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

Die nicht-selektiven Ionenkanäle
TRPC3 und TRPC6
im Glomus caroticum des Menschen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von:

Isabelle Sophie Marie Nonnenmacher

geb. am: 18.04.2002 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 25.03.2026

Dekan: Prof. Dr. M. Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Tschernig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Boehm

Widmung

In Liebe für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 1.1 | Deutsche Zusammenfassung | 1 |
| 1.1.1 | Ziel | 1 |
| 1.1.2 | Methodik | 1 |
| 1.1.3 | Ergebnisse | 1 |
| 1.1.4 | Schlussfolgerung | 2 |
| 1.2 | Abstract | 2 |
| 1.2.1 | Aim | 2 |
| 1.2.2 | Methods | 2 |
| 1.2.3 | Results | 3 |
| 1.2.4 | Conclusion | 3 |
| 2 | Einleitung | 4 |
| 2.1 | Das Glomus caroticum | 4 |
| 2.1.1 | Mikroskopische Anatomie | 4 |
| 2.1.2 | Makroskopische Anatomie | 4 |
| 2.1.3 | Physiologie | 6 |
| 2.1.4 | Pathologie und Pathophysiologie | 8 |
| 2.1.5 | Therapeutische Angriffspunkte | 10 |
| 2.2 | Die TRP-Kanäle | 10 |
| 2.2.1 | Aufbau und Klassen | 11 |
| 2.2.2 | Allgemeines zu TRPC3- und TRPC6-Kanälen | 14 |
| 2.2.3 | TRPC3 und TRPC6 als Angriffspunkt von Pharmaka | 16 |
| 2.3 | Ziel der Arbeit | 18 |
| 3 | Material und Methodik | 19 |
| 3.1 | Materialien | 19 |
| 3.2 | Abläufe | 19 |
| 3.3 | Hinweise zu den Körperspendern | 19 |
| 3.3.1 | Fixierungsabläufe | 19 |
| 3.3.2 | Informationen über die Körperspender | 20 |
| 3.4 | Probenentnahme | 21 |
| 3.5 | Entkalkung | 22 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6 | Probeneinbettung..... | 23 |
| 3.7 | Schneiden..... | 23 |
| 3.8 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... | 23 |
| 3.9 | Immunhistochemie..... | 24 |
| 3.10 | Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung..... | 30 |
| 3.11 | Mikroskopische Auswertung..... | 31 |
| 3.11.1 | Histomorphologische Untersuchung..... | 31 |
| 3.11.2 | Histomorphometrische Untersuchung..... | 33 |
| 3.11.3 | Auswertung der Immunhistochemie..... | 33 |
| 4 | Ergebnisse..... | 35 |
| 4.1 | Histomorphologie..... | 36 |
| 4.1.1 | Befundung der Arteria carotis communis..... | 36 |
| 4.1.2 | Befundung des Glomus caroticums..... | 41 |
| 4.2 | Histomorphometrie..... | 45 |
| 4.3 | Immunhistochemie..... | 49 |
| 4.3.1 | Semiquantitative Befundung..... | 49 |
| 4.3.2 | Densitometrie..... | 52 |
| 4.4 | Negativkontrolle..... | 54 |
| 5 | Diskussion..... | 56 |
| 5.1 | Beantwortung der Fragestellung..... | 56 |
| 5.2 | Limitationen..... | 57 |
| 5.2.1 | Fixiermedium..... | 57 |
| 5.2.2 | Mikrotomie..... | 57 |
| 5.2.3 | Verifizierung der Antikörper..... | 57 |
| 5.2.4 | Studienkollektiv und Kontrollgruppe..... | 58 |
| 5.2.5 | Artifizielle Veränderung des untersuchten Gewebes..... | 59 |
| 5.3 | Kontextualisierung..... | 59 |
| 5.4 | Schlussfolgerungen..... | 60 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 62 |
| 7 | Publikation..... | 73 |
| 8 | Danksagungen..... | 73 |

| | |
|---|-----------|
| 9 Lebenslauf | 75 |
| 10 Anhang | 76 |
| 10.1 Abbildungsverzeichnis..... | 76 |
| 10.2 Tabellenverzeichnis..... | 77 |
| 10.3 Abkürzungsverzeichnis..... | 78 |
| 10.4 Materialiste..... | 81 |
| 10.4.1 Chemikalien..... | 81 |
| 10.4.2 Materialien..... | 83 |
| 10.4.3 Geräte..... | 84 |
| 10.5 Arbeitsschritte Probeneinbettung..... | 85 |
| 10.6 Arbeitsschritte HE-Färbung..... | 86 |
| 10.7 Immunhistochemie..... | 87 |
| 10.7.1 Herstellung der Lösungen..... | 87 |
| 10.7.2 Arbeitsschritte..... | 88 |
| 10.8 Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung..... | 89 |

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

1.1.1 Ziel

Das Glomus caroticum wurde bereits 1928 von Fernando de Castro als chemorezeptives Organ erkannt, welches als Antwort auf Reize aus dem Blutstrom sekretorisch tätig wird. Seit seinen Untersuchungen mittels Silberreduktionsverfahren ist das Glomus caroticum Forschungsgegenstand unter Verwendung neuerer Methoden geworden, die eine genauere Beschreibung sowohl der Histologie als auch der Physiologie ermöglichen. Die nicht-selektiven „transient receptor potential“-Kanäle (TRP-Kanäle) TRPC3 und TRPC6 werden mit einer Reihe von pathologischen Vorgängen in Verbindung gebracht, darunter auch kardiovaskuläre Erkrankungen. Daher werden beide Kanäle als potenzielle Angriffspunkte von Pharmaka gesehen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Nachweis und der Beschreibung der Verteilung der Proteinexpression von TRPC3 und TRPC6 im humanen Glomus caroticum.

1.1.2 Methodik

An elf Körperspendern, die ihren Körper der Forschung überlassen haben, wurden Gewebeproben aus der Karotisbifurkation entnommen. Davon waren sieben Spender weiblich und vier männlich. Das mediane Alter dieser Gruppe betrug 87 Jahre. Die Proben wurden fixiert, in Paraffin eingebettet und nach dem Schneiden auf Objektträger überführt. Für histomorphologische und histomorphometrische Untersuchungen wurden Hämatoxylin-Eosin-(HE) sowie Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbungen durchgeführt. Der Nachweis von TRPC3 und TRPC6 erfolgte mittels Immunhistochemie (IHC). Anschließend wurden die Schnitte densitometrisch und histomorphometrisch vermessen sowie histopathologisch befundet. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde von einer abschließenden Statistik abgesehen.

1.1.3 Ergebnisse

Sowohl für TRPC3 als auch für TRPC6 konnte in der IHC eine über das Hintergrundsignal hinausgehende Färbung registriert werden. Angefärbt wurden hauptsächlich Hauptzellen sowie Endothelzellen. Bei drei der vier auswertbaren Körperspendern war für den TRPC6-Kanal mehr Fläche immunoreaktiv als für TRPC3. Bei zwei Körperspendern wurde aufgrund starker Degenerationen und Fibrose des Glomus caroticums eine deskriptive Auswertung

durchgeführt. Bei diesen beiden Spendern lag zudem eine schwere Atherosklerose der Arteria carotis communis (A. carotis communis) vor.

1.1.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit stellt die erste Untersuchung der Verteilung der Proteinexpression von TRPC3 und TRPC6 im humanen Glomus caroticum dar. Weitere Studien an erweiterten Studienkollektiven sowie die Verwendung von Methoden, die eine genauere Lokalisation der Epitope oder eine Quantifizierung der Proteinexpression erlauben, werden benötigt, um die Ergebnisse dieser explorativen Arbeit zu validieren.

1.2 Abstract

1.2.1 Aim

The carotid body was described by Fernando de Castro as a chemoreceptive organ in 1928. It becomes secretory active in response to stimuli from the bloodstream. Since de Castro conducted his research, the carotid body has become the subject of several following studies allowing a more precise description of both histology and physiology. The non-selective transient receptor potential (TRP) channels TRPC3 and TRPC6 are associated with a number of pathological processes, including cardiovascular disease. Therefore, both channels are seen as a potential target for pharmaceuticals. The present work deals with their detection and description in the human carotid body.

1.2.2 Methods

Tissue samples were taken from the carotid bifurcation of eleven body donors who donated their bodies to research. Seven donors were female and four were male. The median age of this group was 87 years. The samples were fixed, embedded in paraffin and transferred to slides after sectioning. Hematoxylin-eosin (HE) and Movat pentachrome after Verhoeff staining were performed for histomorphologic and histomorphometric studies. Detection of TRPC3 and TRPC6 were performed by immunohistochemistry (IHC). After that, the sections were measured densitometrically and histomorphometrically as well as histopathologically. Due to the small number of cases, no conclusive statistics were performed.

1.2.3 Results

For both TRPC3 and TRPC6, IHC showed a signal beyond background staining. Strongest signals were detected in chief cells and endothelial cells. In three of the four evaluable body donations, more area was immunoreactive for TRPC6 than for TRPC3. A descriptive evaluation was performed in two body donors due to severe carotid body degeneration and fibrosis. These two donors also showed severe atherosclerosis of the common carotid artery (A. carotis communis).

1.2.4 Conclusion

This work represents the first investigation of the distribution of protein expression of TRPC3 and TRPC6 in the human carotid body. To validate the results of this exploratory work, further studies can be suggested. For instance, an extended study collective is necessary as well as a more precise localization of the epitopes and a quantification of the protein expression.

2 Einleitung

2.1 Das Glomus caroticum

Das Glomus caroticum ist ein paariges, chemorezeptives Organ, welches den Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalt, sowie den pH-Wert des Blutstroms durch die A. carotis communis registriert [66]. Es sei nach Rekha et al. erstmals 1743 durch Haller beschrieben worden [85].

2.1.1 Mikroskopische Anatomie

Histologisch finden sich in dem Organ Glomuszellen Typ I und Typ II, Ganglienzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Perizyten. Typ I Glomuszellen (Hauptzellen) sind sekretorisch aktiv und weisen ein basophiles Zytoplasma auf. [18] Bei den Typ II Glomuszellen (Stützzellen) handelt es sich um multipotente Stammzellen [77].

Durch Bindegewebssepten wird das Glomus caroticum in Läppchen in sechs [18] bis 20 [28] Läppchen geteilt. Innerhalb der einzelnen Lobuli findet man Zellagglomerate, in deren Zentren vermehrt Glomuszellen vorkommen. Die Ganglienzellen befinden sich hingegen vermehrt in der Peripherie. Je nach Quelle liegen Typ I Zellen im Verhältnis zu Typ II Zellen willkürlich [18] beziehungsweise in einem Verhältnis von vier bis fünf zu eins in den Zellagglomeraten verteilt vor [13].

2.1.2 Makroskopische Anatomie

Das Glomus caroticum befindet sich üblicherweise beziehungsweise an der postero-medialen Wand der A. carotis communis auf Höhe der Karotisbifurkation [61] und weist eine Verbindung mit dem Mayers-Ligament auf [40]. Diese vaskuläre Struktur läuft entlang der Rückseite der A. carotis communis und führt die Gefäßversorgung des Glomus caroticums [85]. Neuere anatomische Studien beschreiben in seltenen Fällen eine Lage des Glomus caroticums an der lateralen Wand der A. carotis communis sowie der A. carotis externa und interna [88]. Die Größe des Glomus caroticums beläuft sich dabei auf circa 1x2x5 mm [87].

Embryologisch entsteht das Glomus caroticum aus der dritten und vierten Schlundbogenarterie. Im weiteren Entwicklungsverlauf wandern ab der siebten Woche Zellen aus der Neuralleiste ein. [28]

Mit 2000 ml/100 mg gilt das Glomus caroticum auf das Gewicht bezogen als das am besten durchblutete Organ [28]. Dieser Blutfluss erfolgt über eine Arterie, die nahe beziehungsweise

aus der Karotisbifurkation entspringt. Bei Eintritt in das Glomus caroticum verläuft diese weiter in der Peripherie und gibt dabei Äste ab. Die Darstellung eines Gefäßanschnitts von einem potenziellen Versorgungsgefäß des Glomus caroticums ist in Abbildung 17 (siehe unten) gelungen.

Die interlobulären Arterien verlaufen in Bindegewebssepten zwischen den Lobuli. Die Interlobulararterien enthalten, wie die Hauptarterie, einen hohen Anteil an elastischen Fasern in ihrer Tunica media. Die Tunica media der Interlobulararterien ist stark innerviert. Dieser Aufbau ist für Arterien dieser Größenordnung ungewöhnlich und ähnelt durch die stark ausgeprägte Innervation den Gefäßen des Sinus caroticums. Daher wird eine mögliche barorezeptive Funktion in Erwägung gezogen. Der Aufbau dieser Gefäße ändert sich jedoch im distalen Verlauf der Interlobulararterien, da der Anteil an Muskelzellen in der Media steigt. Die Interlobulararterien teilen sich schließlich in Intralobulararteriolen auf, die innerhalb der Lobuli verlaufen. Im Übergang zwischen den Inter- und Intralobulargefäßen bilden glatte Muskelzellen im Gefäßlumen Verschlussmechanismen, die wie arterielle Ringe beschrieben werden. Die Intralobulararteriolen münden in glomerulären Kapillaren aus Endothelzellen, die wiederum von Perizyten umsäumt werden. Zwischen den Glomuszellen und den glomerulären Kapillaren besteht keine direkte Verbindung. Die glomerulären Kapillaren münden in Venolen, die Sinusoide bilden. Der venöse Abstrom mündet in intralobulären Venolen und schließlich in Interlobularvenen. [38] Am Menschen liegen keine Daten zu dem weiteren venösen Abfluss vor. Studien am Huhn konnten einen Abfluss in Richtung der Nebenschilddrüse und in die Vena jugularis interna nachweisen [1].

Das Glomus caroticum wird von efferenten sympathischen und parasympathischen Nervenfasern angesteuert. Nervenfasern aus dem Ganglion inferius nervi glossopharyngei, ehemals Ganglion petrosum, bilden den Ramus sinus carotici und innervieren die Glomuszellen von Typ I. Des Weiteren ziehen Efferenzen aus dem Ganglion cervicale superius sowie von Mikroganglien um den Nervus glossopharyngeus und den Ramus sinus carotici zum Glomus caroticum. Die Typ I Zellen bilden einerseits Synapsen mit afferenten Nervenendigungen, Synapsen untereinander oder auch Synapsen mit Glomuszellen von Typ II aus. [74]

Die Typ I Zellen und die efferenten Nervenendigungen werden von Typ II Zellen eingebettet [13]. Typ II Zellen sind neurogenesefähige, multipotente Stammzellen [77], die für das Wachstum des Glomus caroticums bei Lungenerkrankungen, chronischer Hypoxie oder Hypertonie verantwortlich sind [38]. Die afferenten Nervenfasern, die Synapsen mit den

Glomuszellen von Typ I bilden, werden verschaltet mit Axonen, deren Perykarien im Nucleus tractus solitarii liegen [65].

2.1.3 Physiologie des Glomus caroticum

Zusammengefasst reagiert das Glomus caroticum auf Hypoxie, Hyperkapnie und Azidose mit der Freisetzung von Neurotransmittern [74]. Zudem kann ein chemoreflektorischer Anstieg der Aktivität des Glomus caroticum den Sympathikotonus erhöhen [87].

Zusätzlich zu der Registrierung des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdrucks, des pH-Werts und des Hormonspiegels von Leptin und Insulin wird die Konzentration von Glucose und Laktat erfasst [74]. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoglykämie stimulierend auf die Glomuszellen Typ I wirkt. Ähnlich wie Hypoxie führt auch Hypoglykämie zu einer erhöhten Transmitterfreisetzung. [76] Nachweislich führte die bilaterale Glomektomie an Hunden zu einer Behinderung der durch Insulin-induzierten Gegenregulation einer Hypoglykämie [57]. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der beschriebenen Stimuli, die eine Transmitterfreisetzung aus den Glomuszellen bewirken.

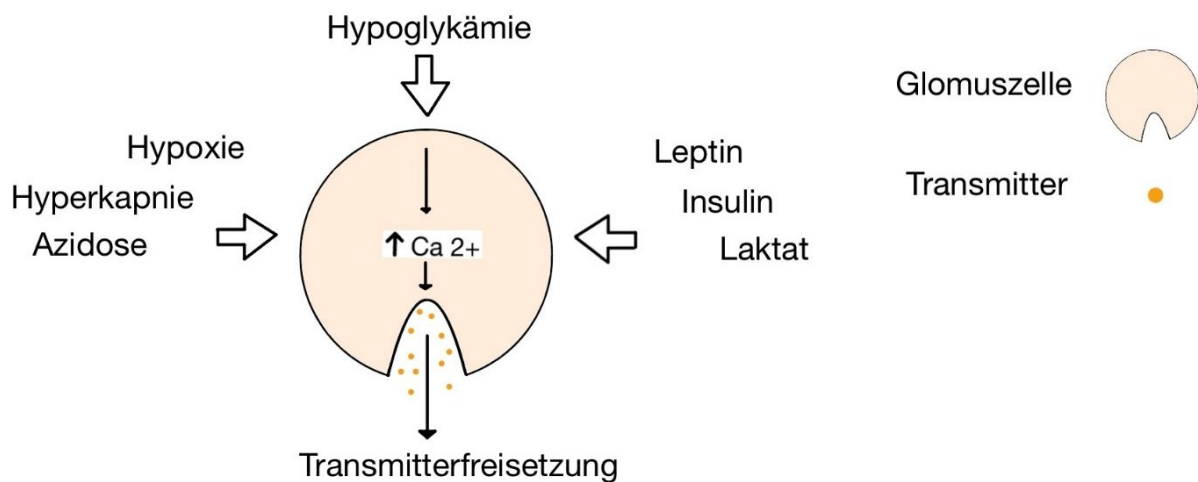


Abbildung 1: Stimuli der Transmitterfreisetzung in den Glomuszellen modifiziert nach [74].

Essentiell für die Funktion des Glomus caroticum als chemorezeptives Organ ist die Fähigkeit der Glomuszellen zur Chemotransduktion: sinkt der arterielle Sauerstoffpartialdruck unter 60 mmHg, werden Glomuszellen Typ I vermehrt erregt [87]. Dabei wird diskutiert, inwiefern sauerstoffabhängige Kaliumkanäle (K^+ -Kanäle) eine Rolle in der Transduktionskaskade spielen. Manche Autoren sehen dies lediglich als Begleitphänomen [58], wohingegen andere Arbeiten den sauerstoffabhängigen K^+ -Kanälen in den Glomuszellen Typ I eine Schlüsselrolle in der Chemotransduktion postulieren [64].

Unabhängig von der schlussendlichen Rolle ist bekannt, dass eine Hypoxie-induzierte Schließung der K^+ -Kanäle zu einer Depolarisation der Glomuszellen Typ I und damit zur Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration (Ca^{2+} -Konzentration) sowie zur Transmitterfreisetzung führt. Eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beziehungsweise eine Transmitterfreisetzung trat auch als Reaktion auf Hyperkapnie und Azidose auf. [74] Die freigesetzten Transmitter (siehe unten) sorgten ihrerseits für Aktionspotenziale an afferenten Nervenendigungen [47].

Kohlenstoffdioxid führt durch Carboanhydrasen zu einer intrazellulären pH-Wert Erniedrigung, da die Reaktion von Kohlenstoffdioxid und Wasser zu Bikarbonat und Wasserstoff-Ionen katalysiert wird. Eine Reduktion der Carboanhydrase verringert nicht nur die Antwort auf den Stimulus Kohlenstoffdioxid, sondern auch auf Sauerstoff [46]. Ein Absinken des intrazellulären pH-Werts schließt K^+ -Kanäle; es kommt zur Depolarisation der Glomuszellen Typ I [93]. Des Weiteren kann Kohlenstoffdioxid direkt ohne eine Senkung des intrazellulären pH-Werts auf Calciumkanäle (Ca^{2+} -Kanäle) wirken und einen Ca^{2+} -Einstrom verursachen [94].

Ein niedriger extrazellulärer pH-Wert führt über säureempfindliche Kationenkanäle (acid-sensing ion channels kurz ASIC) sowie TWIK-assoziierte säureabhängige K^+ -Kanäle (TWIK-related acid-sensing K^+ -channel kurz TASK) zur Signaltransduktion. TWIK-Kanäle gehören zu einer Gruppe von K^+ -Kanälen, die morphologisch aus zwei kanalbildenden Einheiten bestehen. Der Name TWIK steht für die Abkürzung "Tandems of P-domains in a weak inwardly rectifying K^+ -channel" [29].

Die ASICs werden über die Bindung von Protonen an ihrer extrazellulären Domäne aktiviert. Die Kationenkanäle sind hauptsächlich permeabel für Natrium-Ionen (Na^+ -Ion), vereinzelt auch für K^+ und für Ca^{2+} [34]. Immunhistochemisch nachgewiesen wurden ASICs Typ 1-4 in Glomuszellen Typ I und in umliegenden Nervenfasern. Ein absinkender pH-Wert kann folglich

entweder über die Glomuszellen oder über die Nervenfasern direkt registriert werden. [66] Ein erniedrigter pH-Wert inaktivierte außerdem TASK 1 und 3, die im Glomus caroticum vorkommen. Durch die Inaktivierung brach das durch TASK 1 und TASK 3 erzeugte Ruhemembranpotenzial zusammen. [15]

Weitere Studien suggerierten jedoch eine untergeordnete Rolle von TASK 1 und 3 für eine Hypoxie-induzierte Freisetzung von Ca^{2+} . Mäuse mit TASK 1 und TASK 3 Knock-Outs zeigten nur eine minimal geringere Ca^{2+} -Freisetzung [102]. Folglich müssen andere Kanäle eine tragende Rolle in der Hypoxie-bedingten Ca^{2+} -Ausschüttung spielen. Möglicherweise könnte es sich bei diesen Kanälen um „transient receptor potential“-Kanäle (TRP-Kanäle) handeln, insbesondere um die Subfamilie „Canonical“ (TRPC-Kanal). Eine Blockade durch den TRP-Kanal-Antagonisten 2-Aminoethoxydiphenylboran (2-APB) bei Ratten führte zu einer signifikanten Senkung der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Ausschüttung. [51] Genauer zu den TRP-Kanälen siehe Abschnitt 2.2.

Stimulierte Glomuszellen Typ I setzen verschiedene Transmitter wie Acetylcholin, Dopamin, Substanz P, Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin, GABA (aus dem englischen gamma-aminobutyric acid, zu Deutsch gamma-Aminobuttersäure) und Opioide frei [64], jedoch nur, wenn extrazellulär genügend Kalzium-Ionen vorhanden sind [33]. Die freigesetzten Transmitter bewirken zum Teil eine Feedback-Hemmung. Dopamin beispielsweise wirkt atemdepressiv durch die Reduktion von Ca^{2+} -Strömen [11].

ATP wirkt postsynaptisch exzitatorisch, präsynaptisch hingegen hemmt es die Hypoxie-bedingte Aktivierung der Glomuszellen. An der Synapse zwischen Glomuszellen Typ I und Typ II ermöglicht ATP die Freisetzung von Ca^{2+} aus Typ II Zellen. [101] ATP und Acetylcholin sind hauptverantwortlich für die Exzitation der afferenten Nervenfasern [99].

2.1.4 Pathologie und Pathophysiologie

Bei einigen Krankheitsbildern kommt es zu Veränderungen des Glomus caroticums. Dazu gehören obstruktive Schlafapnoe, Herzinsuffizienz und essenzielle Hypertonie. Diese Veränderungen des Glomus caroticums werden als Gegenregulation angesehen, um die einhergehenden Symptome abzumildern. Auch durch Neoplasien kann es zu Umbauvorgängen kommen. [82]

Ebenfalls beeinflusst das Alter die Morphologie des Glomus caroticums. Mit zunehmendem Alter steigt zunächst die Proliferation der Glomuszellen von Typ II. Im weiteren Verlauf

resultiert dies in fibrotischen Umbauvorgängen und einem einhergehenden Verlust funktionellen Gewebes. [44] 30 % der 70-Jährigen wiesen eine chronische Glomitis auf. Glomitis bezeichnet das vermehrte Vorkommen von T-Zellen und Plasmazellen im Glomus caroticum. Diese ähnelt histologisch der Hashimoto-Thyreoditis, weshalb eine Autoimmun-Reaktion als Grundlage für die Glomitis diskutiert wird. [39]

Bei Patienten, die neu mit obstruktiver Schlafapnoe diagnostiziert wurden, kam es zu einer erhöhten Sensibilität der chemorezeptiven Zellen und damit zu einer gesteigerten Antwort auf Hypoxie [50]. Patienten, die seit Jahren unter einer Schlafapnoe gelitten haben und folglich wiederholten hypoxischen Zuständen ausgesetzt waren, zeigten keine erhöhte Sensibilität mehr. Dies deutet auf eine mögliche Abstumpfung hin. [82]

Eine erhöhte Sensitivität des Glomus caroticums ist ein prognostisch ungünstiger Faktor für die Lebenserwartung bei chronischer Herzinsuffizienz [81]. Sun et al zeigte in Untersuchungen an Hasen, dass periphere Chemorezeptoren wie das Glomus caroticum unter chronischer Herzinsuffizienz die Sympathikusaktivität in der Niere unter Normoxie und Hypoxie steigerten. Zudem kam es unter hypoxischen Zuständen zu einer erhöhten Zunahme des Atemzeitvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Inhibition des Glomus caroticums durch Hyperoxie hingegen nahm die Aktivität herzinsuffizienter Individuen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe ab. [95] Diese gesteigerte Aktivität des Glomus caroticums bei chronischer Herzinsuffizienz korrelierte mit einer Abnahme der Stickstoffmonoxid-Synthese und folglich mit einem gesunkenen Stickstoffmonoxid-Gehalt. Physiologischerweise übt Stickstoffmonoxid eine dämpfende Wirkung auf die Aktivität des Glomus caroticums aus. [96]

Auch essenzielle Hypertonie führt zu einer gesteigerten Aktivität des Glomus caroticums. Das resultiert in einer übermäßig erhöhten Sympathikusaktivität und Atmungssteigerung bei Hypoxie [50].

Als Folge von Umweltfaktoren oder Krankheiten kann es als Kompensation zu einer Hyperplasie des Glomus caroticums kommen. Bewohner von Höhenregionen zeigten durch den dauerhaft verringerten Sauerstpartialdruck ihrer Atemluft eine Hyperplasie der Glomuszellen von Typ I [6]. Auch bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und akutem Atemnotsyndrom (ARDS) konnte eine Hyperplasie des Glomus caroticums beobachtet werden. Bei COPD kam es zu einer Vermehrung der Glomuszellen von Typ II, wohingegen bei ARDS eher eine Vermehrung der Glomuszellen von Typ I zu erkennen war. [103]

Im Glomus caroticum können sich Paragangliome entwickeln. Diese sind meist gutartig und weisen geringe Mitoseraten auf. Sauerstoffmangel ist in der Tumorgenese ein entscheidender Faktor. Daher trat bei Höhenbewohnern eine erhöhte Inzidenz von Paragangliomen auf. [90] Pathologische Veränderungen der Stammzellen im Glomus caroticum werden hierfür als mögliche Ursache diskutiert [77].

2.1.5 Das Glomus caroticum als therapeutischer Angriffspunkt

Aufgrund der bisher dargelegten (Patho-) Anatomie und der Beteiligung an (patho-) physiologischen Prozessen, wird das Glomus caroticum klinisch als möglicher Ansatzpunkt für Therapien angesehen und erforscht.

Angesichts der Überreaktivität des Glomus caroticums bei diversen kardiovaskulären Krankheitsbildern wird eine Ablation zur Prognosesteigerung der Patienten diskutiert. Ablationen an Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz führten zu Verringerung der Dyspnoe und des überhöhten Sympathikotonus. Bei frühzeitiger Ablation konnten kardiale Arrhythmien sowie die Verschlechterung der linksventrikulären Ejektionsfraktion vermindert werden. [25]

Neben der Anwendung in der kardiovaskulären Medizin ist das Glomus caroticum auch für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson interessant. Im Glomus caroticum konnten neurogenesefähige Stammzellen gefunden werden, die dort Dopamin freisetzen [77].

2.2 Die TRP- Kanäle

Die Entdeckung der TRP-Kanäle geht auf Untersuchungen an Mutanten der Fruchtfliegenart *Drosophila melanogaster* im Jahr 1969 zurück. Im Elektroretinogramm zeigten die mutierten Fruchtfliegen auf einen lang anhaltenden Lichtreiz hin kurze Rezeptorpotenziale anstelle eines Ruhemembranpotenzials des Wildtyps [24]. Zurückzuführen ist dies auf die falsche Kodierung von Genen, die für die Ausbildung der TRP-Kanäle zuständig sind [67]. Irreführend ist, dass der Wildtyp der *Drosophila melanogaster* keinen transienten, sondern einen dauerhaft geöffneten Ionenkanal aufweist. Die transienten Eigenschaften kommen bei den beschriebenen Mutanten vor. In Säugetieren wurden bislang 28 verschiedene TRP-Kanäle entdeckt. Davon kommen 27 im Menschen vor. [56] Ihre Aktivierungsmöglichkeiten sind vielseitig, daher besteht die Gemeinsamkeit der Subklassen in ihrem ähnlichen Aufbau [111]. Im Allgemeinen handelt es sich bei TRP-Kanälen um nicht-selektive Kationenkanäle, die auf multimodale

Stimuli reagieren. Sie können einerseits in der Zellmembran oder auch in einzelnen Organellen wie Zilien oder Lysosomen vorkommen. [69]

2.2.1 Aufbau und Klassen der TRP-Kanäle

Die TRP-Kanäle lassen sich anhand Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäure-Sequenz in Subfamilien gliedern. Im Menschen nachgewiesen sind folgende sechs Subfamilien: TRPC („Canonical“), TRPM („Melastatin“), TRPV („Vanilloid“), TRPA („Ankyrin“), TRPML („Mucolipin“), und TRPP („Polycystin“) [22]. Der gemeinsame Aufbau der TRP-Kanäle besteht aus sechs Transmembransegmenten. Die eigentliche Porendomäne liegt zwischen dem fünften und dem sechsten Segment. Sowohl der Amino-Terminus (N-Terminus) als auch der Carboxy-Terminus (C-Terminus) der Aminosäurekette liegen im Intrazellularraum. Der Carboxy-Gruppe als cytoplasmatisches Ende der Helix wird eine regulatorische Funktion für den Kationendurchtritt durch die Porendomäne zugeschrieben. [111] Erst die Zusammenlagerung von vier TRP-Einheiten ermöglicht die Bildung eines funktionierenden Kanals. Diese vier TRP-Einheiten können der gleichen TRP-Gruppe zugehören und ein Homotetramer bilden. Lagern sich unterschiedliche TRP-Kanäle zusammen, wie TRPC3 und TRPC6, spricht man von Heterotetrameren.[21] Die Heterotetramerbildung ist einer Erklärung für die funktionelle Variationsbreite der TRP-Kanäle [42].

TRPM-Kanäle

Unter den TRPM-Kanälen („Melastatin“) unterscheidet man TRPM1 bis TRPM8. Ein bekannter Vertreter ist der TRPM8-Kanal, der zur Kälteempfindung beiträgt und der Menthol als Rezeptor dient. Eine Deletion führt zu einer verminderten Differenzierung zwischen kalten und warmen Oberflächen. [10] TRPM-Kanäle weisen sowohl Eigenschaften von Enzymen als auch von Kanälen auf, weshalb sie auch als „chanzymes“ („channel“ und „enzymes“, aus dem Englischen für Kanal und Enzyme) bezeichnet werden [68]. TRPM8-Kanäle werden als potenzielles Ziel von Analgetika angesehen [69]. TRPM-Kanäle sind im Körper weitverbreitet und kommen unter anderem in Organen des Immunsystems und des Herz-Kreislaufsystems vor [20]. Bei Mäusen konnte der TRPM7-Kanal im Glomus caroticum nachgewiesen werden und steht im Zusammenhang mit der hypertensiven Wirkung von Leptin. Über TRPM7-Kanäle induziert Leptin einen nicht-selektiven Kationeneinstrom in den Glomuszellen. Es kommt zu einer Erregung des Ramus sinus carotici nervi glossopharyngei und einer Signalweiterleitung an das Gehirn, welche letztendlich zu einer Steigerung des Blutdrucks führt. [91]

TRPV-Kanäle

Die TRPV-Kanäle („Vanilloid“) verdanken dem Vanilloid-Rezeptor ihren Namen. In Säugetieren kommen die Kanäle TRPV1 bis TRPV6 vor. Diese können wiederum in zwei Untergruppen sortiert werden. TRPV1 bis TRPV4 bilden eine Gruppe und sind weniger selektiv für Ca^{2+} -Ionen als TRPV5 bis TRPV6, welche die zweite Gruppe bilden. [111] TRPV1 wird durch das Vanilloid Capsaicin, Hitze und Protonen [17] aktiviert und dient der Schmerzwahrnehmung [69].

TRPA-Kanäle

Zu der TRPA-Subfamilie („Ankyrin“) gehört lediglich TRPA1. Dieser Kanal kommt im Ohr, im Ganglion trigeminale sowie den Spinalganglien vor [22]. TRPA1-Kanäle enthalten mehrere Ankyrin Wiederholungen am N-Terminus, welche entweder die Ligandenbindung regulieren [62] oder mit dem Cytoskelett interagieren [43]. TRPA1-Kanäle dienen der Funktion peripherer Chemorezeptorzellen während leicht hypoxischen Verhältnissen. Sie sind jedoch von untergeordneter Bedeutung für die Funktion des Glomus caroticum während stark hypoxischer Zustände. [80] Des Weiteren wird TRPA1 mit der glucoseabhängigen Insulinfreisetzung aus den Beta-Zellen des Pankreas in Verbindung gebracht [23].

TRPML-Kanäle

Zu den TRPML-Kanälen („Mucolipin“) gehören TRPML1 bis TRPML3. TRPML1 ist für intrazelluläre Transportvorgänge von Vesikeln verantwortlich. Eine Fehlfunktion kann zu Mucopolidose Typ IV führen. Dabei handelt es sich um eine lysosomale Speicherkrankheit, die zur Akkumulation von Lipiden führt und geistige Beeinträchtigungen verursacht. [9]

TRPP-Kanäle

Fehlfunktionen der TRPP-Kanäle („Polycystin“) werden mit der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) in Verbindung gebracht. Genmutationen des Polycystic-kidney-disease (PKD)-Gens führen zu der polyzystischen Nierenerkrankung (PKD). Mittlerweile sind mehrere dieser Gene bekannt. Die Nomenklatur der Genprodukte, zu denen auch die TRPP-Kanäle gehören, veränderte sich im Laufe der Jahre. Daher ist es aus Übersichtsgründen einfacher das Gen anstelle des Genprodukts zu nennen. Genmutationen der Gene PKD1 und PKD2 sind zusammen für ca. 95 % der Fälle von ADPKD verantwortlich. Das Genprodukt von PKD1 wird auch als Polycystin-1 bezeichnet, wohingegen das Genprodukt von PKD2 Polycystin-2 genannt wird. Polycystin-2 gehört zu den TRPP-Kanälen. [75]

In den Cilien des Nierenepithels formen Polycystin-1 und Polycystin-2 physiologischerweise einen Komplex. Dieser Komplex reagiert auf Scherkräfte, die durch den Urinfluss verursacht werden und sorgt so für die Transduktion eines intrazellulären Ca^{2+} -Signals. Die oben genannten Genmutationen sorgen dafür, dass sich der Komplex aus Polycystin-1 und Polycystin-2 nicht ausbilden kann. [4]

TRPC-Kanäle

Die Bezeichnung der TRPC-Kanäle („Canonical“, aus dem Englischen für kanonisch) leitet sich von ihrer Ähnlichkeit zu dem in der *Drosophila melanogaster* beschriebenen Urtypus ab. Beispielsweise liegt die Ähnlichkeit der Proteinstruktur des TRPC1-Kanals und des Urtypus bei 40 %. [110] TRPC-Kanäle können in drei Subgruppen klassifiziert werden. Diese bestehen aus TRPC1,4,5 und TRPC 3,6,7 sowie TRPC2. TRPC2 ist im menschlichen Organismus ein Pseudogen. TRPC-Kanäle sind G-Protein oder Tyrosin-Kinase gekoppelt. TRP1, 4 und 5 bilden untereinander Heterotetramere aus. [111]

TRPC3, 6 und 7 weisen untereinander eine strukturelle Übereinstimmung von 75 % auf. Sie können Kationen sowohl zelleinwärts als auch zellauswärts leiten und weisen eine leicht höhere Selektivität von Ca^{2+} - gegenüber Na^{+} -Ionen auf. [22] TRPC3 und TRPC6 werden durch Diacylglycerin (DAG) aktiviert [41]. Die Kanalaktivierung ist abhängig von Ca^{2+} -Ionen und von der N-terminalen Glykosylierung. Der TRPC3-Kanal ist ein konstitutiv aktiver Kanal, wohingegen TRPC6 strengen Regulationen unterliegt. TRPC3, 6 und 7 bilden untereinander Heterotetramere aus. [27]

Strukturell weisen TRPC-Kanäle sechs Transmembransegmente auf, wobei sich die porenbildende Domäne zwischen dem fünften und sechsten Segment befindet. Als Gemeinsamkeit weisen die Kanäle einen N-Terminus und einen C-Terminus auf, welche auf der cytoplasmatischen Seite liegen. Abhängig von dem jeweiligen Kanal kann die Anzahl der Aminosäuren vor dem Terminus abweichen. An beiden Endungen befindet sich eine Coiled-Coil-Region. Spezifisch für den N-Terminus sind vier Ankyrin-Repeats. [7] Sowohl die Coiled-Coil-Region als auch die Ankyrin-Repeats des N-Terminus sind verantwortlich für die Assemblierung von Tetrameren innerhalb der TRPC-Subfamilien [60].

Am C-Terminus liegt die TRP-Domäne und die Calmodulin-Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-Bindungsstelle (CiRB). Diese ist für die Bindung von Calmodulin und Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP3) verantwortlich. [12] Innerhalb der Gruppe TRPC3, 6 und 7 sind sich TRPC3

und TRPC7 am ähnlichsten [105]. Abbildung 2 fasst den Aufbau der TRPC-Kanäle schematisch zusammen.

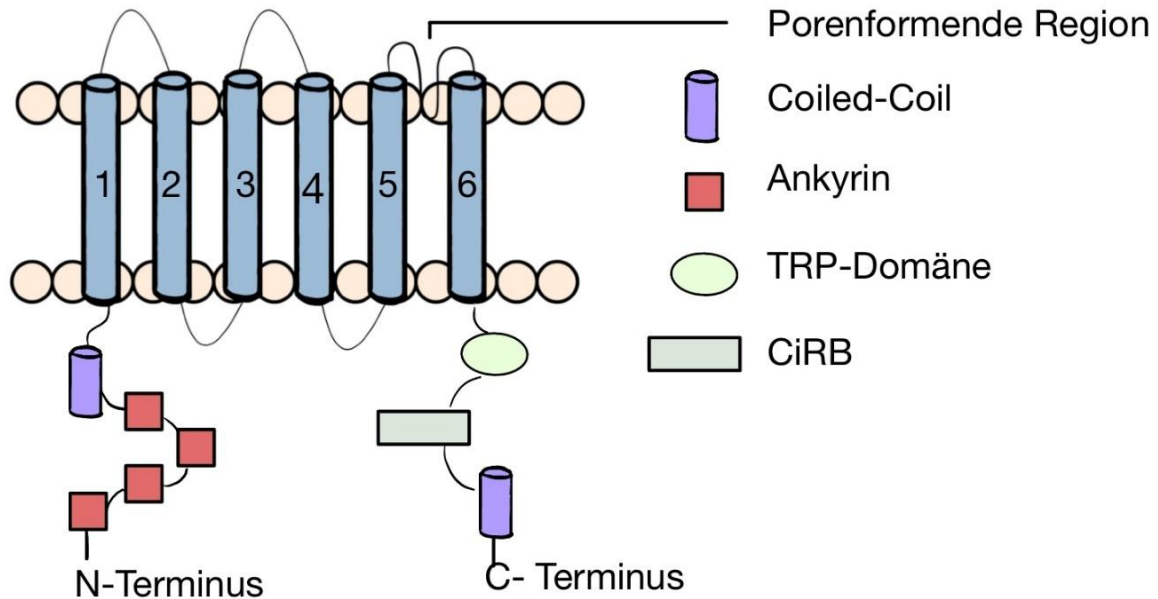


Abbildung 2: Aufbau der TRPC-Kanäle modifiziert nach [7].

2.2.2 Allgemeines zu TRPC3 und TRPC6-Kanälen

TRPC3 und TRPC6 sind im Körper weitverbreitet. TRPC3 kommt gehäuft in erregbaren Zellen vor und spielt eine Rolle in Schrittmacherprozessen im Hippocampus und Cerebellum. Die Kanäle sind beispielsweise für Hintergrundströme dopaminerger Neurone der Substantia nigra verantwortlich. [100] Auch im Herz, Muskulatur und der Plazenta wurden TRP3-Kanäle nachgewiesen [22]. TRPC6 kommt unter anderem in den Podocyten der Niere vor. Malregulationen können zu Nierenerkrankungen führen. [45] Auch im Herz, Lunge, Gehirn und der Muskulatur kommt TRPC6 vor [22]. Im Glomus caroticum der Ratte lassen sich der TRPC3 und der TRPC6-Kanal sowohl in Glomuszellen vom Typ I als auch in den Nervenfasern des Nervus sinus caroticus und im Ganglion inferius nervi glossopharyngei immunhistochemisch nachweisen [16].

Ein Aktivierungsweg von TRPC3 und TRPC6 ist die rezeptorabhängige Aktivierung (ROCE, aus dem Englischen von receptor-operated calcium entry) über G-Proteine. Durch Ligandenbindung stimuliert die Gq11-Untereinheit des G-Protein-gekoppelten Rezeptors die Phospholipase C (PLC). Als Reaktion phosphoryliert die PLC das Molekül Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Aus PIP₂ entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) und Diacylglycerol (DAG). Auch externes DAG, unabhängig von PLC,

kann TRPC3 und TRPC6 aktivieren. DAG bindet an TRPC3 beziehungsweise TRPC6, aktiviert diese und ermöglicht den Kationen-Influx. [41]

Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (SOCE, aus dem Englischen abgeleitet von store-operated calcium entry) wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) [37]. IP3 bindet an seinem Rezeptor an der Oberfläche des ER, wodurch Ca²⁺-Ionen aus dem ER in das Cytoplasma gelangen. Durch die geleerten Ca²⁺-Speicher des ER wird das Stromal interacting molecule 1 (STIM1) aktiviert. Komplexbildungen führen letztendlich zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle durch das Plasmaprotein calcium release-activated calcium modulator (Orai1). [14] Die Offenwahrscheinlichkeit von TRPC-Kanälen wird durch Calmodulin moduliert. Bei höheren Ca²⁺-Konzentrationen konkurriert Calmodulin mit IP3 um dessen Bindungsstelle. Wird TRPC3 bzw. TRPC6 aktiviert, kommt es zum Ca²⁺-Influx. Dadurch kann Calmodulin an der IP3 Bindungsstelle binden und der Kanal geschlossen. [113]

TRPC3 ist für Ca²⁺-Ionen eineinhalbmal selektiver als für Na⁺-Ionen. TRPC6 hingegen ist für Ca²⁺-Ionen fünfmal selektiver als für Na⁺-Ionen [22]. Abbildung 3 fasst beide oben genannten Aktivierungswege zusammen.

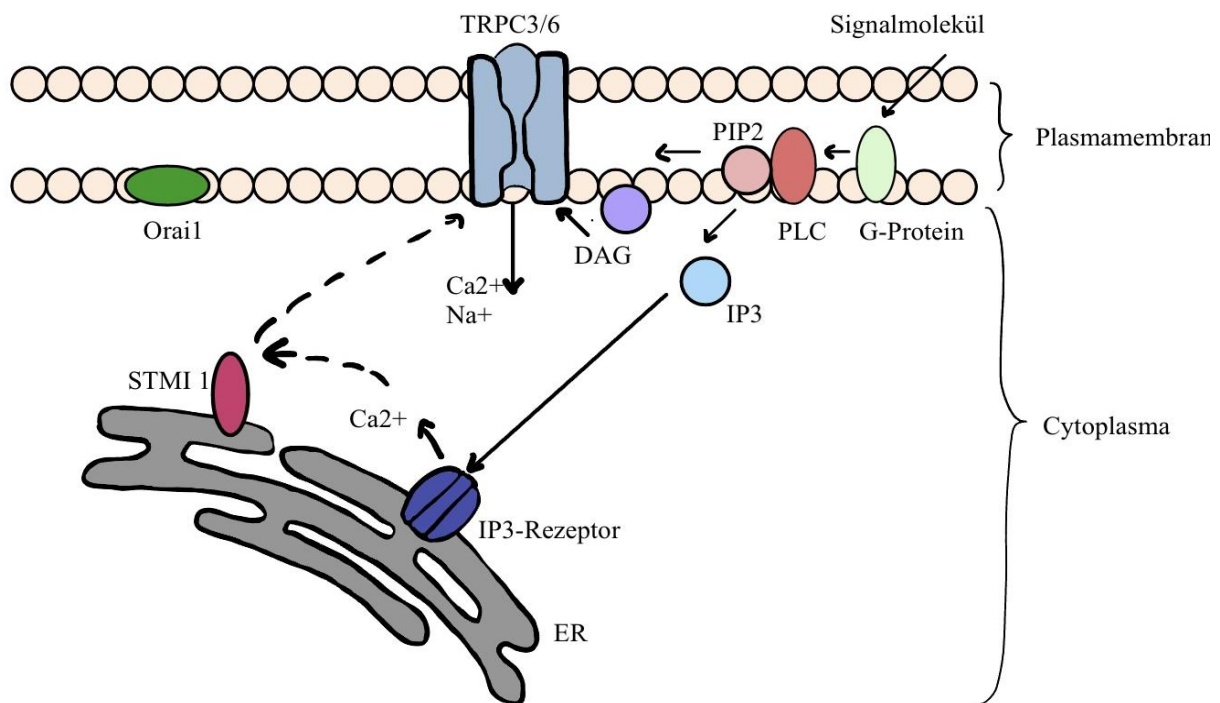


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierungswege ROCE und SOCE. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die rezeptorabhängige Aktivierung der Kanäle über DAG, wohingegen der linke Teil die Aktivierung über Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER veranschaulicht.

2.2.3 TRPC3 und TRPC6 als Angriff von Pharmaka

Kardiovaskuläres System

Im Herz wurde die Präsenz von TRPC6 in Kardiomyocyten im Atrium, im Ventrikel und im Septum interventriculare nachgewiesen [49], [32]. Auch TRPC3 wurde im Herz nachgewiesen [112]. TRP-Kanäle sind physiologischerweise an der Funktion des Gefäßsystems beteiligt [19]. Die Erhöhung des intravasalen Drucks führt zu einer Depolarisation glatter Muskelzellen und der Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen. Daraus resultiert eine Konstriktion der glatten Muskulatur von Arterien, welche auch als myogene Autoregulation bekannt ist. [55] An der Depolarisation, die der Autoregulation zu Grunde liegt, sind TRPC6-Kanäle beteiligt [109].

TRPC3-Kanäle hingegen tragen zwar zu der agonistisch-induzierten Vasokonstriktion mittels Uridintriphosphat (UTP), aber nicht zu der myogenen Autoregulation bei [84]. Zudem ist TRPC6 an der hypoxischen Vasokonstriktion (auch Euler-Liljestrand-Mechanismus) der Lunge beteiligt. Diese führt zur selektiven Konstriktion von Lungenbereichen, in denen wenig Sauerstoff vorhanden ist. Somit wird das Blut vermehrt in Alveolen mit einem höheren Sauerstoffpartialdruck geleitet, um einen stetigen Gasaustausch zu ermöglichen. Bei Deletion des Gens für TRPC6 bleibt eine hypoxische Vasokonstriktion aus und kann somit zu arterieller Hypoxämie führen. [107]

TRPC-Kanäle sind auch an zahlreichen pathophysiologischen Vorgängen im Körper involviert. TRP-Kanalopathien werden von manchen Autoren als neuer, eigenständiger Krankheitstyp bezeichnet [70]. Somit sind auch TRPC-Kanäle als potenzielles Ziel von Medikamenten interessant.

Kardiale Erkrankungen mit erhöhter mechanischer Belastung des Herzens gehen einher mit einer Hypertrophie des Herzmuskels. Die kombinierte Ausschaltung der Gene für TRPC3 und TRPC6 kann zu einer Verbesserung der Herzfunktion beitragen. Dies erklärt sich durch die Unterdrückung hypertrophischer Umbauvorgänge in Kardiomyozyten. Wird selektiv nur einer der beiden Kanäle ausgeschaltet, ist keine Verbesserung erkennbar. [89] Bei Mäusen mit essentieller Hypertonie ändert sich das Verhältnis des Vorkommens von TRPC3- und TRPC6-Kanälen in der glatten Muskulatur mesenterialer Gefäße, welche als Widerstandsgefäße den Blutdruck beeinflussen. TRPC3 kommt bei essentieller Hypertonie häufiger in diesen Gefäßen vor. Durch die vermehrte Aktivität der TRPC3-Kanäle kommt es zur Depolarisation und Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, welche mit einem erhöhten Blutdruck einhergehen.

[5] Eine gesteigerte Expression der TRPC3-Kanäle konnte auch in den Aorten von spontan hypertensiven Ratten beschrieben werden [63].

Atherosklerotische Plaques entstehen initial durch Makrophagen, die Lipide aufnehmen, abspeichern und diese bei Apoptose freisetzen. Dadurch kommt es zur Ablagerung von Lipiden in der Intima. In Kombination mit gestörter Efferocytose entstehen im fortschreitenden Stadium der Atherosklerose Nekrosen. Efferocytose beschreibt die Fähigkeit phagozytosefähiger Zellen untergehende Zellen im Rahmen geordneter Apoptose zu beseitigen. Mäuse mit einem Defizit von TRPC3-Kanälen in Makrophagen zeigten im frühen Stadium der Atherosklerose eine niedrigere Zellularität und weniger Nekrosen im fortgeschrittenen Stadium. [97]

Bei der dilatativen Kardiomyopathie mit einer Einschränkung der links-ventrikulären Funktion wird der Krankheitsprogress durch erhöhte Expression der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMK II) und vermehrte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vorangetrieben. Sowohl CaMK II als auch die ROS-Produktion kann durch die Gabe von Pyrazole-3 als selektiver TRPC3-Inhibitor bei Mäusen gehemmt werden. Daher wird TRPC3 als mögliches Target der Therapie der dilatativen Kardiomyopathie angesehen. [53]

Kardiomyopathien können auch toxisch durch Chemotherapeutika wie Doxorubicin bedingt sein. In Untersuchungen am Maus-Modell konnte dabei eine kardioprotektive Wirkung durch die Ausschaltung von TRPC6 beobachtet werden. Dies wiederum suggeriert eine Relevanz von TRPC6 in der Entstehung der Doxorubicin-induzierten toxischen Kardiomyopathie. [73]

Tumorthherapie

TRPC3 wird als möglicher Angriffspunkt bei Ovarialkarzinomen angesehen. Die Expression von TRPC3 wird durch das Follikelstimulierende Hormon (FSH) gesteigert. TRPC3-Knockdown führt zu einer sinkenden Zellproliferation und erhöhter Apoptose. Zudem zeigen Patientinnen mit Ovarialkarzinomen erhöhte TRPC3-Expressionen im Ovarialgewebe als in der tumorfreien Kontrollgruppe. [98] TRPC6 hingegen sorgt durch die Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration für eine Tumorzellproliferation bei Prostata-Tumoren. Eine Senkung der TRPC6-Expression zeigte in Studien einen antiproliferativen Effekt. [8] Auch bei Pankreaskarzinomen hatte die Ausschaltung von TRPC6 positive Effekte. Durch die Proliferation von Sternzellen kommt es zu einer desmoplastischen Stromareaktion, die zu Hypoxie im Gewebe führt. Dies resultiert in einer schnelleren Migration der Sternzellen und in der Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Durch die Ausschaltung von TRPC6 in pankreatischem Gewebe fällt die Migration der Sternzellen unter Hypoxie geringer aus. [72]

Niere

TRPC6 konnte in den Podocyten der Niere nachgewiesen werden [19]. Eine Mutation von TRPC6 führt zu einer Delokation des Kanals und zu einer aggressiven und autosomal-dominant vererbaren Form der fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS). Diese äußert sich in stark ausgeprägter Proteinurie. In vivo konnte eine Blockade der TRPC6-Kanäle der Podocyten durch das immunsuppressive FK-506 erreicht werden. Dies wird als Ansatz in der Therapie der FSGS angesehen. [70]

2.3 Ziel der Arbeit

Wie oben dargelegt ist das Glomus caroticum ein zentrales Organ in der Physiologie und Pathophysiologie des kardiorespiratorischen Systems. Als dieses rückt es sowohl interventionell als auch pharmazeutisch als potenzielles Target in den Fokus. Dasselbe gilt für TRPC3 und TRPC6, welche bereits als Endpunkte pathophysiologischer Kaskaden in anderen Bereichen des Herzkreislaufsystems, zum Beispiel dem Myokard, beschrieben wurden [106]. Viele Studien zur Anatomie des Glomus caroticum beziehen sich auf nicht humane Säugetiere. Daher widmet sich diese Arbeit der Exploration und Reevaluation der Morphologie sowie dem Nachweis und der Verteilung von TRPC3 und TRPC6 im menschlichen Glomus caroticum. Ziel ist es die TRPC3- und TRPC6-Kanäle in einzelnen Zelltypen nachzuweisen. Zur Reevaluation der Morphologie sollten die in der Literatur beschriebenen Charakteristika verglichen werden. Darüber hinaus soll das Glomus caroticum histomorphometrisch vermessen werden.

3 Material und Methode

3.1 Materialien

Eine tabellarische Aufzählung der insgesamt verwendeten Chemikalien, sonstigen Materialien und Geräte lässt sich dem Anhang aus Tabelle 1-3 entnehmen.

3.2 Abläufe

In die Arbeit wurden ausschließlich postmortal aus der Karotisbifurkation von Körperspendern entnommene Paraganglien einbezogen. Alle Körperspenderinnen und Körperspender gaben zu Lebzeiten ihr schriftliches und aufgeklärtes Einverständnis für die Nutzung ihres Körpers nach dem Tod für Forschung und Lehre. Zusätzlich liegt ein Ethik-Votum der Ärztekammer des Saarlandes unter der Antragsnummer 163/20 vor. Nach ihrem Ableben wurden die Spender der Prosektur des Instituts für Anatomie der Universität des Saarlandes übergeben. Genauere Daten zu den einzelnen Körperspenden sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Fixierung wurde zwischen 26 und 81 Stunden nach dem Ableben durchgeführt. Entnommen wurden die Gewebeproben von Dr. Jan Federspiel unter Assistenz von Nico Lehmann. Da das Glomus caroticum eine makroskopisch schwer zu identifizierende Struktur darstellt, wurden zunächst Färbungen in HE durchgeführt. Anhand dessen konnten Proben mit angeschnittenem Glomus caroticum identifiziert werden. Von diesen Paraffinblöcken wurden weitere Schnitte angefertigt. Diese wurden immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von TRPC3 und TRPC6 unterzogen. Um eine weitergehende histomorphologische Befunderhebung zu ermöglichen, wurde anschließend eine Movat-Pentachrom-Färbung nach Verhöff (Morphisto Kit) durch Tanja Schwab in dem Labor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführt.

3.3 Hinweise zu den Körperspendern

3.3.1 Fixierungsabläufe

Zwischen dem Ableben und der Fixierung lagen maximal 81 Stunden (Tabelle 4). Die untersuchten Körperspender wurden entweder mittels Formalin oder Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol (NEP) nach Weigner fixiert.

3.3.2 Informationen über die Körperspender

| Spender | Alter in Jahren | Geschlecht | Todesursache laut Totenschein | Fixierung und Menge | Zugang | Gewicht in kg | Stunden zwischen Tod & Fixierung |
|---------|-----------------|------------|--|---------------------|----------------------|---------------|----------------------------------|
| 1 | 86 | männlich | Metastase Plattenepithelkarzinom, Lungenembolie, COPD, Herzrhythmusstörung | NEP, 8,9 kg | A. femoralis, rechts | 64 | 46 |
| 2 | 82 | weiblich | Kreislaufversagen, Herzinsuffizienz, Koronare Herzkrankheit | Formalin, 18 Liter | A. femoralis, links | 52 | 81 |
| 3 | 89 | weiblich | Akute respiratorische Insuffizienz, Asphyxie nach Apoplex, Demenz | Formalin, 13 Liter | A. femoralis, rechts | 40 | 39 |
| 4 | 85 | weiblich | Kachexie, Alzheimer, Schizophrenie | NEP, 7 kg | A. femoralis, rechts | 30 | 39 |
| 5 | 101 | weiblich | ,Multiorganversagen, Niereninsuffizienz | NEP, 7,5 kg | A. femoralis, rechts | 32 | 26 |
| 6 | 87 | männlich | Herz-Kreislaufstillstand, Herzinsuffizienz, depressives Syndrom | NEP, 11 kg | A. femoralis, rechts | 90 | 38 |

Tabelle 4: Daten zu den Körperspendern.

3.4 Probenentnahme

Zunächst wurde eine pfeilförmige Hautinzision gesetzt. Diese umfasst einen vom Kinn bis zum Angulus Ludovici verlaufenden Schnitt in der Medianlinie sowie bilaterale Inzisionen von der Schulterhöhle bis zur Medianlinie parallel zu den Clavikeln. Anschließend erfolgte die schichtweise Präparation der Weichteile der Halsvorderseite bis zu den Musculi omohyoidei beidseits. Diese wurden lateral abgesetzt und nach medial geklappt, so dass die Vagina carotica beidseits freiliegt. Danach wurden die cervikalen Gefäß-Nerven-Straßen beidseits en-bloc entnommen. Hierzu wurden diese beidseits horizontal unmittelbar kranial der Clavicula beziehungsweise unmittelbar kaudal des Processus styloideus der Schädelbasis durchtrennt. Ex situ wurden die Präparate für die histologische Aufarbeitung zugeschnitten. Hierbei wurde insbesondere das Fett- und Stützgewebe rund um den Sinus caroticus in der Karotisbifurkation geschont, um eine Resektion des Glomus caroticum zu vermeiden. Von jeder Körperspende wurde pro Seite ein Schnitt in der sagittalen Ebene (Abbildung 4) und Schnitt in der horizontalen Ebene (Abbildung 5) gesetzt.

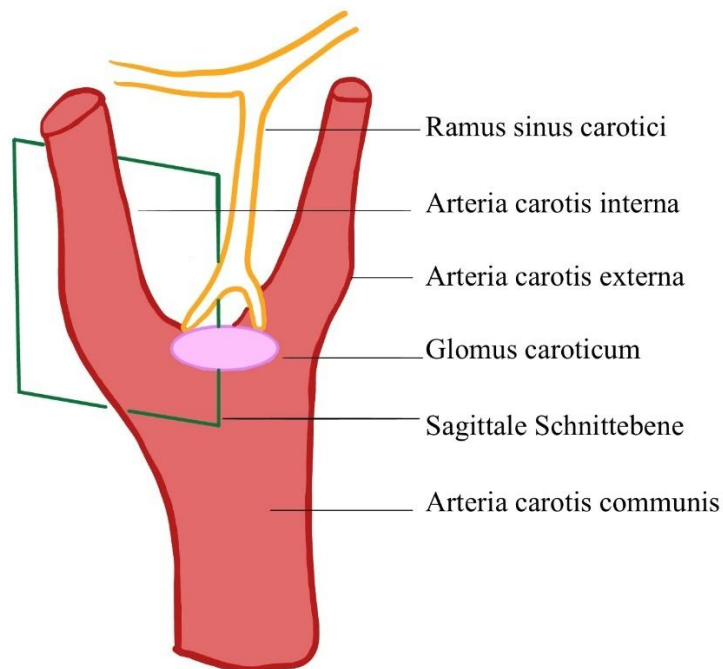


Abbildung 4: sagittale Schnittebene durch die Karotis modifiziert nach [48].

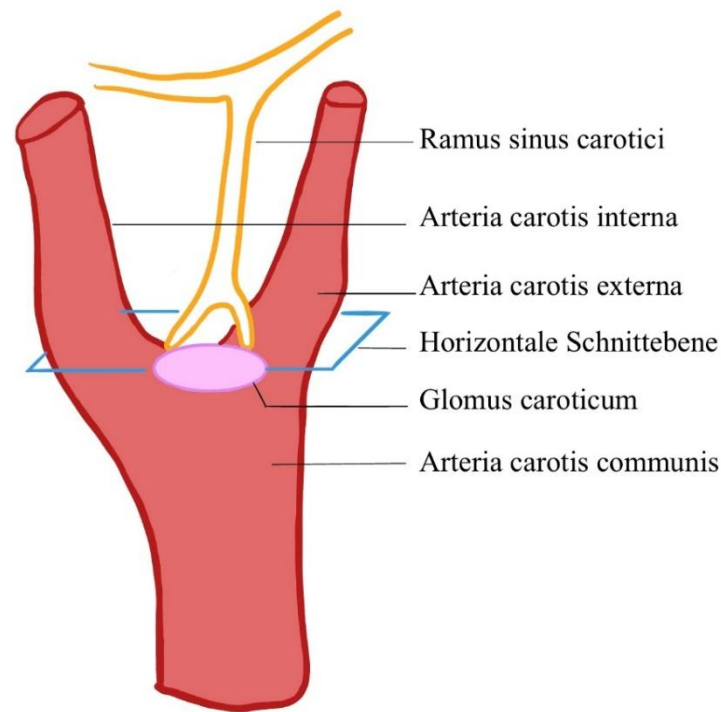


Abbildung 5: horizontale Schnittebene durch die Karotis modifiziert nach [48].

Durch die sagittale Schnittführung entstehen jeweils zwei Präparate: einmal zur A. carotis interna und einmal zur A. carotis externa. Die horizontale Schnittebene teilt ein kraniales und ein kaudales Präparat. Pro Spender wurden dadurch pro Seite vier Präparate gewonnen.

3.5 Entkalkung

Die Mehrheit der entnommenen Proben enthielten Kalkablagerungen. Um das Schneiden am Mikrotom zu ermöglichen, wurden die Proben mittels einer direkten Entkalkungstechnik behandelt. Im Gegensatz zu der indirekten Entmineralisation werden bei dieser Technik die Proben bereits vor ihrer Einbettung entkalkt. In diesem Fall wurde eine Entkalkung mit dem Chelatbildner Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA) gewählt. EDTA reagiert mit Ca^{2+} -Ionen des Kalks zu einem wasserlöslichen Komplex, wodurch sich Ablagerungen entfernen lassen. [108] Hierzu wurde für die vorliegende Arbeit nach Protokoll des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes eine Lösung aus 250 g EDTA-Dinatriumsalz und 1750 ml destilliertem Wasser hergestellt. Durch Zugabe von Natriumhydroxid wurde der pH-Wert auf sieben eingestellt. Der gesamte Prozess der Entkalkung inklusive Zwischenschritten mit einer kurzzeitigen Lagerung der Proben in Phosphatpufferter Salzlösung (PBS) dauerte etwa 8 Wochen. In dieser Zeit waren die Proben

keiner Fixierungslösung (zum Beispiel Phosphat-gepuffertes Formalin) ausgesetzt. Die Entkalkung wurde von Nico Lehmann durchgeführt.

3.6 Probeneinbettung

Die Probeneinbettung erfolgte nach dem Protokoll des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes wie bei Abdinghoff et al. [3] beschrieben. Ziel der Prozedur ist das Überführen des entnommenen Gewebes in Paraffin als Einbettmedium. Nach Probenentnahme und Entkalkung wurden die Gewebestücke in Einbettkassetten in 70%iger Isopropanol-Lösung bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Das Einbetten selbst wurde mit einem Waschen der Proben 15 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser begonnen. Anschließend kam ein Karussell-Gewebeeinbettter zum Einsatz, welcher mittels aufsteigender Alkoholreihe eine Dehydrierung der Proben durchführte. Es folgte eine Einbettung in Methylbenzoat und Paraffin.

Tabelle 5 im Anhang fasst die einzelnen Schritte der Probeneinbettung zusammen.

3.7 Schneiden

Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Mikrotoms und entsprechender Klinge in 7 µm dicke Scheiben geschnitten. Um ein Zusammenfallen der Schnitte zu verhindern, wurde die Klinge bei jedem neu eingespannten Paraffinblock gewechselt. Zum Glätten wurden die Schnitte einige Minuten in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad gegeben. Aus dem Wasserbad heraus wurden die Proben auf Objektträger überführt. In einem ersten, orientierenden Durchgang wurden Schnitte für die HE-Färbung angefertigt. Dabei wurden die Schnitte auf nicht silanisierten Objektträgern aufgezogen. In einem zweiten Durchgang, nach Selektion der Proben mit Nachweis des Glomus caroticums, wurden Schnitte für die IHC angefertigt. Diese wurden auf silanisierten Objektträgern aufgezogen, um die Abschwimmrate der Proben im Färbeprozess zu minimieren. Unabhängig von der Schnittreihe wurden nach Aufziehen der Dünnschnitte die Objektträger 30 Minuten auf einer Wärmeplatte getrocknet und für 12 Stunden bei 37 °C in einem Wärmeschrank gelagert.

3.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zum histologischen Nachweis des Glomus caroticums in den Proben wurde zunächst eine HE-Färbung durchgeführt. Durch das positiv geladene Hämatoxylin lassen sich negativ geladene Zellkerne bläulich anfärben. Das Cytoplasma hingegen wird durch Eosin rötlich kontrastiert. Hämatoxylin ist ein im Cambechebaum vorkommender, natürlicher Farbstoff, der durch

Oxidation in das intensiver färbende Hämatoxylin überführt wird. Der verwendete Hämatoxylin-Farbstoff nach Ehrlich enthält als Oxidationsmittel Natriumiodidtrioxid (NaIO₃) und 3%ige Essigsäure. Dies verhindert ein Überfärben der Proben. [85]

Die Färbung wurde nach dem Standard des Instituts für Anatomie der Universität des Saarlandes wie in [2] durchgeführt. Erst eine Entfernung des Paraffins als Einbettmedium ermöglicht die Bindung des Farbstoffs [86]. Daher wurde eine Entparaffinierung für dreimal fünf Minuten in Xylol durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Lagerung in absteigender Alkoholreihe für zweimal fünf Minuten in 100%iger 2-Propanol-Lösung, einmal für fünf Minuten in 90%iger und einmal für fünf Minuten in 80%iger 2-Propanol-Lösung. Dadurch werden den Gewebeproben als Vorbereitung auf die Färbelösung sukzessive Wasser zugeführt. Die Lagerung in 100%iger 2-Propanol-Lösung wird standardmäßig zweimal durchgeführt, aufgrund der unvermeidbaren Vermischung mit der vorherigen Xylolreihe. Dann folgte die erste Färbung durch Lagerung der Proben für acht Minuten in filtriertem Hämatoxylin. Die ersten Farbüberstände wurden für einige Sekunden in destilliertem Wasser und anschließend für zwölf Minuten unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. [2] Ein direktes Überführen in Leitungswasser ist kontraindiziert [86]. Nach 30 Sekunden in destilliertem Wasser schloss sich der zweite Färbeschritt an. Die Objektträger wurden zweieinhalb Minuten in einer filtrierten Eosin-Lösung gelagert. [2] Um die Farbtintensität zu optimieren, wurden dieser vorher zwei Tropfen 0,1%ige Essigsäure beigemischt [86]. Nach dem Auswaschen in 90%iger 2-Propanol-Lösung wurde die Überführung in aufsteigender Alkoholreihe durchgeführt. Die Reihenfolge dieser ist umgekehrt zu der aufsteigenden Alkoholreihe zu Beginn der Färbung. Danach wurden die Proben für dreimal fünf Minuten in Xylol getunkt. Als letzter Schritt wurde ein Klebstoff appliziert, welcher die Objektträger mit dem Deckglas fixiert. [2]

Eine Zusammenfassung der Arbeitsschritte lässt sich Tabelle 6 im Anhang entnehmen.

3.9 Immunhistochemie

Objektträger, auf denen sich das Glomus caroticum eindeutig identifizieren lässt, sind aufgrund der unvorhersehbaren Entnahme und des Mikrotomierens poröser Strukturen aufwendig in der Gewinnung. Zur Identifikation der geeigneten Antikörperkonzentrationen wurde daher ein Durchlauf der IHC mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Die Vorauswahl der getesteten Antikörperkonzentrationen basierte auf Vorstudien der Arbeitsgruppe [3], [32], [52]. In der Verdünnungsreihe wurden TRPC3-Antikörper in einem Verhältnis von 1:50, 1:100 und 1:200 getestet. TRPC6-Antikörper wurden in einem Verhältnis

von 1:100, 1:200, 1:400 getestet. Der TRPC3-Antikörper lag bereits in einer Konzentration von 1:50 vor. Um auf eine Verdünnung von 1:100 zu kommen, wurden 200 µl der Primäantikörperlösung mit 200 µl Normal Goat Serum (NGS) gemischt. 150 µl der nun entstandenen 1:100 Primäantikörperkonzentration wurden mit 150 µl NGS verdünnt, um eine 1:200 Konzentration des Primäantikörpers zu erhalten. Dasselbe Vorgehen wurde zur Verdünnung des TRPC6-Antikörpers wiederholt.

Nach subjektiver Einschätzung des Verhältnisses von gewünschten Signalen und unvermeidbarer Hintergrundfärbung (weitere Details siehe Abschnitt 3.11), zeigten sich für TRPC3 die besten Ergebnisse in einer Verdünnung von 1:50 und für TRPC6 in 1:100. Im Folgenden wird die Verdünnungsreihe für den TRPC3-Kanal durch die Abbildungen 6-8 exemplarisch dargestellt.

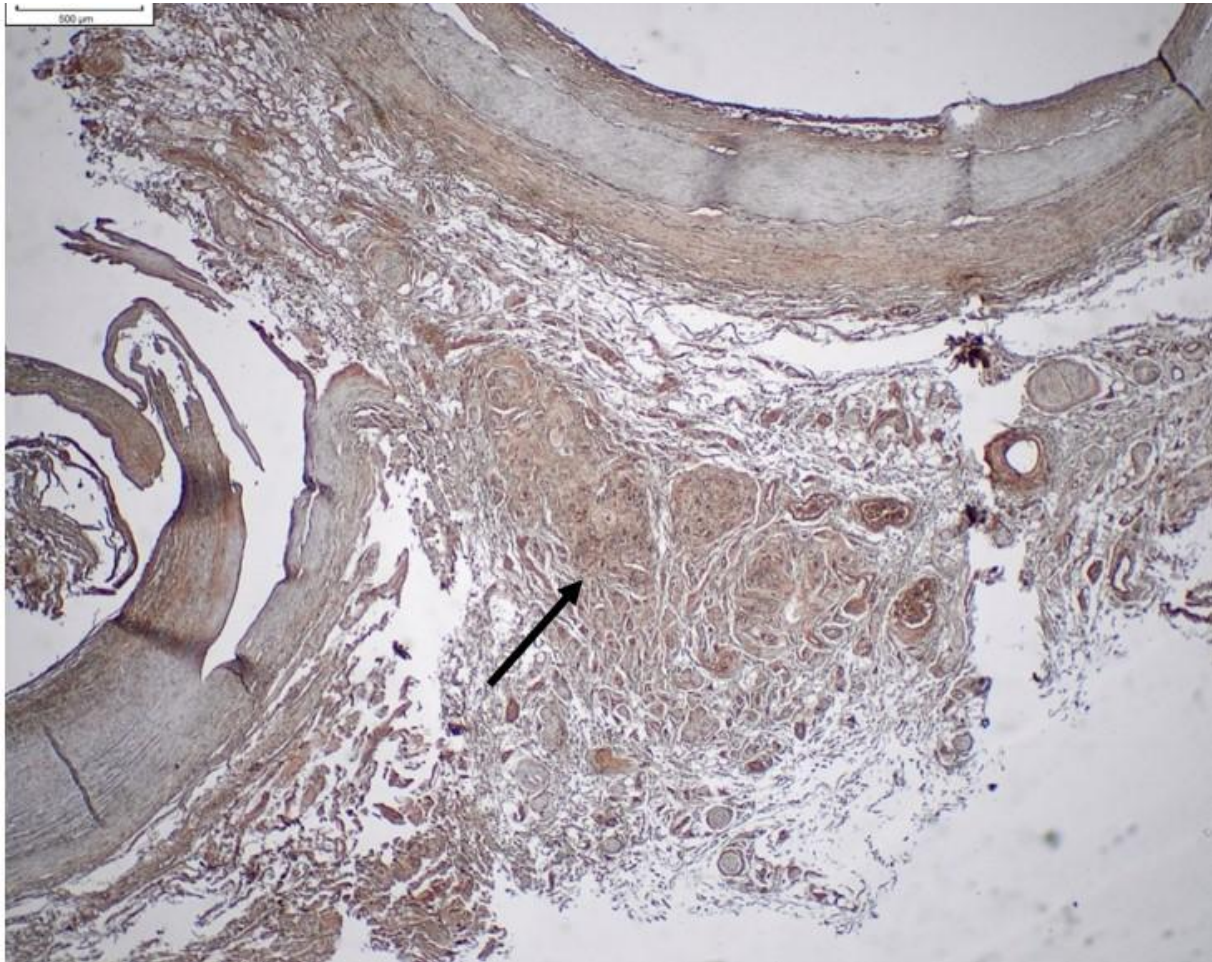


Abbildung 6: Immunhistochemische Anfärbung (Spender 5) des TRPC3-Kanals aus der Verdünnungsreihe in 20-facher Vergrößerung mit einer Gegenfärbung in Hämatoxylin. Für diese Probe wurde eine Antikörperverdünnung von 1:50 gewählt. Das Glomus caroticum (schwarzer Pfeil) ist in der Bildmitte in der Karotisbifurkation erkennbar. Es ist eine deutliche Braunfärbung durch 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Signal erkennbar. Zudem sieht man eine moderate Hintergrundfärbung.



Abbildung 7: Immunhistochemische Anfärbung (Spender 1) des TRPC3-Kanals aus der Verdünnungsreihe in 20-facher Vergrößerung mit einer Gegenfärbung in Hämatoxylin. Es wurde eine Antikörperverdünnung von 1:100 gewählt. Das Glomus caroticum (schwarzer Pfeil) ist im linken Bildabschnitt zu erkennen. Zudem ist eine starke Braunfärbung als Signal auszumachen. Die Hintergrundfärbung ist stärker als in der Verdünnung von 1:50. Diese Antikörperkonzentration lässt keine zuverlässigen Aussagen über die Lokalisation des TRPC3-Kanals zu. Daher wurde die Antikörperkonzentration für weitere Durchläufe der IHC ausgeschlossen.

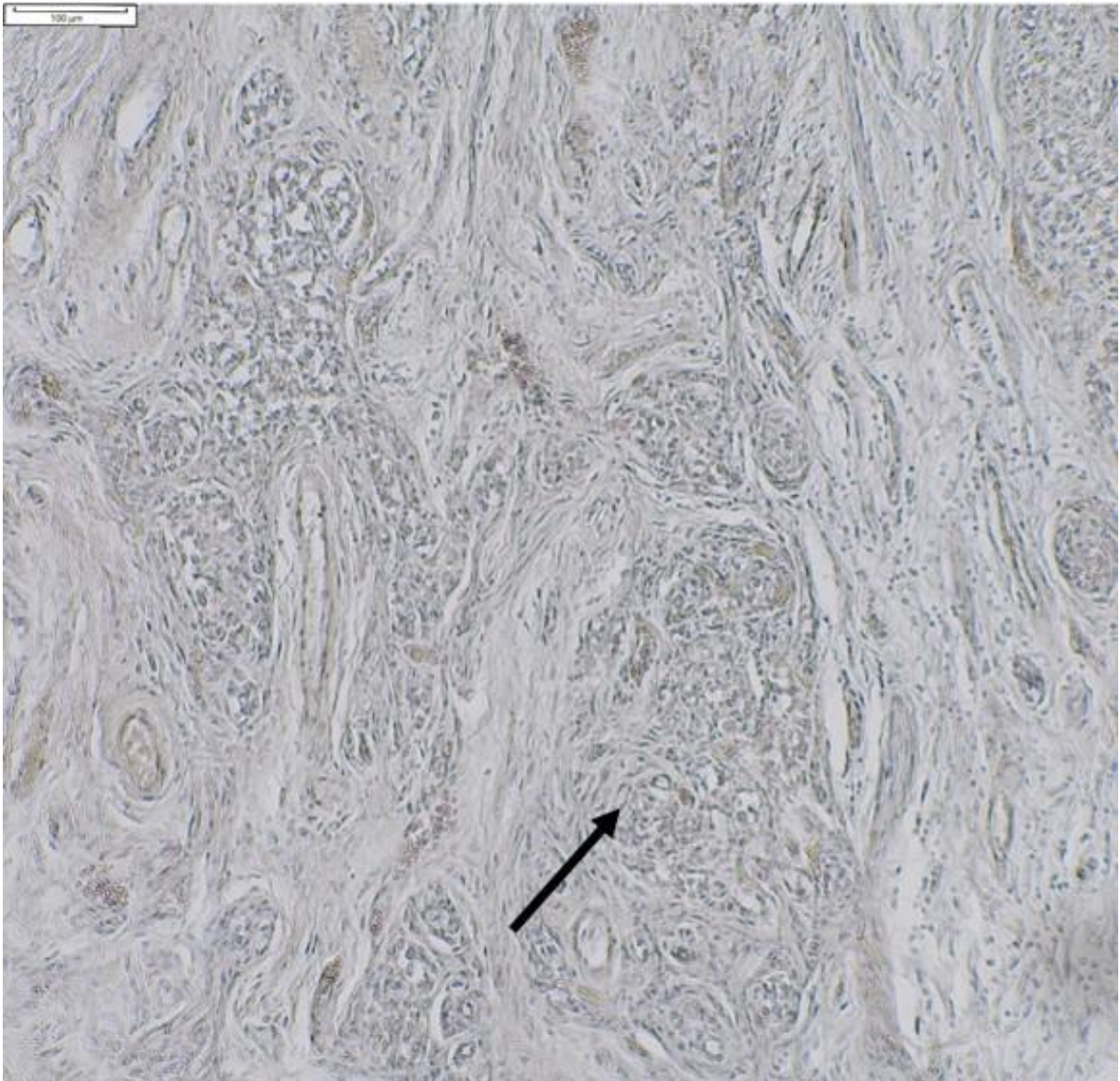


Abbildung 8: Immunhistochemische Anfärbung (Spender 2) des TRPC3-Kanals aus der Verdünnungsreihe in 20-facher Vergrößerung mit einer Gegenfärbung in Hämatoxylin. Einzelne Lobuli (schwarzer Pfeil) des Glomus caroticums sind erkennbar. Die Antikörperverdünnung von 1:200 erzeugt nur schwache, singuläre Signale. Die Hintergrundfärbung fällt gering aus.

Es bietet sich an, das Pipettieren der verschiedenen Lösungen zu erledigen, während der Wärmeschrank auf 95 °C Betriebstemperatur aufgeheizt wird. Vorbereitend für den Färbedurchgang wurde eine 1%ige Citratpufferlösung hergestellt. Diese dient, zusammen mit der später folgenden Inkubation im Wärmeschrank, der Demaskierung der Epitope. Für 250 ml Citratpufferlösung wurden 2,5 ml Citratpuffer und 247,5 ml destilliertes Wasser benötigt. Die Lösung wurde bei 95 °C im Wärmeschrank erhitzt. Um 100 ml 3%ige Wasserstoffperoxidlösung zu erhalten, wurden 91,43 ml PBS und 8,57 ml 35%ige Wasserstoffperoxid zusammengefügt. Der mit Horseredish-Peroxidase (HRP) konjugierte Sekundärantikörper soll in einer Konzentration von 1:500 vorliegen. Zunächst wurden 20 µl der HRP mit 980 µl NGS Blockierlösung vermischt, um eine Sekundärantikörperkonzentration von 1:50 zu erhalten. 100 µl dieser Lösung wurden anschließend mit 900 µl NGS gemischt für eine finale Sekundärantikörperkonzentration von 1:500. Zudem wurde vorbereitend für den Versuch eine Feuchtekammer aufgebaut.

Die einzelnen Verdünnungsschritte sind tabellarisch im Anhang in Tabelle 7 zusammengefasst.

1. Tag

Zuerst mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Wie aus der HE-Färbung bekannt, wurden die Schnitte für dreimal fünf Minuten in Xylol, für zweimal fünf Minuten in 100%igen Isopropanol sowie jeweils für fünf Minuten in 90%igen, 80%igen und 70%igen Alkohol getaucht. Anschließend wurden die Schnitte für fünf Minuten in destilliertem Wasser gelagert. Für die Demaskierung der Epitope folgte die Inkubation für 60 Minuten in 3%iger Citratpufferlösung in einem Wärmeschrank. Nach dem die Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur abkühlten, schloss sich die Spülung für eine Minute in PBS an. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden dann mit einem Fettstift umkreist und die Blockierlösung aus 10%iger NGS auf die Proben gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtekammer inkubiert. Die Blockierlösung wurde daraufhin von den Trägern geklopft und die Primärantikörper aufgetragen. Auf die Negativprobe wurde anstelle des Primärantikörpers Kaninchenserum pipettiert. Die Objektträger wurden dann über Nacht in der Feuchtkammer verwahrt.

2.Tag

Am Folgetag wurden die Objektträger für zweimal zwei Minuten in PBS getunkt. Für zehn Minuten wurden die mit Wasserstoffperoxidlösung beträufelten Proben, in der Feuchteammer verstaut und anschließend erneut für zweimal zwei Minuten in PBS gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die vorherigen Lösungen durch Abklopfen von den Objektträgern entfernt. Nun konnte der Sekundärantikörper appliziert werden. Nach einstündiger Inkubation erfolgte erneut das Eintauchen in PBS für zweimal zwei Minuten. Der eigentliche Färbevorgang der IHC besteht aus der DAB-Färbung und der Gegenfärbung in Hämatoxylin. Die Färbung mittels DAB äußert sich in einer Braunfärbung des Gewebes durch Reaktion mit der, an den Sekundärantikörper gekoppelten, Peroxidase. Unter Beobachtung am Mikroskop wurde die DAB-Lösung auf die Objektträger pipettiert, bis eine markante Braunfärbung erkennbar war. Die DAB-Lösung wirkte neun Minuten lang ein. Danach wurde die Peroxidasereaktion durch Waschen in PBS unterbrochen, um ein Überfärben zu verhindern. Für die Gegenfärbung wurde die Küvette mit den Objektträgern für eine Sekunde in Hämatoxylin getunkt und im Anschluss für fünf Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Die Küvette wurde danach in umgekehrter Reihenfolge wie oben beschrieben in 70%igen, 80%igen, 90%igen, 100%igen Alkohol sowie in Xylol gelagert. Final erfolgte das Auftragen von Gewebeschnittkleber und einem Deckglas. Es empfiehlt sich, die Proben anschließend über Nacht trocknen zu lassen.

Eine detaillierte Zusammenfassung der Arbeitsschritte lässt sich Tabelle 8 im Anhang entnehmen.

3.10 Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung

Die Movat-Pentachrom nach Verhoff-Färbung wurde von Tanja Schwab im Labor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführt. Dabei wurde ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Protokoll nach [31] eingehalten. Der Ablauf wird hier nur zusammenfassend dargestellt. Eine detaillierte Prozessbeschreibung findet sich im Anhang in Tabelle 9. Die Proben wurden zunächst entparaffiniert, wie bereits für die HE-Färbung beschrieben. Anschließend wurden die Proben kurz in Essigsäure getränkt, gefolgt von einer 30-minütigen Lagerung in Alcianblau. Nach einer Spülung in Leitungswasser wurden die Schnitte acht Minuten in der Verhöff-Gebrauchslösung gelagert. Anschließend wurden die Präparate für eine Minute in eine Eisen-Chlorid-Lösung, sowie für zehn Minuten in eine Brilliant-Crocein-Säurefuchsinlösung getränkt. Vor und nach der Lagerung in Phosphorwolframsäure wurden die Proben jeweils in Essigsäure getunkt. Im letzten Abschnitt

schlossen sich die Lagerung in 99%igen Ethanol, Safron-du-Gatinais-Lösung sowie Xylol an. Die Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung eignet sich gut, um die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zu der Morphologie des Glomus caroticums in einer Gegenfärbung in Bezug setzen zu können [78].

3.11 Mikroskopische Auswertung

Basierend auf einer Literaturrecherche der PubMed®-Datenbank handelt es sich bei dieser Arbeit um die erste explorative Studie zu der Verteilung von TRPC3- und TRPC6-Kanälen im menschlichen Glomus caroticum. Zur histologischen Auswertung wurden zwei Standardfärbungen herangezogen (HE, Movat-Pentachrom nach Verhöff). Zur Untersuchung der Verteilung der Proteine TRPC3 und TRPC6 wurden diese immunhistochemisch markiert.

Die Auswertung wurde mit einem Olympus BX43 durchgeführt. Dabei wurden Objektive mit 2- bis 40-facher Vergrößerung genutzt. Zudem wurden zusätzliche Linsen mit ein- bis zweifacher Vergrößerung eingesetzt. Die maximale Vergrößerung in Luft beläuft sich damit rechnerisch auf 800-fach. Als Kamera wurde eine Olympus DP23 und als Software Olympus cellSens Dimensions 4.2 genutzt. Jedes angefertigte Bild wurde mittels der Funktionen „Schärfen“ und „Kontrast maximieren“ mit den Werkseinstellungen von Olympus der zuvor genannten Software bearbeitet.

Die Dünnschnittpräparate in den Standardfärbungen wurden histomorphologisch und histomorphometrisch untersucht (Details siehe Absätze 3.11.1 und 3.11.2). Die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von TRPC3 und TRPC6 wurden jeweils einmal densitometrisch und einmal deskriptiv (Details siehe Absatz 3.11.3) untersucht.

3.11.1 Histomorphologische Untersuchung

Atherosklerose Grading

Die vorherrschende Atherosklerose der A. carotis wurde mittels HE- und Movat-Pentachrom Färbung befundet. Das verwendete Grading-System orientiert sich an den aktuellen internationalen Empfehlungen (siehe Abbildung 9). Als nicht signifikante Atherosklerose gilt eine merkliche Verdickung der Intima ohne Beeinträchtigung der Media. Eine milde Atherosklerose ist eine Läsion unter Beteiligung des luminalen Media-Drittels. Eine moderate Atherosklerose beschreibt eine Affektion von mehr als einem Drittel der Media. Bei einer schweren Atherosklerose sind mehr als zwei Drittel der Media betroffen. Zudem wird eine Atherosklerose mit exzessiver Entzündung unterschieden, bei der mindestens eine milde

Atherosklerose bei gleichzeitigem Nachweis eines Entzündungszellinfiltrates in der Adventitia vorliegt. [36]

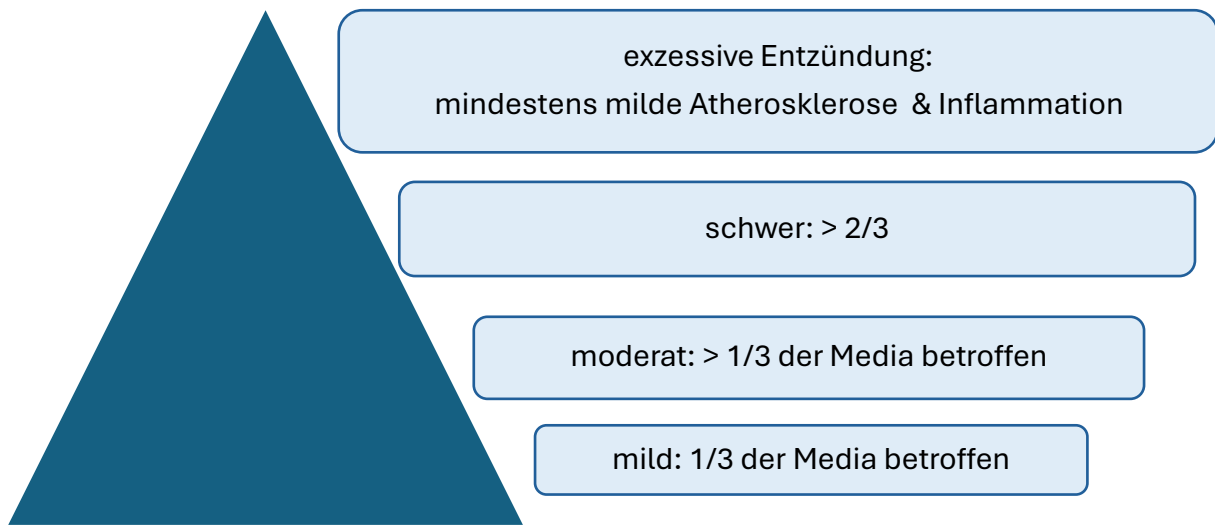


Abbildung 9: Grading des atherosklerotischen Befalls in Anlehnung an [36] mit von unten nach oben aufsteigendem Schweregrad.

Degeneration des Glomus caroticum

Altersabhängige Involution sowie Minderperfusion können zu degenerativen Umbauvorgängen des Glomus caroticum führen. Die Degenerationen wurden mit Parametern bewertet, die in der Literatur bereits beschrieben wurden. Folgende Parameter wurden untersucht: fibröse Einengung der Interlobulararterien, vorhandene sogenannte „dark cell“-Prominenz, lymphozytisches Infiltrat, Fibrose, Lipofuszingranula, sowie die wabenförmige Auflösung der Lobuli. Bei der „dark cell“-Prominenz handelt es sich um das vermehrte Vorkommen stark basophiler Zellen im Glomus caroticum mit teils pyknotischem Zellkern. Die „dark cell“-Prominenz gilt als typischer Befund des senilen Glomus caroticum [44]. Das Vorkommen von Lipofuszingranula konnte in der Vergangenheit mit degenerativen Umbauvorgängen des Glomus caroticum assoziiert werden [26]. Bei der wabenförmigen Auflösung des Glomus caroticum handelt es sich um einen deskriptiven Parameter, der in vorangegangenen Arbeiten auf ein Ödem des Glomus caroticum [115] beziehungsweise eine Stützzellproliferation zurückgeführt werden konnte [44]. Da in der vorliegenden Arbeit postmortale Artefakte, insbesondere Autolyse, nicht auszuschließen sind, wurde dieser Parameter lediglich deskriptiv als vorhanden beziehungsweise nicht vorhanden mit in die Auswertung aufgenommen.

3.11.2 Histomorphometrische Untersuchung

Im Rahmen histomorphometrischer Untersuchungen am digitalen Bild (Olympus cellSens Dimensions 4.2) wurden die Längen, die Breiten sowie die Anzahl der Gefäßanschnitte im jeweiligen untersuchten Anteil des Glomus caroticums bestimmt. Oben genannte Parameter wurden in jedem der vier Schnitte (HE, Movat-Pentachrom und IHC zum Nachweis von TRPC3 bzw. TRPC6) gemessen. Daraus wurde nachfolgend der Mittelwert berechnet. Dabei wurde die Länge als größte Ausdehnung und die Breite als nächst größere Ausdehnung senkrecht zur Länge definiert. Die Anzahl der angeschnittenen Gefäße wurde als numerische Dichte, das heißt Gefäßanschnitte pro mm², bestimmt. In jedem der vier Dünnschnittpräparate wurden die Gefäßanschnitte im dargestellten Glomus caroticum ausgezählt. Der Mittelwert der Gefäßanschnitte wurde anschließend durch den Mittelwert der Fläche des Glomus caroticums dividiert.

3.11.3 Auswertung der TRPC3 und TRPC6 Immunhistochemie

Aus Vorstudien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tschernig ist bekannt, dass aufgrund der ubiquitären Verteilung beziehungsweise Expression der TRPC-Kanäle [116], [117] und vermutlich aufgrund postmortaler Artefakte Hintergrundsignale in der IHC zu beobachten sind [2], [32], [104]. Aus diesem Grund wurde anknüpfend an die Vorstudien ein kombiniertes Vorgehen aus semiquantitativer Deskription der Verteilung parallel zu einer Densitometrie verwendet (siehe [32], [104]).

In der semiquantitativen, deskriptiven Auswertung wird die Färbeintensität an verschiedenen Lokalisationen (Glomuszellen, Stützzellen und Kapillarwände) durch den Untersucher subjektiv quantifiziert (blassbraun \triangleq „+“ entsprechend einem schwachen Signal; hellbraun \triangleq „++“ entsprechend einem moderaten Signal; dunkelbraun \triangleq „+++“ entsprechend einem starken Signal). Als Grundlage wurde an jedem Schnitt der IHC nach beschriebenem Schema die Intensität der Hintergrundfärbung bewertet, um zwischen Artefakten der Färbungen und tatsächlichen Signalen unterscheiden zu können.

Die Schwellenwertuntersuchung wurde in der 400-fachen Vergrößerung digital (Olympus cellSens Dimension 4.2) vorgenommen. Als Grundlage diente ein Weißabgleich. Aufgrund der bekannten Problematik bezüglich der Hintergrundfärbung wurde ein konservativer Schwellenwert der Färbeintensität gewählt. Die Sicherheit der Untersuchung wurde einer möglichen Unterschätzung der tatsächlich immunoreaktiven Fläche gegenüber priorisiert. Für TRPC3 und TRPC6 wurden individuelle Schwellenwerte festgelegt. Dies erfolgte an einem

Schnitt mit starker Hintergrundfärbung. Die IHC mittels DAB erzeugt braune Signale, weshalb der Schwellenwert im roten Farbspektrum (digital nach Rot-Grün-Blau-Wert) festgelegt wurde. Anschließend markiert das Programm alle Farbwerte UNTERHALB der Schwelle, das heißt Hintergrund und/oder nicht sicher positives Signal (siehe Abbildung 28). Entsprechend zeigen sich die tatsächlich als positiv erkannten Signale als Negativ-Bild der rot markierten Areale (unterhalb der Schwelle) und der weißen Areale (optisch leere Räume, beispielsweise Spalträume im Sinne von Schrumpfungartefakten). Die Fläche oberhalb der Schwelle, bzw. die tatsächlich immunoreaktive Fläche, wurde dann als prozentualer Anteil der Fläche eines High Power Fields (400er-fache Vergrößerung; Fläche: 61.285,82 μm^2) berechnet (siehe Abbildung 27).

Diese Schwellenwertmessung wurde für jeden Schnitt der IHC dreimal durchgeführt. Dabei wurden die Gesichtsfelder nach einem sogenannten Systematic Random Sampling Design ausgewählt [114]. Anhand prominenter Strukturen im Gewebe wurde sichergestellt, dass sich die densitometrisch untersuchten Gesichtsfelder nicht überlappen. Das Ergebnis der drei gemessenen High Power Fields pro Schnitt wurde anschließend gemittelt. Aufgrund anzunehmenden inter- und intraindividuelle Varianz wurde die Densitometrie an mehreren Gesichtsfeldern aus einem Schnitt durchgeführt [35].

4 Ergebnisse

Das Studienkollektiv umfasste zu Beginn elf Spender zu je acht Präparaten. Insgesamt konnte das Glomus caroticum an sechs Körperspendern in allen vier Färbungen dargestellt werden. Dies war zum Einen der Porosität der Paraffinblöcke nach der Entkalkung geschuldet. Des Weiteren schieden Proben während der IHC aus, da sich Gewebe von den Objektträgern löste. Deshalb waren nicht zu jedem Spender Schnitte in allen vier Färbungen vorhanden. In weiteren Schnittserien der Paraffinblöcke konnte das Glomus caroticum nicht mehr dargestellt werden.

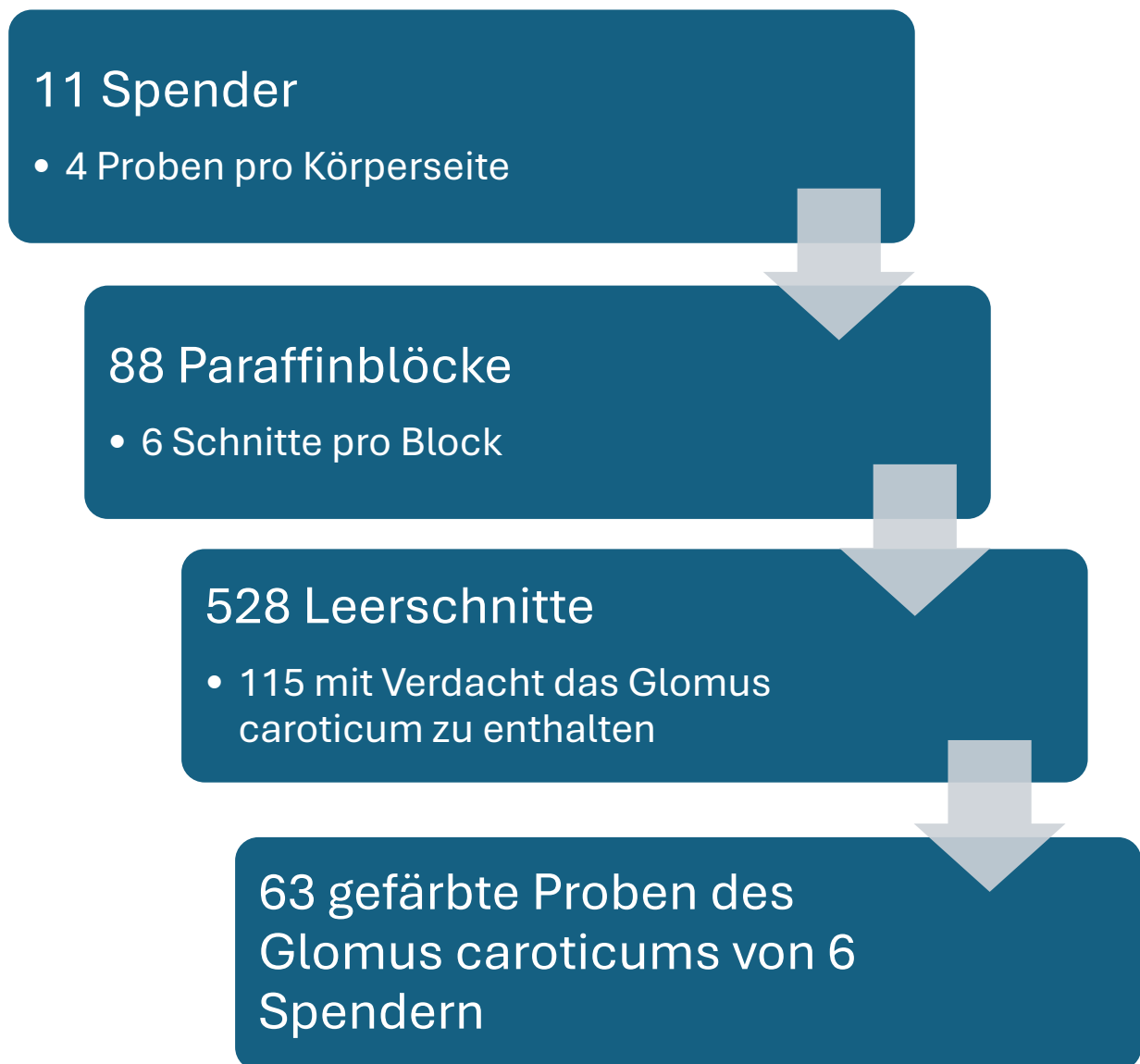


Abbildung 10: Verlauf der Probenauswahl des Studienkollektivs

4.1 Histomorphologie

4.1.1 Befundung der Arteria carotis communis

| Spender | Atherosklerose Grading | Adventitia-Fibrose | Verschluss der Carotis |
|---------|------------------------|--------------------|------------------------|
| 1 | Moderat | Nein | Nein |
| 2 | Nicht signifikant | Nein | Nein |
| 3 | mild | Nein | Nein |
| 4 | schwer | Nein | Ja |
| 5 | moderat | Nein | Nein |
| 6 | schwer | Ja | Nein |

Tabelle 10: Befund der A. carotis communis.

Die Befunde der A. carotis communis der einzelnen Spender sind tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 10). Die A. carotis communis der Spender 4 und Spender 6 war am stärksten atherosklerotisch degeneriert. Spender 6 wies als Einziger eine Fibrose bis in die Adventitia auf.

Abbildung 11 verdeutlicht die Kollagenvermehrung und Verdrängung elastischer Fasern als Ausdruck der Fibrose.

Abbildung 12 zeigt bei Spender 4 das chronisch verschlossene Lumen der A. carotis communis. Luminal erkennbar ist ein basophiles Residuum des Kalks durch den Zustand nach Entkalkung. Die stärkere Vergrößerung in Abbildung 13 bietet Hinweise auf eine beginnende Revaskularisierung. Es zeigen sich inflammatorische Prozesse, welche morphologischen Kriterien entsprechend als lymphozytäres Infiltrat zu deuten sind. Zudem können optisch leere Räume als residuale Fetteinschlüsse der ursprünglichen Plaques beobachtet werden. Eine exzessive Inflammation lag in keinem der Präparate vor.

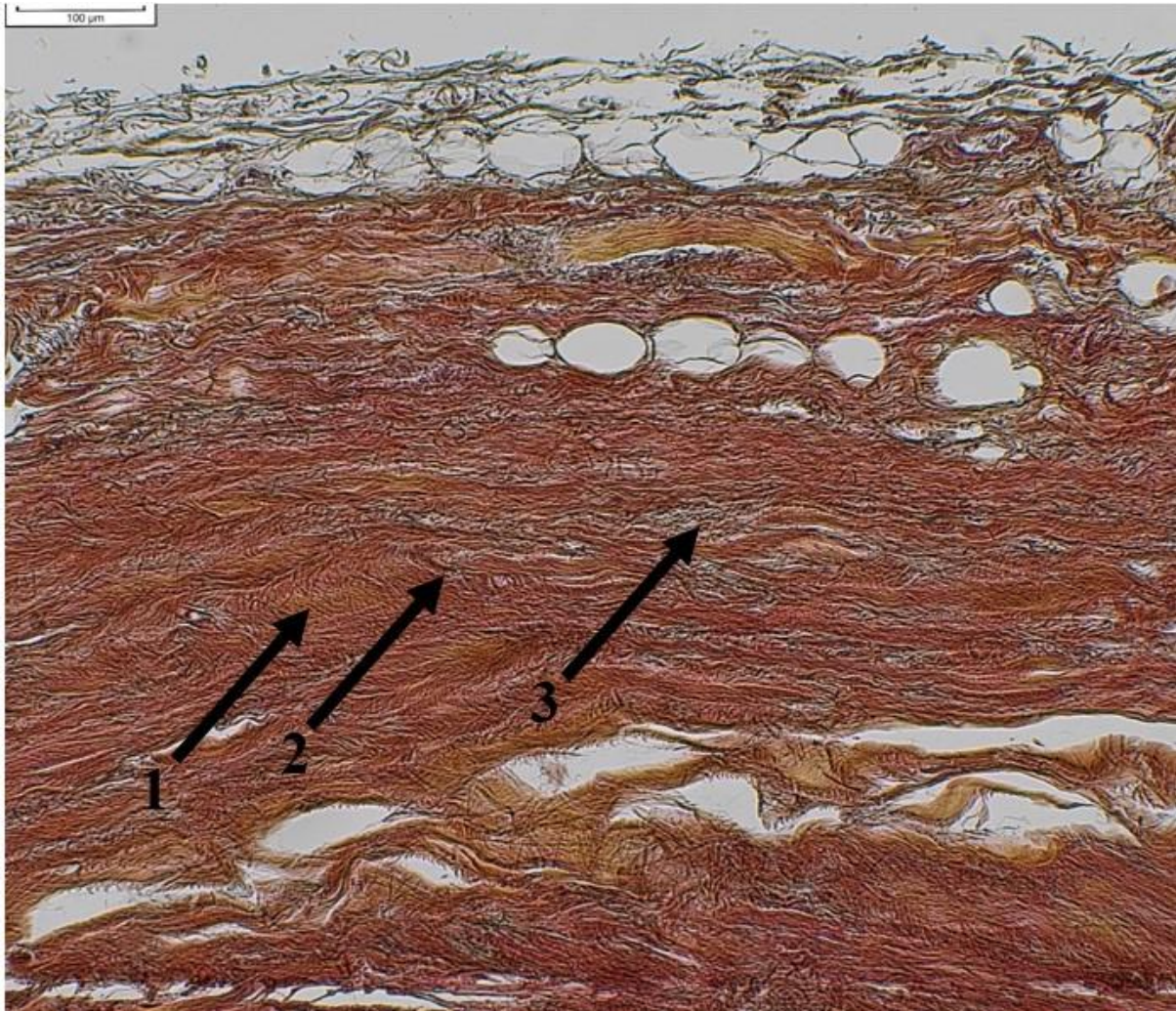


Abbildung 11: Foto einer degenerativ umgebauten *A. carotis communis* (Spender 6) in 100-facher Vergrößerung in der Movat-Pentachrom-Färbung. Elastische Fasern, die sich schwarz färben, sind nur noch vereinzelt erkennbar. 1= Kollagenvermehrung, 2=elastische Faser, 3= Mucopolysaccharide.

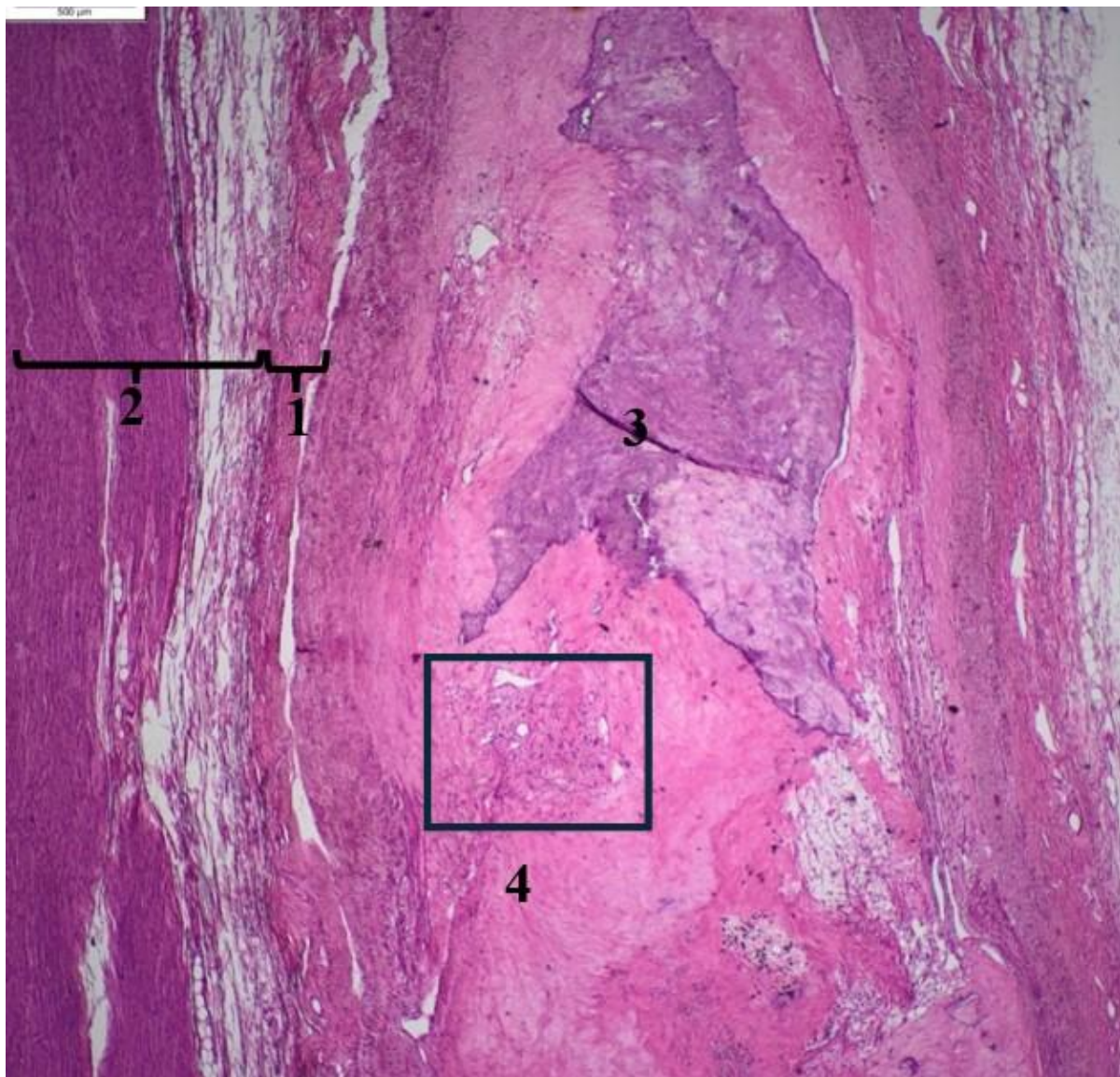


Abbildung 12: Exemplarisches Foto einer verschlossenen *A. carotis communis* (Spender 4) in 20-facher Vergrößerung in HE. 1= Intima, 2= Tunica media, 3= basophiles Kalkresiduum, 4= Ausschnitt Abbildung 13.

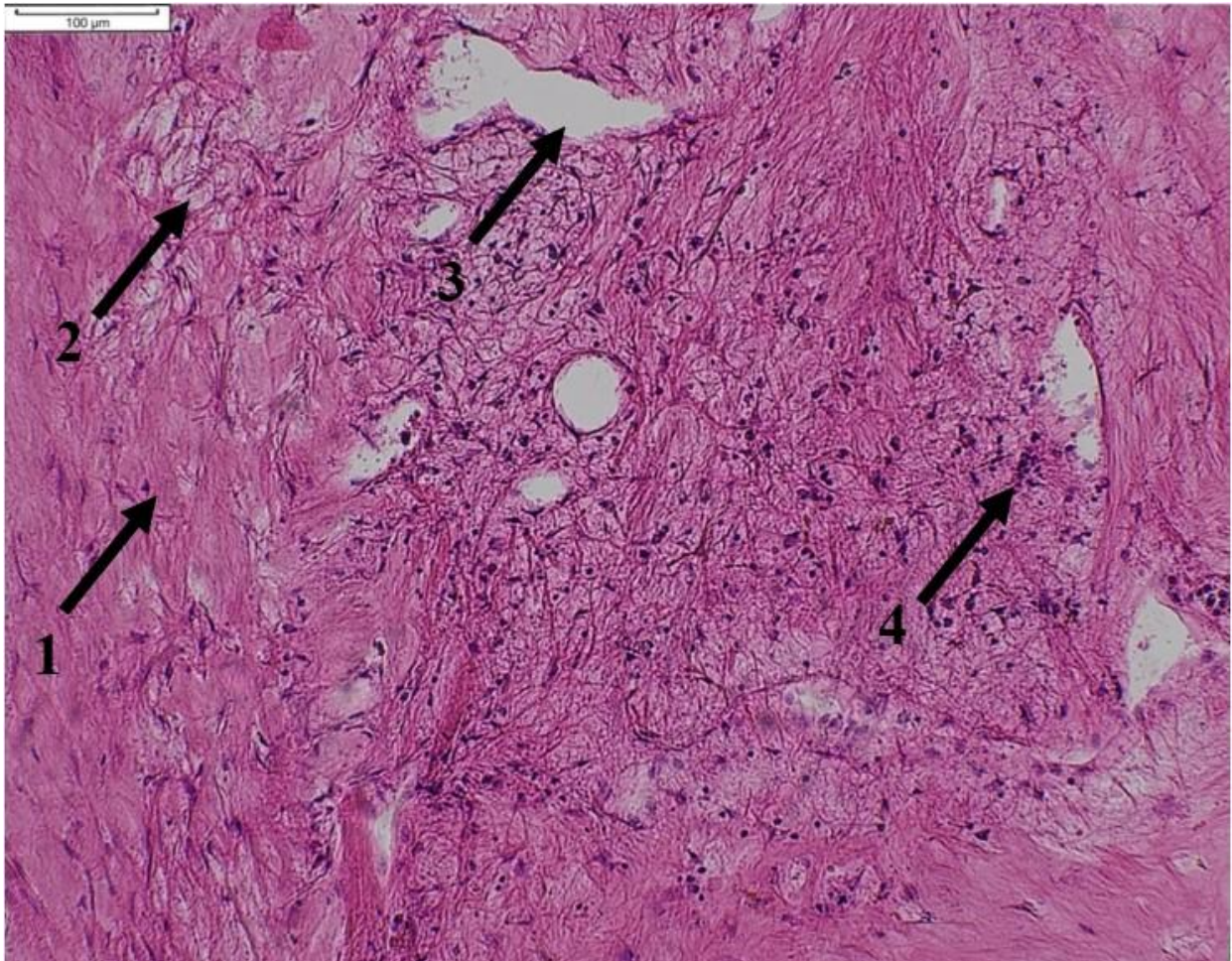


Abbildung 13: Exemplarisches Foto einer fibrotischen *A. carotis communis* (Spender vier) in 100-facher Vergrößerung in HE. Vergrößerter Ausschnitt des luminalen Verschlusses aus Abbildung 12. 1=fibrotisches Gewebe, 2=Residualraum durch Fetteinschlüsse, 3=Kapillare, 4=lymphozytäres Infiltrat.

Die Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung eignet sich, um Degenerationen der A. carotis communis zu sehen (Abbildung 14). Bei Spender 6 reichte diese Degeneration bis in die Tunica adventitia hinein. Dies äußerte sich an Ablagerungen von Mucopolysacchariden, die sich grünlich abzeichnen. Eine Kollagenvermehrung lag insbesondere in der Tunice media vor. Dies ist in der Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung an gelblichen Ablagerungen zu erkennen. Eine begleitende Kompaktierung der Tunica adventitia im Sinne einer Adventitia-Fibrose zeichnete sich bereits ab. Eine Entzündungsreaktion im Glomus caroticum ließ sich nicht beobachten.

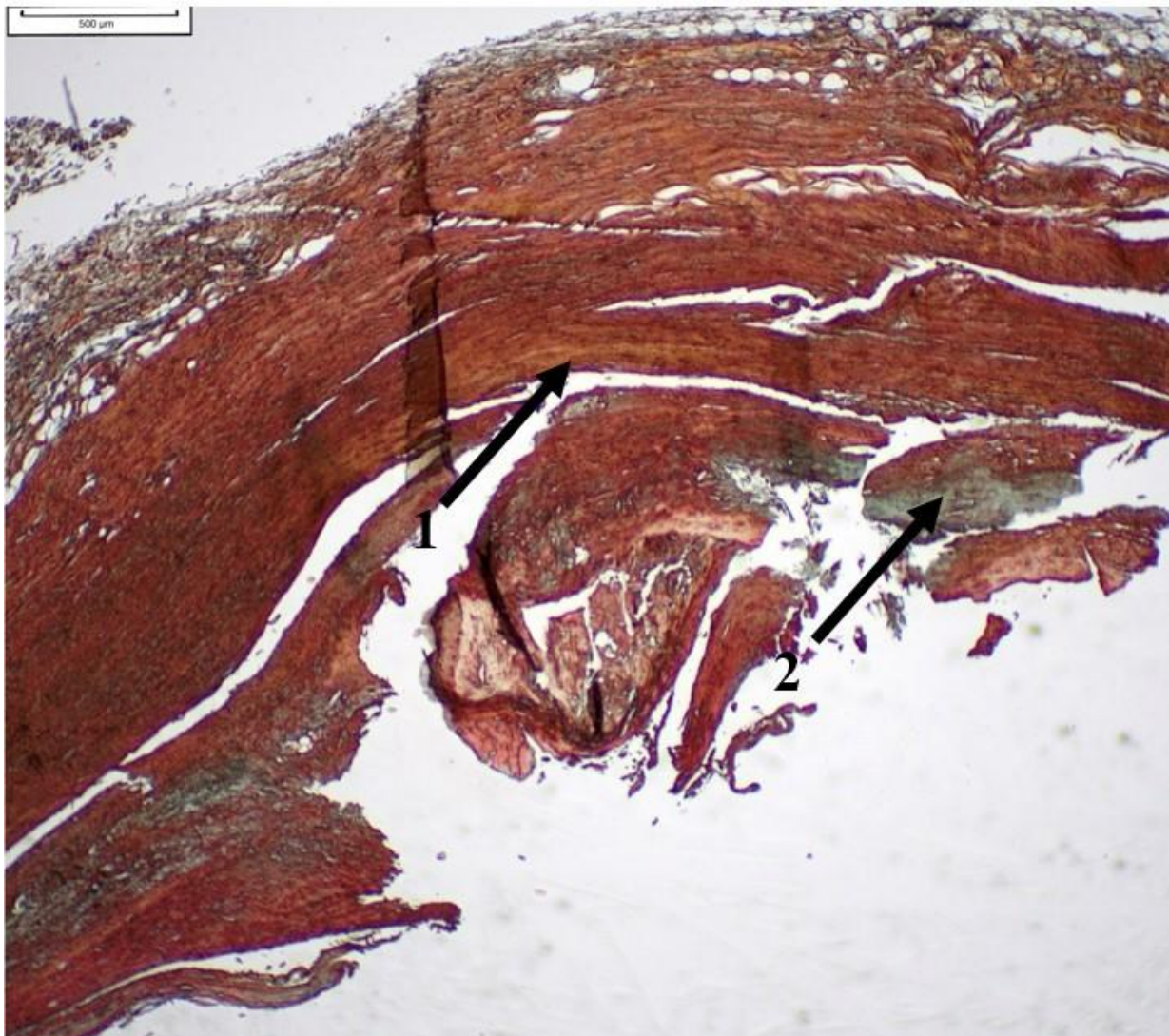


Abbildung 14: Foto einer degenerativ umgebauten A. carotis communis (Spender 6) in 20-facher Vergrößerung in der Movat-Pentachrom-Färbung. 1= Kollagenvermehrung, 2= Mucopolysaccharide

4.1.2 Befundung des Glomus caroticums

| Parameter | Spender 1 | Spender 2 | Spender 3 | Spender 4 | Spender 5 | Spender 6 |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Fibrose | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja |
| Atrophie | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja |
| Elastische Lamelle intakt | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein |
| Wabige Struktur | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein |
| Degenerierte Interlobararterie | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja |
| „dark cell“-Prominenz | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein |
| Inflammatorisches Infiltrat | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein |
| Lipofuszingranula | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein |

Tabelle 11: Befundung des Allgemeinzustands des Glomus caroticums.

Bei Spendern, bei denen die A. carotis communis am schwersten von Atherosklerose betroffen war, atrophierte das Glomus caroticum (Spender 4 und Spender 6). Das Glomus caroticum war lediglich als Rest ausgemauerter Kapillaren abgrenzbar. Haupt- oder Stützzellen fanden sich nicht mehr (siehe Abbildung 15). Daher waren die elastischen Lamellen der Gefäße auch nicht mehr intakt und es lagen keine „dark cell“-Prominenz oder Lipofuszingranula vor. Bei allen anderen Spendern konnten Lipofuszingranula als Hinweis für eine altersbedingte Degeneration nachgewiesen werden (Tabelle 11). Ein inflammatorisches Infiltrat war in keiner Probe zu beobachten. Das einzige Präparat mit einer „dark cell“-Prominenz zeigte auch ein wabig umstrukturiertes Glomus caroticum (Spender 2, Abbildung 16). Abbildung 17 zeigt ein Gefäß, welches wahrscheinlich der Versorgung des Glomus caroticums dient.

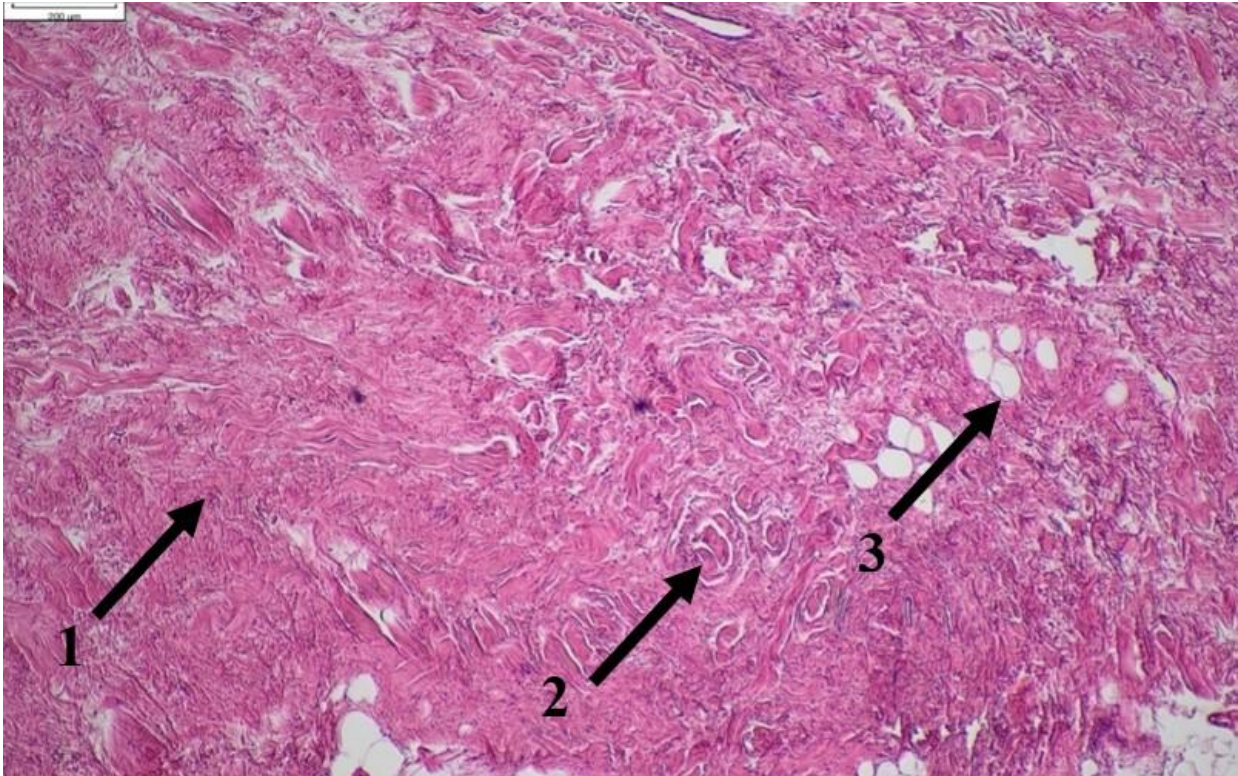


Abbildung 15: exemplarisches Foto eines atrophierten *Glomus caroticum*s (Spender 6) in 40-facher Vergrößerung in HE. Zwischen dem fibrotischen Bindegewebe finden sich nur noch vereinzelt Kapillaren. Diese erinnern nur noch an die ursprüngliche Struktur der glomeruloiden Lobuli. Das Gewebe ist durchsetzt mit einzelnen Fettvakuolen. 1= fibrotisches Bindegewebe, 2= okkludierte Kapillaren, 3=Fettvakuolen.

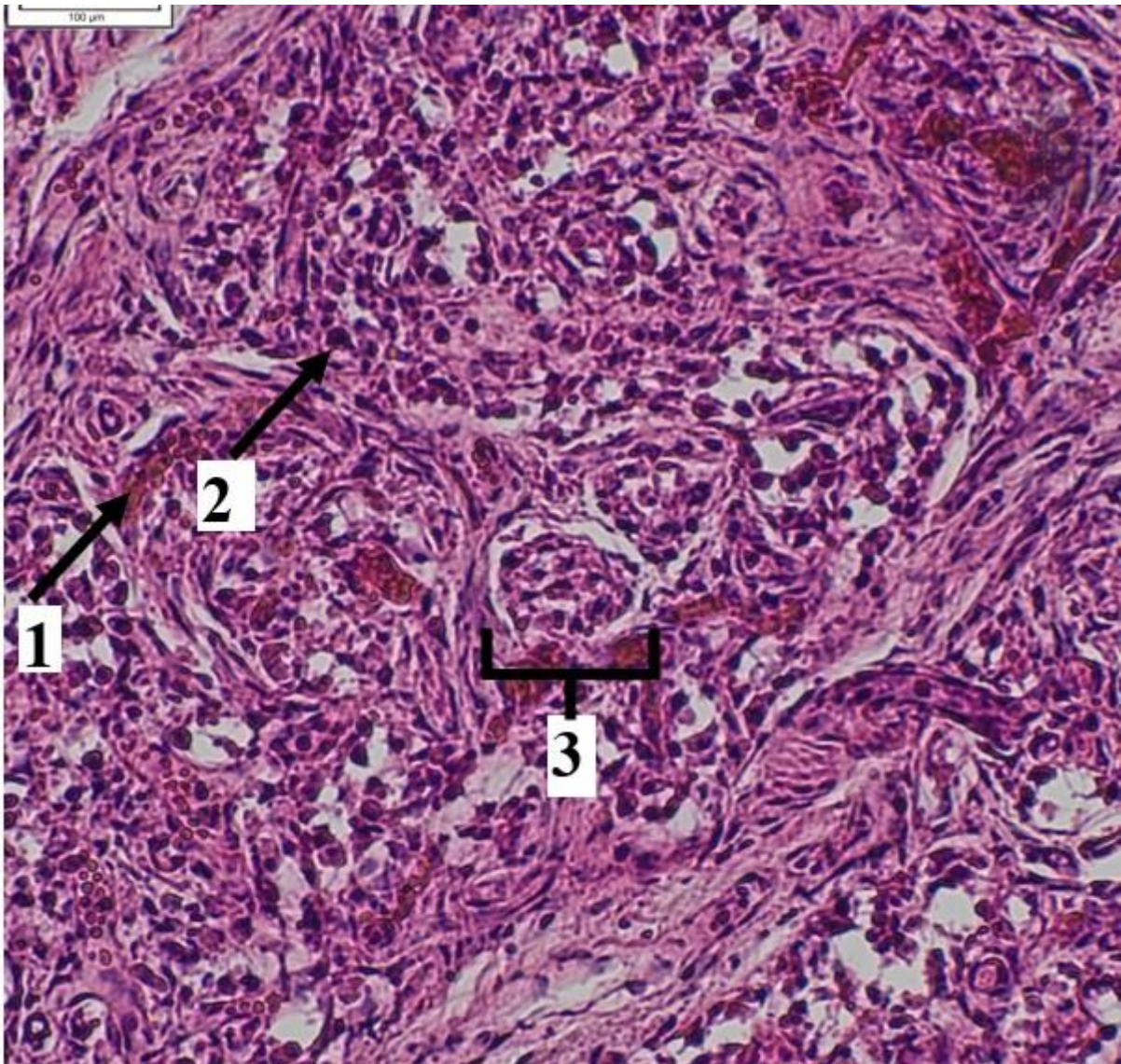


Abbildung 16: Ausschnitt eines Glomus caroticum (Spender 2) in 100-facher Vergrößerung in HE. Erkennbar sind typische Veränderungen des senilen Glomus caroticum wie die „dark cell“-Prominenz, das Vorkommen von Lipofuszingranula sowie der strukturelle Umbau in eine wabige Struktur. 1= Lipofuszingranula, 2= sogenannte „dark cell“-Prominenz, 3= wabige Struktur

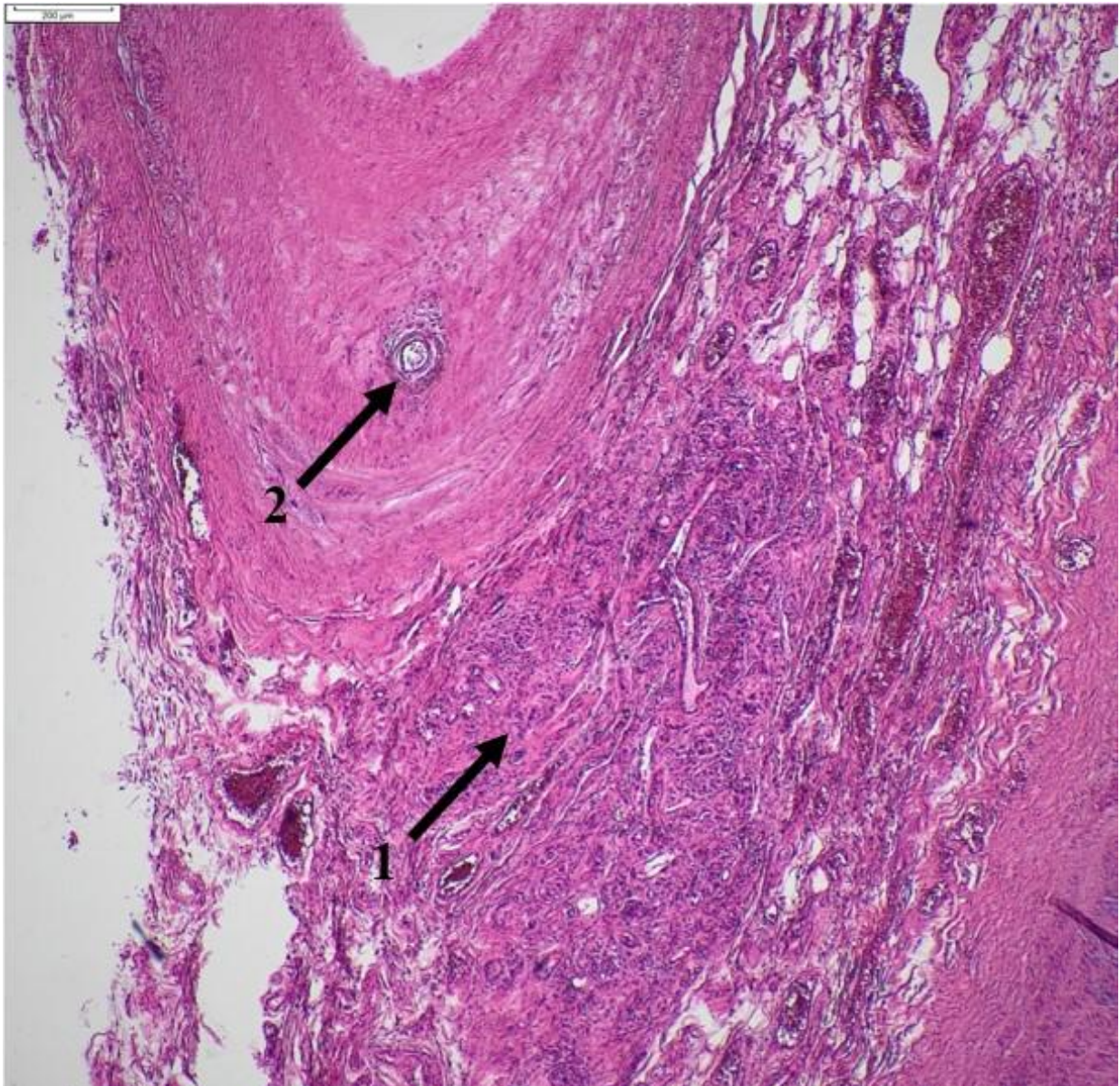


Abbildung 17: *Glomus caroticum* in der Karotisbifurkation (Spender 1) in 40-facher Vergrößerung in HE. Erkennbar ist außerdem der Gefäßanschnitt eines potenziellen Versorgungsgefäßes des *Glomus caroticum*s. 1= *Glomus caroticum*, 2= wahrscheinlich zuführendes Gefäß.

4.2 Histomorphometrie

Durch die starke Atrophie des Glomus caroticums bei Spender 4 und Spender 6 konnten dort keine histomorphometrischen Messungen durchgeführt werden. Die Abbildungen 18 bis 20 fassen die gemessenen Flächen, Breiten und Längen des jeweiligen Glomus caroticums zusammen.

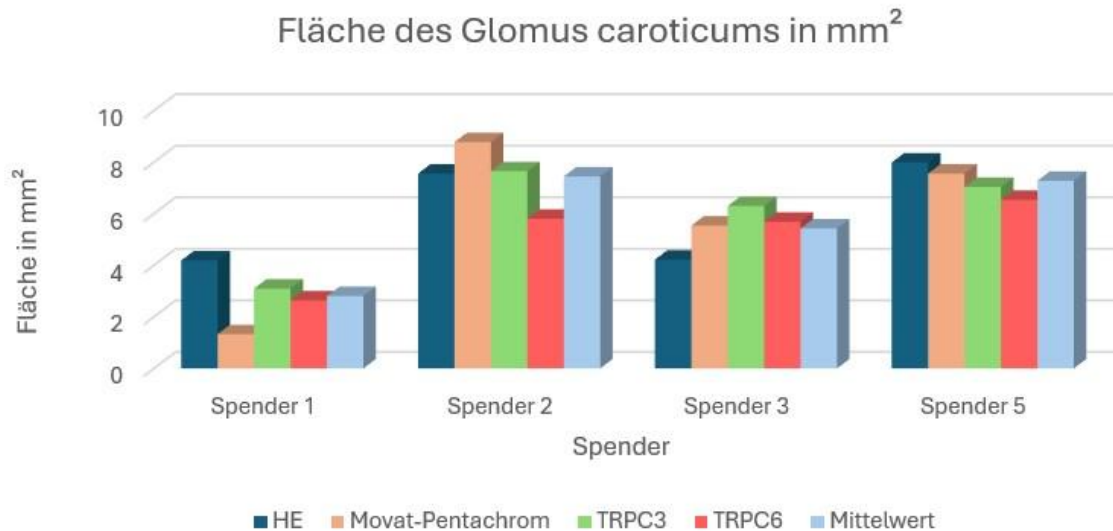


Abbildung 18: Die Graphik zeigt die Fläche des Glomus caroticums in mm² in allen Färbungen und den errechneten Mittelwert. Die x-Achse zeigt die Fläche und die y-Achse zeigt den Spender.

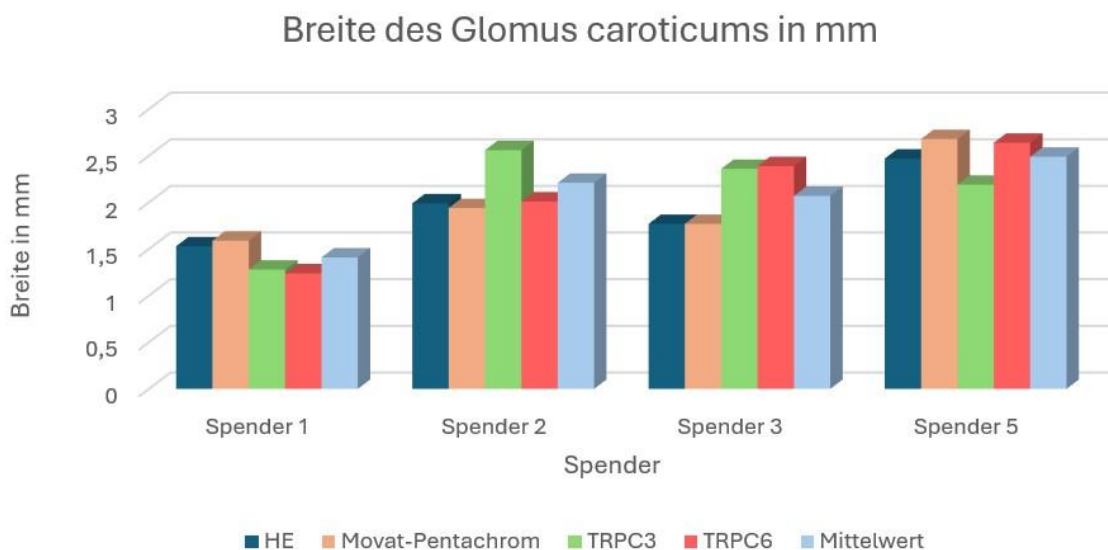


Abbildung 19: Die Graphik zeigt die Breite des Glomus caroticums in allen Färbungen und den errechneten Mittelwert. Die x-Achse zeigt die Breite, die y-Achse zeigt den Spender.

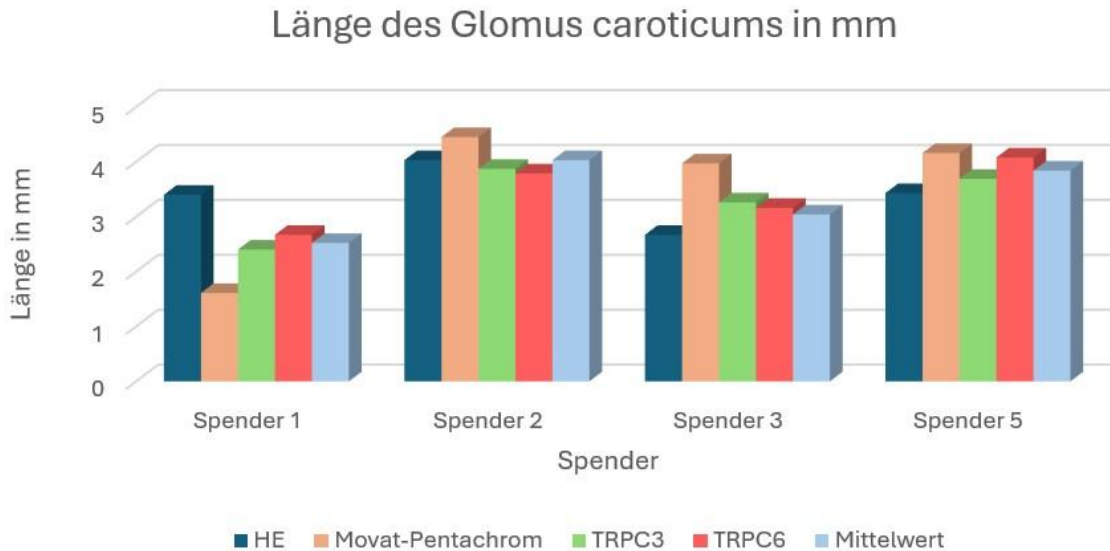


Abbildung 20: Die Graphik zeigt die Länge des Glomus caroticums in mm in den vier verschiedenen Färbungen und den dazu korrespondierenden Mittelwert. Die x-Achse zeigt die Länge in mm. Die y-Achse zeigt den Spender.

Die Flächen, Längen und Breiten variieren innerhalb der Präparate desselben Spenders. Dies ist darin begründet, dass jeder Schnitt einen anderen Teil des Glomus caroticums zeigt. Ähnlich verhält es sich mit der Anzahl der angeschnittenen Gefäßen (Abbildung 21).

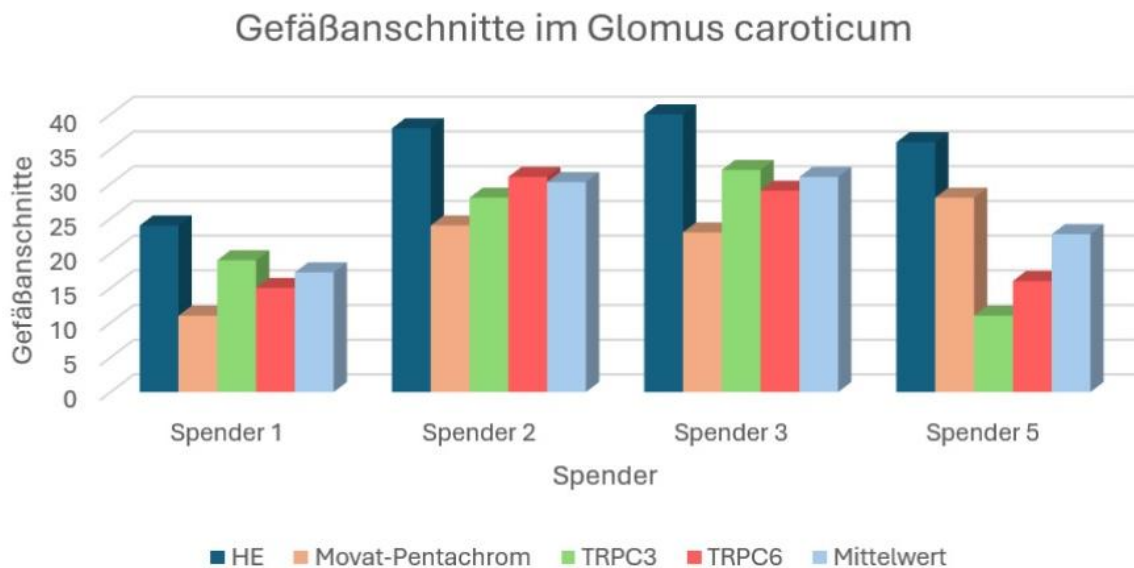


Abbildung 21: Die Graphik zeigt die Anzahl der Gefäßanschnitte im Glomus caroticum in den vier verschiedenen Färbungen und dem daraus resultierenden Mittelwert. Die x-Achse gibt die Anzahl der Anschnitte an, die y-Achse gibt den Spender an.

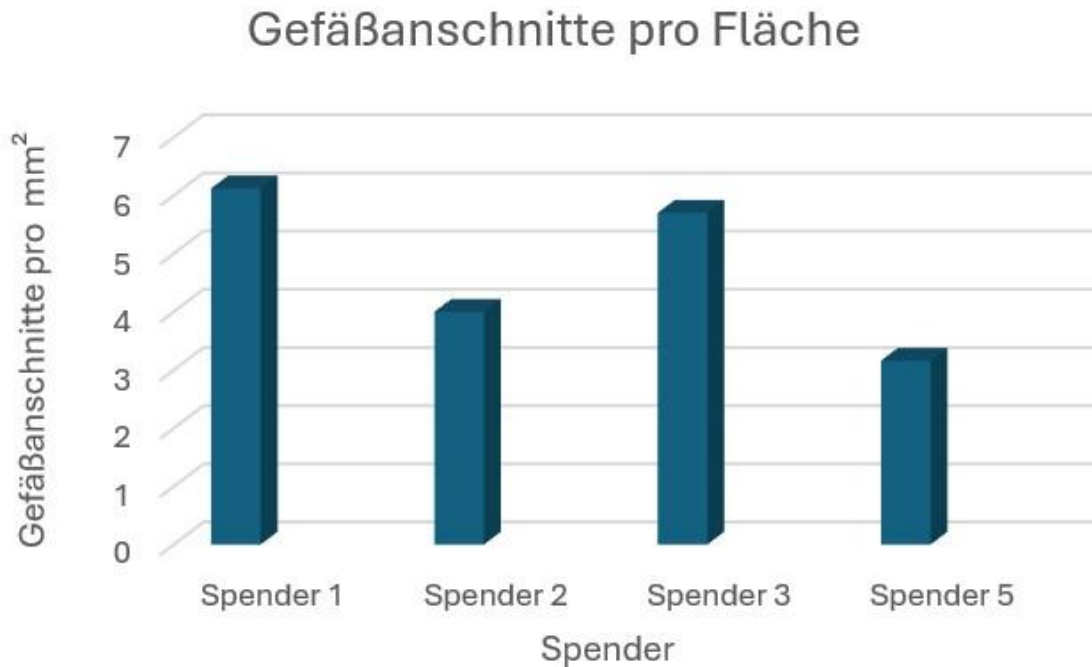


Abbildung 22: Dargestellt sind die Gefäßanschnitte pro mm² im Glomus caroticum der einzelnen Körperspender (Mittelwert der Anzahl der Gefäßanschnitte durch den Mittelwert der Fläche des Glomus caroticums in mm²). Die x-Achse repräsentiert die Gefäßanschnitte pro mm² und die y-Achse steht für den jeweiligen Körperspender.

Bei Spender 1 lagen die meisten Gefäßanschnitte pro Fläche vor. Bei diesem Spender war das Glomus caroticum nicht fibrotisch umgebaut. Spender 5 zeigte die wenigsten Gefäßanschnitte pro Fläche. Korrespondierend lag in diesem Glomus caroticum eine Fibrose bei interessanterweise intakten Interlobulararterien vor. Obwohl bei Spender 2 keine Fibrose erkennbar war, lag eine niedrigere Anzahl an Gefäßanschnitten pro Fläche als bei Spender 3 vor. Insgesamt wurde bei Spender 2 eine größere Fläche des Glomus caroticums als bei Spender 3 angeschnitten. Abbildung 23 verdeutlicht exemplarisch, wie die Zählung der Gefäßanschnitte durchgeführt wurde.

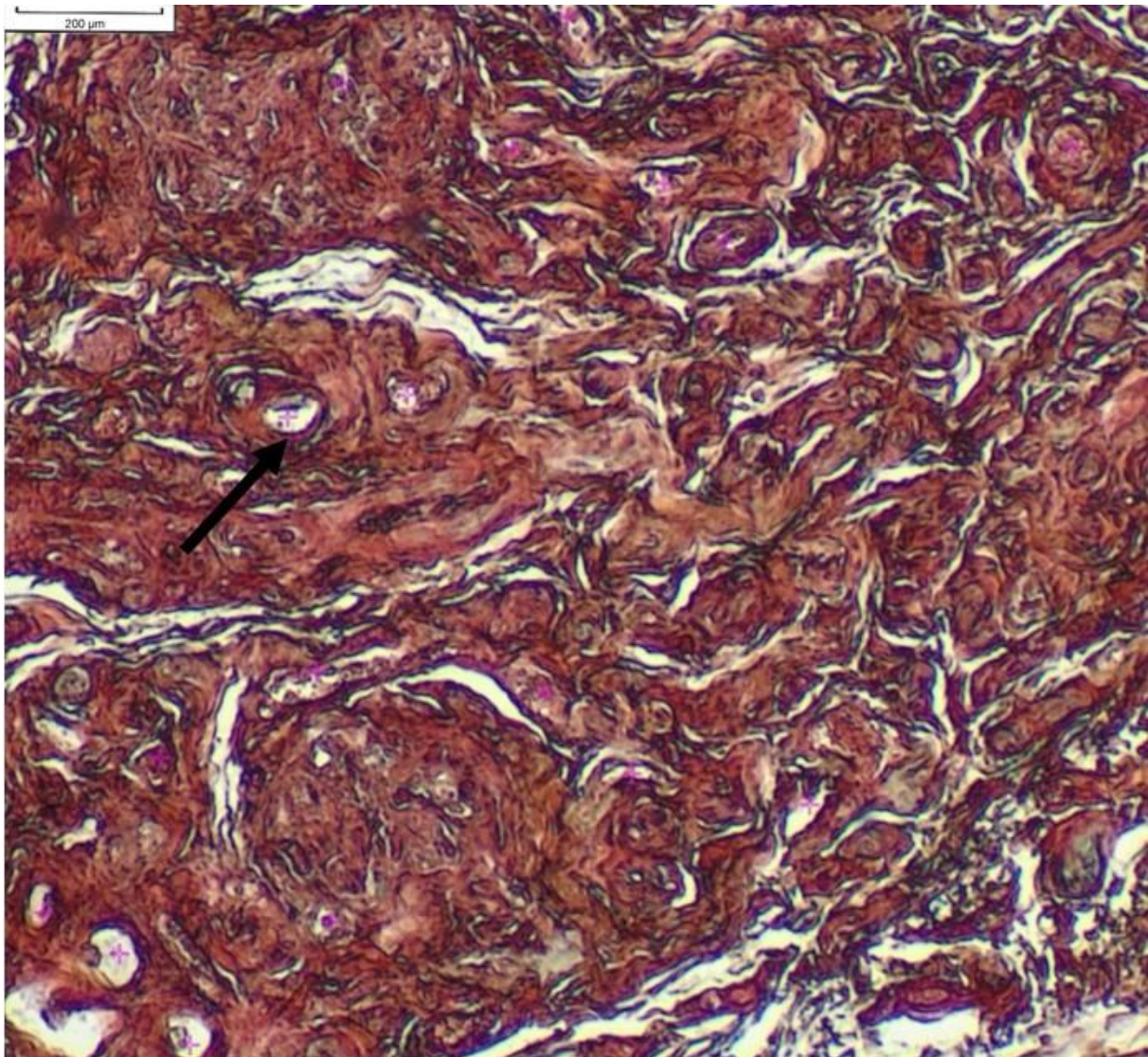


Abbildung 23: Exemplarischer Ausschnitt aus dem Glomus caroticum (Spender 5) in der Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung in 40-facher Vergrößerung. Im Rahmen der Zählung der Gefäßanschnitte wurden diese mittels rosafarbenen Kreuzen markiert (siehe unter anderem an der schwarzen Pfeilspitze)

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Semiquantitative Befundung

Aufgrund der exzessiven Fibrose bei Spender 4 und Spender 6 wurde von der semiquantitativen Befundung abgesehen, da die einzelnen untersuchten Strukturen in der Fibrose nicht sicher zu differenzieren waren.

TRPC3

Die Stärke des Hintergrundrauschens hing nach visuellem Eindruck eng mit der Stärke der Hauptzellfärbung zusammen (Abbildung 24). Das Hintergrundrauschen war immer eine Einheit niedriger als die Färbung der Hauptzellen. Außer bei dem ersten Spender zeigten die Kapillarwände starke Signale. Die Stützzellen färbten sich ähnlich deutlich wie der Hintergrund mit Ausnahme von Spender 5.

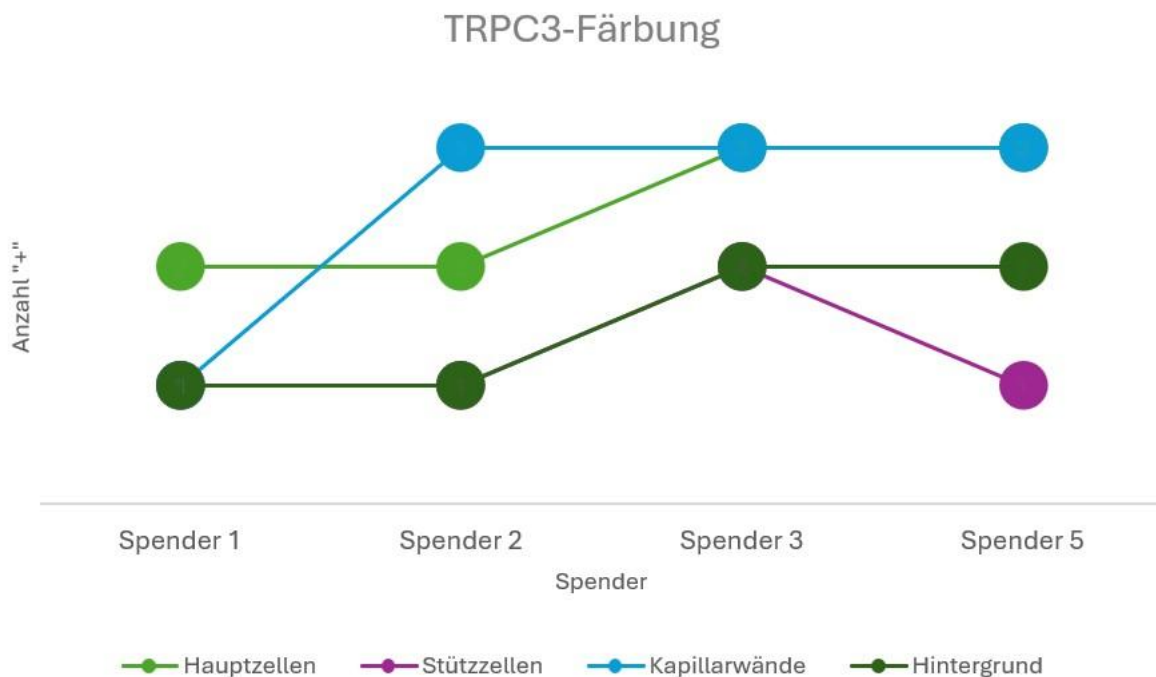


Abbildung 24: Graphik zur semiquantitativen Befundung der immunhistochemischen Färbung des TRPC3-Kanals. Die x-Achse zeigt die Anzahl der vergebenen „+“-Werte zwischen „+, ++ und +++“ zur Beschreibung der Farbtintensität. Die y-Achse repräsentiert die einzelnen Spender. Hintergrunds- und Stützzellfärbung sind bei Spender 1-3 gleich stark. Um dies hervorzuheben, überlagert der dunkelgrüne Graph (Hintergrundfärbung) dort den lila Graphen (Stützzellfärbung). Da die Stärke der Färbung des Hintergrunds und der Stützzellen nur bei Spender 5 differiert, ist nur dort ein separater lila Graph eingezeichnet. Ähnliches gilt für die Färbung der Kapillarwände und des Hintergrunds bei Spender 1.

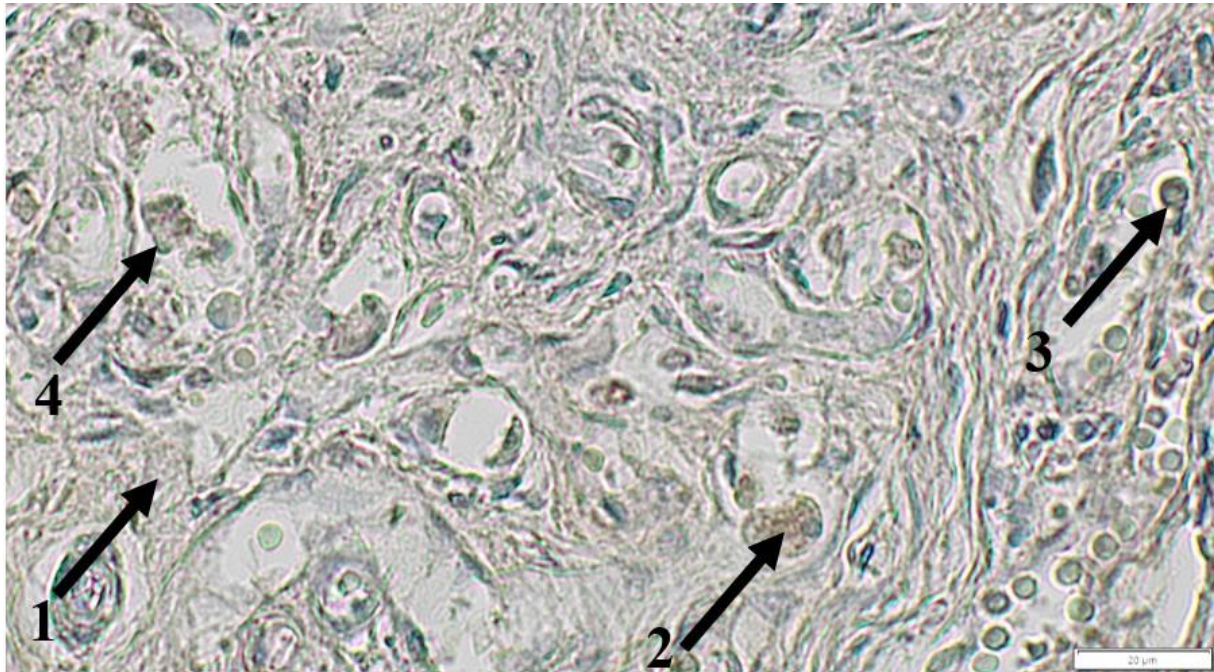


Abbildung 25: Exemplarischer Bildausschnitt der IHC (Spender 1) des TRPC3-Kanals in 400-facher Vergrößerung. Für Details zum deskriptiven Grading der Färbintensität siehe Abschnitt 3.11.3. Wie in den meisten untersuchten Schnitten zeigt sich eine geringe blassbräunliche Hintergrundfärbung (+) (siehe Pfeil 1). Gegen diese lassen sich klar umgrenzte, rundliche Ansammlungen moderater Braunfärbung (++) (siehe Pfeil 2) mit darin gelegentlichem Zellkern erkennen. Solche Formationen wurden als immunoreaktive Zellen gewertet. Daneben fanden sich durch Autolyse deutlich veränderte Zellen mit einer nur geringen blassbraunen Färbung (Pfeil 4). Die rundliche Form ist hier verloren gegangen, die Zelle erscheint insgesamt gesintert. Dennoch lässt sich ein exzentrisch gelagerter Kern abgrenzen. Zudem finden sich Erythrocyten in Blutgefäßen und Kapillaren. Diese zeigen häufig eine blassbraune Färbung (Pfeil 3), die teils nur schwer von falsch positivem, autolytisch veränderten Blut abzugrenzen ist. Für die vorgenommene deskriptive histomorphologische Auswertung der IHC wurden zur Vermeidung der Interferenz mit Artefakten lediglich klar (noch) morphologisch abgrenzbare Zellen (Pfeil 2) in Bezug zu der beobachteten Hintergrundfärbung (Pfeil 1) berücksichtigt. Für weitere Details zur Hintergrundfärbung siehe Absätze 3.5, 3.9, 3.11 und 5.2.5.

TRPC6

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen Befundung der IHC des TRPC6-Kanals. Auffällig war ein verringertes Hintergrundrauschen im Vergleich zur Färbung des TRPC3-Kanals. Die Stützzellen zeigten, wie schon bei TRPC3, kein über die unvermeidbare Hintergrundfärbung hinausgehendes Signal. Erneut waren die Kapillarwände und die Hauptzellen deutlicher gefärbt als andere Zellen.

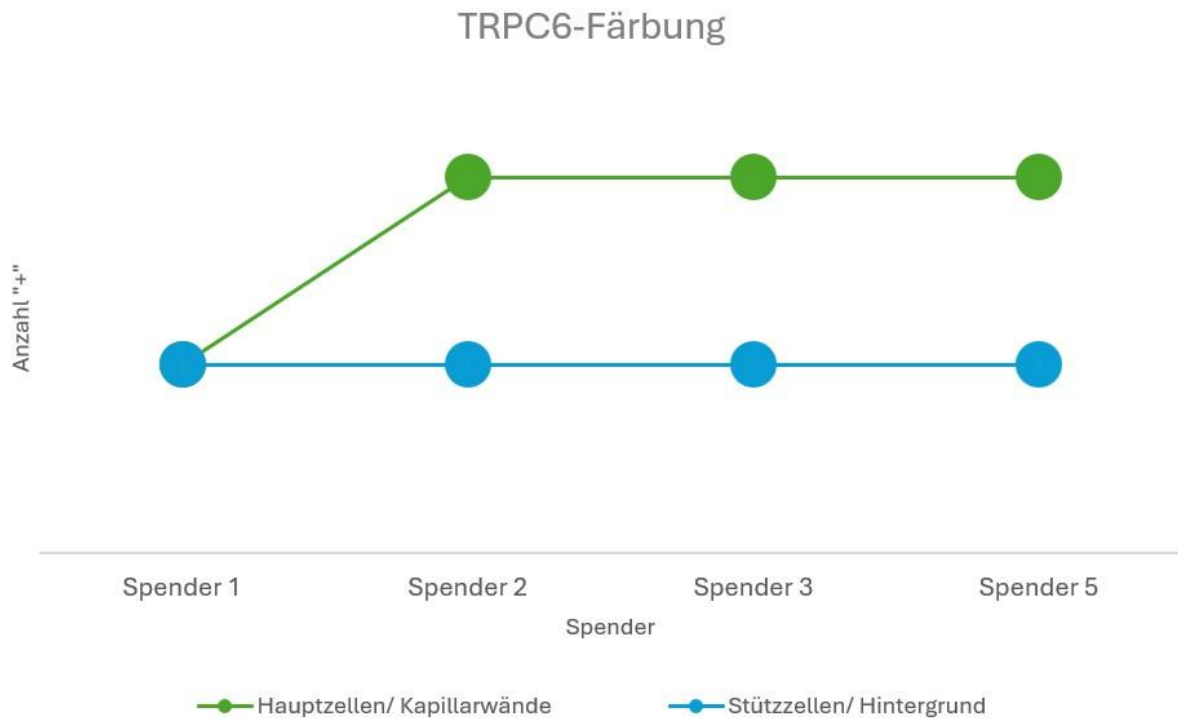


Abbildung 26: Graphik zur semiquantitativen Befundung der IHC des TRPC6-Kanals. Die x-Achse zeigt die Anzahl der vergebenen „+“-Werte zwischen „+, ++ und +++“ als subjektives Maß der Farbtintensität. Die y-Achse repräsentiert die einzelnen Spender. Da die Hauptzellen und die Kapillarwände sowie die Stützzellen und die Hintergrundfärbung jeweils gleich starke Signale aufwiesen, wurden diese Parameter in der Abbildung aus Übersichtsgründen zusammengefasst.

4.3.2 Densitometrie

Die Auswertung der densitometrischen Messungen lässt sich aus Abbildung 27 entnehmen. Für alle ausgewerteten Proben war ein Signal am oder über dem festgelegten Schwellenwert registrierbar. Abbildung 28 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt eines Glomus caroticums nach erfolgter IHC des TRPC3- bzw. TRPC6-Kanals.

Nur bei Spender 1 wurden mehr TRPC3-Signale erkannt als für TRPC6. Für Spender 4 und Spender 6 lagen ausgeprägte Degenerationen des Glomus caroticums vor, weshalb von einer densitometrischen Auswertung abgesehen wurde. Stattdessen wurde ein deskriptiver Ansatz histomorphologischer Kriterien gewählt.

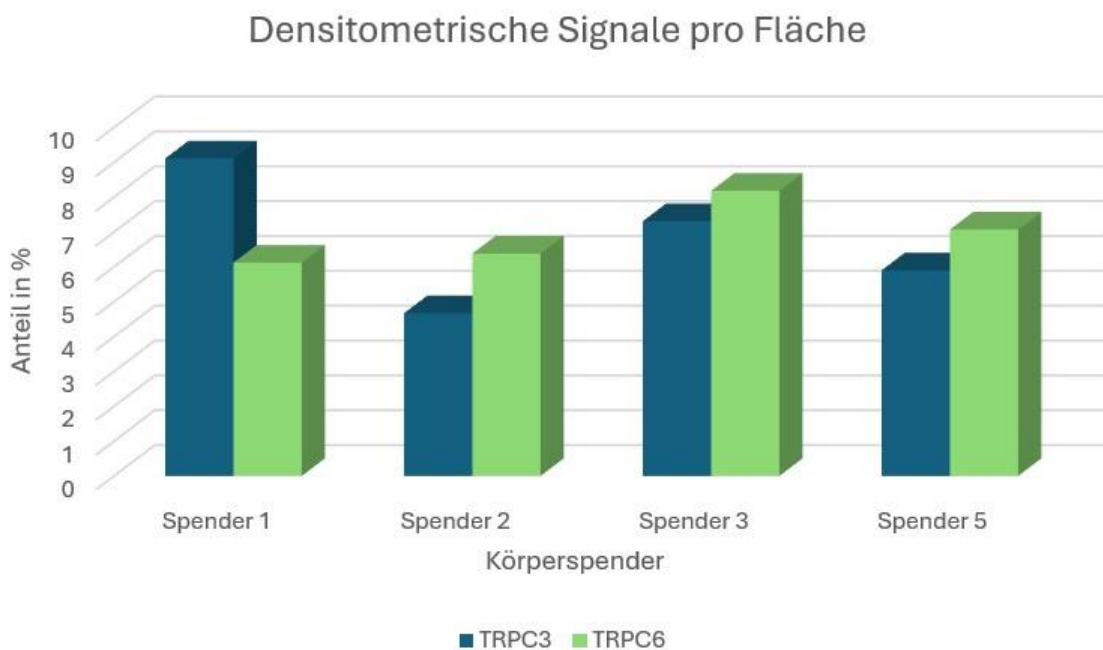


Abbildung 27: Die Mittelwerte der immunoreaktiven Flächen in der densitometrischen Messung wurden im Verhältnis zu der Gesamtfläche des High Power Fields gesetzt. Diese Berechnung wurde jeweils für die IHC der TRPC3- und TRPC6-Kanäle durchgeführt. Die x-Achse repräsentiert den prozentualen Anteil, wohingegen die y-Achse für je einen Spender steht. Für Spender 4 und Spender 6 wurde aufgrund fortgeschrittener Degeneration des Glomus caroticums keine Densitometrie durchgeführt.

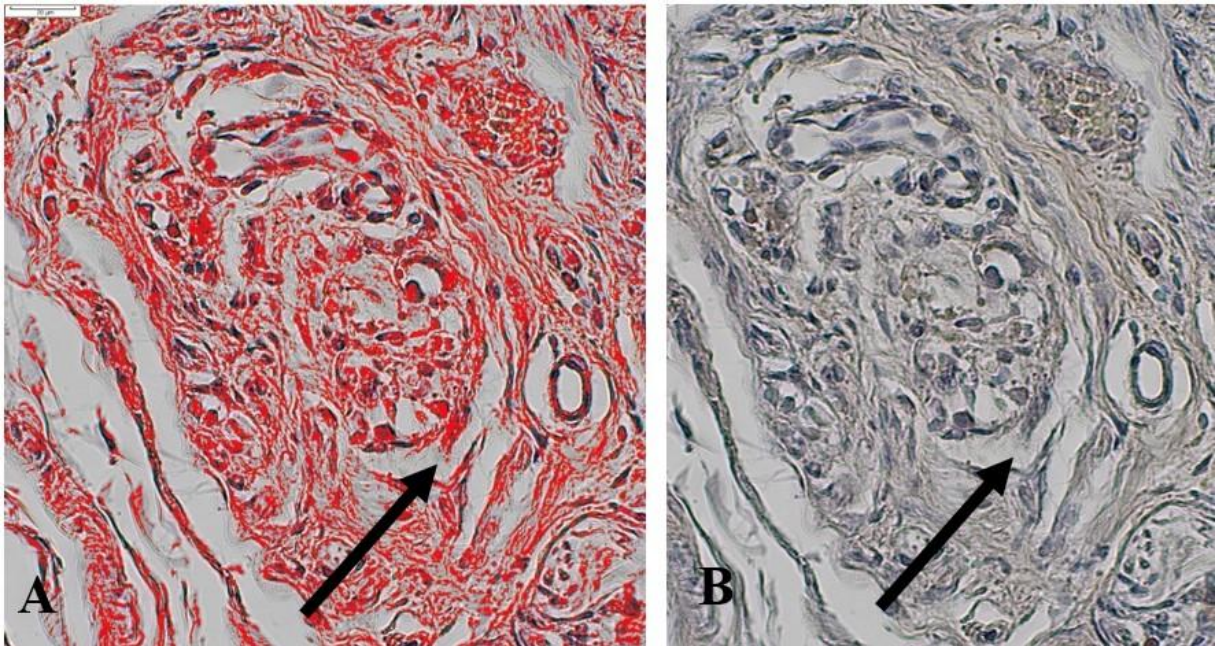


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der densitometrischen Auswertung bei Spender 2 in 400-facher Vergrößerung. Details zur Methode sind in Absatz 3.11.3 erläutert. Dargestellt ist die Schwellenwertuntersuchung (A) im Vergleich zur IHC von TRPC6 (B) mit Gegenfärbung in Hämatoxylin. Hervorzuheben ist, dass die Schwellenwertuntersuchung aufgrund einer etwaigen Hintergrundfärbung in einem sehr konservativen Ansatz durchgeführt wurde. (A) In rot markiert sind braune Farbtöne UNTERHALB der festgelegten Schwelle. Optisch leere Räume (zum Beispiel weiße Spalträume; siehe Pfeil) werden nach erfolgtem Weißabgleich von der Schwellenwertmessung nicht erfasst. Die tatsächlich als immunoreaktiv gewertete Fläche ist somit das Negativ der roten und weißen Areale, das heißt die dunkelbraunen Anteile des Gewebes OBERHALB der definierten Schwelle. Aufgrund des gewählten konservativen Ansatzes zur Auswertung werden nur kleine Flächen als sicher immunoreaktiv erkannt (vergleiche maximal etwa 8 % eines High Power Fields; Abbildung 27).

4.4 Negativkontrolle

Die Negativkontrollen der IHC für die TRPC3- und TRPC6-Kanäle wiesen, von der Gegenfärbung in Hämatoxylin abgesehen, keine Färbung auf. Die Negativkontrollen sind in den Abbildungen 29 und 30 exemplarisch dargestellt.

TRPC3

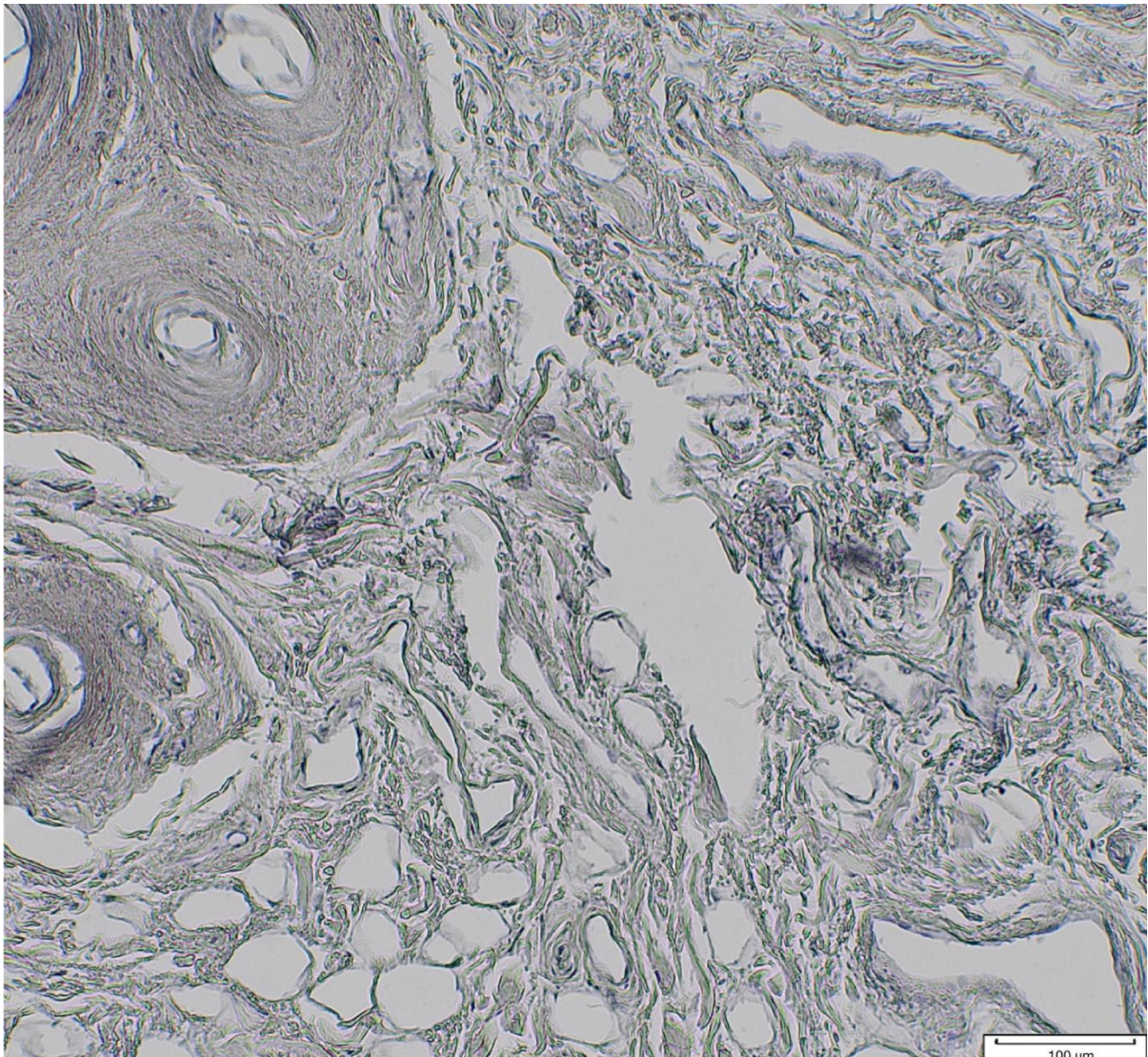


Abbildung 29: Foto der Negativkontrolle der IHC des TRPC3-Kanals in 100-facher Vergrößerung mit Gegenfärbung in Hämatoxylin (Spender 4). Es lassen sich keine von der Hintergrundfärbung zu unterscheidende Signale im fibrotisch degenierten Gewebe des Glomus caroticums in der Karotisbifurkation abgrenzen. Ein Spezifitätsnachweis wurde in der Arbeitsgruppe durchgeführt [30].

TRPC6

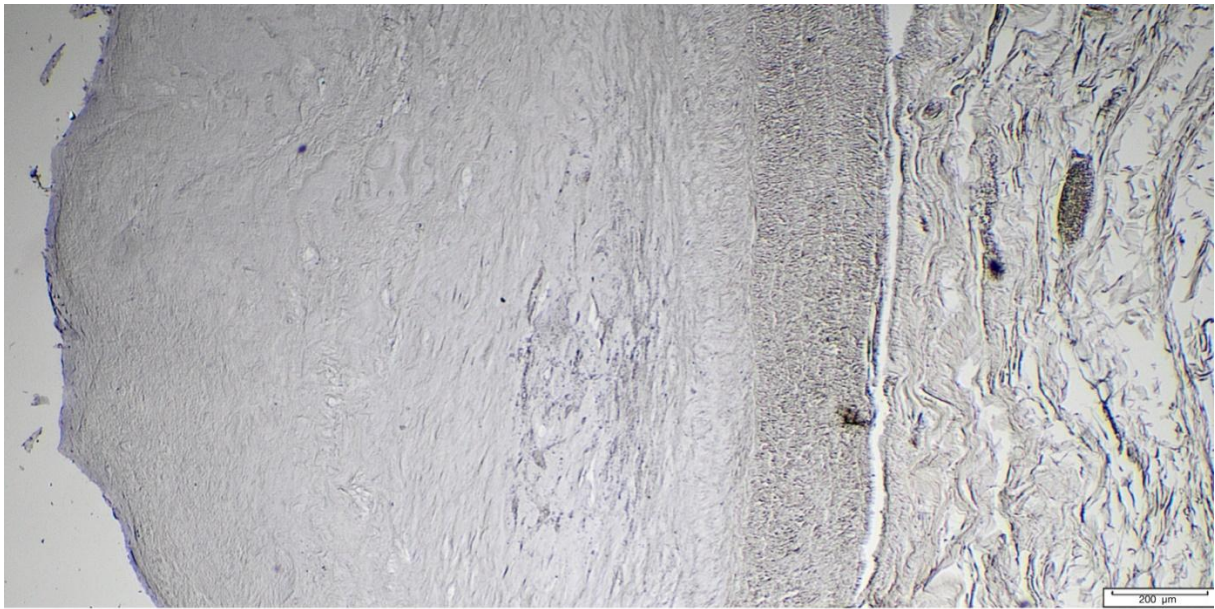


Abbildung 30: Foto der Negativkontrolle der IHC des TRPC6-Kanals in 40-facher Vergrößerung mit Gegenfärbung in Hämatoxylin (Spender 2). Dargestellt ist Gewebe der A. carotis communis. Über die Anfärbung durch Hämatoxylin hinaus ist kein Signal erkennbar. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde das Vorkommen von TRPC6 in der A. carotis communis bereits bestätigt. Weiter wurde in der selben Arbeit eine Negativkontrolle mittels Western Blot unter Verwendung des Blocking Peptids des Antikörperherstellers durchgeführt.[3]

5 Diskussion

Als Ziel dieser Arbeit sollte sowohl der TRPC3- als auch der TRPC6-Kanal immunhistochemisch im menschlichen Glomus caroticum nachgewiesen und dieses erstmals histomorphometrisch charakterisiert werden.

5.1 Beantwortung der Fragestellung

Das Glomus caroticum ließ sich in allen vier durchgeführten Färbungen trotz postmortalen Artefakte (beispielsweise Autolyse) und Fixierungsartefakte darstellen. Darüber hinaus konnten beide Kanäle im humanen Glomus caroticum nachgewiesen werden. Die densitometrische Messung erlaubte eine orientierende Quantifizierung der immunreaktiven Fläche. Bei drei der vier Körperspendern war für TRPC6 mehr Fläche immunreaktiv als für TRPC3. Weiterhin ließ die IHC verschiedene Lokalisationen differenzieren: Hauptzellen und Endothelzellen färbten sich deutlich, wohingegen sich Stützzellen sowie das umgebende Bindegewebe sich nicht übermäßig abhoben. Eine morphometrische Untersuchung war in vier von sechs Fällen durchführbar. In zwei Fällen erfolgte aufgrund fortgeschrittener Atrophie beziehungsweise Fibrose keine morphometrische Auswertung. In diesen Fällen waren die Glomerula durch weitreichende Umbauvorgänge nur noch schemenhaft abzugrenzen. Parallel zeigte sich in beiden Fällen eine schwere atherosklerotische Degeneration der A. carotis communis. Bei Körperspendern mit einem fibrotisch umgebauten aber noch nicht atrophierten Glomus caroticum (Spender 3 und 5) fanden sich zum Teil degenerierte Interlobararterien (Spender 3). Die Fibrose könnte daher auf eine Minderperfusion zurückzuführen sein.

Bereits beschriebene Befundungsschemata des Umbaus des Glomus caroticums konnten reproduziert werden. Diese degenerativen Prozesse äußern sich als sogenannte „dark cell prominence“, lymphozytisches Infiltrat und Fibrose [44] beziehungsweise durch das Auftreten von Lipofuszingranula [26] und durch einen wabenförmigen Umbau [115] in den untersuchten Proben.

5.2 Limitationen

5.2.1 Fixiermedium

Von den sechs untersuchten Körperspendern wurden zwei Spender mittels Formaldehyd und vier Spender mittels NEP fixiert. Die Fixierung soll postmortalen Degeneration und dem damit einhergehenden flächigen Verfall Einhalt gebieten. Die hier verwendeten Fixierungsmedien konservieren Zielstrukturen unterschiedlich gut. Formaldehyd bildet quervernetzende Brücken mit Aminogruppen aus. In Gegenwart von Wasserstoff kommt es zusätzlich zu einer ungewollten Ausbildung von Methylbrücken [83]. Dies führt zu einer Maskierung der Antigene, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion erschwert. Um diesen Effekt entgegenzuwirken, wurde eine Demaskierung mit einem Citratpuffer durchgeführt.

Je nach untersuchtem Gewebe und Antikörper kann die NEP-Fixierung stärkere Signale der IHC hervorrufen. Der genaue Wirkmechanismus der NEP-Fixierung ist noch nicht ausreichend untersucht, es wird jedoch eine Hemmung des enzymatisch bedingten Abbaus von Proteinen diskutiert. Vor allem die Konservierung von Desoxyribonukleinsäuren und Ribonukleinsäuren ist mittels Fixierung nach Weigner der Fixierung in Formaldehyd überlegen. [54]

5.2.2 Mikrotomie

Das Glomus caroticum histologisch darzustellen, kann schwierig sein, insbesondere, wenn es makroskopisch nicht einwandfrei abzugrenzen ist. Die Abgrenzung war bei den Körperspendern makroskopisch nicht sicher möglich. Dies liegt einerseits an der geringen Größe des Glomus caroticums und andererseits an der teilweise vorliegenden Atrophie und Fibrose. Daher erfolgte die eigentliche Identifikation der anatomischen Struktur erst durch die Anfertigung der Schnitte.

Das hohe Alter der Körperspender machte eine Entkalkung des Gewebes erforderlich. Dies führte zu erhöhter Gewebeporosität, erschwerte die Mikrotomie und führte damit zu Schnittartefakten. Aufgrund dessen konnten keine Serienschnitte angefertigt werden, die ideal gewesen wären, um das Organ in Gänze zu beschreiben.

5.2.3 Verifizierung der Antikörper

Zur Verifizierung der Antikörper gegen den TRPC3- und den TRPC6-Kanal wurde auf vorherige Untersuchungen der Arbeitsgruppe zurückgegriffen. Neben einer eigenen Spezifitätskontrolle wäre zukünftig eine Verifizierung der Ergebnisse mit einem Antikörper gegen den TRPC3- und TRPC6-Kanal eines anderen Herstellers denkbar.

Da es sich bei den verwendeten Antikörpern um polyklonale Antikörper handelt, sollte die genaue Abgrenzbarkeit gegeneinander thematisiert werden. Die IHC mit monoklonalen Antikörpern hingegen kann leichter ein falsch-negatives Ergebnis erzeugen, falls das Ziel-Epitop durch die Konservierung maskiert wurde. Da polyklonale Antikörper nicht nur gezielt an einem einzelnen Epitop binden, kann trotz Maskierung eine ausreichende Reaktion stattfinden. Nachteilig tritt jedoch eine stärkere Hintergrundfärbung auf und die Spezifität ist niedriger. [71]

Die verwendeten Antikörper binden an unterschiedlichen Aminosäureresten. Beide Antikörper sind für den Gebrauch an menschlichem Gewebe getestet. Der Antikörper gegen den TRPC3-Kanal richtet sich gegen die Aminosäurereste 822-835 des intrazellulären C-Terminus des Kanals der Maus [118]. Der Antikörper gegen den TRPC6-Kanal hingegen richtet sich gegen die Aminosäurerest 24-38 des intrazellulären N-Terminus des Kanals der Maus [119].

5.2.4 Studienkollektiv und Kontrollgruppe

Es erfolgte keine vollständige Autopsie der Körperspender. Lediglich die Informationen laut Todesbescheinigungen lagen vor und sind in Tabelle 4 aufgeführt. Daher können keine Rückschlüsse etwaiger Einflussfaktoren der Krankengeschichte gezogen werden, beispielsweise Effekte einer Radiatio im Halsbereich.

Des Weiteren liegt eine limitierte Fallzahl vor. Durch unvollständige Probenreihen verkleinerte sich das Kollektiv von ursprünglich elf auf sechs auswertbare Körperspender. Daher ist keine Generalisierbarkeit der Befunde gestattet. Zudem wurde aufgrund der geringen Fallzahl ein deskriptiver Ansatz gewählt. Deduktive Analysen zum Ableiten von Hypothesen waren mit der geringen Fallzahl nicht möglich. Es sei jedoch erwähnt, dass es sich bei dieser Arbeit um eine erste explorative Untersuchung der TRPC3- und TRPC6-Kanäle im humanen Glomus caroticum handelt. Ziel war zunächst der generelle Nachweis der Kanäle.

Zudem umfasst die vorliegende Arbeit keine Kontrollgruppe. Dies ergibt sich daraus, dass kein Zugang zu Gewebe des Glomus caroticums junger, gesunder Menschen besteht. In zukünftigen Studien könnte ein Vergleich älterer, multimorbider Körperspenden mit jüngeren, kranken Individuen angestrebt werden, um spezifische Altersveränderungen des Glomus caroticums weiter zu charakterisieren.

5.2.5 Artificielle Veränderungen des untersuchten Gewebes

Die untersuchten Gewebeproben stammen aus Körperspenden, die postmortal fixiert wurden. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, lag ein postmortales Intervall zwischen 26 und 81 Stunden bis zur Fixierung vor. In dieser Zeit findet bereits Autolyse, insbesondere stoffwechselaktiver Zellen wie endokriner Organe, in relevantem Ausmaß statt. Festgestellte Gefäßdegenerationen (vergleiche Absätze 3.5 und 4.1) und postmortale Thromben führen dazu, dass die Perfusionslösung nicht sicher alle Glomerula in der Karotisbifurkation erreicht. Die fortschreitende Autolyse betrifft auch das Glomus caroticum und ist ein möglicher Grund dafür, dass sich ganze Zellen und keine distinkten Zellkompartimente in der IHC immunoreaktiv zeigten. Ein weiterer Grund hierfür dürfte die limitierte sterische Auflösung der Färbung mittels DAB, das heißt der Markierung eines Epitops durch eine Polymerreaktion, sein.

Sowohl die Polymerreaktion als auch die Autolyse sind mögliche Gründe für die beobachtete Hintergrundfärbung. Des Weiteren könnte die zeitaufwändige Entkalkung des Gewebes dazu beitragen. Aufgrund starker Gefäßverkalkungen der untersuchten Körperspender dauerte die Vorbereitung der Mikrotomie etwa 8 Wochen. In dieser Zeit wirkte EDTA auf das unfixierte Gewebe und alterierte dieses. Die geschilderte Problematik führte zu vergleichsweise starker Hintergrundfärbung trotz Auswahl der eingesetzten Antikörperkonzentrationen in einer Verdünnungsreihe (vergleiche Abschnitt 3.9).

5.3 Kontextualisierung mit vorhandenen Studien

Im Glomus caroticum der Ratte konnten bereits beide Kanäle in den Glomuszellen Typ I sowie in den Nervenfasern des Nervus sinus caroticus nachgewiesen werden [16]. Das Ergebnis der erfolgten Literaturrecherche zeigte, dass bislang noch keine Studien zur Verteilung der TRPC3-beziehungsweise TRPC6-Kanäle im humanen Glomus caroticum vorliegen.

Des Weiteren wurde bislang noch keine kombinierte histomorphometrische und histomorphologische Untersuchung des humanen Glomus caroticums durchgeführt. Mehrere Untersuchungen des senilen Glomus caroticums liegen bereits vor [79], [23], [44], [115]. Andere Arbeiten verglichen altersbedingte Veränderungen mit denen unter chronischer Hypoxie [59]. Bei 30 % der 70-Jährigen liegt eine chronische Glomitis vor [39]. Zu pathologischen Veränderungen aufgrund einer körpereigenen Gegenregulation kommt es auch bei obstruktiver Schlafapnoe, Herzinsuffizienz oder essentieller Hypertonie [82]. Die erhöhte Sensitivität in Folge dessen wird als prognostisch ungünstiger Faktor bei chronischer

Herzinsuffizienz angesehen [81]. Eine Hyperplasie des Glomus caroticum kann auch eine Folge von Umwelteinflüssen, wie dem dauerhaft erniedrigten Sauerstoffpartialdruck bei Bewohnern von Höhenregionen, sein [6]. Da Sauerstoffmangel ein Faktor in der Tumorgenese von Paragangliomen ist, weisen Höhenbewohner einer erhöhte Inzidenz auf [90].

Aufgrund der Beteiligung des Glomus caroticum in verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wird eine Ablation für spezielle Krankheitsbilder diskutiert. Bei Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz konnte bei frühzeitiger Ablation kardiale Arrhythmien und eine Verschlechterung der linksventrikulären Ejektionsfraktion vermindert werden [25].

Gerade in den letzten Jahren rückte die Gruppe der TRP-Kanäle in den Fokus von Forschungsarbeiten. Da TRPC-Kanäle an der Funktion des kardiovaskulären Systems beteiligt sind, sollte ihre Rolle im Glomus caroticum weiter untersucht werden [19]. Manche Autoren bezeichnen TRP-Kanalopathien als eigenen Krankheitstypus [70]. Ihre Rolle im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen ist bereits mehrfach beschrieben. So kann die kombinierte Unterdrückung von TRPC3- und TRPC6-Kanälen in Kardiomyozyten kardiale Hypertrophie bei erhöhter mechanischer Belastung des Herzmuskels vermindern [89]. Zu dem kann eine verminderte Expression des TRPC3-Kanals durch Atherosklerose beigeführte Nekrosen verringern [97]. Untersuchungen am Glomus caroticum der Ratte, bei der eine Blockade durch den TRP-Kanal-Antagonisten 2-APB herbeigeführt wurde, resultierten in einer signifikanten Senkung der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Ausschüttung [51].

5.4 Schlussfolgerungen

TRPC3- und der TRPC6-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen und werden daher als therapeutische Ansatzpunkte diskutiert. Um TRPC3 und TRPC6 im humanen Glomus caroticum als pharmazeutisches Target nutzen zu können, sind weiterführende Untersuchungen zwangsläufig notwendig. In dieser Arbeit wurde explorativ das Vorkommen und die Verteilung der Proteinexpression der Kanäle untersucht. Die Signale für TRPC3 und TRPC6 hoben sich deutlich von der Hintergrundfärbung ab und zeigten sich primär in den Haupt- sowie Endothelzellen. Ein nächster Schritt wäre beispielsweise die Untersuchung der Lokalisation der Kanäle auf intrazellulärer Ebene durch konfokale Mikroskopie.

Im hochgradig degenerierten Glomus caroticum (Spender 4 und 6) konnte keine klare Signalauswertung stattfinden. An einem größeren Studienkollektiv könnte untersucht werden, wie sich einzelne Degenerationsstadien des Glomus caroticums auf die Expression der Kanäle auswirken. Das gleichzeitige Vorkommen von Degenerationen des Glomus caroticums und Atherosklerose suggeriert möglicherweise einen kausalen Zusammenhang. Weitere Untersuchungen an einem größeren Studienkollektiv sowie des Pathomechanismus sind jedoch erforderlich. Gegebenenfalls ließen sich hieraus weitere therapeutische Ansatzpunkte unabhängig der TRPC-Kanäle ableiten.

Das vermehrte Vorkommen von TRPC3 und TRPC6 in den Hauptzellen im Vergleich zu den Stützzellen kann ein Hinweis auf den Einfluss von TRPC3 und TRPC6 für deren Funktion sein. Die Blockade von TRP-Kanälen bei Ratten senkt die Hypoxie-induzierte Ca^{2+} -Ausschüttung [51]. Daher könnten die TRPC3- und TRPC6-Kanäle möglicherweise zu der Hypoxie-bedingten Sekretion der Hauptzellen beitragen. Der weitere Einfluss könnte im Experiment der kardiovaskulären Funktion von knock-out Tieren untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdel-Magied EM, King AS (1978) The topographical anatomy and blood supply of the carotid body region of the domestic fowl. *J Anat* 126:535–546
2. Abdinghoff J, Servello D, Jacobs T, Beckmann A, Tschernig T (2022) Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry. *Biomed Rep* 16:42
3. Abdinghoff JJJ, Abdinghoff J (2022) Der nicht-selektive Kationenkanal TRPC6 in menschlichen Gefäßen. Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek URL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/37083>
4. AbouAlaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, Jones TJ, Ratnam S, Kolb RJ, Nauli SM (2009) Ciliary Polycystin-2 Is a Mechanosensitive Calcium Channel Involved in Nitric Oxide Signaling Cascades. *Circ Res* 104:860–869
5. Álvarez-Miguel I, Ciudad P, Pérez-García MT, López-López JR (2017) Differences in TRPC3 and TRPC6 channels assembly in mesenteric vascular smooth muscle cells in essential hypertension. *J Physiol* 595:1497–1513
6. Arias-Stella J, Valcarcel J (1976) Chief cell hyperplasia in the human carotid body at high altitudes; physiologic and pathologic significance. *Hum Pathol* 7:361–373
7. Asghar MY, Törnquist K (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels as Modulators of Migration and Invasion. *Int J Mol Sci* 21:1739
8. Atala A (2018) Re: Vitamin D3 Prevents Calcium-Induced Progression of Early-Stage Prostate Tumors by Counteracting TRPC6 and Calcium Sensing Receptor Upregulation. *J Urol* 199:1115–1116
9. Bassi MT, Manzoni M, Monti E, Pizzo MT, Ballabio A, Borsani G (2000) Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin-and identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV. *Am J Hum Genet* 67:1110–1120
10. Bautista D, Siemens J, Glazer J, Tsuruda P, Basbaum A, Stucky C, Jordt S-E, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environment cold. *Nature* 448:204–8

11. Benot AR, López-Barneo J (1990) Feedback Inhibition of Ca²⁺ Currents by Dopamine in Glomus Cells of the Carotid Body. *Eur J Neurosci* 2:809–812
12. Birnbaumer L (2009) The TRPC Class of Ion Channels: A Critical Review of Their Roles in Slow, Sustained Increases in Intracellular Ca²⁺ Concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:395–426
13. Biscoe TJ, Pallot D (1972) Serial reconstruction with the electron microscope of carotid body tissue. The type I cell nerve supply. *Experientia* 28:33–34
14. Boda VK, Yasmen N, Jiang J, Li W (2024) Pathophysiological significance and modulation of the transient receptor potential canonical 3 ion channel. *Med Res Rev* 44:2510–2544
15. Buckler KJ (2015) TASK channels in arterial chemoreceptors and their role in oxygen and acid sensing. *Pflugers Arch* 467:1013–1025
16. Buniel MCF, Schilling WP, Kunze DL (2003) Distribution of transient receptor potential channels in the rat carotid chemosensory pathway. *J Comp Neurol* 464:404–413
17. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824
18. Chatyingmongkol K, Roongruangchai J (2003) Histology of the carotid body.
19. Chen X, Sooch G, Demaree IS, White FA, Obukhov AG (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* 9:1983
20. Chen Y, Zhang X, Yang T, Bi R, Huang Z, Ding H, Li J, Zhang J (2019) Emerging structural biology of TRPM subfamily channels. *Cell Calcium* 79:75–79
21. Cheng W, Sun C, Zheng J (2010) Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell* 1:802–810
22. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57:427–450
23. Colsoul B, Nilius B, Vennekens R (2013) Transient receptor potential (TRP) cation channels in diabetes. *Curr Top Med Chem* 13:258–269

24. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224:285–287
25. Del Rio R, Marcus NJ, Schultz HD (2013) Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. *J Am Coll Cardiol* 62:2422–2430
26. Di Giulio C (2018) Ageing of the carotid body. *J Physiol* 596:3021–3027
27. Dietrich A, Schnitzler MM y, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T (2003) N-Linked Protein Glycosylation Is a Major Determinant for Basal TRPC3 and TRPC6 Channel Activity *. *J Biol Chem* 278:47842–47852
28. Drenckhahn D, Asan E, Herausgeber (2004) *Anatomie. 2: Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut* / hrsg. von Detlev Drenckhahn. Unter Mitarb. von Esther Asan. 16., völlig neu bearb. Aufl edition. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore
29. Ehling P, Bittner S, Meuth S, Budde T (2015) TASK, TREK & Co.: Eine wandelbare Kalium-Kanalfamilie für diverse Aufgaben im Gehirn. *Neuroforum* 21:43–52
30. Englisch CN, Steinhäuser J, Wemmert S, Jung M, Gawlitza J, Wenzel G, Schick B, Tschernig T (2023) Immunohistochemistry Reveals TRPC Channels in the Human Hearing Organ : A Novel CT-Guided Approach to the Cochlea.
31. Federspiel JM (2021) Histomorphologische Charakterisierung dilatierter und nicht-dilatierter Aortenwand bei unikuspider Aortenklappenmorphologie im Vergleich zur Aorta bei trikuspider Aortenklappe. Saarländische Universitäts- und LandesbibliothekURL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/31871>
32. Federspiel JM, Gartner J, Lipp P, Schmidt P, Tschernig T (2023) Elderly with Varying Extents of Cardiac Disease Show Interindividual Fluctuating Myocardial TRPC6-Immunoreactivity.
33. Fidone S, Gonzalez C, Yoshizaki K (1982) Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body in vitro. *J Physiol* 333:93–110
34. Gründer S, Pusch M (2015) Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology* 94:9–18

35. Gundersen HJ, Osterby R (1981) Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or „do more less well!“ *J Microsc* 121:65–73
36. Halushka MK, Angelini A, Bartoloni G, Basso C, Batoroeva L, Bruneval P, Buja LM, Butany J, d’Amati G, Fallon JT, Gallagher PJ, Gittenberger-de Groot AC, Gouveia RH, Kholova I, Kelly KL, Leone O, Litovsky SH, Maleszewski JJ, Miller DV, Mitchell RN, Preston SD, Pucci A, Radio SJ, Rodriguez ER, Sheppard MN, Stone JR, Suvarna SK, Tan CD, Thiene G, Veinot JP, van der Wal AC (2016) Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases — nomenclature and diagnostic criteria. *Cardiovasc Pathol* 25:247–257
37. Harden TK (1990) G protein-dependent regulation of phospholipase C by cell surface receptors. *Am Rev Respir Dis* 141:S119-122
38. Heath D, Jago R, Smith P (1983) The vasculature of the carotid body. *Cardiovasc Res* 17:33–42
39. Heath D, Khan Q (1989) Focal chronic thyroiditis and chronic carotid glomitis. *J Pathol* 159:29–34
40. Heath D (1991) The human carotid body in health and disease. *J Pathol* 164:1–8
41. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259–263
42. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci* 99:7461–7466
43. Howard J, Bechstet S (2004) Hypothesis: A helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr Biol* 14:R224–R226
44. Hurst G, Heath D, Smith P (1985) Histological changes associated with ageing of the human carotid body. *J Pathol* 147:181–187
45. Ilatovskaya DV, Staruschenko A (2015) TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases. *Am J Physiol-Ren Physiol* 309:F393–F397

46. Iturriaga R, Lahiri S (1991) Carotid body chemoreception in the absence and presence of CO₂-HCO₃⁻. *Brain Res* 568:253–260
47. Iturriaga R (1993) Carotid body chemoreception: the importance of CO₂-HCO₃⁻ and carbonic anhydrase. (review). *Biol Res* 26:319–329
48. Iturriaga R, Alcayaga J, Chapleau MW, Somers VK (2021) Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiol Rev* 101:1177–1235
49. Jacobs T, Abdinghoff J, Tschernig T (2022) Protein detection and localization of the non-selective cation channel TRPC6 in the human heart. *Eur J Pharmacol* 924:174972
50. Kara T, Narkiewicz K, Somers VK (2003) Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand* 177:377–384
51. Kim I, Fite L, Donnelly DF, Kim JH, Carroll JL (2015) Possible Role of TRP Channels in Rat Glomus Cells. Springer International Publishing, Cham. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-18440-1_25
52. Kirstein E, Schaudien D, Wagner M, Diebolt CM, Bozzato A, Tschernig T, Englisch CN (2024) TRPC3 Is Downregulated in Primary Hyperparathyroidism. *Int J Mol Sci* 25:4392
53. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M (2011) TRPC3-mediated Ca²⁺ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 409:108–113
54. Klopffleisch R, Deetzen M von, Weiss ATh, Weigner J, Weigner F, Plendl J, Gruber AD (2013) Weigners Fixative—An Alternative to Formalin Fixation for Histology With Improved Preservation of Nucleic Acids. *Vet Pathol* 50:191–199
55. Knot HJ, Nelson MT (1998) Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol* 508:199–209
56. Koivisto A-P, Belvisi MG, Gaudet R, Szallasi A (2022) Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov* 21:41–59
57. Koyama Y, Coker RH, Stone EE, Lacy DB, Jabbour K, Williams PE, Wasserman DH (2000) Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes* 49:1434–1442

58. Lahiri S, Roy A, Rozanov C, Mokashi A (1998) K⁺-current modulated by PO₂ in type I cells in rat carotid body is not a chemosensor. *Brain Res* 794:162–165
59. Lazarov NE, Atanasova DY (2023) Structural Plasticity of the Carotid Body. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 237:37–48
60. Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, Bousquet SM, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, Boulay G (2006) Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *J Biol Chem* 281:30356–30364
61. Lim J-Y, Kim J, Kim SH, Lee S, Lim YC, Kim JW, Choi EC (2010) Surgical Treatment of Carotid Body Paragangliomas: Outcomes and Complications According to the Shamblin Classification. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 3:91–95
62. Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54:905–918
63. Liu D, Yang D, He H, Chen X, Cao T, Feng X, Ma L, Luo Z, Wang L, Yan Z, Zhu Z, Tepel M (2009) Increased Transient Receptor Potential Canonical Type 3 Channels in Vasculature From Hypertensive Rats. *Hypertension* 53:70–76
64. López-Barneo J, López-López JR, Ureña J, González C (1988) Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241:580–582
65. López-Barneo J (2022) Chapter 3 - Neurobiology of the carotid body. Elsevier URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323915342000102>
66. Martínez-Barbero G, García-Mesa Y, Cobo R, Cuendias P, Martín-Biedma B, García-Suárez O, Feito J, Cobo T, Vega JA (2023) Acid-Sensing Ion Channels' Immunoreactivity in Nerve Profiles and Glomus Cells of the Human Carotid Body. *Int J Mol Sci* 24:17161
67. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323
68. Montell C (2003) Mg²⁺ Homeostasis: The Mg²⁺-nifcent TRPM Chanzymes. *Curr Biol* 13:R799–R801
69. Moran MM (2018) TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 58:309–330

70. Mukerji N, Damodaran TV, Winn MP (2007) TRPC6 and FSGS: The latest TRP channelopathy. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1772:859–868
71. Mulisch M (2014) *Antikörper*. Springer Fachmedien, Wiesbaden. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-658-03829-8_2
72. Nielsen N, Kondratska K, Ruck T, Hild B, Kovalenko I, Schimmelpfennig S, Welzig J, Sargin S, Lindemann O, Christian S, Meuth SG, Prevarskaya N, Schwab A (2017) TRPC6 channels modulate the response of pancreatic stellate cells to hypoxia. *Pflugers Arch* 469:1567–1577
73. Norton N, Bruno KA, Di Florio DN, Whelan ER, Hill AR, Morales-Lara AC, Mease AA, Sousou JM, Malavet JA, Dorn LE, Salomon GR, Macomb LP, Khatib S, Anastasiadis ZP, Necela BM, McGuire MM, Giresi PG, Kotha A, Beetler DJ, Weil RM, Landolfo CK, Fairweather D (2021) Trpc6 Promotes Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Male Mice With Pleiotropic Differences Between Males and Females. *Front Cardiovasc Med* 8:757784
74. Ortega-Sáenz P, López-Barneo J (2020) Physiology of the Carotid Body: From Molecules to Disease. *Annu Rev Physiol* 82:127–149
75. Palomero OE, Larmore M, DeCaen PG (2023) Polycystin Channel Complexes. *Annu Rev Physiol* 85:425–448
76. Pardal R, López-Barneo J (2002) Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* 5:197–198
77. Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, López-Barneo J (2007) Glia-like Stem Cells Sustain Physiologic Neurogenesis in the Adult Mammalian Carotid Body. *Cell* 131:364–77
78. Petrovic A, Abramovic M, Mihailovic D, Gligorijevic J, Zivkovic V, Mojsilovic M, Ilic I (2011) Multicolor counterstaining for immunohistochemistry – a modified Movat's pentachrome. *Biotech Histochem* 86:429–435
79. Pokorski M, Walski M, Dymecka A, Marczak M (2004) The aging carotid body. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 55 Suppl 3:107–113
80. Pokorski M, Takeda K, Sato Y, Okada Y (2014) The hypoxic ventilatory response and TRPA1 antagonism in conscious mice. *Acta Physiol* 210:928–938

81. Ponikowski P, Chua TP, Anker SD, Francis DP, Doehner W, Banasiak W, Poole-Wilson PA, Piepoli MF, Coats AJ (2001) Peripheral chemoreceptor hypersensitivity: an ominous sign in patients with chronic heart failure. *Circulation* 104:544–549
82. Prabhakar NR, Peng Y-J (2004) Peripheral chemoreceptors in health and disease. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 96:359–366
83. Ramos-Vara JA (2005) Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42:405–426
84. Reading SA, Earley S, Waldron BJ, Welsh DG, Brayden JE (2005) TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 288:H2055–H2061
85. Rekha A, Ravi A, Vijayaraghavan K (2008) Paraganglioma neck – a neuroendocrine tumour revisited. *Int J Angiol Off Publ Int Coll Angiol Inc* 17:162–165
86. Riedelsheimer B, Büchl-Zimmermann S (2015) Färbungen. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-642-55190-1_10
87. Schultz HD, Marcus NJ, Del Rio R (2013) Role of the Carotid Body in the Pathophysiology of Heart Failure. *Curr Hypertens Rep* 15:356–362
88. Schulz S-A, Wöhler A, Beutner D, Angelov DN (2016) Microsurgical anatomy of the human carotid body (glomus caroticum): Features of its detailed topography, syntopy and morphology. *Ann Anat - Anat Anz* 204:106–113
89. Seo K, Rainer PP, Shalkey Hahn V, Lee D, Jo S-H, Andersen A, Liu T, Xu X, Willette RN, Lepore JJ, Marino JP, Birnbaumer L, Schnackenberg CG, Kass DA (2014) Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* 111:1551–1556
90. Sezer Ö, Tjan TDT, Scheld HH, Hoffmeier A, Welp H (2009) Glomustumore. *Z Für Herz-Thorax- Gefäßchirurgie* 23:131–139
91. Shin M-K, Eraso CC, Mu Y-P, Gu C, Yeung BHY, Kim LJ, Liu X-R, Wu Z-J, Paudel O, Pichard LE, Shirahata M, Tang W-Y, Sham JSK, Polotsky VY (2019) Leptin Induces Hypertension Acting on Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel in the Carotid Body. *Circ Res* 125:989–1002

92. Sobrino V, Platero-Luengo A, Annese V, Navarro-Guerrero E, González-Rodríguez P, López-Barneo J, Pardal R (2020) Neurotransmitter Modulation of Carotid Body Germinal Niche. *Int J Mol Sci* 21:8231
93. Stea A, Alexander SA, Nurse CA (1991) Effects of pHi and pHe on membrane currents recorded with the perforated-patch method from cultured chemoreceptors of the rat carotid body. *Brain Res* 567:83–90
94. Summers BA, Overholt JL, Prabhakar NR (2002) CO₂ and pH Independently Modulate L-Type Ca²⁺ Current in Rabbit Carotid Body Glomus Cells. *J Neurophysiol* 88:604–612
95. Sun SY, Wang W, Zucker IH, Schultz HD (1999) Enhanced peripheral chemoreflex function in conscious rabbits with pacing-induced heart failure. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 86:1264–1272
96. Sun SY, Wang W, Zucker IH, Schultz HD (1999) Enhanced activity of carotid body chemoreceptors in rabbits with heart failure: role of nitric oxide. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 86:1273–1282
97. Tano J-Y, Solanki S, Lee RH, Smedlund K, Birnbaumer L, Vazquez G (2014) Bone marrow deficiency of TRPC3 channel reduces early lesion burden and necrotic core of advanced plaques in a mouse model of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 101:138–144
98. Tao X, Zhao N, Jin H, Zhang Z, Liu Y, Wu J, Bast RC, Yu Y, Feng Y (2013) FSH enhances the proliferation of ovarian cancer cells by activating transient receptor potential channel C3. *Endocr Relat Cancer* 20:415–429
99. Teppema LJ, Dahan A (2010) The Ventilatory Response to Hypoxia in Mammals: Mechanisms, Measurement, and Analysis. *Physiol Rev* 90:675–754
100. Tiapko O, Groschner K (2021) TRPC3, an underestimated, universal pacemaker channel? *Cell Calcium* 100:102484
101. Tse A, Yan L, Lee A, Tse F (2012) Autocrine and paracrine actions of ATP in rat carotid body. *Can J Physiol Pharmacol* 90:705–11
102. Turner PJ, Buckler KJ (2013) Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J Physiol* 591:5977–5998

103. Vinhaes ENG, Dolhnikoff M, Saldiva PHN (2002) Morphological changes of carotid bodies in acute respiratory distress syndrome: a morphometric study in humans. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 35:1119–1125
104. Walz M, Tschernig T, Schmidt P, Federspiel JM (2023) TRPC6-protein expression in the elderly and in liver disease. *Ann Anat - Anat Anz* 245:152016
105. Wang H, Cheng X, Tian J, Xiao Y, Tian T, Xu F, Hong X, Zhu MX (2020) TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacol Ther* 209:107497
106. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H (2008) TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 118:337–351
107. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci* 103:19093–19098
108. Welsch U, Riedelsheimer B, Büchl-Zimmermann S (2015) *Präparationstechniken und Färbungen von speziellen Geweben*. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-642-55190-1_12
109. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE (2002) Transient Receptor Potential Channels Regulate Myogenic Tone of Resistance Arteries. *Circ Res* 90:248–250
110. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9652–9656
111. Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol Rev* 62:381–404
112. Yamaguchi Y, Iribe G, Nishida M, Naruse K (2017) Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology. *Prog Biophys Mol Biol* 130:264–272

113. Zhu MX (2005) Multiple roles of calmodulin and other Ca²⁺-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflüg Arch* 451:105–115
114. Weibel, E (1981) *Stereological Methods. Vol. 1. Practical Methods for Biological Morphometry.* 121:131–132
115. Rosai, Y (2005) *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* Mosby, Maryland Heights, Missouri
116. Search: TRPC3 - The Human Protein Atlas, Abgerufen 19.02.2025
URL: <https://www.proteinatlas.org/search/TRPC3>
117. Search: TRPC6 - The Human Protein Atlas, Abgerufen 19.02.2025
URL: <https://www.proteinatlas.org/search/TRPC6>
118. Anti-TRPC3 Antibody, Alomone Labs, Abgerufen 12.12.2024
URL: <https://www.alomone.com/p/anti-trpc3-2/ACC-016>
119. Anti-TRPC6 Antibody, Alomone Labs, Abgerufen 12.12.2024
URL: <https://www.alomone.com/p/anti-trpc6/ACC-017>

7 Publikation

Nonnenmacher I.S.M, Lehmann N, Tschernig T, Schmidt P.H, Federspiel J.M: The non-selective TRPC3 and TRPC6 channels in the human carotid body in the elderly (under review)

8 Danksagungen

In erster Linie gilt Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, Leiter der Prosektur des Anatomischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. Ihm verdanke ich die Möglichkeit diese Arbeit verfassen und seine Laborräume für die Versuche nutzen zu dürfen. Des Weiteren stand er mir bei Fragen mit seiner Expertise jederzeit zur Seite.

Großer Dank gilt zudem Dr. med. Jan Federspiel aus dem Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. Vielen Dank für die zahllosen Stunden deiner Freizeit, die du mit unendlicher Geduld und Motivation für die Betreuung dieser Arbeit geopfert hast. Beginnend von der Entwicklung der Methodik und einer strukturierten Vorgehensweise, über die von dir durchgeführte Präparation des Glomus caroticum an den Körperspendern, bis hin zur Datenauswertung konnte ich mich immer an dich wenden.

Anerkennung und Dank möchte ich zudem Nico Lehmann, Doktorand des Anatomischen Instituts, für sein Mitwirken bei der Präparation, Durchführung der Entkalkung und Probeneinbettung aussprechen. Dank gilt auch Alexander Gießmer, Mitarbeiter des Anatomischen Instituts, für die methodische Beratung zu dem Entkalkungsprozess.

Für die Durchführung der Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung möchte ich mich bei Tanja Schwab, aus dem Labor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes, herzlich bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Irina Scheck und Katja Schäfer, Mitarbeiterinnen der Prosektur des Anatomischen Instituts, für die Einarbeitung in die Laborprozesse und die Hilfe bei der Materialbeschaffung.

Für die Unterstützung bei der Zusammenstellung der Daten zu den Körperspendern möchte ich mich bei Kerstin Simon, Mitarbeiterin der Prosektur des Anatomischen Instituts, bedanken.

Ausdrückliche Anerkennung und tiefster Respekt gilt all jenen, die ihren Körper der Wissenschaft zur Verfügung gestellt haben. Ohne ihr selbstloses Engagement wäre nicht nur diese, sondern zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten unmöglich gewesen. In diesem Sinne ist auch ihren Angehörigen zu danken.

Letztendlich möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung bedanken. Dank gilt insbesondere meinen Eltern, als meine zwei größten Vorbilder. Ihr habt mich weit über diese Arbeit und das Studium hinaus, durch alle bisherigen Höhen und Tiefen begleitet. Nach jedem noch so langen Arbeitstag habt ihr euch trotzdem stets Zeit für mich genommen. Ohne euren bedingungslosen Rückhalt wären mir viele Chancen im Leben verwehrt geblieben.

9 Lebenslauf

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

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stimuli der Transmitterfreisetzung in den Glomuszellen

Abbildung 2: Aufbau der TRPC-Kanäle

Abbildung 3: Aktivierungswege der TRPC3- und TRPC6-Kanäle

Abbildung 4: sagittale Schnittebene durch die Karotis

Abbildung 5: horizontale Schnittebene durch die Karotis

Abbildung 6: Verdünnungsreihe mit TRPC3-Antikörperkonzentration von 1:50

Abbildung 7: Verdünnungsreihe mit TRPC3-Antikörperkonzentration von 1:100

Abbildung 8: Verdünnungsreihe mit TRPC3-Antikörperkonzentration von 1:200

Abbildung 9: Grading des atherosklerotischen Befalls

Abbildung 10: Verlauf der Probenauswahl aus dem Studienkollektiv

Abbildung 11: degenerierte Arteria carotis communis in der Movat-Pentachrom-Färbung

Abbildung 12: verschlossene Arteria carotis communis in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Abbildung 13: Ausschnitt aus Abbildung 12 in stärkerer Vergrößerung

Abbildung 14: Kollagenvermehrung und Mucopolysaccharide der Arteria carotis communis

Abbildung 15: atrophisiertes Glomus caroticum in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Abbildung 16: Veränderungen des senilen Glomus caroticums

Abbildung 17: Gefäßanschnitt eines potenziellen Versorgungsgefäßes des Glomus caroticums

Abbildung 18: Gemessene Fläche des Glomus caroticums in allen Färbungen

Abbildung 19: Gemessene Breite des Glomus caroticums in allen Färbungen

Abbildung 20: Gemessene Länge des Glomus caroticums in allen Färbungen

Abbildung 21: Anzahl der Gefäßanschnitte des Glomus caroticums

Abbildung 22: Anzahl der Gefäßanschnitte in Bezug auf die Fläche des Glomus caroticums

Abbildung 23: Zählung der Gefäßanschnitte

Abbildung 24: Semiquantitative Befundung der Färbung des TRPC3-Kanals

Abbildung 25: Exemplarische immunhistochemische Anfärbung des TRPC3-Kanals

Abbildung 26: Semiquantitative Befundung der Färbung des TRPC6-Kanals

Abbildung 27: Densitometrische Signale pro Fläche

Abbildung 28: Markierung des Densitometrischer Signale für TRPC6

Abbildung 29: Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung des TRPC3-Kanals

Abbildung 30: Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung des TRPC6-Kanals

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Materialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

Tabelle 4: Daten zu den Körperspendern

Tabelle 5: Arbeitsschritte der Probeneinbettung

Tabelle 6: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tabelle 7: Anzusetzende Lösungen für die immunhistochemische Färbung

Tabelle 8: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung

Tabelle 9: Arbeitsschritte der Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung

Tabelle 10: Befundung der Arteria carotis communis

Tabelle 11: Befundung des Allgemeinzustands des Glomus caroticum

10.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| g | Gramm |
| kg | Kilogramm |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µm ² | Quadratmikrometer |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| α | Alpha |
| > | Größer als |
| % | Prozent |
| & | Und |
| Ca ²⁺ -Kanal | Calciumkanal |
| K ⁺ -Kanal | Kaliumkanal |
| 2-APB | 2-Aminoethoxydiphenylboran |
| ADPKD | autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung |
| ARDS | akutes Atemnotsyndrom, aus dem Englischen: acute respiratory distress syndrome |
| ASICs | Acid-sensing ion channels |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CaMK II | Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II |
| CiRB | Calmodulin-Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-Bindungsstelle |
| COPD | chronisch obstruktive Lungenerkrankung, aus dem Englischen: chronic obstructive pulmonary disease |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |

| | |
|------------|--|
| DAG | Diacylglycerol |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FSG | Fokal-segmentale Glomerulosklerose |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon |
| GABA | Gamma-Aminobuttersäure, aus dem Englischen: gamma-aminobutyric acid |
| GDNF | Glial Cell line-derived neurotrophic Factor |
| IHC | Immunhistochemie |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HRP | Horseredish-Peroxidase |
| IP3 | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| NEP | Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol |
| NGS | Normal Goat Serum |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| Orai1 | Calcium release-activated calcium modulator |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat |
| PKD | Polycystic kidney disease |
| PLC | Phospholipase C |
| ROCE | Receptor-operated calcium entry |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| SOCE | Store-operated calcium entry |
| STIM1 | Stromal interacting molecule 1 |
| TASK | Twik-related acid sensing K ⁺ -channels |

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| TRP | Transient receptor potential channels |
| TRPA-Kanal | TRP-Kanal, Subfamilie „Ankyrin“ |
| TRPC-Kanal | TRP-Kanal, Subfamilie „Canonical“ |
| TRPM-Kanal | TRP-Kanal, Subfamilie „Melastatin“ |
| TRPML-Kanal | TRP-Kanal, Subfamilie „Mucolipin“ |
| TRPP-Kanal | TRP-Kanal, Subfamilie „Polycistin“ |
| TRPV-Kanal | TRP-Kanal, Subfamilie „Vanilloid“ |
| UTP | Uridintriphosphat |

10.4 Materialliste

9.4.1 Chemikalien

| Material | Hersteller |
|------------------------------|---|
| Citrat | Ref.: ab93678, Abcam AG, Cambridge, UK |
| 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) | Ref.: 7411-49-6, Vector Laboratories Inc, Burlingham USA |
| Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat | Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland |
| Eosin | Ref. 3137.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Essigsäure | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Formaldehyd | Ref.: 27244 Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland |
| Formaldehyd (zur Fixierung) | Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland |
| Hämatoxylin | Ref. CN04.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Horseredish-Peroxidase (HRP) | Ref.: A10547, Invitrogen AG, Carlsbad, USA |
| Kaninchenserum | Überlassen von Prof. Dr. M. Jung, Biochemie, Homburg |
| Klebstoff | Roti-Histokitt, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid | Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland |

Anhang

| | |
|---|---|
| Normal-Goat-Serum (NGS) | Ref.: NS02L-1ML, Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | Ref.: 1105.1, Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Polyethylenglykol (NEP) | Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland |
| Primärantikörper TRPC3 | Ref.: ACC016, Alomone Labs, Jerusalem, Israel |
| Primärantikörper TRPC6 | Ref.: ACC017, Alomone Labs, Jerusalem, Israel |
| 2-Propanol | Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | Ref.: UN2014, Carl Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland |

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

10.4.2 Materialien

| Material | Hersteller |
|---------------------------|---|
| Deckglas | Epredia, Fisher Scientific GmbH & CO. KG |
| Einbettkassetten | Ref.:M512; Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada |
| Einbettring | Ref.:M460; Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada |
| Feuchtekkammer | Ref.: 21049, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Filterpapier | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| Foliensarg | Pharaopack Europe, Wuppertal, Deutschland |
| Mikrotomklinge | DB80, Leica Mikrosytseme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Objektträger für HE | Riomavix S.L., Calle de Almansa, Spanien |
| Objektträger, silanisiert | Langenbrick GmbH, Emmendingen, Deutschland |
| Fettstift „Dako Pen“ | Ref.: S200230-2, Agilent, Santa Clara, USA |
| Pipetten | Sarstedt AG & CO. KG, Nümbrecht, Deutschland |

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Materialien.

10.4.3 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|-----------------------------------|--|
| Gewebemühle | Pre Cellys; Peclab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Inkubator | VWR International, Pennsylvania, USA |
| Kühlanlage | Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland |
| Karussell-Gewebeeinbettter | SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland |
| Mikroskop | Olympus BX43, Tokio, Japan |
| Mikroskop Software | Olympus cellSens Dimensions 4.2, Tokio, Japan |
| Mikroskop Kamera | Olympus DP23, Tokio, Japan |
| Mikrotom | Ref.: RM2025, Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH |
| Paraffingussgerät mit Kälteplatte | SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland |
| Paraffinstreckbad | Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland |
| Wärmeplatte | VWR International, Pennsylvania, USA |
| Wärmeschrank | Ref.: 51014550, Thermo Fisher Scientific Incorporation, Massachusetts, USA |
| Wasserbad | GFL mbH, Burgwedel, Deutschland |

***Tabelle 3:** Auflistung der verwendeten Geräte.*

10.5 Arbeitsschritte Probeneinbettung

| Arbeitsschritt | Lösungsmedium | Lagerungsdauer in Minuten |
|----------------|--------------------|---------------------------|
| 1 | Isopropanol 70%ig | 180 |
| 2 | Isopropanol 80%ig | 90 |
| 3 | Isopropanol 90%ig | 90 |
| 4 | Isopropanol 100%ig | 90 |
| 5 | Isopropanol 100%ig | 90 |
| 6 | Methylbenzoat | 90 |
| 7 | Methylbenzoat | 90 |
| 8 | Methylbenzoat | 90 |
| 9 | Paraffin | 120 |
| 10 | Paraffin | 120 |

Table 5: Arbeitsschritte der Probeneinbettung nach [3] und wie in Abschnitt 3.6 „Probeneinbettung“ beschrieben.

10.6 Arbeitsschritte HE-Färbung

| Arbeitsschritt | Chemikalie | Dauer |
|----------------|----------------------|-----------------------|
| 1 | Xylol | 5 Minuten |
| 2 | Xylol | 5 Minuten |
| 3 | Xylol | 5 Minuten |
| 4 | 100%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 5 | 90%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 6 | 80%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 7 | Hämatoxylin | 8 Minuten |
| 8 | Destilliertes Wasser | Einige Sekunden |
| 9 | Leitungswasser | 12 Minuten |
| 10 | Destilliertes Wasser | 30 Sekunden |
| 11 | Eosin | 2 Minuten 30 Sekunden |
| 12 | 90%ig 2-Propanol | Einige Sekunden |
| 13 | 90%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 14 | 100%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 15 | 100%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 16 | Xylol | 5 Minuten |
| 17 | Xylol | 5 Minuten |
| 18 | Xylol | 5 Minuten |

Table 6: Arbeitsschritte der HE-Färbung nach [3] und wie in Abschnitt 3.8 „Hämatoxylin-Eosin-Färbung“ beschrieben.

10.7 Immunhistochemie

10.7.1 Herstellung der Lösungen

| Gewünschte Lösung | Menge der Grundsubstanzen |
|--|--|
| 250 ml 1%ige Citratpufferlösung | 247,5 ml destilliertes Wasser, 2,5 ml Citrat |
| 100 ml 3%ige Wasserstoffperoxid Lösung | 91,43 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 8,57 ml Wasserstoffperoxid |
| 1 ml HRP, Verdünnung 1:50 | 20 µl HRP 980 µl NGS Blockierlösung |
| 1 ml HRP, Verdünnung 1:500 | 100 µl HRP, Verdünnung 1:50 900 µl NGS Blockierlösung |

Tabelle 7: In der Versuchsvorbereitung anzusetzende Lösungen.

10.7.2 Arbeitsschritte

| Tag der Versuchsdurchführung | urchzuführender Schritt |
|-------------------------------------|--|
| 1.Tag | Vorbereitung der Lösungen in gewünschter Konzentration |
| 1.Tag | Anfertigung Feuchtkammer |
| 1.Tag | Citratpuffer vorwärmen |
| 1.Tag | Entparaffinierung |
| 1.Tag | Demaskierung der Epitope |
| 1.Tag | Blockierung |
| 1.Tag | Auftragen der Primärantikörper |
| 2.Tag | Peroxidase-Inaktivierung |
| 2.Tag | Auftragen des Sekundärantikörpers |
| 2.Tag | DAB-Färbung |
| 2.Tag | Gegenfärbung |
| 2.Tag | Entwässerung |
| 2.Tag | Deckglas applizieren |

Table 8: Arbeitsschritte der IHC nach Protokoll des Anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes.

10.8 Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung

| Arbeitsschritt | Chemiekalie | Dauer |
|----------------|--|---------------------------|
| 1 | Xylol | 3x5Minuten |
| 2 | 100%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 3 | 90%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 4 | 80%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 5 | 70%ig 2-Propanol | 5 Minuten |
| 6 | Destilliertes Wasser | 2x 2 Minuten |
| 7 | 3%ig Essigsäure | 30 Sekunden |
| 8 | 1% Alcianblau | 30 Minuten |
| 9 | Leitungswasser | 2 Minuten |
| 10 | Verhöff Gebrauchslösung | 8 Minuten |
| 11 | 1%ig Eisen-(III)-Chlorid | 1 Minute |
| 12 | Leitungswasser | 10 Minuten |
| 13 | Brilliant-Crocein- Säurefuchsinlösung | 3 Minuten |
| 14 | 1%ig Essigsäure | 30 Sekunden |
| 15 | 2%ig Phosphorwolframsäure | 15 Minuten |
| 16 | 1%ig Essigsäure | 30 Sekunden |
| 17 | 99%ig Ethanol | 1x3 Minuten, 1x15 Minuten |
| 18 | Safron-du-Gatinais | 15 Minuten |
| 19 | 99%ig Ethanol | 2x 2 Minuten |
| 20 | Xylol | 2x 10 Minuten |

Tabelle 9: Arbeitsschritte der Movat-Pentachrom nach Verhöff-Färbung nach [31].