

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

Der immunhistochemische Nachweis des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC6 im menschlichen Hippocampus

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von: Julia Pauline Folz

geboren am 31.10.1998 in Saarlouis

Tag der Promotion: 09.06.2026

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

Berichterstattende: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Univ. Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Boehm

„Wir können jeden Tag aufs Neue entscheiden, welchen Einfluss wir auf diese Welt
ausüben möchten.“

– Jane Goodall –

Gewidmet
meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Die TRP-Kanal-Superfamilie	5
3.1.1	Relevanz	5
3.1.2	Ursprung und Namensgebung	6
3.1.3	Einteilung.....	6
3.1.4	Allgemeine Struktur der TRP-Kanäle.....	7
3.1.5	Aktivierungsmechanismen der TRP-Kanäle	9
3.1.6	TRPC6	10
3.1.6.1	Grundlagen	10
3.1.6.2	Proteinstruktur	11
3.1.6.3	Physiologie	14
3.1.6.4	Pathophysiologische Relevanz	16
3.1.6.5	TRPC6 im ZNS.....	22
3.2	Aufbau und Funktion des menschlichen Hippocampus	29
3.3	Fragestellung und Ziele der Arbeit	32
4	Material und Methoden	33
4.1	Materialien.....	33
4.1.1	Verwendete Antikörper.....	33
4.1.2	Verwendete Chemikalien.....	33
4.1.3	Lösungen und Puffer.....	35

4.1.4	Verwendete Geräte	36
4.1.5	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	37
4.1.6	Gewebeproben	38
4.2	Methoden	38
4.2.1	Körperspende	38
4.2.2	Konservierung der Körperspender.....	39
4.2.3	Entnahme der Gehirne	40
4.2.4	Nachfixierung der entnommenen Gehirne.....	43
4.2.5	Probengewinnung	44
4.2.5.1	Besonderheiten	44
4.2.5.2	Anatomische Präparation der Hippocampi	45
4.2.5.3	Probenentnahme des menschlichen Cerebellums	49
4.2.6	Paraffineinbettung.....	49
4.2.6.1	Hippocampus	50
4.2.6.2	Cerebellum.....	51
4.2.7	Herstellung von Paraffinschnitten	51
4.2.8	Gesamtübersicht der Proben	52
4.2.9	Auswahl der Schnitte	53
4.2.10	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	53
4.2.10.1	Grundlagen	53
4.2.10.2	Versuchsdurchführung.....	54
4.2.11	Immunhistochemische Färbung.....	56
4.2.11.1	Grundlagen	56
4.2.11.2	Versuchsdurchführung.....	58
4.2.11.3	Verdünnung und Substratinkubationszeit.....	59

4.2.11.4	Negativkontrolle	59
4.2.11.5	Peptidkontrolle.....	60
4.2.12	Bildaufnahme und -verarbeitung	60
4.2.13	Auswertung	61
5	Ergebnisse.....	62
5.1	HE-Färbung	62
5.2	Spezifität der Färbungen.....	66
5.3	Immunhistochemische Färbung.....	72
5.3.1	TRPC6 im menschlichen Hippocampus	72
5.3.1.1	Gehirn A	72
5.3.1.2	Gehirn C.....	80
5.3.1.3	Gehirn G	85
5.3.1.4	Gehirn H	87
5.3.1.5	Gehirn I.....	93
5.3.1.6	Gehirn J.....	98
5.3.2	TRPC6 im menschlichen Cerebellum.....	101
5.3.3	TRPC6 in menschlichen Glioblastomen.....	105
6	Diskussion	107
6.1	Diskussion der Methodik	107
6.2	Diskussion der Ergebnisse	109
6.2.1	Peptidkontrolle und Negativkontrolle.....	109
6.2.2	TRPC6 im menschlichen Hippocampus	109
6.2.3	TRPC6 im menschlichen Cerebellum.....	113
6.2.4	TRPC6 in menschlichen Glioblastomen.....	115

6.3	Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick.....	116
7	Abbildungsverzeichnis	XII
8	Tabellenverzeichnis	XV
9	Literaturverzeichnis	XVI
10	Danksagung	XL
11	Lebenslauf	XLII

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
APP-KI	Amyloid Precursor Protein-Knock-in
AR	ankyrin repeat
ASD	Autismus-Spektrum-Störungen
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
C	Kleinhirnhemisphäre
Ca ²⁺	Calciumion(en)
CA	Cornu ammonis
ca.	circa
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
CH1	C-terminale Helix 1
CH2	C-terminale Helix 2
CIRB	calmodulin and IP ₃ receptor binding
Cmp2	N-(2,6-difluorophenyl)-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)- propanamid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CREB	cAMP-response-element-binding-protein
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAG	Diacylglycerin
EC	Entorhinaler Kortex

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular-signal regulated kinase
et al.	et alia (und andere)
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GBM	Glioblastome
GD	Gyrus dentatus
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	alpha-Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1
HNSCC	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (head and neck squamous cell carcinoma)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase = Meerrettich-Peroxidase (an Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym)
IHC	Immunhistochemie
ICD	intrazelluläre zytoplasmatische Domäne
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
L	Liter
l	links
LEC	lateral entorhinaler Kortex
LH	Linker-Helix
m	männlich

MEC	medialer entorhinaler Kortex
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
Na ⁺	Natrium-Ion
NEP	Nitropökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NGS	normal goat serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSN	NSN21778
nSOC	neuronaler speichergesteuerter Calciumkanalkomplex (neuronal store-operated calcium channel complex)
Orai2	calcium release-activated calcium modulator 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphat
PLC	Phospholipase C
r	rechts
ROCE	Rezeptoroperierter Calciumeinstrom (receptor-operated calcium entry)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom (small cell lung cancer)

SOCE	speicheroperierter Calciueinstrom (store-operated calcium entry)
STIM2	stromal interaction molecule 2
SUB	Subiculum
TEC	Transentorhinaler Kortex
TLR	toll-like receptor
TMD	transmembrane Domäne
TRP	Transient Receptor Potential
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical"
V	Vermis
w	weiblich
Zentr. ChL	Zentrales Chemikalienlager
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Neurologische Erkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten und belastendsten Krankheitsbildern. Im Zuge des demografischen Wandels gewinnen insbesondere neurodegenerative Erkrankungen wie zerebrale Ischämie und Demenz zunehmend an Bedeutung. Gleichzeitig sind die Therapieoptionen vieler neurologischer Erkrankungen sehr begrenzt.

Der nicht-selektive Calciumkanal TRPC6 scheint an der Pathogenese verschiedener Neuropathologien wie zerebraler Ischämie, Alzheimer, Epilepsie und Gliome unmittelbar beteiligt zu sein. Ein immunhistochemischer Nachweis des Kanalproteins im menschlichen Hippocampus und Kleinhirn ist laut aktueller Studienlage bislang nicht erfolgt und wird erstmals durch diese Arbeit bereitgestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden elf Hippocampi aus sechs Körperspendern des Anatomischen Instituts des Saarlandes aufbereitet und immunhistochemisch auf die Expression des TRPC6-Kanalproteins untersucht. Des Weiteren wurden ergänzend zwei Präparate des menschlichen Kleinhirns aus einem Körperspender und zwei Proben menschlicher Glioblastome aus Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes untersucht.

Ein Farbnachweis für das TRPC6-Kanalprotein zeigte sich immunhistochemisch im menschlichen Hippocampus in Körnerzellen des Gyrus dentatus, in Pyramidenzellen des Cornu ammonis (CA1–CA4) und des Subiculus sowie in subzellulären Strukturen des Stratum moleculare und multiforme des Gyrus dentatus. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRPC6 in diesen Regionen exprimiert wird und als Mediator der Calciumhomöostase wesentlich an der synaptischen Plastizität und Gedächtnisbildung des Menschen beteiligt ist. In Übereinstimmung mit bisherigen

Studien am Tiermodell zeigte sich im menschlichen Kleinhirn ein Farbnachweis für das TRPC6-Kanalprotein immunhistochemisch in inhibitorischen Purkinje-Zellen und inhibitorischen Golgi- und Sternzellen. Im Einklang mit bestehenden Studien konnte außerdem ein Farbnachweis für das TRPC6 Kanalprotein in menschlichen Glioblastomen beobachtet werden.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse hinweisend auf eine Expression von TRPC6 im menschlichen Hippocampus, Kleinhirn und in menschlichen Glioblastomen. Sie unterstreichen die Relevanz des TRPC6-Kanalproteins für die Neurophysiologie des Menschen und thematisieren sein Potenzial als mögliches zukünftiges Therapieziel für verschiedene neurologische Krankheitsbilder.

2 Summary

Neurological diseases are among the most common and debilitating conditions worldwide. In the wake of demographic change, neuropathologies such as cerebral ischemia and dementia are becoming increasingly significant. At the same time, the treatment options for many neurological diseases are very limited.

The non-selective calcium channel TRPC6 appears to be directly involved in the pathogenesis of various neurological diseases such as cerebral ischemia, Alzheimer's disease, epilepsy and glial cancer.

According to current studies, immunohistochemical detection of the channel protein in the human hippocampus and cerebellum has not yet been achieved and is provided for the first time in this study.

In the present study, eleven hippocampi from six body donors at the Anatomical Institute of Saarland University were processed immunohistochemically and examined for the presence and distribution of the TRPC6 channel protein.

In addition, two preparations of the human cerebellum from a body donor and two samples of human glioblastomas from patients at Saarland University Medical Center were examined. Immunohistochemical staining revealed TRPC6 channel protein expression in the human hippocampus in granule cells of the dentate gyrus, in pyramidal cells of the cornu ammonis (CA1–CA4) and subiculum, and in subcellular structures of the stratum moleculare and multiforme of the dentate gyrus. The results suggest that TRPC6 is expressed in these regions and, as a mediator of calcium homeostasis, plays an important role in synaptic plasticity and memory formation in humans. In line with previous studies in animal models, immunohistochemical staining for the TRPC6 channel protein was observed in inhibitory Purkinje cells and

inhibitory Golgi and stellate cells in the human cerebellum. Consistent with existing studies, staining for the TRPC6 channel protein was also observed in human glioblastomas.

In summary, the results indicate TRPC6 expression in the human hippocampus, cerebellum and human glioblastomas. They underline the relevance of the TRPC6 channel protein for human neurophysiology and highlight its potential as a possible future therapeutic target for various neurological conditions.

3 Einleitung

3.1 Die TRP-Kanal-Superfamilie

3.1.1 Relevanz

Die Transient Receptor Potential (TRP)-Kanal-Superfamilie bezeichnet eine Familie membranintegraler Proteine, die eine Permeabilität für Natrium, Kalium Calcium oder Magnesium aufweisen [39].

Die meisten TRP-Kanäle fungieren als Calcium permeable nicht-selektive Kationenkanäle an der Plasmamembran [104]. Sie werden in einer Vielzahl von multizellulären Organismen, inklusive des Menschen exprimiert und nehmen eine zentrale Rolle für verschiedene physiologische Prozesse ein [160].

Neben der Bedeutsamkeit für zahlreiche sensorische Funktionen wie unter anderem Pheromon-Signalisierung, Geschmackstransduktion, Nozizeption, Sehvermögen und Temperaturempfinden wirken die TRP-Kanäle als Signalintegratoren und spielen eine entscheidende Rolle bei homöostatischen Funktionen wie Osmoregulation, Calcium- und Magnesium-Rückresorption sowie Muskelkontraktion und vasomotorischer Kontrolle [104].

Das Forschungsfeld der TRP-Kanäle hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen: Neben ihrer Beteiligung an der Genese nephrologischer, kardiovaskulärer, pulmologischer und onkologischer Krankheitsbilder nehmen die TRP-Kanäle – und vor allem der TRPC6-Kanal – eine entscheidende Rolle innerhalb der Physiologie und Pathophysiologie des Zentralen Nervensystems (ZNS) ein [22,118,128,131]. Die wachsenden Erkenntnisse über Physiologie, Struktur, Funktionen und das Expressionsspektrum der TRP-Kanalfamilie ebnen zusammen mit der Entdeckung

neuer Substanzen zur Modulation ihrer Funktion den Weg für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Medizin.

3.1.2 Ursprung und Namensgebung

Der Ursprung des Begriffes TRP (transient receptor potential) liegt in der 1969 von Cosens und Manning isolierten Mutante von *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), die im Elektoretinogramm auf langanhaltende Lichtreize mit einem transienten Rezeptorpotential reagierte [29]. 20 Jahre später gelang die Kodierung des sogenannten TRP-Gens durch Wong, Montell und Rubin [97,175]. Bei dem Transkript handelte es sich um ein Sechs-Transmembran-Segmentprotein, das als nicht selektiver Calcium permeabler Kationenkanal fungiert [53]. Mithilfe der PCR-Klonierung konnte nachgewiesen werden, dass Homologe des TRP-Proteins auch in anderen Arten exprimiert werden [114]. Sie wurden unter dem Begriff der TRP-Kanal-Superfamilie zusammengefasst.

3.1.3 Einteilung

Die Einteilung der Superkanalfamilie erfolgt auf Grundlage der Sequenzhomologie in die sieben Unterfamilien TRPC (canonical/classical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastin), TRPN (NO-mechano-potential), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystin) und TRPML (mucolipin) [160]. Sechs der sieben Unterfamilien werden in Säugetieren exprimiert. Eine Ausnahme bilden die TRPN-Kanäle, welche jedoch in einigen Wirbeltieren vorkommen [98]. Man vermutet, dass der Ursprung der TRP-Kanäle weit vor der Entstehung der metazoischen Organismen liegt, da die Expression einer weiteren mutmaßlichen Unterfamilie TRPY (yeast) in Pilzen nachgewiesen wurde [30,112,160].

3.1.4 Allgemeine Struktur der TRP-Kanäle

TRP-Proteine bestehen aus sechs Transmembrandomänen (S1–S6), einer porenbildenden Schleife, die zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6 lokalisiert ist, sowie den zytosolischen Amino- und Carboxyltermini [110]. Eine spannungssensorähnliche Domäne, wie sie auch in spannungsgesteuerten K^+ -, Na^+ - und Calciumkanälen vorhanden ist, wird durch die ersten vier Transmembran-alpha-Helices (S1-S4) gebildet [163]. Die intrazellulären Amino- und Carboxyltermini sind in ihrer Länge variabel und enthalten eine Vielzahl unterschiedlicher Struktur motive [110]. Die Transmembranproteine können zu Tetrameren assemblieren [104]. Dabei wurde die Bildung von homo- und heterotetrameren Kanälen beschrieben [15,23]. Abbildung 1B veranschaulicht den tetrameren Aufbau.

TRPC-, TRPM- und TRPN-Kanäle besitzen alle eine TRP-Domäne (EWKFAR), welche dem sechsten Transmembransegment folgt [160]. Ein weiteres Strukturmerkmal vieler TRP-Proteine ist das Vorhandensein von Ankyrin Repeats im Aminotermminus, welche eine wesentliche Rolle bei der Tetramerisierung des Kanals und der Interaktion mit anderen Proteinen und Liganden einzunehmen scheinen [45]. Die Fähigkeit zur Bildung funktionell aktiver Homo- und Heterotetramere stellt eine effektive Möglichkeit zur Modulation ihrer biophysikalischen Eigenschaften dar [131]. Abbildung 1 veranschaulicht die genannten Strukturmerkmale der TRP-Proteine.

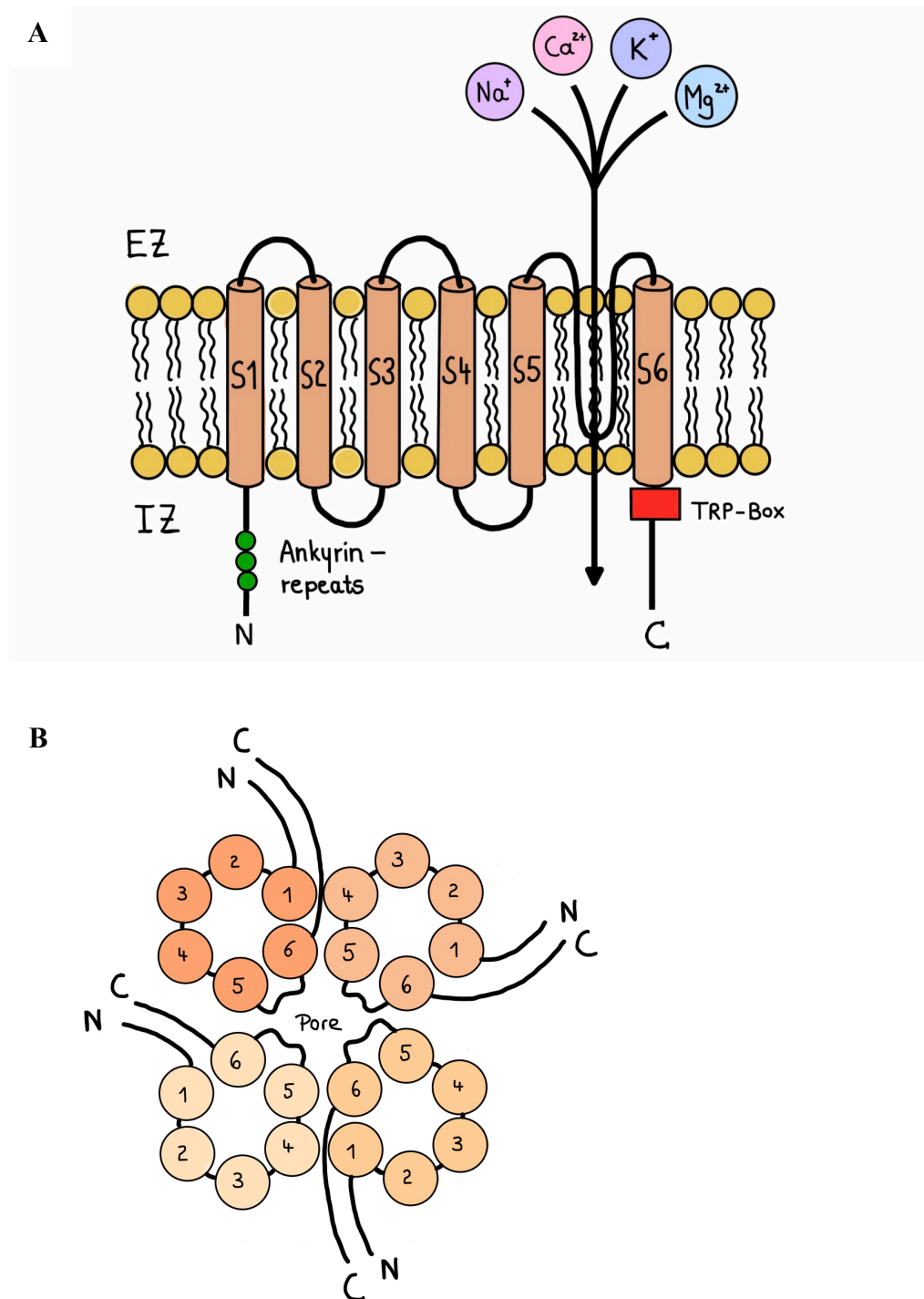


Abbildung 1: Strukturmerkmale der TRP-Kanal-Superfamilie

A: Aufbau einer Kanaluntereinheit (Monomer), eigene Darstellung, modifiziert nach Clapham et al., 2001 [27]

B: Tetramere Struktur der TRP-Kanäle, eigene Darstellung, modifiziert nach Watanabe et al., 2009 [170]

3.1.5 Aktivierungsmechanismen der TRP-Kanäle

Die Aktivierung der TRP-Kanäle kann über eine Vielzahl unterschiedlicher und spezifischer Aktivierungsmechanismen erfolgen, wobei diese innerhalb einer Unterfamilie nochmals variieren können [160].

Zu den Mechanismen des TRP-Kanal-Gatings zählen neben der Spannungsabhängigkeit vieler TRP-Kanäle die Aktivierung durch Membranphospholipide, Liganden und Phosphorylierungsprozesse [104]. Man geht davon aus, dass positiv geladene Lysin- und Argininreste im Transmembransegment S4 an der Spannungserkennung beteiligt sind [161]. Einige TRP-Kanäle, darunter auch TRPC6, werden direkt über den Lipidbotenstoff Diacylglycerin (DAG) und dessen Metaboliten, die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, aktiviert [59,93].

Des Weiteren können TRP-Kanäle durch chemische (Säuren, Lipide), thermische und mechanische Reize sowie den osmotischen Druckgradienten aktiviert werden [99,100,103,113,122]. Als ein berühmter Vertreter ist TRPV1 zu nennen. Der temperaturempfindliche Kanal fungiert als Hitze-Sensor und wird chemisch durch das in Paprika- und Chilischoten enthaltene Capsaicin aktiviert [18].

Neben der Vielfalt an Aktivierungsmechanismen werden auch Gemeinsamkeiten innerhalb einzelner TRP-Kanal-Unterfamilien beschrieben: So werden alle klassischen TRP-Kanäle, einschließlich TRPC6 über Signalwege aktiviert, die zu einer Stimulation der Phospholipase C (PLC) führen [99]. Eine detaillierte Darstellung der Physiologie des TRPC6-Kanals folgt in Kapitel 3.1.6.3.

3.1.6 TRPC6

3.1.6.1 Grundlagen

Der TRPC6 Kanal gehört zur Unterfamilie der kanonischen bzw. klassischen TRP-Kanäle, welche auch als TRPC-Kanäle (Transient Receptor Potential Canonical/Classical) bezeichnet werden, und innerhalb der TRP-Kanal-Superfamilie die größte Sequenzhomologie mit den ursprünglichen TRP-Proteinen aus *Drosophila melanogaster* aufweisen [157]. Bei den TRPC-Kanälen handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle, deren Aktivierung hauptsächlich zu einem Natrium- oder Calciueinstrom führt [163]. Interessanterweise weist TRPC6 eine etwa sechsfach höhere Permeabilität gegenüber Calciumionen als gegenüber Natriumionen auf [95]. Die Kanalaktivierung führt zu einer Depolarisation der Zellmembran und zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumionenkonzentration [34,163].

Der menschliche TRPC6-Genlocus befindet sich auf Chromosom 11, wodurch Mutationen dieses Gens Männer und Frauen gleichermaßen betreffen können [31,128]. Die TRPC-Familie umfasst insgesamt sieben Mitglieder (TRPC1-7), wobei der TRPC2-Kanal als Pseudogen beim Menschen nicht exprimiert wird [91]. Unter strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten lassen sich die TRPC-Kanäle in die vier Untergruppen TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 und TRPC3/6/7 gliedern [160,163]. Sowohl ihre 70- bis 80-prozentige Sequenzhomologie als auch die Empfindlichkeit gegenüber DAG sind Gemeinsamkeiten der TRPC3/6/7-Kanalfamilie [59,105].

3.1.6.2 Proteinstruktur

Die Struktur des TRPC6 konnte bisweilen noch nicht vollständig aufgelöst werden, allerdings leistete die Kryo-Elektronenmikroskopie einen wesentlichen Beitrag zur Aufschlüsselung der molekularen Identität des TRPC6-Kanals und förderte die Entwicklung neuer Modulatoren [5,151].

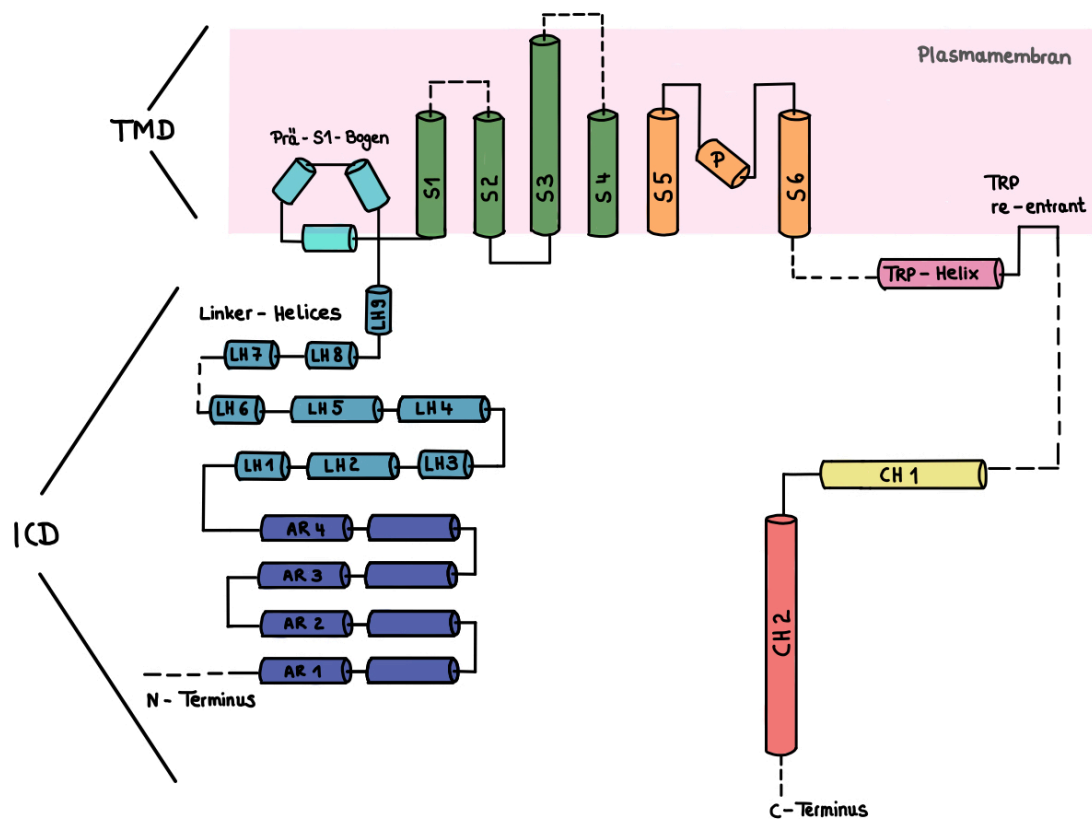


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer TRPC6-Kanaluntereinheit

Eigene Darstellung in Anlehnung an Tang et al., 2018 [151] und Azumaya et al., 2018 [5]

Die Grundzüge der TRPC6-Kanalarchitektur richten sich nach den in Kapitel 3.1.4. beschriebenen allgemeinen Strukturmerkmalen der TRP-Kanäle.

Die Zusammenschlüsse aus jeweils vier der charakteristischen Kanaluntereinheiten bilden eine zweischichtige Architektur bestehend aus einer intrazellulären

zytoplasmatischen Domäne (ICD) und einer transmembranen Domäne (TMD) und weisen eine vierfache Symmetrie auf [22,151].

Ein gemeinsames Merkmal aller TRP-Kanäle ist die sogenannte TRP-Helix oder TRP-Domäne mit dem charakteristischen Motiv „EWKFAR“, welche am Übergang von TMD und ICD lokalisiert ist und von der angenommen wird, dass sie für das Kanal-Gating entscheidend ist [151,163]. Die TMD enthält die spannungssensor-ähnliche Domäne (S1-S4) sowie die Ionenkanalpore, die durch die vierfach symmetrische Anordnung der Transmembransegmente S5 und S6 gebildet wird und den Selektivitätsfilter des Kanals bildet [5,22,151]. Die Länge der S3-Helix ist kennzeichnend für den TRPC6-Kanal, da sie um genau drei Windungen länger als die S3-Helix anderer TRP-Kanäle ist und somit einen charakteristischen Vorsprung der TMD in den Extrazellularraum formt [151].

Ein gemeinsames Strukturmerkmal aller TRPC-Kanäle, welches ICD und TMD miteinander verbindet ist der Prä-S1-Bogen, eine dreifach helikale Region, die zur Hälfte in die Plasmamembran eingebettet ist und vor der transmembranen S1-Helix lokalisiert ist [151,163]. Die ICD, die in ihrer Gesamtheit durch die N- und C-terminalen Strukturen der Untereinheiten gebildet wird, ähnelt strukturell einer umgekehrten kuppelartigen Kammer, die dem Zytosol zugewandt ist [5,22,151]. Sie enthält Proteinbindungsstellen zur Modulation des TRPC6-Kanal-Gatings und fungiert als Ort der Signalerfassung, indem Signale aus dem Intrazellularraum über die TRP-Domäne an die TMD weitergeleitet werden [5,151].

Als funktionelle Bindungsstelle innerhalb der ICD wurde u.a. das sogenannte CIRB (calmodulin and IP₃ receptor binding)-Motiv beschrieben, das in allen TRPC-Kanälen vorhanden ist und Bindungsstellen für Calmodulin und Inositoltriphosphat (IP₃) enthält [163]. Das N-terminale Ende der TRPC6-Untereinheiten wird von vier

Ankyrin Repeats (AR1–4) gebildet, an welche sich neun alpha-helikale Segmente, die sogenannten Linker-Helices (LHs) in Richtung TMD anschließen [5,151,163].

Der zytoplasmatische C-Terminus ist insgesamt kürzer als der N-Terminus und beinhaltet zwei über einen kurzen Linker verbundene Helices, nämlich die C-terminale Helix 1 (CH1) und die C-terminale Helix 2 (CH2) [5,151]. Zwischen CH1 und der charakteristischen TRP-Domäne ist der TRP-Reentrant lokalisiert – eine Wiedereintrittsschleife, die sowohl mit dem Prä-S1-Bogen als auch der S1-Helix interagiert [151,163]. CH1 bildet nach dem Austritt der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne aus der TMD eine horizontale Verbindungshelix, die parallel zur Membran und antiparallel zur TRP-Domäne ausgerichtet ist und sich mit der vertikalen senkrecht zur Membran verlaufenden CH2 verbindet [5,151,163]. Im tetrameren Konstrukt kreuzen sich die horizontalen Verbindungshelices der vier Untereinheiten im rechten Winkel zueinander [5]. Die vertikalen Helices bilden in ihrer Gesamtheit ein charakteristisches vierhelikales Bündel, die sogenannte Coiled-Coil [5,151].

TRPC6 ist ebenso wie TRPC3 und TRPC7 fähig homo- und heterotetramere Zusammenschlüsse zu bilden [157]. Umfangreiche Wechselwirkungen zwischen den vier Kanaluntereinheiten tragen zum tetrameren Zusammenbau des Komplexes bei und befinden sich vor allem im Bereich der zytosolischen Domänen einschließlich der N-terminalen Ankyrin-Repeats, der C-terminalen Verbindungshelices und der Coiled-Coil [151].

3.1.6.3 Physiologie

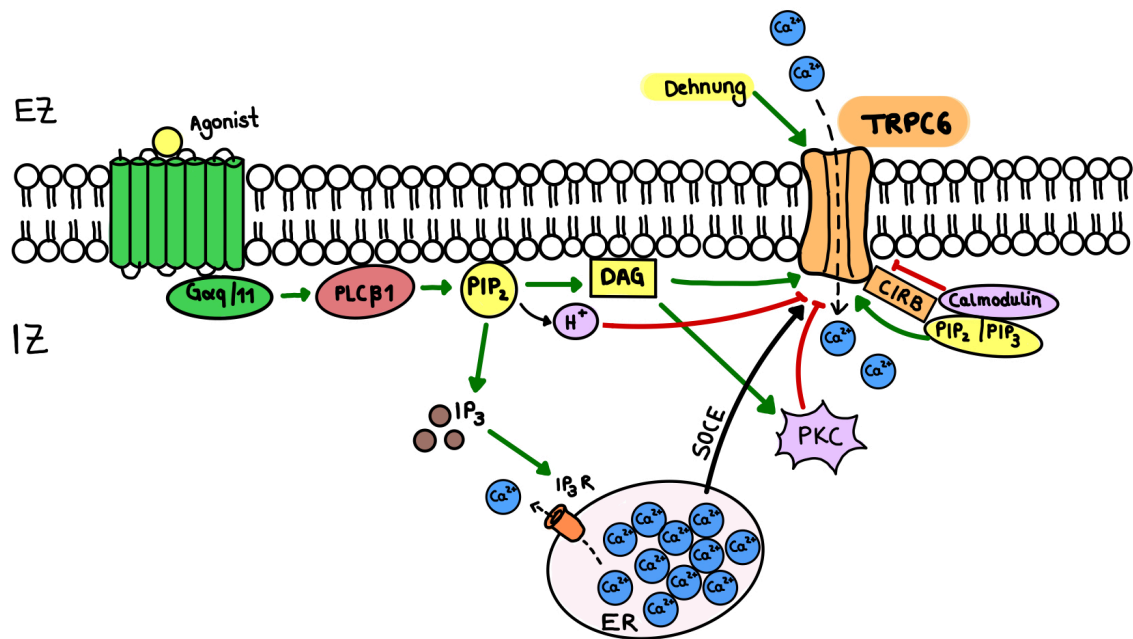


Abbildung 3: Wichtige Regulationsmechanismen der TRPC6-Kanalaktivität

Eigene Darstellung, modifiziert nach Sun et al., 2014 [148]

Das Gating des TRPC6-Kanals ist komplex und wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, die bis heute noch nicht vollständig erforscht sind [34].

TRPC6 wurde als stark rezeptorgesteuerter Kanal mit geringer Basalaktivität identifiziert [59]. Die Aktivierung erfolgt unter anderem durch Agonisten heterotrimerer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (G Protein-coupled receptors, GPCRs), die über den Phospholipase C (PLC) -Weg signalisieren [22,59].

Bindet ein Agonist an den GPCR vom Typ $G_{\alpha q/11}$ wird eine Signalkaskade initiiert, die u.a. zur $PLC\beta 1$ -vermittelten Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) führt [22,163].

Neben der indirekten Aktivierung über GPCRs wurde auch eine direkte Aktivierung von TRPC6 durch DAG und Derivate der Arachidonsäure beschrieben [59,157].

Die DAG-Empfindlichkeit ist entgegen früheren Meinungen kein exklusives Merkmal der TRPC3/6/7-Familie und konnte auch für TRPC2 und TRPC5 nachgewiesen werden [81]. Der durch diese rezeptorvermittelte Aktivierung ausgelöste Calciumeinstrom wird als rezeptoroperierter Calciumeinstrom (ROCE) bezeichnet [33].

Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} wird unabhängig von einer TRPC6-Kanalaktivierung jedoch auch durch das im PLC-Weg anfallende IP_3 hervorgerufen, welches durch Bindung an Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER) die Freisetzung von gespeichertem Ca^{2+} aus dem ER induziert [123].

Zusätzlich zu dem ROCE wird in der Literatur ein speicheroperierter Calciumeinstrom (SOCE) bzw. kapazitativer Calciumeinstrom durch TRPC6-Kanäle diskutiert [33]. Gemeint ist ein Calciumeinstrom durch Aktivierung speichergesteuerter Kanäle der Plasmamembran infolge einer Erschöpfung der Calciumspeicher im ER, erstmals beschrieben durch James Putney Jr. [119].

Kürzlich wurde gezeigt, dass TRPC6, Orai2 (calcium release-activated calcium modulator 2) und STIM2 (stromal interaction molecule 2) am neuronalen speicheroperierten Calciumeintrag beteiligt sind [190,191]. STIM2 fungiert hierbei im ER als Sensor für die Calciumkonzentration und führt im Falle eines Calciumabfalls über eine Interaktion mit Orai2- und TRP-Kanälen in der Plasmamembran zu einem Calciumeinstrom [190].

Eine Beeinflussung der TRPC6-Kanalaktivität erfolgt außerdem durch Protonen, die u.a. bei der $\text{PLC}\beta_1$ -vermittelten Hydrolyse anfallen und insgesamt eine hemmende Wirkung auf die Kanalaktivität zeigen [135]. Für PIP_2 und seine Vorstufen wurde ebenfalls ein gering hemmender Effekt auf die TRPC6-Kanalöffnung nachgewiesen [163]. Durch seine Rolle als Substrat für die $\text{PLC}\beta_1$ -vermittelte DAG-Synthese besitzt PIP_2 jedoch auch aktivierende Eigenschaften [68,163]. Die Regulation des TRPC6-

Kanals erfolgt außerdem über das sogenannte CIRB-Motiv, das eine Bindung von Phosphoinositiden (z. B. PIP₂/PIP₃) oder Calmodulin erlaubt [79]. Die Bindung von Phosphoinositiden wie PIP₂ /PIP₃ führt zur Unterbrechung der Calmodulin-Bindung und reguliert auf diese Weise die Calmodulin vermittelte Hemmung des TRPC6-Kanals [79]. Calcium, welches für die Bindung von Calmodulin an TRPC6 erforderlich ist, kann sowohl aktivierend als auch hemmend auf die TRPC6-Kanalaktivität wirken [12,140].

Ein weiterer Regulationsmechanismus besteht in der Proteinkinase-C (PKC)-abhängigen Phosphorylierung des TRPC6-Kanals oder der GPCRs [14,21]. Die PKC wird DAG abhängig aktiviert und führt über Phosphorylierung nachweislich zu einer Hemmung der TRPC6-Kanalaktivität [14]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TRPC6 durch H₂O₂ über einen von Cysteinoxidation abhängigen Weg aktiviert werden kann [49]. Nicht zuletzt ist die Mechanosensitivität des TRPC6-Kanals zu nennen und seine Stimulation durch dehnungsinduzierte Ausdünnung der Plasmamembran [144].

3.1.6.4 Pathophysiologische Relevanz

Der TRPC6-Kanal wird in verschiedenen Organen exprimiert und ist durch seine Calciumionen-Permeabilität an diverse Signalwegen und einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt [22,128,163]. Er wird unter anderem in Nieren, Muskeln, Herz, Lunge und im Gehirn des Menschen exprimiert [41,69,126,164,182]. Mithilfe von Studien an Human- und Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine Funktionsstörung des TRPC6-Kanals unmittelbar an der Krankheitsentstehung beteiligt ist. Eine mögliche Relevanz konnte unter anderem für kardiale, pulmonale, vaskuläre, renale, onkologische sowie neurologische Pathologien nachgewiesen werden [128,163].

3.1.6.4.1 TRPC6 in der Kardiologie

Im Bereich der Kardiologie stellt TRPC6 möglicherweise ein Ziel der Kardioprotektion dar. Xie et al., 2012 wies am Mausmodell nach, dass eine kardiale Überexpression des Kationenkanals mit Herzumbau und -hypertrophie assoziiert ist [178]. Diese Vermutung wird durch weitere tierexperimentelle Studien bestätigt, in welchen TRPC6-Inhibitoren die Herzfunktion schützten, indem sie die pathologische Herzhypertrophie und ein stressinduziertes kardiales Remodeling hemmten [87,136]. Als zugrundeliegenden Mechanismus vermuten die Autoren eine Hemmung des Angiotensin-II-Signalwegs. Nikolova-Krsteovski et al., 2017 konnte zudem zeigen, dass TRPC6 als Vorhof-Mechano-Sensor den parakrinen Crosstalk zwischen atrialem Endokard und atrialen Kardiomyozyten reguliert und so möglicherweise Vorhofflimmern verhindern kann [102]. Jacobs et al., 2022 lieferte Hinweise für eine immunhistochemische Expression des TRPC6-Kanalproteins in humanem kardialen Gewebe, insbesondere in Kardiomyozyten und intramuskulären Arteriolen, und unterstützt die bestehenden Vermutungen über die Rolle von TRPC6 für die Pathophysiologie des Herzens [69].

3.1.6.4.2 TRPC6 in der Pulmologie

TRPC6 scheint weiterhin an der Pathogenese verschiedener pulmonaler Erkrankungen beteiligt zu sein. Das Spektrum reicht von Mukoviszidose über die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Asthma, Lungenödem und Lungenfibrose bis hin zur pulmonalen Hypertonie [3,43,58,128,169,171,183].

Es wurde eine TRPC6-Expression in den glatten Muskelzellen und bronchialen Epithelzellen der menschlichen Atemwege nachgewiesen [28]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TRPC6 u.a. DAG-vermittelt sowie über die Aktivierung des toll-like receptor 4 (TLR4) zu einem Calciueinstrom in die Lungenendothelzellen und

einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität führt [152]. Passend hierzu wird eine Beteiligung von TRPC6 an der Entstehung von Lungenfibrose und Lungenödemen vermutet [58,124,171].

Auch für die Pathophysiologie der Covid-19-Pneumonie wird eine Beteiligung des TRPC6-Kanals vermutet. In der erkrankten Lunge konnte immunhistochemisch eine erhöhte TRPC6-Proteinexpression in entzündlichen Läsionen, zellulären Infiltraten, fibrosiertem Gewebe und in erweiterten Kapillaren festgestellt werden [82]. Mehrere Studien konnten darüber hinaus eine mögliche Beteiligung von TRPC6 im Rahmen der Hypoxie-vermittelten pulmonalen Vasokonstriktion nachweisen [55,89,165,177]. Chronische Hypoxie konnte als Aktivator des TRPC6-Kationenkanals im Ratten und Mausmodell identifiziert werden und erhöhte zugleich dessen Expression [165].

Zhao et al., 2022 brachte den Gefäßumbau von Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie in direkten Zusammenhang mit dem TRPC6-vermittelten Ca^{2+} -Fluss in humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen und zeigte TRPC6 in der Lunge als mechanosensitiven durch Membrandehnung aktivierbaren Kationenkanal [193]. Die Ergebnisse der Studie lassen an neue therapeutische Möglichkeiten der pulmonal arteriellen Hypertonie durch den gezielten Einsatz negativer TRPC6-Kanalmodulatoren denken.

Für die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) konnte gezeigt werden, dass die Proliferation glatter Muskelzellen in vitro durch Noxen wie Nikotin ausgelöst und vermutlich über einen TRPC6-abhängigen Signalweg vermittelt wird [61]. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Aktivierung von Alveolarmakrophagen, die eine Schlüsselrolle in der Pathogenese dieser Krankheit einnimmt, vom TRPC6-vermittelten Calciumeinstrom abhängt [43,128].

3.1.6.4.3 TRPC6 in der Nephrologie

Auch im Bereich der Nephrologie scheint TRPC6 an der Pathophysiologie einiger Erkrankungen beteiligt zu sein. Immunhistochemisch wurde bereits eine Expression des Kanalproteins in den Glomeruli, den parietalen Epithelzellen der Bowman Kapsel, im Tubulussystem sowie in den Sammelrohren der menschlichen Niere nachgewiesen [41]. Mehrere Studien zeigten, dass eine erhöhte Aktivität des TRPC6-Kanals zu einer Ca^{2+} -vermittelten Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts in den Podozyten führt und möglicherweise an der Pathogenese der Proteinurie beteiligt ist [65].

Eine gestörte Kanalfunktion im Sinne einer Überexpression von TRPC6 konnte pathophysiologisch in direkten Zusammenhang mit dem Auftreten der familiären fokalsegmentalen Glomerulosklerose, der Nierenfibrose und der diabetischen Nierenerkrankung gebracht werden [87,125,146,174,176]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Expression des Kationenkanals erhöht. Als zugrundeliegender Mechanismus wird die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II diskutiert, was wiederum zur Freisetzung von H_2O_2 und letztlich zur Aktivierung des redoxsensitiven TRPC6-Kanals führt [66,67].

3.1.6.4.4 TRPC6 in der Onkologie

Im Bereich der Onkologie zeigt sich der Kationenkanal von besonderer Bedeutung. Er wird von Krebszellen exprimiert und spielt für die Genese und das Voranschreiten vieler Krebsarten eine wichtige Rolle.

Eine starke Expression von TRPC6 wurde vor allem in Brustkrebszellen nachgewiesen [32,70]. Des Weiteren wird TRPC6 von Gliomen, Nieren-, Lungen-, Magen-, Leber-, Ösophagus- und Gebärmutterkarzinomen exprimiert sowie auch von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses [9,17,36,40,46,73,141,142,162].

Es wurde eine Assoziation von TRPC6 mit möglichen Brustkrebs-Onkogenen beschrieben, die zu einem verstärkten Tumorwachstum führen [128]. Außerdem konnte eine Aktivierung von TRPC6 durch die in Brustkrebszelllinien überexprimierten Tyrosinkinasen nachgewiesen werden [57]. Darüber hinaus wurde eine Interaktion von TRPC6 mit dem humanen Myxovirusresistenzprotein gezeigt, das eine starke Expression in Brustkrebszelltumoren aufweist [94].

Eine hohe TRPC6-Expression korrelierte in einer klinischen Studie bei Patient*innen mit Ösophaguskarzinom mit einer signifikant schlechteren Prognose [192]. TRPC6 konnte in diesem Zusammenhang als Regulator des G2-Phasenübergangs in der Tumorgenese des Ösophaguskarzinoms identifiziert werden und stellt somit ein mögliches therapeutisches Ziel zur Behandlung des Ösophaguskarzinoms dar.

Für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zeigte Wen et al., 2016 eine Steigerung der Wirksamkeit des Medikaments Doxorubicin durch eine Hemmung von TRPC6. Die Autoren vermuten außerdem eine Beteiligung des erhöhten Calciumeintrags über TRPC6 an der Multidrug-Resistenz von HCC-Zellen [172].

In den Proben von Nierenzellkarzinomen konnte ebenfalls eine deutlich erhöhte TRPC6-Expression nachgewiesen werden, wobei ein Zusammenhang zwischen TRPC6-Aktivität und der Zellproliferation menschlicher Nierenadenokarzinome beobachtet wurde [42,142].

Ähnliches wurde für die Pathogenese von Lungenkrebs berichtet. Es konnte gezeigt werden, dass der TRPC6 induzierte Calcium-Influx die Zellzyklusprogression fördert und zu einer verstärkten Proliferation der Krebszellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms führt [180]. Weiterhin wies Yang et al., 2016 nach, dass die gezielte Hemmung von TRPC6 mit einer Verringerung der Proliferation und Invasion von Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms einhergeht. Eine Nikotinexposition erhöhte

die TRPC6-Expression und -Aktivierung über einen HIF-1 α (alpha-Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1) abhängigen Signalweg [168].

Ähnliches konnte auch für die Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses (HNSCC) – die sechsthäufigste Tumorentität beim Menschen – gezeigt werden. Während HNSCC-Zellen eine deutlich erhöhte Transkription des TRPC6-Gens zeigten, konnte eine siRNA induzierter Ausschaltung von TRPC6 die Invasivität der HNSCC-Zellen deutlich verringern [9].

Die Expression von TRPC6 bei Prostatakarzinomen korrelierte mit dem Gleason-Score und der extrahepatischen Ausdehnung [184]. Es zeigte sich auch hier, dass der TRPC6-abhängige Calciuminflux die Proliferation der Krebszellen fördert und dass das Silencing von TRPC6 durch Anti-Sense-Hybrid-Depletion die Proliferation der Krebszellen hemmt [155].

Eine starke Expression von Spleißvarianten der TRPC6-Kanäle sowie auch von TRPC1-, TRPC3- und TRPC4-Kanälen wurde für Ovarialkrebszellen nachgewiesen [185]. Durch siRNA induzierte Ausschaltung von TRPC6 und hemmende TRPC-Antikörper konnte die Zellproliferation der Krebszellen verringert werden, wohingegen eine Überexpression von TRPC6 die Tumorgenese förderte. Des Weiteren scheint TRPC6 auch eine Rolle für die Tumorgenese des Zervixkarzinoms zu spielen [6].

Eine protektive Wirkung wurde für Vitamin D nachgewiesen [10]. Eine Supplementierung greift in den Calciumhaushalt ein und könnte die durch Calcium ausgelöste TRPC6-vermittelte Tumorgenese abschwächen.

3.1.6.5 TRPC6 im ZNS

3.1.6.5.1 Expression von TRPC6 im ZNS

Tierexperimentelle Studien zeigten eine breite Expression von TRPC6 im ZNS, u.a. in Kortex, Substantia Nigra, Hippocampus, retinalen Ganglienzellen, Thalamus, Hypothalamus und Cerebellum [148].

Eine besonders starke Expression des TRPC6-Kanalproteins konnte im Hippocampus der Maus nachgewiesen werden [194]. Mithilfe von Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass TRPC6 vor allem in postsynaptischen Strukturen des Hippocampus der Maus zu finden ist [194]. Weiterhin scheint das TRPC6-Kanalprotein im Hippocampus der Nager hauptsächlich in Pyramidenzellen, in Körnerzellen des Gyrus dentatus, in Interneuronen und in einigen Gliazellen exprimiert zu werden [75,101,186].

Über die Expression von TRPC6 im ZNS des Menschen liegen nur wenige Daten vor. Eine Studie von Riccio et al., 2002 zeigte eine breite Expression von humaner TRPC6 mRNA im menschlichen ZNS von zwei Männern und zwei Frauen [126]. Direkte immunhistochemische Nachweise am menschlichen Gewebe sind sehr selten. Ein immunhistochemischer Nachweis des TRPC6-Kanalproteins ist im menschlichen Hippocampus und Cerebellum bislang nach aktueller Studienlage noch nicht erfolgt. Vor diesem Hintergrund kommt der vorliegenden Arbeit eine besondere Relevanz zu, nicht zuletzt im Hinblick auf die Frage nach der Übertragbarkeit der bisherigen Studienergebnisse auf den Menschen und der Entwicklung neuer pharmakologischer und therapeutischer Strategien.

3.1.6.5.2 Funktionen von TRPC6 im ZNS

Der nichtselektive Kationenkanal TRPC6 fördert innerhalb des Zentralen Nervensystems sowohl das neuronale Wachstum, die synaptische Plastizität als auch

das Überleben von Neuronen [38,85,194]. Eine Fehlregulation des Kationenkanals wurde mit einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen in Verbindung gebracht [50,71,77,154,187]. Seine neuroprotektive Wirkung vermittelt TRPC6 wahrscheinlich über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-response-element-binding-protein). Es konnte gezeigt werden, dass eine TRPC6-Überexpression mit einer erhöhten Phosphorylierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase IV (CaMKIV) und des Transkriptionsfaktors CREB einherging und sowohl in kultivierten hippocampalen Neuronen und als auch in TRPC6-transgenen Mäusen die Spine-Bildung förderte [194]. Des Weiteren scheint der speicheroperierte Calciumeintrag des TRPC6-Kanals unter anderem über die Aktivität der CaMKII unmittelbar an der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität und an der Gedächtnisbildung beteiligt zu sein [115,117,147,190].

Außerdem wird eine Beteiligung von TRPC6 an den neuroprotektiven Effekten von BDNF (brain-derived neurotrophic factor) vermutet [72]. Darüber hinaus wirkt TRPC6 in Neuronen als endogener negativer Regulator der NMDA-Rezeptor-Aktivität und stellt somit ein potenzielles pharmakologisches Ziel zur Vermeidung einer exzitotoxischen, NMDA-Rezeptor-vermittelten Calciumüberladung dar [83,139].

3.1.6.5.3 TRPC6 und zerebrale Ischämie

Der Apoplex zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit [92]. Trotz der großen Relevanz des Krankheitsbildes existiert bisher keine etablierte Therapie, die die Genesung nach dem Infarktgeschehen wesentlich verbessert. Hinzu kommt, dass die aktuellen Therapieoptionen begrenzt sind und Thrombolytika mit einem Anwendungszeitfenster, das im Stundenbereich liegt, eine zeitlich begrenzte Wirksamkeit aufweisen [127]. Als Ursache für den Neuronenuntergang im Rahmen

des ischämischen Geschehens scheint die Calciumüberlastung eine zentrale Rolle zu spielen [8,189]. Pathophysiologisch liegt dem neuronalen Tod ein Ausfall der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ zugrunde, welcher über eine Depolarisation der Zellmembran zu einer überschießenden Glutamatfreisetzung führt, die wiederum über die Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors zu einem fulminanten Calciumeinstrom in die Neurone führt und neurotoxisch wirkt [138]. Der Einsatz von NMDA-Rezeptor-Blockern zur Verhinderung ischämischer Neuronenschäden führte in Studien am Menschen zu schwerwiegenden Nebenwirkungen [47,63].

Ein neues interessantes Therapieziel stellt der TRPC6-Kanal dar. Er führt zu einer selektiven Inhibition des NMDA-Rezeptors, welcher für die neurotoxische Calciumüberladung verantwortlich ist [139]. Die Hemmung des NMDA-Rezeptors erfolgt hierbei vermutlich über eine Calcineurin vermittelte Dephosphorylierung, da in kultivierten Hippocampus-Neuronen gezeigt werden konnte, dass die hemmende Wirkung von TRPC6 auf die NMDA-Rezeptoraktivität in Anwesenheit des Calcineurininhibitors FK506 aufgehoben wurde [83,139].

Die neuroprotektive Funktion von TRPC6 wurde in vivo bestätigt. TRPC6-transgene Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach zerebraler Ischämie kleinere Infarkt volumina, eine geringere Mortalität und eine bessere Erholung [83].

Passend hierzu zeigte Du, et al., 2010 in vitro eine spezifische Herunterregulation von TRPC6 in Hippocampusneuronen nach Ischämie [38]. Eine Hemmung der Calpain-vermittelten TRPC6-Proteolyse führte in vivo über den CREB-Signalweg zu einem geringeren Infarktvolumen und verbesserte die kognitive Leistung, wohingegen eine Hemmung von TRPC6 die Empfindlichkeit gegenüber Ischämie erhöhte [38].

Neben vielen Studien, die über die neuroprotektive Funktion des TRPC6-Kanals berichten, deuten einige experimentelle Daten daraufhin, dass eine Überexpression des

Kanals mit einer erhöhten Aktivierung des NMDA-Rezeptors einhergeht und somit über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration neurotoxisch wirkt [19]. Die Kontroversen bezüglich der Erkenntnisse zur pathophysiologischen Rolle von TRPC6 bei Ischämie könnten auf unterschiedlichen Rahmenbedingungen der Experimente zurückgeführt werden. Andererseits könnte man darauf schließen, dass das Krankheitsbild Heterogenitäten in Bezug auf die Rolle der TRPC6-Kanalfunktion aufweist.

Zusammenfassend stellt jedoch die Entwicklung selektiver TRPC6-Kanalmodulatoren zur Regulation der TRPC6-Kanalfunktion ein mögliches relevantes Therapieziel zur Behandlung zerebraler Ischämie und neurodegenerativer Erkrankungen dar mit dem Potenzial der Neuroprotektion und der positiven Beeinflussung des Krankheitsverlaufs.

3.1.6.5.4 TRPC6- und Alzheimer

Als Ursache des Gedächtnisverlusts im Rahmen der Alzheimer Demenz wird ein synaptisches Versagen, insbesondere durch den Verlust und die Destabilisierung dendritischer pilzförmiger (Mushroom-) Spines diskutiert [11,116]. Es wird angenommen, dass die hippocampalen Mushroom-Spines wesentlich an der Gedächtnisspeicherung beteiligt sind [13].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der speicheroperierte Calciumeintrag über die Aktivierung der CaMKII eine zentrale Rolle für die Stabilisierung der Mushroom-Spines spielt [147]. Passend hierzu wurde gezeigt, dass der Expressionsgrad von STIM2 in hippocampalen Neuronen im Alzheimer-Mausmodell sowie in einem zellulären Modell amyloidbedingter Synaptotoxizität herunterreguliert ist [115]. Außerdem zeigten Patienten mit Alzheimer eine signifikante Verringerung der Gesamtexpression der TRPC6-mRNA in peripheren Leukozyten [20]. Eine

Überexpression von TRPC6 hingegen führte sowohl in kultivierten hippocampalen Neuronen als auch in TRPC6-transgenen Mäusen über den CREB-Signalweg zu einer gesteigerten Ausbildung der dendritischen Spines im Hippocampus [194]. TRPC6-transgene Mäuse zeigten neben einem gesteigertem neuronalen Wachstum in der CA1-Region des Hippocampus weiterhin eine deutliche Verbesserung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses [194]. Neben diesen positiven Effekten hemmt TRPC6 nachweislich die γ -Sekretase und führt dadurch zur verminderten Bildung des neurotoxisch wirkenden Beta-Amyloids [166].

Interessanterweise wurde eine Koinzidenz von zerebraler Ischämie und Alzheimer beobachtet, was darauf hindeuten könnte, dass die Pathogenese von Alzheimer und zerebraler Ischämie gemeinsame Mechanismen aufweist [106].

Die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung der neurodegenerativen Erkrankung sind bisweilen begrenzt: Der zur Therapie des Krankheitsbildes eingesetzte NMDA-Rezeptorblocker Memantin lindert im frühen bis mittleren Stadium der Alzheimer-Krankheit lediglich vorübergehend die Symptome [134,156]. Die Relevanz von TRPC6 als mögliches therapeutisches Target zur Behandlung von Alzheimer wird durch eine weitere Studie gestützt, welche zeigt, dass die Ausschaltung des TRPC6-Gens zu einer erheblichen Beeinträchtigung des räumlichen Lernens, des Arbeitsgedächtnisses und des sozialen Erkennungsgedächtnisses führt [179].

3.1.6.5.5 TRPC6 und Autismus

Des Weiterem werden Mutationen im TRPC6-Gen mit einer gestörten neuronalen Entwicklung assoziiert [50]. Ein Funktionsverlust des Kanalproteins führte in mehreren Studien zur Ausbildung von Verhaltensmustern, wie sie für den Formenkreis der Autismus-Spektrum-Störungen typisch sind [50,111].

3.1.6.5.6 TRPC6 und neuropathische Schmerzen

TRPC6 ist an der Wahrnehmung von Schmerzen beteiligt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation der Nozizeption in Neuronen des Hinterhorns durch TRPC6, TRPC1 und TRPV4 erfolgt und dass TRPC6 an der Entstehung von mechanischer Hyperalgesie und neuropathischen Schmerzen beteiligt ist [1]. Passend hierzu wurde immunhistochemisch durch Western-Blot-Analysen gezeigt, dass die TRPC6-Expression im Hinterhorn und in der Mikroglia nach einer Nervenverletzung signifikant erhöht ist [167]. Weiterhin konnte Wang et al., 2020 zeigen, dass Larixylacetat – ein Hauptbestandteil von Lärchenharz – durch die Hemmung der TRPC6-Kanalfunktion analgetisch und entzündungshemmend wirkt [167].

3.1.6.5.7 TRPC6 und seine Rolle für Gliome

Maligne Gliome zählen zu den häufigsten Hirntumoren des Erwachsenen [107,108]. Darunter stellt das Glioblastom den bösartigsten und aggressivsten primären Hirntumor des Menschen dar [109]. Auch unter maximaler Therapie beträgt die mediane Überlebenszeit weniger als ein Jahr [109]. Aufgrund des bislang unzureichenden Therapieansprechens stellt sich die Frage nach neuen spezifischen molekularen Zielstrukturen als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Ein mögliches neues Therapieziel stellt der TRPC6-Kationenkanal dar. Es konnte gezeigt werden, dass Glioblastom-Tumorproben eine vermehrte Expression von mRNA aufweisen, die für den TRPC6-Kanal kodiert und dass die Expression der TRPC6-mRNA mit dem Tumorgrad zunimmt [2,36]. TRPC6 scheint unmittelbar an der Aggressivität, Invasivität und Behandlungsresistenz der Tumorentität beteiligt zu sein [24]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Hypoxie als positiver Einflussfaktor für die Aggressivität der Glioblastome über die Aktivierung von Notch1 zu einer Hochregulation der TRPC6-Kanalexpression führt [24,44]. Der TRPC6-vermittelte

Calciumeinstrom führt unter anderem durch die Aktivierung des calcineurin-nuclear factor of activated T-cells (NFAT)-Signalwegs zu einer gesteigerten Invasivität, Angiogenese und einem gesteigerten Tumorwachstum [24,56,60,120]. TRPC6 scheint nach aktuellem Wissensstand der einzige TRP-Kanal zu sein, der direkt an der Glioblastom-Angiogenese beteiligt ist [25].

3.1.6.5.8 TRPC6 und Epilepsie

Die Rolle von TRPC6 wurde auch für das Krankheitsbild der Temporallappenepilepsie untersucht. Sie ist die häufigste Form der Epilepsie und durch spontan wiederkehrende Anfälle gekennzeichnet [137]. Im Falle der Therapieresistenz rücken chirurgische Verfahren wie die anteromediale Temporallappenentfernung mit Hippokampektomie in den Vordergrund [145].

Die molekularen Mechanismen der Epileptogenese der Temporallappenepilepsie sind nicht genau bekannt. Hippocampussklerose, astrogliale Proliferation, Moosfaserausbreitung und synaptische Reorganisation stellen jedoch pathologische Veränderungen und Voraussetzungen für die Ausbildung der Temporallappenepilepsie dar [133].

Bei Patient:innen mit therapieresistenter Temporallappenepilepsie konnte eine signifikante Erhöhung der TRPC3- und TRPC6-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden [186]. Gleiches gilt für den pilocarpininduzierten Status epilepticus im Mausmodell. Hier konnte eine erhöhte Proteinexpression von TRPC6 und TRPC3 speziell in der CA3-Region des Cornu ammonis festgestellt werden [186]. Es wird vermutet, dass TRPC6 an der Regeneration der epileptogenen Umstrukturierung beteiligt ist, wohingegen TRPC3 die dem Krankheitsbild zugrundeliegende Moosfasersprossung in der CA3-Region fördert [186]. Passend zu der vermuteten Rolle von TRPC6 für die dendritische Plastizität wurde berichtet, dass

TRPC6 hauptsächlich an exzitatorischen postsynaptischen Bereichen exprimiert wird [194]. Es wird außerdem diskutiert, ob TRPC6 über den extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2)-Signalweg die neuronale Erregbarkeit durch Regulation der subzellulären Lokalisation von Kaliumkanälen (Kv4.3) modulieren kann [76].

In jedem Fall bleibt die Rolle von TRPC6 für die Pathophysiologie der Epilepsie ein spannendes Forschungsfeld und eröffnet möglicherweise neue Therapieoptionen für eine zielgerichtete Therapie.

3.2 Aufbau und Funktion des menschlichen Hippocampus

Der paarig angelegte Hippocampus gehört zum limbischen System und befindet sich an der Medialwand des Unterhorns des Seitenventrikels im Lobus temporalis [4,37,158]. Er stellt den Hauptteil des dreischichtigen Archikortex dar [4,158]. Als entscheidende Struktur innerhalb des Papez-Neuronenkreises ist der Hippocampus unmittelbar an den Prozessen des Lernens und der Gedächtnisbildung beteiligt [158]. Anatomisch besteht der Hippocampus aus dem Gyrus dentatus und dem Cornu ammonis. Funktionell gehören weitere Strukturen zum Hippocampus, sodass korrekterweise von der Hippocampusformation gesprochen wird [4]. Diese besteht aus Gyrus dentatus, Cornu ammonis und Subiculum [4]. In manchen Quellen wird außerdem die Regio entorhinalis als Haupteingang zum Hippocampus zur Hippocampusformation hinzugezählt. Abbildung 4 veranschaulicht die histologische Gliederung anhand eines HE-gefärbten Frontalschnittes des Hippocampus.

Hervorzuheben ist die Funktion des Hippocampus als zentrale Schaltstelle für die Langzeitpotenzierung [158]. Wichtig für die Induktion der Langzeitpotenzierung sind zirkulierende Impulse durch Ausbildung von Neuronenkreisen (vgl. Abbildung 5) innerhalb der funktionellen Anteile des Hippocampus [158].

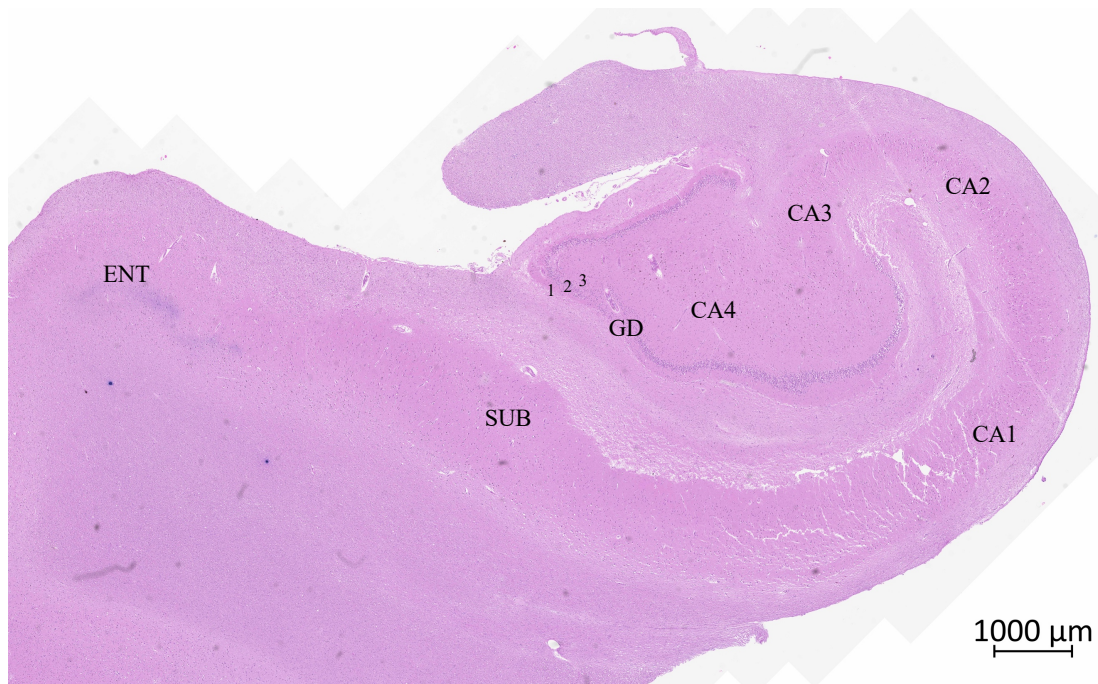


Abbildung 4: Frontalschnitt des Hippocampus mit Abbildung der Hippocampusformation

Das Cornu ammonis lässt sich in die vier Regionen CA1 (enthält viele kleine Pyramidenzellen), CA2 (enthält besonders große Pyramidenzellen), CA3 (lockere Anordnung der Pyramidenzellen) und CA4 (Endplatte) einteilen. Der Gyrus dentatus imponiert als C-förmige Struktur und gliedert sich von außen nach innen in Stratum moleculare (1), Stratum granulare (2) und Stratum multiforme (3). Über das Subiculum (SUB) geht der Hippocampus in den entorhinalen Kortex (ENT) des Gyrus parahippocampalis über.

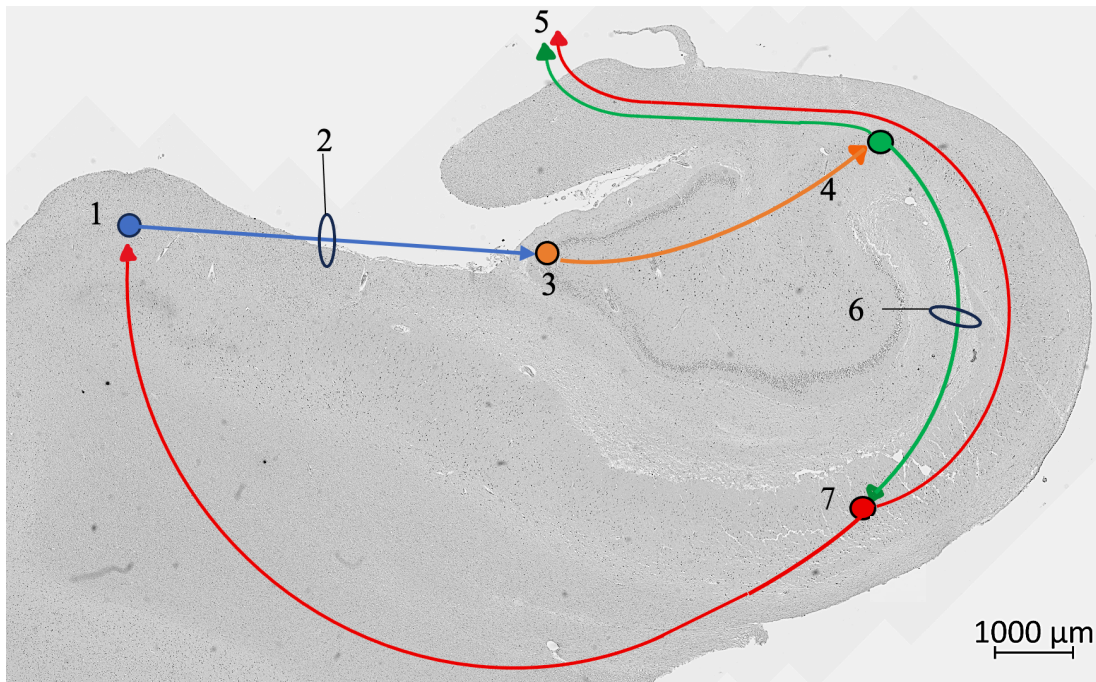


Abbildung 5: Schema des erregenden Neuronenkreises zur Ausbildung der Langzeitpotenzierung bei der Gedächtnisbildung

Eigene Darstellung in Anlehnung an Trepel, 2017, Elsevier [158]

Die Pyramidenzellen der Area entorhinalis (1) projizieren über den Tractus perforans (2) auf die Körnerzellen des Gyrus dentatus (3). Die Axone der Körnerzellen (Moosfasern) projizieren auf die Pyramidenzellen der CA3-Region (4). Diese projizieren gemeinsam mit den Pyramidenzellen der CA1- und CA2-Region über die Fimbria hippocampi und den Alveus zu den efferenten Zielen des Hippocampus (z.B. Septum und Corpora mamillaria) (5). Über die Schaffer-Kollaterale (6) werden die Impulse aus der CA3-Region zu den Pyramidenzellen der CA1-Region (7) geleitet, die zu Subiculum und dem entorhinalen Kortex projizieren, sodass sich ein geschlossener erregender Schaltkreis ergibt, der mit seinen zirkulierenden Impulsen maßgebend für die Langzeitpotenzierung ist.

3.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

1. Gelingt ein Proteinnachweis von TRPC6 im menschlichen Hippocampus bzw. im menschlichen Kleinhirn?
2. Lässt sich ein Unterschied im Proteinnachweis bezüglich der histologischen Gliederung feststellen?
3. Kann ein TRPC6-Nachweis auch in menschlichen Proben von Glioblastomen gezeigt werden und somit ein direkter Zusammenhang zu Pathologien des menschlichen ZNS vermutet werden?
4. Zeigt sich ein Einflussfaktor für das Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises von TRPC6 wie z.B. Geschlecht, Fixierung oder Lokalisation (rechte/linke Hemisphäre)?

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Verwendete Antikörper

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-TRPC6	Kaninchen	Alomone labs, Jerusalem, Israel	1:100

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Sekundärantikörper	Spezies	Hersteller
Anti-rabbit HRP	Ziege	Ref.: A10547; Invitrogen, Carlsbad, USA

4.1.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Eosin	Zentr. ChL, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Zentr. ChL, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium RotiHistoKit	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fixierlösung nach Weigner	Ref.: 27796; Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Fixierlösung: Neue Basler Lösung nach Kurz	Ref.: 27244; Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
ImmPACT DAB EqV Substrate	Ref.: SK-4103; Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kontrollpeptid (TRPC6 Blocking Peptide)	Ref.: BLP-CC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Ref.: 700212; Zentr. ChL., Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	Ref.: G6767-500ML; Sigma Aldrich, Zentr. ChL., Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Wasserstoffperoxid 35 % rein	Ref.: UN2014; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

4.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Ausgangssubstanzen zur Herstellung der verwendeten Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller
10x Citratpuffer pH 6,0	Ref.: ab93678; Abcam, Cambridge, Großbritannien
10x PBS Pulver pH 7,4	Ref.: 1105.1; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer

1x Citrat-Puffer pH 6 zur Antigendemaskierung: Angesetzt aus 100x Citrat-Puffer pH 6 in Aqua dest. (Verhältnis 1:100)
Negativkontroll-Lösung: Kaninchenserum in PBS (1:500): Angesetzt aus Stammlösung (1:50)
10 % NGS-Blockier-Lösung: 10 % Normal Goat Serum und 0,1 % Triton X-100 in PBS
Peroxidase Blockierung: 3 % H ₂ O ₂ in 1x PBS
Peroxidase Substratlösung: Angesetzt aus zwei Stammlösungen im Verhältnis 1:1: ImmPACT DAB EqV Reagent 1 (Chromogen) und ImmPACT DAB EqV Reagent 2 (Diluent)
Waschpuffer 1x PBS: Angesetzt aus 10x PBS in Aqua dest. (Verhältnis 1:100)
Verdünnungspuffer der Antikörper: 10 % Normal Goat Serum und 0,1 % Triton X-100 in PBS

4.1.4 Verwendete Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Ausgießstation (MPS/P2)	SLEE medical, Mainz, Deutschland
Einkanalpipetten (UHP)	VWR International, Pennsylvania, USA
Karussell Gewebeeinbeter MTP	SLEE medical, Mainz, Deutschland
Kühlanlage der Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Kühlplatte	SLEE medical, Mainz, Deutschland
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Mikroskopiersoftware ZEN lite	ZEISS Microscopy, Deutschland
Mikrotom Microm RM 2025	Heidelberg Instruments, Heidelberg, Deutschland
GFL Paraffinbad 1052	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Slide-Scanner-Mikroskop	ZEISS Axio Scan.Z1
Vortexer-Vortex Mixer	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Wärmeplatte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wärmeschrank	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel, Deutschland

4.1.5 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Dako pen®, Delimiting Pen	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
Deckgläser	Zentralmagazin Universitätsklinikum des Saarlandes, Deutschland
Feuchtkammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Filtrierpapiere	Ref.: 534018, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
Mikrotomklingen	Leica-Microsystem, Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen	Carl Roth, Zentr. ChL, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Sterile Skalpellklingen	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland

4.1.6 Gewebeproben

Bei den in dieser Forschungsarbeit verwendeten Gewebeproben handelte es sich um menschliches Gewebe des Zentralen Nervensystems.

Die Probenentnahme und -aufbereitung erfolgte an Körperspendern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes. Es wurden Proben des menschlichen Hippocampus und des menschlichen Kleinhirns entnommen.

Zusätzlich wurden freundlicherweise zwei in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus menschlichen Glioblastomen durch die Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes bereitgestellt. Dadurch kann mit dieser Arbeit auch eine Aussage über die mögliche Relevanz des TRPC6-Kanals für Pathologien des ZNS getroffen werden.

4.2 Methoden

4.2.1 Körperspende

Die selbstständig entnommenen Gewebeproben stammen allesamt von Körperspendern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes, die bereits zu Lebzeiten in die Körperspende eingewilligt haben.

Während viele Forschungsinstitute dazu angehalten sind, ihre Forschung an anderen Spezies wie bspw. Mäusen oder Ratten auszurichten, privilegiert das Konzept der Körperspende zur wissenschaftlichen Arbeit an menschlichem Gewebe in Kongruenz mit dem Prinzip der Selbstbestimmung sowie ethischen Gesichtspunkten.

4.2.2 Konservierung der Körperspender

Um die Körperspenden für das wissenschaftliche Arbeiten haltbar zu machen, wurden diese durch Injektion einer Fixierlösung konserviert. Die untersuchten Proben wurden sowohl aus Formalin- als auch aus Nitropökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol (NEP)-fixierten Körperspendern gewonnen. Die Zusammensetzung der Fixierlösungen kann Tabelle 8 und 9 entnommen werden.

Tabelle 8: Formalin-Fixierung – neue Basler Lösung nach Kurz

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

Tabelle 9: NEP-Fixierung nach Weigner

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

Pro Konservierung wurden 10 bis 15 L der jeweiligen Fixierlösung injiziert. Der Zugang erfolgte über die rechte Femoralarterie. Mittels einer Einmalkanüle der Größe 18 Gauge wurden obere und untere Extremität, Regio glutealis, Regio nuchae sowie Finger- und Zehenbeeren nachinjiziert.

Zur äußeren Fixierung der Körperspender wurden diese für einen Zeitraum von mindestens vier Monaten in drei- bis fünfprozentiger Formalin-Lösung gelagert. Anschließend wurden die Körperspender bei 14 °C in einem luft- und wasserdicht verschweißten „Pharopack-Sarg“ in der Thalheimeranlage aufbewahrt.

4.2.3 Entnahme der Gehirne

Die eigenhändige Entnahme der insgesamt sechs Gehirne stellte sich als komplexen Prozess dar. Sie erfolgte mit größter chirurgischer Sorgfalt und Präzision, um eine Schädigung des vulnerablen Nervengewebes zu vermeiden und eine gute Qualität der Proben zu gewährleisten.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Probenentnahme war die genaue Kenntnis der Kopf- Hals- und Neuroanatomie des Menschen.

Vor Beginn der Organentnahme wurde sichergestellt, dass der Schädel von allen Seiten optimal bearbeitet werden konnte. Durch Unterpolsterung der Schultern und Reklination des Kopfes konnten die dorsalen und dorsotemporalen Anteile des Schädels erreicht werden. Während der gesamten Entnahme war eine ausreichende manuelle Fixierung des Schädels notwendig. Das verwendete Instrumentarium für die Gehirnentnahme umfasste Skalpell, Knochensäge, Hammer und Meißel.

Ausgehend von der Mittellinie, ca. vier Zentimeter kranial der Glabella erfolgte der Hautschnitt mit dem Skalpell. Dieser verlief zirkulär entlang des Os occipitale des Dorsokraniums. Als Orientierungsmarke zur Führung des Skalpells diente hierbei die Protuberantia occipitalis externa (vgl. Abbildung 6). Unter Freilegung des

Schädelknochens wurden äußere Haut, Galea aponeurotica und Bindegewebe sowie die Musculi temporoparietales und occipitofrontales durchtrennt.

Anschließend wurde die Schädelkalotte Schritt für Schritt mit der Knochensäge entlang der Schnittlinie eröffnet. Bestehende Knochenbrücken wurden mit Hammer und Meißel unter besonderer Vorsicht durchtrennt. Nach vollständiger zirkulärer Eröffnung des Kraniums wurde das Neurokranium mit einem Knochenspalter vorsichtig unter deutlichem Kraftaufwand vom Viscerocranium entlang der Schnittöffnung aufgehebelt. Hierdurch wurde ein Knochenspalt erzeugt. Dieser stand durch die Anheftungen des Gehirns an dem inneren Schädelknochen über die Lamina externa der Dura mater encephali unter starker Zugspannung. Durch das vorsichtige Lösen dieser Befestigungen mit dem Skalpell, konnte das Gehirn mobilisiert werden. In einem nächsten Schritt wurden zwei Schnitte entlang des Tentorium Cerebelli gesetzt, wodurch der Hirnstamm erreicht werden konnte. Nach Durchtrennung des basalen Hirnstamms und der Hirnnerven mit dem Skalpell erfolgte die Bergung des Gehirns und dessen Lagerung in dreiprozentiger Formalin-Lösung.

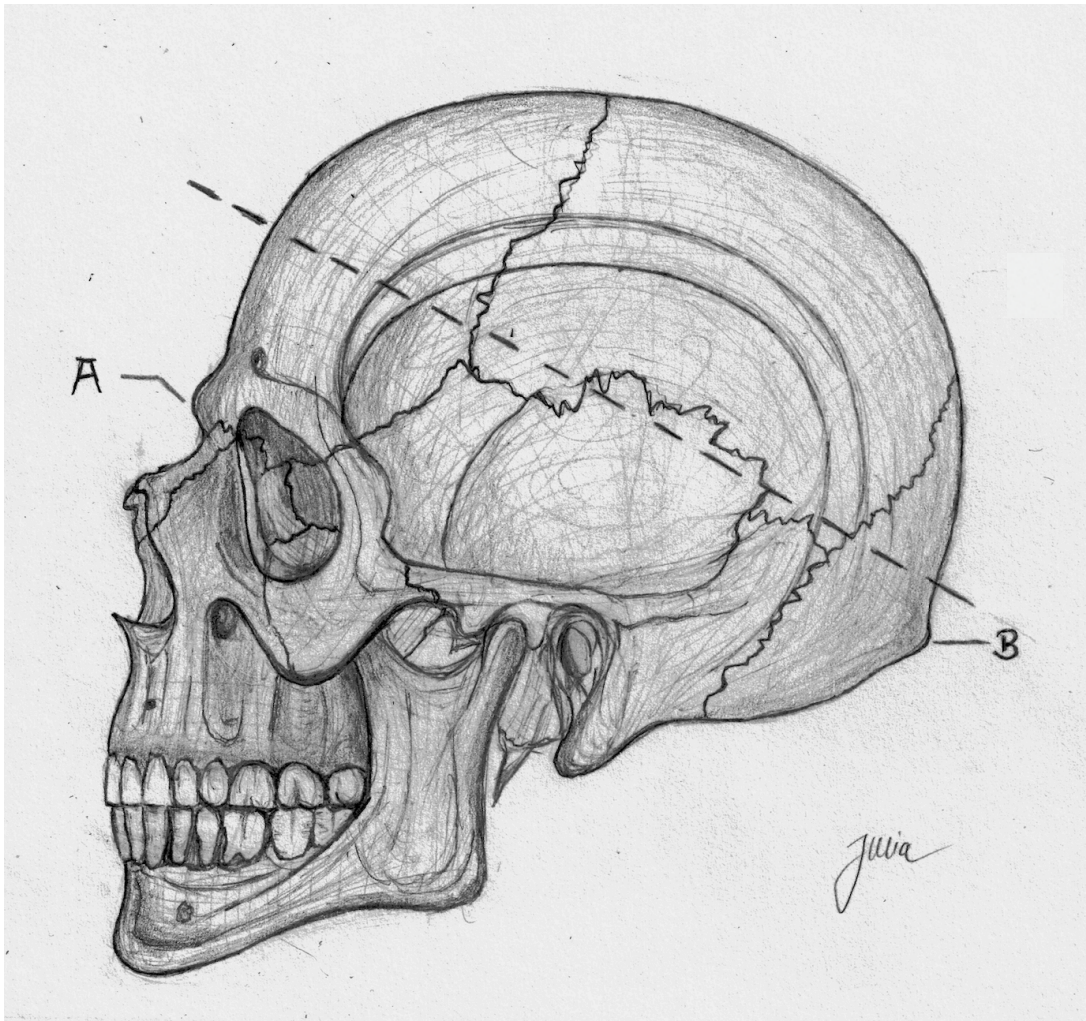


Abbildung 6: Zeichnung des menschlichen Schädels mit anatomischen Orientierungspunkten und Schnittführung

Beschriftung:

A: Glabella

B: Protuberantia occipitalis externa

— — — Kennzeichnung der Schnittführung

Tabelle 10 liefert eine Übersicht über die wichtigsten Informationen zu den entnommenen Gehirnen und den zugehörigen Körperspendern.

Zur besseren Übersicht wurden die sechs Gehirne alphabetisch durchnummeriert (A bis F). Alle hier aufgelisteten Gehirne wurden eigenhändig im Präparier-Saal des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes an Körperspendern entnommen.

Tabelle 10: Nomenklatur der entnommenen Proben mit Angabe über die Fixierung und Aufführung weiterer spenderspezifischer Daten

Nomenklatur	Fixierung	Geschlecht	Sterbealter
Gehirn A	NEP (05/2021)	w	91
Gehirn B	NEP (05/2021)	m	86
Gehirn C	Formalin (07/2021)	w	82
Gehirn D	NEP (07/2021)	m	90
Gehirn E	NEP (06/2021)	w	81
Gehirn F	NEP (06/2021)	m	81

4.2.4 Nachfixierung der entnommenen Gehirne

Zur Nachfixierung wurden die Gehirne für zehn Tage in verschlossenen Behältnissen in dreiprozentiger Formalin-Lösung gelagert. Im Anschluss wurden die Gehirne in vierprozentigem PFA in PBS (pH 7,4) über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach Abgießen des PFAs wurden die Gehirne am nächsten Tag bei 4 °C in PBS gelagert. Dieser Zustand erlaubte die Gewinnung von Proben durch Präparation des Gehirns.

4.2.5 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte ebenso wie die Entnahme der Gehirne in Eigenarbeit im Präparier-Saal des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes.

Es wurden Proben aus dem menschlichen Hippocampus und dem menschlichen Kleinhirn gewonnen. Die Hippocampi wurden an insgesamt sechs Gehirnen präpariert. Zusätzlich wurden an einem der sechs Gehirne (Gehirn A) zwei Proben des menschlichen Cerebellums entnommen.

4.2.5.1 Besonderheiten

Das Nervengewebe des menschlichen Gehirns zeichnet sich unter anderem durch seine besondere Empfindlichkeit gegenüber äußeren Reizen und Noxen aus, weshalb eine erfolgreiche Konservierung nicht immer garantiert ist.

Trotz Gleichbehandlung aller Gehirne bei der Entnahme und der Nachfixierung, zeigten vier der insgesamt sechs entnommenen Gehirne nach der Nachfixierung eine unzureichende Probenqualität. Sie wiesen eine weiche und bröselige Struktur auf, sodass eine weitere Bearbeitung und Präparierung der Gehirne nicht möglich war. Bei diesen Gehirnen handelte es sich konkret um die Gehirne B, D, E und F.

Aufgrund dieser Gegebenheiten wurden vier weitere Gehirne (Anatomie-Kurspräparate) zur Präparierung der Hippocampi herangezogen. Auch Teile dieser Gehirne wiesen eine instabile Struktur auf, sodass bei einem dieser Gehirne (Gehirn J) auf den Hippocampus der linken Hemisphäre verzichtet werden musste.

Eine Übersicht über alle aufbereiteten Gehirne zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11: Gesamtübersicht der Proben

A-F: Selbst entnommen an Körperspendern

G-J: Anatomie-Kurspräparate, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. T. Tschernig

*: Kennzeichnung der Gehirne, welche aufgrund unzureichender Probenqualität keine Verwendung fanden

Nomenklatur	Fixierung	Geschlecht	Sterbealter
Gehirn A	NEP (05/2021)	w	91
Gehirn B*	NEP (05/2021)	m	86
Gehirn C	Formalin (07/2021)	w	82
Gehirn D*	NEP (07/2021)	m	90
Gehirn E*	NEP (06/2021)	w	81
Gehirn F*	NEP (06/2021)	m	81
Gehirn G	Formalin (09/2019)	w	57
Gehirn H	NEP (01/2020)	m	72
Gehirn I	NEP (01/2020)	m	83
Gehirn J	NEP (01/2020)	w	83

4.2.5.2 Anatomische Präparation der Hippocampi

Ziel war es, den Hippocampus als ganze Struktur darzustellen. In diesem Sinne wurde eine En-bloc-Resektion durchgeführt. Diese erforderte eine genaue Planung der Schnittführung und eine ausgezeichnete Kenntnis über die Neuroanatomie des Menschen.

Nach Positionierung des Gehirns entsprechend der Lage im menschlichen Schädel wurde der Sulcus sagittalis aufgesucht. Entlang dieser anatomischen Leitstruktur erfolgte ein Sagittalschnitt unter Separierung der beiden Hemisphären.

Anschließend wurden Teile der Leptomeninx (Arachnoidea encephali und Pia mater encephali) mitsamt den umliegenden Blutgefäßen entfernt, sodass das Auffinden der Sulci als Orientierungspunkte für die Präparierung des Hippocampus erleichtert wurde. Anschließend erfolgte ein Horizontalschnitt durch den Sulcus temporalis mit kaudaler Begrenzung durch den Thalamus (vgl. Abbildung 7).



Abbildung 7: Schnittführung des Horizontalschnitts

A: Thalamus

B: Cornu anterior des Seitenventrikels

Die weitere Bearbeitung wurde am basalen Teil der beiden durch den Transversalschnitt entstandenen Hirnhälften fortgesetzt. Den Zugang zur Präparierung des Hippocampus bildete das im basalen Temporallappen gelegene Unterhorn (Cornu temporale) des Seitenventrikels. Durch Eröffnen des Seitenventrikels ließen sich schließlich Fornix und die okzipital gelegenen Anteile des Hippocampus darstellen. Unter vorsichtigem Präparieren mit dem Skalpell konnte der Verlauf des Hippocampus bis in die Tiefe dargestellt werden und dieser als ganze Struktur geborgen werden (vgl. Abbildung 8).

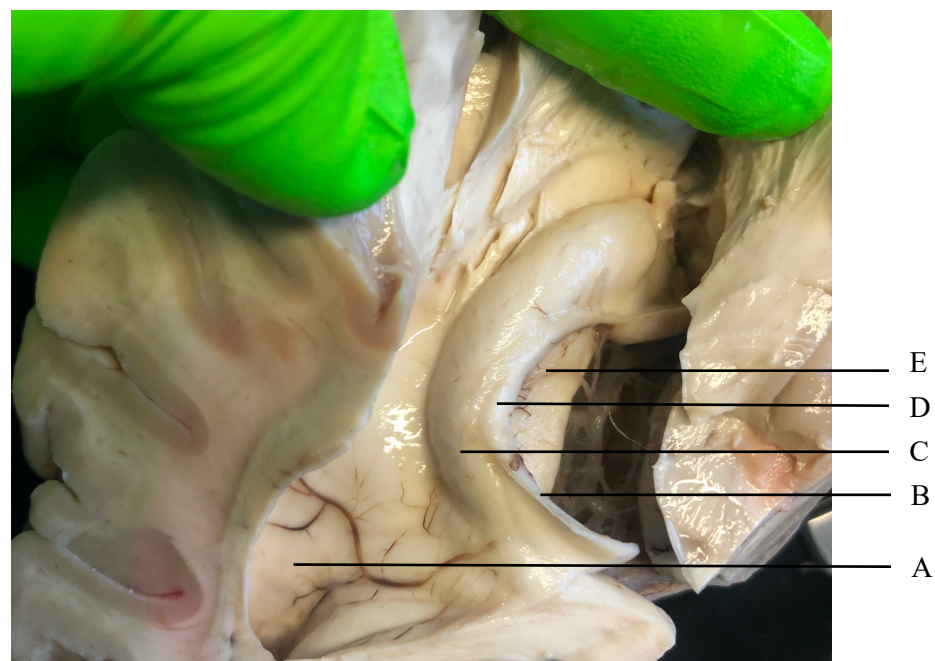


Abbildung 8: Darstellung des anatomischen Verlaufs des Hippocampus am Boden des Unterhorns (Cornu temporale)

A: Cornu temporale ventriculi lateralis

B: Fimbria hippocampi

C: Hippocampus

D: Gyrus dentatus

E: Gyrus parahippocampalis

Mit dem Skalpell wurde der Hippocampus durch zwei Frontalschnitte in drei gleichgroße Gewebeproben separiert (vgl. Abbildung 9). Die zugeschnittenen Gewebeproben wurden in Einbettkassetten verschlossen. Die Beschriftung der Proben erfolgte fortlaufend entsprechend der allgemeinen Gewebetopografie mit den arabischen Ziffern 1, 2 und 3. Ziffer 1 kennzeichnet hierbei den am weitesten kranial gelegenen und makroskopisch schmälisten Abschnitt des Hippocampus. Der am weitesten rostral gelegenen und makroskopisch breitesten Anteil des Hippocampus mit dem Pes hippocampi wurde mit der Ziffer 3 versehen. Die Gewebeproben wurden über Nacht bei 4 °C in vierprozentigem PFA in PBS fixiert.

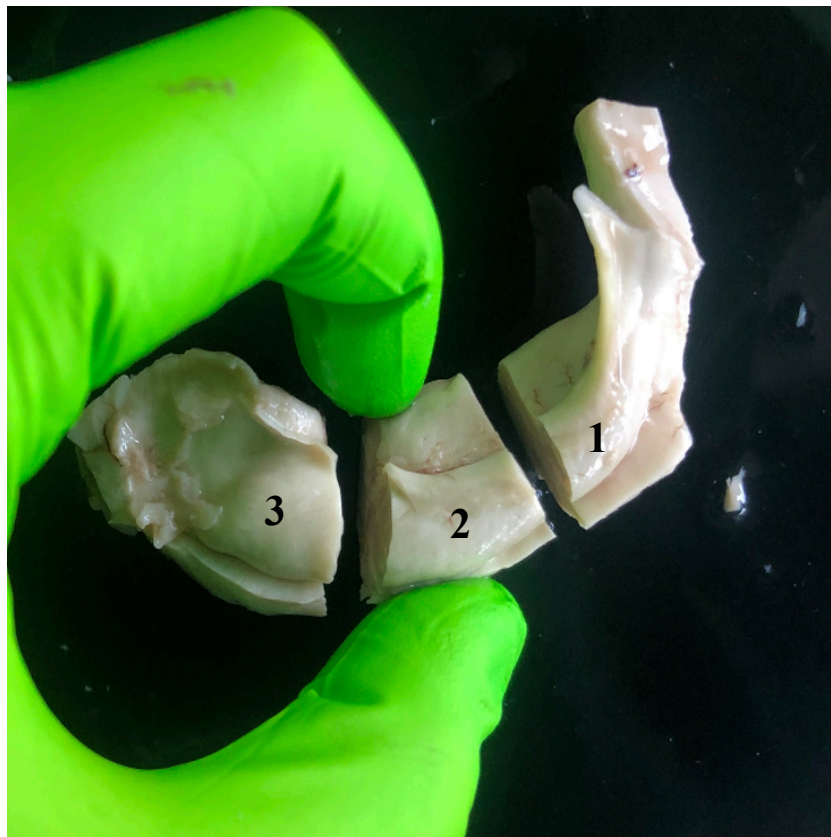


Abbildung 9: Gewebeproben mit Beschriftung

4.2.5.3 Probenentnahme des menschlichen Cerebellums

Ergänzend wurden neben der Präparierung der Hippocampi Proben des menschlichen Cerebellums asserviert. Hierfür wurden Vermis (V) und Kleinhirnhemisphären (C) des Gehirns aufgesucht und linksseitig jeweils eine Probe dieser entnommen.

4.2.6 Paraffineinbettung

Um die Proben der Histologie zugänglich zu machen, wurden diese in Paraffin eingebettet. Dieser Zustand erlaubte den späteren Zuschnitt in hauchdünne, nur wenige Mikrometer dicke Schnitte und die anschließende histologische Aufbereitung und Färbung des eingebetteten Gewebes.

Vor der Einbettung wurden die Proben nochmals in kleinere Abschnitte zugeschnitten. So wurde gewährleistet, dass die Proben den durch die Größe der Einbettringe vorgegebenen Maßen entsprachen.

Die Beschriftung erfolgte analog der zuvor festgelegten: Ausgehend von dem am weitesten kranial gelegenen und makroskopisch schmalsten Abschnitt des Hippocampus wurden die Proben aufsteigend bis zu dem am weitesten rostral gelegenen und makroskopisch breitesten Anteil des Hippocampus durchnummeriert. Nach dem erneuten Zuschnitt wurden die Proben wieder in die Einbettkassetten eingeschlossen.

Der Einbettungsprozess begann mit einer dreistündigen Wässerung der Proben unter fließendem Leitungswasser. Anschließend erfolgte die Dehydrierung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie eine vierstündige Lagerung in Methylbenzoat. Hierdurch konnten dem Gewebe restlicher Alkohol und verbliebenes Wasser entzogen werden. Die Paraffinierung erfolgte schließlich durch insgesamt vierstündiges Lagern der Einbettkassetten in flüssigem Paraffin.

Die Schritte der Dehydrierung, der Lagerung der Proben in Methylbenzoat und der Paraffinierung fanden automatisiert im Einbettautomaten statt und werden in Tabelle 12 in ihrer zeitlichen Abfolge dargestellt:

Tabelle 12: Zeitliche Abfolge der Schritte im Einbettautomaten

1h	70 % 2-Propanol
1,5h	80 % 2-Propanol
1,5h	90 % 2-Propanol
2x1,5h	100 % 2-Propanol
3x1,5h	Methylbenzoat
2x2h	Paraffin

Die anschließende Einblockung der paraffinierten Proben wurde eigenhändig durchgeführt. Hierzu wurden die Böden der Ausgussförmchen mit flüssigem Paraffin ausgegossen und die Proben anschließend entsprechend der gewünschten Schnittfläche positioniert.

Nach korrekter Ausrichtung der Proben wurden die Einbettringe aufgesetzt und die Ausgussförmchen zum Aushärten auf die Kühlplatte mit einer Temperatur von $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gestellt. Die Einbettringe wurden nach und nach mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Nach Aushärten des Paraffins konnten die fertigen Blöcke bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.2.6.1 Hippocampus

Ziel war die Darstellung der Hippocampusformation mit Abbildung von Cornu ammonis, Gyrus dentatus und Subiculum. Vor diesem Hintergrund wurde der

Hippocampus entlang seiner Querschnittsfläche auf den metallenen Ausgussförmchen positioniert.

4.2.6.2 Cerebellum

Die Proben von Vermis und Kleinhirnhemisphäre des Cerebellums wurden längs angeschnitten und entsprechend ihrer Schnittfläche auf dem Ausgussförmchen positioniert, sodass sich im späteren Schnitt histologisch sowohl Rinden- als auch Markareale abbildeten.

4.2.7 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom in Schnitte mit einer Dicke von sieben Mikrometern zugeschnitten.

Beim Einspannen des Gewebeblocks wurde darauf geachtet, dass die Blockoberfläche horizontal und vertikal zur Messerklinge ausgerichtet ist. Der Anschnitt des Blocks erfolgte so weit bis das eingebettete Gewebe im entsprechenden Umfang zu sehen war. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit einem feuchten Pinsel aufgenommen und im Wasserbad bei 37 °C gestreckt. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf einen Objektträger wurde dieser auf einer Wärmeplatte bei 37 °C für die Dauer von 30 min getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Prüfung des Gewebes auf Vollständigkeit und eine ausreichende Probenqualität. Zur weiteren Trocknung wurden die Schnitte über Nacht im Wärmeschränk bei 37 °C gelagert und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4.2.8 Gesamtübersicht der Proben

Tabelle 13: Gesamtübersicht der eigenständig gewonnenen Proben

Beschriftung: H = Hippocampus, V = Vermis, C = Kleinhirnhemisphäre, l = links, r = rechts

	Gehirn A		Gehirn C		Gehirn G		Gehirn H		Gehirn I		Gehirn J
H	a) H r 1.1.	a) H l 1.1.	c) H r 1.1.	c) H l 1.1.	g) H r 1.1.	g) H l 1.1.	h) H r 1.1.	h) H l 1.1.	i) H r 1.1.	i) H l 1.1.	j) H r 1.1.
	a) H r 1.2.	a) H l 1.2.	c) H r 1.2.	c) H l 1.2.	g) H r 1.2.	g) H l 1.2.	h) H r 1.2.	h) H l 1.2.	i) H r 1.2.	i) H l 1.2.	j) H r 1.2.
	a) H r 1.3.	a) H l 1.3.	c) H r 1.3.	c) H l 1.3.			h) H r 1.3.	h) H l 1.3.	i) H r 1.3.	i) H l 1.3.	
	a) H r 2.1.	a) H l 2.1.	c) H r 2.1.	c) H l 2.1.	g) H r 2.1.	g) H l 2.1.	h) H r 2.1.	h) H l 2.1.	i) H r 2.1.	i) H l 2.1.	j) H r 2.1.
	a) H r 2.2.	a) H l 2.2.	c) H r 2.2.	c) H l 2.2.	g) H r 2.2.	g) H l 2.2.	h) H r 2.2.	h) H l 2.2.	i) H r 2.2.	i) H l 2.2.	j) H r 2.2.
				c) H l 2.3.	g) H r 2.3.	g) H l 2.3.		h) H l 2.3.	i) H r 2.3.	i) H l 2.3.	
	a) H r 3.1.	a) H l 3.1.	c) H r 3.1.	c) H l 3.1.	g) H r 3.1.	g) H l 3.1.	h) H r 3.1.	h) H l 3.1.	i) H r 3.1.	i) H l 3.1.	j) H r 3.1.
	a) H r 3.2.	a) H l 3.2.	c) H r 3.2.	c) H l 3.2.	g) H r 3.2.	g) H l 3.2.	h) H r 3.2.	h) H l 3.2.	i) H r 3.2.	i) H l 3.2.	j) H r 3.2.
	a) H r 3.3.	a) H l 3.3.		c) H l 3.3.	g) H r 3.3.	g) H l 3.3.	h) H r 3.3.	h) H l 3.3.	i) H r 3.3.	i) H l 3.3.	j) H r 3.3.
V	/	a) V l 1 a) V l 2 a) V l 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/
C	/	a) C l 1 a) C l 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Neben den in Tabelle 13 aufgeführten Proben sind außerdem zwei weitere Gewebeproben aus menschlichen Glioblastomen zu berücksichtigen:

- GBM A
- GBM B

Diese wurden durch Herr Prof. Dr. med. Joachim Oertel und Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat aus der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

4.2.9 Auswahl der Schnitte

Um eine schlüssige Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde durch eine gezielte Auswahl der Proben eine interne Vergleichbarkeit geschaffen. Stellvertretend für jedes Gehirn und jede Hemisphäre wurde ein Block gewählt, welcher in seinem Anschnitt die Hippocampusformation, bestehend aus Cornu ammonis, Gyrus dentatus und Subiculum, vollständig darstellte. Auf diese Weise wurde eine sichere Zuordnung zu anatomischen Arealen ermöglicht und letztlich eine standardisierte Auswertung der Ergebnisse gewährleistet.

4.2.10 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die Qualität der Gewebeschnitte zu beurteilen, wurde vor Durchführung der immunhistochemischen Färbung eine Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) aller ausgewählten Schnitte als Übersichtsfärbung durchgeführt.

4.2.10.1 Grundlagen

Die HE (Hämatoxylin-Eosin) -Färbung zählt zu den bekanntesten Färbeverfahren und überzeugt vor allem durch ihre gute Reproduzierbarkeit sowie eine übersichtliche Darstellung der Gewebestrukturen [80,132].

Das zur Gruppe der Flavonoide gehörende Hämatoxylin wird aus dem Kernholz des Blauholzbaumes *Hematoxylon campechianum* extrahiert und ist farblos [7,80]. Erst durch Oxidation wird das farbwirksame Hämatein generiert, welches in der Histologie durch seine charakteristische blaue Färbung bekannt ist [4,7].

Durch Zusatz von Metallsalzen entstehen gute chromogene basische Färbelösungen wie die Hämalaune, welchen auch das in dieser Arbeit verwendete Hämatoxylin nach Ehrlich angehört [80].

Das Grundprinzip der Färbung beruht auf der Ionenbindung [80]. Hämalaune sind als basische Hämatoxylinlacke des Aluminiums positiv geladen und binden an saure, anionische Komponenten wie Chromatin, Nukleolen, Ergastoplasma und Ribosomen, sodass sie sich zur Kernfärbung eignen [80,159]. Die Farbe des Lackes ändert sich pH-abhängig [80]. Während sich die Farbe in saurer Lösung rotbraun darstellt, kann durch pH-Erhöhung ein blauer Farbumschlag erreicht werden, der zugleich zu einer Fixierung der Färbung führt [80].

Die Gegenfärbung erfolgt mit saurem Eosin [132]. Dieses gehört zur Gruppe der Xanthenfarbstoffe und färbt die basischen kationischen Komponenten des Gewebes wie Zytoplasmaproteine, Mitochondrien, Bindegewebe und Kollagenfasern in einem kräftigen Rotton. [80,159].

4.2.10.2 Versuchsdurchführung

Um das Gewebe der HE-Färbung zugänglich zu machen und eine Anfärbung mit den wasserlöslichen Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin zu gewährleisten, wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert.

Hierzu wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in Xylol eingetaucht. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14: Zeitliche Abfolge der Entparaffinierung und Rehydrierung

Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
100 % Propan-2-ol	5 min
100 % Propan-2-ol	5 min
90 % Propan-2-ol	5 min
80 % Propan-2-ol	5 min

Nach dem Entparaffinieren wurden die Proben in gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich überführt und dort für acht Minuten belassen. Im Anschluss erfolgte das Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser, sodass überschüssiges Hämatoxylin entfernt wurde. Durch zwölfminütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser und der konsekutiven Erhöhung des pH-Wertes konnte der charakteristische blau-violette Farbumschlag erreicht werden. Nach dem Bläuen wurden die Schnitte für ca. dreißig Sekunden mit destilliertem Wasser gespült.

Es folgte die zweieinhalbminütige Gegenfärbung mit 0,1-prozentigem Eosin. Die Einstellung des pH-Wertes zwischen vier und sechs gelang durch die Beigabe von zwei Tropfen Eisessig. Zur Differenzierung und Entwässerung wurden die Schnitte einer aufsteigend Alkoholreihe zugeführt. Hierzu wurden die Proben für fünf Minuten in 9-prozentigem Ethanol und anschließend zweimal für jeweils weitere fünf Minuten in 100-prozentigem Ethanol gespült.

Abschließend wurden die Schnitte für insgesamt dreimal fünf Minuten in Xylol geklärt. Im Anschluss konnten die Proben mit dem Eindeckmedium Roti-Histokitt und einem Deckglas auf dem Objektträger eingedeckt werden.

4.2.11 Immunhistochemische Färbung

4.2.11.1 Grundlagen

Um das TRPC6-Kanalprotein und seine Lokalisation in Zellen und im Gewebe nachzuweisen, bedarf es einer Methode, diesen Kanal für das menschliche Auge sichtbar zu machen.

Ein leistungsstarkes Verfahren zur visuellen Lokalisation spezifischer Antigene stellt die Immunhistochemie dar [88,153]. Sie vereint die drei Bereiche der Immunologie, Histochemie und Chemie und hat sich zu einem Standardinstrument in Forschung und klinischer Diagnostik entwickelt [88,121].

Grundlage dieses Verfahrens ist die spezifische Bindung zwischen Antikörper und Antigen [88]. Unterschieden werden direkte und indirekte Methoden der Immunhistochemie. Bei der traditionellen direkten Methode ist der Primärantikörper an ein Enzym gekoppelt [7,153]. Die indirekte Methode verwendet hingegen einen enzymatisch markierten Sekundärantikörper, der an einen unkonjugierten Primärantikörper bindet [74]. Nach Inkubation mit einem chromogenen Substrat wie Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) wird enzymatisch ein farbiges Reaktionsprodukt generiert [153].

In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. Verwendet wurde ein mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) konjugierter Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet war. Als chromogenes Substrat wurde DAB eingesetzt. Durch das enzymatisch generierte Farbprodukt konnten Rückschlüsse auf die Expression des TRPC6-Kanalproteins im menschlichen ZNS getroffen werden.

Abbildung 10 verdeutlicht das Schema, welches der immunhistochemischen Färbung zugrunde liegt.

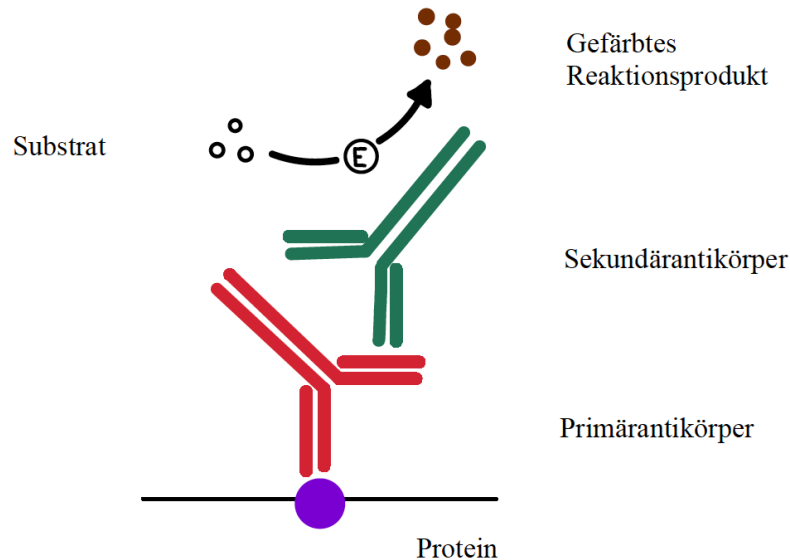


Abbildung 10: Schema – Indirekte Methode der IHC

Als ein wichtiger Schritt der Immunhistochemie ist außerdem die Antigenrückgewinnung bzw. Antigendemaskierung zu nennen. Eine durch die Formalin-Fixierung hervorgerufene Änderung der Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine, welche konsekutiv zu einer reversiblen Verminderung der Antigenität führt, kann durch Erhitzen der Gewebeproben in gepufferten Lösungen wieder aufgehoben werden [35,121,130].

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Immunhistochemie stellt der Umgang bzw. die Prävention unspezifischer Hintergrundfärbungen dar. Diese kann sowohl auf eine unspezifische Antikörperbindung als auch auf die Aktivität endogener Peroxidasen zurückgeführt werden [7,153]. Um eine unspezifische Antikörperbindung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zu minimieren, wurde der Sekundärantikörper mit 10-prozentiger NGS-Blockier-Lösung bestehend aus 10-prozentigem NGS und 0,1-

prozentigem Triton X-100 in PBS vorinkubiert. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch das Aufbringen einer 3-prozentigen H_2O_2 -Lösung gehemmt.

4.2.11.2 Versuchsdurchführung

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung in chronologischer Reihenfolge dargestellt.

Zunächst wurden die Hirnschnitte entparaffiniert. Hierzu wurden die Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol eingetaucht.

Es folgte die Rehydrierung des Gewebes durch eine absteigende Alkoholreihe. Die Schnitte wurden nacheinander für jeweils fünf Minuten in 90-, 80- und 70-prozentiges Propan-2-ol getaucht. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde das Gewebe zur wärmeinduzierten Antigendemaskierung für eine Dauer von 60 min im Wärmeschränk im vorgewärmten Citratpuffer (pH 6) bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Objektträger erfolgte das einstündige Blockieren der Schnitte mit 10-prozentigem NGS in PBS in einer Feuchtekammer. Die Blockierlösung wurde von den Schnitten geklopft und der Primärantikörper anschließend in der entsprechenden Verdünnung auf die Schnitte pipettiert und über Nacht zur Inkubation belassen.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst zweimal für eine Dauer von zwei Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidasen durch die zehnminütige Inkubation des Gewebes mit 3-prozentigem H_2O_2 in PBS in einer Feuchtekammer. Nach zwei weiteren zweiminütigen Waschschritten in PBS folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers. Dieser wurde im Verhältnis von 1:500 in NGS-Blockierlösung verdünnt und anschließend auf die Schnitte pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation in der Feuchtekammer und zweimaligem

Waschen in PBS wurden die Proben mit der Substratlösung (DAB) inkubiert. Nach Abwarten der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Reaktion in PBS gestoppt.

Es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Hierzu wurden die Objektträger für eine Sekunde in gefiltertes Hämatoxylin getaucht und nach zweimaligem Eintauchen in destilliertes Wasser schließlich für fünf Minuten in Leitungswasser gebläut.

Die Dehydrierung der Proben erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe bestehend aus 70- 80-, 90- und 100-prozentigem Propan-2-ol. Nach jeweils fünfminütiger Inkubation wurden die Schnitte abschließend für insgesamt dreimal fünf Minuten in Xylol geklärt und mit dem Eindeckmedium Roti-Histokitt und einem Deckglas auf dem Objektträger eingedeckt.

4.2.11.3 Verdünnung und Substratinkubationszeit

Nach Austestung unterschiedlicher Verdünnungen des Primärantikörpers (1:50, 1:100, 1:200, 1:500) und unterschiedlicher Substratinkubationszeiten (1min, 2,5min, 3min) mit anschließender Evaluation der Ergebnisse unter dem Mikroskop erwiesen sich eine Verdünnung des Primärantikörpers von 1:100 und eine Substratinkubationszeit von drei Minuten als guter Standard für die immunhistochemische Färbung von Cerebellum und Hippocampus. Alle Proben des menschlichen Cerebellums und Hippocampus wurden unter diesem Standard erhoben. Für die Gewebeschnitte aus der Neurochirurgie wurde bei gleicher Verdünnung eine Substratinkubationszeit von sechs Minuten gewählt.

4.2.11.4 Negativkontrolle

Um eine unspezifische Anfärbung des Gewebes auszuschließen und eine bessere abschließende Beurteilung der Qualität der Färbung zu gewährleisten, wurde bei jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle mitgeführt. Als negatives

Kontrollreagenz wurde Kaninchenserum verwendet. Die Verdünnung mit der 10-prozentigen NGS-Blockierlösung erfolgte im Verhältnis 1:500 und wurde entsprechend der Inkubationszeit des Primärantikörpers für drei Minuten auf den Schnitten belassen.

4.2.11.5 Peptidkontrolle

Um eine spezifische Bindung des Primärantikörpers nachzuweisen und damit auch die Validität der Ergebnisse zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit einmalig eine Peptidkontrolle unter Verwendung von TRPC6 Blocking Peptide angefertigt. Hierzu wurden 40 µg des Kontrollpeptids in 20 µl PBS aufgelöst. Anschließend wurde der im Verhältnis 1:100 in NGS-Blockierlösung verdünnte Primärantikörper hinzugegeben. Nach nächtlicher Inkubation bei 7 °C konnte die Lösung anstelle der im Protokoll vorgesehenen Primärantikörperlösung auf einen in der immunhistochemischen Färbung ursprünglich deutlich positiv angefärbten Gewebeschnitt pipettiert werden. Durch die Zugabe des TRPC6 Blocking-Peptide wird der Primärantikörper geblockt, sodass sich eine erfolgreiche Peptidkontrolle durch eine deutlich schwächere Färbung im Vergleich zur korrespondierenden Positivkontrolle zeigt.

4.2.12 Bildaufnahme und -verarbeitung

Die Bilder der gefärbten Schnitte wurden mithilfe des Axio Scan.Z1 erzeugt. Durch das zugrunde liegende Prinzip des Stitchings wurden hochauflösende Übersichtsaufnahmen generiert und die Schnitte konnten in ihrer Gesamtheit bildlich dargestellt werden.

Grundlage der Technik bildet die Aufnahme vieler kleiner Bilder (Tiles), die im Anschluss zu einem größeren Bild zusammengefügt werden.

Das Scannen der HE-gefärbten Schnitte erfolgte mit dem 10x-Objektiv. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit dem 20x-Objektiv eingescannt. Es entstanden hochauflösende Aufnahmen, deren Beurteilung mit der Software ZEN lite erfolgte. Die Software ermöglichte die bildliche Darstellung der hochauflösenden CZI-Dateien. Außerdem konnten durch Markieren eines gewünschten Bildausschnittes neue Bilder generiert werden, in denen die markierten Strukturen gezoomt und hochauflösend zur Darstellung kamen. Durch Spiegeln und Drehen der Bilder mit der Mikroskopiersoftware ZEN lite wurde ein einheitliches Layout und somit eine bessere Vergleichbarkeit der Aufnahmen geschaffen. Die Konvertierung der Bilder in das gebräuchliche JPEG-Format erfolgte ebenfalls mit dieser Software.

4.2.13 Auswertung

Die Auswertung der CZI-Dateien erfolgte mit der Mikroskopiersoftware ZEN lite unter Beachtung der histologischen Gliederung.

5 Ergebnisse

5.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung aller verwendeten Gewebeproben zeigte eine gute Probenqualität ohne wesentliche Lysen oder andere Minderungen der Gewebequalität mit Ausnahme der Probe des rechten Hippocampus von Spender J. Hier ließ sich eine umschriebene Auflösung der Gewebestruktur feststellen.

In den folgenden Abbildungen 11 bis 14 wird exemplarisch je ein HE-gefärbter Schnitt stellvertretend für jedes Gewebe (Hippocampus, Cerebellum und Glioblastom) gezeigt.

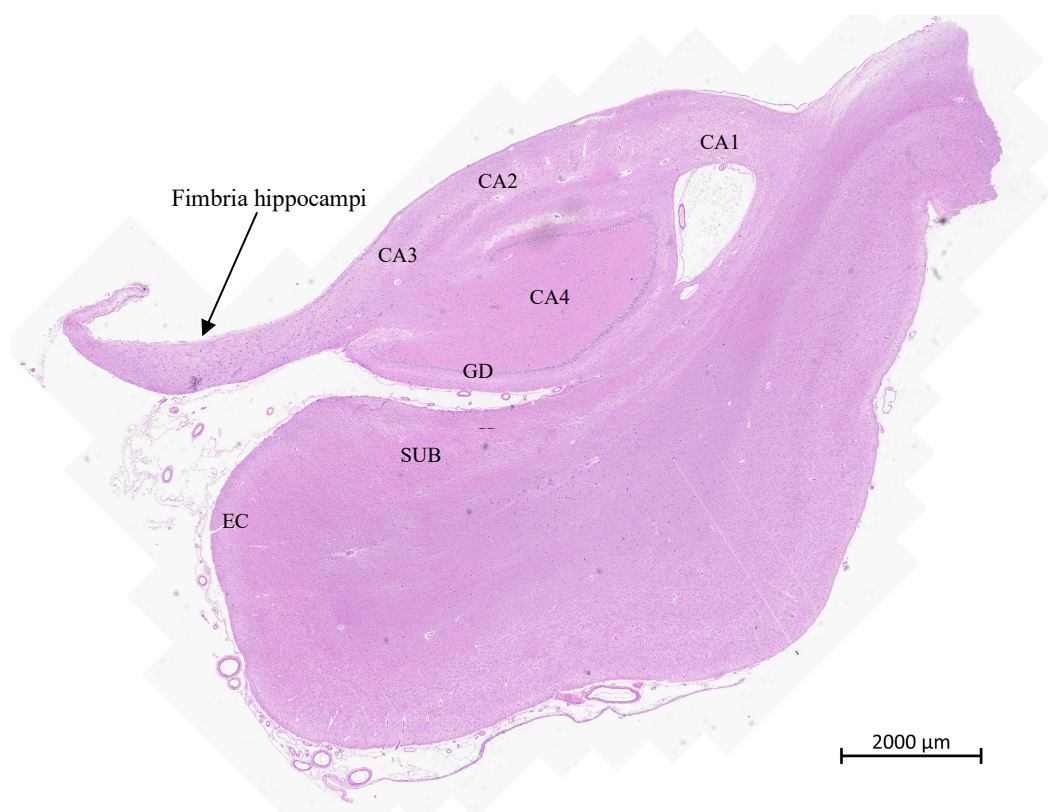


Abbildung 11: HE-Färbung des Präparats a) *H r 2.2*.

Zu sehen ist ein Frontalschnitt durch den rechten menschlichen Hippocampus von Spender A mit Abbildung der charakteristischen Hippocampusformation. Dargestellt

sind Cornu ammonis (CA1–CA4), Gyrus dentatus (GD), Subiculum (SUB) und Entorhinaler Kortex (EC).

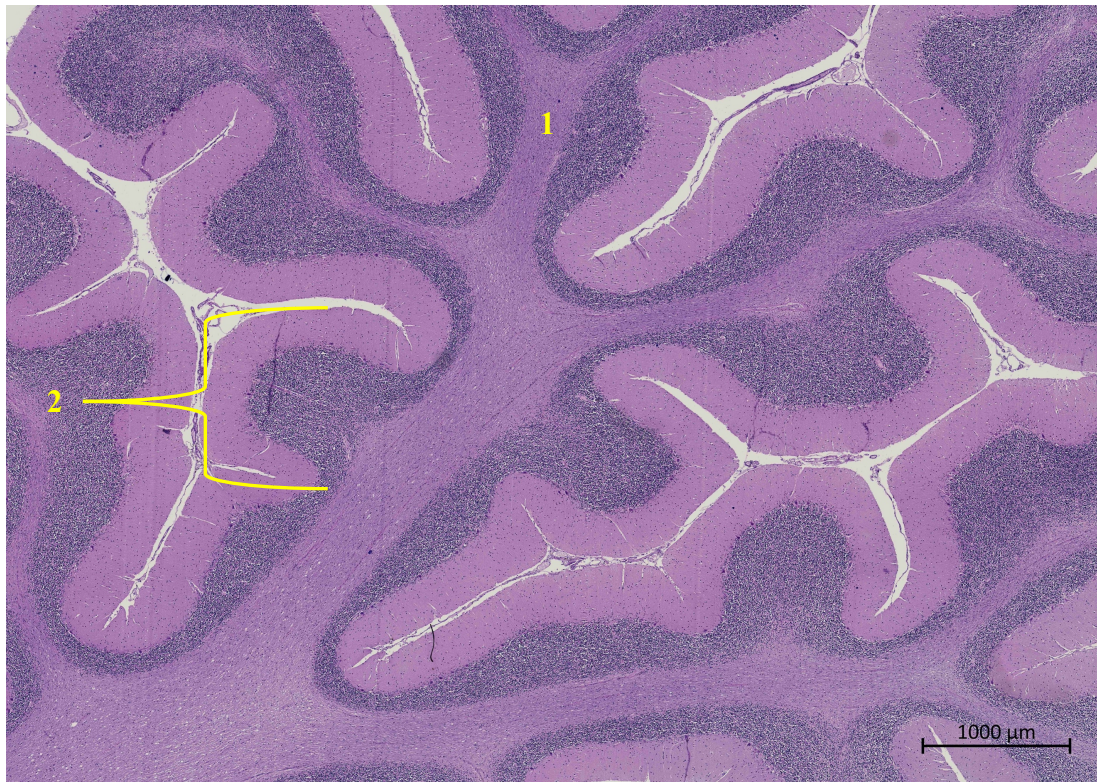


Abbildung 12: HE-Färbung des Präparats *a) C l 2*

Die Abbildung zeigt die charakteristische Struktur des Kleinhirnparenchyms, welche auch als Arbor vitae („Lebensbaum“) bezeichnet wird. Deutlich erkennbar sind die Kleinhirnwindungen (Foliae), hervorgerufen durch die starke Faltung der Kleinhirnrinde.

1: Marklamelle

2: Folium

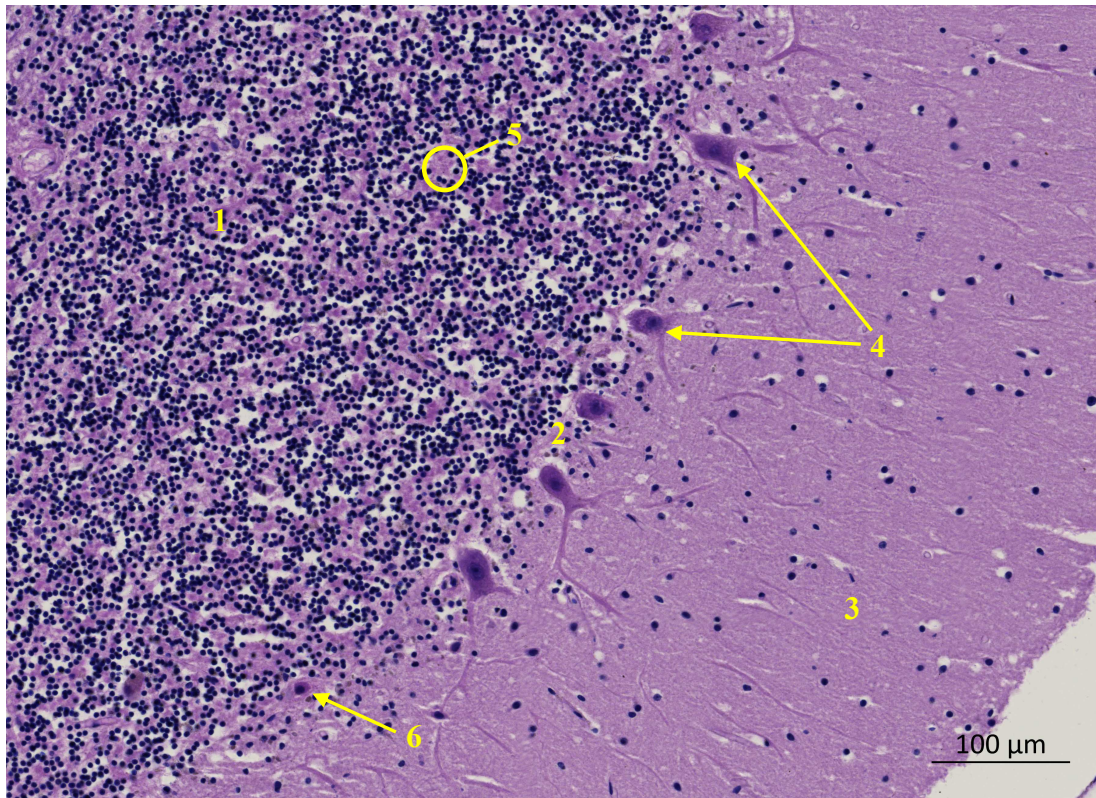


Abbildung 13: HE-Färbung des Präparats a) C l 2

Dargestellt ist die histologische Dreigliederung des Kleinhirnparenchyms in Stratum granulosum (1), Stratum purkinjense (2) und Stratum moleculare (3). Die GABA-ergen Purkinjezellen (4) strecken ihre Dendriten ins Stratum moleculare aus und projizieren zu den Kleinhirnkernen. Die eosinophilen zellkernfreien Areale im Stratum granulosum werden als Glomeruli cerebellares (5) bezeichnet. Bei den kleineren rundlichen Zellen im Stratum moleculare handelt es sich um Stern und Korbzellen, welche als inhibitorische Interneurone fungieren und zur räumlichen Kontrastverschiebung beitragen [37]. Neben den exzitatorischen Körnerzellen befinden sich im Stratum granulosum in weitaus geringerer Zahl die Golgi-Zellen (6). Hierbei handelt es sich um inhibitorisch wirkende Interneurone, die als „negatives Feedbacksystem“ für die Körnerzellen wirken [37,158].

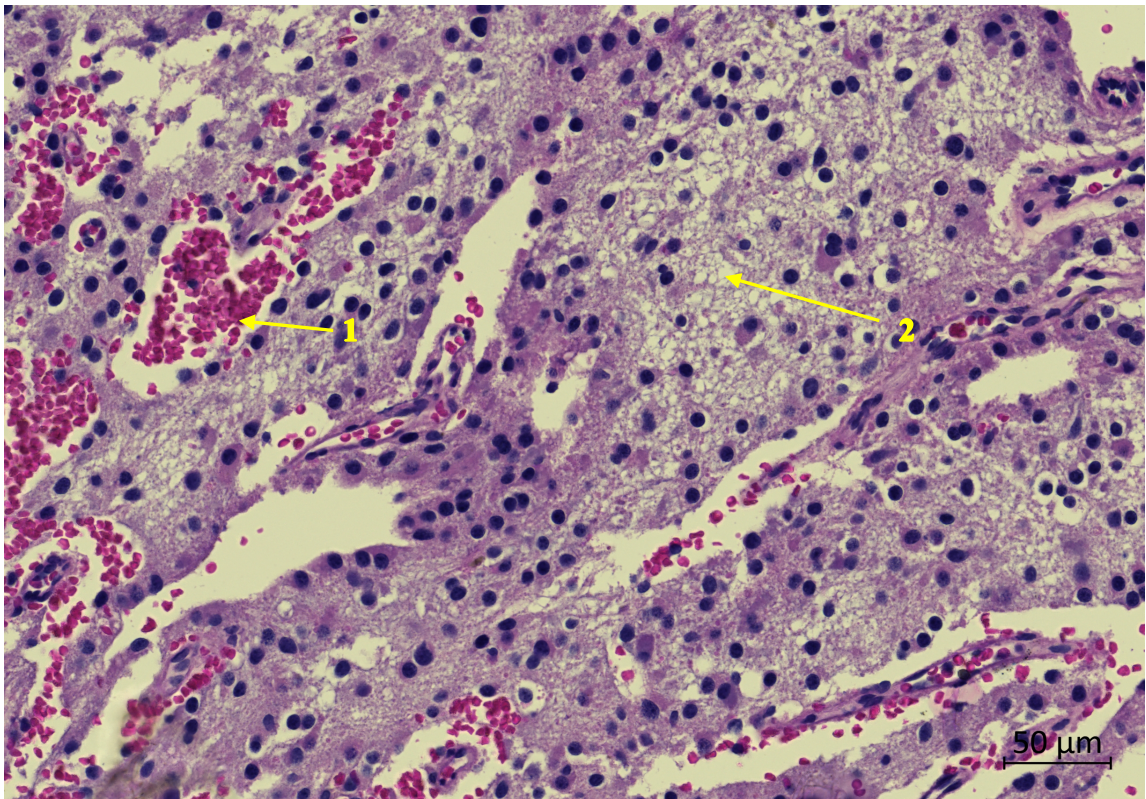


Abbildung 14: HE-Färbung des Präparats *GBM A*

Erkennbar sind die Gefäßproliferate (1) und die typische Zellpolymorphie des Glioblastoms. Weiterhin ist ein nekrotisches Areal (2) innerhalb des Tumors abgrenzbar.

5.2 Spezifität der Färbungen

Im Folgenden werden die Peptidkontrolle und die Negativkontrolle dem immunhistochemischen Nachweis von TRPC6 gegenübergestellt.

Die Peptidkontrolle wurde an Präparat *a) H r 2.2.* durchgeführt, welches in der immunhistochemischen Färbung stark positiv für den polyklonalen Primärantikörper Anti-TRPC6 gefärbt war (vgl. Abbildung 15, 20–23).

Entsprechend der Erwartungen an die Peptidkontrolle kann im Vergleich zur Positivkontrolle eine deutlich schwächere Färbung des Präparats *a) H r 2.2.* beobachtet werden (vgl. Abbildung 16). Es kann folglich von einer Spezifität der Ergebnisse ausgegangen werden. Die mitgeführte Negativkontrolle zeigt sich negativ ohne Nachweis positiver Zellen für TRPC6 und ist im Folgenden exemplarisch für Präparat *a) H r 2.2.* sowie für das Präparat *GBM A* gezeigt (vgl. Abbildungen 17 und 19).

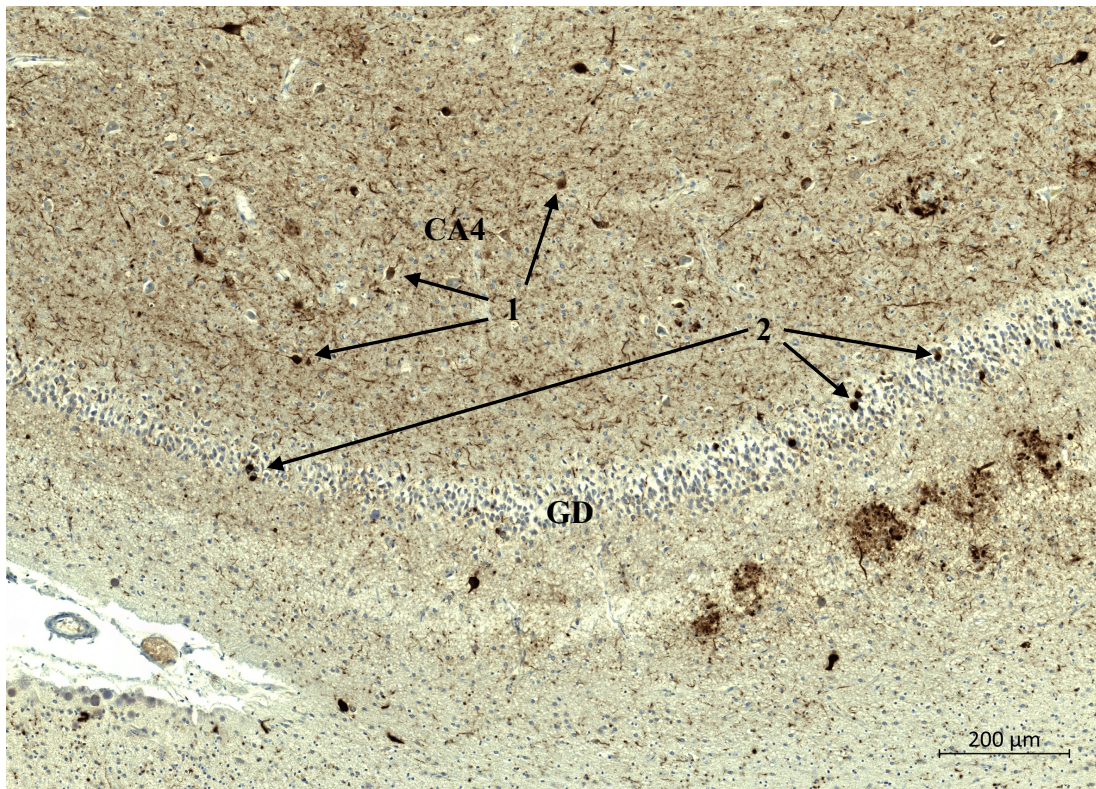


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *a) Hr 2.2.*

Zu sehen ist die CA4-Region des Cornu ammonis mit deutlicher Braunfärbung der Pyramidenzellen (1). Weiterhin zeigen sich die Körnerzellen des Gyrus dentatus vereinzelt positiv für TRPC6 (2).

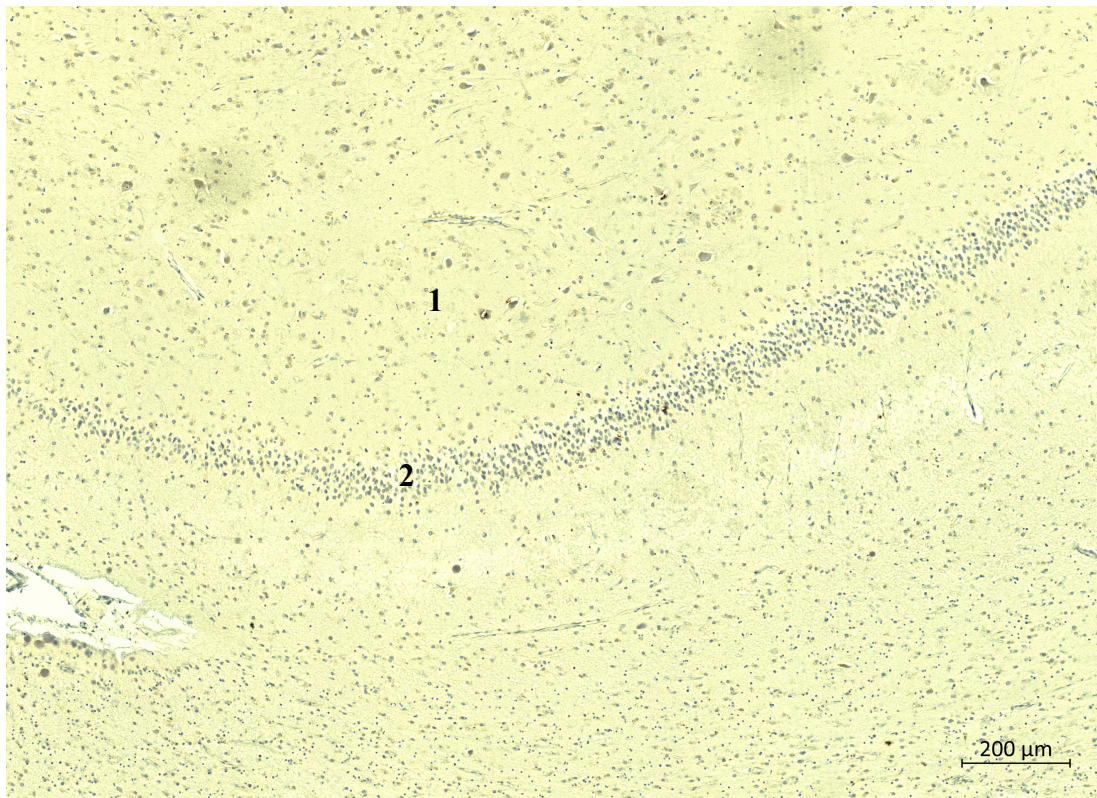


Abbildung 16: Peptidkontrolle im Präparat *a) Hr 2.2.*

1: CA4-Region des Cornu ammonis

2: Stratum granulosum des Gyrus dentatus

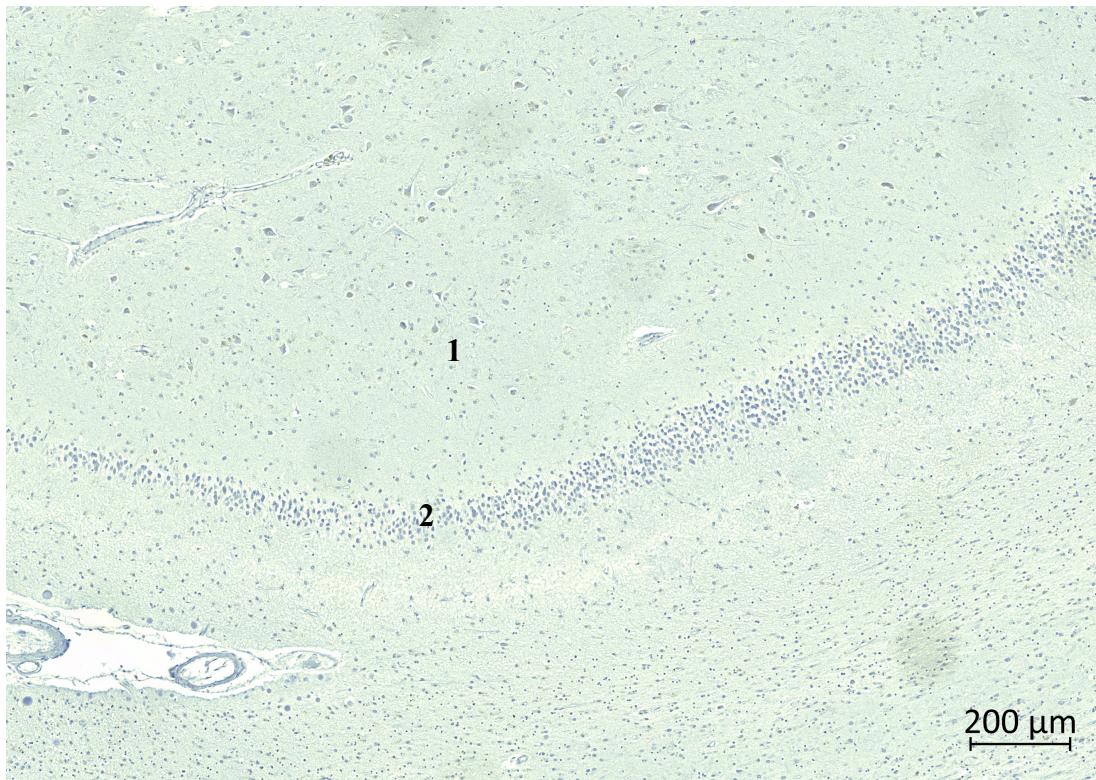


Abbildung 17: Negativkontrolle im Präparat *a) Hr 2.2.*

1: CA4-Region des Cornu ammonis

2: Stratum granulosum des Gyrus dentatus

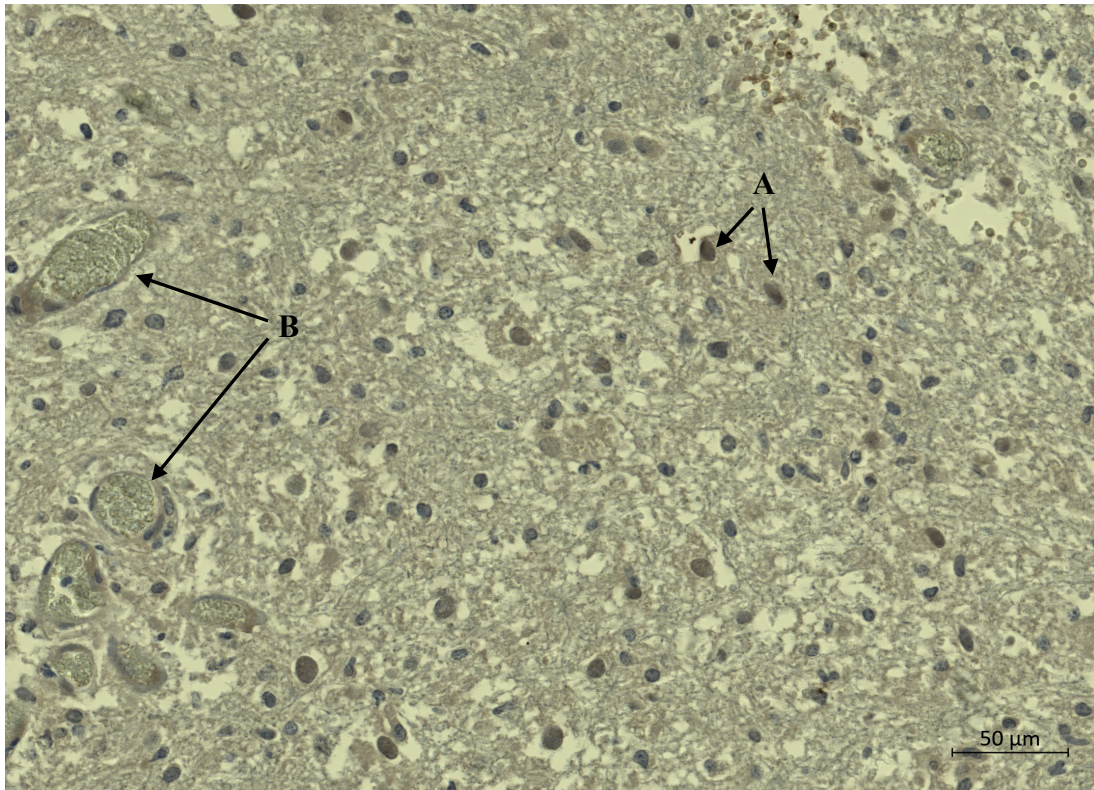


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *GBM A*

Die stark polymorphen Zellen zeigen sich größtenteils TRPC6-positiv. Der Buchstabe A markiert beispielhaft zwei TRPC6-positive Zellen. Weiterhin sind innerhalb des Tumors charakteristische Gefäßproliferate (B) zu sehen.

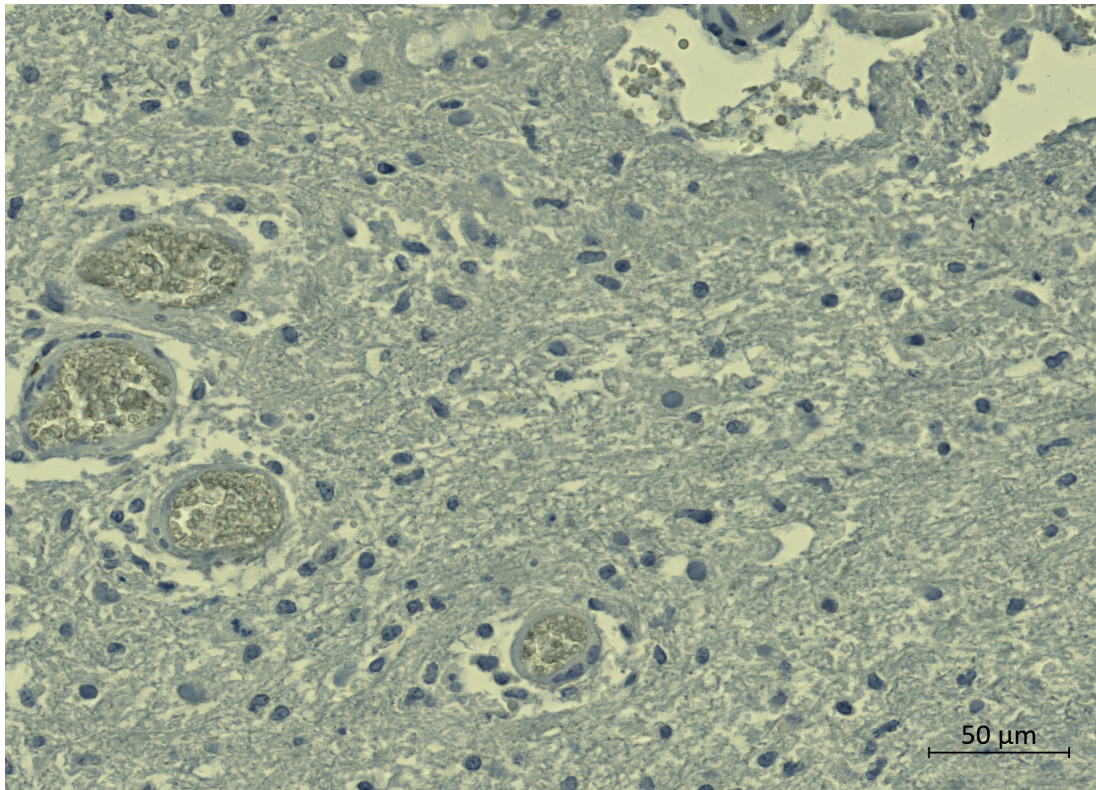


Abbildung 19: Negativkontrolle im Präparat *GBM A*

5.3 Immunhistochemische Färbung

5.3.1 TRPC6 im menschlichen Hippocampus

Die Ergebnisse der Immunhistochemie werden im Folgenden anhand lichtmikroskopischer Bilder der gefärbten Präparate gezeigt. Durch die Auswahl verschiedener Bildausschnitte soll eine gute Darstellung der TRPC6-Kanalexpression ermöglicht werden. Unter dem Begriff „Expression“ ist im Folgenden im Rahmen der Darstellung und Diskussion der eigenen Ergebnisse der immunhistochemische Farbnachweis gemeint, der Hinweise für das Vorhandensein des TRPC6-Kanalproteins liefert.

5.3.1.1 Gehirn A

Gehirn A zeigt unter den sechs untersuchten Gehirnen die stärkste Anfärbung für TRPC6. Ein immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 kann beidseits in Pyramidenzellen des Cornu ammonis (CA1–CA4) und des Subiculum sowie in Körnerzellen des Gyrus dentatus erbracht werden (vgl. Abbildungen 20–26).

Des Weiteren kann beidseits eine subzelluläre Expression des Kanalproteins im Gyrus dentatus gezeigt werden. TRPC6-positive Strukturen sind sowohl im Stratum moleculare als auch im Stratum multiforme des Gyrus dentatus abgrenzbar (vgl. Abbildung 22 und 26). Die TRPC6-positiven Strukturen im Stratum moleculare, die parallel zur CA1–CA3-Region verlaufen, erinnern mit ihrem nestartigen Aussehen an die Morphologie von Dendriten. Es wäre grundsätzlich denkbar, dass es sich bei den genannten Strukturen um die im Stratum moleculare lokalisierten Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus handelt. Die fadenförmigen, TRPC6-positiven Strukturen im Stratum multiforme lassen sich histomorphologisch prinzipiell mit Axonen der Körnerzellen des Gyrus dentatus vereinbaren.

Im Seitenvergleich zeigt der rechte Hippocampus eine etwas stärkere Anfärbung als der linke Hippocampus. Links kann innerhalb des Cornu ammonis eine besonders starke Anfärbung für die CA2- und CA3-Region beobachtet werden (vgl. Abbildung 25).

Rechts:

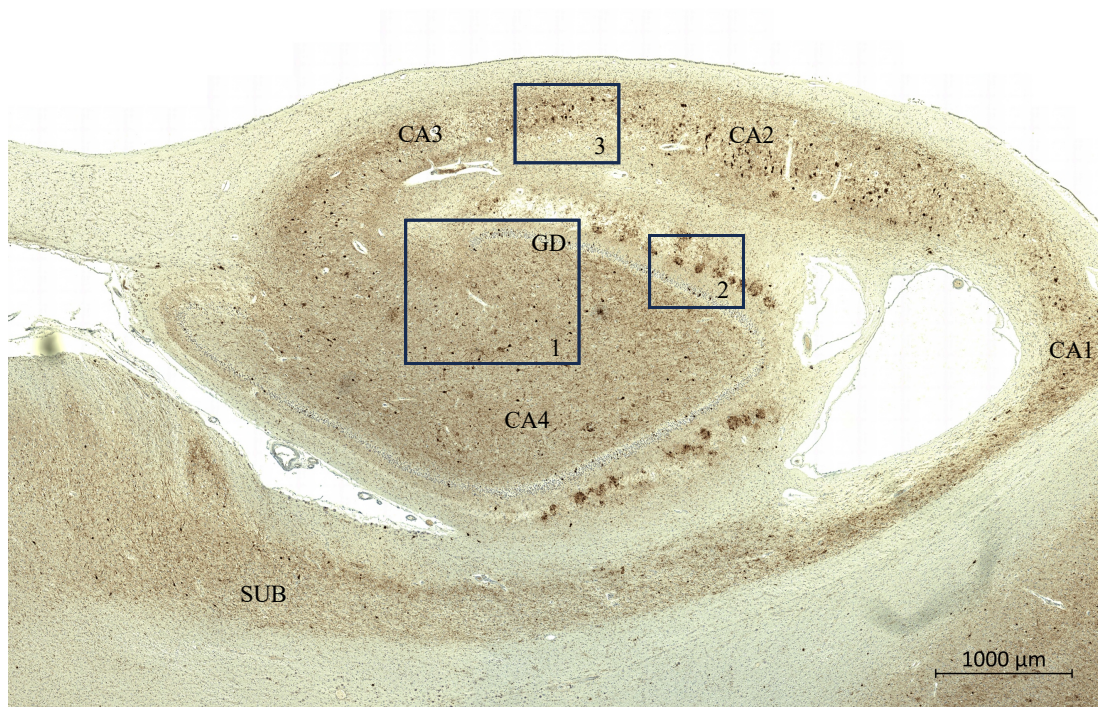


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *a) Hr 2.2*

Dargestellt sind Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis (CA1–CA4) und Subiculum (SUB) im rechten Hippocampus von Gehirn A. In der Abbildung sind drei Bildausschnitte zur detaillierten Darstellung der Ergebnisse markiert.

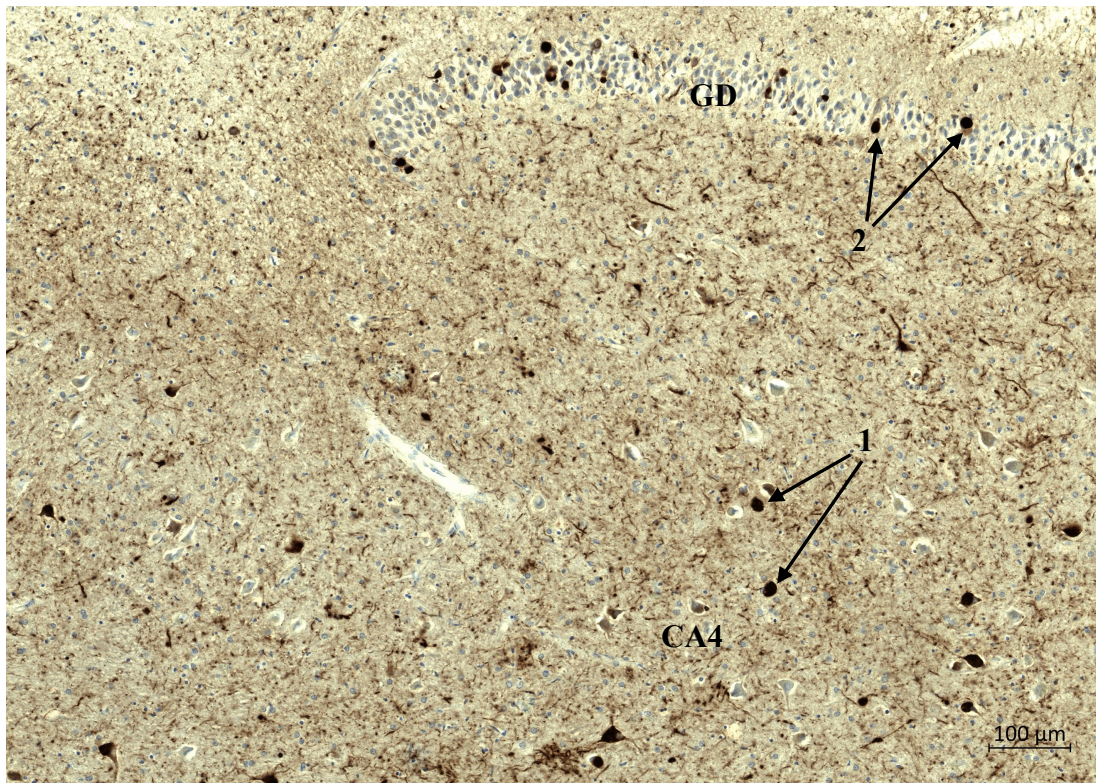


Abbildung 21: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 20

Gezeigt sind die CA4-Region des Cornu ammonis und Anteile des Gyrus dentatus (GD). Korrespondierend zu den deutlich positiven Pyramidenzellen der CA4-Region (1) zeigen sich im Gyrus dentatus TRPC6-positive Körnerzellen (2).

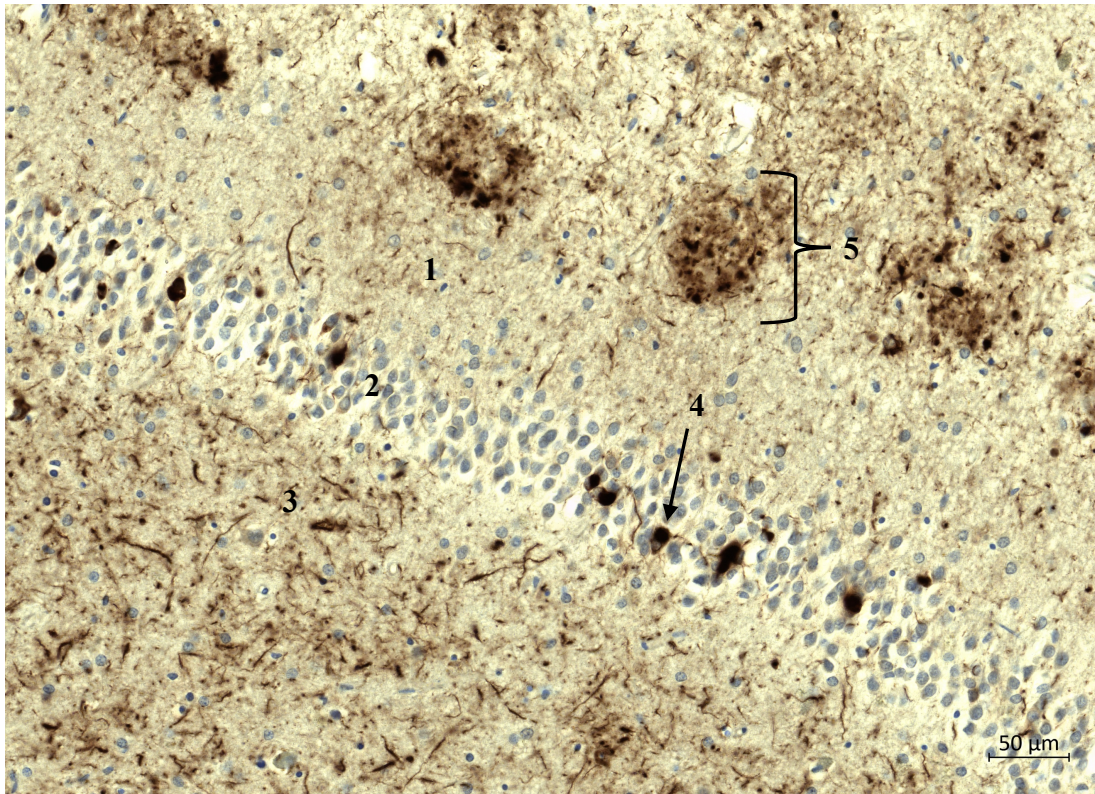


Abbildung 22: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 20

Detailaufnahme des Gyrus dentatus mit seiner Dreigliederung in Stratum moleculare (1), Stratum granulosum (2) und Stratum multiforme (3). Neben den TRPC6-positiven Körnerzellen (4) im Stratum granulosum zeigt sich weiterhin eine subzelluläre Verteilung des TRPC6-Kanalproteins. Im Stratum moleculare des Gyrus dentatus sind nestartig angeordnete TRPC6-positive Strukturen abgrenzbar (5). Des Weiteren lassen sich innerhalb des Stratum multiforme des Gyrus dentatus fadenförmige TRPC6-positive Strukturen beobachten, bei welchen es sich um Axone der Körnerzellen handeln könnte.

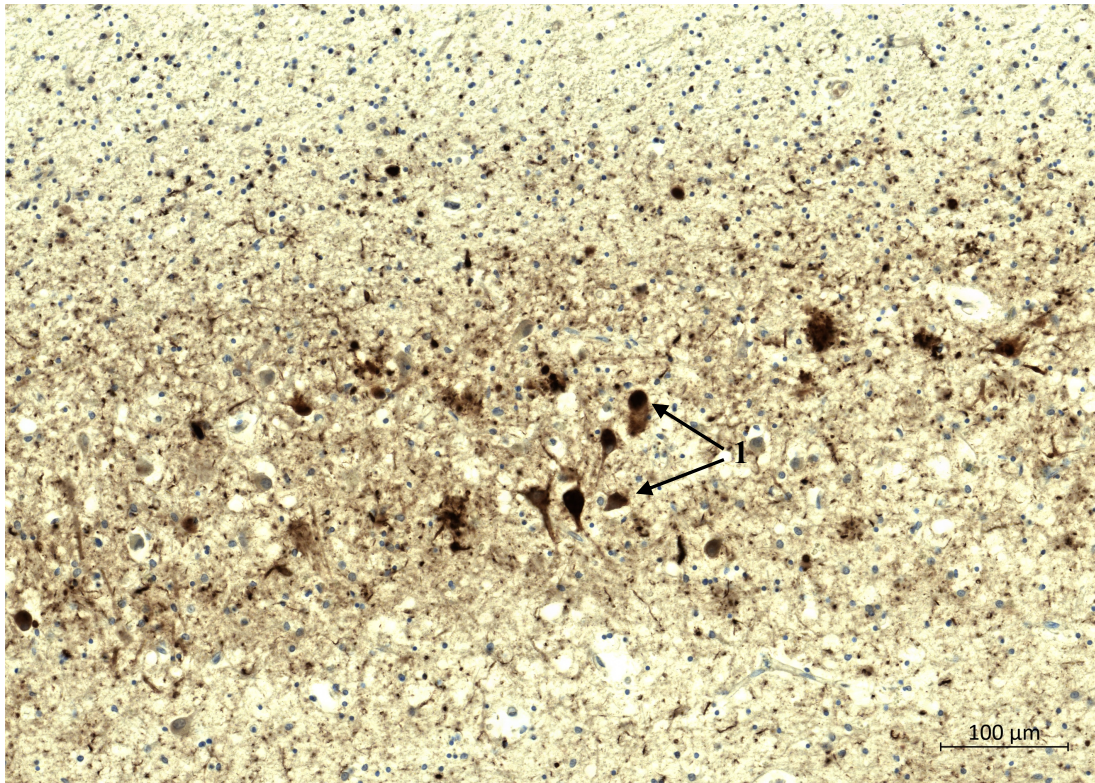


Abbildung 23: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 3) aus Abbildung 20

Ziffer 1 markiert TRPC6-positive Pyramidenzellen der CA3-Region im rechten Hippocampus von Gehirn A.

Links:

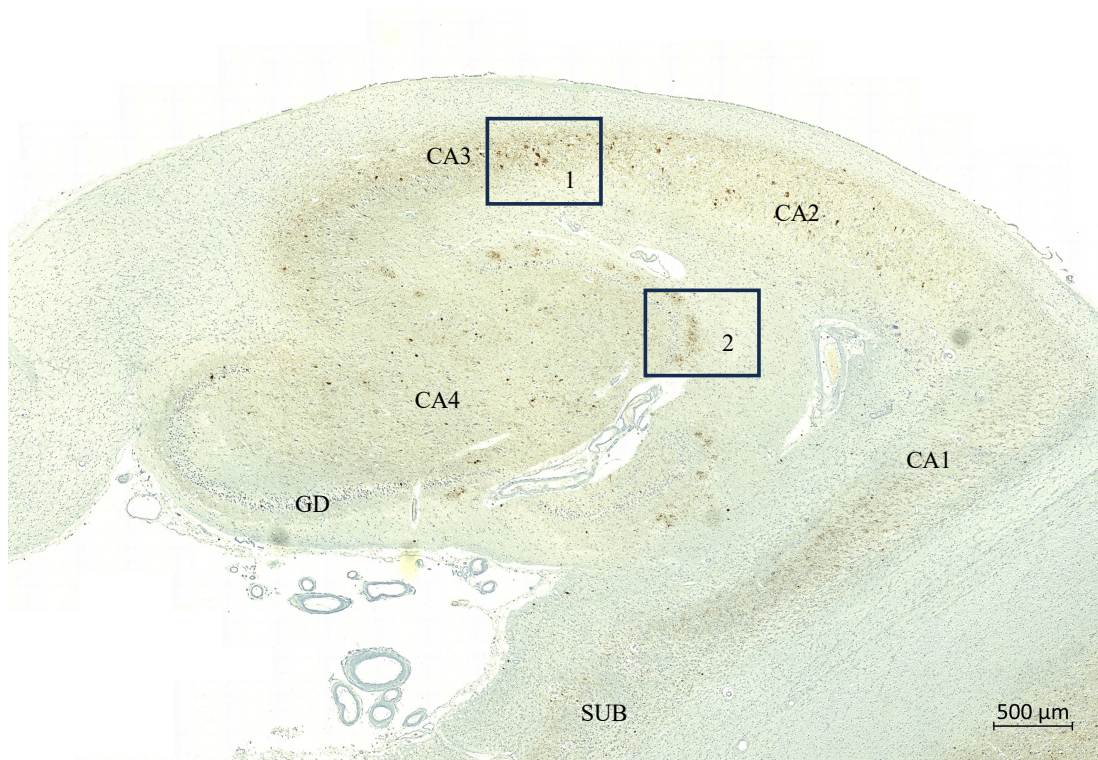


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *a) H1 2.2*.

Zu sehen sind Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis (CA1–CA4) und Subiculum (SUB) im linken Hippocampus von Gehirn A. Mithilfe der Bildausschnitte 1 und 2 wird eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse ermöglicht.

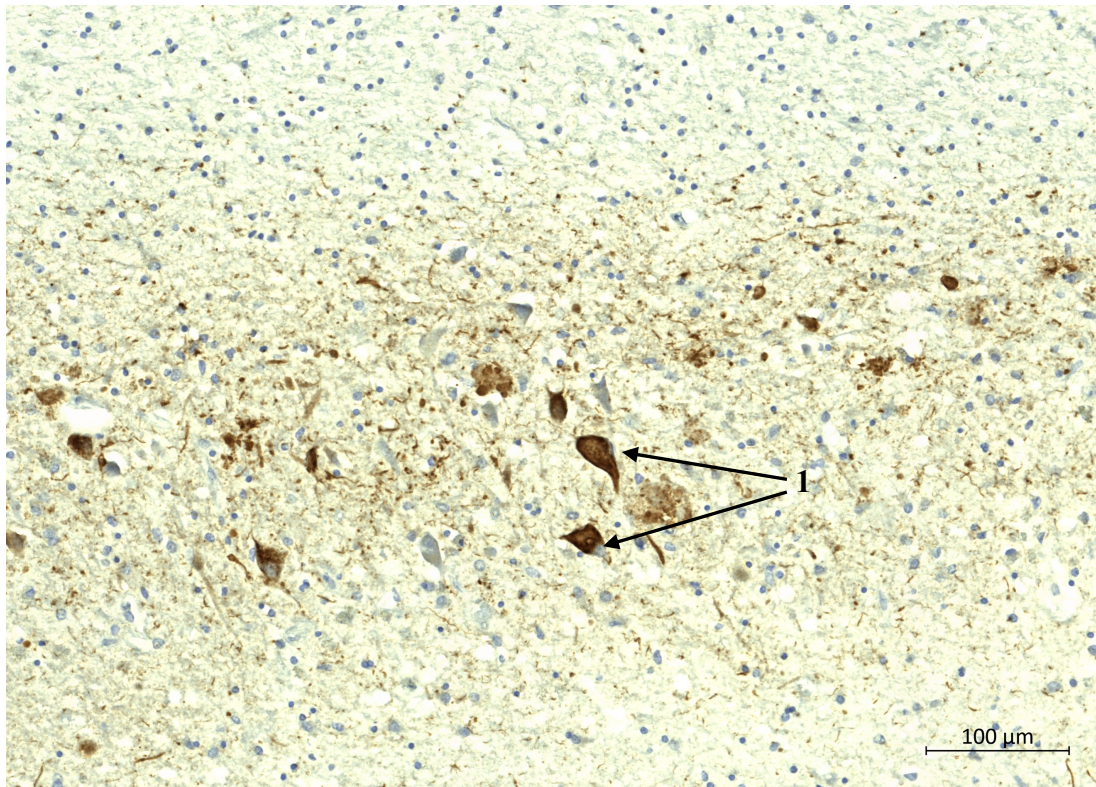


Abbildung 25: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 24

Abbildung der TRPC6-positiven Pyramidenzellen (1) der CA3-Region im linken Hippocampus von Gehirn A.

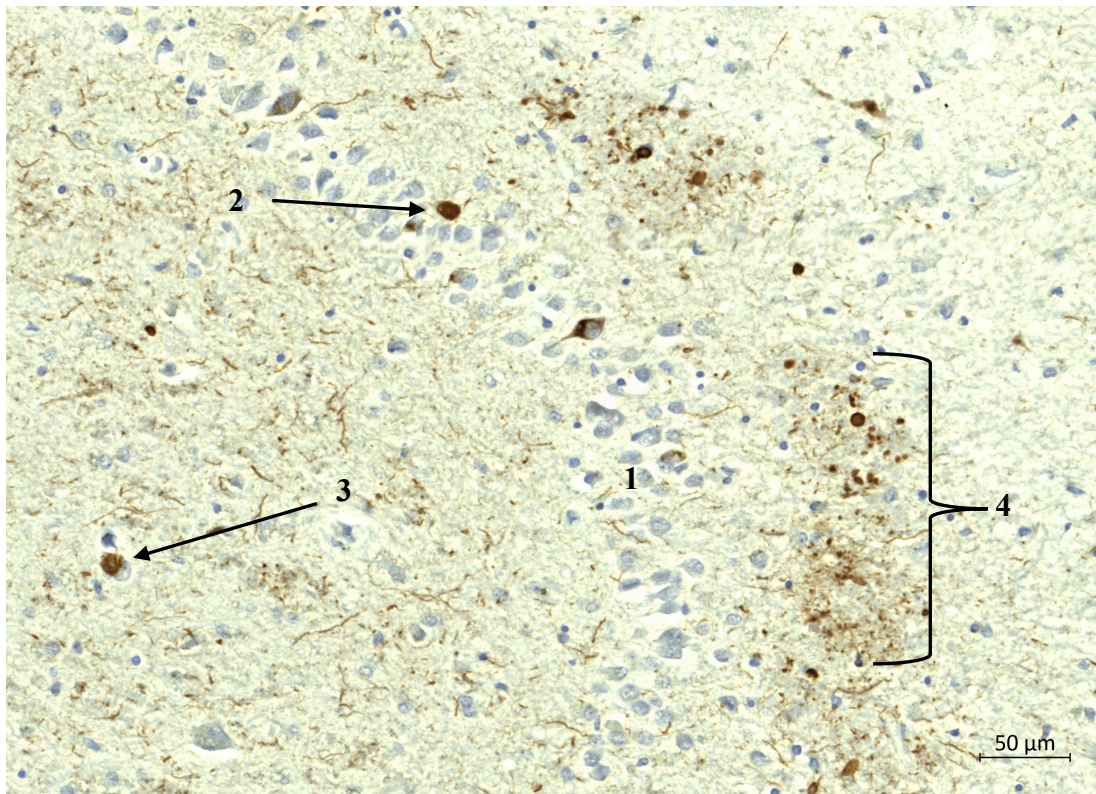


Abbildung 26: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 24

Die Abbildung zeigt den Gyrus dentatus des linken Hippocampus von Gehirn A. Die charakteristischen rundlichen Körnerzellen (1) des Stratum granulosum erscheinen vereinzelt positiv für TRPC6 (vgl. Ziffer 2).

Ziffer 3 markiert eine TRPC6-positive Pyramidenzelle der CA4-Region. Im Stratum moleculare und im Stratum multiforme des Gyrus dentatus kann ein subzelluläres Expressionsmuster von TRPC6 beobachtet werden (4), wie es bereits in der rechten Hemisphäre von Gehirn A nachgewiesen wurde.

5.3.1.2 Gehirn C

Im Vergleich zu Gehirn A weist das formalinfixierte Gehirn C eine insgesamt schwächere Anfärbung für TRPC6 auf. In beiden Hemisphären lässt sich TRPC6 vereinzelt in den Pyramidenzellen des Cornu ammonis und des Subiculus nachweisen. Zusätzlich zeigen sich in der linken Hemisphäre vereinzelt TRPC6-positive Körnerzellen im Gyrus dentatus (vgl. Abbildung 30).

Während in der rechten Hemisphäre vereinzelt TRPC6-positive Pyramidenzellen in den Regionen CA1–CA4 des Cornu ammonis beobachtet werden können, zeigt die linke Hemisphäre vereinzelt einen positiven Farbnachweis für TRPC6 für die Pyramidenzellen der CA1–CA3-Region. Innerhalb der CA4-Region kann links keine Farbreaktion beobachtet werden.

Rechts:

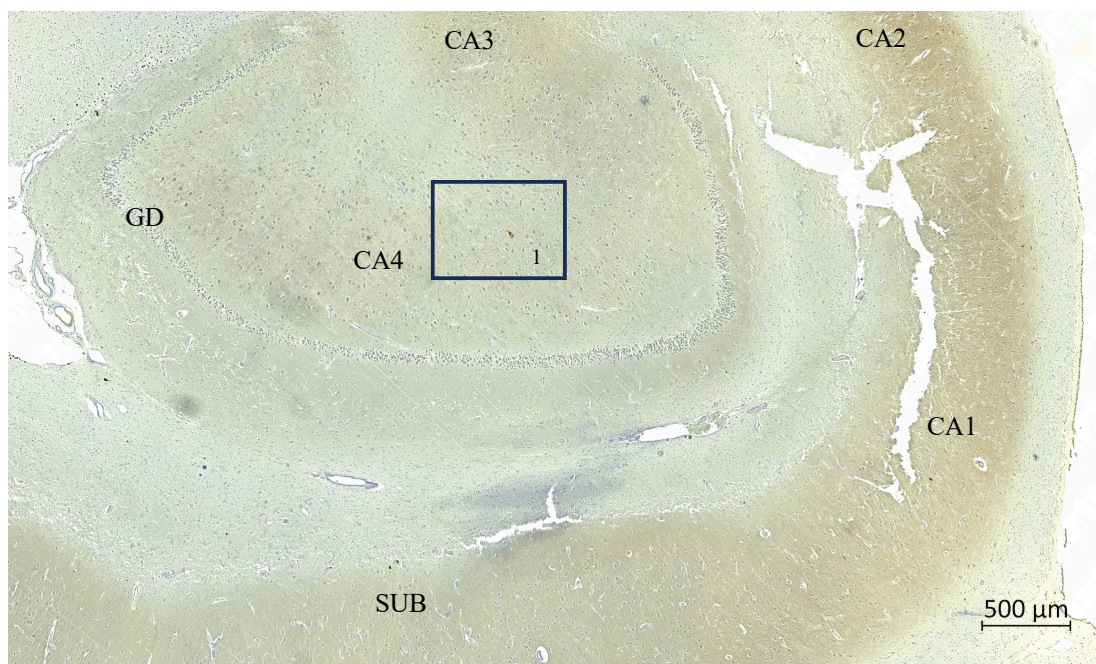


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat c) *H r 2.2*.

Gezeigt sind Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis (CA1–CA4) und Subiculum (SUB) im rechten Hippocampus von Gehirn C. Zur detaillierten Darstellung wurde ein Bildausschnitt markiert.

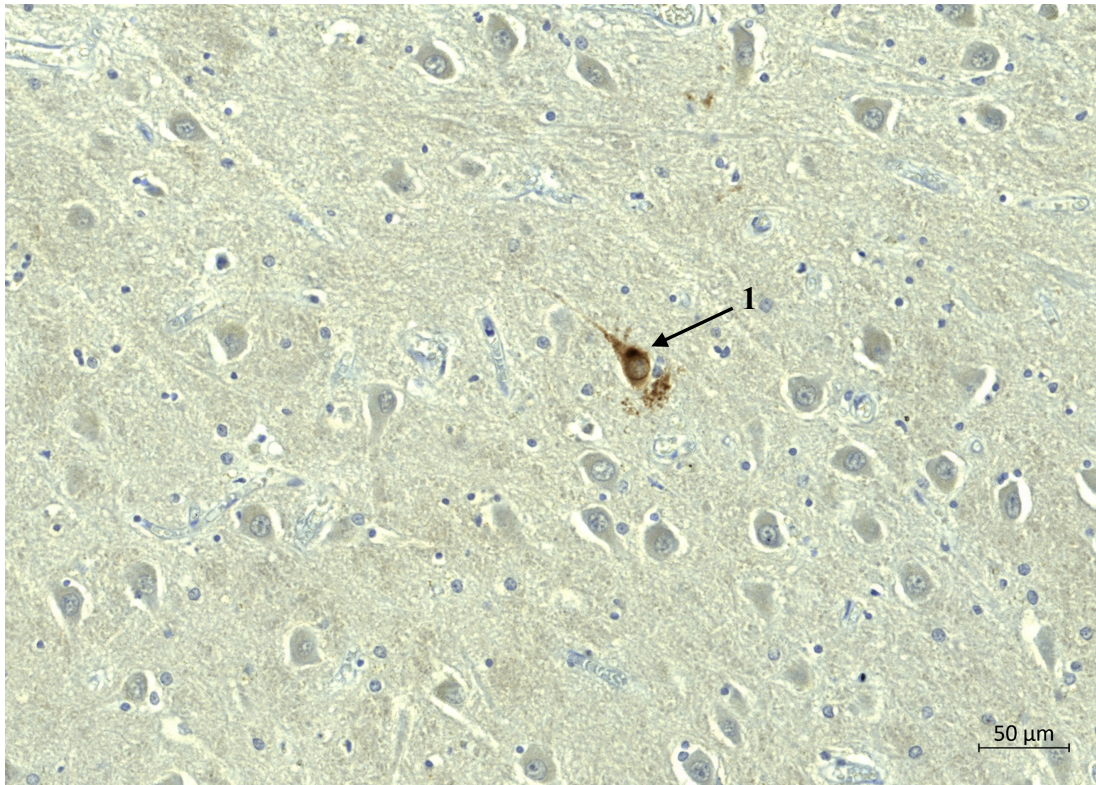


Abbildung 28: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 27

Der Bildausschnitt zeigt die CA4-Region des rechten Hippocampus von Gehirn C.

Ziffer 1 markiert exemplarisch eine TRPC6-positive Pyramidenzelle.

Links:

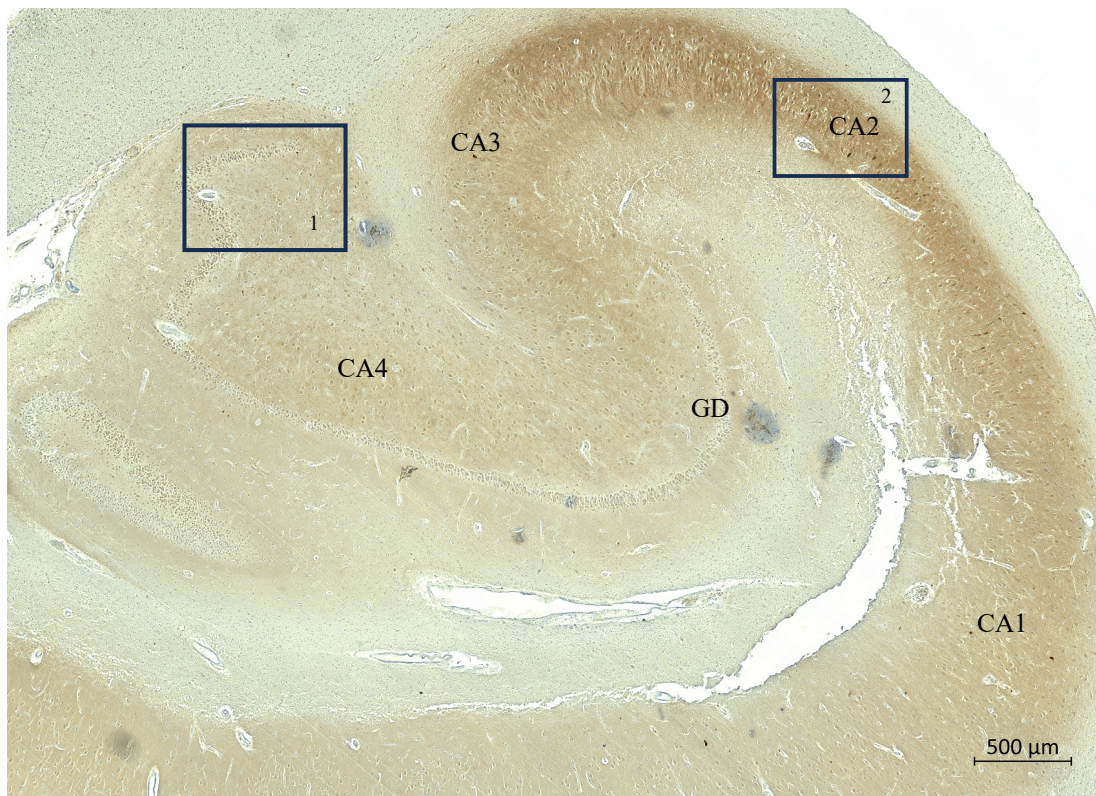


Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *c) H1 2.2*.

Zu sehen sind Gyrus dentatus (GD) und Cornu ammonis (CA1–CA4) im linken Hippocampus von Gehirn C. Zur genauen Betrachtung der Ergebnisse wurden zwei Bildausschnitte markiert.

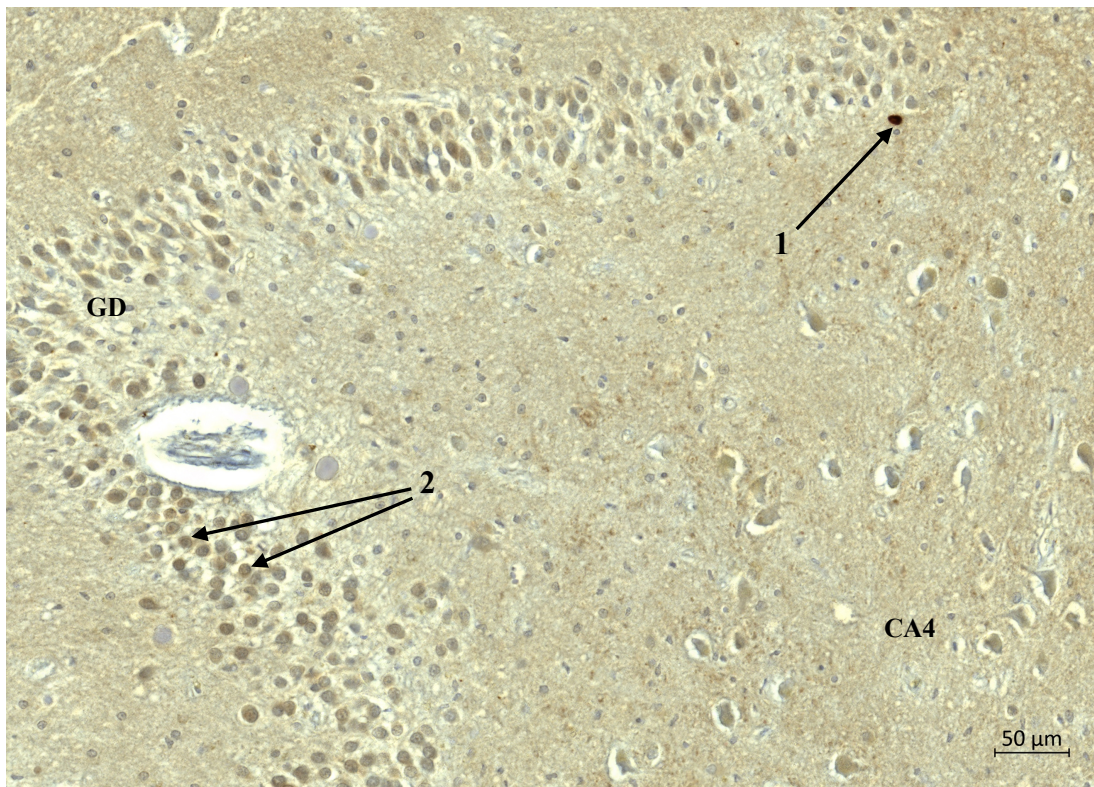


Abbildung 30: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 29

Gezeigt sind Gyrus dentatus (GD) und die CA4-Region des Cornu ammonis. Ziffer 1 zeigt exemplarisch eine TRPC6-positive Körnerzelle. Die Färbung der meisten Körnerzellen ist schwach ausgeprägt (vgl. Ziffer 2). Mit Ausnahme der CA4-Region kann innerhalb der linken Hemisphäre von Gehirn C in den restlichen Regionen des Cornu ammonis vereinzelt eine TRPC6-Expression beobachtet werden.

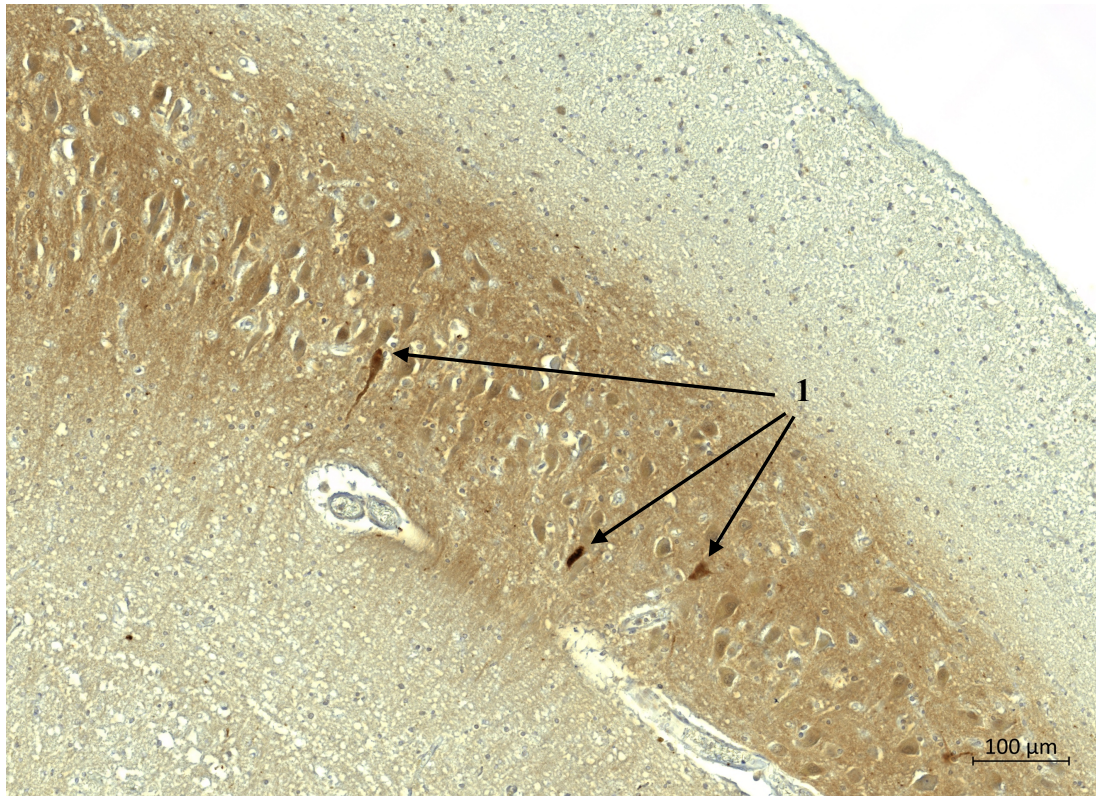


Abbildung 31: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 29

Die Pfeile markieren TRPC6-positive Pyramidenzellen (1) in der CA2-Region des Cornu ammonis im linken Hippocampus von Gehirn C.

5.3.1.3 Gehirn G

Im formalinfixierten Gehirn G kann beidseits keine Farbreaktion für das TRPC6-Kanalprotein beobachtet werden (vgl. Abbildungen 32 und 33).

Rechts:

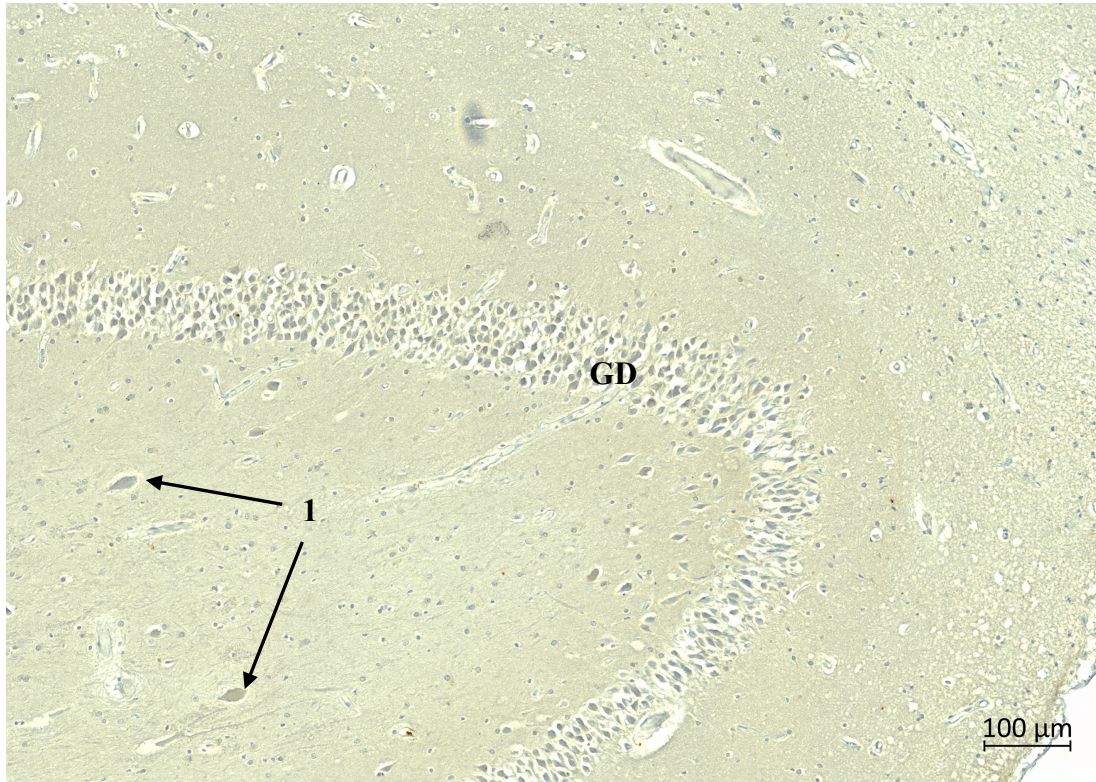


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung für TRPC6 im Präparat *g) Hr 2.3*.

Sowohl die Körnerzellen des Gyrus dentatus (GD) als auch die Pyramidenzellen (1) des Cornu ammonis und des Subiculus zeigen keine Farbreaktion.

Links:

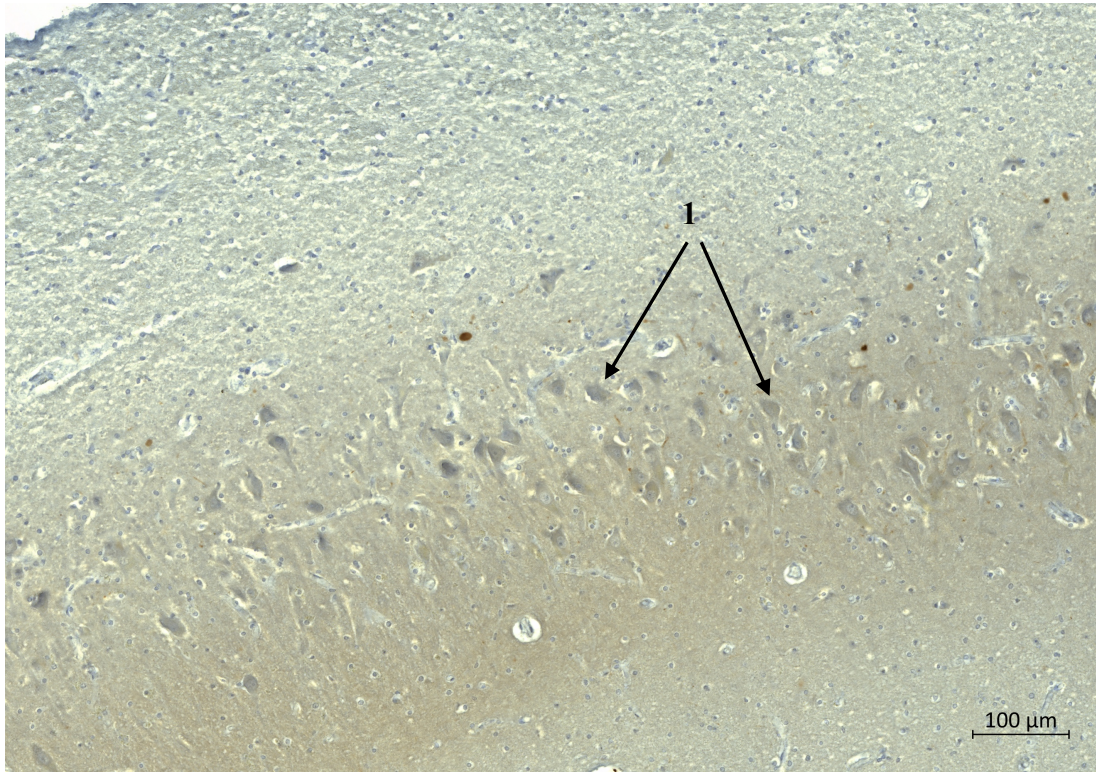


Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung für TRPC6 im Präparat *g) H I 2.3.*

Ziffer 1 markiert die TRPC6-negativen Pyramidenzellen der CA3-Region des Cornu ammonis.

5.3.1.4 Gehirn H

In Gehirn H zeigen sich beidseits vereinzelt die Pyramidenzellen des Cornu ammonis (CA1–CA4) und des Subiculus immunhistochemisch positiv für TRPC6. Eine besonders starke TRPC6-Expression kann beidseits in der CA1-Region beobachtet werden (vgl. Abbildungen 35 und 38). Außerdem zeigen die Körnerzellen des Gyrus dentatus rechts vereinzelt eine Anfärbung für TRPC6 (vgl. Abbildung 36). Linksseitig kann in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus keine Farbreaktion beobachtet werden. Insgesamt weist der linke Hippocampus im Vergleich zum rechten eine stärkere Expression des TRPC6-Kanalproteins auf.

Rechts:

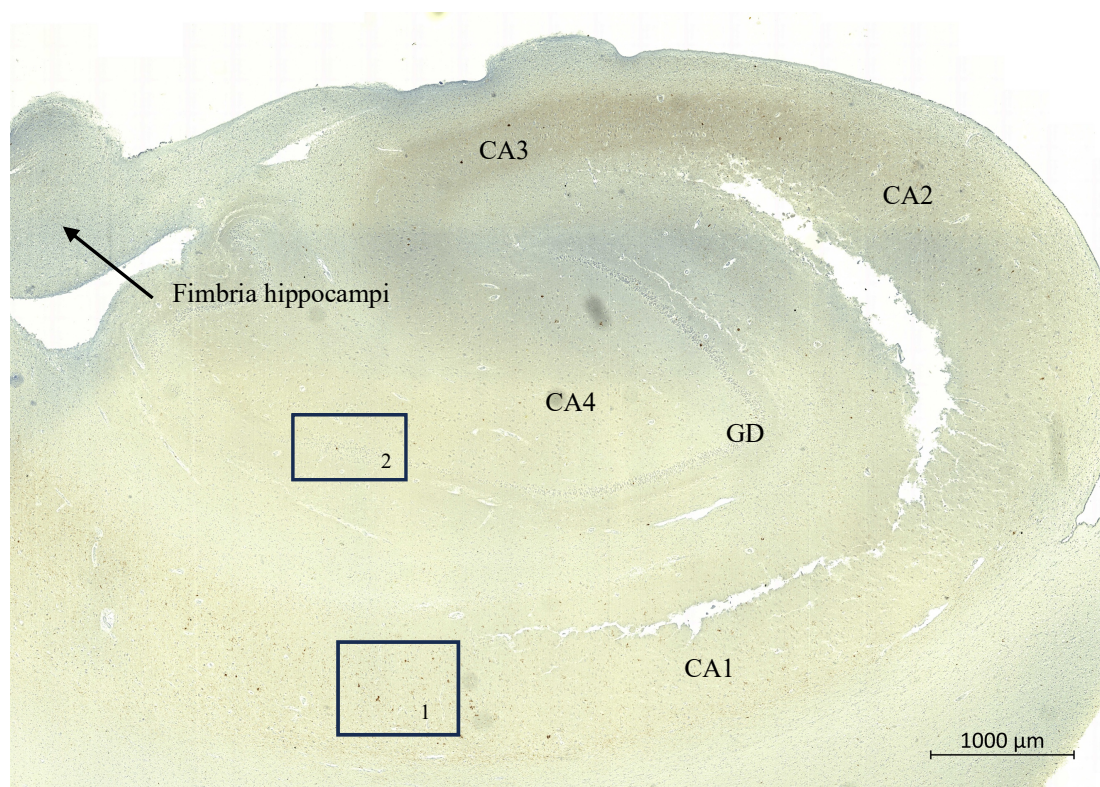


Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *h) Hr 2.2*.

Gezeigt sind Gyrus dentatus (GD) und Cornu ammonis (CA1–CA4) im rechten Hippocampus von Gehirn H sowie zwei weitere Bildausschnitte.

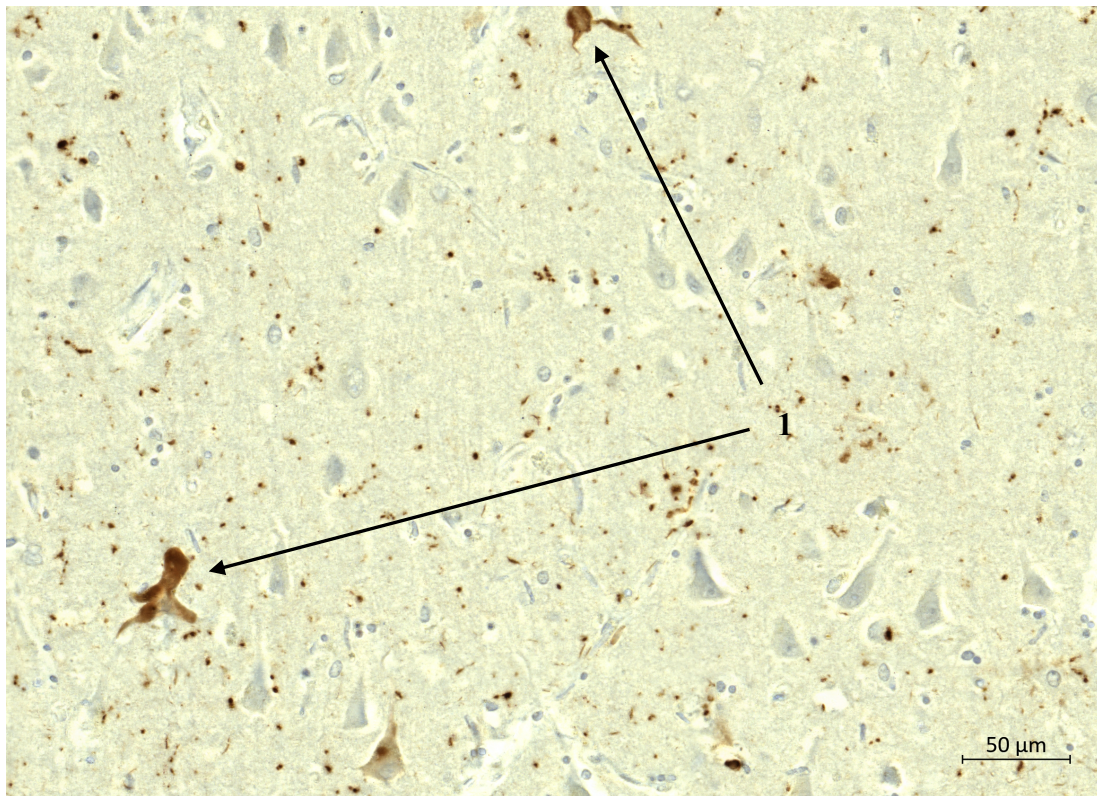


Abbildung 35: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 34

Ziffer 1 markiert immunhistochemisch positive Pyramidenzellen der hier abgebildeten CA1-Region des Cornu ammonis im rechten Hippocampus von Gehirn H.

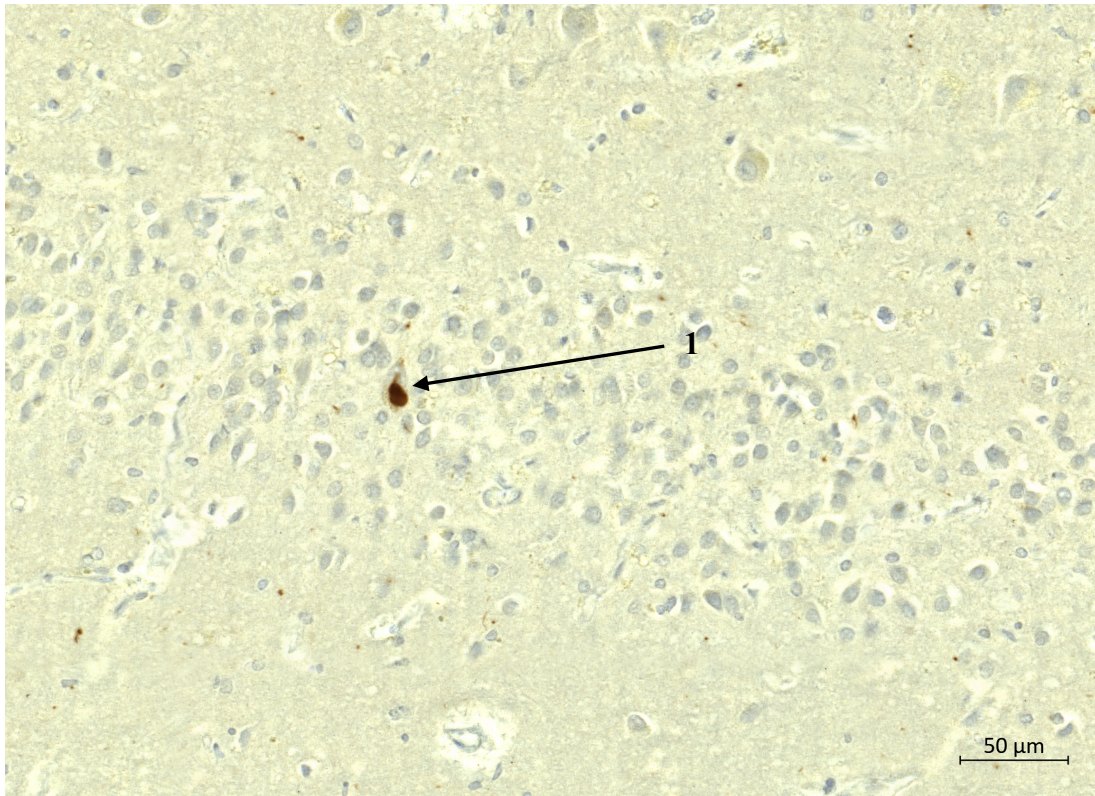


Abbildung 36: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 34

Ziffer 1 kennzeichnet eine TRPC6-positive Körnerzelle des Gyrus dentatus im rechten Hippocampus von Gehirn H.

Links:

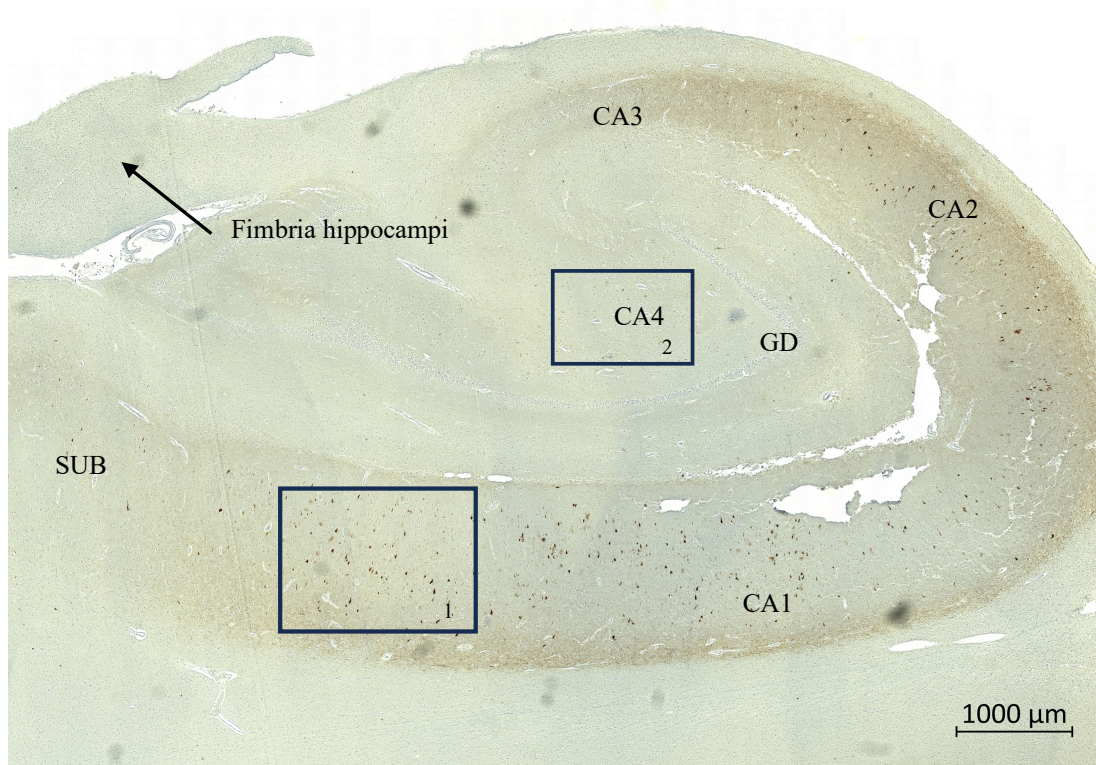


Abbildung 37: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *h) Hl 2.2.*

Zu sehen sind Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis (CA1–CA4) und Subiculum (SUB) im linken Hippocampus von Gehirn H. Zur weiteren Analyse wurden zwei Bildausschnitte markiert.

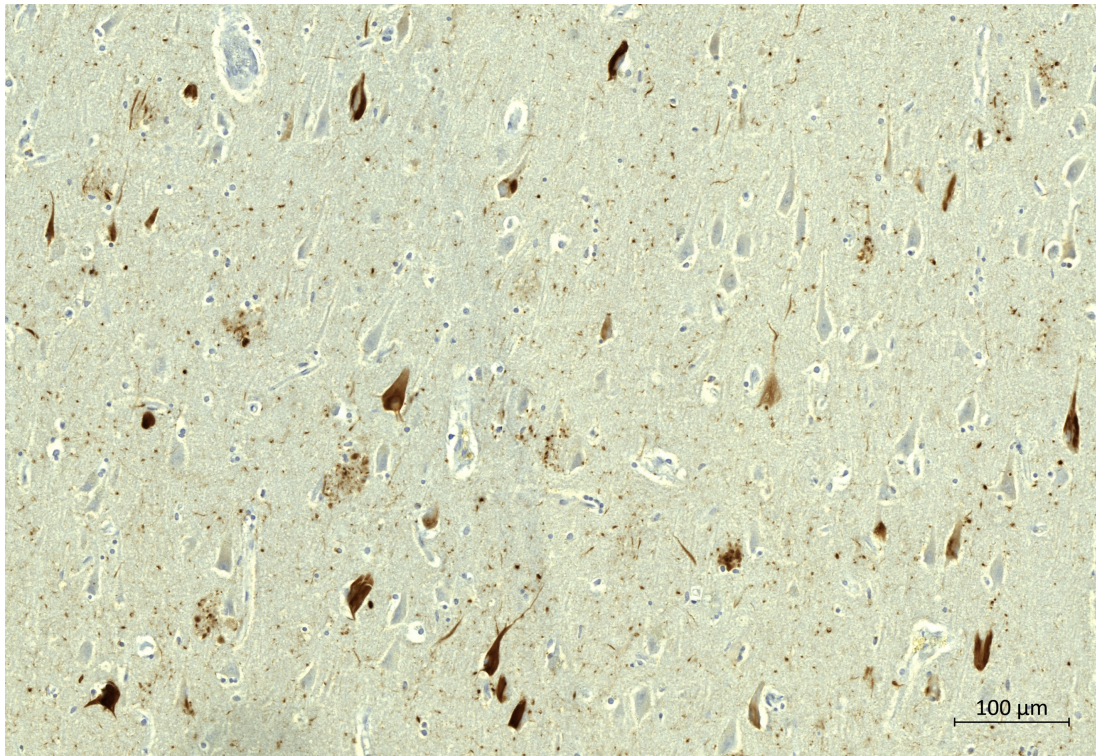


Abbildung 38: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 37

Dargestellt sind TRPC6-positive Pyramidenzellen der CA1-Region im linken Hippocampus von Gehirn H.

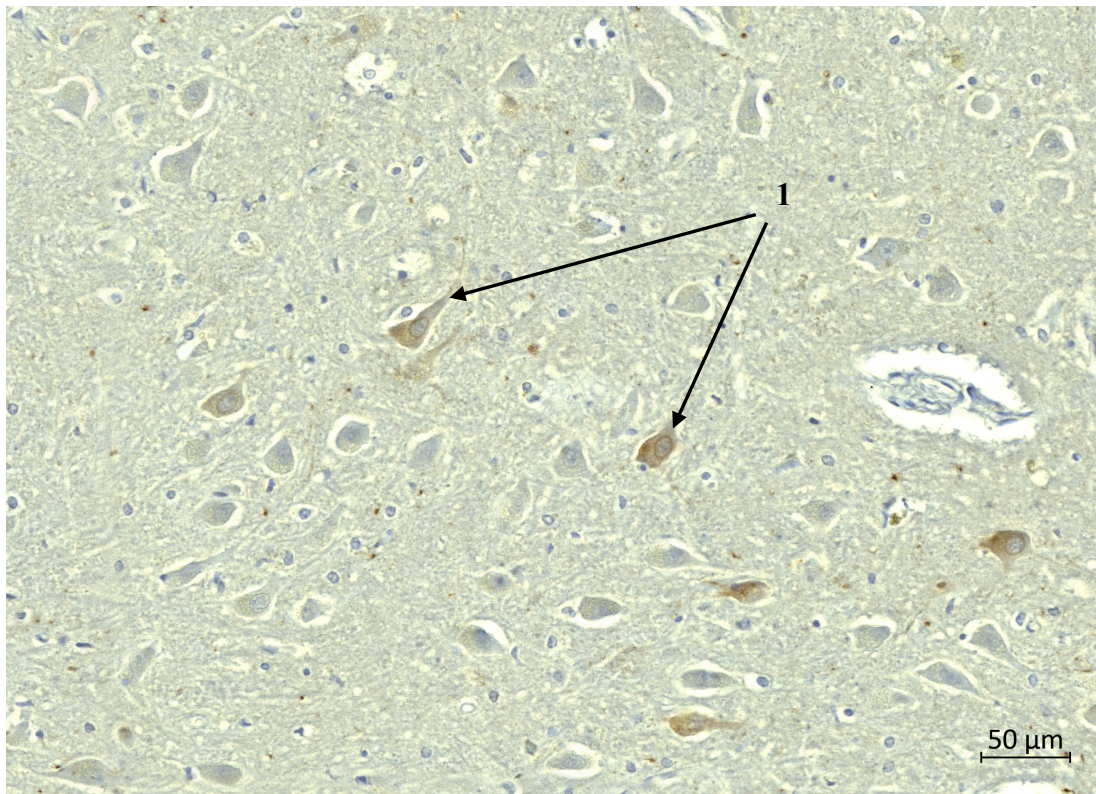


Abbildung 39: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 37

Ziffer 1 markiert zwei TRPC6-positive Pyramidenzellen der CA4-Region im linken Hippocampus von Gehirn H.

5.3.1.5 Gehirn I

In Gehirn I zeigen die Pyramidenzellen des Subiculus sowie der CA1-, CA2- und CA4-Region des Cornu ammonis beider Hippocampi vereinzelt eine Anfärbung für TRPC6 (vgl. Abbildung 41, 42 und 44).

Innerhalb des Gyrus dentatus lassen sich beidseits keine TRPC6-positiven Zellen abgrenzen. Im direkten Seitenvergleich kann links eine stärkere TRPC6-Expression beobachtet werden.

Rechts:

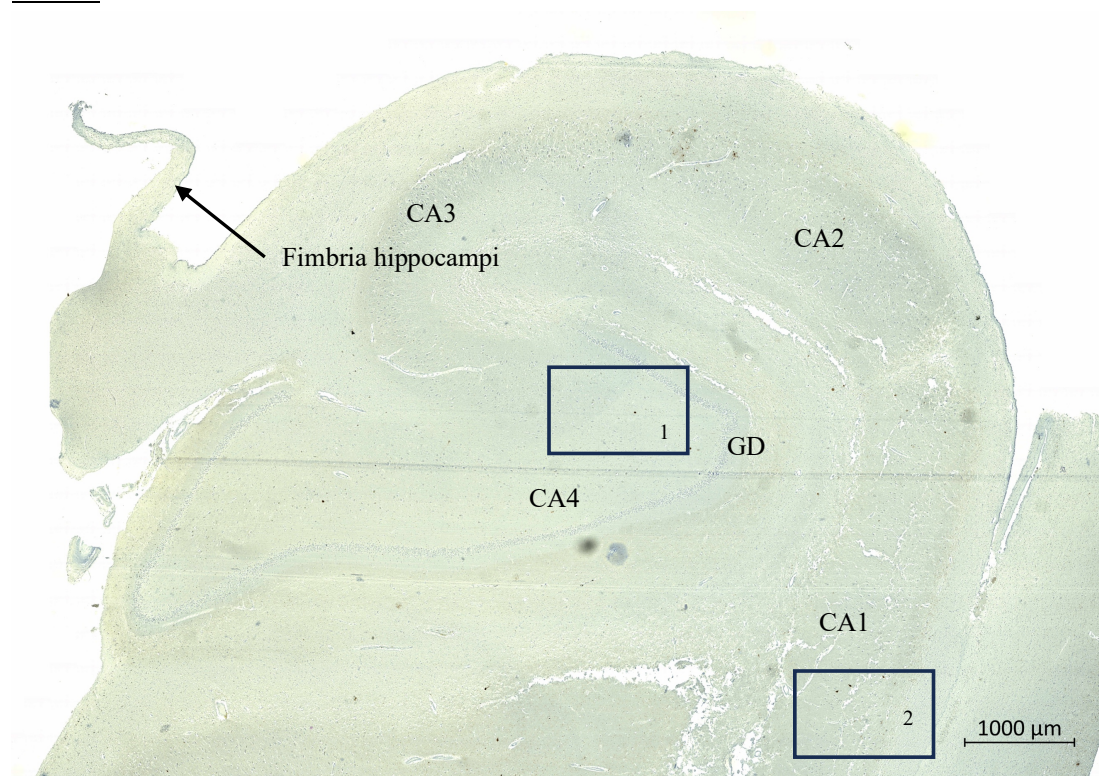


Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat i) *Hr* 2.3.

Zu sehen sind Gyrus dentatus (GD) und Cornu ammonis (CA1–CA4) im rechten Hippocampus von Gehirn I sowie zwei markierte Bildausschnitte.

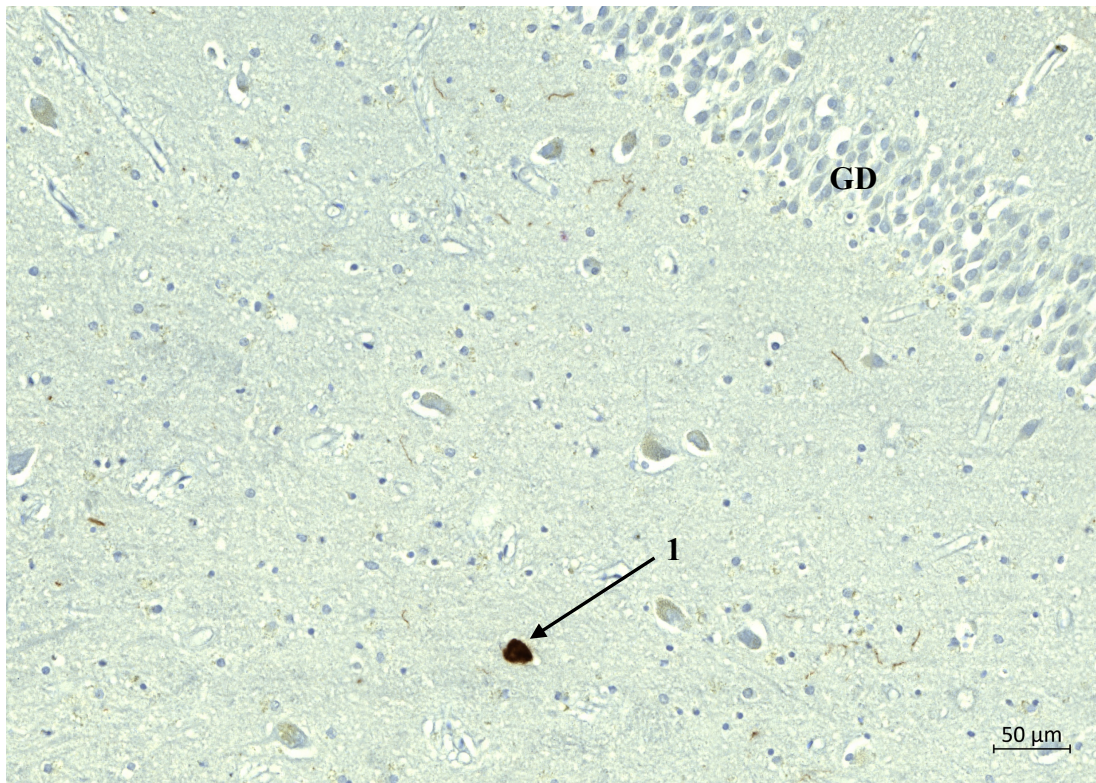


Abbildung 41: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 40

Ziffer 1 markiert eine TRPC6-positive Pyramidenzelle in der CA4-Region des rechten Hippocampus von Gehirn I.

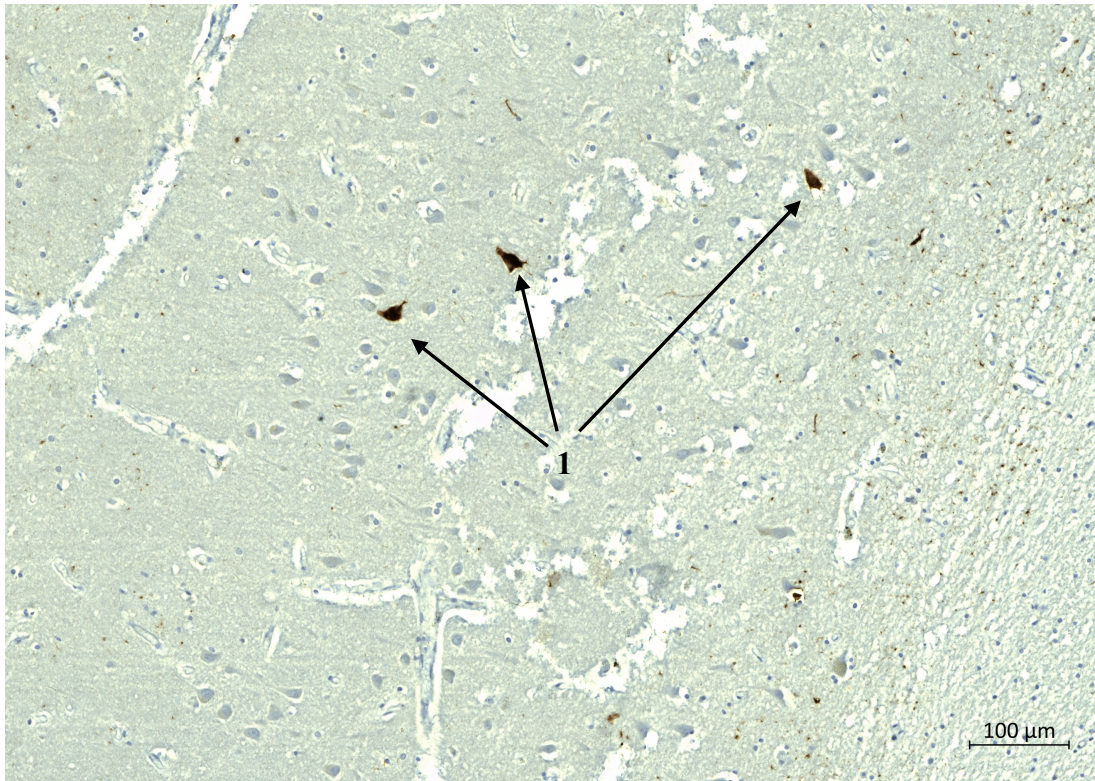


Abbildung 42: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 40

Gezeigt sind TRPC6-positive Pyramidenzellen (1) in der CA1-Region im rechten Hippocampus von Gehirn I.

Links:

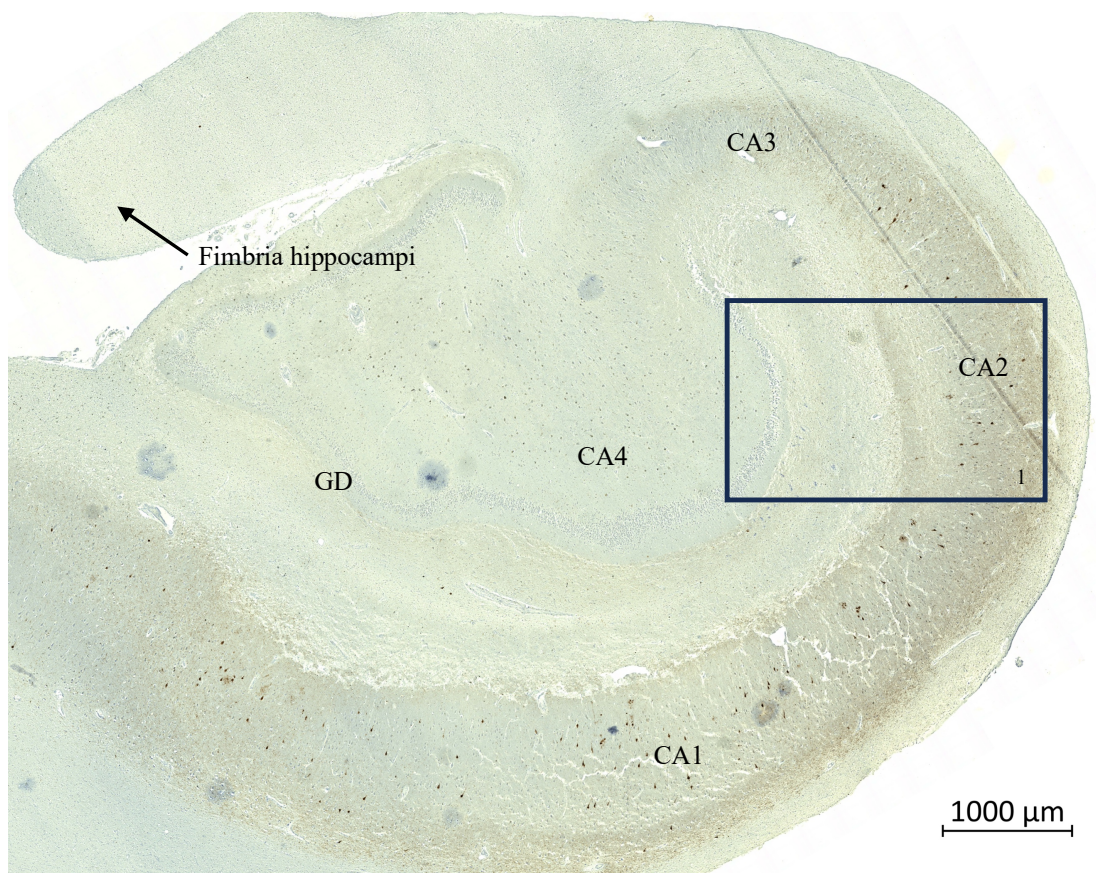


Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *i) H l 2.2.*

Dargestellt sind Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis (CA1–CA4) und Subiculum (SUB) im linken Hippocampus von Gehirn I. Zur weiteren Analyse wurde ein Bildausschnitt markiert.

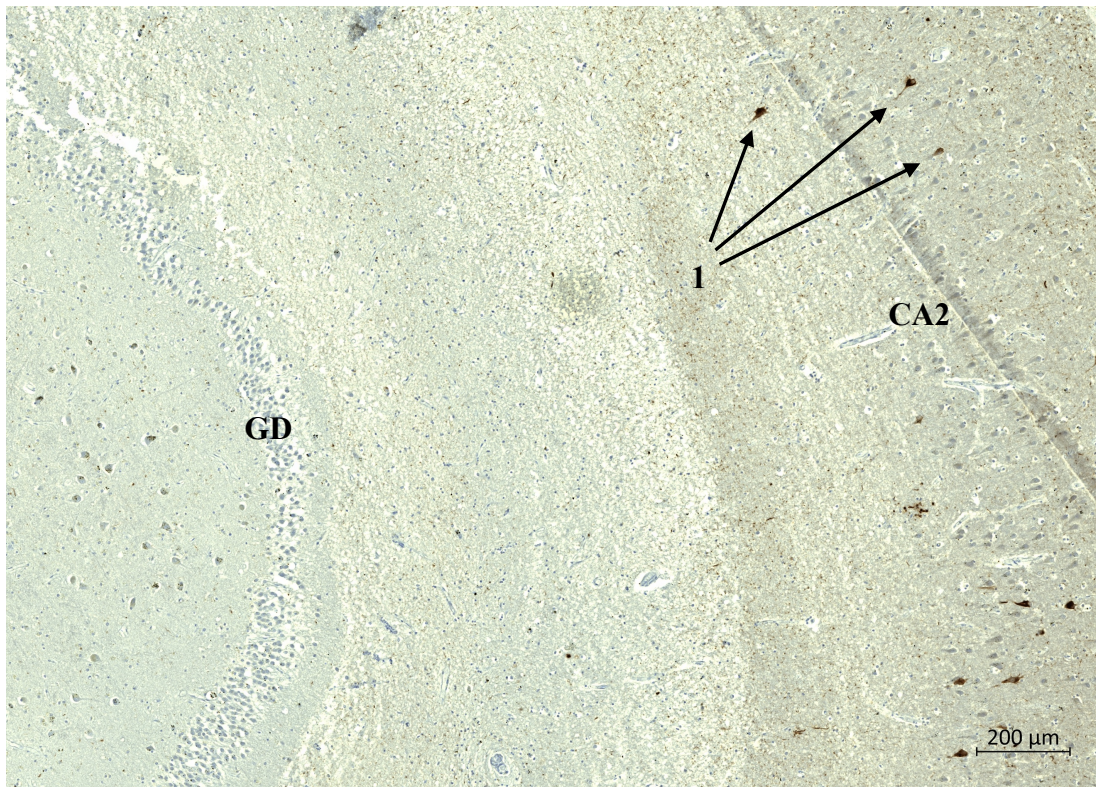


Abbildung 44: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 43

Gezeigt sind die TRPC6-positiven Pyramidenzellen der CA2-Region des Cornu ammonis im linken Hippocampus von Gehirn I (vgl. Ziffer 1). Die Körnerzellen des Gyrus dentatus (GD) weisen keine Farbreaktion auf.

5.3.1.6 Gehirn J

Rechts:

Im rechten Hippocampus von Gehirn J kann ein positiver Farbnachweis für TRPC6 in Pyramidenzellen der CA1-, CA2- und CA4-Region des Cornu ammonis (vgl. Abbildung 46 und 47) sowie in Pyramidenzellen des Subiculus gezeigt werden. Vereinzelt lassen sich TRPC6-positive Körnerzellen im Gyrus dentatus (GD) nachweisen.

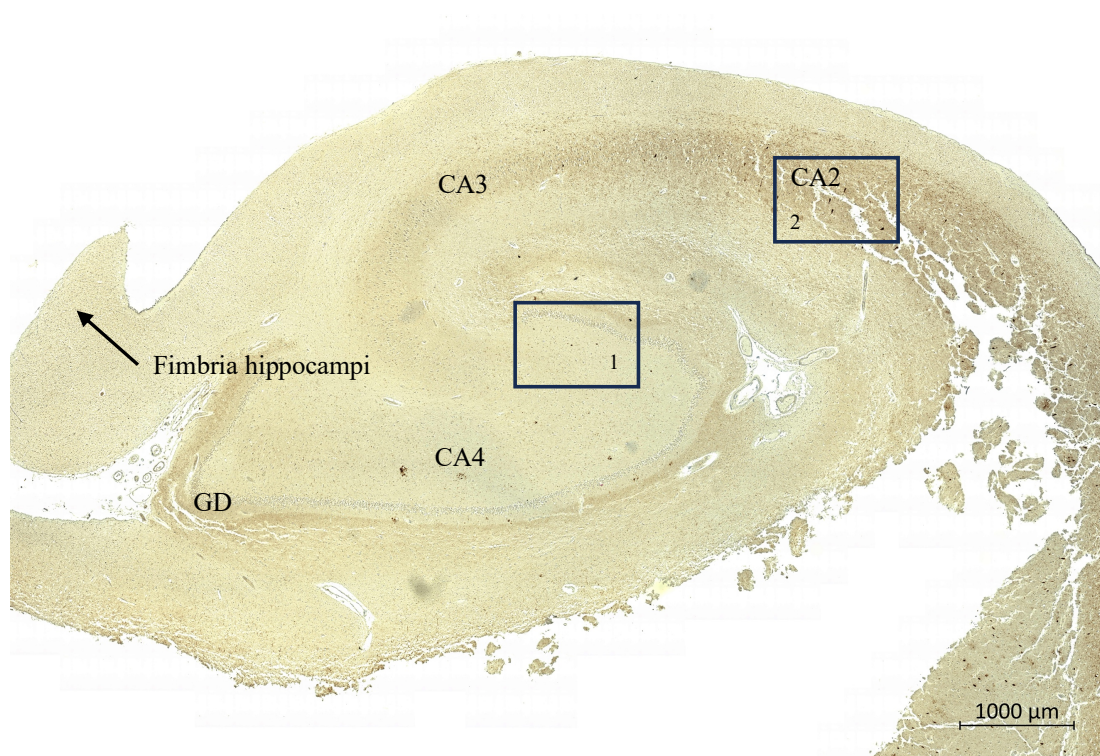


Abbildung 45: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat j) Hr 2.1.

Abgebildet sind Fimbria hippocampi, Cornu ammonis (CA1–CA4) sowie der Gyrus dentatus im rechten Hippocampus von Gehirn J. Zwei Bildausschnitte wurden zur genauen Betrachtung der Ergebnisse markiert.

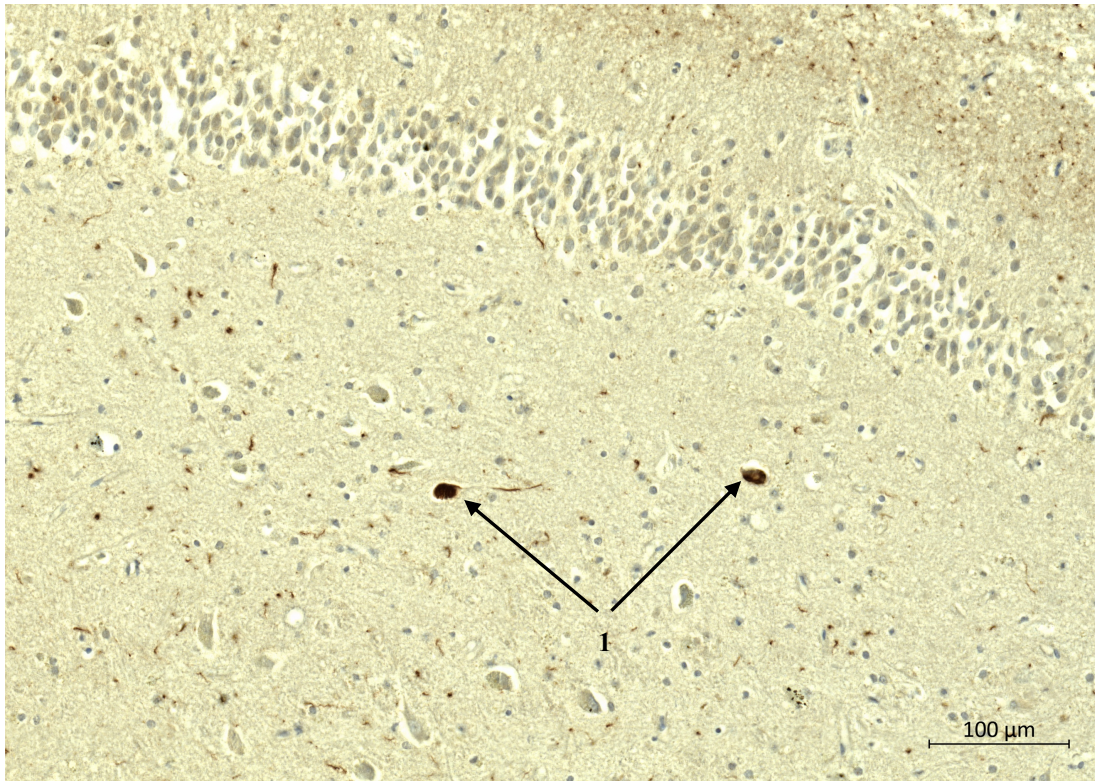


Abbildung 46: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 45

Ziffer 1 markiert zwei TRPC6-positive Pyramidenzellen der CA4-Region im rechten Hippocampus von Gehirn J.

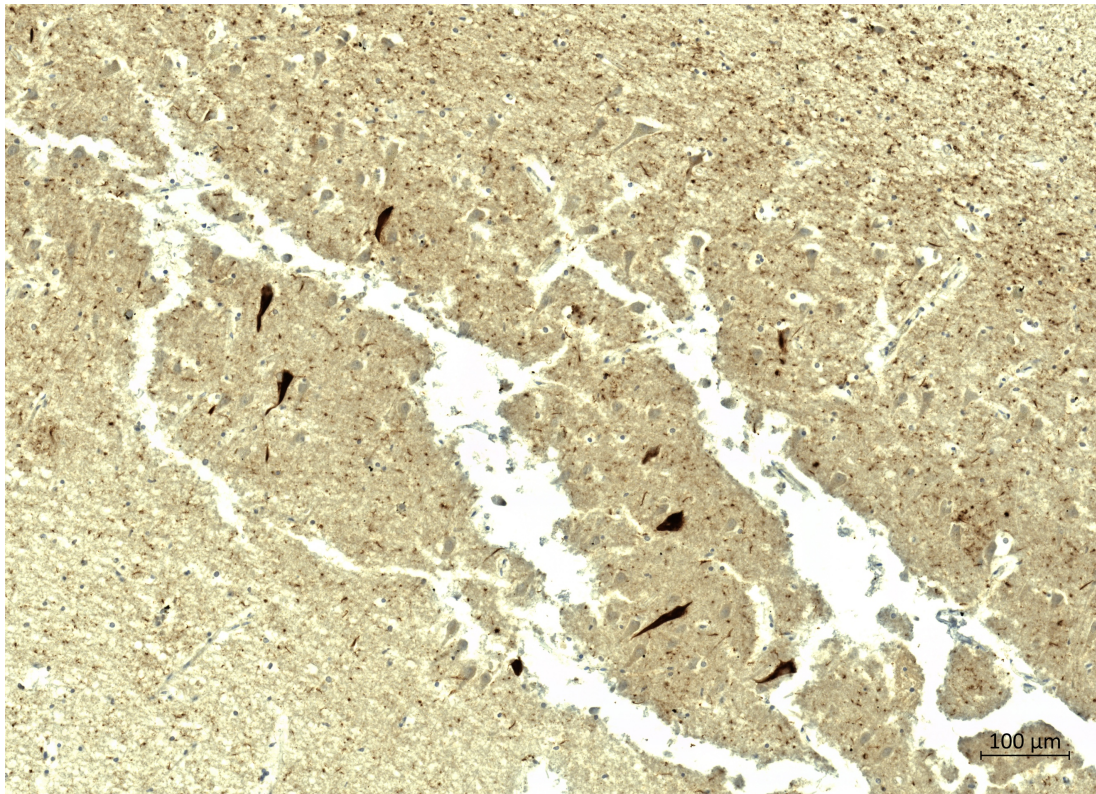


Abbildung 47: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 45

Zu sehen sind TRPC6-positive Pyramidenzellen der CA2-Region im rechten Hippocampus von Gehirn J.

.

5.3.2 TRPC6 im menschlichen Cerebellum

Im menschlichen Cerebellum kann eine Anfärbung für TRPC6 in den inhibitorischen Purkinjezellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 48 und 51).

Des Weiteren zeigen sich die im Stratum granulosum befindlichen Golgi-Zellen, welche als inhibitorische Interneurone fungieren und ein negatives Rückkopplungssystem für Körnerzellen bilden, immunhistochemisch positiv für TRPC6 (vgl. Abbildung 48 und 49). Auch in den inhibitorischen Sternzellen im Stratum moleculare kann eine Anfärbung für TRPC6 beobachtet werden (vgl. Abbildung 50).

Kleinhirnhemisphäre:

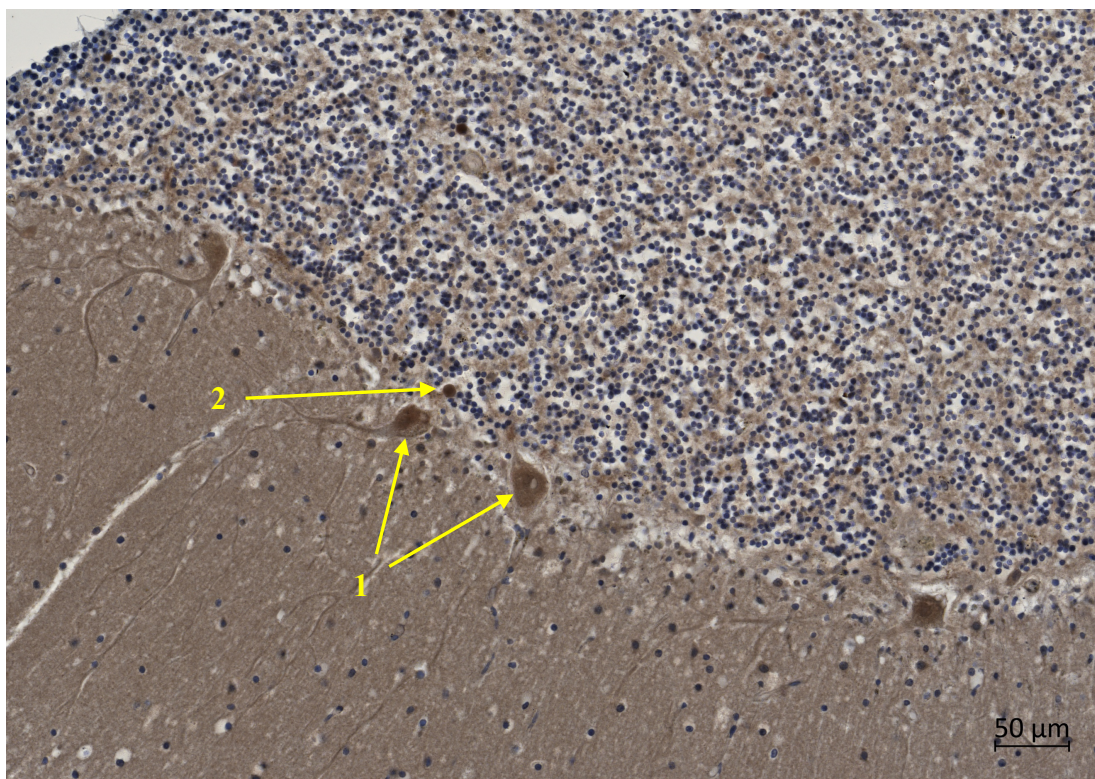


Abbildung 48: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *a) C l 2*

Gezeigt ist das Kleinhirnparenchym mit Darstellung der TRPC6-positiven Purkinjezellen (1). Ziffer 2 markiert eine im Stratum granulosum gelegene TRPC6-positive Golgi-Zelle.

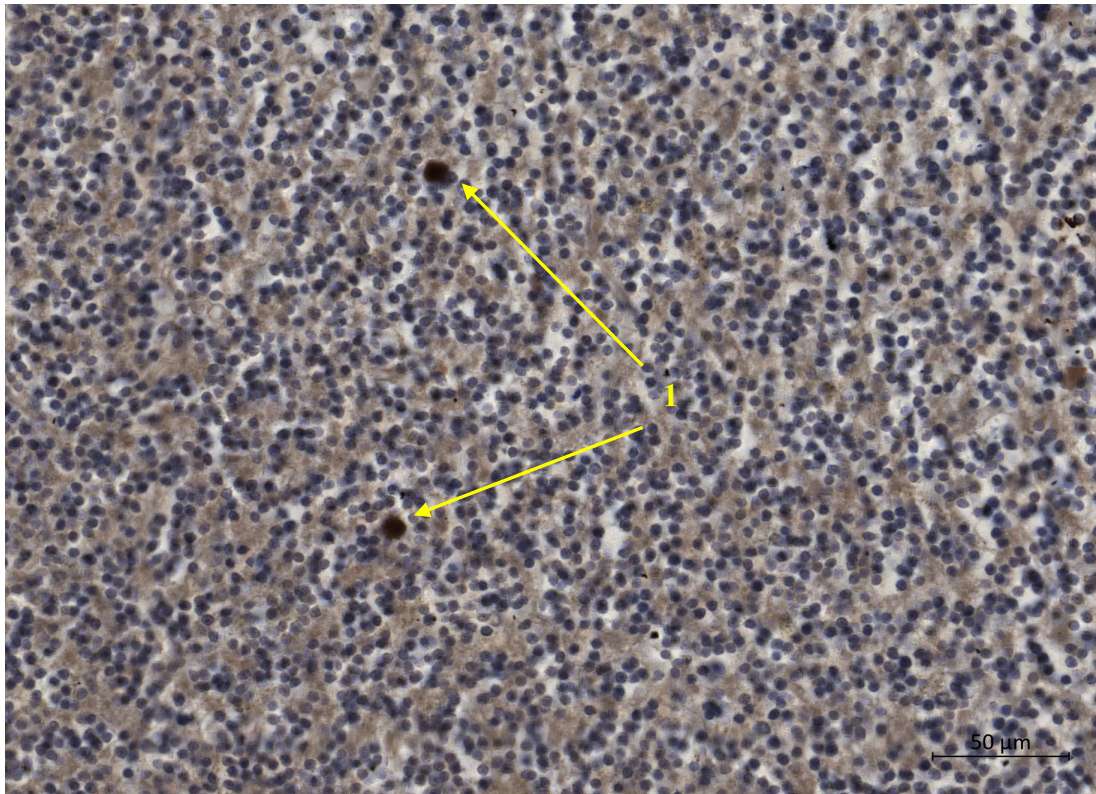


Abbildung 49: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *a) C l 2*

Detailansicht des Stratum granulosum der Kleinhirnrinde mit Abbildung der TRPC6-positiven inhibitorischen Golgi-Zellen (1)

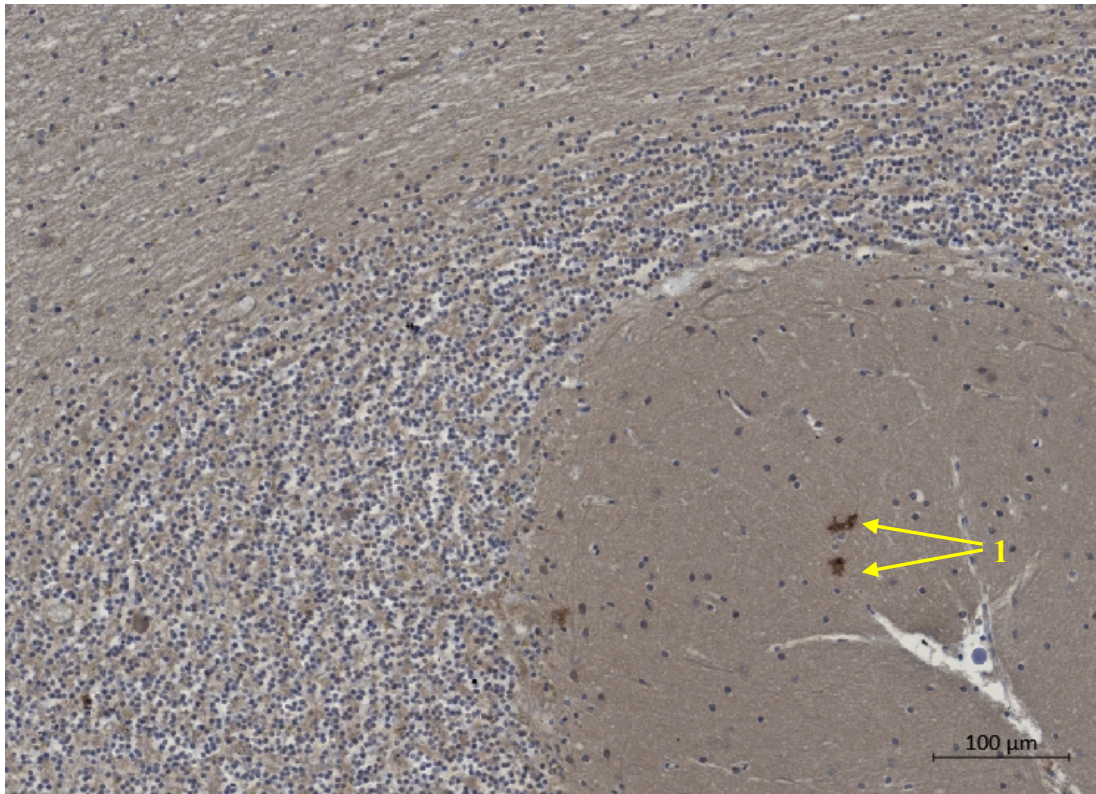


Abbildung 50: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *a) C l 2*

Ziffer 1 markiert TRPC6-positive inhibitorische Sternzellen im Stratum moleculare des menschlichen Kleinhirns.

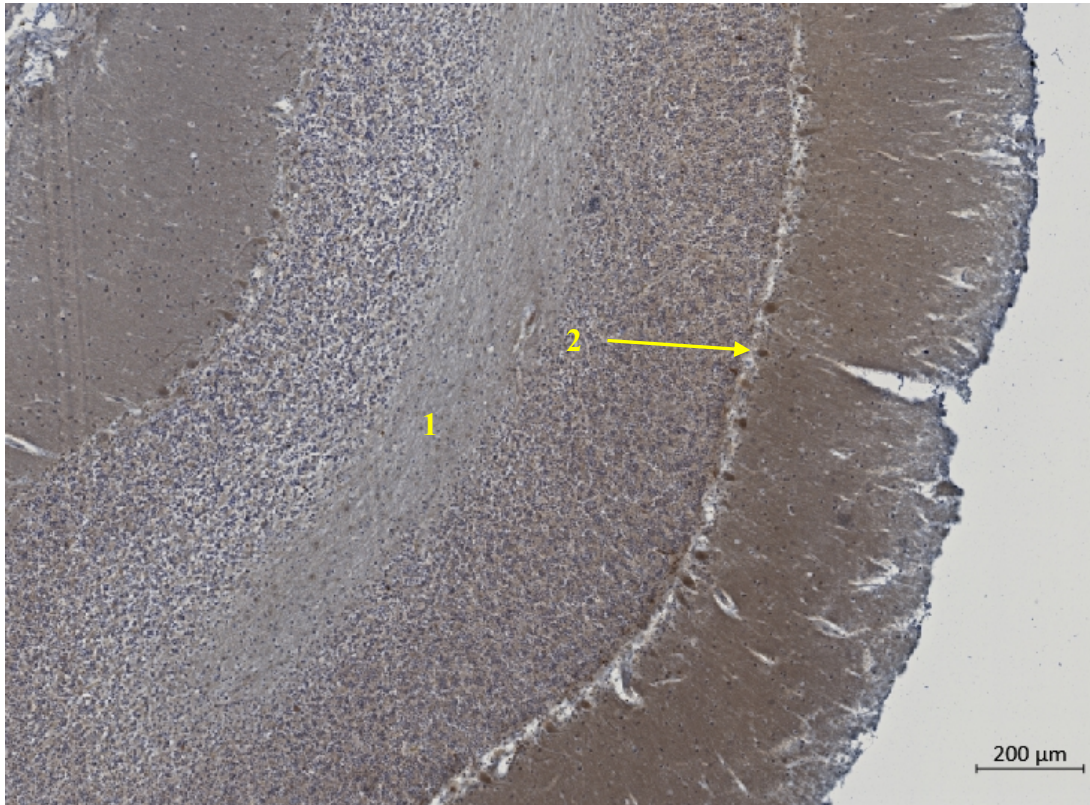
Vermis:

Abbildung 51: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *a) V l 2*

Gezeigt ist ein Gewebeschnitt des Vermis von Gehirn A mit der charakteristischen Gliederung in Marklager (1) und Kleinhirnrinde, bestehend aus Stratum granulosum, Stratum purkinjense und Stratum moleculare. Ziffer 2 markiert eine der TRPC6-positiven inhibitorischen Purkinjezellen der Kleinhirnrinde.

5.3.3 TRPC6 in menschlichen Glioblastomen

In beiden untersuchten Proben aus menschlichen Glioblastomen kann TRPC6 immunhistochemisch nachgewiesen werden.

In Präparat *GBM B* zeigt sich hierbei lichtmikroskopisch eine stärkere TRPC6-Expression der stark polymorphen Zellen des Glioblastoms als in Präparat *GBM A* (vgl. Abbildungen 52 und 53).

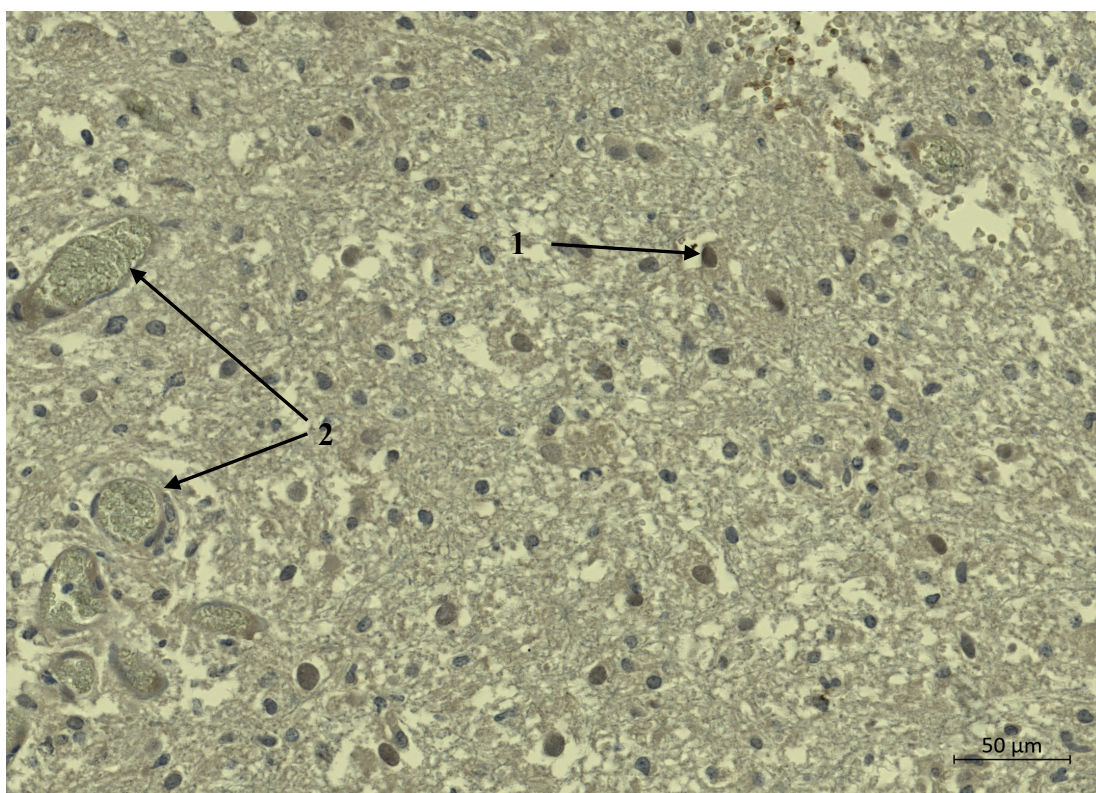


Abbildung 52: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *GBM A*

Ziffer 1 markiert beispielhaft eine TRPC6-positive Zelle. Weiterhin sind innerhalb des Tumors charakteristische Gefäßproliferate (2) zu sehen.

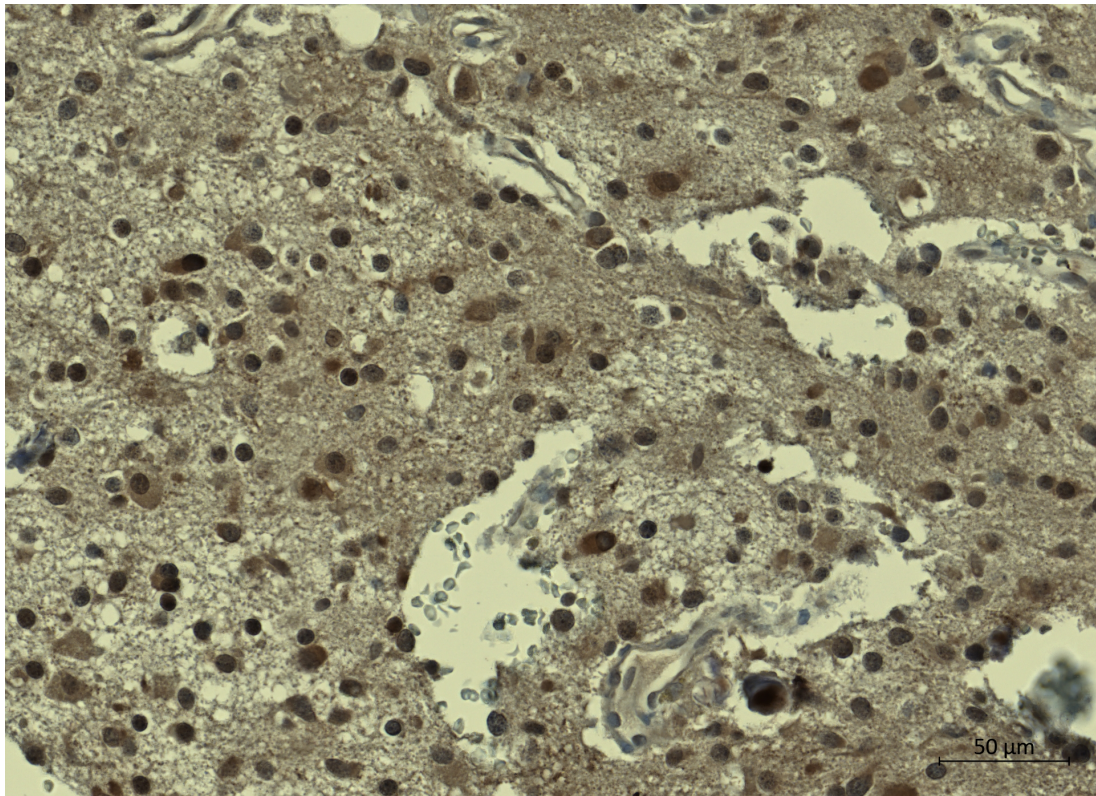


Abbildung 53: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat *GBM B*

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methodik

In dieser Arbeit wurden 15 Proben ausgewertet, darunter elf Proben des menschlichen Hippocampus von sechs Körperspendern sowie zwei Proben des menschlichen Cerebellums eines Körperspenders. Die Arbeit wurde um die Untersuchung von zwei Proben aus menschlichen Glioblastomen ergänzt, die freundlicherweise aus der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes bereitgestellt wurden.

Da es sich bei dem untersuchten Gewebe um Gewebe von Körperspendern bzw. Patienten handelt, sind verschiedene Variablen vorgegeben, die potenziell Einfluss auf das Ergebnis des immunhistochemischen TRPC6-Nachweises ausüben können. Dazu gehören neben dem Alter der Körperspender auch mögliche Vorerkrankungen sowie der Lebensstil der Spender. Das Probenkollektiv bestand aus Gewebe von Körperspendern mit einer Altersspanne von 57 bis 91 Jahren. Zwei Drittel der Spender wiesen ein Alter zwischen 80 und 91 Jahren auf, sodass die Ergebnisse der Studie nicht auf alle Altersklassen übertragen werden können und differenziert betrachtet werden müssen.

Des Weiteren muss die Fixierung als möglicher Einflussfaktor auf den immunhistochemischen TRPC6-Nachweis miteinbezogen werden. Während der Großteil der Körperspender NEP-fixiert war, zählen Gehirn C und Gehirn G zu dem Gewebe, welches aus fomalinfixierten Körperspendern gewonnen wurde. Da Formaldehyd die Proteinstruktur verändert und zu einer reversiblen Verminderung der Antigenität führt, muss bei Betrachtung der Ergebnisse bedacht werden, dass eine möglicherweise unzureichende Antigendemaskierung zu einer eingeschränkten

Aussagekraft der Färbung durch eine abgeschwächte oder fehlende Färbung führen kann [121,149,173].

Für das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung ist außerdem die Probenqualität von großer Relevanz. Da das Hirngewebe von Natur aus sehr vulnerabel und besonders empfindlich gegenüber äußeren Reizen und Noxen ist, kann eine erfolgreiche Konservierung nicht immer gewährleistet werden. Auch in dieser Arbeit gestaltete sich die Nachfixierung der Gehirne trotz etablierter Verfahren schwierig. Vier der insgesamt sechs entnommenen Gehirne wiesen nach der Nachfixierung eine unzureichende Probenqualität auf. Um eine Beeinflussung der Arbeit durch eine unzureichende Probenqualität zu vermeiden, fanden die betroffenen Gehirne keine weitere Verwendung und wurden durch Gehirne ersetzt, die eine gute Probenqualität aufwiesen.

Die Komplexität der Arbeitsschritte, insbesondere das Gewinnen, Aufbereiten und Verarbeiten der Proben stellt von Natur aus ein fehleranfälliges Konstrukt dar. Um die Fehleranfälligkeit möglichst gering zu halten und eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu schaffen, wurden alle Schritte nach einem standardisierten Schema ausgeführt. Für die Paraffinschnitte wurde standardisiert eine Dicke von 7 µm gewählt. Bei einer geringeren Schnittdicke wäre eine weniger intensive Anfärbung denkbar, wohingegen bei einer breiteren Schnittdicke womöglich mehr Protein markiert werden würde [86]. Um die Qualität der Färbung zu optimieren und unspezifische Hintergrundfärbungen oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden durch Anpassen der Antikörperverschüttung und Substratinkubationszeit standardisierte Parameter etabliert. Nach Durchführung einer Verdünnungsreihe 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 mit einer Substratinkubationszeit von 1 min, zeigte sich eine Verdünnung des primären Antikörpers von 1:100 zum Nachweis des TRPC6-Kanals als geeignet. Die Inkubationszeit für das Chromogen DAB wurde initial zu kurz gewählt (1–2,5 min),

sodass die Braunfärbung nur schwach ausgeprägt war. Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf eine Dauer von 3 min konnte ein gutes Färbeergebnis ohne unspezifische Hintergrundfärbungen erreicht werden. Daher wurde eine Substratinkubationszeit von drei Minuten für die Färbung der Gewebeschnitte von Hippocampus und Kleinhirn als Standard gewählt.

Für die Gewebeschnitte der Glioblastome aus der Neurochirurgie erwies sich eine Substratinkubationszeit von sechs Minuten als geeignet.

Ein weiterer Einflussfaktor auf das Ergebnis der IHC stellt die Wahl des Antikörpers dar [48]. In dieser Arbeit wurde ein polyklonaler Knockout-validierter Antikörper verwendet, der bereits in einigen Knockout- und Knockdown-Forschungen geprüft wurde [54,62,78]. Um die Spezifität der Färbung zu gewährleisten, wurde ergänzend eine Peptidkontrolle durchgeführt. Außerdem wurde in jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle mitgeführt.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Peptidkontrolle und Negativkontrolle

Die in jedem Färbedurchgang mitgeführte Negativkontrolle zeigte sich allzeit negativ. Ebenso ließ sich in der Peptidkontrolle eine deutlich abgeschwächte Färbung des am stärksten angefärbten Präparats *a) H r 2.2.* beobachten, sodass insgesamt von einer Spezifität der Ergebnisse auszugehen ist.

6.2.2 TRPC6 im menschlichen Hippocampus

Ein immunhistochemischer Nachweis des TRPC6-Kanalproteins im menschlichen Hippocampus wird laut aktueller Studienlage in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Ein Hauptgrund stellt mit Sicherheit das Ausweichen auf tierexperimentelle Studien aufgrund mangelnden Probenmaterials dar. Angesichts dieser Tatsache scheint die vorliegende Arbeit den ersten immunhistochemischen Nachweis des TRPC6-Kanalproteins im menschlichen Hippocampus zu liefern und gibt dadurch wertvolle Aufschlüsse über die Physiologie des menschlichen ZNS.

Mit Ausnahme von Gehirn G konnte in allen Gehirnen eine Anfärbung für TRPC6 in Pyramidenzellen des Cornu ammonis und des Subiculums beobachtet werden.

Des Weiteren zeigte sich in vier der sechs untersuchten Gehirne bzw. in fünf der elf untersuchten Hippocampi ein positiver Farbnachweis für TRPC6 in Körnerzellen des Gyrus dentatus. Außerdem konnte in einem der untersuchten Gehirne (Gehirn A) immunhistochemisch beidseits eine subzelluläre Expression des Kanalproteins im Stratum moleculare und im Stratum multiforme beobachtet werden.

Die Anzahl, Verteilung und Intensität der TRPC6-positiven Pyramidenzellen innerhalb des Cornu ammonis und des Subiculums zeigte innerhalb der verschiedenen Gehirne eine gewisse Variabilität. Als mögliche Ursache hierfür wären vorgegebene Faktoren wie Alter, Vorerkrankungen und Lebensstil der Spender denkbar. Die Ergebnisse sollten daher aufgrund des ausgewählten Probenkollektivs differenziert betrachtet werden.

Neben dem fehlenden immunhistochemischen Nachweis von TRPC6 in Gehirn G, zeigt Gehirn C eine deutlich schwächere Anfärbung und eine geringere TRPC6-Expression. Bei der weiteren Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass Gehirn C und G im Gegensatz zu den übrigen NEP-fixierten Gehirnen, formalinfixiert sind. Es liegt daher nahe, dass der fehlende Nachweis bzw. die verminderte Expression des TRPC6-Kanalproteins in Gehirn G und in Gehirn C unter Umständen auf eine unzureichende Antigendemaskierung der Epitope für TRPC6 im Formalin-fixierten Gewebe zurückzuführen ist. Auffallend gegenüber den restlichen Proben war weiterhin eine

besonders starke Anfärbung für TRPC6 im rechten Hippocampus des NEP-fixierten Gehirn A. Daher wurde das entsprechende Präparat *a) H r 2.2.* für die Durchführung der Peptidkontrolle gewählt.

Eine Aussage über den Einfluss der Lokalisation (rechts/links) der Gewebeproben auf den TRPC6-Proteinnachweis ist für das ausgewählte Probenkollektiv nur bedingt möglich. In drei der sechs untersuchten Gehirne zeigte sich im Seitenvergleich eine stärkere TRPC6-Expression innerhalb der linken Hemisphäre.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass eines der insgesamt sechs untersuchten Gehirne, nämlich Gehirn G, keinen Farbnachweis für TRPC6 zeigte und dass für Gehirn J lediglich die rechte Hemisphäre untersucht werden konnte. Eine definitive Aussage über eine Abhängigkeit des TRPC6-Proteinnachweises von der Lokalisation lässt sich daher final nicht treffen.

Auch für den immunhistochemischen Nachweis von TRPC6 in den Körnerzellen des Gyrus dentatus konnte keine wesentliche Abhängigkeit von der Lokalisation (rechts/links) festgestellt werden. Ein Nachweis gelang insgesamt dreimal im rechten Hippocampus und zweimal im linken Hippocampus. Ebenso konnte TRPC6 unabhängig vom Geschlecht im menschlichen Hippocampus nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Arbeit darauf schließen, dass TRPC6 beim Menschen in Pyramidenzellen des Ammonshorns (CA1–CA4-Region) und des Subiculums, in Körnerzellen des Gyrus dentatus und in subzellulären Strukturen des Stratum moleculare und multiforme des Gyrus dentatus exprimiert wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRPC6 in allen Regionen des menschlichen Hippocampus exprimiert wird, die an der Langzeitpotenzierung bei der Gedächtnisbildung beteiligt sind (vgl. Abbildung 5) und lassen vermuten, dass der Kanal als Mediator der Calciumhomöostase eine zentrale Rolle für die Gedächtnisbildung im menschlichen Hippocampus spielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Gegensatz zu einer früheren Studie von Chung et al., 2006, in welcher ein auf das Stratum moleculare des Hippocampus begrenzter TRPC6-Proteinnachweis beschrieben wurde [26]. Neuere tierexperimentelle Studien konnten immunhistochemisch eine Expression des TRPC6-Kanalproteins im Maus- und Rattenmodell in Pyramidenzellen, in Körnerzellen des Gyrus dentatus, in Interneuronen und in einigen Gliazellen zeigen [75,101,186,194].

Die in dieser Dissertationsarbeit beobachtete subzelluläre Expression des TRPC6-Kanals in beiden Hippocampi von Gehirn A bestätigt die Ergebnisse einer Studie von Nagy, et al., 2013, die eine Expression des TRPC6-Proteins in den Dendriten und Axonen der Körnerzellen des Hippocampus der Ratte zeigte [101]. Passend zu der in dieser Arbeit beschriebenen subzellulären TRPC6-Expression konnte Zhou et al., 2008 eine immunhistochemische Expression des TRPC6-Kanalproteins an exzitatorischen Postsynapsen im Hippocampus der Ratte nachweisen [194]. Die Relevanz von TRPC6 für die Langzeitpotenzierung bei der Gedächtnisbildung wird durch die Erkenntnis gestützt, dass TRPC6-transgene Mäuse eine verstärkte Ausbildung dendritischer Spines und eine verbesserte Lern- und Gedächtnisleistung zeigen [194]. Einige Studien bestätigen die zentrale Rolle von TRPC6 für die Bildung exzitatorischer Synapsen über den CREB-Signalweg [150,194]. Passend hierzu führte die Ausschaltung des TRPC6-Gens im Gyrus dentatus männlicher Mäuse durch die Injektion eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) mit TRPC6-spezifischer short hairpin RNA (shRNA) zu einer Veränderung der synaptischen Signalweiterleitung, dem Verlust dendritischer Dornen, der Herunterregulation von CREB und einer eingeschränkten Lern- und Gedächtnisleistung [179]. Die Studien beleuchten u.a. die Relevanz von TRPC6 für die regelrechte Funktion des Gyrus dentatus bei der Gedächtnisbildung und geben Hinweise dafür, dass TRPC6 die synaptische Plastizität fördert [16,52].

In einer Studie von Zeng et al., 2015 konnte eine Hochregulation von TRPC6 und TRPC3 im menschlichen Hippocampus von Patienten mit therapieresistenter Epilepsie und im Pilocarpin-Mausmodell beobachtet werden [186]. Eine gesteigerte Expression des TRPC6-Kanalproteins zeigte sich in dieser Studie insbesondere in der CA3-Region [186]. In Einklang mit Studien über die neuroprotektive Funktion des TRPC6-Kanals zeigte Zeng et al., 2015, dass eine Hochregulation des TRPC6-Kanalproteins in kultivierten Hippocampusneuronen nach therapieresistentem Status epilepticus mit einer Steigerung des dendritischen Wachstums und der Spine-Bildung einhergeht [186]. Die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit unterstützen die Annahme, dass TRPC6 in der CA3-Region des menschlichen Hippocampus exprimiert wird und möglicherweise an der Neuropathologie der Epilepsie beteiligt ist.

Eine TRPC6-Expression konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch beidseits in der CA3-Region in Gehirn A, C und H gezeigt werden und ließ sich somit in sechs der insgesamt elf untersuchten Hippocampi nachweisen.

Zusammenfassend bestätigt der immunhistochemische Nachweis von TRPC6 im menschlichen Hippocampus dieser Arbeit die Relevanz des TRPC6-Kanalproteins für die Neurophysiologie des Menschen und legt nahe, dass TRPC6 als neuroprotektiver Umgebungssensor unmittelbar an der Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen wie Alzheimer, Epilepsie und zerebraler Ischämie beteiligt ist.

6.2.3 TRPC6 im menschlichen Cerebellum

Wenngleich das Forschungsfeld der TRPC-Kanäle zunehmend an Bedeutung gewonnen hat, ist der TRPC6-Kanal im menschlichen Kleinhirn bisher kaum untersucht. Eine Expression des TRPC6-Kanalproteins konnte immunhistochemisch bisher nur tierexperimentell gezeigt werden. Mit dieser Arbeit gelingt somit erstmals der immunhistochemische Nachweis von TRPC6 im menschlichen Kleinhirn.

Die Ergebnisse der Dissertationsarbeit lassen vermuten, dass TRPC6 in den inhibitorischen Purkinjezellen, Golgizellen und Sternzellen des menschlichen Kleinhirns exprimiert wird.

Ähnliche Ergebnisse lieferte eine tierexperimentelle Studie von Huang et al., 2007. Diese zeigte eine Expression des TRPC6-Kanalproteins im Kleinhirn der Ratte in Purkinje-Zellen, in ausgereiften Körnerzellen der inneren Körnerzellschicht und in Interneuronen der Molekularschicht [64]. Im Rahmen der Studie wurde jedoch ein signifikanter Rückgang der Expression in den ersten sechs Wochen postnatal beobachtet, weshalb die Autoren eine zentrale Rolle von TRPC6 für die Kleinhirnentwicklung vermuten. Außerdem konnte Li et al., 2005 einen positiven Zusammenhang zwischen TRPC6-Expression und BDNF-vermitteltem Nervenwachstum in kultivierten Körnerzellen des Kleinhirns zeigen [85]. Eine Studie von Griesi-Oliveira et al., 2015 unterstützt die Vermutungen über die Relevanz von TRPC6 für die neuronale Entwicklung und zeigt einen Zusammenhang von Mutationen im TRPC6-Gen und der Entstehung von Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) [50]. Passend hierzu konnte Palacios- Muñoz et al., 2022 zeigen, dass einige der ASD-typischen Verhaltensänderungen im *Drosophila melanogaster*-Modell durch den Einsatz der TRPC6-Agonisten Hyperforin und Insulin-like growth factor verhindert werden konnten [111].

Insgesamt bestätigt der immunhistochemische Nachweis dieser Arbeit die Relevanz des TRPC6-Kanalproteins für die Physiologie des menschlichen Kleinhirns und macht deutlich, dass der TRPC6-Kanal angesichts der noch bestehenden Wissenslücken und seines möglichen therapeutischen Potenzials für Erkrankungen des ZNS weiterhin ein interessantes Forschungsfeld darstellt.

6.2.4 TRPC6 in menschlichen Glioblastomen

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der beiden Glioblastome zeigen TRPC6-positive Zellen innerhalb der stark polymorphen Zellverbände des Tumors. Hierbei war die Anfärbung der TRPC6-positiven Strukturen in Präparat *GBM B* besonders stark ausgeprägt.

Der positive immunhistochemische Nachweis dieser Arbeit unterstützt die Studien von Alptekin et al., 2015 und Ding et al., 2010, in welchen eine Überexpression von TRPC6 in menschlichen Glioblastom-Tumorproben nachgewiesen wurde [2,36].

In der Studie von Alptekin et al., 2015 konnte ferner ein positiver Zusammenhang zwischen TRPC6-Expression und Tumorgrad festgestellt werden, mit dem Ergebnis der stärksten TRPC6-Expression in hochmalignen Glioblastomen. Weiterhin konnte Chigurupati et al., 2010 eine Beteiligung von TRPC6 an der Aggressivität, Invasivität und Behandlungsresistenz der Tumorentität nachweisen [24]. Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine TRPC6-vermittelte Aktivierung des NFAT-Signalwegs beschrieben, wobei die Hochregulation der TRPC6-Kanalexpression vermutlich hypoxieinduziert durch die Aktivierung von Notch1 erfolgt [24,44]. In Einklang mit den Erkenntnissen, dass TRPC6 als wichtiger Vermittler des aggressiven Tumorwachstums ein mögliches Ziel zur Behandlung von Glioblastomen darstellt, konnte in präklinischen Studien bereits ein therapeutischer Effekt durch die Hemmung der hypoxieinduzierten TRPC6-Expression gezeigt werden: Neben einer Verringerung des Gliomwachstums sowie einer Abnahme von Invasion und Angiogenese verstärkte die Hemmung des Kanals auch die antiproliferative Wirkung einer therapeutischen Bestrahlung [24,25,36,181]. Unklar bleibt weiterhin, ob der Notch-Signalweg, der die TRPC6-Expression reguliert, direkt durch Hypoxie oder indirekt über weitere Transkriptionsfaktoren aktiviert wird [51,143].

6.3 Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

Zusammenfassend bestätigt der positive immunhistochemische Nachweis des TRPC6-Kanals in Hippocampus, Cerebellum und Glioblastomen des Menschen die Aktualität und Relevanz von TRPC6 für die Neurophysiologie des Menschen.

Angesichts der zahlreichen Studien, die eine Beteiligung von TRPC6 an der Pathogenese neurologischer Erkrankungen wie zerebraler Ischämie, Demenz, Epilepsie, Autismus und Gliomen vermuten, unterstützt der immunhistochemische Nachweis dieser Arbeit die Relevanz von TRPC6 als mögliches therapeutisches Target. Passend zur vermuteten neuroprotektiven Rolle von TRPC6 für zerebrale Ischämie, konnte in einer Studie von Lin et al., 2013 gezeigt werden, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion von Hyperforin, einem TRPC6-Aktivator, das Infarktvolumen im Rattenmodell um etwa 55 % senkte [90]. Eine Studie von Li et al., 2019 zeigte eine signifikante Verringerung des neuronalen Schadens und des neurologischen Defizits durch die Transplantation von Stammzellen mit TRPC6-Überexpression und multidirektionalem Differenzierungspotenzial im Rattenmodell für zerebrale Ischämie und Reperfusion [84]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Anwendung von positiven TRPC6-Modulatoren zukünftig eine neue mögliche kausale Therapieoption zur Behandlung der zerebralen Ischämie darstellen könnte.

Auch für die bislang unzureichend und nur symptomatisch therapierbare Alzheimer-Demenz scheint die Aktivierung des TRPC6-Kanals bzw. die Modulation des speicheroperierten Calciumeintrags (store-operated calcium entry, SOCE) eine potenziell vielversprechende Therapieoption darzustellen. Die TRPC6-Aktivatoren Hyperforin und NSN21778 (NSN) konnten sowohl im Presenilin- als auch im Amyloid Precursor Protein-Knock-in-Mausmodell (APP-KI-Mausmodell) der

Alzheimer Demenz den Verlust dendritischer Dornen rückgängig machen und im APP-KI-Mausmodell die Langzeitpotenzierung verbessern [190].

Passend zu den bisherigen Erkenntnissen, dass TRPC6 eine zentrale Rolle für die regenerative Umstrukturierung nach Status epilepticus in der CA3-Region des Hippocampus spielt (vgl. Kapitel 3.1.6.5.8.), konnte Zeng et al., 2015 zeigen, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion eines Anti-TRPC6-Antikörpers im Pilocarpin-Mausmodell zu einer Verringerung des dendritischen Remodelings in der CA3-Region nach Status epilepticus führte [186]. In Einklang mit diesen Ergebnissen konnte Kim et al., 2017 nachweisen, dass TRPC6 die Anfälligkeit für Krampfanfälle reduziert und die durch den Status epilepticus induzierten neuronalen Schäden hemmen kann [76].

Eine zentrale Herausforderung im Hinblick auf das pharmakologische Potenzial von TRPC6-Kanalmodulatoren liegt in der Entwicklung selektiver und klinisch geeigneter Substanzen. Die oben genannten TRPC6-Aktivatoren Hyperforin und NSN weisen Eigenschaften auf, welche sie als potenzielle Pharmaka ungeeignet machen: Während NSN die Blut-Hirnschranke unzureichend überwindet, ist Hyperforin schwierig zu synthetisieren und führte bei Langzeitinkubation zur Apoptose von Hippocampusneuronen [117,190].

Kürzlich konnte ein selektiver TRPC6-Aktivator identifiziert werden, der die Blut-Hirnschranke überwindet und keine Kreuzreaktivität zu TRPC3 und TRPC7 aufweist. Es handelt sich hierbei um das N-N-substituierte Piperazinderivat Cmp2 (N-(2,6-difluorophenyl)-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)-propanamid) [187]. Zernov et al., 2024 zeigte, dass die intraperitoneale Injektion von Cmp2 im Alzheimer Mausmodell über eine selektive Aktivierung von TRPC6 zu einer Verbesserung der synaptischen Plastizität und zu einer Regeneration der Langzeitpotenzierung führte und einen neuen möglichen Therapieansatz zur Behandlung der Alzheimer-Demenz darstellen könnte [187]. Eine neuere Studie von Zernov et al., 2025 bestätigt die Vermutungen und

zeigte positive Effekte von Cmp2 auf die kognitive und motorische Leistungsfähigkeit im Alzheimer Mausmodell [188]. Darüber hinaus scheint TRPC6 auch für das Pharmaka-unabhängige Verfahren der Ultraschall-Neuromodulation essenziell zu sein, welches als nebenwirkungsarme, nichtinvasive Therapieoption bei Depressionen, Demenz, chronischen Schmerzen und traumatischen Hirnverletzungen diskutiert wird [96,129]. Weitere Studien sind erforderlich, um die Sicherheit und langfristige Wirksamkeit dieses Verfahrens zu evaluieren.

Zusammenfassend kann TRPC6 als interessantes molekulares Therapieziel zur Behandlung vieler Pathologien des ZNS angesehen werden. Insbesondere für neurodegenerative Erkrankungen wie zerebrale Ischämie und Morbus Alzheimer könnte die gezielte Modulation des TRPC6-Kanals eine neue kausale Therapieoption eröffnen. Künftige Studien müssen klären, inwieweit sich selektive TRPC6-Modulatoren wie Cmp2 als effektive und sichere Therapieoptionen beim Menschen etablieren lassen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturmerkmale der TRP-Kanal-Superfamilie.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer TRPC6-Kanaluntereinheit	11
Abbildung 3: Wichtige Regulationsmechanismen der TRPC6-Kanalaktivität	14
Abbildung 4: Frontalschnitt des Hippocampus mit Abbildung der Hippocampusformation	30
Abbildung 5: Schema des erregenden Neuronenkreises zur Ausbildung der Langzeitpotenzierung bei der Gedächtnisbildung	31
Abbildung 6: Zeichnung des menschlichen Schädels mit anatomischen Orientierungspunkten und Schnittführung.....	42
Abbildung 7: Schnittführung des Horizontalschnitts	46
Abbildung 8: Darstellung des anatomischen Verlaufs des Hippocampus am Boden des Unterhorns (Cornu temporale).....	47
Abbildung 9: Gewebeproben mit Beschriftung.....	48
Abbildung 10: Schema – Indirekte Methode der IHC.....	57
Abbildung 11: HE-Färbung des Präparats <i>a) H r 2.2.</i>	62
Abbildung 12: HE-Färbung des Präparats <i>a) C l 2</i>	63
Abbildung 13: HE-Färbung des Präparats <i>a) C l 2</i>	64
Abbildung 14: HE-Färbung des Präparats <i>GBM A</i>	65
Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>a) H r 2.2.</i>	67
Abbildung 16: Peptidkontrolle im Präparat <i>a) H r 2.2.</i>	68
Abbildung 17: Negativkontrolle im Präparat <i>a) H r 2.2.</i>	69

Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>GBM A</i>	70
Abbildung 19: Negativkontrolle im Präparat <i>GBM A</i>	71
Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>a) H r 2.2</i>	73
Abbildung 21: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 20	74
Abbildung 22: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 20	75
Abbildung 23: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 3) aus Abbildung 20	76
Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>a) H l 2.2.</i>	77
Abbildung 25: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 24	78
Abbildung 26: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 24	79
Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>c) H r 2.2.</i>	80
Abbildung 28: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 27	81
Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>c) H l 2.2.</i>	82
Abbildung 30: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 29	83
Abbildung 31: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 29	84
Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung für TRPC6 im Präparat <i>g) H r 2.3.</i>	85
Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung für TRPC6 im Präparat <i>g) H l 2.3.</i>	86
Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>h) H r 2.2.</i>	87
Abbildung 35: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 34	88
Abbildung 36: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 34	89
Abbildung 37: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>h) H l 2.2.</i>	90

Abbildung 38: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 37	91
Abbildung 39: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 37	92
Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>i) H r 2.3.</i>	93
Abbildung 41: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 40	94
Abbildung 42: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 40	95
Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>i) H l 2.2.</i>	96
Abbildung 44: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 43	97
Abbildung 45: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>j) H r 2.1.</i>	98
Abbildung 46: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 1) aus Abbildung 45	99
Abbildung 47: Vergrößerter Ausschnitt (Bildausschnitt 2) aus Abbildung 45	100
Abbildung 48: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>a) C l 2</i>	101
Abbildung 49: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>a) C l 2</i>	102
Abbildung 50: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>a) C l 2</i>	103
Abbildung 51: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>a) V l 2</i>	104
Abbildung 52: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>GBM A</i>	105
Abbildung 53: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 im Präparat <i>GBM B</i>	106

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper für die Immunhistochemie.....	33
Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie.....	33
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	33
Tabelle 4: Ausgangssubstanzen zur Herstellung der verwendeten Puffer.....	35
Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer	35
Tabelle 6: Verwendete Geräte	36
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	37
Tabelle 8: Formalin-Fixierung – neue Basler Lösung nach Kurz	39
Tabelle 9: NEP-Fixierung nach Weigner.....	39
Tabelle 10: Nomenklatur der entnommenen Proben mit Angabe über die Fixierung und Aufführung weiterer spenderspezifischer Daten	43
Tabelle 11: Gesamtübersicht der Proben	45
Tabelle 12: Zeitliche Abfolge der Schritte im Einbettautomaten.....	50
Tabelle 13: Gesamtübersicht der eigenständig gewonnenen Proben.....	52
Tabelle 14: Zeitliche Abfolge der Entparaffinierung und Rehydrierung	55

9 Literaturverzeichnis

1. Alessandri-Haber N, Dina OA, Chen X, Levine JD (2009) TRPC1 and TRPC6 Channels Cooperate with TRPV4 to Mediate Mechanical Hyperalgesia and Nociceptor Sensitization. *J Neurosci* 29:6217–6228
2. Alptekin M, Eroglu S, Tutar E, Sencan S, Geyik MA, Ulasli M, Demiryurek AT, Camci C (2015) Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumour Biol* 36:9209–9213
3. Antigny F, Norez C, Dannhoffer L, Bertrand J, Raveau D, Corbi P, Jayle C, Becq F, Vandebrouck C (2011) Transient receptor potential canonical channel 6 links Ca^{2+} mishandling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44:83–90
4. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, (eds) (2020) *Duale Reihe Anatomie*. 5th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
5. Azumaya CM, Sierra-Valdez F, Cordero-Morales JF, Nakagawa T (2018) Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 (TRPC6). *J Biol Chem* 293:10381–10391
6. Bai L, Chen Y, Zheng A (2022) Pharmacological targeting transient receptor potential canonical channel 6 modulates biological behaviors for cervical cancer HeLa and SiHA cell. *Cancer Cell Int* 22:145
7. Bancroft JD, Gamble M (eds) (2008) *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia
8. Bano D, Nicotera P (2007) Ca^{2+} signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 38:674–676

9. Bernaldo de Quirós S, Merlo A, Secades P, Zambrano I, de Santa María IS, Ugidos N, Jantus-Lewintre E, Sirera R, Suarez C, Chiara M-D (2013) Identification of TRPC6 as a possible candidate target gene within an amplicon at 11q21-q22.2 for migratory capacity in head and neck squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 13:116
10. Bernichtein S, Pigat N, Barry Delongchamps N, Boutillon F, Verkarre V, Camparo P, Reyes-Gomez E, Méjean A, Oudard SM, Lepicard EM, Viltard M, Souberbielle J-C, Friedlander G, Capiod T, Goffin V (2017) Vitamin D3 Prevents Calcium-Induced Progression of Early-Stage Prostate Tumors by Counteracting TRPC6 and Calcium Sensing Receptor Upregulation. *Cancer Res* 77:355–365
11. Bezprozvanny I, Hiesinger PR (2013) The synaptic maintenance problem: membrane recycling, Ca^{2+} homeostasis and late onset degeneration. *Mol Neurodegener* 8:23
12. Boulay G (2002) Ca^{2+} -calmodulin regulates receptor-operated Ca^{2+} entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells. *Cell Calcium* 32:201–207
13. Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381–386
14. Bousquet SM, Monet M, Boulay G (2010) Protein Kinase C-dependent Phosphorylation of Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) on Serine 448 Causes Channel Inhibition. *J Biol Chem* 285:40534–40543
15. Bröker-Lai J, Kollwe A, Schindeldecker B, Pohle J, Nguyen Chi V, Mathar I, Guzman R, Schwarz Y, Lai A, Weißgerber P, Schwegler H, Dietrich A, Both M, Sprengel R, Draguhn A, Köhr G, Fakler B, Flockerzi V, Bruns D, Freichel M (2017) Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *EMBO J* 36:2770–2789
16. Buzsáki G, Llinás R (2017) Space and time in the brain. *Science* 358:482–485

17. Cai R, Ding X, Zhou K, Shi Y, Ge R, Ren G, Jin Y, Wang Y (2009) Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 125:2281–2287
18. 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
19. Chen J, Li Z, Hatcher JT, Chen Q-H, Chen L, Wurster RD, Chan SL, Cheng Z (2017) Deletion of TRPC6 Attenuates NMDA Receptor-Mediated Ca^{2+} Entry and Ca^{2+} -Induced Neurotoxicity Following Cerebral Ischemia and Oxygen-Glucose Deprivation. *Front Neurosci* 11:138
20. Chen J-M, Li Q-W, Liu J-S, Jiang G-X, Liu J-R, Chen S-D, Cheng Q (2019) TRPC6 mRNA levels in peripheral leucocytes of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A case-control study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 92:279–284
21. Chen X, Egly C, Riley A, Li W, Tewson P, Hughes T, Quinn A, Obukhov A (2014) PKC-dependent Phosphorylation of the H1 Histamine Receptor Modulates TRPC6 Activity. *Cells* 3:247–257
22. Chen X, Sooch G, Demaree IS, White FA, Obukhov AG (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* 9:1983
23. Cheng W, Sun C, Zheng J (2010) Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell* 1:802–810
24. Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, Pattisapu JV, Kyriazis GA, Sugaya K, Bushnev S, Lathia JD, Rich JN, Chan SL (2010) Receptor Channel TRPC6 Is a Key Mediator of Notch-Driven Glioblastoma Growth and Invasiveness. *Cancer Res* 70:418–427

25. Chinigò G, Castel H, Chever O, Gkika D (2021) TRP Channels in Brain Tumors. *Front Cell Dev Biol* 9:617801
26. Chung YH, Sun Ahn H, Kim D, Hoon Shin D, Su Kim S, Yong Kim K, Bok Lee W, Ik Cha C (2006) Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Res* 1085:132–137
27. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The trp ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387–396
28. Corteling RL, Li S, Giddings J, Westwick J, Poll C, Hall IP (2004) Expression of transient receptor potential C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:145–154
29. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224:285–287
30. Denis V, Cyert MS (2002) Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* 156:29–34
31. D’Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, Spalluto C, Rocchi M, D’Urso M, Ciccodicola A (1998) Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21→q22. *Cytogenet Genome Res* 83:46–47
32. Dhennin-Duthille I, Gautier M, Faouzi M, Guilbert A, Brevet M, Vaudry D, Ahidouch A, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H (2011) High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cell Physiol Biochem* 28:813–822
33. Dietrich A, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T (2005) The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 451:72–80

34. Dietrich A, Gudermann T (2014) TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance. In: Nilius B, Flockerzi V (eds) Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_7
35. Dill KA, Shortle D (1991) Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem* 60:795–825
36. Ding X, He Z, Zhou K, Cheng J, Yao H, Lu D, Cai R, Jin Y, Dong B, Xu Y, Wang Y (2010) Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. *J Natl Cancer Inst* 102:1052–1068
37. Drenckhahn D, Waschke J (eds) (2007) Taschenbuch Anatomie. 1st ed. Urban & Fischer
38. Du W, Huang J, Yao H, Zhou K, Duan B, Wang Y (2010) Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. *J Clin Invest* 120:3480–3492
39. Earley S, Brayden JE (2015) Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature. *Physiol Rev* 95:645–690
40. El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T (2008) Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* 47:2068–2077
41. Englisch CN, Röhrich D, Walz M, Junker K, Beckmann A, Meier C, Paulsen F, Jung M, Tschernig T (2022) TRPC6 Is Found in Distinct Compartments of the Human Kidney. *IJTM* 2:156–163
42. Englisch CN, Paulsen F, Tschernig T (2022) TRPC Channels in the Physiology and Pathophysiology of the Renal Tubular System: What Do We Know? *Int J Mol Sci* 24:181
43. Finney-Hayward TK, Popa MO, Bahra P, Li S, Poll CT, Gosling M, Nicholson AG, Russell REK, Kon OM, Jarai G, Westwick J, Barnes PJ, Donnelly LE (2010)

Expression of transient receptor potential C6 channels in human lung macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:296–304

44. Flynn JR, Wang L, Gillespie DL, Stoddard GJ, Reid JK, Owens J, Ellsworth GB, Salzman KL, Kinney AY, Jensen RL (2008) Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics, and preoperative imaging as predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme. *Cancer* 113:1032–1042

45. Gaudet R (2008) A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst* 4:372–379

46. Ge P, Wei L, Zhang M, Hu B, Wang K, Li Y, Liu S, Wang J, Li Y (2018) TRPC1/3/6 inhibition attenuates the TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer via the Ras/Raf1/ERK signaling pathway. *Cell Biol Int* 42:975–984

47. Ginsberg MD (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology* 55:363–389

48. Gown AM (2016) Diagnostic Immunohistochemistry: What Can Go Wrong and How to Prevent It. *Arch Pathol Lab Med* 140:893–898

49. Graham S, Ding M, Ding Y, Sours-Brothers S, Luchowski R, Gryczynski Z, Yorio T, Ma H, Ma R (2010) Canonical Transient Receptor Potential 6 (TRPC6), a Redox-regulated Cation Channel. *J of Biol Chem* 285:23466–23476

50. Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, Nunez Y, Walker MF, Murdoch JD, Sanders SJ, Fernandez TV, Ji W, Lifton RP, Vadasz E, Dietrich A, Pradhan D, Song H, Ming G-L, Gu X, Haddad G, Marchetto MCN, Spitzer N, Passos-Bueno MR, State MW, Muotri AR (2015) Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol Psychiatry* 20:1350–1365

51. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M (2005) Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9:617–628
52. Hainmueller T, Bartos M (2020) Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat Rev Neurosci* 21:153–168
53. Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643–651
54. Harper MT, Londoño JEC, Quick K, Londoño JC, Flockerzi V, Philipp SE, Birnbaumer L, Freichel M, Poole AW (2013) Transient receptor potential channels function as a coincidence signal detector mediating phosphatidylserine exposure. *Sci Signal* 6:ra50
55. He X, Song S, Ayon RJ, Balisterieri A, Black SM, Makino A, Wier WG, Zang W-J, Yuan JX-J (2018) Hypoxia selectively upregulates cation channels and increases cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ in pulmonary, but not coronary, arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 314:C504–C517
56. Hernández GL, Volpert OV, Iñiguez MA, Lorenzo E, Martínez-Martínez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM (2001) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: Roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 193:607–620
57. Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A, Mikoshiba K (2004) Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 279:18887–18894
58. Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S, Weber J, Klee S, Jia J, Zwickenspflug W, Flockerzi V, Storch U, Yildirim AÖ, Gudermann T, Königshoff M, Dietrich A (2017) Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast

differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863:560–568

59. 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

60. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205–2232

61. Hong W, Peng G, Hao B, Liao B, Zhao Z, Zhou Y, Peng F, Ye X, Huang L, Zheng M, Pu J, Liang C, Yi E, Peng H, Li B, Ran P (2017) Nicotine-Induced Airway Smooth Muscle Cell Proliferation Involves TRPC6-Dependent Calcium Influx Via $\alpha 7$ nAChR. *Cell Physiol Biochem* 43:986–1002

62. Hou X, Xiao H, Zhang Y, Zeng X, Huang M, Chen X, Birnbaumer L, Liao Y (2018) Transient receptor potential channel 6 knockdown prevents apoptosis of renal tubular epithelial cells upon oxidative stress via autophagy activation. *Cell Death Dis* 9:1015

63. Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD (2004) The Rise and Fall of NMDA Antagonists for Ischemic Stroke. *Curr Mol Med* 4:131–136

64. Huang W-C, Young JS, Glitsch MD (2007) Changes in TRPC channel expression during postnatal development of cerebellar neurons. *Cell Calcium* 42:1–10

65. Hunt JL, Pollak MR, Denker BM (2005) Cultured podocytes establish a size-selective barrier regulated by specific signaling pathways and demonstrate synchronized barrier assembly in a calcium switch model of junction formation. *J Am Soc Nephrol* 16:1593–1602

66. Ilatovskaya DV, Palygin O, Chubinskiy-Nadezhdin V, Negulyaev YA, Ma R, Birnbaumer L, Staruschenko A (2014) Angiotensin II has acute effects on TRPC6 channels in podocytes of freshly isolated glomeruli. *Kidney Int* 86:506–514

67. Ilatovskaya DV, Blass G, Palygin O, Levchenko V, Pavlov TS, Grzybowski MN, Winsor K, Shuyskiy LS, Geurts AM, Cowley AW, Birnbaumer L, Staruschenko A (2018) A NOX4/TRPC6 Pathway in Podocyte Calcium Regulation and Renal Damage in Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 29:1917–1927
68. Itsuki K, Imai Y, Hase H, Okamura Y, Inoue R, Mori MX (2014) PLC-mediated PI(4,5)P₂ hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *J Gen Physiol* 143:183–201
69. 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
70. Jardin I, Diez-Bello R, Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Smani T, Rosado JA (2018) TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure. *Cancers (Basel)* 10:331
71. Jeon J, Bu F, Sun G, Tian J-B, Ting S-M, Li J, Aronowski J, Birnbaumer L, Freichel M, Zhu MX (2021) Contribution of TRPC Channels in Neuronal Excitotoxicity Associated With Neurodegenerative Disease and Ischemic Stroke. *Front Cell Dev Biol* 8:618663
72. Jia Y, Zhou J, Tai Y, Wang Y (2007) TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci* 10:559–567
73. Jiang H-N, Zeng B, Zhang Y, Daskoulidou N, Fan H, Qu J-M, Xu S-Z (2013) Involvement of TRPC Channels in Lung Cancer Cell Differentiation and the Correlation Analysis in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 8:e67637
74. Kabiraj A, Gupta J, Khaitan T, Bhattacharya PT (2015) Principle and techniques of immunohistochemistry – a review. *Int J Biol Med Res* 5204–5210

75. Kim D-S, Ryu HJ, Kim J-E, Kang T-C (2013) The Reverse Roles of Transient Receptor Potential Canonical Channel-3 and -6 in Neuronal Death Following Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *Cell Mol Neurobiol* 33:99–109
76. Kim J-E, Park J-Y, Kang T-C (2017) TRPC6-mediated ERK1/2 Activation Regulates Neuronal Excitability via Subcellular Kv4.3 Localization in the Rat Hippocampus. *Front Cell Neurosci* 11:413
77. Kim Y-J, Kang T-C (2015) The role of TRPC6 in seizure susceptibility and seizure-related neuronal damage in the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 307:215–230
78. Kistler AD, Singh G, Altintas MM, Yu H, Fernandez IC, Gu C, Wilson C, Srivastava SK, Dietrich A, Walz K, Kerjaschki D, Ruiz P, Dryer S, Sever S, Dinda AK, Faul C, Reiser J (2013) Transient receptor potential channel 6 (trpc6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease. *J Biol Chem* 288:36598–36609
79. Kwon Y, Hofmann T, Montell C (2007) Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin-Mediated Regulation of TRPC6. *Molecular Cell* 25:491–503
80. Lang G (2013) Histologische Färbung. In: *Histotechnik*. Springer, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1190-1_10
81. Lee YM, Kim BJ, Kim HJ, Yang DK, Zhu MH, Lee KP, So I, Kim KW (2003) TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G604–G616
82. Leidinger G, Flockerzi F, Hohneck J, Bohle RM, Fieguth A, Tschernig T (2022) TRPC6 is altered in COVID-19 pneumonia. *Chem Biol Interact* 362:109982
83. Li H, Huang J, Du W, Jia C, Yao H, Wang Y (2012) TRPC6 inhibited NMDA receptor activities and protected neurons from ischemic excitotoxicity. *J Neurochem* 123:1010–1018

84. Li W, Yang F, Gao J, Tang Y, Wang J, Pan Y (2019) Over-Expression of TRPC6 via CRISPR Based Synergistic Activation Mediator in BMSCs Ameliorates Brain Injury in a Rat Model of Cerebral Ischemia/Reperfusion. *Neuroscience* 415:147–160
85. Li Y, Jia Y-C, Cui K, Li N, Zheng Z-Y, Wang Y, Yuan X (2005) Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434:894–898
86. Libard S, Cerjan D, Alafuzoff I (2019) Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 151:91–96
87. Lin BL, Matera D, Doerner JF, Zheng N, del Camino D, Mishra S, Bian H, Zeveleva S, Zhen X, Blair NT, Chong JA, Hessler DP, Bedja D, Zhu G, Muller GK, Ranek MJ, Pantages L, McFarland M, Netherton MR, Berry A, Wong D, Rast G, Qian HS, Weldon SM, Kuo JJ, Sauer A, Sarko C, Moran MM, Kass DA, Pullen SS (2019) In vivo selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:10156–10161
88. Lin F, Chen Z (2014) Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry: Literature Review and Geisinger Experience. *Arch Pathol Lab Med* 138:1564–1577
89. Lin M-J, Leung GPH, Zhang W-M, Yang X-R, Yip K-P, Tse C-M, Sham JSK (2004) Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95:496–505
90. Lin Y, Zhang J-C, Fu J, Chen F, Wang J, Wu Z-L, Yuan S-Y (2013) Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion

(MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:253–262

91. Löf C, Viitanen T, Sukumaran P, Törnquist K (2011) TRPC2: Of Mice But Not Men. In: Islam M (ed) *Transient Receptor Potential Channels. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_6

92. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367:1747–1757

93. Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40:551–561

94. Lussier MP, Cayouette S, Lepage PK, Bernier CL, Francoeur N, St-Hilaire M, Pinard M, Boulay G (2005) MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *J Biol Chem* 280:19393–19400

95. Malczyk M, Erb A, Veith C, Ghofrani HA, Schermuly RT, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N, Sydykov A (2017) The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature. *Front Immunol* 8:707

96. Matsushita Y, Yoshida K, Yoshiya M, Shimizu T, Tsukamoto S, Kudo N, Takeuchi Y, Higuchi M, Shimojo M (2024) TRPC6 is a mechanosensitive channel essential for ultrasound neuromodulation in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121:e2404877121

97. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323

98. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002) A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. *Molecular Cell* 9:229–231
99. Montell C (2005) The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci STKE* 2005:re3
100. Moran MM, Xu H, Clapham DE (2004) TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 14:362–369
101. Nagy GA, Botond G, Borhegyi Z, Plummer NW, Freund TF, Hájos N (2013) DAG-sensitive and Ca^{2+} permeable TRPC6 channels are expressed in dentate granule cells and interneurons in the hippocampal formation. *Hippocampus* 23:221–232
102. Nikolova-Krstevski V, Wagner S, Yu ZY, Cox CD, Cvetkovska J, Hill AP, Huttner IG, Benson V, Werdich AA, MacRae C, Feneley MP, Friedrich O, Martinac B, Fatkin D (2017) Endocardial TRPC-6 Channels Act as Atrial Mechanosensors and Load-Dependent Modulators of Endocardial/Myocardial Cross-Talk. *JACC Basic Transl Sci* 2:575–590
103. Nilius B, Voets T (2005) TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 451:1–10
104. Nilius B, Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12:218
105. Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y (1999) Molecular and Functional Characterization of a Novel Mouse Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP7. *J Biol Chem* 274:27359–27370

106. Olichney JM, Hansen LA, Hofstetter CR, Grundman M, Katzman R, Thal LJ (1995) Cerebral Infarction in Alzheimer's Disease Is Associated With Severe Amyloid Angiopathy and Hypertension. *Arch Neurol* 52:702–708
107. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2015) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 17 Suppl 4:iv1–iv62
108. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2017) CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol* 19:v1–v88
109. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2019) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol* 21:v1–v100
110. Owsianik G, D'hoedt D, Voets T, Nilius B (2006) Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156:61–90
111. Palacios-Muñoz A, de Paula Moreira D, Silva V, García IE, Aboitiz F, Zarrei M, Campos G, Rennie O, Howe JL, Anagnostou E, Ambrozewicz P, Scherer SW, Passos-Bueno MR, Ewer J (2022) Mutations in *trpy*, the homologue of TRPC6 autism candidate gene, causes autism-like behavioral deficits in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 27:3328–3342
112. Palmer CP, Zhou X-L, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y (2001) A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca^{2+} -permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7801–7805

113. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38:233–252
114. Petersen CC, Berridge MJ, Borge MF, Bennett DL (1995) Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem J* 311:41–44
115. Popugaeva E, Pchitskaya E, Speshilova A, Alexandrov S, Zhang H, Vlasova O, Bezprozvanny I (2015) STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Mol Neurodegener* 10:37
116. Popugaeva E, Pchitskaya E, Bezprozvanny I (2017) Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer’s disease – A therapeutic opportunity? *Biochem Biophys Res Commun* 483:998–1004
117. Popugaeva E, Chernyuk D, Zhang H, Postnikova TY, Pats K, Fedorova E, Poroikov V, Zaitsev AV, Bezprozvanny I (2019) Derivatives of Piperazines as Potential Therapeutic Agents for Alzheimer’s Disease. *Mol Pharmacol* 95:337–348
118. Prikhodko V, Chernyuk D, Sysoev Y, Zernov N, Okovityi S, Popugaeva E (2020) Potential Drug Candidates to Treat TRPC6 Channel Deficiencies in the Pathophysiology of Alzheimer’s Disease and Brain Ischemia. *Cells* 9:2351
119. Putney JW (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1–12
120. Qin L, Zhao D, Liu X, Nagy JA, Hoang MV, Brown LF, Dvorak HF, Zeng H (2006) Down syndrome candidate region 1 isoform 1 mediates angiogenesis through the calcineurin-NFAT pathway. *Mol Cancer Res* 4:811–820
121. Ramos-Vara JA (2005) Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42:405–426
122. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu Rev Physiol* 68:619–647

123. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (eds) (2016) *Duale Reihe Biochemie*. 4th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
124. Ratnasingham M, Bradding P, Roach KM (2025) The role of TRP channels in lung fibrosis: Mechanisms and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol* 180:106728
125. Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 37:739–744
126. Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 109:95–104
127. Ringleb PA, Köhrmann M, die Leitlinien-Gruppe (2022) S2e-Leitlinie: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. *DGNeurologie* 5:17–39
128. Saqib U, Munjuluri S, Sarkar S, Biswas S, Mukherjee O, Satsangi H, Baig MS, Obukhov AG, Hajela K (2023) Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) Channel in the Pathogenesis of Diseases: A Jack of Many Trades. *Inflammation* 46:1144-1160
129. Sarica C, Nankoo J-F, Fomenko A, Grippe TC, Yamamoto K, Samuel N, Milano V, Vetkas A, Darmani G, Cizmeci MN, Lozano AM, Chen R (2022) Human Studies of Transcranial Ultrasound neuromodulation: A systematic review of effectiveness and safety. *Brain Stimul* 15:737–746
130. Schacht V, Kern JS (2015) Basics of Immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology* 135:1–4
131. Schaefer M, Urban N (2013) TRP-Kanäle: vielseitige zelluläre Sensoren und Effektoren: Nicht-Selektive Kationenkanäle. *Biospektrum* 19:143–145

132. Schiebler TH (ed) (2005) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 9th ed. Springer, Berlin/Heidelberg
133. Schmeiser B, Zentner J, Prinz M, Brandt A, Freiman TM (2017) Extent of mossy fiber sprouting in patients with mesiotemporal lobe epilepsy correlates with neuronal cell loss and granule cell dispersion. *Epilepsy Res* 129:51–58
134. Schneider LS, Dagerman KS, Higgins JPT, McShane R (2011) Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68:991–998
135. Semtner M, Schaefer M, Pinkenburg O, Plant TD (2007) Potentiation of TRPC5 by Protons. *J Biol Chem* 282:33868–33878
136. Seo K, Rainer PP, Shalkey Hahn V, Lee D-I, 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 U S A* 111:1551–1556
137. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW (2007) Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. *Toxicol Pathol* 35:984–999
138. Shekhar S, Liu Y, Wang S, Zhang H, Fang X, Zhang J, Fan L, Zheng B, Roman RJ, Wang Z, Fan F, Booz GW (2021) Novel Mechanistic Insights and Potential Therapeutic Impact of TRPC6 in Neurovascular Coupling and Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* 22:2074
139. Shen H, Pan J, Pan L, Zhang N (2013) TRPC6 inhibited NMDA current in cultured hippocampal neurons. *Neuromolecular Med* 15:389–395

140. Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Ito Y, Inoue R (2004) Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 561:415–432
141. Shi Y, Ding X, He Z-H, Zhou K-C, Wang Q, Wang Y-Z (2009) Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer. *Gut* 58:1443–1450
142. Song J, Wang Y, Li X, Shen Y, Yin M, Guo Y, Diao L, Liu Y, Yue D (2013) Critical role of TRPC6 channels in the development of human renal cell carcinoma. *Mol Biol Rep* 40:5115–5122
143. Song LL, Peng Y, Yun J, Rizzo P, Chaturvedi V, Weijzen S, Kast WM, Stone PJB, Santos L, Loredó A, Lendahl U, Sonenshein G, Osborne B, Qin J-Z, Pannuti A, Nickoloff BJ, Miele L (2008) Notch-1 associates with IKK α and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene* 27:5833–5844
144. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL (2006) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16586–16591
145. Spencer DD, Spencer SS, Mattson RH, Williamson PD, Novelly RA (1984) Access to the posterior medial temporal lobe structures in the surgical treatment of temporal lobe epilepsy. *Neurosurgery* 15:667–671
146. Spires D, Ilatovskaya DV, Levchenko V, North PE, Geurts AM, Palygin O, Staruschenko A (2018) Protective role of Trpc6 knockout in the progression of diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 315:F1091-F1097
147. Sun S, Zhang H, Liu J, Popugaeva E, Xu N-J, Feske S, White CL, Bezprozvanny I (2014) Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron* 82:79–93

148. Sun Y, Sukumaran P, Bandyopadhyay BC, Singh BB (2014) Physiological Function and Characterization of TRPCs in Neurons. *Cells* 3:455–475
149. Sutherland BW, Toews J, Kast J (2008) Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom* 43:699–715
150. Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, Wang Y (2008) TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci* 121:2301–2307
151. Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu J-X, Liu M, Zhou X, Zhang X, Chen L (2018) Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Res* 28:746–755
152. Tauseef M, Knezevic N, Chava KR, Smith M, Sukriti S, Gianaris N, Obukhov AG, Vogel SM, Schraufnagel DE, Dietrich A, Birnbaumer L, Malik AB, Mehta D (2012) TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J Exp Med* 209:1953–1968
153. Taylor CR, Shi S-R, Barr NJ, Wu N (2006) *Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization*. Elsevier Saunders, Philadelphia
154. Thapak P, Vaidya B, Joshi HC, Singh JN, Sharma SS (2020) Therapeutic potential of pharmacological agents targeting TRP channels in CNS disorders. *Pharmacol Res* 159:105026
155. Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Slomianny C, Beck B, Mariot P, Bonnal J-L, Mauroy B, Shuba Y, Capiod T, Skryma R, Prevarskaya N (2006) Differential role of TRP channels in Ca^{2+} entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* 66:2038-2047

156. Thomas SJ, Grossberg GT (2009) Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging* 4:367–377
157. Trebak M, Vazquez G, Bird GSJ, Putney JW (2003) The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 33:451–461
158. Trepel M (2017) *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. 7th ed. Elsevier
159. Ulfig N (ed) (2019) *Kurzlehrbuch Histologie*. 5th ed. Georg Thieme Verlag
160. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP Channels. *Annu Rev Biochem* 76:387–417
161. Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B (2007) TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* 3:174–182
162. Wan Q, Zheng A, Liu X, Chen Y, Han L (2012) Expression of transient receptor potential channel 6 in cervical cancer. *Onco Targets Ther* 5:171–176
163. 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
164. Wang J, Laurier LG, Sims SM, Preiksaitis HG (2003) Enhanced capacitative calcium entry and TRPC channel gene expression in human LES smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G1074-1083
165. Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA (2006) Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca^{2+} in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 98:1528–1537
166. Wang J, Lu R, Yang J, Li H, He Z, Jing N, Wang X, Wang Y (2015) TRPC6 specifically interacts with APP to inhibit its cleavage by γ -secretase and reduce A β production. *Nat Commun* 6:8876

167. Wang J, Zhao M, Jia P, Liu F-F, Chen K, Meng F-Y, Hong J-H, Zhang T, Jin X-H, Shi J (2020) The analgesic action of larixyl acetate, a potent TRPC6 inhibitor, in rat neuropathic pain model induced by spared nerve injury. *J Neuroinflammation* 17:118
168. Wang Y, He J, Jiang H, Zhang Q, Yang H, Xu X, Zhang C, Xu C, Wang J, Lu W (2018) Nicotine enhances store-operated calcium entry by upregulating HIF-1 α and SOCC components in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 40:2097–2104
169. Wang Y-X, Zheng Y-M (2011) Molecular Expression and Functional Role of Canonical Transient Receptor Potential Channels in Airway Smooth Muscle Cells. *Adv Exp Med Biol* 704:731–747
170. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Ono K, Ito H (2009) The Pathological Role of Transient Receptor Potential Channels in Heart Disease. *Circ J* 73:419–427
171. Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Mederos y Schnitzler M, Brandes RP, Grimminger F, Meissner M, Freichel M, Offermanns S, Veit F, Pak O, Krause K-H, Schermuly RT, Brewer AC, Schmidt HHHW, Seeger W, Shah AM, Gudermann T, Ghofrani HA, Dietrich A (2012) Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nat Commun* 3:649
172. Wen L, Liang C, Chen E, Chen W, Liang F, Zhi X, Wei T, Xue F, Li G, Yang Q, Gong W, Feng X, Bai X, Liang T (2016) Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent. *Sci Rep* 6:23269
173. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000) Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24:1016–1019
174. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB (2005) A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Science* 308:1801–1804

175. Wong F, Schaefer EL, Roop BC, LaMendola JN, Johnson-Seaton D, Shao D (1989) Proper function of the drosophila trp gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron* 3:81–94
176. Wu Y-L, Xie J, An S-W, Oliver N, Barrezueta NX, Lin M-H, Birnbaumer L, Huang C-L (2017) Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. *Kidney Int* 91:830–841
177. Xia Y, Yang X-R, Fu Z, Paudel O, Abramowitz J, Birnbaumer L, Sham JSK (2014) Classical Transient Receptor Potential 1 and 6 Contribute to Hypoxic Pulmonary Hypertension Through Differential Regulation of Pulmonary Vascular Functions. *Hypertension* 63:173–180
178. Xie J, Cha S-K, An S-W, Kuro-O M, Birnbaumer L, Huang C-L (2012) Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat Commun* 3:1238
179. Xie R, Wang Z, Liu T, Xiao R, Lv K, Wu C, Luo Y, Cai Y, Fan X (2021) AAV Delivery of shRNA Against TRPC6 in Mouse Hippocampus Impairs Cognitive Function. *Front Cell Dev Biol* 9:688655
180. Yang L-L, Liu B-C, Lu X-Y, Yan Y, Zhai Y-J, Bao Q, Doetsch PW, Deng X, Thai TL, Alli AA, Eaton DC, Shen B-Z, Ma H-P (2016) Inhibition of TRPC6 reduces non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Oncotarget* 8:5123–5134
181. Yin H, Cheng H, Li P, Yang Z (2022) TRPC6 interacted with K_{Ca}1.1 channels to regulate the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Arch Biochem Biophys* 725:109268
182. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX-J (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13861–13866

183. Yu Y, Keller SH, Remillard CV, Safrina O, Nicholson A, Zhang SL, Jiang W, Vangala N, Landsberg JW, Wang J-Y, Thistlethwaite PA, Channick RN, Robbins IM, Loyd JE, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT, Cahalan MD, Rubin LJ, Yuan JX-J (2009) A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2313–2322
184. Yue D, Wang Y, Xiao J-Y, Wang P, Ren C-S (2009) Expression of TRPC6 in benign and malignant human prostate tissues. *Asian J Androl* 11:541–547
185. Zeng B, Yuan C, Yang X, Atkin SL, Xu S-Z (2013) TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 13:103–116
186. Zeng C, Zhou P, Jiang T, Yuan C, Ma Y, Feng L, Liu R, Tang W, Long X, Xiao B, Tian F (2015) Upregulation and Diverse Roles of TRPC3 and TRPC6 in Synaptic Reorganization of the Mossy Fiber Pathway in Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Neurobiol* 52:562–572
187. Zernov N, Ghamaryan V, Melenteva D, Makichyan A, Hunanyan L, Popugaeva E (2024) Discovery of a novel piperazine derivative, cmp2: a selective TRPC6 activator suitable for treatment of synaptic deficiency in Alzheimer’s disease hippocampal neurons. *Sci Rep* 14:23512
188. Zernov N, Melenteva D, Ghamaryan V, Makichyan A, Hunanyan L, Popugaeva E (2025) N-N-Substituted Piperazine, Cmp2, Improves Cognitive and Motor Functions in 5xFAD Mice. *Int J Mol Sci* 26:4591
189. Zhang E, Liao P (2015) Brain transient receptor potential channels and stroke. *J Neurosci Res* 93:1165–1183
190. Zhang H, Sun S, Wu L, Pchitskaya E, Zakharova O, Fon Tacer K, Bezprozvanny I (2016) Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic

Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment. *J Neurosci* 36:11837–11850

191. Zhang J, Mao X, Zhou T, Cheng X, Lin Y (2014) IL-17A contributes to brain ischemia reperfusion injury through calpain-TRPC6 pathway in mice. *Neuroscience* 274:419–428

192. Zhang S-S, Wen J, Yang F, Cai X-L, Yang H, Luo K-J, Liu QW, Hu R-G, Xie X, Huang Q-Y, Chen JY, Fu JH, Hu Y (2013) High expression of transient potential receptor C6 correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 30:607

193. Zhao T, Parmisano S, Soroureddin Z, Zhao M, Yung L, Thistlethwaite PA, Makino A, Yuan JX-J (2022) Mechanosensitive cation currents through TRPC6 and Piezo1 channels in human pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 323:C959–C973

194. Zhou J, Du W, Zhou K, Tai Y, Yao H, Jia Y, Ding Y, Wang Y (2008) Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 11:741–743

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, Leiter der Prosektur des Anatomischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes für die Überlassung des Themas und die sehr konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Er hat es geschafft mich immer wieder aufs Neue zu motivieren und stand mir jederzeit mit seinem geschätzten Rat zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt den Menschen, die ihren Körper der Wissenschaft gespendet haben und diese Arbeit ermöglicht haben. Danken möchte ich auch den Angehörigen, die die Entscheidung zur Körperspende unterstützt haben, auch wenn Ihnen dies womöglich schwergefallen ist.

Der Sektionsassistentin Frau Irina Scheck möchte ich ausdrücklich danken für ihre hilfreichen Tipps und die Einführung in verschiedene Laborarbeiten.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Boehm für die Möglichkeit der Nutzung des Slide-Scanner-Mikroskops bedanken. Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Philipp Wartenberg für die Einführung in die Nutzung des Gerätes und die Beantwortung meiner Fragen.

Herrn Prof. Dr. med. Joachim Oertel und Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat danke ich herzlich für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Gewebeproben aus menschlichen Glioblastomen.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Herrn Sebastian Wiederhold für seine qualifizierte Hilfe bei technischen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Sie haben mich während meines gesamten Studiums unterstützt und mich gelehrt, immer an mich zu glauben.

Im Besonderen möchte ich mich bei meinen Eltern, Werner und Heike Folz bedanken, für die Ermöglichung meines Studiums und die allzeitige Unterstützung.

Außerdem danke ich meiner Zwillingsschwester Annika Folz für ihr immer offenes Ohr und meinem Bruder Fabian Folz. Sie waren immer für mich da.

Mein Dank gilt auch meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen Irini Kakaletti und Dr. med. Jan Philipp Kühn, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit stets motiviert haben und für mich da waren.

Letztlich möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

11 Lebenslauf

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