aus dem ER (Chen *et al.*, 2020, Englisch *et al.*, 2023a, Rassow, 2016). Der Begriff des kapazitativen Calcium Einstroms, auch „Store Operated Calcium Entry“ (SOCE) genannt, fiel im Jahr 1986 durch Putney Jr. als mögliche Erklärung für die Wiederauffüllung der zytosolischen Ca^{2+} -Speicher nach Entleerung des ER (Wang *et al.*, 2020). TRPC-Kanäle galten lange Zeit als die wichtigsten molekularen Vertreter für diesen Mechanismus. Sie würden sich als Ca^{2+} -permeable Kanäle an der Plasmamembran, als Reaktion auf die Entleerung des ER öffnen und einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bewirken. Diese Theorie wurde jedoch revidiert. Nach aktuellem Wissensstand wird angenommen, dass in der Plasmamembran des ER lokalisierte Stroma-Interaktionsproteine (Stroma Interaction Molecule = STIM) eine Ca^{2+} -Depletion wahrnehmen können (Liao *et al.*, 2007). Diese interagieren dann mit Orai1 Proteine (Orai1 = Kalziumfreisetzung-aktiviertes Kalziumkanalprotein 1), welche Bestandteile von „Calcium Release Activated Calcium Channels“, auch „ I_{CRAC} “ Kanäle genannt, sind. Diese würden einen Ca^{2+} -Einfluss in die Zelle veranlassen (Liao *et al.*, 2007, Niemeyer, 2017), wodurch intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher wieder aufgefüllt werden (siehe **Abbildung 4**) (Prakriya und Lewis, 2015). Eine Beteiligung von TRPC-Kanälen an SOCE wird kontrovers diskutiert (Lopez *et al.*, 2020). Manche Forschungsgruppen unterstützen die Theorie einer speicherunabhängigen TRPC3 Aktivierung (Zitt *et al.*, 1997), andere widersetzen sich dem rapide und erkannten eine Aktivierung durch SOCE-Mechanismus (Kiselyov *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass TRPC-Kanäle unter besonderen Umständen, zum Beispiel bei Verbindung mit anderen Proteinen wie dem STIM-Orai1-Komplex, an SOCE beteiligt sind (Liao *et al.*, 2007, Lopez *et al.*, 2020, Woodard *et al.*, 2010, Yuan *et al.*, 2009). Studien weisen ebenso auf eine eventuelle

expressionsabhängige SOCE-Aktivierung hin. Bei TRPC3 Überexpression werde ein speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom vermittelt (Kwan *et al.*, 2004).

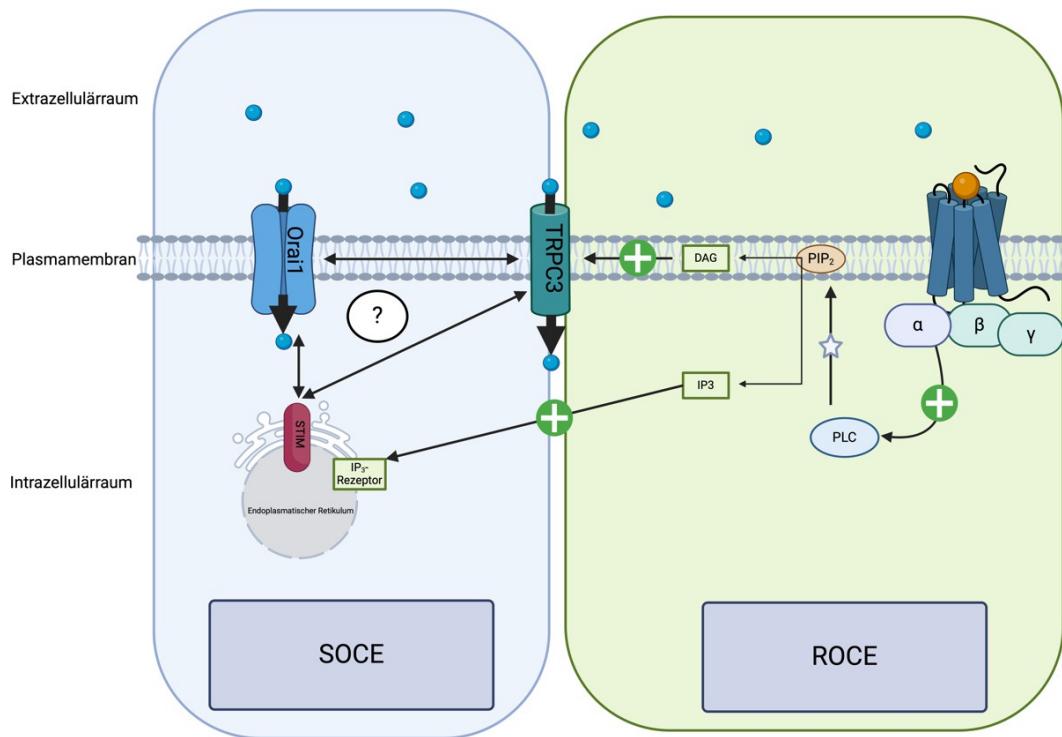


Abbildung 4. Schematische Darstellung der ROCE- und SOCE-Aktivierung. Das Fragezeichen auf der linken Seite stellt die Unsicherheit über die Aktivierung von TRPC3 durch einen solchen Mechanismus dar. Die blauen Kreise stellen Ionen dar. IP₃-Rezeptor = Inositol-1,4,5-triphosphat, DAG = Diacylglycerol, PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PLC = Phospholipase C, Orai 1 = Kalziumfreisetzung-aktivierte Kalziumkanalprotein 1, STIM = Stroma Interaction Molecule Proteine, SOCE = Store Operated Calcium Entry, ROCE = Receptor Operated Calcium Entry. „Created with BioRender.com“. Agreement Number: EA26Y0ZXJH.

Andere Zwischenprodukte des PLC-Signalweges scheinen ebenso eine Rolle zu spielen. Die Rolle von PIP₂ ist jedoch komplex und wurde noch nicht vollständig geklärt (Chen *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020). Am Carboxyterminus des Kanals befindet sich die Calmodulin/IP₃-Bindungsstelle. TRPC3 scheint durch Bindung des Ca^{2+} -Calmodulin Komplexes inhibiert zu werden (Kiselyov *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2020).

Eine Aktivierung von TRPC-Kanälen in einer zyklischen adenosin monophosphat (cAMP)-abhängigen Weise wurde ebenso suggeriert. Durch Aktivierung von G_{i/o}- oder G_s-Protein gekoppelte Rezeptoren und die folgende Anpassung der Adenylatzyklase, die sich in eine Modulierung der Proteinkinase A und somit einer Veränderung der cAMP-Konzentration widerspiegelt, können TRPC-Kanäle ebenso aktiviert werden (Gualdani und Gailly, 2020). Posttranskriptionale Modifikationen beeinflussen die Aktivität von TRPC3. Erhöhte TRPC3-Kanalaktivität wurde durch Src-Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung des Aminoterminus des Kanals erreicht (Kawasaki *et al.*, 2006). Proteinkinase C induzierte Phosphorylierung des Carboxyterminus führte zu einer erniedrigten Aktivität

(Trebak *et al.*, 2005). Aktivierung von TRPC3 durch mechanischen Stress wurde berichtet (Dryer *et al.*, 2019).

Die pharmakologische Inhibierung von TRPC3 konnte durch verschiedene chemische Verbindungen erreicht werden. Ein Aktivator der Proteinkinase G (PKG), eine pyrazol Verbindung (pyr3) (Kiyonaka *et al.*, 2009), sowie ein Modulator der PKG (Kwan *et al.*, 2004), stellen mögliche pharmakologische Angriffspunkte des TRPC3-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle dar.

3.7 Ziele der Arbeit

Nach Einführung in den gegenwärtigen Forschungsstand möchte ich die Ziele dieser Arbeit wie folgt präzisieren:

I. Der immunhistochemische Nachweis von TRPC3 in tierischen Nierenproben:

Aufgrund von Unstimmigkeiten in der Literatur bezüglich der Verteilung von TRPC3 in tierischen Nieren oder Zellkulturen werden eigenständig immunhistochemische Färbungen mit folgender Fragestellung untersucht:

- Können bereits gewonnene Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Verteilung von TRPC3 in tierischen Nieren oder Zellkulturen bestätigt werden?

II. Der immunhistochemische Nachweis von TRPC3 in humanen Nierenproben:

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Verteilung von TRPC3 in der Niere wurden fast ausschließlich in Tiermodellen oder in Zellkulturen erreicht. Unklar bleibt jedoch, wie die Verteilung von TRPC3 in der menschlichen Niere ist und ob die bereits gewonnenen tierischen Erkenntnisse sich auf den Menschen übertragen lassen. Hierbei ist auch der unterschiedlichen Herkunft der menschlichen Proben Rechnung zu tragen. Es ergeben sich hiermit folgende Fragestellungen:

- Ist TRPC3 mittels immunhistochemischer Methoden im menschlichen Nierengewebe nachweisbar?
- Wie stellen sich Verteilung und Intensität der Signale in den unterschiedlichen anatomischen Strukturen dar?
- Bestehen hierbei Unterschiede zwischen fixiertem post-mortem Gewebe und im Operationsaal gewonnenem Nephrektomie-Gewebe?

III. Der immunhistochemische Nachweis von TRPC3 in pathologischen humanen Nierenproben:

- Wie beeinflusst die Pathologie der Nephrokalzinose die Expression von TRPC3 in der menschlichen Niere ?

4 Material und Methodik

4.1 Probenmaterial

Das Probenkollektiv setzt sich zusammen aus Proben von Körperspendern, Gewebe von Nephrektomien- also im Operationssaal gewonnene Proben lebender Patienten („OP-Proben“) und Proben von Nephrokalzinose-betroffenen Nieren. Ebenso wurden Nieren von Mäusen analysiert. Näheres zu Ethik, Patienteneigenschaften und Probenmaterial wird im kommenden Abschnitt erläutert.

4.1.1 Körperspender

4.1.1.1 Ethik

Die Referenznummer, die durch das Ethikvotum der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer im Saarland für die Untersuchung von Ionenkanälen in Körperspendergewebe des anatomischen Instituts vergeben wurde, lautet 163/20. Alle Versuche wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

4.1.1.2 Eigenschaften

Insgesamt wurden Proben von 16 Körperspendern entnommen. 13 Proben stammen aus formalinfixierten Körperspendern und wurden im Rahmen des Präparierkurses entnommen. Weitere drei Proben wurden an Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol (NEP)-fixierte Körperspender entnommen. Alle Körperspender stammen aus der Prosektur des anatomischen Instituts der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg. Mit den unterschiedlichen Fixierungen wurde ein Vergleich des Gewebes im Hinblick auf Unterschiede im Zusammenhang mit der Fixierungsart erzielt (Janczyk *et al.*, 2011).

Mithilfe einer Kennnummer (Journal Nummer), mit der jeder Körperspender versehen ist, kann die Anonymität gewahrt werden und auf Körperspendereigenschaften zurückgegriffen werden. Tabelle 1. zeigt die Eigenschaften des Körperspenderkollektivs. Die Patienten 1a bis 13a wurden formalinfixiert. Die Patienten 14a bis 16a wurden NEP-fixiert. Die Fixierung erfolgte bei allen Körperspendern zwischen den ersten und vierten Tag post-mortem.

Das mittlere Lebensalter der formalinfixierten Körperspendern ist 74.2 Jahre mit einer Standardabweichung (SD) von neun Jahren. Das mittlere Lebensalter der NEP-fixierten Körperspender ist 78.6 Jahre mit einer SD von drei Jahren. 50% der untersuchten Körperspender sind Frauen, 50% sind Männer.

Körperspender	Geschlecht	Todesalter	Todesgrund und Komorbiditäten
1a	Männlich	71	Respiratorische Insuffizienz, B-Zell Lymphom, Nasopharynxkarzinom
2a	Männlich	71	Nasopharynxkarzinom
3a	Weiblich	90	Pneumonie, Demenz, Apoplex
4a	Männlich	71	Malignes Melanom
5a	Männlich	64	Multiorganversagen, Ösophaguskarzinom, Peritonealkarzinose
6a	Männlich	90	Akut dekompensierte Rechtsherzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit, Vorhofflimmern, arterielle Hypertonie
7a	Weiblich	68	Respiratorische Insuffizienz, Sepsis und Leberversagen, metastasiertes kleinzelliges endokrines Karzinom
8a	Weiblich	86	Sepsis mit Multiorganversagen
9a	Männlich	59	Myogenes Herzversagen, koronare Herzkrankheit, metastasiertes Prostatakarzinom
10a	Männlich	80	Respiratorische Insuffizienz, Lungenembolie, Bronchialkarzinom
11a	Weiblich	69	Respiratorische Insuffizienz, schwere Pneumonie, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, seropositive rheumatoide Arthritis, Herzinsuffizienz, Mammakarzinom, chronische Niereninsuffizienz
12a	Weiblich	71	Multiorganversagen, respiratorische Insuffizienz, Herzinsuffizienz, Bronchialkarzinom, Vulvakarzinom
13a	Weiblich	75	Nierenversagen, Niereninsuffizienz/Exsikkose, Unterkieferknochenkarzinom mit Knochenmetastasen, Demenz
14a	Weiblich	75	Fortgeschrittenes Anal-Colon-Karzinom, Hyperthyreose, rheumatoide Arthritis
15a	Männlich	83	Maligne Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkt, koronare Herzkrankheit

16a	Weiblich	78	Herzstillstand, arterielle Verschlusskrankheit, arterielle Hypertonie
-----	----------	----	--

Tabelle 1. Eigenschaften des Körperspenderkollektivs.

4.1.1.3 Entnahmestelle

Die formalinfixierten Proben wurden an bereits präparierten Körperspendern entnommen. Die Proben wurden auf der ventralen Seite jeder Niere apikal und basal mithilfe einer Stanzbiopsie von neun Millimeter (mm) Diameter entnommen. Die Proben wurden nach der Entnahme in Einbettkästen gelegt.

Der Zugang zu den Nieren erfolgte bei den nicht präparierten NEP-fixierten Körperspendern von dorsal über einen lateral Flankenschnitt. Da bereits durchgeführte Untersuchungen keine Seitenunterschiede des Gewebes und der TRPC3-Expression zwischen rechter und linker Niere zeigten, wurden ausschließlich Proben von den rechten Nieren entnommen. Jeweils zwei Proben wurden auf der dorsalen Seite der Nieren entnommen, apikal und basal. Bei dem Körperspender 14a wurden die Proben aus der linken Niere entnommen, da er rechts keine aufwies. Die, durch die Entnahme verursachten Gewebedefekte wurden anschließend mittels Nahtmaterial verschlossen, und die Körperspender in einem pietätvollen Zustand zurückzulassen.

4.1.2 Nieren aus der Urologie

Mit dem Ziel, Körperspendergewebe und „vitales“ Gewebe im Hinblick auf Qualität und immunhistochemischer Färbung zu vergleichen, wurden Proben von Nephrektomien untersucht, die im Operationssaal gewonnen wurden. Diese Probengruppe wird als „OP-Proben“ bezeichnet. Die Bereitstellung dieser Proben erfolgte durch die Leiterin der klinisch-experimentellen Forschungsabteilung in der Klinik für Urologie und Kinderurologie in Homburg, Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker.

4.1.2.1 Ethik

Die Referenznummer, die durch das Ethikvotum der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer im Saarland dafür vergeben wurde, lautet 141/14. Alle Versuche wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

4.1.2.2 Eigenschaften

Die Proben stammen von Nephrektomien von an Nierenzellkarzinom betroffene Patienten. Andere Vordiagnosen konnten nicht eruiert werden. Das analysierte Nierengewebe wies eine ausreichende Distanz zum Karzinom auf und wurde durch erfahrene Kliniker als mikroskopisch frei von Tumorzellinfiltrationen und somit als „gesund“ freigegeben. Insgesamt wurden Proben von zehn unterschiedlichen Patienten erhalten, die maschinell ausgewertet werden konnten. Die

Probenbeschaffung erstreckte sich über mehrere Jahre, weshalb in der Publikation mit den Ergebnissen dieser Arbeit nur vier der Proben aufgeführt sind (Diebolt *et al.*, 2024). Die Ergebnisse der Färbungen, die nach Erscheinung der Publikation erzielt wurden, wurden in dem Ergebnisteil dieser Arbeit implementiert.

Das mittlere Lebensalter der Patienten beträgt 62 Jahre mit einer SD von zehn Jahren. Fünf Patienten sind Männer, vier sind Frauen. Bei einem Patienten fehlt die Angabe des Geschlechts. Die **Tabelle 2.** zeigt die Patienteneigenschaften.

Patient	Geschlecht	Alter
1b	Männlich	64
2b	Weiblich	62
3b	Männlich	71
4b	Männlich	43
5b	Weiblich	55
6b	Weiblich	72
7b	Weiblich	49
8b	Männlich	72
9b	Männlich	70
10b	Keine Angabe	Keine Angabe

Tabelle 2. Eigenschaften der Patienten, von welchen die Proben im Operationssaal gewonnen wurden („OP-Proben“).

4.1.2.3 Probenentnahme

Der genaue Ort der Probenentnahme konnte nicht eruiert werden.

4.1.3 Nieren aus der Pathologie – Nephrokalzinosen

Das Ziel dieser Untersuchung war, den Einfluss der Pathologie der Nephrokalzinose auf die anti-TRPC3-Färbung zu untersuchen und mit anderen humanen Gewebeproben zu vergleichen. Weitere Informationen hierzu stehen in **Kapitel 3.6.1**. Die Proben stammen aus dem Institut für Pathologie in Homburg und wurden von Herrn Prof. Dr. med. Matthias Wagner zur Verfügung gestellt.

Ursprünglich standen die Fragen im Raum, ob die durch die Nephrokalzinose induzierte Verkalkung einen Einfluss auf die Färbung nehmen könnte und ob eine Korrelation von Verkalkung und

immunhistochemischer Färbung (IHC) besteht. Um diese Fragen zu beantworten, wurden Färbungen der unentkalkten Proben sowie Färbungen von den gleichen Blöckchen nach Entkalkung durchgeführt. Zusätzlich zu der immunhistochemischen anti-TRPC3 Färbung, wurden von-Kossa Färbungen an den Schnitten durchgeführt. Die Entkalkung wurde mithilfe einer Osteosoft Lösung durchgeführt. Die Blöckchen verblieben zwischen drei und fünf Tagen in der Lösung. Die ausschließlich immunhistochemischen Färbungen von fünf unentkalkten und vier entkalkten Proben konnten maschinell analysiert und verglichen werden. Ein Vergleich von unentkalktem Nephrokalzinose Gewebe mit den OP-Proben, welche als gesunde Kontrollgruppe dienen sollte, konnte maschinell durchgeführt werden.

Die Von-Kossa gefärbten Präparate wurden nicht maschinell ausgewertet, sondern eine Aussage konnte nur getroffen werden, ob sie „Von-Kossa positiv“ oder „Von-Kossa negativ“ waren.

4.1.3.1 Ethik

Die Referenznummer, die durch das Ethikvotum der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer im Saarland vergeben wurde, lautet 130/21. Alle Versuche wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

4.1.3.2 Eigenschaften

Proben von fünf Patienten wurden aus der Pathologie erhalten. Die Patienten waren unter dem Begriff „Nephrokalzinose“ in der Pathologiedatenbank hinterlegt. Angaben zu Alter, Geschlecht oder genauer Probenentnahmestelle konnten nicht bei allen eruiert werden (siehe Tabelle 3). Die Probe von der Patientin 4c stammt aus der rechten Niere.

Patient	Geschlecht	Gekürzter histopathologischer Befund
1c	Männlich	Nephrokalzinose
2c	Weiblich	Dystrophe Nephrokalzinose bei sekundärem Hyperparathyreoidismus
3c	Keine Angabe	Ausgeprägte Nephrokalzinose bei Hyperparathyreoidismus
4c	Weiblich	Mäßiggradige Nephrokalzinose bei interstitieller Nephritis
5c	Keine Angabe	Chronische interstitielle Nephritis Nephrokalzinose

Tabelle 3. Eigenschaften der an Nephrokalzinose-erkrankten Patienten.

4.1.4 Tierische Nieren

4.1.4.1 Ethik

Für alle Tiere galt die Zuchterlaubnis nach Absatz (§) 11 und eine jährliche Offenlegungserklärung für euthanasierte Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken nach §4 Absatz 3 des deutschen Tier schutzgesetzes. Die hier verwendete Zucht sowie Haltung dieser Tiere gilt nicht als Tierversuch und erforderte keine zusätzliche Genehmigung.

4.1.4.2 Eigenschaften

Die tierischen Nieren stammen von gesunden Kontrollmäusen. Die ersten vier stammen aus dem Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie in Homburg, die unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ entnommen wurden. Die anderen drei stam men aus dem Fraunhofer Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin in Hannover und wur den durch Dr. Dirk Schaudien zur Verfügung gestellt. Die ausschließlich männlichen vier bis fünf Monate alten C57BL/6J und B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J Mäuse waren phänotypisch unbelastet. Nach Isofluran-Inhalation wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Nieren wurden nach der Entnahme in beschrifteten Einbettkörbchen gelegt. Danach wurden sie wie die anderen humanen Proben verarbeitet. Alle Methoden wurden in Übereinstimmung mit den einschlägigen Richtlinien und Vorschriften durchgeführt.

4.2 Übersicht der histologischen Arbeitsschritte

Zur Herstellung histologischer Schnitte wurden mehrere Arbeitsschritte befolgt. Diese sind in **Abbildung 5.** in chronologischer Reihenfolge dargestellt und werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

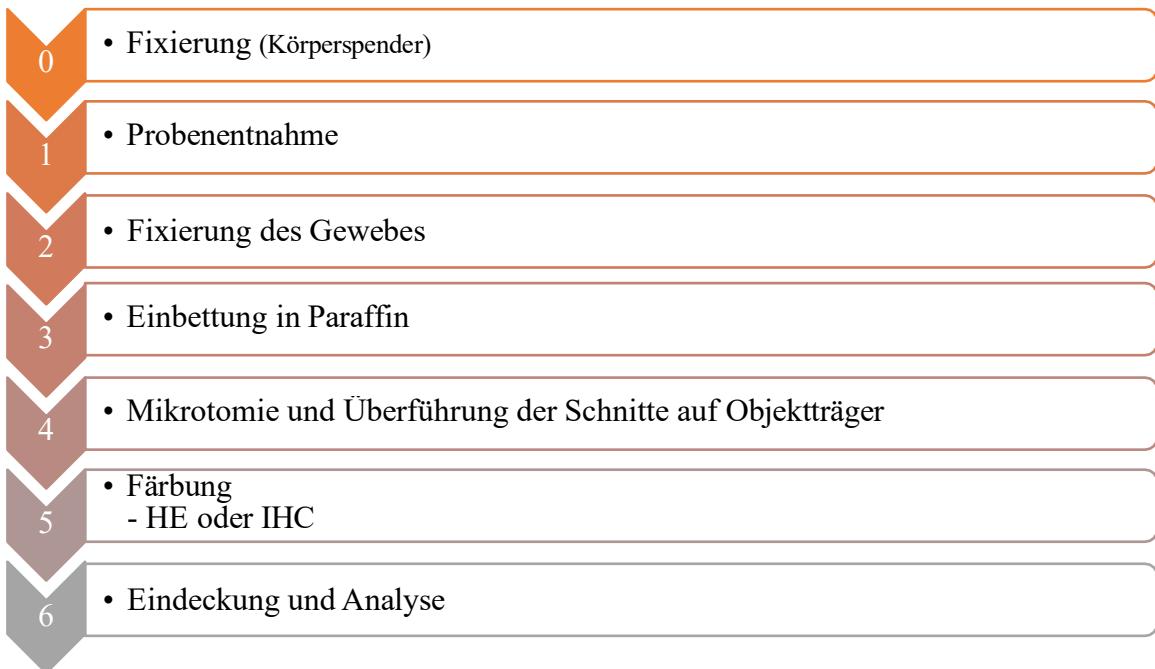


Abbildung 5. Schematische Darstellung der histologischen Arbeitsschritte. HE = Hämatoxylin Eosin Färbung, IHC = Immunhistochemie.

4.3 Fixierung

Die Fixierung dient der Haltbarmachung von Geweben über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren nach Eintreffen des Todes. Sie wird für die Körperspender in der Prosektur des Anatomischen Instituts der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg durchgeführt. Als Folge des Zelltodes entsteht ein Sauerstoffmangel, wodurch morphologische Veränderungen auftreten. Die Autolyse ist ein Prozess der Selbstverdauung durch zelleigene Enzyme. Dieser Prozess ist in den Nieren besonders relevant, da sie neben Leber und Gehirn zu den enzymreichen Geweben gehören (Lang, 2006). Die Fixierung soll Autolyse und eintretende Fäulnis verhindern und wird üblicherweise mit einer wässrigen Formaldehydlösung durchgeführt. Die Zeit zwischen Tod und Fixierung soll möglichst klein gehalten werden um Schäden an den Zellen zu verhindern (Lang, 2006). Wir wollen nun den Vorgang der chemischen Fixierung näher erläutern und auf Unterschiede zwischen NEP- und Formalinfixierung eingehen.

Vor der eigentlichen Fixierung erfolgen Vorbereitungen, die der NEP- und Formalinfixierung gemeinsam sind. Zuerst werden die Leichen für die letzte medizinische Leichenschau entkleidet. Die Entfernung überbleibender medizinischer- und persönlicher- Gegenstände, sowie eine Rasur von

Kopf- und Körperbehaarung wird durchgeführt. Zuletzt werden die Körperspendern mit Journalnummern versehrt, die dazu dienen, die Körper zu identifizieren. Beide Methoden weichen was benutzte Lösungen, lagerungs-Art und -Zeit betrifft, voneinander ab.

4.3.1 Formalinfixierung

Formalinfixierte Körperspender werden hauptsächlich für den Präparierkurs eingesetzt. Die Körper werden über einen Zeitraum von etwa zwei Jahren haltbar gemacht. Das Gewebe unterscheidet sich in diesem Fall deutlich von frischem Gewebe, ist relativ fest und die Farbe verändert sich von blutig-rot im vitalen, zu grau-braun im fixierten Zustand.

Zur Aufbewahrung der inneren Organe wird die Perfusionskonservierung durchgeführt. Nach entsprechender Präparierung mit einem Skalpell wird eine Basler-Lösung nach Kurz in die rechtsseitige Femoralarterie am medialen Oberschenkel eingeführt. Zwei Venenverweilkanülen werden eingebracht, die mit einem Schlauchsystem verbunden sind. Die Fixierlösung wird mithilfe einer Pumpe, die Drücke um die ein bis zwei bar erzeugt, in den Körper gebracht. In den Akren, der Gluteal- und Nacken-Region, wo das Fixierungsmittel nur unzureichend hingelangt, wird mit einer 18G (Gauge) Einmalkanüle das Formalin von außen eingebracht.

Für die Aufbewahrung des äußeren Körpers werden die Körperspender etwa vier Monate in mit 3.5% Formalinlösung gefüllte Wannen gelagert. Danach werden sie in Pharopack-Sarg, auch Foliensarg genannt, bei 14 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt. In drei- bis Viermonatsabständen, werden die Sarge zur Begutachtung geöffnet. Dabei können Prozesse wie Fäulnis kontrolliert und verhindert werden.

4.3.2 Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol-Fixierung

Die NEP-Fixierung nach Weigner stellt eine Alternativmethode dar (Janczyk *et al.*, 2011). Die NEP-fixierten Körperspender werden für Operationskurse oder zu wissenschaftlichen Zwecken benutzt. Dafür sind die Körper nur etwa mehrere Monate haltbar. Nach den gemeinsam genannten vorbereitenden Maßnahmen wird die Fixierung durchgeführt. Die Schritte der inneren Konservierung sind die gleichen, wie in **Kapitel 4.3.1** beschrieben. Lediglich die Fixierlösung ändert sich. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus NEP- und Formalinlösung. Die äußere Konservierung erfolgt in einem Zeitraum von mehreren Tagen bis drei Monaten.

4.4 Einbettungsprozess und Gewebeverarbeitung

Nach der Entnahme wurden die Proben für eine Nacht zusätzlich in 3.5% Formalin bei vier Grad Celsius aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden sie in reiner phosphatgepufferter Salzlösung (PBS = Phosphate buffered saline) zum Zwecke des Waschens überführt, wo sie 24 Stunden bei vier Grad Celsius blieben. Danach wurden sie zur Vorbereitung auf die Einbettung jeweils drei Stunden in fließendem Leitungswasser und in 70% Isopropanol Lösung gestellt. Das Ziel der darauffolgenden Behandlung in dem Karussel-Gewebeeinbetter ist es, die Poren im Gewebe, die zuvor mit Formalin gefüllt waren, nach und nach durch unterschiedliche Lösungen zu ersetzen und am Ende durch Paraffin, was eine Überführung in Paraffin-Blöckchen Form ermöglicht. Es ist dann möglich, wenige Micrometer (μm) dünne Schnitte am Mikrotom zu schneiden. Es handelt sich hierbei um ein Standardverfahren der Histologie (Lang, 2006).

Die Einbettkästchen wurden im Einbettautomaten eingespannt, der vollautomatisiert unterschiedlich lange Zeiten in verschiedene Lösungen verbrachte, von hochkonzentrierten Alkoholen bis hin zu flüssigem Paraffin. Die hochkonzentrierten Alkohole bereiten durch Wasserentzug das Gewebe auf das wasserunlösliche Paraffin vor (Lang, 2006). Methylbenzoat wird zum Klären, als Übergangslösung vor der Infiltration durch Paraffin benutzt. Die Stationen waren wie folgt: drei Stunden in 70% Isopropanol, anderthalb Stunden in 80% Isopropanol, anderthalb Stunden in 90% Isopropanol, zweimal anderthalb Stunden in 100% Isopropanol und drei Mal anderthalb Stunden in Methylbenzoat. Zum Schluss noch zwei Mal zwei Stunden in flüssigem Paraffin. Dieser automatisierte Vorgang hat dazu beigetragen, dass optimale Bedingungen bezüglich Temperatur, Reagenzien und Zeiten beibehalten werden konnten.

Der nächste Schritt ist das Ausgießen, bei welchem mithilfe von erwärmtm flüssigem Paraffin Blöckchen erstellt werden. In diesem Fall wurden die Nierenbiopsien längsseitig eingelegt, damit sich beim Schneiden Mark und Rinde auf dem Schnitt befinden. Paraffin ist eine Mischung aus gesättigten Kohlenwasserstoffen, die bei der Raffinierung von Erdöl entstehen. Das Schneiden sieben Mikrometer dünner Schnitte, dessen Ergebnis sich auf die gesamte histologische Untersuchung auswirkt, erfolgte mithilfe eines Rotationsmikrotoms. Durch ein Handrad konnten die befestigten Blöckchen auf das Messer hingeführt werden. Dazu wurden ein Wärmebad, ein Wärmeschrank und eine Wärmebank auf 37°C erwärmt. Nach der Überführung der Schnitte auf Objektträger konnten diese eine Nacht im Wärmeschrank bei 37°C verbleiben. Es wurde auf Unversehrtheit der Schnitte geachtet.

4.5 Histologische Färbungen

4.5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

4.5.1.1 Prinzip

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) ist eine gängige Färbemethode, die sich als Übersichtsfärbung für histologische Beobachtungen im menschlichem Gewebe standardisiert hat (Lang, 2006). Vor jeder IHC-Färbung wurde eine HE-Färbung von dem korrespondierenden Schnitt durchgeführt. Somit konnte die Intaktheit und Vollständigkeit des Gewebes begutachtet werden.

Hämatoxylin ist ein kationischer Farbstoff, der an negativ geladene Gewebekomponenten bindet und sie blau erscheinen lässt. Der Kern zum Beispiel, das endoplasmatische Retikulum oder die Ribosomen lassen sich dadurch anfärben. Die Blaufärbung entsteht bei dem Vorgang des Bläuens durch Leitungswasser. Durch Erhöhung des pHs, wird die eigentlich rot-braun Färbung durch Hämatoxylin blau-lila (Lang, 2006).

Eosin ist ein saurer, anionischer Farbstoff, der an Strukturen mit einer positiven Ladung bindet (Lang, 2006). Eosinophil sind die meisten Zellorganellen, das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern, die infolgedessen rot erscheinen (Chan, 2014, Gerhard Aumüller, 2010b, Lang, 2006). Das Zuführen von zwei Tropfen Eisessig ermöglichte eine Ansäuerung des Eosins, was optimale Reaktionsbedingungen schaffte und der Kontrastierung diente (Lang, 2006).

4.5.1.2 Protokoll und Durchführung

Ein Protokoll war im Labor des Institutes für Anatomie und Zellbiologie in Homburg bereits etabliert und ist in **Tabelle 4.** aufgeführt. Der Durchlauf durch die Xylol Lösungen diente der Entparaffinierung, die absteigende Alkoholreihe der Hydrierung, damit die folgenden wässrigen Färbelösungen haften können (Gerhard Aumüller, 2010b, Lang, 2006). Das Hämatoxylin und das Eosin wurden mithilfe von Trichter und Papierfilter im Vorfeld filtriert. Die aufsteigende Alkoholreihe diente der Dehydrierung des Gewebes. Durch das Xylol wurde das Alkohol aus dem Gewebe entfernt, was zu einer besseren Durchsicht des Präparates diente. Zum Schluss erfolgte die Eindeckung. Die fertigen Schnitte konnten über Nacht unter dem Abzug gelagert werden, bevor sie am nächsten Tag in Mappen eingeräumt wurden. Die Arbeitsschritte eins, zwei, sechs und sieben wurden unter dem Abzug durchgeführt.

Arbeitschritt	Lösung	Zeit
1. Schnitte entparaffinieren	Xylol	15 Minuten
2. Schnitte in absteigender Alkoholreihe hydrieren	2x 100% Isopropanol 90% Isopropanol 80% Isopropanol	Jeweils 5 Minuten
3. Kernfärbung	Hämatoxylin	8 Minuten
4. Bläuen	Spülen in destilliertem Wasser	Bis die überschüssige Farbe entfernt ist
	Bläuen in fließendem Leitungswasser	12 Minuten
	Spülen in destilliertem Wasser	30 Sekunden
5. Plasmafärbung	Eosin 0,1%	2,5 Minuten
6. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe	90% Isopropanol	Sekunden
	100% Isopropanol	10 Minuten
7. Klären in Xylol	Xylol	15 Minuten
8. Eindecken	Mit Roti-Histokitt	Aushärtung unter dem Abzug über Nacht

Tabelle 4. HE-Färbungsprotokoll.

4.5.2 Immunhistochemische Färbung

4.5.2.1 Immunglobuline

Immunglobuline sind Proteine, die vom Organismus als defensive Reaktion auf das Eindringen einer fremden Substanz, in der Regel einem Antigen, gebildet werden. Antigene bieten unterschiedliche Epitope, das heißt Gruppen von Aminosäuren innerhalb ihres Proteins, gegen welche sich Antikörper richten. Damit eine Bindung zwischen Antigen und Antikörper entsteht, müssen die chemischen Strukturen genau zueinander passen. Die Struktur eines Antikörpers ist meistens Y-förmig und beinhaltet als Stamm das F_c -Fragment (F_c = „Fragment constant“) und als Arme zwei F_{ab} -Fragmente (F_{ab} = „Fragment antigen binding“) (siehe **Abbildung 6.**) (Lang, 2006). Man unterscheidet mono- und polyklonale Antikörper.

Monoklonale Antikörper sind immunologisch gleiche Antikörper, die, wenn sie in der Forschung eingesetzt werden, in der Regel aus dem Serum von Versuchstieren gewonnen werden. Den Tieren wurde ein Antigen verabreicht, um sie zu immunisieren. Ein Antikörper aus einer Plasmazelle, der sich gegen ein Epitop richtet, wird mit einer unsterblichen Myelomzelle gekoppelt. Die dadurch gebildeten Antikörper richten sich ausschließlich gegen ein Epitop eines Antigens. Sie sind teuer und schwieriger herzustellen als polyklonale Antikörper (Lang, 2006).

Polyklonale Antikörper stammen aus verschiedenen Plasmazellen, sind also immunologisch gesehen heterogener als monoklonale Antikörper (Lang, 2006). Sie können mehrere Epitope des Antigens erkennen und binden. Dies ist in der IHC-Färbung von Vorteil, falls ein Teil des Antigens im Gewebe unzugänglich oder durch die Fixierung beschädigt wurde (Lang, 2006). Die Antigene Eigenschaften von Antikörpern werden bei der Herstellung sekundärer-polyklonaler Antikörper genutzt. Wird einer Spezies artfremde Antikörper verabreicht, bildet das Tier Sekundärantikörper, die sich mit ihrem F_{ab} -Fragment gegen das F_c -Fragment des zuerst verabreichten Primärantikörpers richten (Lang, 2006). Nach Herstellerangaben richtet sich der benutzte anti-TRPC3 Antikörper gegen die Aminosäureresten 822-835 von Maus-TRPC3 (Zugang Q9QZC1), Intrazellulär, C-Terminus. Er wurde für die Methode der Immunhistochemie entwickelt und erkennt TRPC3 von Maus, Ratte und Mensch (Alomone Labs, Jerusalem, Israel).

4.5.2.2 Prinzip

Immunhistochemische Färbungen können zu dem Zwecke des Nachweises von TRPC3-Kanälen im Nierengewebe durchgeführt werden. Durch den Einsatz von Antikörpern, die eine Affinität zu Antigene, beziehungsweise Epitope im Gewebe aufweisen, ist der Nachweis durch Farbstoffentwicklung am Ort der Antigen-Antikörper Reaktion möglich (Lang, 2006). Sie werden nicht nur in der Forschung, sondern auch im klinischen Kontext, insbesondere im Rahmen von Diagnostik

eingesetzt (Lang, 2006, Libard *et al.*, 2019). Es gibt verschiedene Arten der IHC-Färbung. Bei der direkten Methode bindet ein Enzym-gebundener Primärantikörper an ein Antigen im Gewebe. Bei hinzugeben eines Substrates entsteht eine enzymatische Reaktion, was zu einer Färbung führt (Lang, 2006). Bei der indirekten Methode, die im Rahmen dieser Arbeit zur Verwendung kam, bindet ein Primärantikörper an das gewünschte Antigen im Gewebe. Ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper wird auf den Schnitt gebracht und bindet mit seinen F_{ab} -Fragmenten an den F_c -Fragmenten des Primärantikörpers. Das gekoppelte Enzym, in dieser Arbeit die Merrettischperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) kann durch zugeben eines Chromogens, ihres Substrates -in diesem Fall 3,31-Diaminobenzidin (DAB) bei Bindung eine Reaktion katalysieren, die sich in einem braunen Farbumschlag zeigen lässt (Gerhard Aumüller, 2010a, Lang, 2006, Lüllmann-Rauch). Dieses Prinzip ist in **Abbildung 6.** schematisch dargestellt. Andere ungebundene Sekundärantikörper wurden im Vorhinein durch Waschschrifte entfernt. Bei Betrachtung unter dem Mikroskop, zeigen TRPC3-positive Strukturen ein braunes Signal, TRPC3-negative Strukturen nicht.

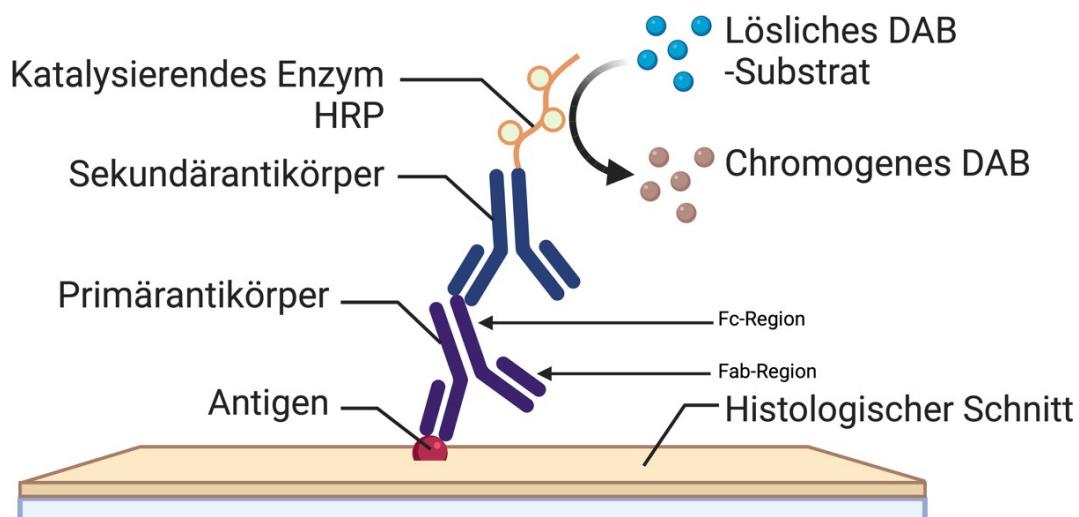


Abbildung 6. Schematische Darstellung des Prinzips der immunhistochemischen Färbung. F_c = „Fragment constant“, F_{ab} = „Fragment antigen binding“ sind exemplarisch dargestellt. „Created with BioRender“. Agreement Number: HJ26W64KOO.

4.5.2.3 Protokoll und Durchführung

Ein Protokoll war im Labor des Institutes für Anatomie und Zellbiologie in Homburg bereits etabliert und wurde angewendet. Die Entwicklungszeit von DAB wurde individuell für das Nierengewebe und den TRPC3-Antikörper etabliert. Bei Aufbringen von Lösungen auf das Gewebe, richtete sich das Volumen nach der Größe des Gewebes auf den Schnitten.

4.5.2.3.1 Tag 1

Der 1. Schritt ist bei der HE-Färbung und IHC-Färbung der gleiche. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte, die in Xylol und einer aufsteigenden Alkoholreihe gebracht werden, wird unter dem Abzug durchgeführt. Ein Unterschied besteht in dem anschließenden Waschschnitt in destilliertem Wasser, welcher dem Entfernen von Alkoholresten dient, die den pH-Wert des Puffers im folgenden Schritt negativ beeinflussen könnte.

Die Proben werden jeweils fünf Minuten unter dem Abzug in drei Xylol Lösungen, zwei 100% Isopropanol, jeweils eine 90% Isopropanol, 80% Isopropanol, 70% Isopropanol und destilliertes Wasser gebracht.

Der 2. Schritt, die hitzeinduzierte Demaskierung (heat induced epitope retrieval = HIER) wird durch Eintauchen der Schnitte für eine Stunde in 95°C warmen Citratpuffer 1% (Prozent) bei pH 6 durchgeführt. Die Herstellung erfolgt mit destilliertem Wasser in einer Konzentration 1:100. Durch den Vorgang der Fixierung können Proteine vernetzt und die determinanten Gruppen beeinträchtigt werden, sodass die Epitope für den Antikörper nicht mehr zugänglich sind. Durch diesen Schritt werden sie über Hitze und einem optimalen pH wieder freigelegt, was für den weiteren Verlauf primordial ist. Anschließend kühlen die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur ab und werden eine Minute in PBS eingetaucht, um Reste des Citratpuffers abzuwaschen. Die Pufferlösung PBS schafft ein schonendes Milieu und verhindert das Austrocknen des Gewebes auf den Objekträgern. Nach Abklopfen überflüssiger Flüssigkeit, wird das Gewebe auf den Objekträgern mit einem Fettstift umrandet, damit die folgend mit einer Pipette applizierten Lösungen zurückgehalten werden. Somit wird ein Austrocknen der Schnitte verhindert und ressourcenschonend gearbeitet, da kleinere Mengen an Lösungen auf die Objekträger pipettiert werden müssen.

Der 3. Schritt, die Blockierung, erfolgt durch Inkubation der Schnitte für eine Stunde mit Blockierungspuffer (10% Ziegenserum in PBS) (Ziegenserum = normal goat serum = NGS) in der Feuchtekammer. NGS enthält unspezifisch bindende Antikörper, die nicht-spezifische Bindungen des TRPC3-Antikörpers an das Gewebe verhindert.

Bei dem 4. Schritt werden die Positivkontrollen mit dem anti-TRPC3 Primärantikörper über Nacht in der Feuchtekammer inkubiert. Der IgG-Antikörper, der aus Kaninchen gewonnen wurde, wird in der gewünschten Konzentration auf die Schnitte nach entfernen des NGS durch Abklopfen gebracht. Nach Durchführung der Färbung mit unterschiedlichen Konzentrationen ergab sich eine optimale Verdünnung von 1:50. Die Negativkontrolle inkubierte mit dem Serum eines nicht-immunen Kaninchens, der zwar Antikörper enthält, diese sich jedoch nicht spezifisch gegen TRPC3-Epitope richten. Die Negativkontrolle wurde in allen anderen Schritten wie die Positivkontrollen behandelt.

4.5.2.3.2 Tag 2

Im 5. Schritt werden nach Abklopfen des Primärantikörpers die Proben vor und nach zehn-minütiger Inkubation mit 3%-Wasserstoffperoxid für zwei Mal zwei Minuten in PBS gewaschen. Damit werden die ungebundenen Antikörper entfernt. Endogene Peroxidasen werden mit dem 3%-Wasserstoffperoxid kompetitiv gehemmt. Ein enzymatisch inaktiver Komplex wird gebildet, damit bei der späteren Umsetzung des Substrates, an welchem auch eine Peroxidase beteiligt ist, keine falsch-positiven Reaktionen stattfinden.

Bei dem 6. Schritt wird der HRP-gekoppelter polyklonaler IgG-sekundär-Antikörper (Anti-rabbit HRP) in der Konzentration 1:500 auf die Schnitte pipettiert und für 60 Minuten in der Feuchtekammer auf die Proben inkubieren gelassen. Daran schließt sich ein Waschschritt von jeweils zwei Mal zwei Minuten in PBS, um nicht-gebundene Sekundärantikörper zu entfernen.

Im 7. Schritt wird das Chromogen DAB auf die Schnitte pipettiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wird die enzymatische Reaktion beobachtet, die durch die Meerrettischperoxidase katalysiert wird und sich in einen braunen Farbumschlag zeigt. Für die in dieser Arbeit gefärbten Schnitte ergab sich eine DAB-Zeit von 5 Minuten. Die Reaktion wird durch Einführen der Schnitte in PBS gestoppt.

Der 8. Schritt dient der besseren Kontrastierung durch Gegenfärbung. Die Proben werden eine Minute in destilliertem Wasser, eine Sekunde in Hämatoxylin nach Ehrlich gebracht, kurz in destilliertem Wasser gedippt und noch fünf Minuten in Leitungswasser zum Bläuen gelegt.

Der 9. Schritt, die Entwässerung wird durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol unter dem Abzug durchgeführt.

Die genauen Schritte sind für den letzten Schritt jeweils fünf Minuten in 70%- 80%- und 90%- , und zwei Mal 100%-Isopropanol. Folgend werden sie für jeweils fünf Minuten in drei Xylol Lösungen gelegt und anschließend mit dem Roti-Histokitt eingedeckt und aushärten gelassen, bevor sie bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.5.3 Von-Kossa Färbung

In der Von-Kossa Färbung können Ca^{2+} -Ionen im Gewebe sichtbar gemacht werden. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf der Reaktion von Silberionen aus einer Silbernitratlösung, die mit Bestandteilen von Kalkablagerungen (Carbonat- und Phosphationen) reagieren. In einem zweiten Schritt können diese Silberionen durch starke Lichteinwirkung zu schwarzem metallischem Silber reduziert und sichtbar gemacht werden (Lang, 2006, Schneider, 2021). Diese Färbung schloss sich direkt an die IHC an, nach dem Bläuen und vor der abschließenden Dehydrierung. Dies stellt eine experimentell neue Technik dar, da üblicherweise die Von-Kossa Färbung an ungefärbten Schnitten

durchgeführt wird. Somit sollte eine mögliche Korrelation der Expression von TRPC3 und Kalkablagerungen direkt erkannt werden. Die Schnitte wurden nach dem Bläuen in PBS überführt. Von da an, wurden sie in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden sie für eine Stunde in 5%-Silbernitrat unter Lichteinwirkung gelegt und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Für wenige Sekunden wurden sie einzeln in 1%-Pyrogallolsäure entwickelt. Anschließend wurden sie erneut in destilliertem Wasser gespült. Drei-minütiges Verweilen in Natrium-Thiosulfat-Lösung diente der Fixierung. Nach einem erneuten Waschschritt in destilliertem Wasser, einer Hintergrundfärbung mit Kernechtrot für zehn Minuten sowie erneut einen Waschschritt in destilliertem Wasser, wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert, bevor sie eingedeckt wurden. Die letzten Schritte entsprechen den letzten IHC-Schritten.

4.5.4 Titrierung

Ein optimaler Antikörpertiter liegt bei Erreichen der höchsten Verdünnung eines anti-Serums vor mit dem eine optimale Färbung ohne Hintergrundfärbung erreicht wird (Lang, 2006). Dies wurde in dieser Arbeit bei der 1:50 Verdünnung erreicht. Die Konzentration nach Wiederherstellung ist für TRPC3 nach Herstellerangaben 0.8 mg/ml (Alomone Labs, Jerusalem, Israel).

4.6 Qualitätskontrollen

Zur Qualitätssicherung wurde das oben beschriebene Protokoll streng eingehalten. Unspezifische Reaktionen sind Bindungen des Antikörpers an Gewebebestandteile, die nicht auf die gewünschte Target Antigen-Antikörper Reaktion zurückzuführen sind (Lang, 2006). Diese sollten verhindert werden, da sie zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Zur Validierung der Ergebnisse wurden Negativkontrollen mitgeführt. Einmalig wurde eine Peptidkontrolle durchgeführt.

4.6.1 Peptidkontrolle

Eine Spezifitätskontrolle wurde einmalig durchgeführt, um die Spezifität des Primärantikörpers für das TRPC3-Antigen im Gewebe zu sichern. Dafür erfolgte die Bindung zwischen dem Peptid und dem Epitop des Primärantikörpers im Vorhinein, sodass letzterer mit seinen F_{ab} -Fragmenten nur noch vergleichsweise wenig an das Antigen im Gewebe binden kann. Dies führt zu einer Abschwächung des Signals in der Peptidkontrolle im Vergleich zu einer korrespondierenden Positivkontrolle. Bei abgeschwächter oder fehlender Färbung der Peptidkontrolle gilt das Ergebnis als erfolgreich. Die Ergebnisse der Peptidkontrolle sind im **Kapitel 5.6** aufgeführt.

Dazu wurden am Vortag der Färbung, 40 µg des Kontrollpeptids, dass bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert war, in 20 µL PBS gelöst. Danach wurden 130 µL anti-TRPC3-Antikörper in der Konzentration 1:50 dazu pipettiert und über Nacht im Kühlschrank inkubieren gelassen. Anstelle des

Primärantikörpers wurde diese Lösung auf das entsprechend gekennzeichnete Präparat pipettiert. Mitgeführt wurden im gleichen Färbegang eine Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle.

4.6.2 Negativkontrolle

Zur Überprüfung der Spezifität des Sekundärantikörpers, wurden bei jedem Färbegang Negativkontrollen durchgeführt. Diese Schnitte wurden mit Kaninchenserum anstelle des Primärantikörpers inkubiert. Das Kaninchenserum wurde den Tieren vor der Immunisierung gegen das Protein entnommen und enthielt somit kein anti-TRPC3 Antikörper. Bei allen anderen Schritten wurden die positiv- und Negativkontrollen gleichbehandelt. Die Negativkontrolle ist als erfolgreich anzusehen, wenn keine Braunfärbung auftritt (siehe exemplarisch **Abbildung 20. I, J**). Somit wird mit hoher Wahrscheinlichkeit ein richtig-positives Ergebnis der restlichen mitgeführten Schnitte angenommen. Weist die Negativkontrolle jedoch eine Braunfärbung auf, muss von einem falsch-positiven Ergebnis ausgegangen werden und die restlichen Positivkontrollen sind nicht auswertbar. Jedoch schließt eine ausschließliche Braunfärbung der Positivkontrollen nicht eine falsch-positive Färbung aus. Weiteres dazu wird in der Diskussion besprochen.

4.7 Histologische Identifizierung der Tubulusabschnitte

Eine korrekte Erkennung der mikroskopischen Strukturen der Niere vor der Intensitätsanalyse der Färbung, sei sie manuell oder maschinell, ist unerlässlich. Die Erkennung der Strukturen wurde in Rücksprache mit erfahrenen Anatomen durchgeführt, um möglichst optimale Analysebedingungen zu schaffen. Anhand von Bildern und in der Literatur beschriebenen Merkmalen ist eine Unterscheidung der Primärsegmente des Tubulussystems der Niere möglich. Dabei wird zwischen proximaler-, distaler-, Intermediärtubulus und Sammelrohr unterschieden (Drenkhahn, 2008). Die Einteilung der Strukturen wird hier anhand ihres geographischen Vorkommens innerhalb der Niere durchgeführt (Rinde, Mark; Außenmark, mit Außen- und Innenstreifen, Innenmark). Die Abgrenzung zwischen gewundenen und geraden Anteilen des proximalen oder distalen Tubulus zum Beispiel, wird nicht vorgenommen. Die mikroskopische Erkennung von Glomeruli wird hier nicht erwähnt, da diese eindeutig ist. Bei der Betrachtung wurde nur das Kapillarbett an der Grenze des viszeralen Blattes der Bowman Kapsel berücksichtigt. Die einzelnen Zellen in- und um- das Kapillarbett werden nicht genau anatomisch eingeteilt. Im Folgenden werden wir auf besondere Merkmale der einzelnen Tubulusabschnitte eingehen. Das Tubulusepithel ist in der gesamten Niere einschichtig, mit Unterschieden in der Höhe der Zellen (Drenkhahn, 2008, Kaissling und Le Hir, 1990). Die entsprechenden Bilder können für die menschliche aus **Abbildung 7.** und für die tierische Niere aus **Abbildung 8.** entnommen werden.

4.7.1 Proximaler Tubulus

Die proximalen Tubuli kommen vorwiegend in der Rinde, in den Markstrahlen und im Außenstreifen vor (Drenkhahn, 2008). Sie haben im Vergleich zu anderen umliegenden Strukturen in der Rinde einen großen Durchmesser, wenn sie im Querschnitt dargestellt werden. Das charakteristische Merkmal ist der hohe Bürstensaum, der aus Mikrovilli gebildet ist und eine Vergrößerung der luminalen Zelloberfläche ermöglicht (Hans-Christian Pape, 2014, Kaissling und Le Hir, 1990).

4.7.2 Intermediärtubulus

Die Intermediärtubuli findet man in der Rinde und im Mark. Sie bilden die dünnen Teile der Henle Schleife. Insgesamt besitzen sie ein sehr niedriges Epithel, was sie von den anderen Tubulusabschnitten unterscheidet. Dadurch ist jedoch die Unterscheidung zu Gefäßabschnitten schwierig (Drenkhahn, 2008).

4.7.3 Distaler Tubulus

Distale Tubuli können in der gesamten Niere bis in den Innenstreifen des Außenmarks angetroffen werden. Es wird angenommen, dass die geraden Anteil sich vorwiegend im Außen- und Innenstreifen des Außenmarks befinden und, dass der gewundene Teil in der Rinde zu seinem zugehörigen Glomerulus zurückschwengt, wo er die Na^+ - Cl^- Konzentration misst (Drenkhahn, 2008). Die Unterscheidung der distalen Tubuli lässt sich anhand des fehlenden Bürstensaums und des mittelhohen Epithels vornehmen. Die Zellen sind im Mark meistens kubisch (Drenkhahn, 2008).

4.7.4 Sammelrohr

Sammelrohre sind prinzipiell in der gesamten Niere vertreten, werden aber im Mark am einfachsten erkannt. Die Sammelrohre sind an ihrer Größe erkennbar, da sie alle anderen Tubulusabschnitte überragt. Die Zellen sind kubisch und die Grenzen zwischen den einzelnen Epithelzellen sind meistens gut abgrenzbar (Drenkhahn, 2008, Rao *et al.*, 2019).

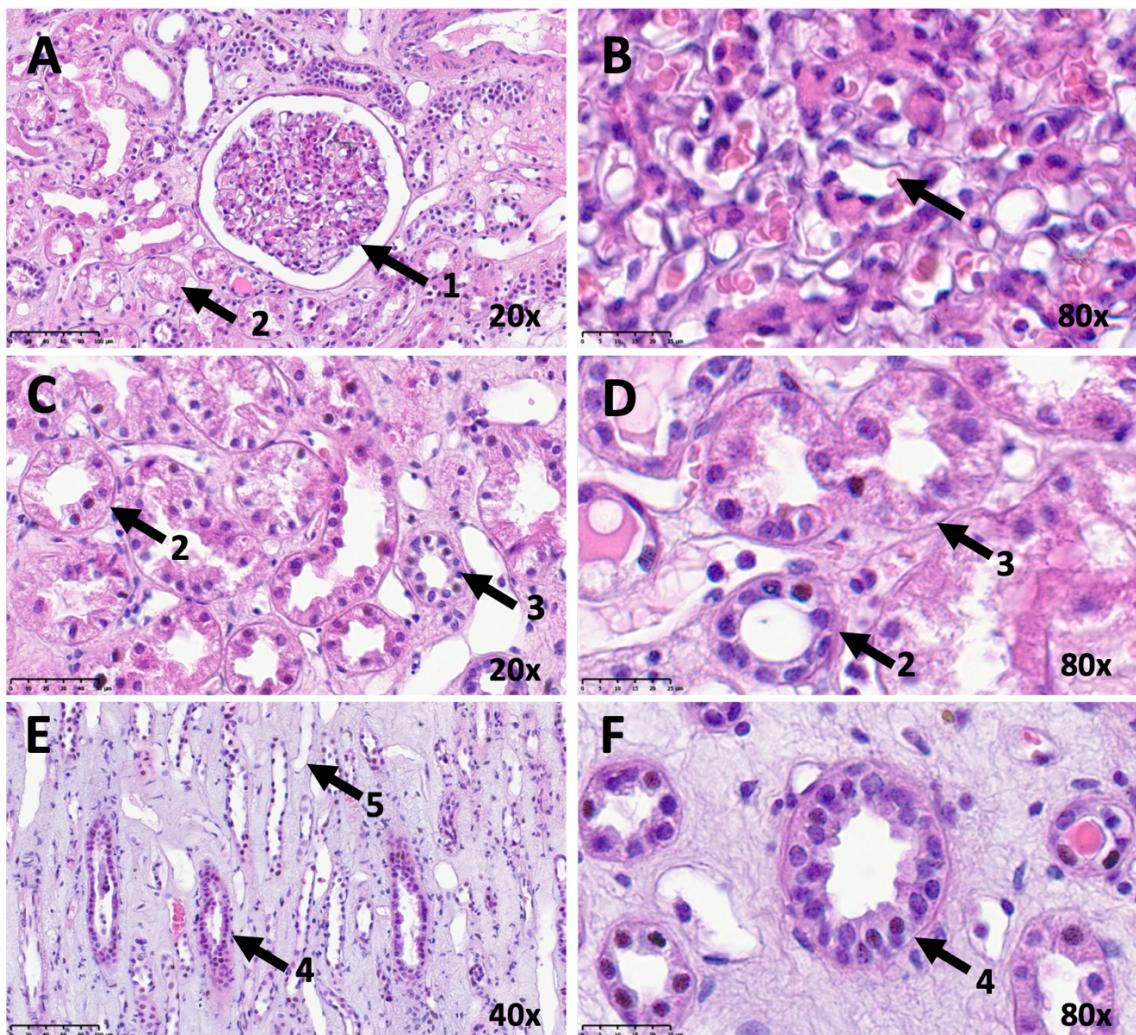


Abbildung 7. HE-Färbung von menschlichem Nierengewebe. Das Gewebe stammt von Patient 3b. Abbildung A zeigt eine Glomerulus (1) und ein proximaler Tubulus (2) in der Rinde. Abbildung B zeigt eine Erythrozyt (mit Pfeil gekennzeichnet) in den Kapillaren des Glomerulus. Abbildung C und D zeigen proximale Tubuli (2) und distale Tubuli (3) in unterschiedlichen Vergrößerungen in der Rinde. Abbildung E zeigt ein Sammelrohr (4) und ein Intermediärtubulus (5) im Mark. Abbildung F zeigt ein Sammelrohr (4) im Mark.

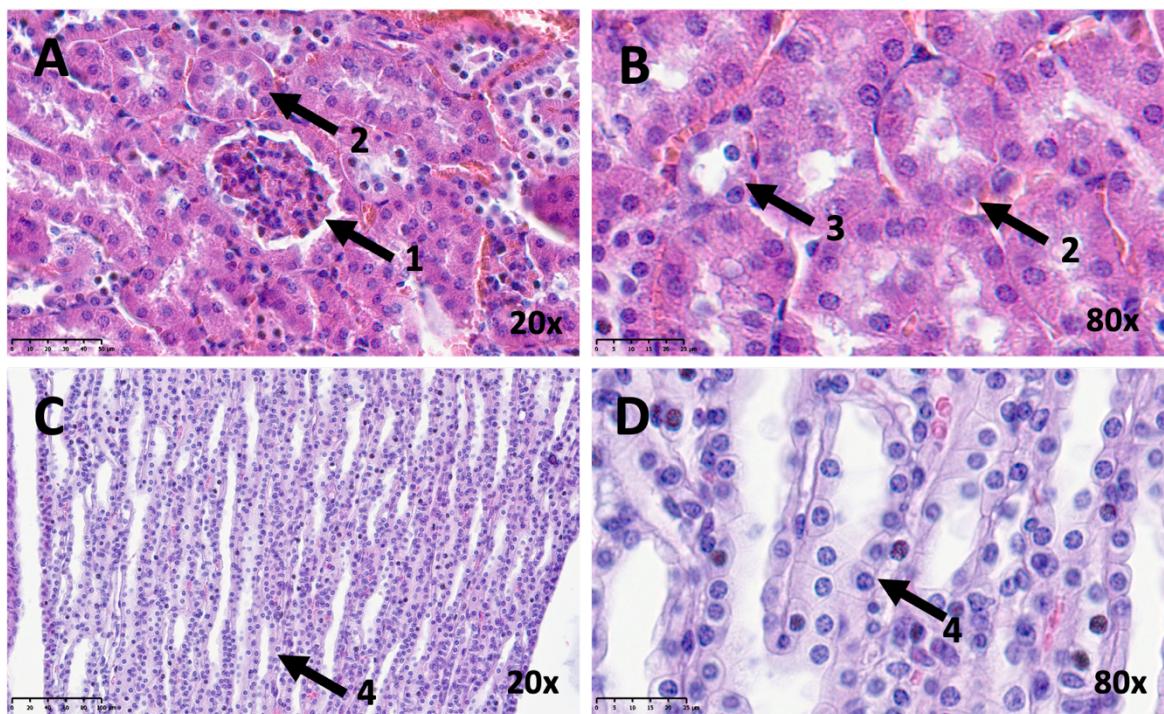


Abbildung 8. HE-Färbung von tierischem Nierengewebe. Das Gewebe stammt von Maus 4. Abbildung A zeigt ein Glomerulus (1) und ein proximaler Tubulus (2) in der Rinde. Abbildung B zeigt ein proximaler Tubulus (2) und ein distaler Tubulus (3) in der Rinde. Abbildung C und D zeigen Sammelrohre (4) im Mark in unterschiedlichen Vergrößerungen.

4.8 Maschinelle Auswertung

Eine Software basierte semiquantitative Messung des Färbesignals der Immunhistochemie, ähnlich dem H-Score von Pixel (pix H-Score) wurde am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover durchgeführt (Ram *et al.*, 2021). In diesem Rahmen möchte ich mich herzlich bei Dr. Schaudien für die herausragende fachkundige Beratung, Zeit und Geduld, die er investiert hat, bedanken.

Das Bildanalyse-Software Programm von Visiopharm (Version 09.2021, Visiopharm Denmark) wurde dafür benutzt. Der pix H-Score verhält sich analog zum traditionellen zellbasierten H-Score, wird aber auf Pixel und nicht auf einzelne Zellen angewendet (Ram *et al.*, 2021). Dabei wird mit der Festlegung von Intensitätsschwellen sowohl für das Chromogen, in diesem Fall DAB, als auch für Hämatoxylin gearbeitet. Gewichtete DAB-Werte zwischen eins und drei können somit pro Schnitt und pro Struktur errechnet werden, die mit der Intensität der Färbung korrelieren. Der genaue Ablauf wird im folgenden Kapitel erläutert. Die Ergebnisse müssen aufgrund unterschiedlicher Faktoren auf welche näher in der Diskussion eingegangen wird als relativ gesehen und interpretiert werden (Lang, 2006).

Diese Methode konnte bei den besterhaltenen Geweben angewendet werden. Dabei handelt es sich um alle Operations-, Maus-, vier Formalin-, eine NEP-, und fünf-Nephrokalzinose Proben.

4.8.1 Ablauf

Die Objektträger wurden zuerst mithilfe des Hamamatsu Nano Zoomer S210 (Hamamatsu, Japan) digitalisiert. Das Nierengewebe ist sehr heterogen und die Auswertung sollte ohne Berücksichtigung des Lumens der Tubuli erfolgen, um Verzerrungen zu vermeiden. Dazu ist das Gewebe nicht immer morphologisch gut erhalten. Jeweils fünf- für den jeweiligen Schnitt repräsentative Strukturen (Glo-merulus, kortikaler-, proximaler-, und distaler- Tubulus, proximaler- und distaler- Tubulus im Au-ßenstreifen des Außenmarks, distaler Tubulus, im Innenstreifen des Außenmarks, Intermediärtubulus und Sammelrohr im Innenmark) wurden händisch als „Region of Interest“ (ROI) mit einem Farbcode auf dem NDP.view2 Programm von Hamamatsu (U12388-01, Hamamatsu, Japan) gekennzeichnet, wie in **Abbildung 9.** exemplarisch dargestellt ist. In den Operations- und Maus-Nieren wurden meis-tens alle Strukturen gekennzeichnet, soweit diese vorhanden waren. In den maschinell ausgewerteten Formalin und NEP-Proben, sowie in der Peptidkontrolle, wurden hauptsächlich die Primärsegmente gekennzeichnet. Einschlusskriterien der Strukturen in die Auswertung waren die Repräsentativität der Färbung für den Schnitt und die morphologische Integrität. Sie wurden aufgrund der in **Kapitel 4.7** dargelegten Kriterien ausgesucht. Dokumente mit dem Format „ndpi-ndpa“ wurden erstellt, die durch das Visiopharm Programm geöffnet werden konnten und die Koordinaten für die eingezeich-neten ROIs beinhalteten. Innerhalb dieser Regionen konnten die DAB-positiven Bereiche mithilfe

des dem Programm-innigen DAB-Filter erkannt werden. Durch Thresholding wurden die DAB-positiven Bereiche mit unterschiedlichen Schwellenwerte in eine dreistufige Skala unterteilt. Je nachdem, welche Intensität der Braunfärbung vorlag, wurde der entsprechende Bereich von der stärksten (3+) zu der mittleren (2+) und der schwächsten (1+) Braunfärbung eingeteilt. Diese Einteilung bedurfte einiger Anpassungen und wurde in einem mehrstufigen Prozess festgelegt, der im folgenden Kapitel dargestellt wird. Werte zwischen null und eins galten als negativ.

Über die Threshold Funktion konnte durch ein Hämatoxylin Filter die Hämatoxylin Färbung durch das Programm erkannt und festgelegt werden, damit das Hämatoxylin im Voraus erkannt wurde und nicht mit in die Intensitätsmessung der DAB-Werte hineingezogen wurde.

Die Flächen wurden durch das Programm gemessen. Als Gesamtfläche galt die gesamte Fläche der einzelnen ROIs. Die Summe aus erkannter Hämatoxylin Färbung und DAB-Färbung galt als reine Gewebefläche. Nachdem ein geeignetes Programm mit passenden Stufenbereichen gefunden wurde, wurde das Programm auf die Schnitte angewendet. Die Ergebnisse lagen in Form einer Tabelle, mit Gewebeflächen und DAB-Werten zwischen null und drei für die jeweiligen Flächen der Strukturen der jeweiligen Schnitte vor. Die normalisierten gewichteten DAB-Werte pro Schnitt und pro Struktur erhielt ich, indem die DAB-positiven Flächen mit dem durch das Programm zugeordnete DAB-Wert (ein- zwei oder drei Fach positiv) der Struktur multipliziert wurde und alle Werte summiert wurden. Die Messung erfolgte in Quadratmikrometer. Dieser Wert wurde dann auf die Gesamtgewebefläche der jeweiligen Strukturen pro Schnitt normiert. Pro Schnitt lag also ein gewichteter DAB-Wert pro Struktur vor, der dem H-Score von Pixel ähnelt (Ram *et al.*, 2021). Der durchschnittliche normierte gewichteter DAB-Flächenwert für proximale Tubuli für ein Schnitt zum Beispiel konnte dann ausgerechnet werden, wie weiter unten exemplarisch dargestellt ist. Die Bilder für die Abbildungen wurden mit der Bildbetrachtungssoftware NDP.view2 von Hamamatsu (U12388-01, Hamamatsu, Japan) aufgenommen.

Exemplarische Darstellung der Berechnung des gewichteten DAB-Wertes für proximale Tubuli (PT) in Schnitt xy:

$$\frac{\text{Fläche in Schnitt xy der PT die (DAB 1x positiv ist } x_1) + (\text{DAB 2x positiv ist } x_2) + (\text{DAB 3x positiv ist } x_3)}{\text{Gesamtgewebefläche der PT in Schnitt xy}}$$

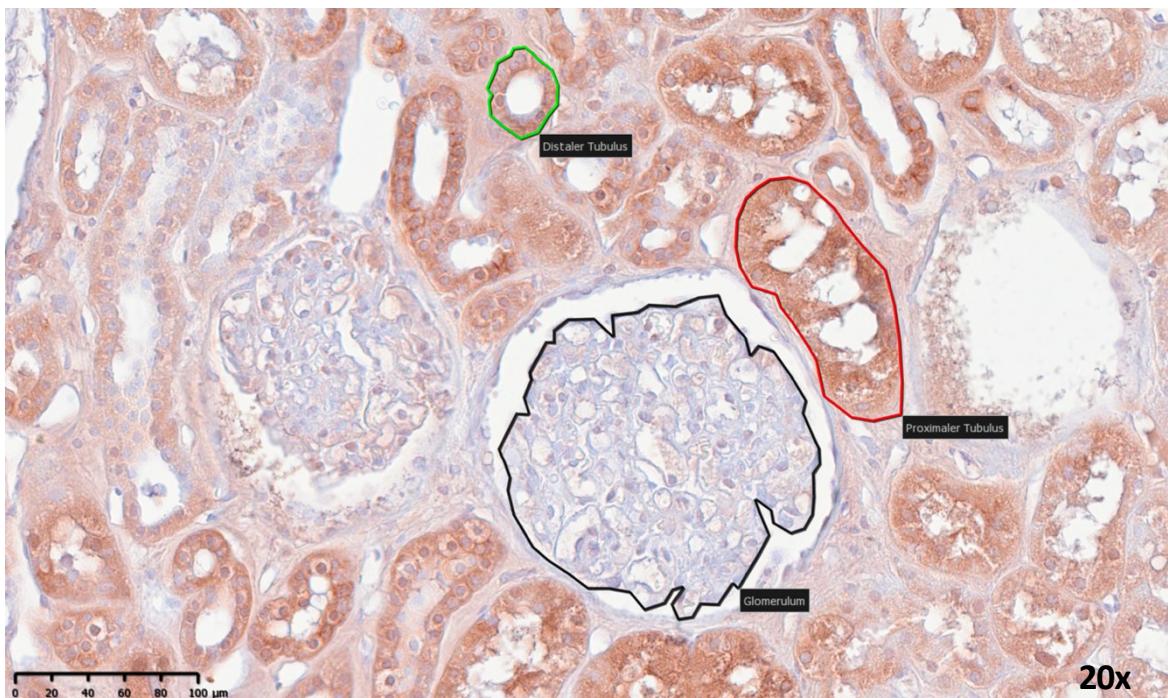


Abbildung 9. Exemplarische Markierung der ROIs im NDP-Viewer Programm. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von Patient 3b. Ein Glomerulus (schwarz eingekreist), proximaler (rot eingekreist) und distaler Tubulus (grün eingekreist) sind als ROI gekennzeichnet. Das gleiche Verfahren erfolgte im Mark mit anderen Farben. ROI = Region of Interest.

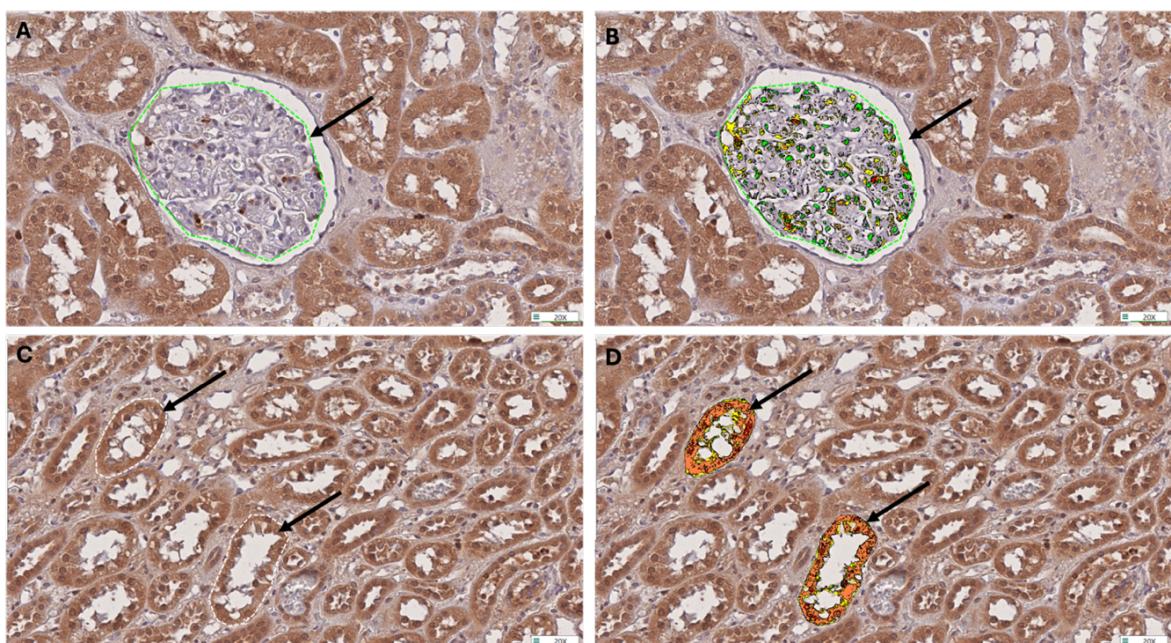


Abbildung 10. Exemplarische Auswertung der ROIs durch das Programm. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von menschlichem Gewebe (Abbildung A,B: Patient 1b, Abbildung C,D: Patient 7b). Glomerulus und proximaler Tubulus sind in jeweiligen Farben als ROI gekennzeichnet (grün in A und B, weiß in C und D). Abbildung B und D zeigen die exemplarische Auswertung der ROIs innerhalb beider Strukturen durch das Programms. Die grüne Fläche wird als negativ gewertet. Die rote Fläche als drei-fach positiv, die orangefarbene Fläche zweifach positiv, die gelbe Fläche ein-fach positiv.

4.8.2 Etablierung der Skalenbegrenzungen

Im Folgenden Kapitel wird der Prozess der Etablierung der geeigneten Skalenbegrenzungen für die DAB-positiven und Hämatoxylin Bereiche erläutert. In der Tat galten mehrere Anforderungen an das Programm. Die Intensitäten sollten möglichst differenziert wahrgenommen und auch die Hämatoxylin-Färbung richtig erkannt werden. Der Prozess der Entwicklung und des Durchlaufens der unterschiedlichen Programme war auch wichtig, um mögliche Einflussfaktoren zu erkennen und zu berücksichtigen sowie Störfaktoren zu beseitigen. Auf den digitalisierten Objektträgern konnte mit Hilfe eines Farbcodes eingesehen werden, welche Regionen das Programm als Hämatoxylin (grün), ein-(gelb), zwei-(orange) oder drei-fach (rot) positiv gewertet hatte und ob basierend auf die visuelle Auswertung, die maschinelle Auswertung Sinn ergab (Siehe **Abbildung 10. B** und **D**). So konnten notwendige Anpassungsstellen des Programms erkannt werden.

Die Ergebnisse aller vier Programme waren insgesamt ähnlich und in der Tendenz der Ergebnisse gleich. Es war trotzdem notwendig die Anpassungen durchzuführen, bis die Version 4 angenommen wurde. Um die grenzgebenden Werte der DAB-Skalierung festzulegen, wurden vor der Analyse alle Präparate durchgesichtet und mithilfe vom DAB-Filter Messungen an unterschiedlichen Stellen durchgeführt, bis die kleinsten und die höchsten DAB-Werte gefunden wurden, die richtungsweisend für den weiteren Vorgang waren.

4.8.2.1 Version 1:

Die Skalen der DAB- und Hämatoxylin Filter können für dieses Programm der **Tabelle 5.** entnommen werden. Je höher der Wert, desto schwächer die Intensität der Färbung. Die Ergebnisse waren vielversprechend und entsprachen der visuellen Auswertung. Jedoch konnte man erkennen, dass in manchen Tubuli Artefakte fälschlicherweise als positiv gewertet wurden.

Hämatoxylin Skala	0	160	
Class 2: DAB-Skala	0	60	3 fach-positiv
Class 3: DAB-Skala	61	120	2 fach-positiv
Class 4: DAB-Skala	121	180	1 fach-positiv

Tabelle 5. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 1.

4.8.2.2 Version 2:

Der Hämatoxylin Wert ist für dieses Programm gleichgeblieben, die DAB-Filter Skala wurde heruntergesetzt, mit dem Ziel die sehr hellen Flächen, die nicht als „positiv“ gewertet werden sollten, herauszunehmen (siehe **Tabelle 6.**). Die gleiche Tendenz der Ergebnisse blieb, war entsprechend nach unten verschoben.

Hämatoxylin Skala	0	160	
DAB-Skala	0	55	3 fach-positiv
DAB-Skala	56	110	2 fach-positiv
DAB-Skala	111	160	1 fach-positiv

Tabelle 6. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 2.

4.8.2.3 Version 3:

In diesem Programm wurde die anfängliche Messung des Hämatoxylins komplett weggelassen, um nur die Braunfärbung zu bewerten (siehe **Tabelle 7**). Bei der visuellen Betrachtung fiel jedoch auf, dass die Auswertung nicht genau genug war.

Hämatoxylin Skala	160	160	
DAB-Skala	0	55	3 fach-positiv
DAB-Skala	56	110	2 fach-positiv
DAB-Skala	111	160	1 fach-positiv

Tabelle 7. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 3.

4.8.2.4 Version 4:

Das Hämatoxylin in dem vierten Programm wurde wieder gemessen (siehe **Tabelle 8**). Dieses Mal jedoch mit einem Unterschied: die Blautöne wurden differenziert gemessen damit hellblaue Töne als Hämatoxylin gewertet, dunkle Stellen jedoch als DAB-Flächen gewertet wurden. Die DAB-Skala von Programm zwei wurde wieder eingesetzt. Dieses Färbeprogramm spiegelte am besten die Unterschiede innerhalb der Färbungen.

Hämatoxylin Skala	0	120	
DAB-Skala X	0	55	3 fach-positiv
DAB-Skala Y	56	110	2 fach-positiv
DAB-Skala Z	111	160	1 fach-positiv

Tabelle 8. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 4.

4.9 Manuelle Auswertung

Die manuelle semiquantitative Auswertung erfolgte visuell an einem Lichtmikroskop durch zwei unabhängige Untersucher. Die Auswahl der Strukturen erfolgte nach festgelegten Kriterien, die dem **Kapitel 4.7** entnommen werden können. Ein Farbcode, der mit der Intensität der Braunfärbung korrelierte wurde benutzt und im Vorfeld besprochen (siehe **Tabelle 9.**). Die Stärke der Färbung wurde vor der Analyse durch exemplarische Festlegung an Bildern durchgeführt, damit mögliche Verzerrungen durch unterschiedliche Wahrnehmungen minimiert werden können (siehe **Abbildung 11.**). Möglichkeiten waren die „negative“, bei keinem Vorliegen von Braunfärbung, „positive“ bei geringer Braunfärbung, oder „stark positive“ bei starker Färbung (siehe **Abbildung 11.**). Die Strukturen, die begutachtet wurden, sind folgende: kortikal; Glomerulus, proximaler-, distaler -Tubulus, medullär; Intermediärtubulus und Sammelrohr. Je fünf repräsentative Vertreter der jeweiligen Struktur pro Präparat wurden ausgesucht, und jeweils mit dem Farbcode bewertet. Da die Färbung in der Regel innerhalb des Tubulusanschnittes homogen ist, wurde der Code für die einzelnen Strukturen als Gesamtbetrachtung ohne das Lumen zu berücksichtigen angewendet. Diese Werte wurden prozentual für den Schnitt ausgewertet (zum Beispiel: in Schnitt X sind drei Glomeruli positiv (+), zwei Glomeruli sind negativ (-). Das ergibt in der Auswertung der Glomeruli insgesamt für Schnitt X: 60% schwach gefärbt (+), 40% negativ (-)).

Da es durch vorherige Analysen keinen Anhalt auf eine geographisch beeinflusste Verteilung der Kanäle ergab, wurden je nach Qualität des Gewebes die Formalinproben von der rechten Niere oben oder unten analysiert (Bei den Körperspendern 3a,4a,8a,10a,15a stammen die Proben aus der rechten Niere unten, bei den anderen aus der rechten Niere oben).

Negativ	Positiv	Stark positiv
Keine Braunfärbung	Schwache Braunfärbung	Starke Braunfärbung
-	+	++

Tabelle 9. Code für die manuelle Betrachtung und Analyse der Färbungen. Die Braunfärbung bezieht sich auf die betrachtete anatomische Struktur

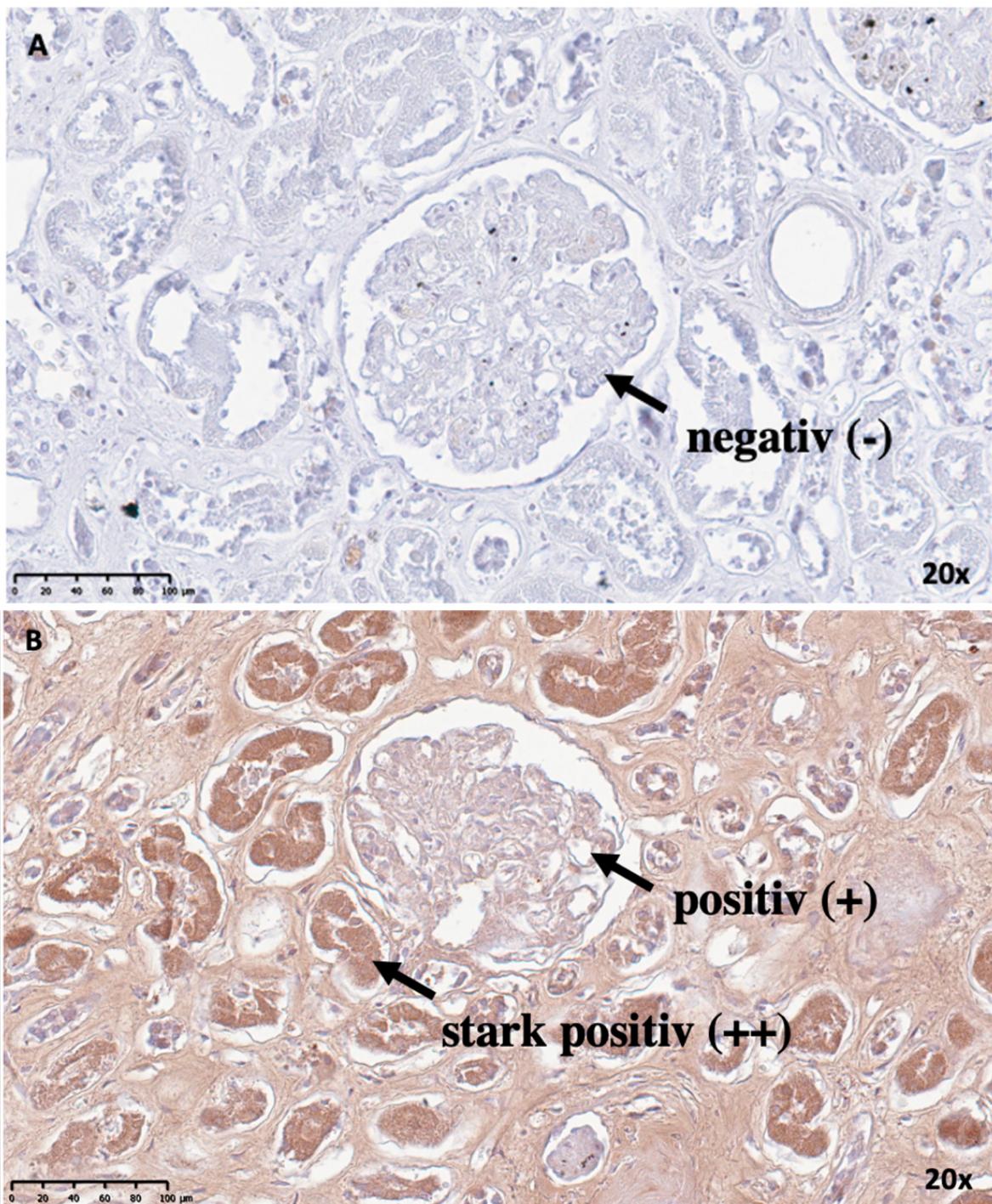


Abbildung 11. Darstellung des Farbcodes für die manuelle Analyse der Färbungen. Abbildung A und B zeigen immunhistochemische anti-TRPC3 Färbungen und stellen die exemplarisch festgelegten Kriterien der manuellen Auswertung anhand von Intensitätsunterschieden der Färbung dar. Abbildung A ist die Negativkontrolle von Patient 11a und weist eine als negativ (-) interpretierte Färbung auf. Abbildung B ist die Positivkontrolle von Patient 12a und zeigt ein positives Signal (+) im Glomerulus sowie ein stark positives Signal (++) im proximalen Tubulus.

4.10 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem GraphPad Prism Softwarepaket (GraphPad, Version 10.0.3) durchgeführt. Der Mittelwert \pm der Standardabweichung wurde benutzt. Der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Dunns multiplem Vergleichstest (angegeben als "Dunn"), wurde zum Vergleich der Ränge mehrerer unabhängiger Gruppen verwendet. Bei Vergleichen von zwei Gruppen kam der Mann-Whitney-U Test zur Anwendung. Die P-Werte (P) galten als signifikant, wenn sie kleiner als 0,05 waren.

4.11 Material

Folgende Tabellen stellen benutzte Materialien dar.

4.11.1 Geräte

Gerätename	Hersteller
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano-em, Zentr. ChL
GFL-Paraffinbad 1052	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgweddel, Deutschland
Wärmeplatte	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wärmeschrank	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	VWR. International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Labor-Abzugsgaube Captair®Flex® M321	Erlab®group, Val-de-Reuil Cedex, Frankreich
Mikrotom Microm RM 2025	Heidelberg Instruments, Heidelberg, Deutschland
Nikon ECLIPSE E200 LED Fotomikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Paraffin Ausgießstation MPS/P1	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin-Dispenser	MEDAX GmbH & Co, Neumünster, Deutschland
Pipette	VWR International, Pennsylvania, USA
Vortexer	Heathrow scientific, Illinois, USA
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlanlage für Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH&Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Hamamatsu Nano Zoomer S210	Hamamatsu, Japan

Tabelle 10. Geräteliste.

4.11.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Biopsiestanze 8 mm	Kai Industries Co Ltd, Japan
Einbettkasten Macro, weiß	Ref.:M512, Simport Scientific Inc, Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Roti-Plast-Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen DB80	Leica Microsystem Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
SuperFrost®Plus Objektträger	Ref.: J1800ARLX, R. Langenbrinck GmbH, Labor und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Objektträger mit Mattrand	Art.-Nr.: 1110022A, Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Deckgläser 24x60mm + 24x50mm	Zentralmagazin Universitätsklinikum des Saarlandes, Deutschland
Filtrerpapier	Ref.:534018, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
Eindeckmedium Roti-HistoKitt©	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 0-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL	VWR International, Pennsylvania, USA
1,5ml Reagiergefäß	Ref.: 703224, Zentrales Chemikalienlager, Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Feuchte Kammer	Panalo-em, Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Filterpapier	Ref.: 534018 Macherey-Nagel GmbH und Co, KG, Düren, Deutschland
DakoPen	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
Destilliertes Wasser	MilliQ Reference A+, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Einbettkasten Macro, Weiß	Ref.: M512, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Einbettringe	Ref.: M460, Simport Scientifix Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada

PROLENE 1.0 Nahtmaterial	Ethicon US LLC, Cincinnati, USA
Skalpellklingen Nr. 22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 11. Verbrauchsmaterialien.

4.11.3 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Formaldehydlösung 3.5 %	Ref.: 27244, Otto Fischar GmbH & Co, KG, Saarbrücken, Deutschland
Isopropanol-97%	Ref.: 700212, Zentrales Chemikalienlager (ZchL), Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Xylol	Zentrales Chemikalienlager (ZchL), Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin 0,1%	Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Citratpuffer pH6, Antigen Retrieval Buffer	Ref.: ab93678, Abcam, Cambridge, Großbritannien
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eosin	ZChL, Universität des Saarlandes, Deutschland
Essigsäureanhydrid	ZChL, Universität des Saarlandes, Deutschland
Ethanol	CARL Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 35%	Ref.: 8683.4, ZChL, Universität des Saarlandes, Deutschland
ImmPACT DAB EqV	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA (Bestellnummer: SK-4103)

Kaninchenserum	Ref.: A10547, Life Technologies AG, Carlsbad, USA
Methylbenzoat 99%	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
NEP-Lösung nach Weigner	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Osteosoft®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Versilberungskit nach von Kossa	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS-Pulver	Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Plast Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 12. Chemikalien und Lösungen.

4.11.4 Substanzen für die Immunhistochemie

Substanz	Hersteller
Primärantikörper (anti-TRPC3-Antikörper)	Ref.: ACC016, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärantikörper (HRP goat anti-rabbit 1:500)	Ref.: A10547, Invitrogen AG, Carlsbad, USA
Kontrollpeptid (TRPC3 Blocking-Peptide)	Ref: BLP-CC016, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Kaninchenserum (normal rabbit Serum)	Ref.: A10547, Life Technologies, Carlsbad, AG, USA
Normal Goat Serum (NGS, normales Ziegenserum)	Ref.: G6767; Sigma Aldrich, Zentr. ChL.

Tabelle 13. Substanzen für die immunhistochemischen Färbungen.

4.11.5 Programme

Visiopharm Programm	Version 09.2021, Visiopharm Denmark
Image Viewing Software NDP.View2 Viewing Software U-12388-01	©Hamamatsu Photonics K.K. and its affiliates, JAPAN
GraphPad Prism-Softwarepaket	©GraphPad Software, Version 10.0.3

Tabelle 14. Benutzte Programme.

5 Ergebnisse

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Analysemethoden für die jeweiligen Probengruppen.

	Anzahl der manuell analysierten Proben	Anzahl der maschinell analysierten Proben
Formalinproben (n = 13)	13	4
NEP-Proben (n = 3)	3	1
OP-Proben (n = 10)	0	10
Maus-Proben (n = 7)	0	7
Nephrokalzinose-Proben (n = 5)	0	5

Tabelle 15. Übersicht von Anzahl und Art der analysierten Proben pro Gewebegruppe.

5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die HE-gefärbten Präparate dienen der Begutachtung des Gewebes, um Auffälligkeiten oder Pathologien aufdecken zu können. Das Gewebe wurde als altersentsprechend in den verschiedenen Gruppen eingestuft. Verschiedene Autolysegrade sind festzustellen. Das NEP-Gewebe ist im Gesamtbild am schlechtesten erhalten. Darauf folgt das formalinfixierte Gewebe. Die OP-Proben sind am besten erhalten. **Abbildung 12.** zeigt Ausschnitte von Rinde und Mark von NEP- (A, D, G), formalin-fixiertes Gewebe (B, E, H) und OP-Proben (C, F, I). **Abbildung 13.** zeigt Übersichten der Mausniere, **Abbildung 14.** die einzelnen Strukturen der Mausniere in höherer Vergrößerung.

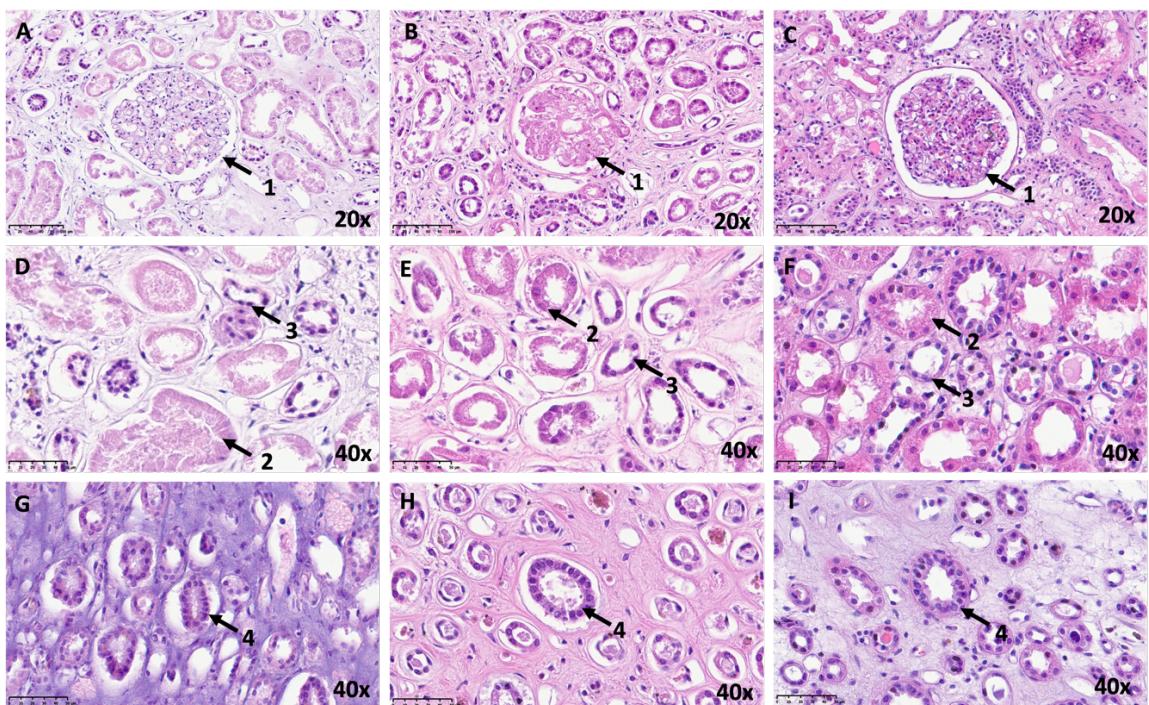


Abbildung 12. HE-Färbung des menschlichen Gewebes mit unterschiedlichen Fixierungen. NEP-fixiertes-(A, D, G; Patient 16a), formalinfixiertes (B, E, H; Patient 2a) sowie OP-Gewebe (C, F, I; Patient 3b). Abbildung A, B, C, D, E, F zeigen die Rinde. Abbildung G, H, I das Mark. In Abbildung A, B, C sind Glomeruli (1) zu sehen. In Abbildung D, E, F proximale (2) und distale Tubuli (3). In Abbildung G, H, I sind Sammelrohre (4) zu sehen.

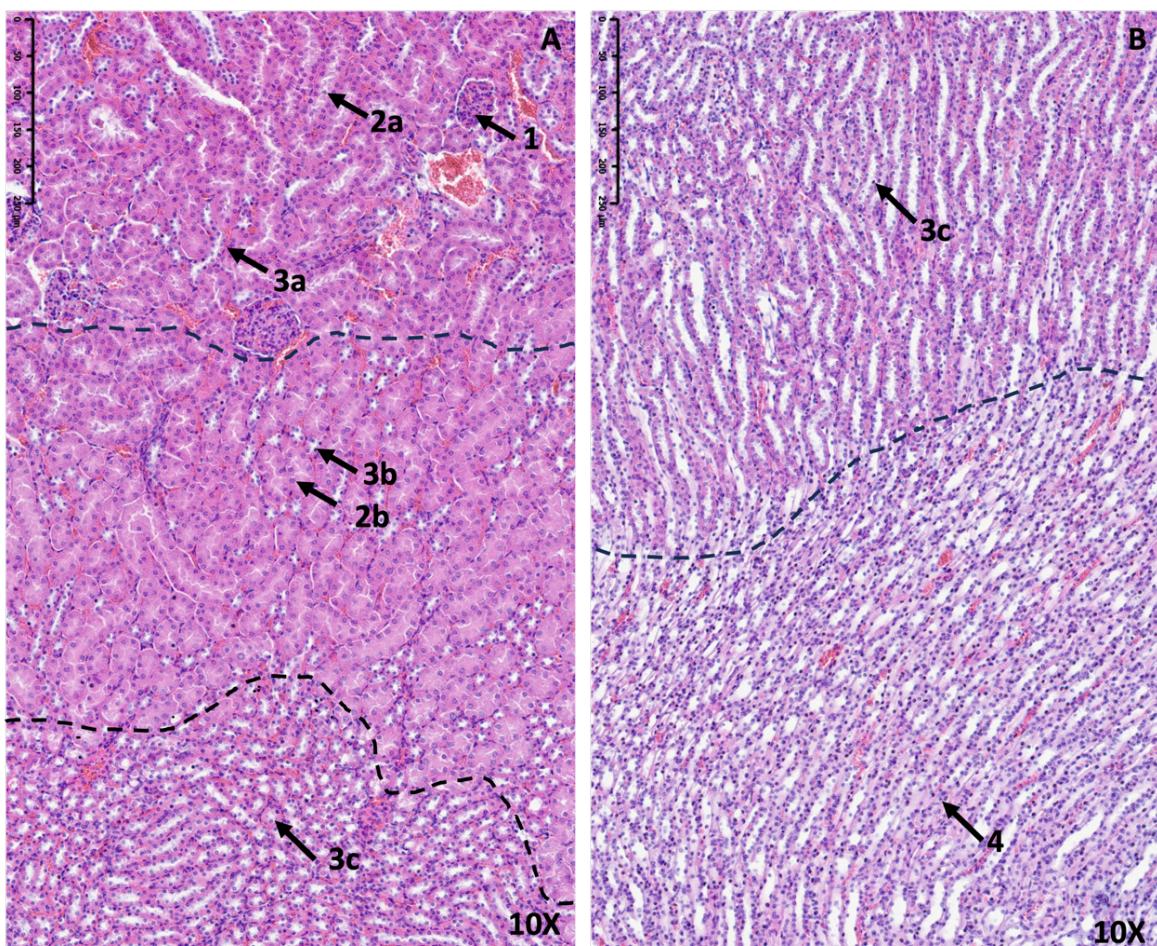


Abbildung 13. HE-Färbung des tierischen Gewebes als Übersichtsaufnahme. Dabei handelt es sich um Gewebe von der Maus 4. Abbildung A zeigt den Übergang von Rinde (Bereich über der oberen gestrichelten Linie) zum Außenstreifen des äußeren Marks (Bereich zwischen der oberen blauen und unteren schwarzen gestrichelten Linie). Ein Glomerulus (1), proximaler (2a) und distaler Tubulus (3a) in der Rinde sind gekennzeichnet. Ein proximaler (2b) und distaler (3b) Tubulus in Außenstreifen des äußeren Marks ebenso. Dazu, der Übergang des Außenstreifens (Bereich zwischen der oberen und unteren gestrichelten Linie) zum Innenstreifen (Bereich unter der unteren gestrichelten Linie) des äußeren Marks, wo sich distale Tubuli (3c) befinden. Abbildung B zeigt den Übergang zwischen dem Innenstreifen des äußeren Marks (über der gestrichelten Linie) mit distalen Tubuli (3c) zum Innenmark (unter der gestrichelten Linie) wo sich Sammelrohre (4) befinden.

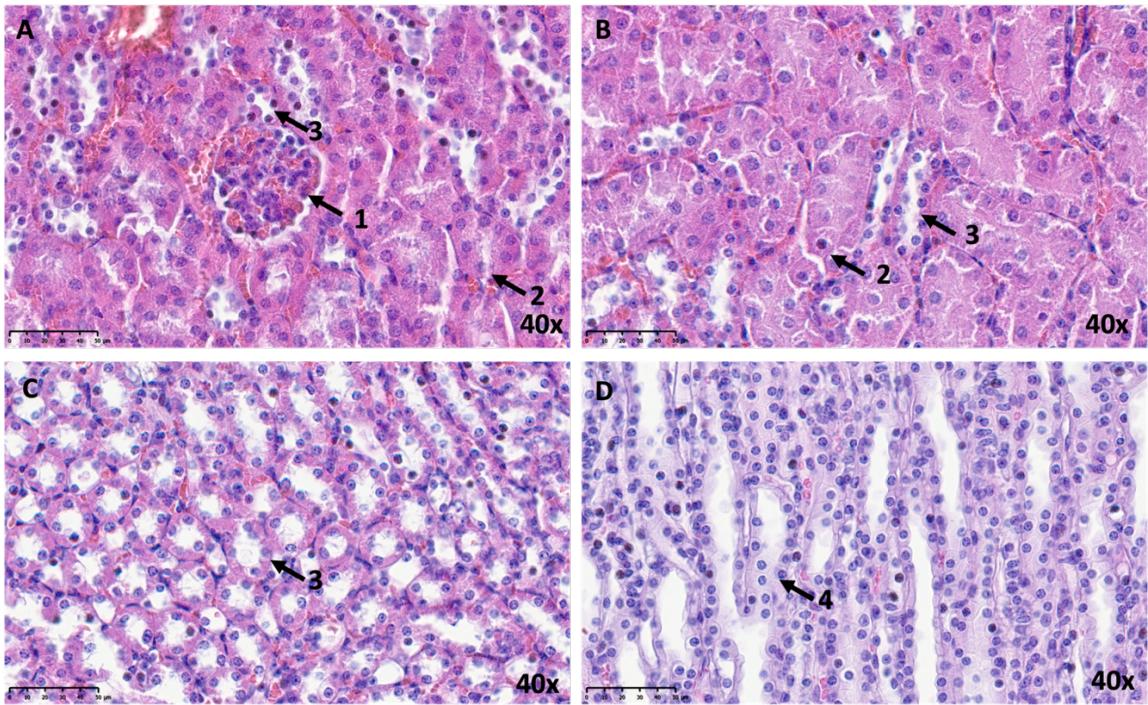


Abbildung 14. HE-Färbung des tierischen Gewebes der Niere. Dabei handelt es sich um Gewebe von Maus 4. Abbildung A zeigt ein Glomerulus (1), proximaler (2) und distaler (3) Tubulus in der Rinde. Abbildung B zeigt ein proximaler (2) und distaler (3) Tubulus im Außenstreifen des äußeren Marks. Abbildung C zeigt ein distaler Tubulus (3) im Innenstreifen des äußeren Marks. Abbildung D zeigt ein Sammelrohr (4) im inneren Mark.

5.2 Formalinfixierte Proben

Die Auswertung des formalinfixierten Gewebes wurde für 13 Proben manuell und für vier Proben maschinell durchgeführt. Eine detaillierte Erläuterung der dafür festgelegten Methodik befindet sich in **Kapitel 4.8 und Kapitel 4.9**. Die manuelle und maschinelle Auswertung kann nicht genau verglichen werden. Jedoch werden analog maschinelle Werte zwischen null und eins als negativ (-), Werte zwischen 1 und 1.5 als schwach gefärbt (+) und über 1.5 als stark gefärbt (++) dargestellt.

5.2.1 Manuelle Auswertung

Die tabellarische Auswertung befindet sich in **Tabelle 16.** und **Tabelle 17.** Die Tendenz der Ergebnisse ist bei beiden Gutachtern mit feinen Unterschieden ähnlich. Die Glomeruli und die distalen Tubuli sind meistens schwach gefärbt (+) (jeweils 88% und 73% der distalen Tubuli bei Betrachtung der Ergebnisse jeden Gutachters). Die proximalen Tubuli und die Sammelrohre sind stark gefärbt (++) (jeweils 76% und 60% der Fälle der proximalen Tubuli bei Betrachtung der Ergebnisse jeden Gutachters). Die Intermediärtubuli in 86% der Fälle negativ (-) bei Betrachtung der Ergebnisse jeden Gutachters. **Abbildung 15.** zeigt Strukturen aus den formalinfixierten Färbungen. Die **Diagramme 1. bis 5.** zeigen die Auswertung beider Gutachter für die jeweils berücksichtigten Strukturen.

	Glomerulus	Proximaler Tubulus	Distaler Tubulus	Intermediärtubulus	Sammelrohr
1a	+ (100%)	++ (100%)	+ (80%) - (20%)	- (100%)	+ (100%)
2a	+ (100%)	++ (100%)	++ (60%) + (40%)	- (100%)	++ (80%) - (20%)
3a	+ (100%)	++ (100%)	+ (100%)	- (100%)	++ (100%)
4a	+ (80%) - (20%)	++ (100%)	+ (100%)	- (100%)	++ (100%)
5a	+ (100%)	++ (100%)	+ (100%)	+ (40%) - (60%)	++ (100%)
6a	+ (100%)	++ (100%)	+ (40%) - (60%)	- (100%)	++ (100%)
7a	+ (100%)	++ (80%) - (20%)	+ (100%)	- (100%)	++ (100%)
8a	+ (80%) - (20%)	+ (100%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)
9a	+ (100%)	++ (100%)	+ (80%) - (20%)	+ (20%) - (80%)	+ (100%)
10a	+ (20%) - (80%)	+ (100%)	+ (80%) - (20%)	- (100%)	++ (100%)
11a	+ (100%)	++ (100%)	+ (100%)	- (100%)	+ (100%)
12a	+ (100%)	+ (100%)	+ (80%) - (20%)	- (100%)	+ (40%) - (60%)
13a	+ (100%)	++ (80%) + (20%)	+ (80%) - (20%)	+ (80%) - (20%)	++ (100%)

Tabelle 16. Ergebnisse der manuellen Auswertung der formalinfixierten Proben, Gutachter 1.

	Glomerulus	Proximaler Tubulus	Distaler Tubulus	Intermediärtubulus	Sammelrohr
1a	+ (100%)	++ (100%)	+ (80%) - (20%)	- (100%)	+ (100%)
2a	+ (60%) - (40%)	++ (100%)	+ (40%) - (60%)	+ (40%) - (60%)	++ (80%) + (20%)
3a	+ (100%)	++ (100%)	++ (20%) + (80%)	- (100%)	++ (100%)
4a	+ (80%) - (20%)	++ (100%)	+ (100%)	- (100%)	++ (100%)
5a	+ (100%)	++ (100%)	+ (100%)	+ (80%) - (20%)	++ (100%)
6a	+ (100%)	++ (100%)	+ (20%) - (80%)	- (100%)	++ (100%)
7a	+ (80%) - (20%)	++ (40%) + (60%)	+ (100%)	- (100%)	++ (100%)
8a	+ (80%) - (20%)	+ (100%)	- (100%)	- (100%)	- (100%)
9a	+ (100%)	++ (100%)	+ (80%) - (20%)	+ (20%) - (80%)	+ (100%)
10a	+ (20%) - (80%)	+ (100%)	+ (80%) - (20%)	- (100%)	++ (100%)
11a	+ (100%)	++ (100%)	+ (100%)	- (100%)	+ (100%)
12a	+ (100%)	+ (100%)	+ (80%) - (20%)	- (100%)	+ (40%) - (60%)
13a	+ (100%)	++ (80%) + (20%)	+ (80%) - (20%)	+ (80%) - (20%)	++100%

Tabelle 17. Ergebnisse der manuellen Auswertung der formalinfixierten Proben, Gutachter 2.

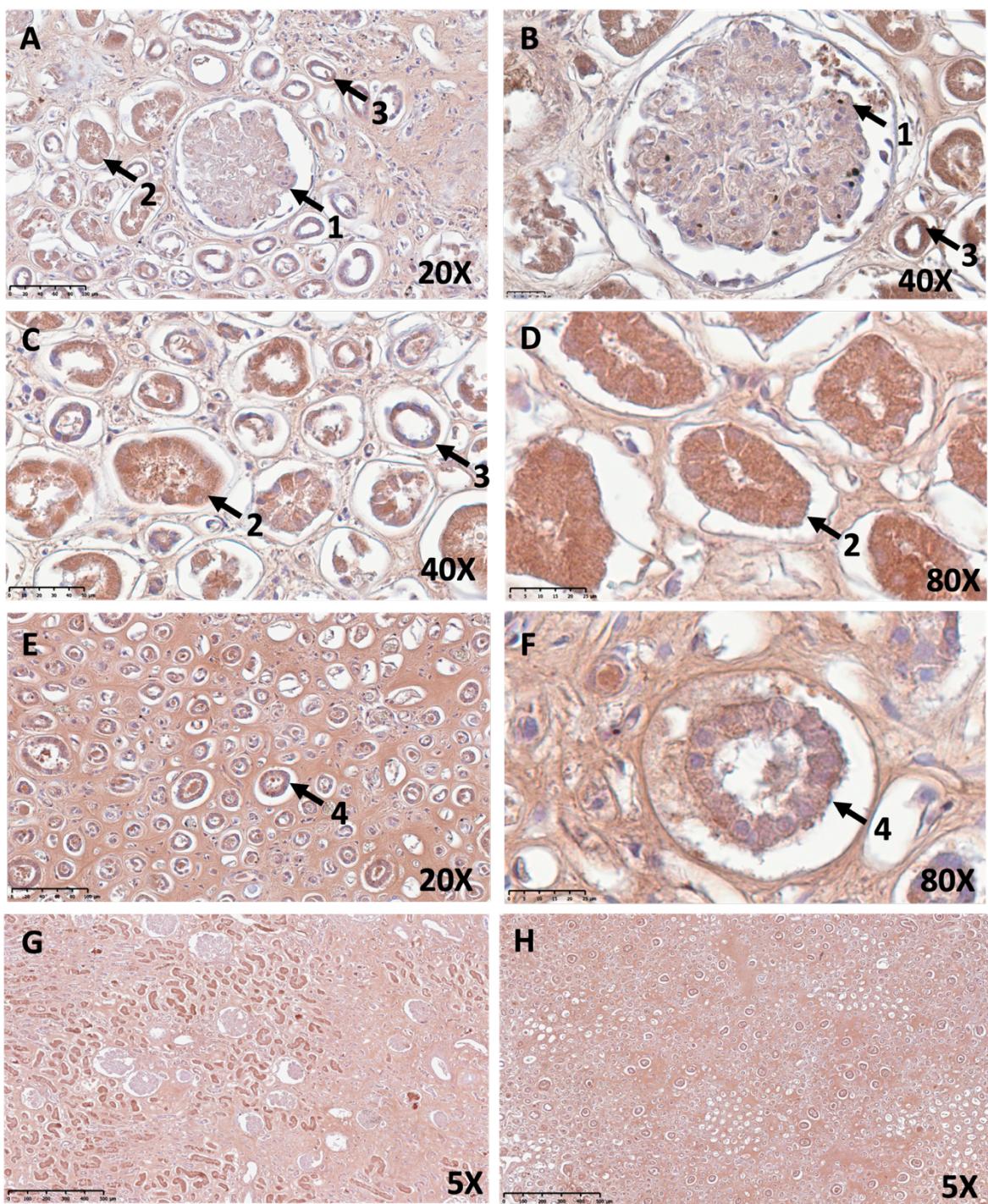


Abbildung 15. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von formalinfixiertem Gewebe. Dabei handelt es sich um Gewebe vom Körperspender 2a. Abbildungen A und B zeigen positive (+) Glomeruli (1). Abbildungen A, B, C und D zeigen stark positive (++) proximale (2) und distale (3) Tubuli in verschiedenen Vergrößerungen. Abbildungen E und F zeigen stark positive (++) Sammelrohre (4). In G und H sieht man Übersichtsaufnahmen der Rinde (G) und des Marks (H).

Manuelle Auswertung der Färbung der Glomeruli
der formalinfixierten Körperspender je nach Gutachter

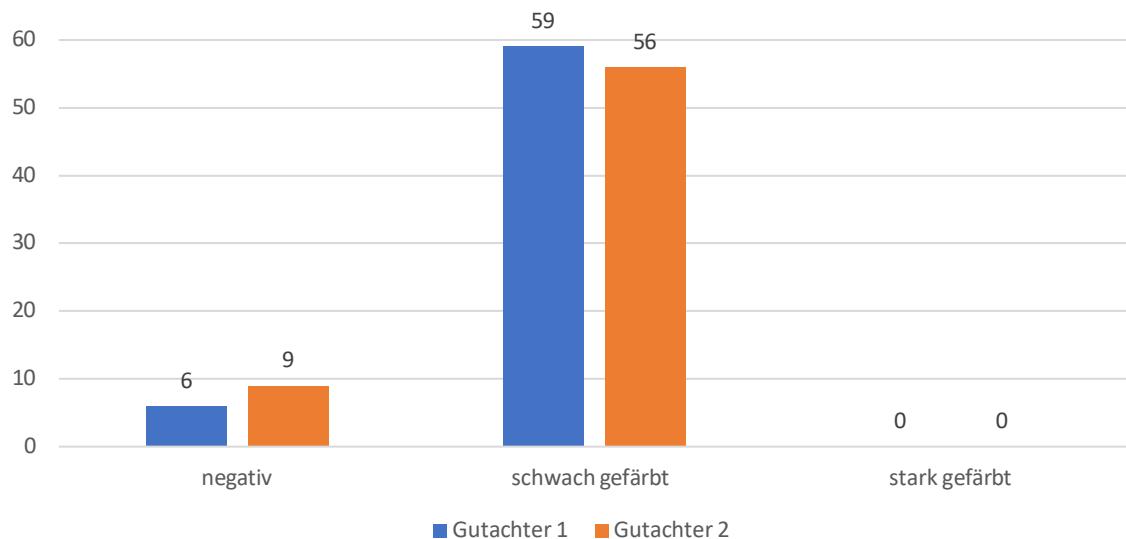


Diagramm 1. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Glomeruli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter ($n = 13, 65$ Strukturen). Die meisten Glomeruli sind schwach gefärbt (+). Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

Manuelle Auswertung der Färbung der proximalen Tubuli
der formalinfixierten Körperspender je nach Gutachter

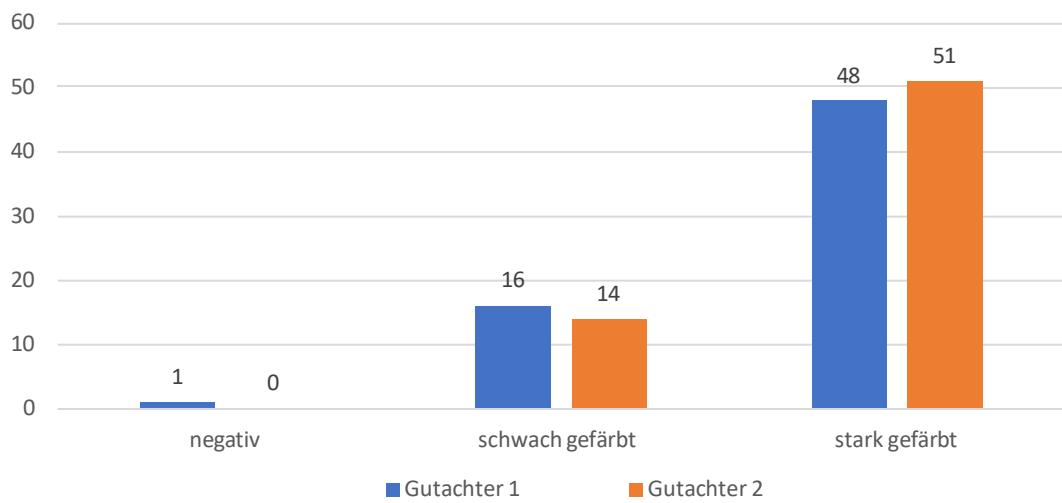


Diagramm 2. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der proximalen Tubuli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter ($n = 13, 65$ Strukturen). Die meisten proximalen Tubuli sind stark gefärbt (++) . Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

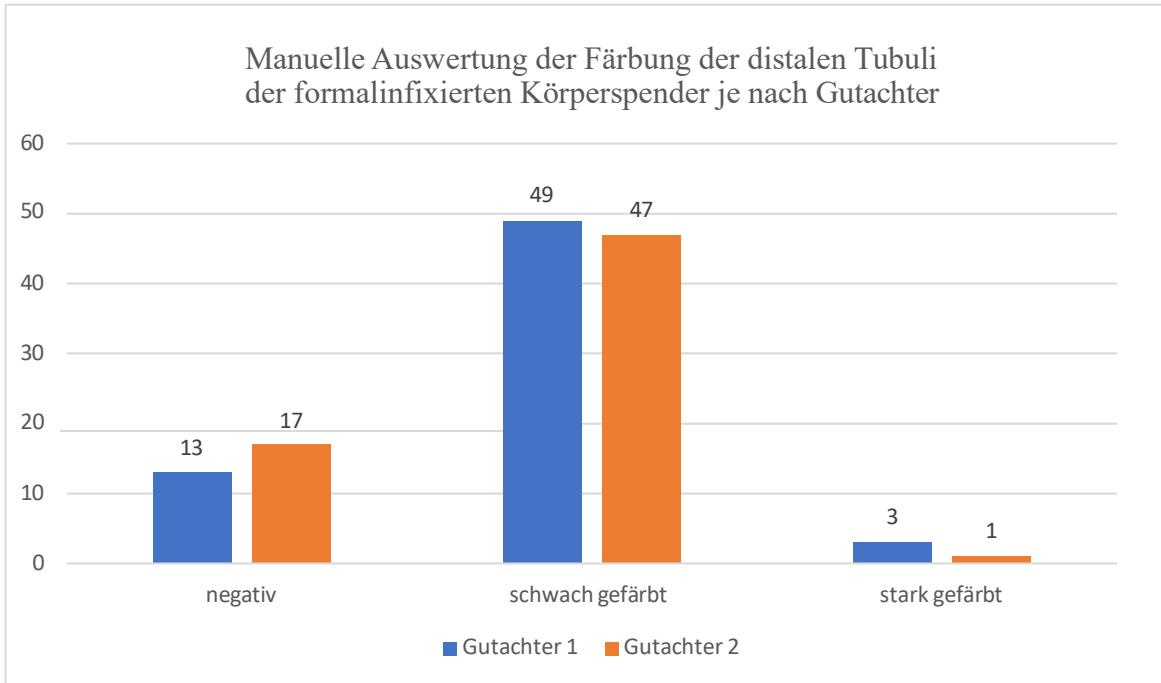


Diagramm 3. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der distalen Tubuli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter ($n = 13, 65$ Strukturen). Die meisten distalen Tubuli sind schwach gefärbt (+). Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

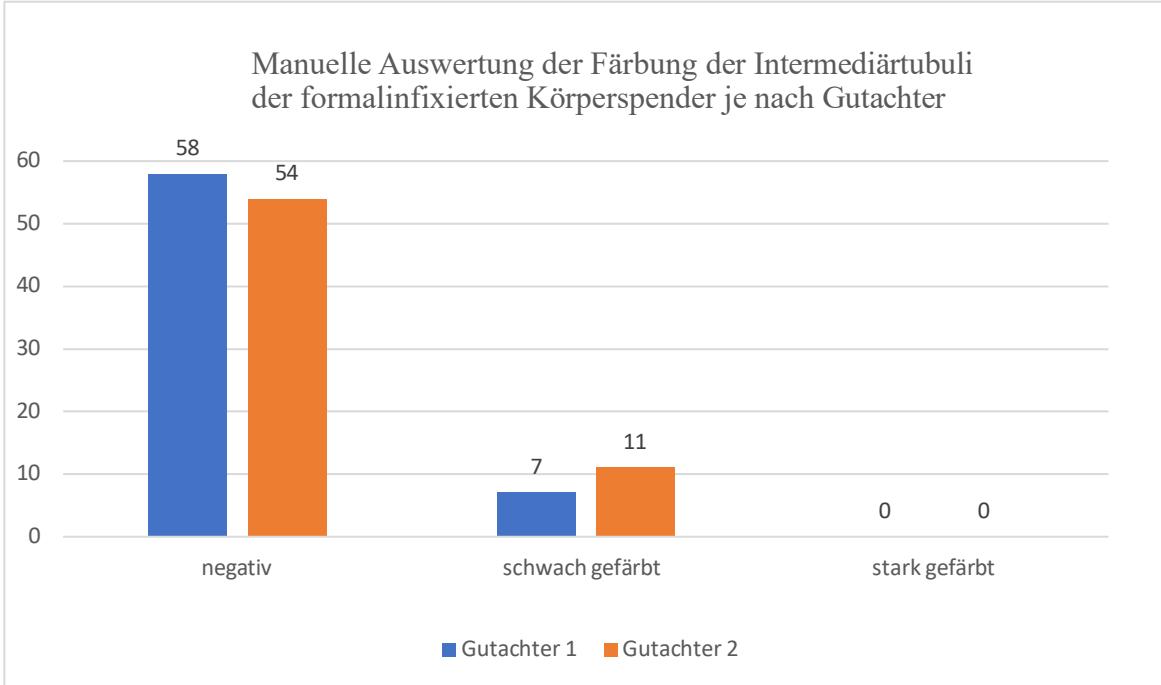


Diagramm 4. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Intermediärtubuli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter ($n = 13, 65$ Strukturen). Die meisten Intermediärtubuli sind negativ (-). Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

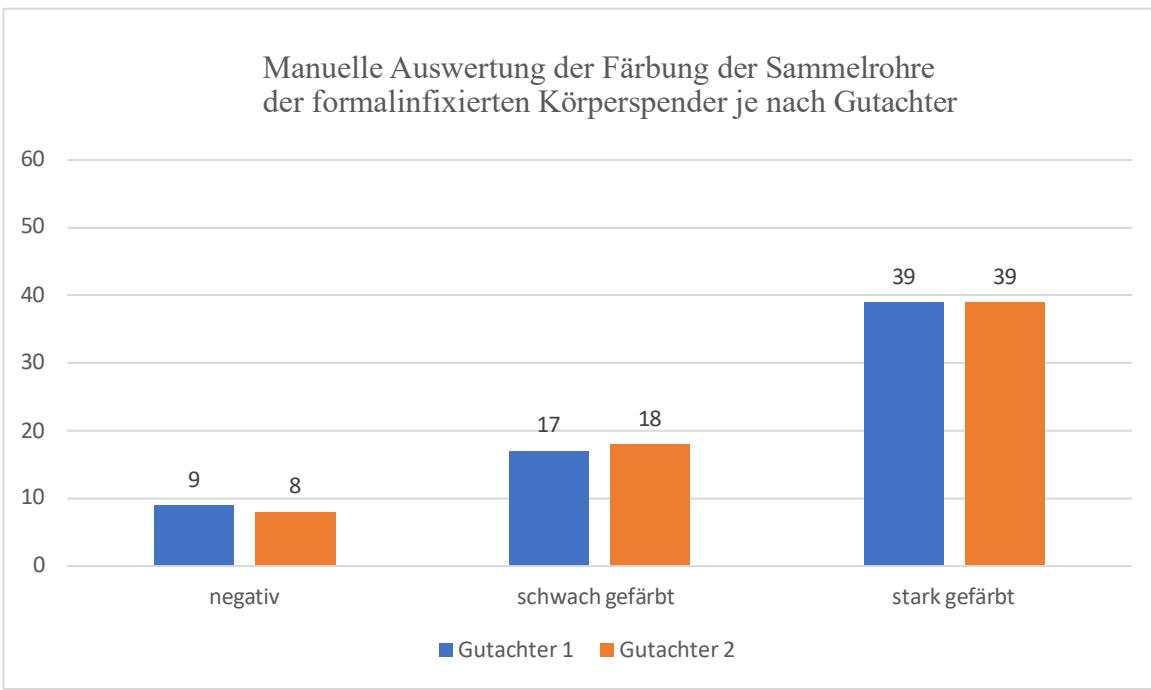


Diagramm 5. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Sammelrohre in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter ($n = 13, 65$ Strukturen). Die meisten Sammelrohre sind stark gefärbt (++). Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

5.2.2 Maschinelle Auswertung

5.2.2.1 Formalinfixierte Körperspender

Diagramm 6. zeigt die Ergebnisse der maschinellen Auswertung der vier Formalinproben. Die Glomeruli und Intermediärtubuli scheinen in der maschinellen Auswertung insgesamt negativ zu sein. Die distalen Tubuli sind im groben Durchschnitt ein-fach gefärbt. Die proximalen Tubuli und Sammelrohre sind stark gefärbt. Die maschinelle Auswertung zeigt eine gleiche Tendenz wie die manuelle Auswertung.

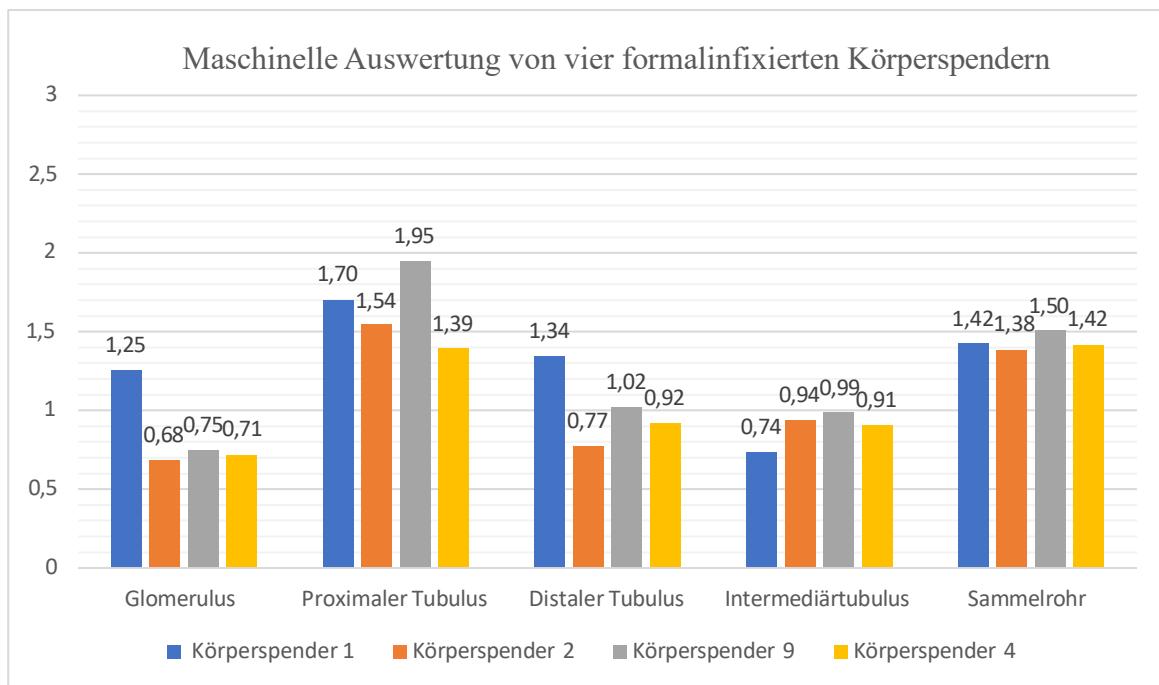


Diagramm 6. Balkendiagramm. Maschinelle Auswertung von vier formalinfixierten Körperspendern. Die gewichteten Werte des DAB-Scores pro Schnitt für den jeweiligen Körperspender stehen auf der vertikalen Achse. Auf der horizontalen Achse stehen die jeweiligen analysierten Strukturen pro Körperspender. Körperspender 1a = blau, Körperspender 2a = orange, Körperspender 9a = grau, Körperspender 4a = gelb.

5.2.3 Vergleich der formalinfixierten Körperspender- und OP-Proben

Ein maschineller Vergleich der immunhistochemischen Färbung von formalinfixierten Körperspender- und OP-Proben wurde durchgeführt. Die gewichteten DAB-Werte der vier Formalin und zehn OP-Nieren wurden mithilfe deskriptiver Statistik und Mann-Whitney-U Tests verglichen, wie in **Kapitel 4.10** beschrieben ist. Die P-Werte und Ergebnisse beziehen sich auf die anatomisch jeweils gleichen Strukturen in beiden unterschiedlichen Gruppen (z.B. Vergleich von Glomerulus von OP-Proben mit Glomerulus von Formalin-Proben). Die statistisch signifikanten Unterschiede werden mit einem Stern („*“) markiert.

Ein signifikanter Unterschied findet man bei dem Vergleich der Färbung der Glomeruli sowie der distalen Tubuli (siehe **Tabelle 18.**). Die Glomeruli in den Formalinproben scheinen signifikant

stärker gefärbt zu sein als die Glomeruli der OP-Proben (H-Wert _{Formalin Glomerulus} = 0.85, SD = 0.27, H-Wert _{OP-Glomerulus} = 0.29, SD = 0.14, P = 0.002, P < 0.05). Die distalen Tubuli in der OP-Gruppe scheinen statistisch signifikant gefärbter zu sein als die in der Formalin Gruppe (H-Wert _{Formalin DT} = 1.01, SD = 0.24, H-Wert _{DT OP} = 1.51, SD = 0.40, P = 0.03, P < 0.05). Mögliche Erklärungsansätze dafür werden in der Diskussion erläutert. Kein statistisch signifikanter Unterschied findet sich in der IHC-Färbung zwischen OP-Proben und Formalinproben in den anderen untersuchten Lokalisationen.

	Mittelwert des gewichteten DAB-Wertes für die jeweilige Gruppe	SD	P-Wert und Signifikanz
Glomerulus OP	0.29	0.14	P = 0.002*
Glomerulus Formalin	0.85	0.27	
PT OP	1.74	0.22	P = 0.635
PT Formalin	1.65	0.24	
DT OP	1.51	0.40	P = 0.03*
DT Formalin	1.01	0.24	
DT Mark OP	1.35	0.31	P = 0.200
DT Mark Formalin	1.08	0.21	
SR OP	1.79	0.28	P = 0.191
SR Formalin	1.43	0.05	
IT OP	0.95	0.23	P = 0.905
IT Formalin	0.89	0.11	

Tabelle 18. Vergleich der maschinell ausgewerteten formalinfixierten Körperspender-Proben und OP-Proben. PT = proximaler Tubulus, DT = distaler Tubulus, SR = Sammelrohr, IT = Intermediärtubulus. Der P-Wert bezieht sich auf den Vergleich der jeweiligen gleichen anatomischen Strukturen beider Gruppen. SD = Standardabweichung. Ein Stern „*“ markiert eine statistische Signifikanz.

5.3 NEP-fixierte Körperspenderproben

Die NEP-fixierten Proben wurden manuell untersucht (siehe **Tabelle 19.** und **Tabelle 20.**). Eine Probe ermöglichte eine maschinelle Auswertung (siehe **Diagramm 12.**). Da die Größe der untersuchten Gruppe ($n = 3$) viel kleiner ist als die der formalinfixierten Körperspender ($n = 13$) sind die Ergebnisse nur relativ vergleichbar. Die Tabelle und folgende Graphiken sind nach dem gleichen Prinzip wie **Kapitel 5.2.1** aufgebaut. **Abbildung 16.** zeigt die Ergebnisse in Bildern.

5.3.1 Manuelle Auswertung

Die Analyse beider Gutachter ist gleich ausgefallen (siehe **Tabelle 19.** und **Tabelle 20., Diagramm 7.** bis **Diagramm 11.**). Die Ergebnisse weichen etwas von den Ergebnissen der formalinfixierten Proben ab. Die Glomeruli und Intermediärtubuli sind in der Mehrzahl der Fälle schwach gefärbt (+). Die proximalen Tubuli und distalen Tubuli sind meistens stark gefärbt (++) . Die Sammelrohre sind zu fast gleichen Anteilen schwach (+) und stark (++) gefärbt.

Gutachter 1:

KS	Glomerulus	Proximaler Tubulus	Distaler Tubulus	Intermediärtubulus	Sammelrohr
14a	+ (100%)	++ (100%)	++ (100%)	+ (60%) - (40%)	+ (100%)
15a	+ (60%) - (40%)	++ (100%)	- (80%) + (20%)	++ (100%)	- (80%) + (20%)
16a	+ (100%)	++ (100%)	++ (60%) + (40%)	+ (100%)	++ (100%)

Tabelle 19. Ergebnisse der manuellen Auswertung der NEP-fixierten Proben, Gutachter 1. KS = Körperspender.

Gutachter 2:

KS	Glomerulus	Proximaler Tubulus	Distaler Tubulus	Intermediärtubulus	Sammelrohr
14a	+ (100%)	++ (100%)	++ (100%)	+ (60%) - (40%)	+ (100%)
15a	+ (60%) - (40%)	++ (100%)	- (80%) + (20%)	++ (100%)	- (80%) + (20%)
16a	+ (100%)	++ (100%)	++ (60%) + (40%)	+ (100%)	++ (100%)

Tabelle 20. Ergebnisse der manuellen Auswertung der NEP-fixierten Proben, Gutachter 2. KS = Körperspender.

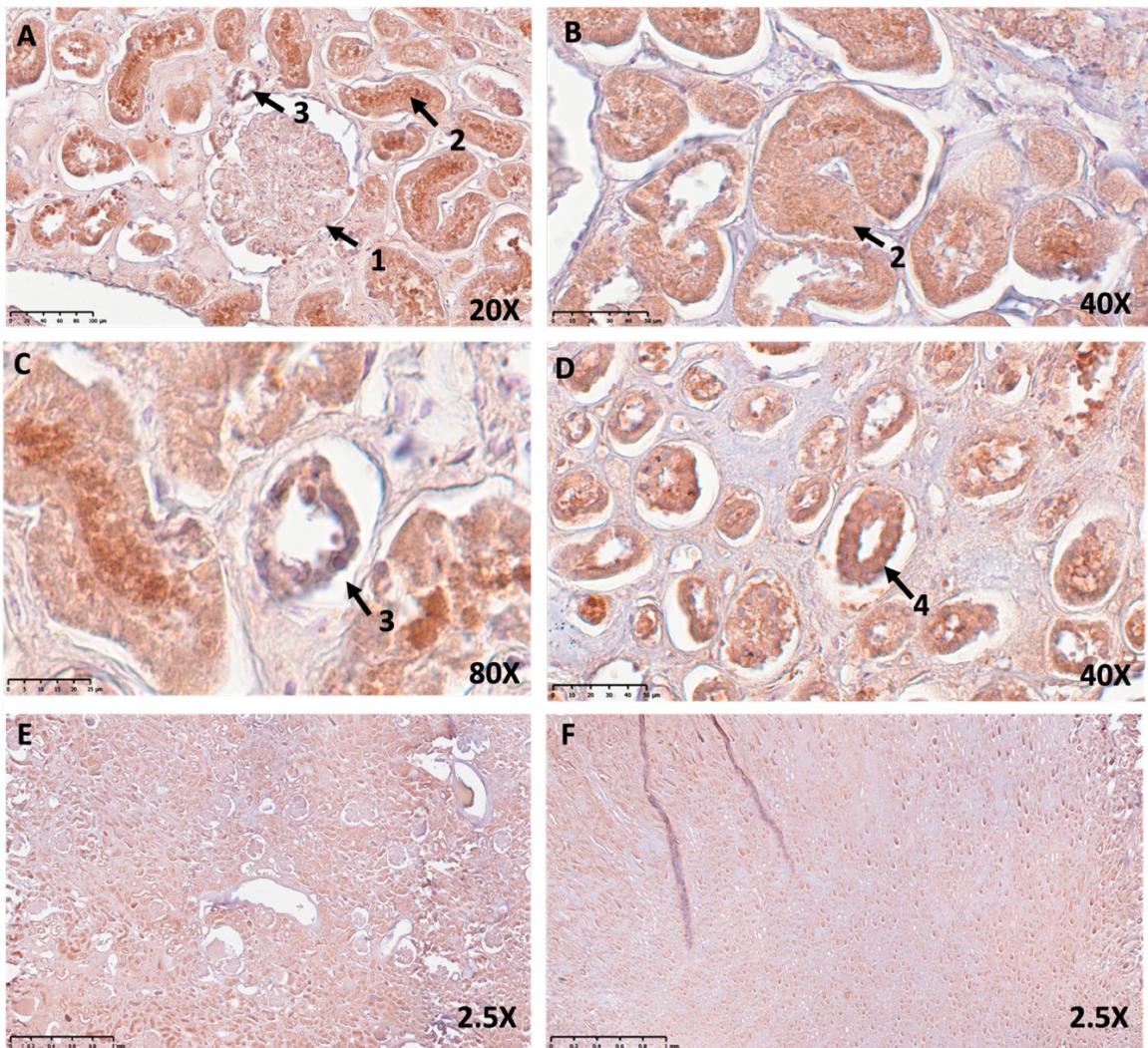


Abbildung 16. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von NEP-fixiertem Gewebe. Dabei handelt es sich um das Gewebe von Körperspender 15a. Abbildungen A zeigt positive (+) Glomeruli (1). Abbildung A, B und C zeigen stark positive (++) proximale (2) und distale (3) Tubuli in verschiedenen Vergrößerungen. Abbildung C zeigt den autolytischen Umbau eines distalen Tubulus. Abbildung D zeigt stark positive (++) Sammelrohre (4). In E und F sieht man Übersichtsaufnahmen der Rinde (E) und des Marks (F).

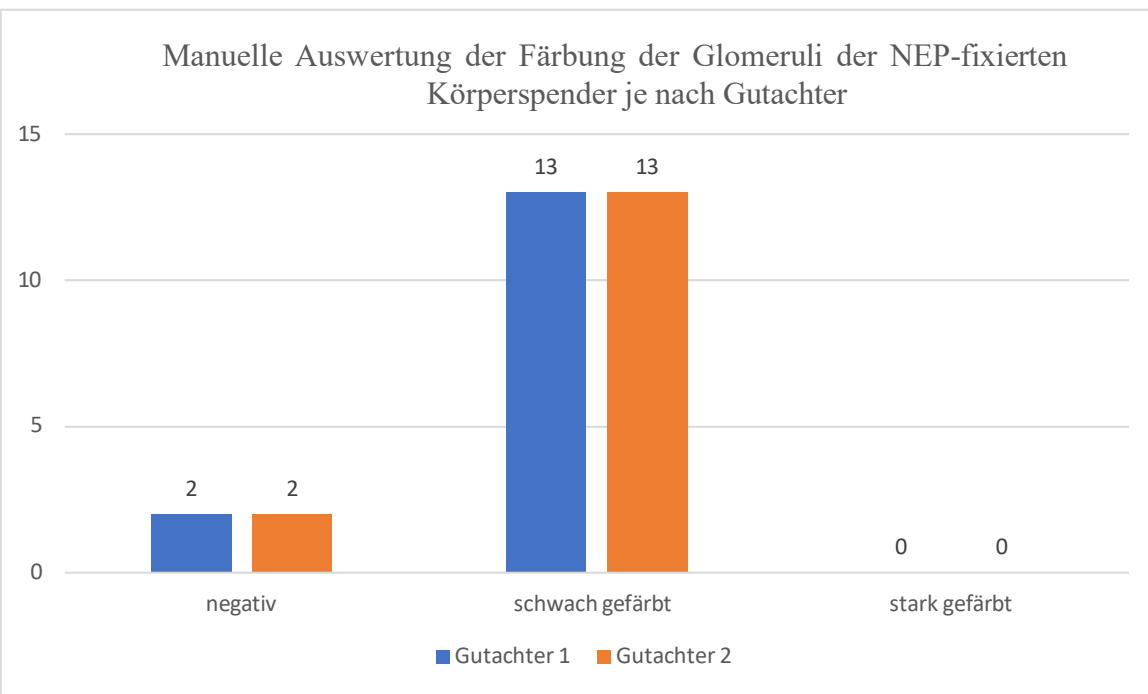


Diagramm 7. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Glomeruli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen). Die meisten Glomeruli sind schwach gefärbt (+). Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

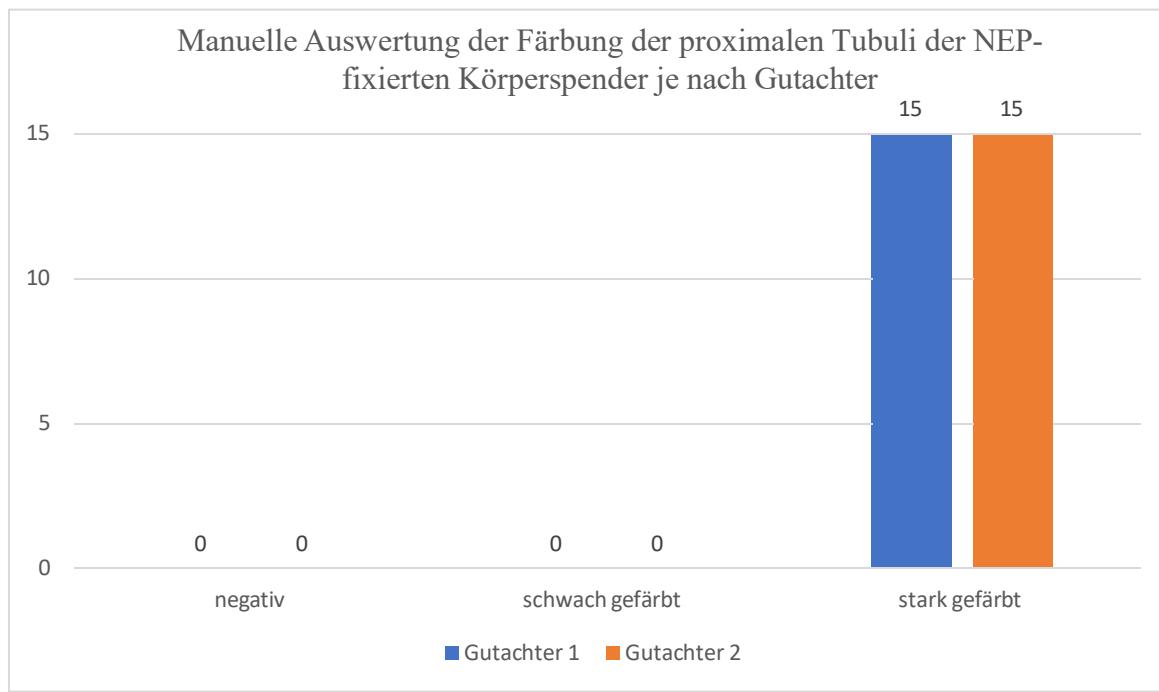


Diagramm 8. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der proximalen Tubuli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen). Die meisten proximalen Tubuli sind stark gefärbt (++) . Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

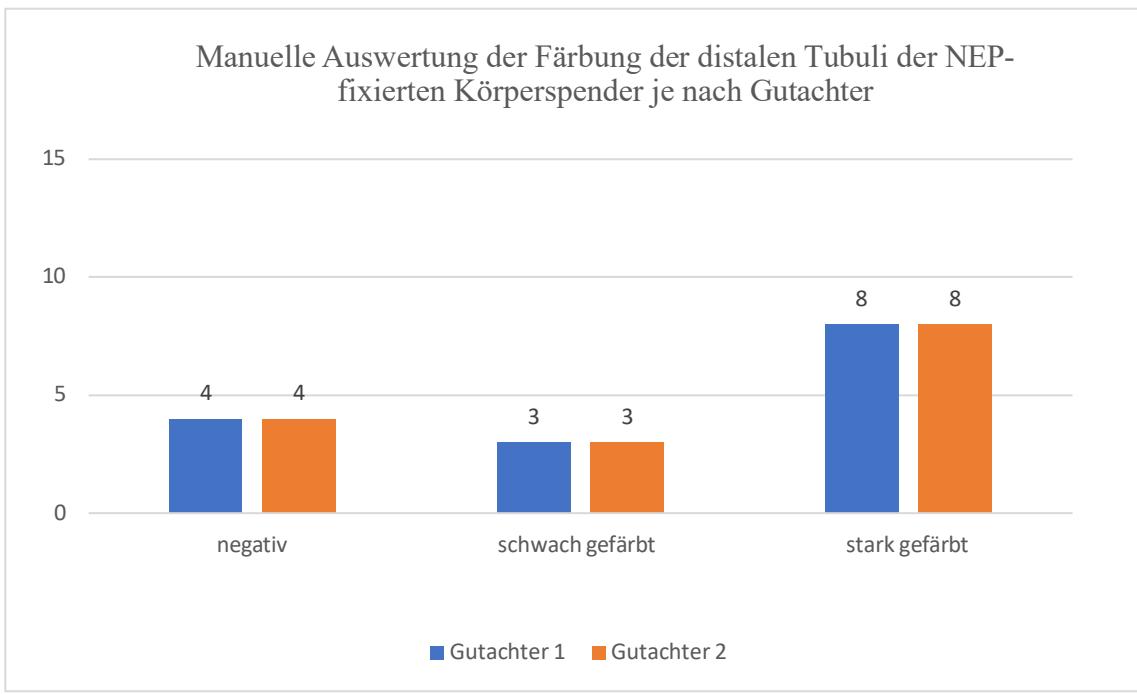


Diagramm 9. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der distalen Tubuli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter ($n = 3, 15$ Strukturen). Die meisten distalen Tubuli sind stark gefärbt (++). Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

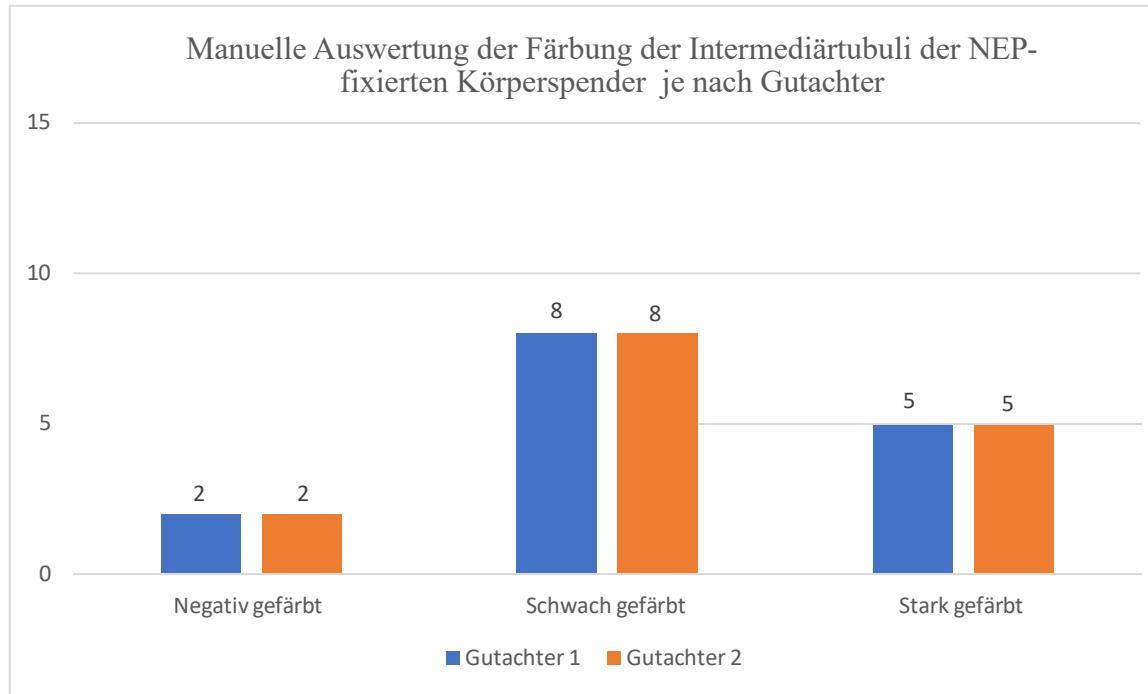


Diagramm 10. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Intermediärtubuli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter ($n = 3, 15$ Strukturen). Die meisten Intermediärtubuli sind stark gefärbt (++). Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

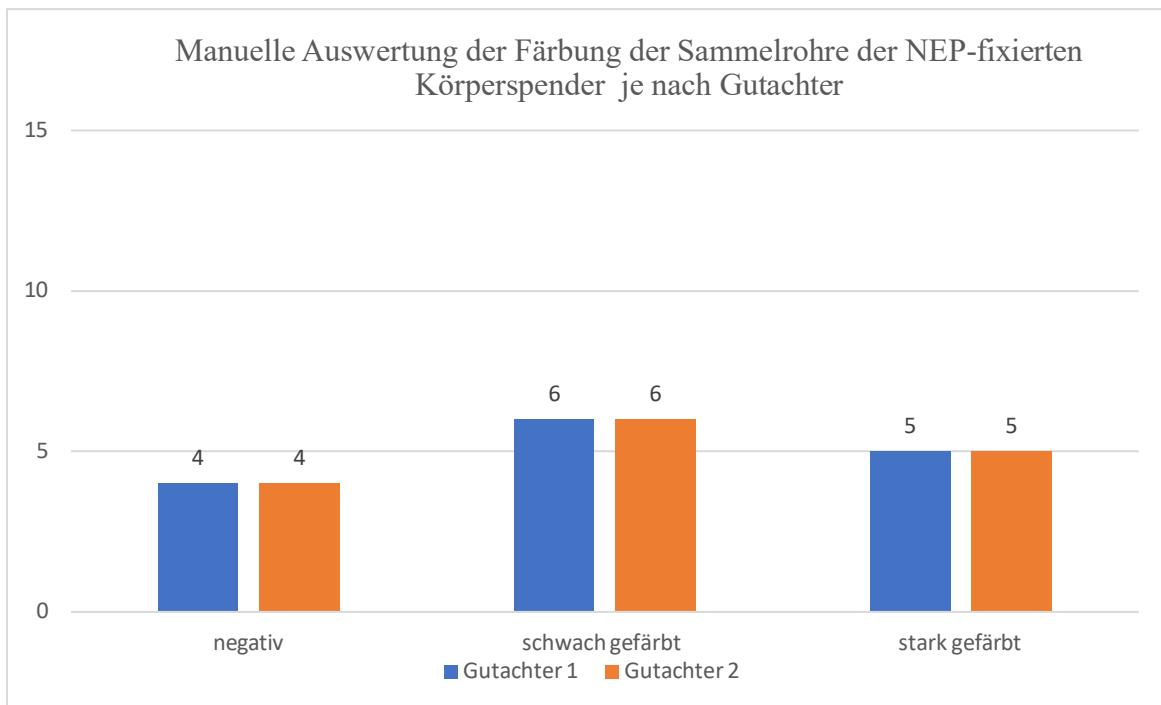


Diagramm 11. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Sammelrohre der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen). Die meisten Sammelrohre sind schwach gefärbt (+), fast der gleiche Anteil sind jedoch stark gefärbt (++) . Auf der vertikalen Achse ist die gesamte Anzahl der Strukturen dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung in negativ (-), schwach (+) und stark (++) gefärbt je nach Gutachter (Gutachter 1 = blau, Gutachter 2 = orange).

5.3.2 Maschinelle Auswertung

Die maschinelle Auswertung einer NEP-Probe ergab folgende Ergebnisse (siehe **Diagramm 12**). Proximale Tubuli und Sammelrohre sind stark gefärbt. Die Glomeruli und Intermediärtubuli sind negativ, gefolgt von den etwas mehr gefärbten distalen Tubuli. Diese Werte entsprechen in etwa den Werten in der maschinellen Auswertung der formalinfixierten Proben.

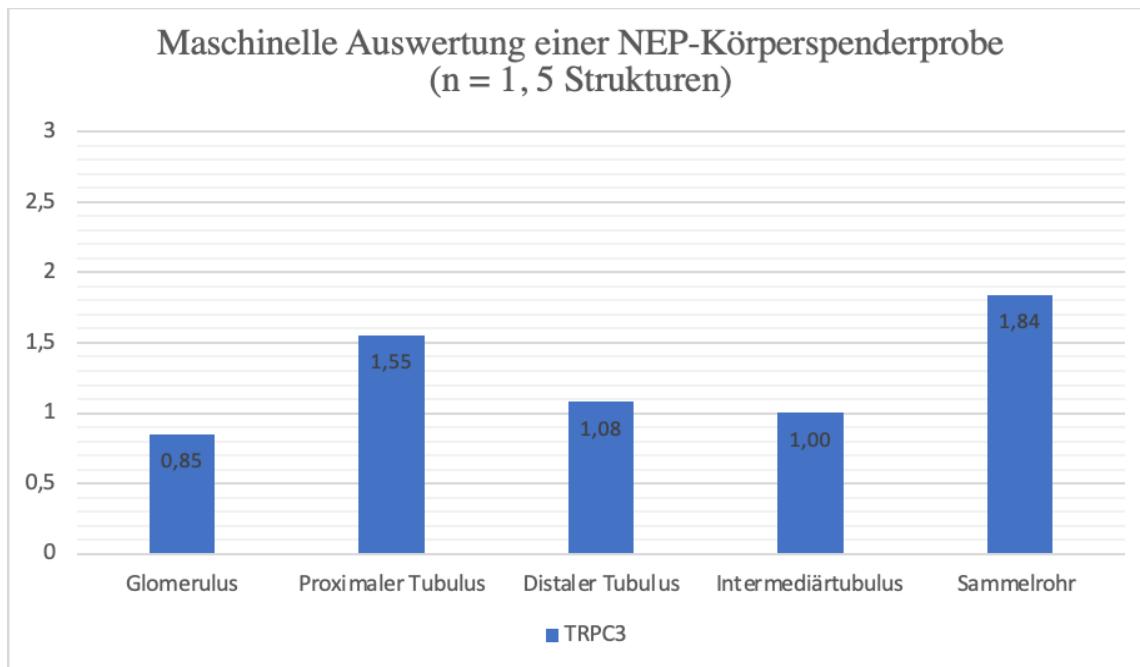


Diagramm 12. Auf der vertikalen Achse ist der summierte gewichtete DAB-Wert für die jeweiligen Strukturen. Auf der horizontalen Achse, die jeweils untersuchten Lokalisationen.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Körperspender

Zusammenfassend, spiegeln sich die manuell ausgewerteten Ergebnisse der formalinfixierten Körperspender in der maschinellen Auswertung wider. Die Glomeruli und Intermediärtubuli sind schwach gefärbt bis negativ, die distalen Tubuli sind schwach gefärbt, proximale Tubuli und Sammelrohre sind stark gefärbt. Im Vergleich von OP-Proben mit formalinfixierten Proben gibt es ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Glomeruli sowie zwischen den distalen Tubuli der jeweiligen beiden Gruppen. Die Glomeruli sind bleiben in beiden Fällen negativ. Die NEP-Ergebnisse der manuellen Auswertung weichen von den bereits erreichten Ergebnissen der formalinfixierten Körperspender ab. Die maschinelle Auswertung von einer NEP-Probe ergibt wiederum die gleiche Tendenz wie die Ergebnisse der formalinfixierten Körperspender, was für eine mögliche Verzerzung in der manuellen Auswertung der NEP-Proben spricht.

5.5 OP- und Tierproben

Die Ergebnisse des folgenden Abschnitts wurden in einer Publikation veröffentlicht (Diebolt *et al.*, 2024). Da die Probensammlung sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren erstreckt hat, sind in der Publikation nur vier Proben für jeweils die Mensch- und Mausgruppe aufgeführt. Die danach erhaltenen Proben wurden daraufhin gefärbt und in die Analyse implementiert. Diese stärken die Datenlage und erweiterte die bereits erhaltenen statistisch signifikanten Ergebnisse. Zusammen sind hier die Ergebnisse der maschinellen Auswertung der zehn menschlichen Proben und sieben Mausproben aufgeführt. Dazu ergab sich ein besonderes Färbemuster in den Mausnieren, welches im folgenden Kapitel beschrieben wird.

5.5.1 Deskriptive Gesamtanalyse der Mausnieren

Da die Mausnieren als gesamte Organe, in der Länge durchgetrennt immunhistochemisch mit dem anti-TRPC3-Antikörper gefärbt wurden, ist eine deskriptive Analyse möglich und einfacher als für die Menschenproben, die nur ein Bruchteil der Niere darstellen. Für die Beschreibung werden die Begriffe negativ, schwach und stark gefärbt in Analogie zur manuellen Auswertung benutzt. Der Außenstreifen des äußeren Marks sowie manche proximalen Tubuli in der Rinde scheinen in der Maus besonders stark gefärbt zu sein.

5.5.1.1 Rinde

In der Rinde sind die Glomeruli weitestgehend negativ. Die proximalen Tubuli können in zwei Klassen eingeteilt werden. Erstere, sind schwach gefärbt. Die anderen, sind stark gefärbt. Die distalen Tubuli sind meistens stark gefärbt (siehe **Abbildung 17.** und **Abbildung 18. A**).

5.5.1.2 Mark

Im Außenstreifen des äußeren Marks scheinen im Gegenteil zur Rinde, alle proximalen Tubuli und distalen Tubuli homogen mit etwa der gleichen Intensität gefärbt zu sein. Diese Intensität korreliert in etwa mit der Intensität der stark gefärbten proximalen Tubuli in der Rinde (siehe **Abbildung 17.** und **Abbildung 18. B**). Im Innenstreifen des Außenmarks sind die distalen Tubuli schwächer gefärbt.

Im Innenmark befinden sich einige stark gefärbte Sammelrohre sowie schwach gefärbte Intermediärtubuli (siehe **Abbildung 17.** und **Abbildung 18. D**).

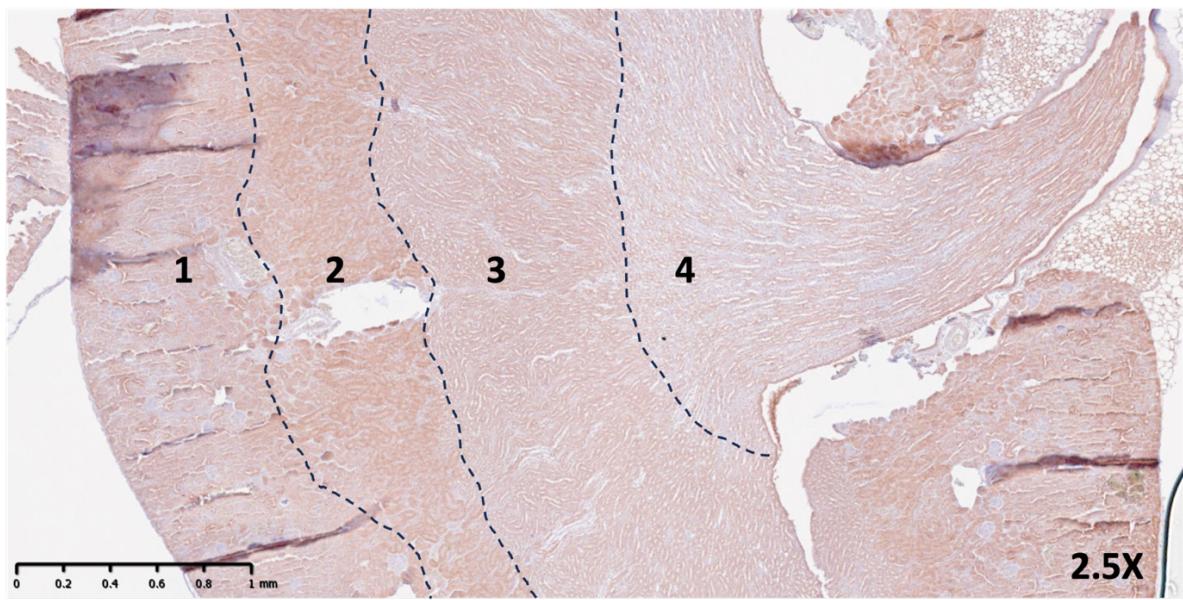


Abbildung 17. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von tierischem Gewebe in der Übersicht. Dabei handelt es sich um Gewebe von der Maus 4. Die Einteilung zeigt die Rinde (1), äußeres Mark (2, 3) mit Außenstreifen (2) und Innenstreifen (3) sowie Innenmark (4).

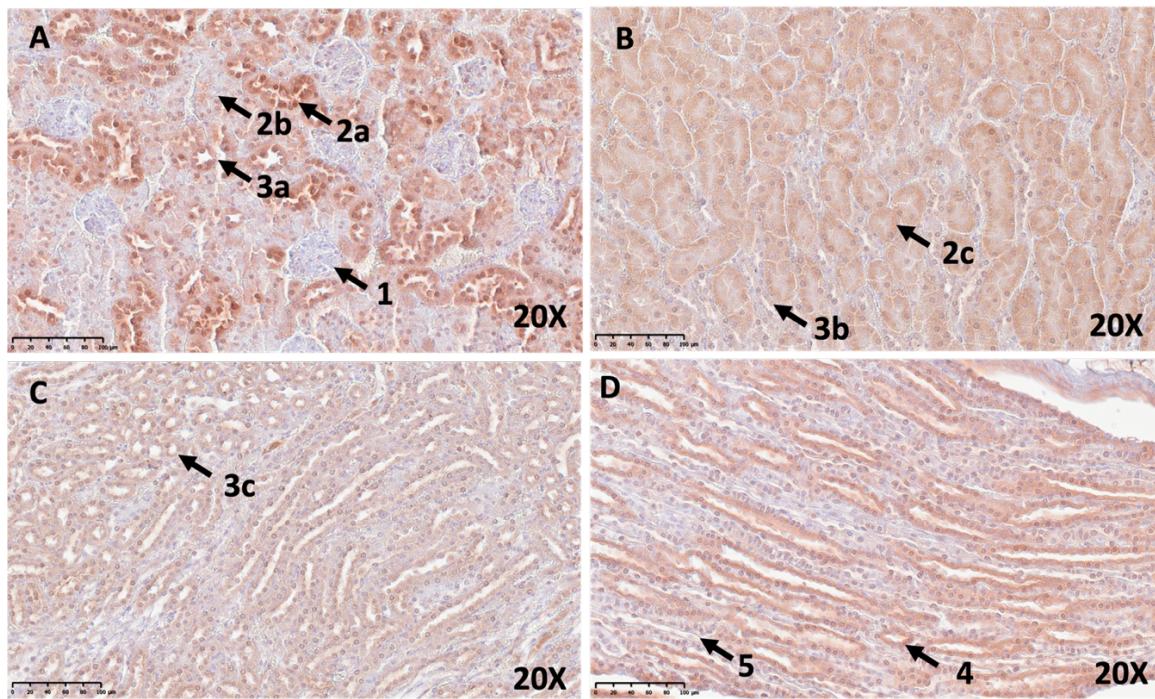


Abbildung 18. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von tierischem Gewebe in unterschiedlichen Lokalisationen. Dabei handelt es sich um Gewebe von Maus 4. Rinde (A), äußeres Mark (B, C) mit Außen- (B) und Innenstreifen (C), sowie inneres Mark (D). Abbildung A zeigt ein Glomerulus (1), gefärbter proximaler Tubulus (2a), ungefärbter proximaler Tubulus (2b) und distaler Tubulus (3a). Abbildung B zeigt ein proximaler Tubulus (2c) sowie ein distaler Tubulus (3b). Abbildung C zeigt ein distaler Tubulus (3c). Abbildung D zeigt ein Sammelrohr (4) sowie ein Intermediärtubulus (5).

5.5.2 Maschinelle Analyse der OP- und Mausnieren

Die gewichteten DAB-Werte wurden wie in **Kapitel 4.10** beschrieben statistisch mithilfe des Kruskal-Wallis gefolgt vom Dunn-Tests für die jeweiligen Spezies verglichen. Sie korrelieren mit der Intensität der Braunfärbung. Mittelwerte und Standardabweichungen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen. Statistisch signifikante Unterschiede sind auf der **Abbildung 19.** mit Stern „*“ gekennzeichnet. Da nicht alle Proben ausreichend Gewebe von Rinde und Mark aufwiesen, wurden die jeweils präsenten Strukturen aufgeführt, was die Diskrepanz in der Probenanzahl in manchen Lokalisationen erklärt. **Abbildung 20.** und **Abbildung 21.** zeigen entsprechende Bilder für jeweils Mensch und Maus. **Tabelle 21.** bis **Tabelle 27.** zeigen die entsprechenden gewichteten DAB-Werte in den unterschiedlichen Lokalisationen.

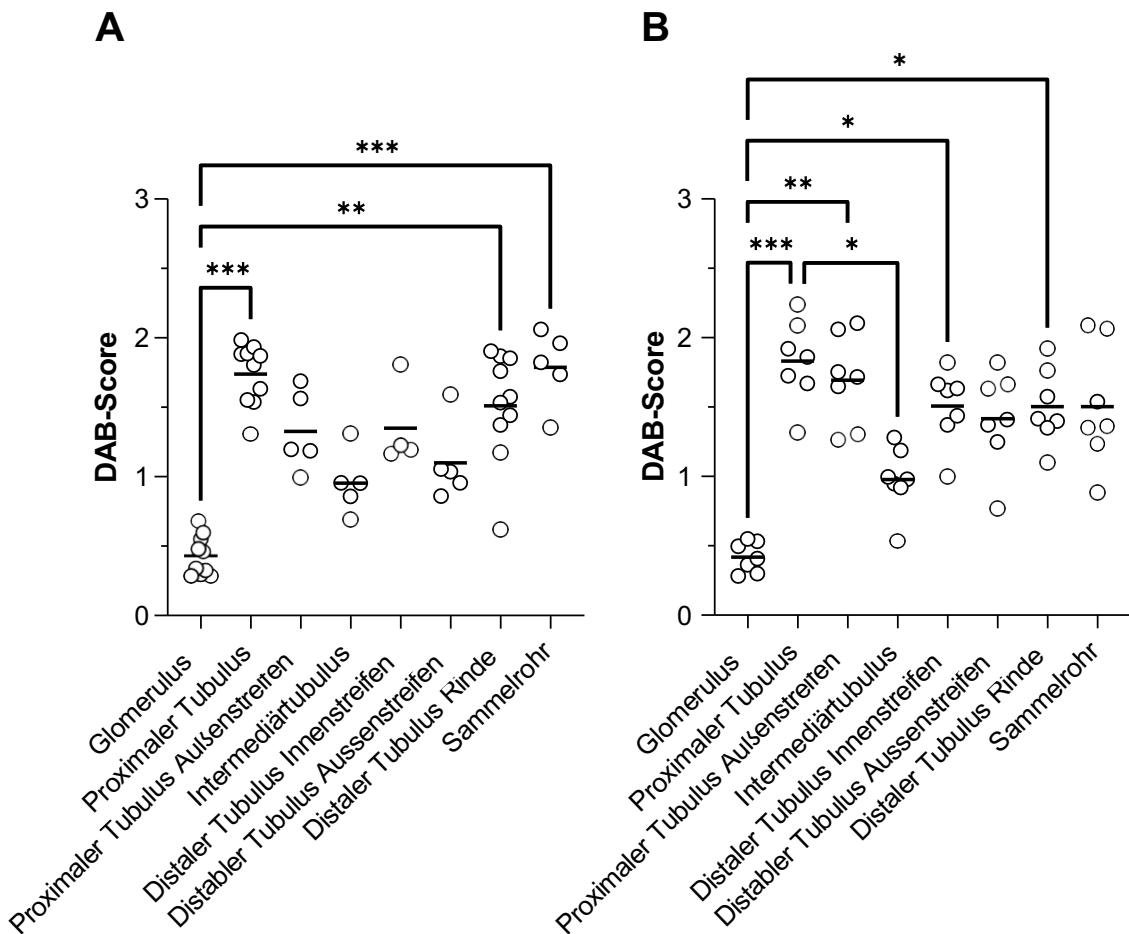


Abbildung 19. Ergebnisse der maschinellen Auswertung von OP- und Mausproben. Die Ergebnisse der OP-Proben befinden sich in „A“, die Ergebnisse der Mausproben in „B“. Auf der vertikalen Achse stehen die normalisierten und gewichteten DAB-positiven Scores von null bis drei für die jeweiligen Schnitte. Auf der horizontalen Achse stehen die jeweils untersuchten Lokalisationen. Ein Stern („*“) signalisiert ein P-Wert unter 0.05, zwei Sterne („**“) signalisieren einen P-Wert unter 0.01, drei Sterne „***“ signalisieren einen P-Wert unter 0,001. Proximaler Tubulus = proximaler Tubulus Rinde.

5.5.2.1 Glomerulus

Die korrespondierenden Werte können aus der **Tabelle 21.**, **Tabelle 22.** und **Tabelle 25.** entnommen werden. Die Färbung der Glomeruli ist insgesamt negativ ausgefallen (siehe **Abbildung 20. A, B** und **Abbildung 21. A, B**). Im Menschen wurde eine statistisch signifikant schwächere Färbung der Glomeruli im Vergleich zu den kortikalen proximalen Tubuli ($P < 0.0001$; Dunn), sowie der Glomeruli im Vergleich zu den kortikalen distalen Tubuli ($P = 0.013$; Dunn) festgestellt (siehe **Abbildung 20. A, B**). Die Sammelrohre im Mark sind statistisch signifikant stärker gefärbt als die Glomeruli in der Rinde ($P = 0.0003$; Dunn) (siehe **Abbildung 20. A, G, H**). Trotz der insgesamt negativen Färbung in den Glomeruli scheinen einzelne Zellen innerhalb des Glomerulus gefärbt zu sein (siehe **Abbildung 20. B**, **Abbildung 10. A**).

Bei den Mäusen ist der Vergleich zwischen Glomeruli und kortikale proximale Tubuli statistisch signifikant ($P = 0.0001$; Dunn) (siehe **Abbildung 21. A, B** im Vergleich zu **Abbildung 21. G, H**). Auch der Vergleich zwischen Glomeruli und kortikale distale Tubuli ist statistisch signifikant ($P = 0.0293$; Dunn), und der Vergleich zwischen Glomeruli und distale Tubuli im Innenstreifen ($P = 0.0269$; Dunn) (siehe **Abbildung 21. A** und **E, F**).

Glomerulus	Gewichteter DAB-Wert	Standardabweichung
Mensch	= 0.43	= 0.14
Maus	= 0.42	= 0.11

Tabelle 21. Gewichtete DAB-Werte der Glomeruli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse.

5.5.2.1 Proximaler Tubulus

Entsprechende Werte können aus der **Tabelle 22.** entnommen werden. Für die semiquantitative Analyse wurden die stärker gefärbten Tubuli in der Mausniere berücksichtigt (siehe **Abbildung 18. A**). Im Gegensatz hierzu waren die proximalen Tubuli im Menschen homogen gefärbt (siehe **Abbildung 20. A**). Die analysierten kortikalen proximalen Tubuli von Mensch und Maus haben ähnliche Werte erzielt (siehe **Abbildung 20. A** und **Abbildung 21. A**).

Der Vergleich von Glomerulus und proximalem Tubulus im Außenstreifen bei der Maus ist statistisch signifikant ($P = 0.0019$; Dunn). Die proximalen Tubuli des Außenstreifens des äußeren Marks der Mausnieren weisen etwas niedrigere DAB-Werte als die proximalen Tubuli der Rinde auf, obwohl sie ähnlich gefärbt erscheinen. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ($P > 0.9999$; Dunn) (siehe **Abbildung 21. C, D**). Ähnliche Tendenzen zeigen sich für den proximalen Tubulus im Außenstreifen im Menschen ($P > 0.9999$; Dunn) (siehe **Tabelle 22.**). Die Färbung der

proximalen Tubuli im Außenstreifen ist jedoch im Menschen schwächer als in der Maus (siehe **Tabelle 22.**)

Proximaler Tubulus	Gewichteter DAB-Wert	Standardabweichung
Rinde		
Mensch	= 1.74	= 0.22
Maus	= 1.83	= 0.30
Mark - Außenstreifen		
Mensch	= 1.35	= 1.29
Maus	= 1.70	= 0.33

Tabelle 22. Ergebnisse der proximalen Tubuli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse.

5.5.2.1 Distaler Tubulus

Entsprechende Werte können aus der **Tabelle 23.** entnommen werden. Der distale Tubulus wurde in drei unterschiedliche Lokalisationen untersucht. In der Rinde und im Außen- sowie Innenstreifen des Marks.

In der Rinde wiesen beide Spezies eine ähnliche Färbung auf (siehe **Abbildung 20. A, B** und **Abbildung 21. A, B, Tabelle 23.**)

Beim Vergleich von Innen- und Außenstreifen des distalen Tubulus konnte sowohl beim Menschen als auch bei der Maus kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Maus: $P > 0.9999$; Dunn; Mensch: $P > 0.9999$; Dunn) (siehe **Abbildung 20. C, D, E, F** und **Abbildung 21. C, D, E, F**). Im Außenstreifen des Menschen scheint der distale Tubulus weniger gefärbt zu sein als im Außenstreifen der Mäuse (siehe **Abbildung 20. D**).

Distaler Tubulus	Gewichteter DAB-Wert	Standardabweichung
Rinde		
Mensch	= 1.51	= 0.39
Maus	= 1.50	= 0.27
Mark - Außenstreifen		
Mensch	= 1.10	= 0.29
Maus	= 1.42	= 0.35

Mark - Innenstreifen		
Mensch	= 1.35	= 0.31
Maus	= 1.51	= 0.27

Tabelle 23. Ergebnisse der distalen Tubuli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse.

5.5.2.1 *Intermediärtubulus*

Entsprechende Werte können aus der **Tabelle 24.** entnommen werden. Die Intermediärtubuli scheinen in Menschen und Maus schwach gefärbt bis negativ zu sein (siehe **Abbildung 20. G** und **Abbildung 21. G**). Im murinen Gewebe weist der Vergleich der proximalen Tubuli in der Rinde mit den Intermediärtubuli aus dem Mark ein statistisch signifikanter Unterschied auf ($P = 0.0105$; Dunn).

Intermediärtubulus	Gewichteter DAB-Wert	Standardabweichung
Mensch	= 0.95	= 0.23
Maus	= 0.98	= 0.24

Tabelle 24. Ergebnisse der Intermediärtubuli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse.

5.5.2.2 *Sammelrohr*

Die Braunfärbung wurde im Sammelrohr des Menschen besonders stark nachgewiesen (siehe **Abbildung 20. G, H, Tabelle 25.**). Maussammelrohre wiesen ebenso Färbung auf, die aber im Vergleich etwas weniger stark ausgeprägt ist (siehe **Abbildung 21. G, H, Tabelle 25.**). Beim Menschen konnte in manchen Sammelrohre Halo-ähnliche Effekte in den Zellen erkannt werden, die entweder auf Artefakte oder auf eine besondere Lokalisation der TRPC3-Kanäle hindeuten könnten (siehe **Abbildung 20. G, Abbildung 22.B**).

Sammelrohr	Gewichteter DAB-Wert	Standardabweichung
Mensch	= 1.79	= 0.27
Maus	= 1.50	= 0.44

Tabelle 25. Ergebnisse der Sammelrohre der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse.

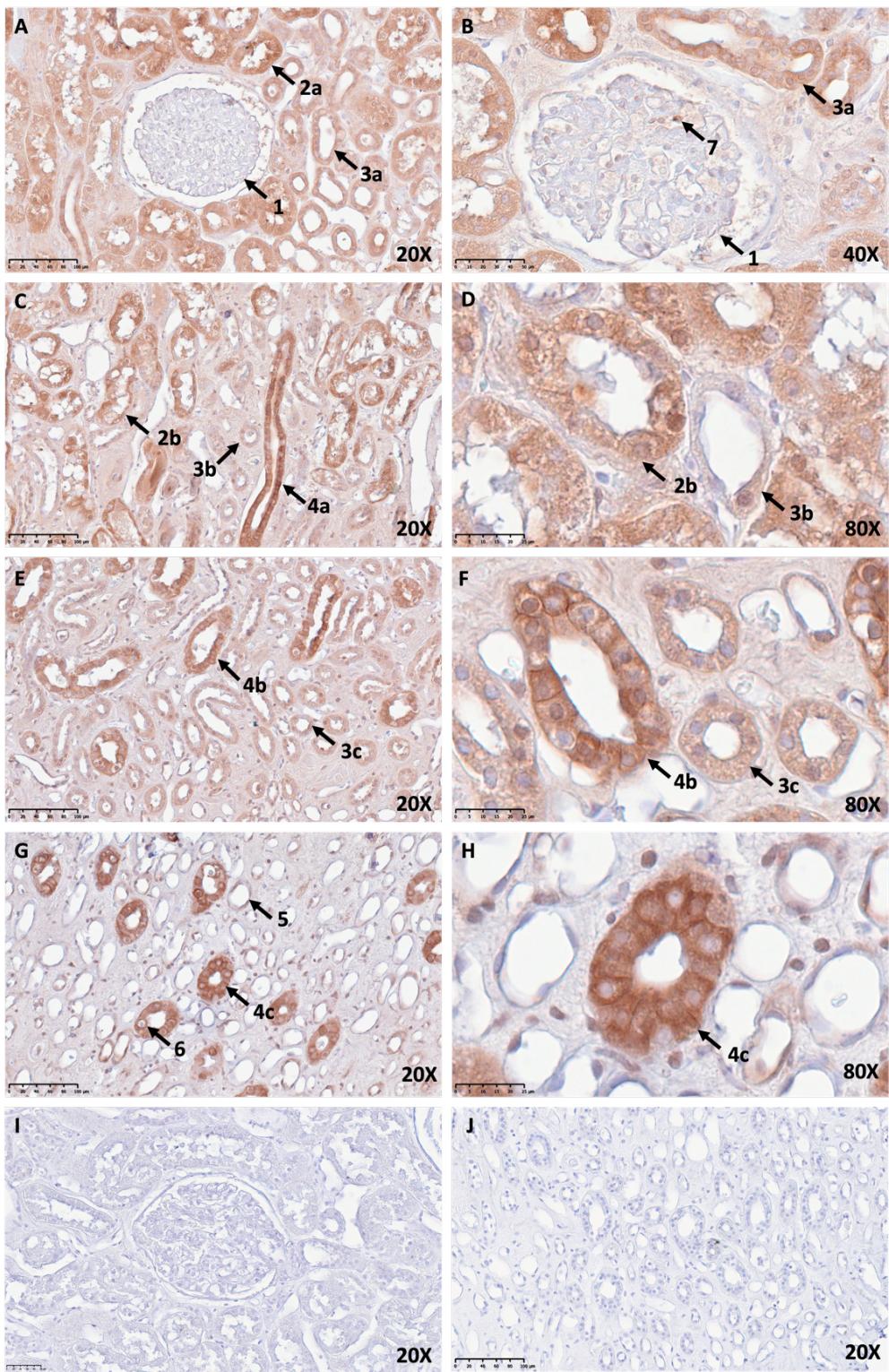


Abbildung 20. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von menschlichem Gewebe. Dabei handelt es sich um Gewebe von Patient 1b. Abbildung I und J sind Negativkontrollen von Rinde (I) und Mark (J). Abbildung A und B zeigen ein Glomerulus (1), proximale (2a) und distale (3a) Tubuli in der Rinde in unterschiedlichen Vergrößerungen. Eine positive Zelle im Glomerulus ist dargestellt (7). Abbildung C und D zeigen proximale (2b), distale (3b) Tubuli und ein Sammelrohr (4a) im Außenstreifen des äußeren Marks in unterschiedlichen Vergrößerungen. Abbildung E und F zeigen distale Tubuli (3c) und Sammelrohre (4b) im Innenstreifen des äußeren Marks in unterschiedlichen Vergrößerungen. Abbildung G und H zeigen Sammelrohre (4c) und ein Intermediärtubulus (5) im inneren Mark in unterschiedlichen Vergrößerungen. Eine Halo-ähnliche Struktur ist mit (6) in Abbildung G gekennzeichnet.

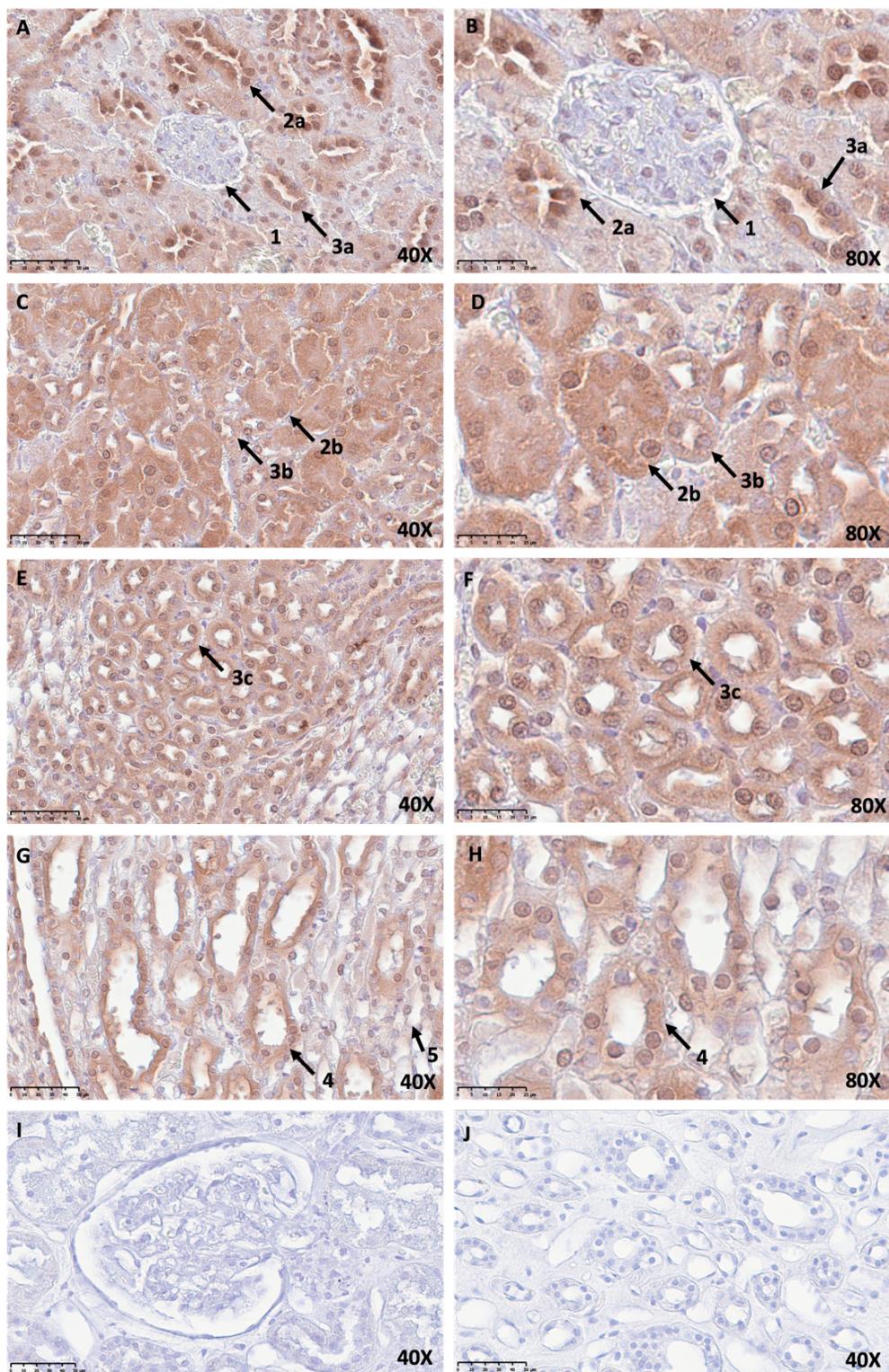


Abbildung 21. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von tierischem Gewebe. Dabei handelt es sich um Gewebe von der Maus 3. Abbildung I und J sind Negativkontrollen von Rinde (I) und Mark (J). Abbildung A und B zeigen ein Glomerulus (1), proximale (2a) und distale (3a) Tubuli in der Rinde in unterschiedlichen Vergrößerungen. Abbildung C und D zeigen proximale (2b) und distale (3b) Tubuli im Außenstreifen des äußeren Marks in unterschiedliche Vergrößerungen. Abbildung E und F zeigen distale Tubuli (3c) im Innenstreifen des äußeren Marks in unterschiedlichen Vergrößerungen. Abbildung G und H zeigen Sammelrohre (4c) und ein Intermediärtubulus (5) im inneren Mark in unterschiedlichen Vergrößerungen.

5.6 Peptidkontrolle

Das Ergebnis der Spezifitätskontrolle gilt für den anti-TRPC3-Antikörper als erfolgreich, da die Peptidkontrolle eine schwächere Färbung als die Positivkontrolle aufweist (siehe **Tabelle 26.**, **Diagramm 13.** und **Abbildung 22.**). Die gewichteten DAB-Werte sind der **Tabelle 26.** zu entnehmen.

	Glomerulus	PT	DT	IT	SR	DT-Mark
Gewichteter DAB-Wert pro Schnitt:						
Negativ-Kontrolle	= 0.11	= 0.07	= 0.04	= 0.04	= 0.05	= 0.10
Positivkontrolle	= 0.78	= 1.82	= 1.75	= 1.17	= 2.04	= 1.69
Peptidkontrolle	= 0.30	= 0.98	= 0.96	= 0.69	= 1.28	= 0.96

Tabelle 26. Maschinelle Auswertung der Spezifitätskontrolle. Erreichter gewichteter DAB-Wert pro Schnitt im Durchschnitt für die positiv-, negativ- und Peptidkontrolle. PT = proximaler Tubulus, DT = distaler Tubulus, IT = Intermediärtubulus, SR = Sammelrohr, DT-Mark = distaler Tubulus im Mark.

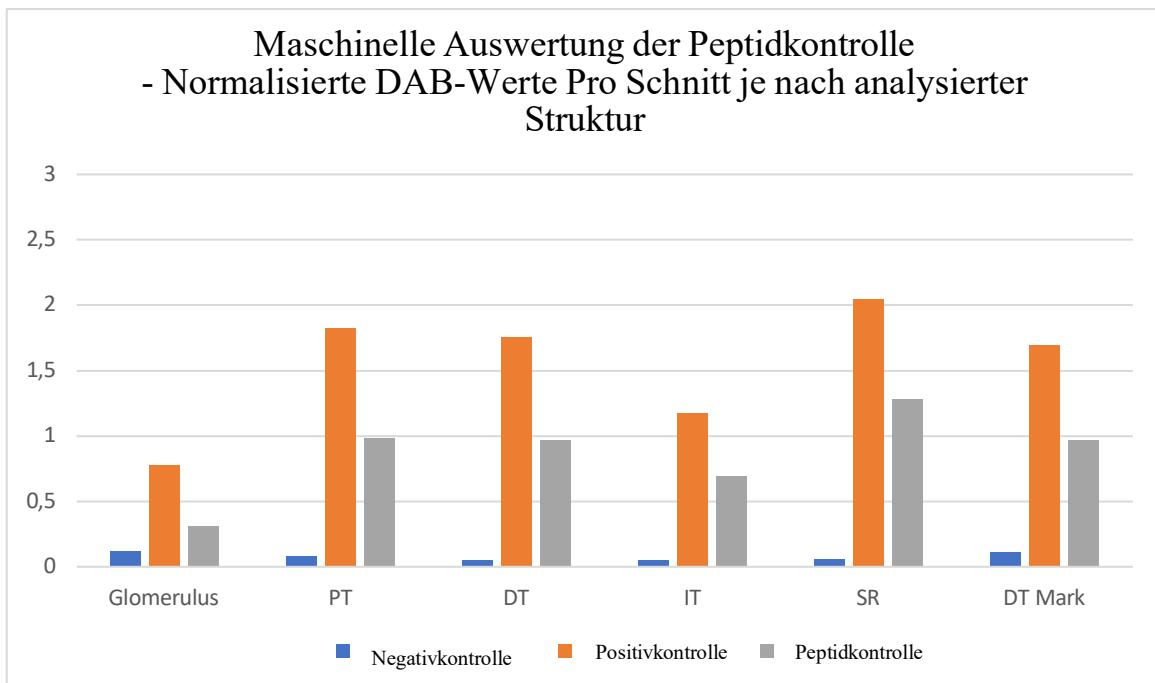


Diagramm 13. Maschinelle Auswertung der Färbung der Peptidkontrolle. Auf der vertikalen Achse ist der jeweils erreichte gewichtete DAB-Wert pro Schnitt dargestellt. Auf der horizontalen Achse, die jeweilige Einteilung von jeweils positiv-, negativ- und Peptidkontrolle mit unterschiedlich untersuchten Lokalisationen. PT = proximaler Tubulus, DT = distaler Tubulus, IT = Intermediärtubulus, SR = Sammelrohr, DT-Mark = distaler Tubulus im Mark. Blau = Negativkontrolle, orange = Positivkontrolle, Grau = Peptidkontrolle.

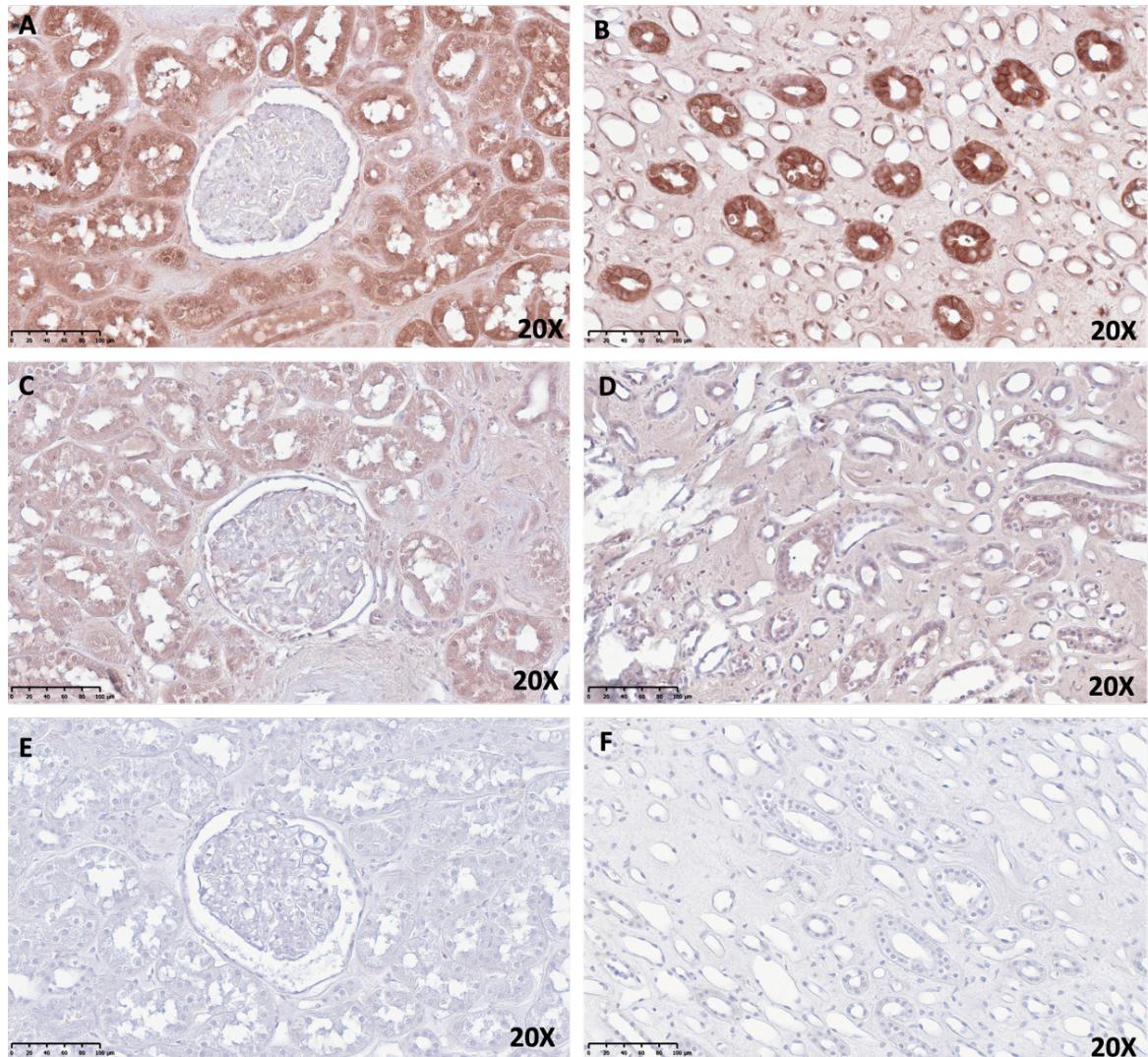


Abbildung 22. Spezifitätskontrolle vom TRPC3-Antikörper. Dabei handelt es sich um Gewebe von Patient 1b. Abbildung A, C, E zeigen Rindenabschnitte, Abbildung B, D, F Markabschnitte. Abbildung E und F sind Negativkontrollen. Abbildung A und B zeigen die Positivkontrollen. Abbildung C und D zeigen die Peptidkontrollen. Abbildung E und F zeigen die Negativkontrollen.

5.7 Pathologische Proben-Nephrokalzinosen

Die Hypothese hinter dieser Untersuchung ist, dass die TRPC3-Färbung in den Nephrokalzinose Präparaten im Vergleich zu den OP-Proben schwächer ist. Hintergrund dieser Überlegung ist die Involvierung der TRPC3-Kanäle in der Pathophysiologie der Nephrokalzinosen. Ihnen wird eine protektive Wirkung im Hinblick auf die Entwicklung von Nephrokalzinose zugeschrieben, sodass sich die Frage stellt, ob die Expression von TRPC3 in Nephrokalzinosegewebe geschwächt ist (Awuah Boadi *et al.*, 2021, Gombedza *et al.*, 2019, Ibeh *et al.*, 2019). In **Kapitel 3.6.1** kann mehr zu dieser Fragestellung nachgelesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in einer Publikation eingereicht. Die entsprechende Referenz befindet sich in **Kapitel 13. Publikationen**.

5.7.1 Vergleich der entkalkten und nicht-entkalkten pathologischen Proben

Der maschinelle Vergleich zwischen nicht-entkalktem und entkalktem anti-TRPC3 gefärbtem Gewebe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (siehe **Tabelle 27**). Insofern kann angenommen werden, dass die, durch die Nephrokalzinose induzierte Kalzifizierung keinen wesentlichen Einfluss auf die immunhistochemische Färbung hat und auch keine falsch-positiven Ergebnisse dadurch erzeugt wurden (siehe **Abbildung 23**. Vergleich von A, C, E mit jeweils B, D, F).

Die Auswertung der Von-Kossa Färbung konnte nur als „Von-Kossa positiv“ im Falle von schwarzen Ausfällungen und „Von-Kossa negativ“ gewertet werden. Das unentkalkte Gewebe wies positive Von-Kossa Flächen auf, was sich in Form von Mikrokalk darstellte (siehe **Abbildung 24. A, Abbildung 25. A, D**). Das entkalkte Gewebe wies viel weniger Positivität in diesem Zusammenhang auf, wurde jedoch nicht quantifiziert (siehe **Abbildung 24. B**). Keine Korrelation zwischen den positiven Von-Kossa Färbungen und der Expression von TRPC3 im proximalen Tubulus und im Sammelrohr wurde im Vergleich mit den ausschließlich anti-TRPC3 gefärbten Präparaten festgestellt (siehe **Abbildung 24**. Vergleich von A mit B und C und **Abbildung 25**. Vergleich von C und F mit A, B, D, E).

	Gewichteter DAB-Mittelwert für alle Strukturen der beobachteten Gruppe	SD	P-Wert und Signifikanz
a. PT entkalzifizierte Proben	= 1.50	= 0.26	Vergleichsgruppen: a und b P-Wert = 0.56 Nicht signifikant
b. PT nicht-entkalzifizierte Proben	= 1.36	= 0.32	
c. SR entkalzifizierte Proben	= 1.53	= 0.36	Vergleichsgruppen: c und d P-Wert = 0.73 Nicht signifikant
d. SR nicht-entkalzifizierte Proben	= 1.62	= 0.26	

Tabelle 27. Ergebnisse des Vergleichs der pathologischen entkalzifizierten und nicht-entkalzifizierten Proben untereinander. PT = proximaler Tubulus, SR = Sammelrohr, SD = Standardabweichung.

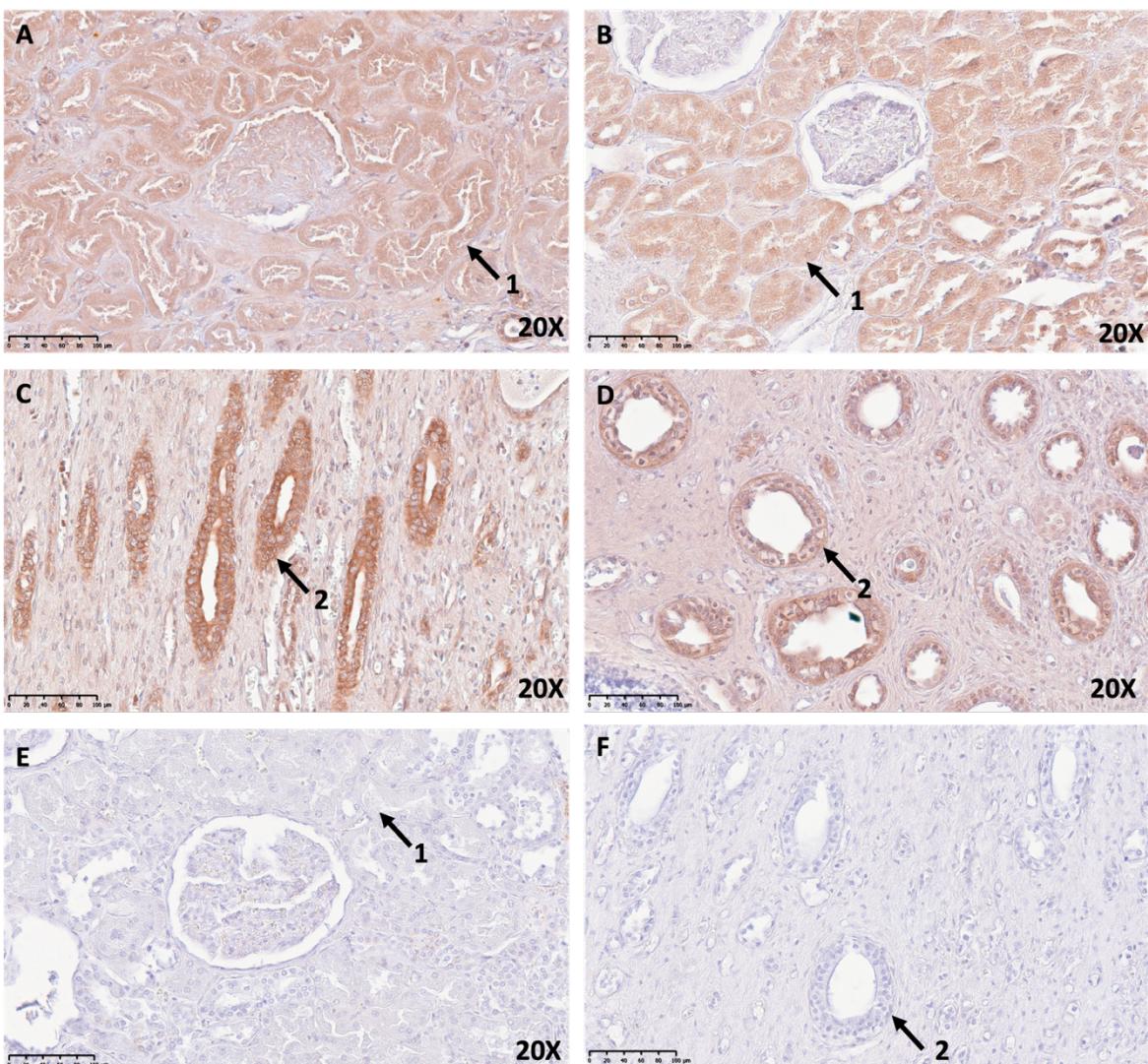


Abbildung 23. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von menschlichem Nephrokalzinose-be-troffenem Gewebe. Dabei handelt es sich um Gewebe von Patient 1c (A, C, E, F) und 5c (B, D). Vergleich von unentkalktem (A, C, E) und entkalktem Gewebe (B, D, F). Abbildung A, B und E zeigen Rinde. Abbildung C, D und F zeigen Mark. Abbildung E und F zeigen Negativkontrollen. Abbildung A und C stellen unentkalktes Gewebe dar. Abbildung B und D stellen entkalktes Gewebe dar. Proximale Tubuli (1) und Sammelrohre (2) sind mit entsprechenden Nummern gekennzeichnet.

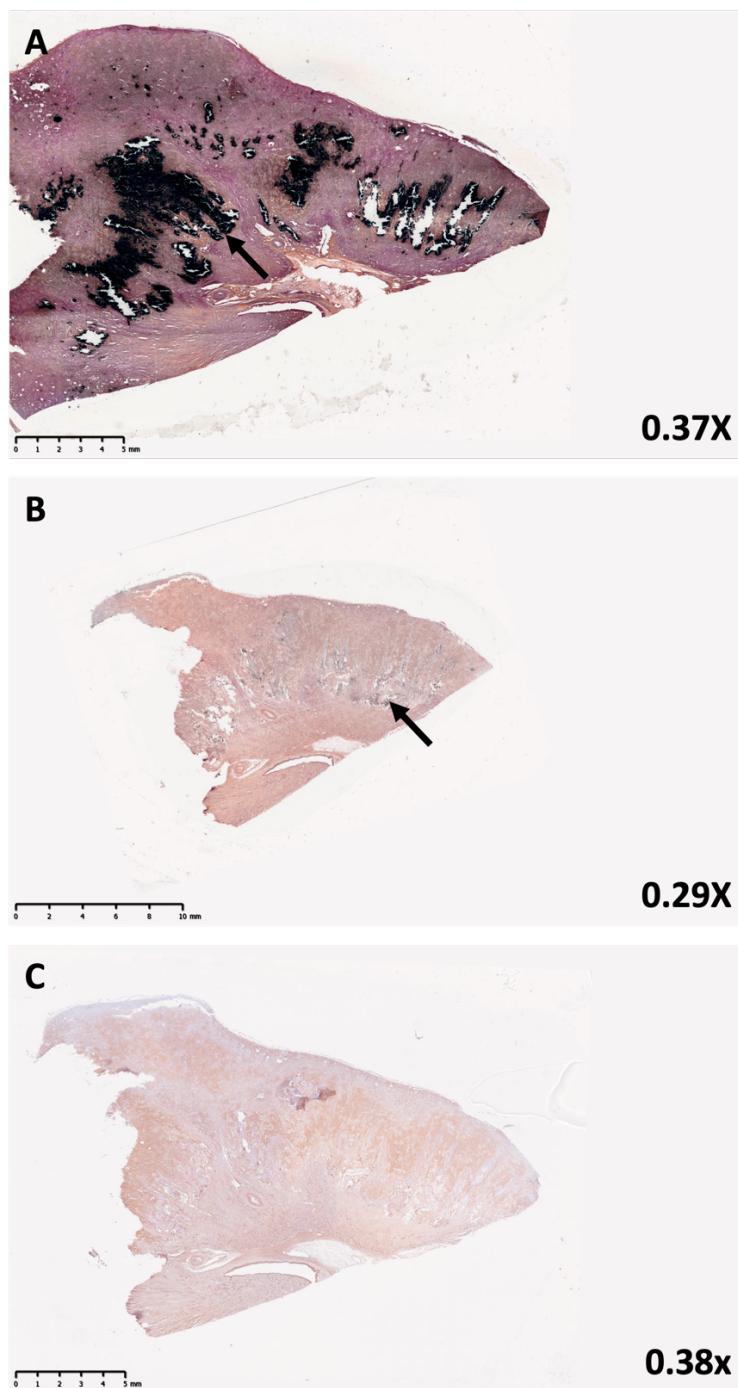


Abbildung 24. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung und Von-Kossa Färbung von menschlichem Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe im Vergleich in der Übersicht. Dabei handelt es sich um Gewebe von Patient 2c. Vergleich von Von-Kossa unentkalktem mit anti-TRPC3 Färbung (A), von-Kossa entkalktem mit anti-TRPC3 Färbung (B) und entkalktem nur mit anti-TRPC3 gefärbtem Gewebe (C) in der Übersicht. Abbildung A zeigt positive Von-Kossa Reaktionen mit Mikrokalkablagerungen (schwarze Stellen, exemplarisch mit Pfeil gekennzeichnet). Abbildung B zeigt weniger positive Reaktionen, jedoch sind dezente Mikrokalkablagerungen noch sichtbar (siehe Pfeil). Abbildung C stellt entkalktes, allein anti-TRPC3 gefärbtes Gewebe dar.

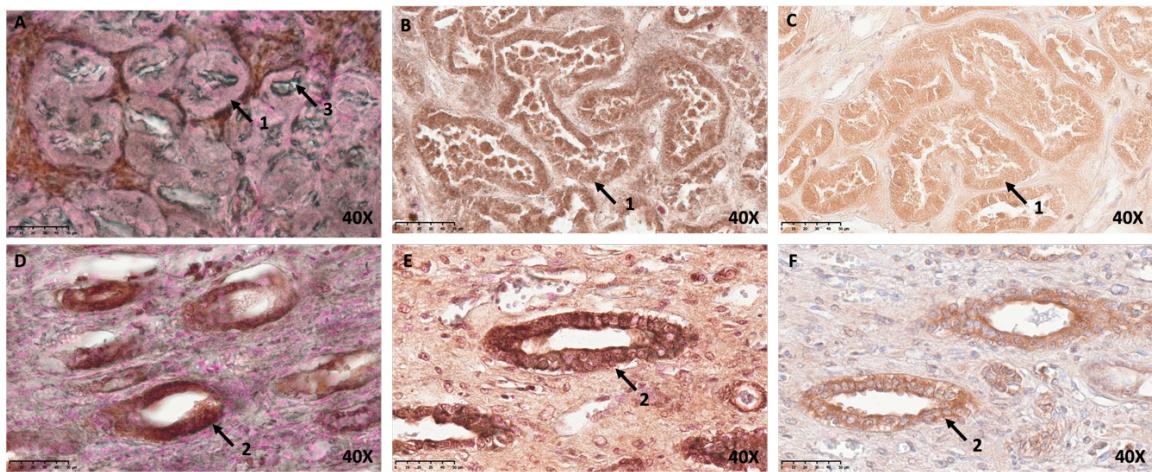


Abbildung 25. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung und Von-Kossa Färbung von menschlichem Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe im Vergleich in höherer Vergrößerung. Dabei handelt es sich um Gewebe von Patient 2c. Vergleich von Von-Kossa unentkalktem mit anti-TRPC3 Färbung (A, D), Von-Kossa entkalktem mit anti-TRPC3 Färbung (B, E) und entkalktem nur mit anti-TRPC3 gefärbtem Gewebe (C, F). Eine positive Von-Kossa Reaktion ist im luminal an den proximalen Tubuluszellen (A) zu sehen (3). Abbildung C und F stellen entkalktes, allein anti-TRPC3 gefärbtes Gewebe dar. Die proximalen Tubuli (1) und Sammelrohre (2) werden mit entsprechenden Ziffern gekennzeichnet.

5.7.2 Vergleich der pathologischen Proben mit den OP-Proben

Die fünf nicht-entkalzifizierten Proben wurden mit den zehn OP-Proben, die als „gesunde Kontrollgruppe“ dienen sollten maschinell mithilfe der gewichteten DAB-Werten verglichen. Sie wurden mithilfe von statistischen Tests wie in **Kapitel 4.10** dargestellt analysiert. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde im Vergleich der proximalen Tubuli nachgewiesen, mit schwächeren Werten in dem Nephrokalzinose Gewebe. Die Sammelrohre in den Nephrokalzinosepräparaten sind minimal weniger gefärbt als in den OP-Proben (siehe **Tabelle 28.** und **Abbildung 26.** im Vergleich **A, C, E** mit **B, D, F.** **Abbildung 27.** zeigt eine exemplarische Auswertung des Programms).

	Mittelwert DAB für alle Strukturen der beobachteten Gruppe	SD	P-Wert, Signifikanz
a. PT Nephrokalzinose Proben	1.357	0.3166	Vergleichsgruppen: a und b P-Wert = 0.0280 *
b. PT OP-Proben	1.735	0.2238	
c. SR Nephrokalzinose Proben	1.618	0.2600	Vergleichsgruppen: c und d P-Wert = 0.4206 Nicht signifikant
d. SR OP-Proben	1.788	0.272	

Tabelle 28. Ergebnisse des Vergleichs der maschinell ausgewerteten nicht-entkalzifizierten und OP-Proben. PT = proximaler Tubulus, SR = Sammelrohr, SD = Standardabweichung.

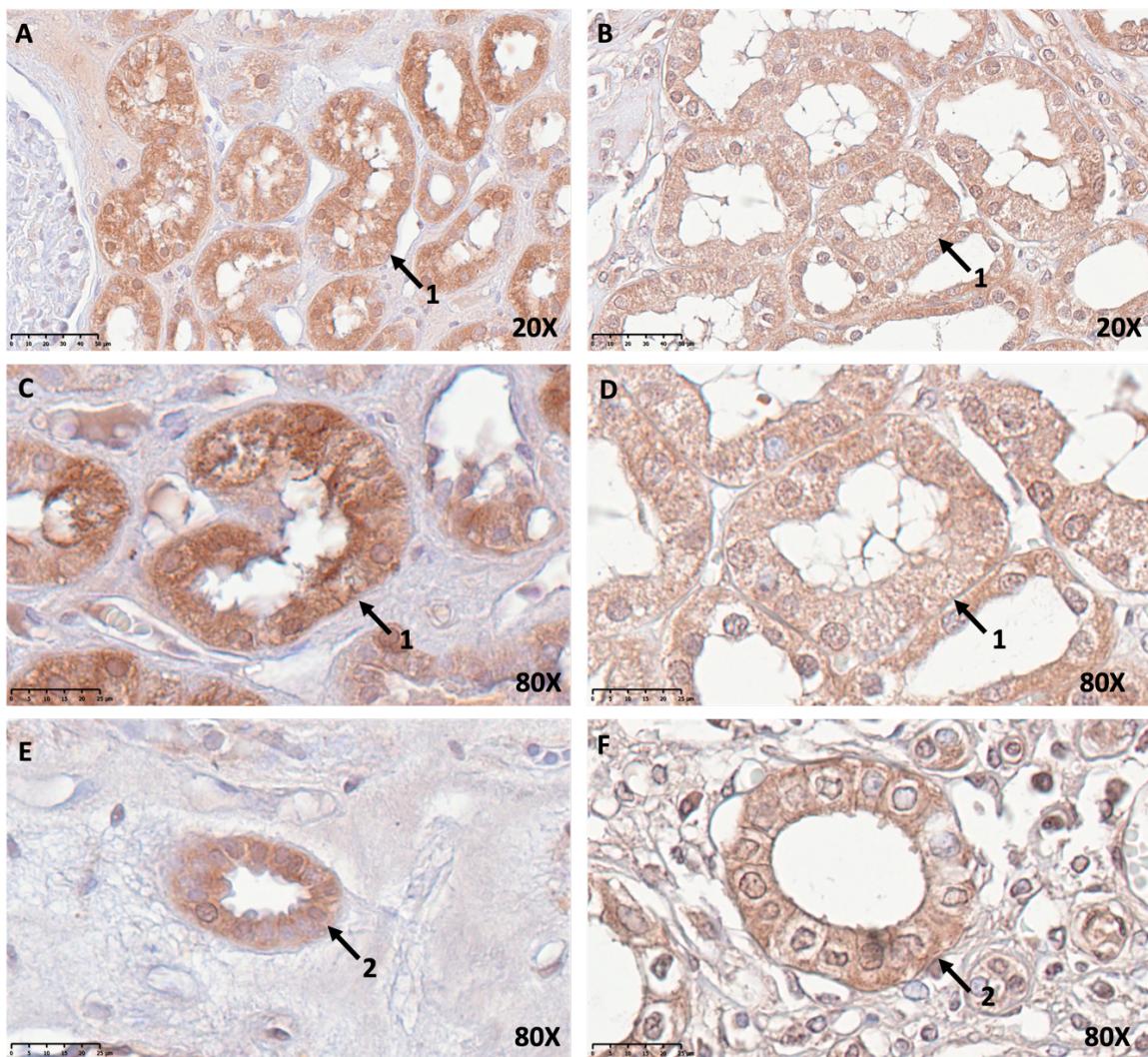


Abbildung 26. Vergleich der Immunhistochemischen anti-TRPC3 Färbung von menschlichem Nephrokalzinosebetroffenem- und OP-Gewebe. Die Bilder auf der linken Seite (A, C und E) stellen das OP-Gewebe dar (Patient 3b). Die Bilder auf der rechten Seite (B, D und F) stellen das nicht entkalkte Nephrokalzinose Gewebe dar (Patient 2c). Abbildung A, B, C, D zeigen Rinde mit proximalen Tubuli (1). Abbildung E und F zeigen Mark mit Sammelrohre (2).

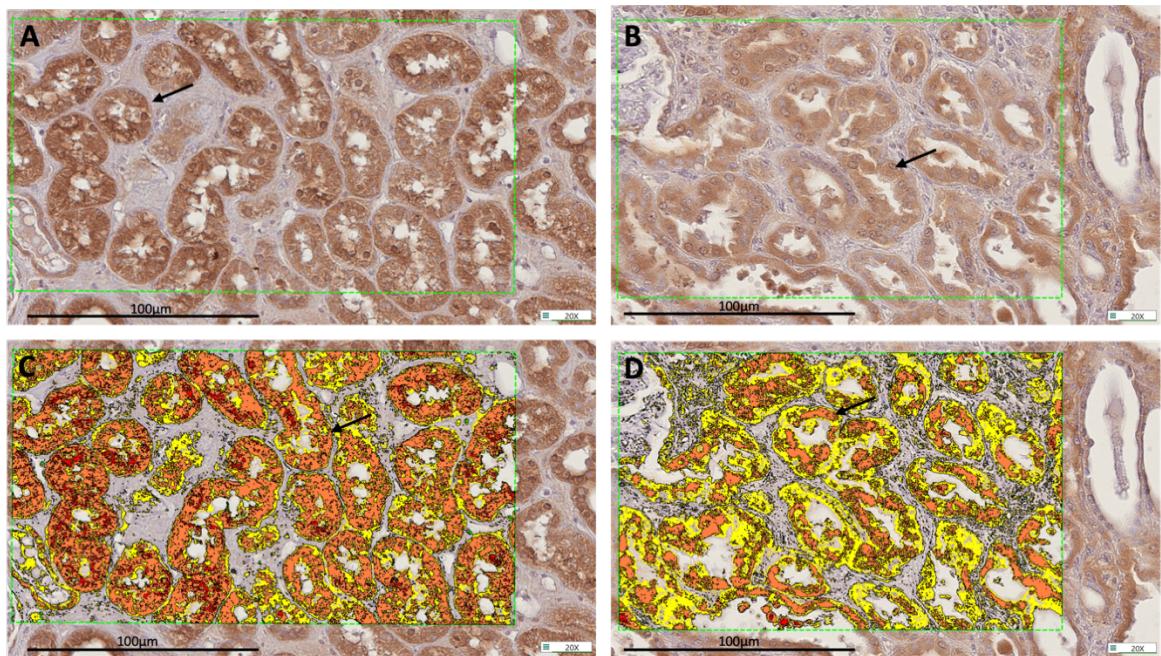


Abbildung 27. Exemplarischer Vergleich der Auswertung des Programms zwischen OP- und von Nephrokalinosebetroffenem Gewebe. Bei der Abbildung A und C handelt es sich um Gewebe von Patient 3b (OP-Gewebe) und bei der Abbildung B und D um Gewebe von Patient 3c. Abbildung A und B zeigen die immunhistochemischen Färbungen. Abbildung C und D die exemplarische Auswertung durch das maschinelle Programm in der grün umrandeten Fläche. Der Farbcode lautet rot = drei-fach positiv, orange = zwei-fach positiv, gelb = ein-fach positiv. Die deutliche schwächere Färbung des Nephrokalinose Gewebes ist bei dem Vergleich von C und D feststellbar, da die Farben in D deutlich mehr zu orange und gelb tendieren als bei C, wo mehr rote Fläche vorhanden ist. Dies ist nur eine exemplarische Darstellung, die dazu dient, die schwächere Färbung bildlich zeigen.

6 Diskussion

Die bereits bestehende anatomische Beschreibung der Verteilung der TRPC3-Kanäle in der Niere beruht meist auf tierischen Modellen, wobei sich die hierzu vorliegenden Studien teilweise widersprechen (Khayyat *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020). Diese inkonsistenten Ergebnisse können auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, darunter unterschiedliche Proben, Verarbeitungstechniken, Detektionsmethoden oder Variationen in den Eigenschaften der Patienten oder Körperspender (Wang *et al.*, 2020). In den folgenden Abschnitten möchte ich diese Aspekte genauer betrachten und sowohl die angewandte Methodik als auch die erzielten Ergebnisse diskutieren.

6.1 Diskussion von Material und Methodik

6.1.1 Probensammlung

Berichte über das Vorkommen von TRPC3 in menschlichem Gewebe sind selten. Die Beschaffung möglichst „gesunder“ menschlicher Nierenproben gestaltet sich schwierig und begrenzt die Probenanzahl. Diese stieg jedoch im Laufe der Zeit auf zehn an (Riccio *et al.*, 2002). Zu dem Zeitpunkt der Publikation lagen nur vier Proben vor; die nachfolgend erzielten Ergebnisse konnten daher hierfür zwar nicht mehr verwendet werden, wurden jedoch in dieser Arbeit implementiert. Das Körperspendergewebe konnte zu einer insgesamt größeren Zahl von Proben führen, auch wenn Qualitäteinbußen des Gewebes in Kauf genommen werden mussten. In der Tat war die Autolyse in dem postmortalen Gewebe teils schon fortgeschritten und führte sogar zu dem Ausschluss mancher Proben. Die OP-Proben sind im Gegenteil morphologisch sehr gut erhalten. Mehrere Faktoren könnten dafür zuständig sein. Beispielsweise könnten die größeren postmortalen Intervalle der mit Formalin fixierten Körperspender-Proben im Vergleich zu denen der Operationsproben eine Rolle gespielt haben. Nicht zuletzt aus diesen Gründen, gehe ich davon aus, dass die beobachtete Verteilung des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC3 in den OP-Nieren die Verteilung von TRPC3 im Menschen allgemein widerspiegelt. Das fortgeschrittene Alter und die bereits vorhandenen Komorbiditäten der analysierten Körperspender müssen beachtet werden und können die Färbung eventuell beeinflusst haben. Das OP-Gewebe stammte aus Tumor-Nephrektomien von an Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten. In einer Arbeit von Kistler *et al.* wurde die Proteinexpression bereits durch Immunhistochemie an tumorfreien Blöckchen von tumorbefallenen Organen untersucht (Kistler *et al.*, 2013). Eine mögliche Beeinflussung der Proteinexpression aufgrund der ursprünglichen Pathologie ist nicht ausgeschlossen.

Auch die Lokalisation der Entnahme der Proben schwankte. In dieser Arbeit wurde jedoch angenommen, dass der Entnahmestandort keinen wesentlichen Einfluss auf die Proteinexpression hat. Dies wurde auch in den Mausnieren gezeigt, welche als Ganze verarbeitet wurden. Dazu könnte sich die

Expression von TRPC3 nicht nur zwischen Menschen und Tier unterscheiden, sondern selbst intra-Speziesunterschiede, wie z.B. zwischen Ratten und Mäusen zum Beispiel, könnten eine Rolle spielen (Wang *et al.*, 2020).

Die Geschlechterverteilung bei den Körperspendern betrug 50% Frauen, 50% Männer, bei den Operationsnieren in etwa gleich. Die Mäuse waren aufgrund praktischer Beschaffungsgründe ausschließlich männlich. Bisher ergab sich in den durchgeführten Färbungen kein Hinweis auf eine geschlechterspezifische Verteilung der TRPC3-Kanäle. Dieser Aspekt könnte jedoch einen Einfluss auf die Färbung gehabt haben und sollte in zukünftigen Studien beachtet werden.

6.1.2 Fixierung

Prozesse, die vor oder während der eigentlichen Fixierung stattfinden, können die Proteindegredation beeinflussen. Umweltbedingungen zum Todeszeitpunkt (wie Temperatur, Vorhandensein von Kleidung etc.), prä-mortale agonale Zustände, die den Stoffwechsel der Zellen beeinflussen können, das postmortale Intervall oder die Dauer und Art der Fixierung, um nur ein paar Beispiele zu nennen (Libard *et al.*, 2019).

Statistisch signifikante Ergebnisse zwischen OP-Proben und Formalinproben wurden im Glomerulus, wo die Färbung in den Formalinproben stärker ist, sowie im distalen Tubulus, wo die Färbung in den Formalinproben schwächer ist, gefunden. In allen anderen Lokalisationen des Tubulussystems ist die Färbung in den Formalinproben schwächer als in den OP-Proben. Eine Arbeitsgruppe untersuchte die postmortalen proteolytischen Autolyseprozessen bei Formalinfixierung von menschlichen Geweben in Abhängigkeit des postmortalen Intervalls und stellte fest, dass die Bewahrung der immunhistochemischen Charakteristiken insbesondere von der Gewebeart abhängig ist (Mauriello *et al.*, 2022). In der Niere findet eine frühe Autolyse im Tubulussystem und eine späte Autolyse in den Glomeruli statt (Mauriello *et al.*, 2022). Die Färbung im Tubulussystem könnte also aufgrund von fortgeschrittenen Autolyseprozessen schwächer ausfallen. Eine optimale Preservation des Gewebes sowohl im Tubulussystem als auch in den Glomeruli zeigte sich bei der Fixierung innerhalb von einem Tag nach Probenentnahme (Mauriello *et al.*, 2022). Diese Zusammenhänge kann ich mithilfe meiner Ergebnisse bestätigen. Das postmortale Intervall der Körperspender betrug in dieser Arbeit in den meisten Fällen zwischen 24h und 72h (Mauriello *et al.*, 2022). Die stärkere Färbung in den Glomeruli und die schwächere Färbung im Tubulussystem der Formalinproben im Vergleich mit den OP-Proben, die direkt nach der Entnahme kurzzeitig fixiert wurden, könnte also durch Autolyse erklärt werden, die bei unterschiedlichen Postmortalintervallen entstanden ist. Die OP- Probengruppe eignet sich also auch deswegen am besten für die maschinelle Auswertung, da die Zeit zwischen Entnahme und Fixierung am kleinsten ist und so Gewebeveränderungen insgesamt minimal sind (el-Shennawy *et al.*, 1985). Wieso die Glomeruli in den Formalinproben stärker gefärbt sind als in den

OP-Proben, obwohl diese kurzfristig fixiert wurden, ist immer noch fraglich. Die gewichteten DAB-Werte der Glomeruli befinden sich jedoch in beiden Fällen unter eins, sind also als negativ anzusehen und beeinflussen die Richtung der Ergebnisse nicht.

Auch die Art der Fixierung stellt einen Einflussfaktor dar. In der Tat führt die Langzeitfixierung mit Formalin zu einer Vernetzung der Proteine, was den immunhistochemischen Nachweis von Proteinen beeinträchtigen kann (Lang, 2006). Ein Teil meiner Proben war standardmäßig Formalin- ein anderer NEP-fixiert (Janczyk *et al.*, 2011, Klopfleisch *et al.*, 2013). In einer Studie von Klopfleisch *et al.* wurden die NEP- und Formalinfixierung im Hinblick auf Ergebnisse der Morphologie des Gewebes und der IHC-Färbung in unterschiedlichen Geweben verglichen. Es stellte sich heraus, dass je nach Länge der Fixierung die Qualität des Gewebes, insbesondere des distalen Tubulus in der Formalinfixierung besser war als in der NEP-Fixierung. Die Morphologie der Glomeruli und der proximalen Tubuli schienen ähnlich gut erhalten zu sein. Meine Ergebnisse ermöglichten in diesem Zusammenhang ähnliche Schlussfolgerungen. Die Proben der NEP-fixierten Körperspender wiesen jedoch mehr Autolyse auf als die der formalinfixierten. Auch hier können andere Faktoren eine Rolle gespielt haben, wie zum Beispiel die Anzahl der Proben, die bei den NEP-fixierten Körperspendern niedriger war, sodass allgemeine Schlussfolgerungen nicht möglich sind.

6.1.3 Färbung

Kleinste Abweichungen in der Durchführung der immunhistochemischen Färbung, sei es durch Temperatur-, pH-, oder Konzentrationsschwankungen können sich entsprechend auch auf das Ergebnis der Färbung auswirken (Bordeaux *et al.*, 2010). Um dies möglichst zu verhindern, wurde das bewährte Protokoll strikt durchgeführt. Fehler im Umgang mit den Proben oder Verunreinigungen von Antikörpern könnten auch zu Verzerrungen führen. Zur besseren Kontrolle dieser Faktoren, wären standardisierte Verfahren notwendig. Die Menge an Färbungen, die in dieser Arbeit händisch durchgeführt wurden, war jedoch nicht groß genug, um standardisierte maschinelle Techniken zu benutzen (Lang, 2006). Dies stellt eine mögliche Limitation dar.

6.1.4 Antikörper

Der benutzte Antikörper ist sehr wichtig und hat erheblichen Einfluss auf das Untersuchungsergebnis (Libard *et al.*, 2019). In dieser Arbeit wurde ein polyklonaler Knockout-validierter Antikörper verwendet (Feng *et al.*, 2013, Xia *et al.*, 2023). Bei einer Knockout-Validierung wird ein Antikörper mit Zellen oder Geweben inkubiert, die das gewünschte Antigen nicht enthalten. Die Spezifität ist bei einem richtig-negativen Ergebnis bestätigt. Der TRPC3-Antikörper wurde in der Studie von Xia *et al.* mithilfe von Western-Blot und Immunhistochemie in Knockout Mäusen validiert (Xia *et al.*, 2023). Ein Vorteil der polyclonalen Antikörper liegt in ihrer Beständigkeit gegenüber äußeren Einflüssen wie z.B. Änderungen im pH (Jacobs *et al.*, 2022). Der hier benutzte Antikörper kam im

Rahmen anderer Arbeiten meiner Arbeitsgruppe an humanem Gewebe bereits in der Immunhistochemie zur Verwendung (Englisch *et al.*, 2024, Englisch *et al.*, 2023b, Kaul *et al.*, 2023, Kirstein *et al.*, 2024). Darüber hinaus wurde von mir eine Peptidkontrolle erfolgreich durchgeführt, die die Spezifität des Primärantikörpers untermauert. Negativkontrollen zur Kontrolle des Sekundärantikörpers wurden stets mitgeführt, die in jedem Färbegang richtig-negativ waren. Zu dem Thema des Mitführen von Kontrollen gibt es keine eindeutigen Richtlinien, hingegen eher kontroverse Meinungen (Lang, 2006). Insgesamt ist also von einer guten Spezifität des Antikörpers auszugehen. Jedoch ist eine Braunfärbung aufgrund unterschiedlicher Faktoren nicht sicher mit Antigenpräsenz gleichzustellen, wie wir im Folgenden sehen werden.

6.1.5 Auswertung

Eine Präsenz der Kanäle ist bei Braunfärbung und ab einem DAB-Wert von eins anzunehmen, kann aber durch unterschiedliche Faktoren nicht sicher angenommen werden. Die Möglichkeit der unspezifischen Färbung besteht. Genauso muss ein negatives Ergebnis nicht zwangsläufig ein nicht-Vorhandensein des Target Antigens bedeuten. Es bedarf weiterer Untersuchungstechniken, um die Ergebnisse zu bestätigen.

Die manuelle Auswertung von IHC-Bildern hat sich aktuell als Standard durchgesetzt, auch wenn dieser Methode oft eine ungenügende Objektivität und Reproduzierbarkeit vorgehalten wird (Ram *et al.*, 2021). Die Verwendung eines gewichteten H-Wertes, ähnlich dem H-Wert von Pixel, erzielte im Vergleich zu herkömmlichen Analyse-Softwares und manuellen Auswertungsmethoden in einer bereits durchgeführten Studie objektivere und besser reproduzierbare Leistungen (Ram *et al.*, 2021). Insgesamt war die Tendenz der Ergebnisse der manuellen Auswertung der zwei Untersucher trotz minimaler Unterschiede ähnlich. Diese minimalen Abweichungen sind wahrscheinlich dem individuellen Interpretationsraum geschuldet. Dazu zeigten die Werte der maschinellen Ergebnisse eine ähnliche Tendenz wie die der manuellen Auswertung, was als relative interne Kontrolle der Studie dienen kann. Die Menge der betrachteten Anzahl an Strukturen betrug je Identität fünf pro Schnitt und könnte in weiteren Untersuchungen erhöht werden, um eine höhere Validität zu erhalten. Es sollte berücksichtigt werden, dass die Gruppengrößen bei den Formalin und NEP-fixierten Körperspendern nicht die gleiche war und insofern der Vergleich der Ergebnisse beeinträchtigt oder verzerrt sein könnte.

Die DAB- und Hämatoxylin-Filter des Visiopharm-Programms mussten für die maschinelle Auswertung jeweils skaliert werden. Diese Stufung wurde unter Berücksichtigung aller Schnitte und in mehreren Phasen durch den Benutzer selbst eingestellt. Dadurch können die Ergebnisse mit einer gewissen Subjektivität betrachtet werden. Bei Betrachten der Analysen und Ergebnissen ist dies eine unerlässliche Grenze, die es zu beachten gilt (Varghese *et al.*, 2014). Trotzdem ist die maschinelle

Auswertung objektiver als die manuelle, da alle Schnitte durch das Programm gleichbehandelt werden und relative Vergleiche möglich sind.

Die Erkennung und Zuordnung der verschiedenen Tubulusabschnitte der Niere stellte eine Herausforderung dar. Dazu war das Gewebe teils autolytisch. Sie wurde durch mehrere erfahrenen Anatomen kontrolliert. Fehler können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Ergebnisse von Körperspender, OP- und Mausproben

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben ein Färbemuster ergeben, dass je nach Spezies und untersuchtem Gewebe feine Unterschiede aufweist. Trotz bereits angesprochener geringer Unterschiede nehmen wir die TRPC3-Expression in den OP-Nieren als Referenz für den Menschen, da in diesen Schnitten die Morphologie auch am besten erhalten war. Die Glomeruli waren weitestgehend negativ oder schwach gefärbt. Proximale Tubuli und Sammelrohre waren meistens stark gefärbt im Vergleich zu den meist negativen Intermediärtubuli. Distale Tubuli waren zwischen schwach und stark gefärbt je nach beobachteter Lokalisation. Bis heute herrscht bezüglich der renalen Expression von TRPC3 Uneinigkeit, wie schon Khayyat *et al.* feststellten (Khayyat *et al.*, 2020). Im folgenden Abschnitt werden wir näher auf die Expression von TRPC3 in unterschiedlichen Abschnitten des Tubulussystems eingehen.

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Expression vom TRPC3-Protein auf Podozyten und Hauptzellen des Sammelrohrs beschränkt ist (Woudenberg-Vrenken *et al.*, 2009). Bei Anwendung der Western-Blot Technik konnte eine hohe Expression vom TRPC3-Protein in Ratten-Glomeruli beschrieben werden (Ilatovskaya *et al.*, 2011). Zudem wurde TRPC3 mRNA in tierischen Glomeruli nachgewiesen (Reiser *et al.*, 2005). Über die Funktion von TRPC3 in diesen Zellen ist jedoch noch wenig bekannt (Khayyat *et al.*, 2020). In meinen Schnitten waren die Glomeruli im Kontrast hierzu meistens negativ. Einzelne Zellen jedoch schienen gefärbt zu sein. Eine klare anatomische Identifikation gelang nicht, auch wenn eine Zuordnung zum Podozyten aufgrund der Morphologie und der Lokalisation im Glomerulus nahe lag.

Die Expression von TRPC3 wurde in den gewundenen und geraden apikalen Teilen von proximalen Tubuluszellen beschrieben (Ibeh *et al.*, 2019). Sowohl in Mäusen als auch in Menschen konnte ich eine starke Färbung in den proximalen Tubuluszellen der gefärbten Schnitte erkennen. In den tierischen Präparaten waren alle proximalen Tubuli im Außenstreifen stark gefärbt, obwohl im Vergleich in der Rinde nur manche Vertreter stark gefärbt waren. Letztere wurden zur Auswertung benutzt. Ein Erklärungsansatz könnte durch die anatomische Verteilung der Strukturen geboten werden.

In der Tat befinden sich im Außenstreifen des Marks vor allem die geraden Anteile der proximalen Tubuli. In der Rinde jedoch, sind vorwiegend die gewundenen Anteile vertreten. Es ist denkbar, dass die Expression von TRPC3 in den geraden Anteilen stärker ist als in anderen Lokalisationen des proximalen Tubulus. Die stärker gefärbten proximalen Tubuli in der Rinde wären demnach die geraden Anteile der proximalen Tubuli, die in die Rinde ragen. In den menschlichen Proben waren die proximalen Tubuli in der Rinde homogen gefärbt, genauso wie im Außenstreifen. Eine unterschiedliche Verteilung der TRPC3-Kanäle zwischen geraden und gewundenen Teilen des proximalen Tubulus in der Maus ist denkbar. Weitere Untersuchungen mit genauer Identifizierung der geraden und gewundenen Teilen der Tubulusabschnitte sind notwendig, um diese Zusammenhänge zu verifizieren. Eine besondere Rolle wird TRPC3 in der transzellulären Ca^{2+} -Reabsorption im proximalen Tubulus zugeschrieben. Eine besonders apikal-betonte Färbung konnte in den menschlichen Schnitten jedoch nicht erkannt werden (Ibeh *et al.*, 2019).

In einer Arbeit von Goel *et al.* wurde die Verteilung der TRPC3-Kanäle in der Niere beschrieben. Dafür wurden Lysate von Rattenieren durch Co-Lokalisationen von TRPC-Kanälen mit Markerproteine analysiert. Die Expression von TRPC3 wurde auf Hauptzellen des Sammelrohres begrenzt, da weder eine Kolokalisation mit dem peanut lectin, ein Marker für interkalierte Zellen, noch mit der Natrium/Calcium Pumpe 1 (NCX 1), ein Marker für den gewundenen Teil des distalen Tubulus und des Verbindungstubulus, noch mit aquaporin-1 (AQP-1), ein Marker des proximalen Tubulus gezeigt werden konnte (Goel *et al.*, 2006). Dagegen wurde die Kolokalisation von TRPC3 mit einem Marker für den Sammelrohr und Verbindungstubulus, dem AQP-2 Rezeptor gezeigt. Die Expression des NCX ist in Menschen und Tieren jedoch unterschiedlich, was die Grenzen der Übertragbarkeit von tierischen Resultaten auf Menschen aufzeigt (Biner *et al.*, 2002, Loffing und Kaissling, 2003). Das TRPC3-Protein wurde durch Letavernier *et al.* im Jahre 2012 mittels immunhistochemischer Methoden in einer menschlichen Nierenbiopsie im Sammelrohr nachgewiesen (Letavernier *et al.*, 2012). Wir fanden eine starke Braunfärbung sowohl in Menschen- als auch in Tiersammelrohren. Insgesamt scheinen unsere Daten nicht die Theorie von Goel *et. al* zu unterstützen, laut welcher sich TRPC3 im Sammelrohr auf die Hauptzellen beschränkt (Goel *et al.*, 2006). In der Tat erscheinen in meinen Färbungen in den meisten Fällen alle Zellen der Sammelrohre gefärbt. In manchen Menschenfärbungen weisen Sammelrohrzellen einen ungefärbten Stroma auf. Das Verhältnis von interkalierten Zellen zu Hauptzellen beträgt in der Niere normalerweise etwa 1:2 bis 1:3 und könnte mit der Zahl der ungefärbten Zellen in diesen beobachteten Strukturen in etwa korrelieren (Rao *et al.*, 2019). Das Verhältnis von gefärbten zu ungefärbten Zellen variiert jedoch je nach Sammelrohranschnitt stark. Solche Phänomene sind auch in Negativkontrollen aufzufinden und manche Zellmembranen erscheinen geschädigt. Damit könnte man erklären, dass Gewebe ausgeschwemmt worden ist und somit keine Färbung mehr möglich war. Diese Aspekte würden insgesamt eher für die Verzerrung durch ein Artefakt sprechen. Eine mögliche Erklärung, wieso solche Phänomene nur in manchen Schnitten

und dabei ausschließlich im Sammelrohr vorkommen, ist die besondere kuboidale Zellform im Sammelrohr, die im Menschen exazerbierter ist als in Tierexemplaren und somit schneller geschädigt wird (Goel *et al.*, 2006). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Zusammenhänge zu erforschen.

Im Gegensatz dazu fand ich TRPC3 Färbung in den Zellen des menschlichen und tierischen distalen Tubulus. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den verschiedenen untersuchten Lokalisationen festgestellt werden. Im Außenstreifen ist die Färbung beim Menschen etwas schwächer als in den anderen Lokalisationen. Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass TRPC3 im distalen Tubulus genauso wie TRPC3 im proximalen Tubulus zur Regulierung der luminalen Ca^{2+} -Konzentration beitragen könnte (Auwah Boadi *et al.*, 2021, Englisch *et al.*, 2022, Ibeh *et al.*, 2019).

Der Intermediärtubulus war in dieser Arbeit weitestgehend ungefärbt. Jedoch sind Beschreibungen in der Literatur selten anzutreffen und die anatomische Erkennung im Präparat ist schwierig, da eine Verwechslung mit Gefäßquerschnitten nicht ausgeschlossen ist.

6.2.2 Ergebnisse der Nephrokalzinoseproben

TRPC3-Kanäle sollen eine kritische Rolle in der Modulation der luminalen Ca^{2+} -Konzentration im proximalen Tubulus übernehmen (Ibeh *et al.*, 2019). (Liu *et al.*, 2011). Basierend auf den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Bandyopadhyay ging ich der Hypothese nach, dass die Expression von TRPC3 im proximalen Tubulus in menschlichem Nephrokalzinosegewebe reduziert ist (Bandyopadhyay *et al.*, 2005). Bei dem Krankheitsbild der Nephrokalzinose kommt es als Folge einer chronischen Hyperkalziurie, deren Ätiologie multifaktoriell bedingt sein kann zu parenchymalen Kristallablagerungen im Nierengewebe. Ernährungsbedingte, hormonelle und genetische Komponenten müssen berücksichtigt werden (Auwah Boadi *et al.*, 2024, Singh *et al.*, 2022). Die Nephrokalzinose kann akute und chronische Nierenschädigung hervorrufen (Gombedza *et al.*, 2019). Eine protektive Rolle im Zusammenhang mit der Entwicklung von Nephrokalzinosen wurde den TRPC3-Kanälen zugeschrieben (Ibeh *et al.*, 2019). TRPC3-Knockout Mäuse zeigten in der Tat erhöhte Kalzifikationsraten und Kristallbildung im Tubulussystem (Ibeh *et al.*, 2019). Eine andere Studie wies auf eine pH-abhängige, mit TRPC3-Knockout gekoppelte Entwicklung von Nierensteinen, die Fibrose, Entzündung und Apoptose der proximalen Tubuluszellen begünstigte. Insbesondere der TRPC3-Knockout verschlimmerte diese Zustände (Auwah Boadi *et al.*, 2021). Während die oben genannten Studien nahelegen, dass eine TRPC3-Minderexpression für die beobachteten Phänotypen mitverantwortlich ist, konnte die Studie von Liu *et al.* zeigen, dass erst die erhöhten extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen eine reduzierte Expression von TRPC3 auf Monozyten induzieren. Ob die verminderte Expression von TRPC3 in dem Nephrokalzinose Gewebe ursächlich oder als Folge der Nephrokalzinose entsteht ist eine wichtige Frage, die wir mit dieser Analysemethode nicht

beantworten können. Ein statistisch signifikanter Unterschied im DAB-Score zwischen den pathologischen Nierenproben und den OP-Nierenproben konnte in der Tat nachgewiesen werden, mit verminderten Werten in den Nephrokalzinosen. Im Sammelrohr zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied.

Wenn diese Hypothese durch immunhistochemische Techniken bestätigt oder verworfen werden soll, muss beachtet werden, dass zum einen die Färbung mit der Expression von TRPC3-Kanälen korrelieren sollte. Dies kann als solches angenommen werden, kann aber nicht als absolute Sicherheit betrachtet werden. In der Tat spielen unterschiedliche Einflüsse während der Verarbeitung der Proben (wie in **Kapitel 6.1** angesprochen) oder die Möglichkeit der unspezifischen Bindung der Antikörper eine Rolle. Insgesamt ist es notwendig, mit anderen Detektionstechniken zu arbeiten, um dies zu bestätigen.

Darüberhinaus als problematisch anzusehen ist die geringe Anzahl an untersuchten Proben, die bei fünf in den pathologischen Proben zu klein ist. Untersuchungen an größeren Patientengruppen sind notwendig, um die dargelegte Hypothese zu bestätigen oder zu verwerfen. Eine Geschlechtsabhängige Untersuchung am Menschen wäre ebenso notwendig, da experimentell gewonnene Ergebnisse darauf hinweisen, dass in tierischem Gewebe weibliche Vertreter unter besonderen Bedingungen anfälliger für Steinbildungen in der Niere sind und somit auch die Proteinexpression von TRPC3 davon abhängig sein könnte (Auwah Boadi *et al.*, 2024).

Die Nephrokalzinose ist dazu ein sehr heterogenes Krankheitsbild. Die Patienten weisen oft unterschiedliche Vorerkrankungen auf. Die veränderte Expression von TRPC3 könnte durch diese beeinflusst worden sein (Linda Shavit, 2015, Vaidya *et al.*, 2024). Auch die Einteilung in unterschiedlichen Nephrokalzinose-Stadien wäre notwendig, da die Kalzifizierungsgrade unterschiedlich sind und somit die Expression unterschiedlich beeinflusst werden kann. Auch die Beeinflussung der Proteinexpression in den anderen humanen Gewebeproben durch unterschiedliche Patienteneigenschaften müsste ausgeschlossen werden, um einen Vergleich von „gesund“ und „pathologisch“ zu ermöglichen, was in Anbetracht der in **Kapitel 6.1.1** angesprochenen Fakten (Alter, Vorerkrankungen, Beeinflussung der Proteinexpression auf Mikromolekularer Ebene durch die Nierenzellkarzinome in der OP-Gruppe etc.) nicht mit Sicherheit möglich ist.

TRPC3 stellt einen pharmakologischen Angriffspunkt dar gegen Krankheiten wie die Nephrokalzinose, die in eine chronische Nierenerkrankung münden kann. Unter der Voraussetzung, dass die Expression vom TRPC3 Protein in der untersuchten Gruppe nur durch die Nephrokalzinosen bedingt ist, die Immunhistochemie diese adäquat erkennt (Braunfärbung = Proteinexpression) und die anderen Gewebeproben als „gesund“ eingestuft werden, ist eine verminderte Expression vom TRPC3-Protein in den Nephrokalzinosen im Vergleich mit den OP-Proben suggeriert. Somit würde ich die

Theorie unterstützen, nach welcher die Expression von TRPC3 in Nephrokalzinosen und bei der Entwicklung von Hyperkalziurie, Nephrokalzinose und chronischen Nierenerkrankungen im Vergleich zum Gesunden beeinflusst sein kann (Ibeh *et al.*, 2019). Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven und mit anderen Techniken sind notwendig, um diese Ergebnisse zu bestätigen und ein besseres Verständnis der Pathophysiologie und des Einflusses von TRPC3-Kanälen in diesem Zusammenhang zu erlangen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde mithilfe immunhistochemischer Methoden die Expression von TRPC3 in gesundem tierischem und menschlichem Gewebe untersucht, und letzteres mit pathologischem Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe verglichen. Der immunhistochemische Nachweis des TRPC3-Kanals war in diesen Geweben erfolgreich. Dabei wurden unterschiedliche Probenherkünfte und Probenverarbeitungen berücksichtigt und miteinander verglichen. Trotz minimaler Abweichungen ließ sich ein recht homogenes Färbemuster im gesunden Gewebe beschreiben. Unterschiede vor allem in der Qualität des Gewebes waren zwischen Körperspender- und OP-Nieren zu beobachten. Unterschiede in der Ausprägung der Färbung waren minimal. Meine Ergebnisse unterstützen weitestgehend die für Tiere bereits vorhandenen Forschungsergebnisse sowie die Translation derer auf den Menschen. Die hier beschriebene TRPC3-Expression im Menschen ist neu. Weitere Studien mit höheren Patientenzahlen und anderen Detektionstechniken sind erforderlich, um die hier vorgestellten Erkenntnisse über das renale TRPC3-Expressionsprofil beim Menschen zu verifizieren und das Verständnis in diesem Themengebiet zu vertiefen.

In dieser Arbeit konnte auch ein Unterschied im Hinblick auf die TRPC3-Färbung im proximalen Tubulus zwischen gesundem und pathologischem Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe festgestellt werden. Zukünftig wird es notwendig sein, durch Untersuchungen an höheren Probenzahlen diese Ergebnisse zu verifizieren. In der Vergangenheit haben sich Arbeitsgruppen bereits mit dem Beitrag von tubulärem TRPC3 zur Vorbeugung der Nephrokalzinose in Tiermodellen beschäftigt. Meines Wissens, sind die hier vorgestellten Ergebnisse die ersten ihrer Art, die TRPC3 in menschlichem Nephrokalzinose-Gewebe untersucht haben. Da es bisher keine zufriedenstellende Therapie der chronischen Nierenerkrankung gibt, in der die Nephrokalzinose münden kann, ist es zwingend erforderlich, das Wissen über solche Krankheitsbilder wie die Nephrokalzinose weiter zu vertiefen, um gezielte Therapien zu entwickeln, die eine pharmakologische Modulierung des TRPC3-Kanals beinhalten (Tiapko und Groschner, 2018).

8 Literaturverzeichnis

1. Asghar MY and Tornquist K (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels as Modulators of Migration and Invasion. *Int J Mol Sci*, 21: 102047.
2. Awuah Boadi E, Shin S, Choi BE, Ly K, Raub CB, and Bandyopadhyay BC (2024) Sex-specific Stone-forming Phenotype in Mice During Hypercalciuria/Urine Alkalization. *Lab Invest*, 104: 102047.
3. Awuah Boadi E, Shin S, Yeroushalmi S, Choi BE, Li P, and Bandyopadhyay BC (2021) Modulation of Tubular pH by Acetazolamide in a Ca(2+) Transport Deficient Mice Facilitates Calcium Nephrolithiasis. *Int J Mol Sci*, 22:
4. Bandyopadhyay BC, Swaim WD, Liu X, Redman RS, Patterson RL, and Ambudkar IS (2005) Apical localization of a functional TRPC3/TRPC6-Ca2+-signaling complex in polarized epithelial cells. Role in apical Ca2+ influx. *J Biol Chem*, 280: 12908-16.
5. Biner HL, Arpin-Bott MP, Loffing J, Wang X, Knepper M, Hebert SC, and Kaissling B (2002) Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *J Am Soc Nephrol*, 13: 836-847.
6. Birnbaumer L (2009) The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 49: 395-426.
7. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, Anagnostou V, and Rimm D (2010) Antibody validation. *Biotechniques*, 48: 197-209.
8. Chan JK (2014) The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol*, 22: 12-32.
9. Chen X, Sooch G, Demaree IS, White FA, and Obukhov AG (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells*, 9:
10. Cossens DJ and Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224: 285-7.
11. Diebolt CM, Schaudien D, Junker K, Krasteva-Christ G, Tschernig T, and Englisch CN (2024) New insights in the renal distribution profile of TRPC3 - Of mice and men. *Ann Anat*, 252: 152192.
12. Drenkhahn B, *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Band 1*. 17. ed, ed. ELSEVIER. 2008.
13. Dryer SE, Roshanravan H, and Kim EY (2019) TRPC channels: Regulation, dysregulation and contributions to chronic kidney disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865: 1041-1066.
14. Duan J, Li J, Chen GL, Ge Y, Liu J, Xie K, Peng X, Zhou W, Zhong J, Zhang Y, Xu J, Xue C, Liang B, Zhu L, Liu W, Zhang C, Tian XL, Wang J, Clapham DE, Zeng B, Li Z, and Zhang J (2019) Cryo-EM structure of TRPC5 at 2.8-A resolution reveals unique and conserved structural elements essential for channel function. *Sci Adv*, 5: eaaw7935.
15. Earley S, Santana LF, and Lederer WJ (2022) The physiological sensor channels TRP and piezo: Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021. *Physiol Rev*, 102: 1153-1158.
16. el-Shennawy IE, Gee DJ, and Aparicio SR (1985) Renal tubular epithelia ultrastructure in autolysis. *J Pathol*, 147: 13-21.
17. Englisch C, Kirstein E, Diebolt C, Wagner M, and Tschernig T (2024) Distribution of TRPC3 and TRPC6 in the Human Exocrine and Endocrine Pancreas. *Pathology - Research and Practice*,
18. Englisch CN, Paulsen F, and Tschernig T (2023a) TRPC Channels in the Physiology and Pathophysiology of the Renal Tubular System: What Do We Know? *International Journal of Molecular Sciences*, 24: 181.

19. Englisch CN, Röhricht D, Walz M, Junker K, Beckmann A, Meier C, Paulsen F, Jung M, and Tschernig T (2022) TRPC6 Is Found in Distinct Compartments of the Human Kidney. International Journal of Translational Medicine, 2: 156-163.
20. Englisch CN, Steinhauser J, Wemmert S, Jung M, Gawlitza J, Wenzel G, Schick B, and Tschernig T (2023b) Immunohistochemistry Reveals TRPC Channels in the Human Hearing Organ-A Novel CT-Guided Approach to the Cochlea. Int J Mol Sci, 24:
21. Fallah HP, Ahuja E, Lin H, Qi J, He Q, Gao S, An H, Zhang J, Xie Y, and Liang D (2022) A Review on the Role of TRP Channels and Their Potential as Drug Targets_An Insight Into the TRP Channel Drug Discovery Methodologies. Front Pharmacol, 13: 914499.
22. Fan C, Choi W, Sun W, Du J, and Lu W (2018) Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3. Elife, 7:
23. Feng S (2017) TRPC Channel Structure and Properties. Adv Exp Med Biol, 976: 9-23.
24. Feng S, Li H, Tai Y, Huang J, Su Y, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L, and Wang Y (2013) Canonical transient receptor potential 3 channels regulate mitochondrial calcium uptake. Proc Natl Acad Sci U S A, 110: 11011-6.
25. Gerhard Aumüller GA, Arne Conrad, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio, *Duale Reihe Anatomie*. 2. ed. 2010a. 1236.
26. Gerhard Aumüller GA, Arne Conrad, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio, *Duale Reihe Anatomie* 2010b.
27. Goel M and Schilling WP (2010) Role of TRPC3 channels in ATP-induced Ca²⁺ signaling in principal cells of the inner medullary collecting duct. Am J Physiol Renal Physiol, 299: F225-33.
28. Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Estacion M, and Schilling WP (2006) Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol, 290: F1241-52.
29. Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Hopfer U, and Schilling WP (2007a) Vasopressin-induced membrane trafficking of TRPC3 and AQP2 channels in cells of the rat renal collecting duct. Am J Physiol Renal Physiol, 293: F1476-88.
30. Goel M, Zuo CD, Sinkins WG, and Schilling WP (2007b) TRPC3 channels colocalize with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and Na⁺ pump in axial component of transverse-axial tubular system of rat ventricle. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 292: H874-83.
31. Gombedza FC, Shin S, Kanaras YL, and Bandyopadhyay BC (2019) Abrogation of store-operated Ca(2+) entry protects against crystal-induced ER stress in human proximal tubular cells. Cell Death Discov, 5: 124.
32. Gualdani R and Gailly P (2020) How TRPC Channels Modulate Hippocampal Function. Int J Mol Sci, 21:
33. Hans-Christian Pape AK, Stefan Silbernagl, *Physiologie*. 7. Auflage ed. 2014: Georg Thieme Verlag KG.
34. Hardie RC and Minke B (1992) The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. Neuron, 8: 643-51.
35. Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning HA, Sumser M, Abramowitz J, Blum R, Dietrich A, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, and Konnerth A (2008) TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. Neuron, 59: 392-8.
36. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, and Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 7461-6.
37. Ibeh CL, Yiu AJ, Kanaras YL, Paal E, Birnbaumer L, Jose PA, and Bandyopadhyay BC (2019) Evidence for a regulated Ca(2+) entry in proximal tubular cells and its implication in calcium stone formation. J Cell Sci, 132:
38. Ilatovskaya DV, Levchenko V, Ryan RP, Cowley AW, Jr., and Staruschenko A (2011) NSAIDs acutely inhibit TRPC channels in freshly isolated rat glomeruli. Biochem Biophys Res Commun, 408: 242-7.

39. Jacobs T, Abdinghoff J, and Tschernig T (2022) Protein detection and localization of the non-selective cation channel TRPC6 in the human heart. *Eur J Pharmacol*, 924: 174972.
40. Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Kaessmeyer S, and Plendl J (2011) Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy--A study based on histo- and microbiological analyses. *Ann Anat*, 193: 71-5.
41. Kaissling B and Le Hir M (1990) Functional morphology of kidney tubules and cells in situ. *Methods Enzymol*, 191: 265-89.
42. Kaneko Y and Szallasi A (2014) Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol*, 171: 2474-507.
43. Kaul NL, Diebolt CM, Meier C, and Tschernig T (2023) Transient receptor potential channel 3 in human liver and gallbladder - An investigation in body donors. *Ann Anat*, 250: 152150.
44. Kawasaki BT, Liao Y, and Birnbaumer L (2006) Role of Src in C3 transient receptor potential channel function and evidence for a heterogeneous makeup of receptor- and store-operated Ca²⁺ entry channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 335-40.
45. Khayyat NH, Tomilin VN, Zaika O, and Pochynyuk O (2020) Polymodal roles of TRPC3 channel in the kidney. *Channels (Austin)*, 14: 257-267.
46. Kirstein E, Schaudien D, Wagner M, Diebolt CM, Bozzato A, Tschernig T, and Englisch CN (2024) TRPC3 Is Downregulated in Primary Hyperparathyroidism. *Int J Mol Sci*, 25:
47. Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, and Muallem S (1999) The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell*, 4: 423-9.
48. Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, and Muallem S (1998) Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature*, 396: 478-82.
49. Kistler AD, Singh G, Altintas MM, Yu H, Fernandez IC, Gu C, Wilson C, Srivastava SK, Dietrich A, Walz K, Kerjaschki D, Ruiz P, Dryer S, Sever S, Dinda AK, Faul C, and Reiser J (2013) Transient receptor potential channel 6 (TRPC6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease. *J Biol Chem*, 288: 36598-609.
50. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, and Mori Y (2009) Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 5400-5.
51. Klopfleisch R, von Deetzen M, Weiss AT, Weigner J, Weigner F, Plendl J, and Gruber AD (2013) Weigners fixative-an alternative to formalin fixation for histology with improved preservation of nucleic acids. *Vet Pathol*, 50: 191-9.
52. Koivisto AP, Belvisi MG, Gaudet R, and Szallasi A (2022) Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov*, 21: 41-59.
53. Kwan HY, Huang Y, and Yao X (2004) Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 2625-30.
54. Lang G, *Histotechnik 2006*: Springer Verlag
55. Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, Bousquet SM, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, and Boulay G (2006) Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *J Biol Chem*, 281: 30356-64.
56. Letavernier E, Rodenas A, Guerrot D, and Haymann JP (2012) Williams-Beuren syndrome hypercalcemia: is TRPC3 a novel mediator in calcium homeostasis? *Pediatrics*, 129: e1626-30.
57. Li Z, Zhou J, Li Y, Yang F, Lian X, and Liu W (2019) Mitochondrial TRPC3 promotes cell proliferation by regulating the mitochondrial calcium and metabolism in renal polycystin-2 knockdown cells. *Int Urol Nephrol*, 51: 1059-1070.

58. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, and Birnbaumer L (2007) Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 4682-7.
59. Libard S, Cerjan D, and Alafuzoff I (2019) Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*, 151: 91-96.
60. Lichtenegger M and Groschner K (2014) TRPC3: a multifunctional signaling molecule. *Handb Exp Pharmacol*, 222: 67-84.
61. Linda Shavit PJaRJU (2015) What is nephrocalcinosis? *Kidney international*,
62. Liu Y, Krueger K, Hovsepian A, Tepel M, and Thilo F (2011) Calcium-dependent expression of transient receptor potential canonical type 3 channels in patients with chronic kidney disease. *Arch Biochem Biophys*, 514: 44-9.
63. Loffing J and Kaissling B (2003) Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284: F628-43.
64. Lopez JJ, Jardin I, Sanchez-Collado J, Salido GM, Smani T, and Rosado JA (2020) TRPC Channels in the SOCE Scenario. *Cells*, 9:
65. Lüllmann-Rauch R, *Taschenlehrbuch Histologie*. 5. ed.: Thieme.
66. Mauriello S, Treglia M, Pallocci M, Bonfiglio R, Giacobbi E, Passalacqua P, Cammarano A, D'Ovidio C, Marsella LT, and Scimeca M (2022) Antigenicity Preservation Is Related to Tissue Characteristics and the Post-Mortem Interval: Immunohistochemical Study and Literature Review. *Healthcare (Basel)*, 10:
67. Minke B, Wu C, and Pak WL (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature*, 258: 84-7.
68. Miyagi K, Kiyonaka S, Yamada K, Miki T, Mori E, Kato K, Numata T, Sawaguchi Y, Numaga T, Kimura T, Kanai Y, Kawano M, Wakamori M, Nomura H, Koni I, Yamagishi M, and Mori Y (2009) A pathogenic C terminus-truncated polycystin-2 mutant enhances receptor-activated Ca²⁺ entry via association with TRPC3 and TRPC7. *J Biol Chem*, 284: 34400-12.
69. Montell C and Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2: 1313-23.
70. Moran MM (2018) TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 58: 309-330.
71. Niemeyer BA (2017) The STIM-Orai Pathway: Regulation of STIM and Orai by Thiol Modifications. *Adv Exp Med Biol*, 993: 99-116.
72. Nilius B and Owsianik G (2010) Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch*, 460: 437-50.
73. Nilius B and Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, 12: 218.
74. Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K, and Mori Y (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J Biol Chem*, 273: 10279-87.
75. Oliveira B, Kleta R, Bockenhauer D, and Walsh SB (2016) Genetic, pathophysiological, and clinical aspects of nephrocalcinosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 311: F1243-F1252.
76. Pedersen SF, Owsianik G, and Nilius B (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38: 233-52.
77. Prakriya M and Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, 95: 1383-436.
78. Ram S, Vizcarra P, Whalen P, Deng S, Painter CL, Jackson-Fisher A, Pirie-Shepherd S, Xia X, and Powell EL (2021) Pixelwise H-score: A novel digital image analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from immunohistochemistry images. *PLoS One*, 16: e0245638.

79. Rao R, Bhalla V, and Pastor-Soler NM (2019) Intercalated Cells of the Kidney Collecting Duct in Kidney Physiology. *Semin Nephrol*, 39: 353-367.
80. Rassow J, Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2016) Duale Reihe Biochemie Georg Thieme Verlag
81. Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, and Pollak MR (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*, 37: 739-44.
82. Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, and Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, 109: 95-104.
83. Rosasco MG and Gordon SE, *TRP Channels: What Do They Look Like?*, in *Neurobiology of TRP Channels*, T.L.R. Emir, Editor. 2017: Boca Raton (FL). p. 1-9.
84. Sampaio FJ (2000) Renal anatomy. Endourologic considerations. *Urol Clin North Am*, 27: 585-607, viii.
85. Sayer JA, Carr G, and Simmons NL (2004) Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clin Sci (Lond)*, 106: 549-61.
86. Schneider MR (2021) Von Kossa and his staining technique. *Histochem Cell Biol*, 156: 523-526.
87. Singh P, Harris PC, Sas DJ, and Lieske JC (2022) The genetics of kidney stone disease and nephrocalcinosis. *Nat Rev Nephrol*, 18: 224-240.
88. Soriano RM, Penfold D, and Leslie SW, *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Kidneys*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
89. Storch U, Forst AL, Pardatscher F, Erdogmus S, Philipp M, Gregorita M, Mederos YSM, and Gudermann T (2017) Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E37-E46.
90. Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, and Zhu MX (2001) Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem*, 276: 21303-10.
91. Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu JX, Liu M, Zhou X, Zhang X, and Chen L (2018) Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Res*, 28: 746-755.
92. Tiapko O and Groschner K (2018) TRPC3 as a Target of Novel Therapeutic Interventions. *Cells*, 7:
93. Trebak M, Hempel N, Wedel BJ, Smyth JT, Bird GS, and Putney JW, Jr. (2005) Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712. *Mol Pharmacol*, 67: 558-63.
94. Vaidya SR, Yarrarapu SNS, and Aeddula NR, *Nephrocalcinosis*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL).
95. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, and De A (2014) IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*, 9: e96801.
96. Vazquez G, Wedel BJ, Kawasaki BT, Bird GS, and Putney JW, Jr. (2004) Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels. *J Biol Chem*, 279: 40521-8.
97. Venkatachalam K and Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76: 387-417.
98. Vervaet BA, Verhulst A, D'Haese PC, and De Broe ME (2009) Nephrocalcinosis: new insights into mechanisms and consequences. *Nephrol Dial Transplant*, 24: 2030-5.
99. Wang H, Cheng X, Tian J, Xiao Y, Tian T, Xu F, Hong X, and Zhu MX (2020) TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacol Ther*, 209: 107497.

100. Wong F, Schaefer EL, Roop BC, LaMendola JN, Johnson-Seaton D, and Shao D (1989) Proper function of the *Drosophila* trp gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron*, 3: 81-94.
101. Woodard GE, Lopez JJ, Jardin I, Salido GM, and Rosado JA (2010) TRPC3 regulates agonist-stimulated Ca²⁺ mobilization by mediating the interaction between type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, RACK1, and Orai1. *J Biol Chem*, 285: 8045-53.
102. Woudenberg-Vrenken TE, Bindels RJ, and Hoenderop JG (2009) The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 5: 441-9.
103. Xia W, Wang Q, Lin S, Wang Y, Zhang J, Wang H, Yang X, Hu Y, Liang H, Lu Y, Zhu Z, and Liu D (2023) A high-salt diet promotes hypertrophic scarring through TRPC3-mediated mitochondrial Ca(2+) homeostasis dysfunction. *Heliyon*, 9: e18629.
104. Yuan JP, Kim MS, Zeng W, Shin DM, Huang G, Worley PF, and Muallem S (2009) TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels (Austin)*, 3: 221-5.
105. Zhang X, Hu M, Yang Y, and Xu H (2018) Organellar TRP channels. *Nat Struct Mol Biol*, 25: 1009-1018.
106. Zhu X, Jiang M, and Birnbaumer L (1998) Receptor-activated Ca²⁺ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca²⁺ entry. *J Biol Chem*, 273: 133-42.
107. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, and Birnbaumer L (1996) trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell*, 85: 661-71.
108. Zitt C, Obukhov AG, Strubing C, Zobel A, Kalkbrenner F, Luckhoff A, and Schultz G (1997) Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol*, 138: 1333-41.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung und Einteilung der Niere und des Nephrons	5
Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Nierenkörperchens	7
Abbildung 3. Schematischer Aufbau von TRPC3	14
Abbildung 4. Schematische Darstellung des Mechanismus der ROCE- und SOCE-Aktivierung	16
Abbildung 5. Schematische Darstellung der histologischen Arbeitsschritte	25
Abbildung 6. Schematische Darstellung des Prinzips der immunhistochemischen Färbung	31
Abbildung 7. HE-Färbung von menschlichem Nierengewebe	37
Abbildung 8. HE-Färbung von tierischem Nierengewebe	38
Abbildung 9. Exemplarische Markierung der ROIs im NDP-Viewer Programm	41
Abbildung 10. Exemplarische Auswertung der ROIs durch das Programm	41
Abbildung 11. Darstellung des Farbcodes für die manuelle Analyse der Färbungen	45
Abbildung 12. HE-Färbung des menschlichen Gewebes mit unterschiedlichen Fixierungen	52
Abbildung 13. HE-Färbung des tierischen Gewebes als Übersichtsaufnahme	53
Abbildung 14. HE-Färbung des tierischen Gewebes der Niere	54
Abbildung 15. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von formalinfixiertem Gewebe	57
Abbildung 16. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von NEP-fixiertem Gewebe	65
Abbildung 17. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von tierischem Gewebe in der Übersicht	71
Abbildung 18. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von tierischem Gewebe in unterschiedlichen Lokalisationen	71
Abbildung 19. Ergebnisse der maschinellen Auswertung von OP- und Mausproben	72
Abbildung 20. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von menschlichem Gewebe	76
Abbildung 21. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von tierischem Gewebe	77
Abbildung 22. Spezifitätskontrolle vom TRPC3-Antikörper	79
Abbildung 23. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung von menschlichem Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe	82
Abbildung 24. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung und Von-Kossa Färbung von menschlichem Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe im Vergleich in der Übersicht	83
Abbildung 25. Immunhistochemische anti-TRPC3 Färbung und Von-Kossa Färbung von menschlichem Nephrokalzinose-betroffenem Gewebe im Vergleich in höherer Vergrößerung	84
Abbildung 26. Vergleich der Immunhistochemischen anti-TRPC3 Färbung von menschlichem Nephrokalzinosebe-troffenem- und OP-Gewebe	86
Abbildung 27. Exemplarischer Vergleich der Auswertung des Programms zwischen OP- und von Nephrokalzinosebetroffenem Gewebe	87

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Eigenschaften des Körperspenderkollektivs	20
Tabelle 2. Eigenschaften der Patienten, von welchen die Proben die im Operationssaal gewonnen wurden	22
Tabelle 3. Eigenschaften der an Nephrokalzinose-erkrankten Patienten	23
Tabelle 4. HE-Färbungsprotokoll	29
Tabelle 5. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 1	42
Tabelle 6. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 2	43
Tabelle 7. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 3	43
Tabelle 8. Einstellung der Hämatoxylin und DAB-Skala im Visiopharm Programm, Version 4	43
Tabelle 9. Code für die manuelle Betrachtung und Analyse der Färbungen	44
Tabelle 10. Geräteliste	47
Tabelle 11. Verbrauchsmaterialien	48
Tabelle 12. Chemikalien und Lösungen	49
Tabelle 13. Substanzen für die immunhistochemischen Färbungen	50
Tabelle 14. Benutzte Programme	50
Tabelle 15. Übersicht von Anzahl und Art der analysierten Proben pro Gewebegruppe	51
Tabelle 16. Ergebnisse der manuellen Auswertung der formalinfixierten Proben, Gutachter 1	55
Tabelle 17. Ergebnisse der manuellen Auswertung der formalinfixierten Proben, Gutachter 2	56
Tabelle 18. Vergleich der maschinell ausgewerteten formalinfixierten Körperspender-Proben und OP-Proben	62
Tabelle 19. Ergebnisse der manuellen Auswertung der NEP-fixierten Proben, Gutachter 1	64
Tabelle 20. Ergebnisse der manuellen Auswertung der NEP-fixierten Proben, Gutachter 2	64
Tabelle 21. Gewichtete DAB-Werte der Glomeruli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse	73
Tabelle 22. Ergebnisse der proximalen Tubuli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse	74
Tabelle 23. Ergebnisse der distalen Tubuli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse	74
Tabelle 24. Ergebnisse der Intermediärtubuli der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse	75
Tabelle 25. Ergebnisse der Sammelrohre der OP- und Maus-Proben in der maschinellen Analyse	75
Tabelle 26. Maschinelle Auswertung der Spezifitätskontrolle	78
Tabelle 27. Ergebnisse des Vergleichs der pathologischen entkalzifizierten und nicht-entkalzifizierten Proben untereinander	81
Tabelle 28. Ergebnisse des Vergleichs der maschinell ausgewerteten nicht-entkalzifizierten und OP- Proben	85

11 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Glomeruli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter (n=13, 65 Strukturen)	58
Diagramm 2. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der proximalen Tubuli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter (n=13, 65 Strukturen)	58
Diagramm 3. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der distalen Tubuli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter (n = 13, 65 Strukturen)	59
Diagramm 4. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Intermediärtubuli in den formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter (n = 13, 65 Strukturen)	59
Diagramm 5. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Sammelrohre in den Formalinfixierten Schnitten je nach Gutachter	60
Diagramm 6. Balkendiagramm. Maschinelle Auswertung von vier formalinfixierte Körperspender	61
Diagramm 7. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Glomeruli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen)	66
Diagramm 8. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der proximalen Tubuli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen)	66
Diagramm 9. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der distalen Tubuli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen)	67
Diagramm 10. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Intermediärtubuli der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen)	67
Diagramm 11. Balkendiagramm. Manuelle Auswertung der Färbung der Sammelrohre der NEP-fixierten Körperspender je nach Gutachter (n = 3, 15 Strukturen)	68
Diagramm 12. Balkendiagramm. Maschinelle Auswertung der Färbung der Sammelrohre (n = 1, 5 Strukturen)	69
Diagramm 13. Maschinelle Auswertung der Färbung der Peptidkontrolle	78

12 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
ADPKD	Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung
AQP1	Aquaporin 1
AQP2	Aquaporin 2
AQP3	Aquaporin 3
ARD	Ankyrin repeated domain
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
Ca²⁺	Calcium
CKD	Chronische Nierenerkrankung
Cl⁺	Chlorid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAG	Diacylglycerol
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DT	Distaler Tubulus
ECD	Extrazelluläre Domäne
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	Et cetera
F_{ab}	Fragment antigen binding
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
G	Gauge (Einheit)
GBM	Glomeruläre Basalmembran
G_s-Protein	G_s-Protein gekoppelte Rezeptoren
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HRP	Horseradish Peroxidase

H⁺	Wasserstoffion
I_{CRAC}	Calcium Release Activated Calcium Channels
IC-Zellen	Intercalated Cells
IHC	Immunhistochemie
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IT	Intermediärtubulus
K⁺	Kalium
Mg²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Na⁺	Natrium
NCX	Natrium Calcium Pumpe
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol
NGS	Normales Ziegenserum
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Pondus hydrogenii
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PT	Proximaler Tubulus
ROI	Region of Interest
ROCE	Receptor Operated Calcium Entry
§	Paragraph
SD	Standardabweichung
SOCE	Store Operated Calcium Entry
SR	Sammelrohr
STIM	Stroma Interaction Molecule Proteine
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin

TRPC	Transient Receptor Potential Canonical/Classical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPN	Transient Receptor Potential No mechanopotential
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
%	Prozent
pyr 3	Pyrazol-Verbindung
z.B.	zum Beispiel

13 Publikationen

- C. N. Englisch; **C. M. Diebolt**; D. Schaudien; G. Klammlinger; E. Kirstein; K. Junker; M. Wagner; T. Tschernig (2024). **Proximal Tubular TRPC3 Immunostaining is Reduced in Human Nephrocalcinosis Tissue**. Laboratory Investigation.
DOI: 10.1016/j.labinv.2024.102109.
- **C. M. Diebolt**; D. Schaudien; K. Junker; G. Krasteva-Christ; T. Tschernig, C. N. Englisch (2024). **New insights in the renal distribution profile of TRPC3 – Of mice and men**. *Annals of Anatomy*. Volume 252, Pages 152192. ISSN: 1618-0402 (Electronic). 0940-9602 (Linking). DOI: 10.1016/j.aanat.2023.152192

Der Inhalt dieser Arbeit wurde im Rahmen eines Vortrages beim European Student Symposium on Anatomical Research 2023 von der European Federation for Experimental Morphology durch Herrn Colya Englisch vorgestellt (nominiert durch die deutsche anatomische Gesellschaft).

14 Danksagung

Meine tiefste Dankbarkeit gilt zunächst denen, die sich dazu entschieden haben ihren Körper der Wissenschaft zu widmen und somit mir als Medizinerin ihr Vertrauen zu schenken. Ein respektvoller und würdiger Umgang mit den Körperspendern war mir stets ein sehr wichtiges Anliegen.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, Leiter der Prosektur, der mir nicht nur das Thema dieser Arbeit anvertraute, sondern mich auch mit seiner herausragenden Betreuung und seinem fachlichen Rat jederzeit unterstützte. Für die offene, stets unkomplizierte Kommunikation, sowie die Zuversicht und lösungsorientierte Herangehensweise bin ich sehr dankbar. Dies hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein aufrichtiger Dank gilt Colya Englisch, dessen fachliche Kompetenz, innovative Ideen und konstruktive Kritik die Qualität meiner Arbeit maßgeblich beeinflusst haben. Seine unermüdliche Unterstützung in diesem Prozess sowie sein stets offenes Ohr waren für mich von unschätzbarem Wert und haben mich sowohl persönlich als auch fachlich weitergebracht. Durch seine Verbesserungsvorschläge konnte die Qualität der Arbeit maßgeblich verbessert werden.

Ich möchte mich zudem bei Herrn Dr. Dirk Schaudien aus dem Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover für die technische und materielle Unterstützung herzlichst bedanken. Seine fachliche Beratung und seine Unterstützung waren sehr wertvoll.

Danke an Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker aus der Abteilung für Urologie und Kinderurologie in Homburg für die Bereitstellung der Operationsproben.

Danke an Herrn Prof. Dr. med. Matthias Wagner und Herrn Dr. med. Gilbert Georg Klammlinger aus dem Institut für Pathologie in Homburg für die Zusammenarbeit im Hinblick auf die pathologischen Nierenproben.

Danke an Frau univ.-Prof. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie in Homburg für die freundliche Bereitstellung der Mausnieren.

Ein herzliches Dankeschön richtet sich auch an das Institut für Anatomie und Zellbiologie in Homburg, dessen Bereitstellung von Räumlichkeiten und Ressourcen für die Durchführung dieser Arbeit wichtig waren. Danke an Irina Scheck und Katja Schäfer für die Einarbeitung und Zusammenarbeit im Labor.

Darüber hinaus möchte ich der Studienstiftung des deutschen Volkes meinen Dank aussprechen, die mich nicht nur finanziell unterstützt, sondern auch ideell gefördert hat und mir somit neue Perspektiven im Studium und ein neuer Blick auf die Forschung gegeben hat.

Ebenfalls möchte ich Dr. iur. Susanne Englisch für das sorgfältige und besonders gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit und ihre zielführende, konstruktive Kritik bedanken.

Ich möchte zuletzt meinen tiefsten Dank meinen Eltern aussprechen, die mich mein ganzes Leben lang in jeglicher Art und Weise unterstützt haben und mir ermöglichten Medizin zu studieren. Ihre Liebe hat mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin.

15 Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 04.12.2024

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Barbara Niemeyer