

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

Immunhistochemische Expression des Kationenkanals TRPC6 in der Unterkiefer- und Tränendrüse und in Speicheldrüsentumoren

*Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2024

vorgelegt von
Céline Aurelia Carl
geboren am 23.01.1998 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 25.06.2024

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Kolja Freier

Gewidmet
meiner Mutter
Véronique

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	VII
II. Zusammenfassung	- 1 -
1. Deutsche Zusammenfassung	- 1 -
2. Abstract	- 4 -
3. Einleitung	- 7 -
3.1. TRP-Ionenkanäle	- 7 -
3.1.1 Die Geschichte der TRP-Kanäle	- 9 -
3.1.2 Zur physiologischen Bedeutung der TRP-Kanäle.....	- 10 -
3.1.3 Die TRPC-Unterfamilie: Geschichte, Vorkommen und Bedeutung	- 11 -
3.2. Der TRPC6-Subtyp: Aufbau und Funktion.....	- 13 -
3.3. TRPC6: gewebsspezifisches Vorkommen und Bedeutung	- 21 -
3.4. Funktion des TRPC-Kanals in exokrinen Drüsen	- 23 -
3.5. Das untersuchte Gewebe: Glandula submandibularis und Glandula lacrimalis	- 25 -
3.5.1 Was ist eine Drüse?	- 25 -
3.5.2 Die Kopfspeicheldrüsen am Beispiel der Glandula submandibularis: Struktur, Bedeutung und Physiologie	- 27 -
3.5.2.1 Makro- und mikroskopische Anatomie der Speicheldrüsen	- 27 -
3.5.2.2 Die Anatomie der Glandula submandibularis	- 28 -
3.5.2.3 Funktion und Bedeutung der Speicheldrüsen.....	- 28 -
3.5.2.4 Physiologie der Speichelproduktion.....	- 29 -
3.5.3 Eine weitere exokrine Drüse des Kopfes: die Glandula lacrimalis	- 30 -
3.6. Tumoren in der Glandula submandibularis	- 31 -
3.6.1 ACC	- 32 -
3.6.2 MEC	- 33 -
3.7. Ziel der Arbeit	- 34 -
III. Materialien und Methoden	- 35 -
4. Material	- 35 -
4.1. Chemikalien und Lösungen	- 35 -
4.2. Antikörper	- 36 -
4.3. Geräte / Laboraustattung	- 37 -
4.4. Verbrauchsmaterialien	- 38 -
5. Probenmaterial	- 39 -
5.1. Ethikantrag	- 39 -
5.2. Prozess der Probenbearbeitung	- 39 -
5.3. Körperspende	- 39 -
5.4. Biopsie von Tumoren	- 40 -

5.5. Übersicht über die in Anspruch genommenen Spender	- 41 -
5.6. Übersicht über die in Anspruch genommenen Biopsien.....	- 41 -
5.7. NEP-Fixierung	- 41 -
5.8. Formalinfixierung.....	- 43 -
5.9. Probenauswahl	- 43 -
6. Methode	- 45 -
6.1. Bearbeitung der Proben	- 45 -
6.1.1. Gewinnung der Proben	- 45 -
6.1.2. Paraffinwachseinbettung nach Formalinfixierung	- 46 -
6.1.3. Paraffinschnitte mit dem Mikrotom.....	- 48 -
6.2. Färbung	- 49 -
6.2.1. HE-Färbung.....	- 49 -
6.2.1.1. Vorstellung	- 49 -
6.2.1.2. Übersicht	- 50 -
6.2.1.3. Protokoll	- 50 -
6.2.2. IHC-Färbung.....	- 54 -
6.2.2.1. Vorstellung	- 54 -
6.2.2.2. Übersicht	- 56 -
6.2.2.3. Protokoll	- 59 -
6.2.2.3.1. Tag 1	- 60 -
6.2.2.3.2. Tag 2	- 62 -
6.2.2.4. Abbildungen	- 64 -
7. Histologische Auswertung der Daten	- 68 -
7.1 Auswertungsparameter	- 68 -
7.2 Statistische Auswertung.....	- 68 -
IV. Ergebnisse.....	- 69 -
8. Übersicht.....	- 69 -
9. Allgemeine Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse	- 71 -
10. Ergebnisse nach den Strukturen der Drüsen.....	- 72 -
10.1 Ergebnisse der Glandula submandibularis	- 72 -
10.2 Ergebnisse der Glandula lacrimalis	- 76 -
10.3 Gesamtergebnis.....	- 80 -
11. Ergebnisse nach dem Geschlecht.....	- 83 -
11.1 Ergebnisse der Glandula submandibularis	- 83 -
11.2 Ergebnisse der Glandula lacrimalis	- 84 -
11.3 Gesamtergebnis.....	- 86 -
12. Ergebnisse nach Karzinom der Gl. submandibularis	- 88 -
12.1 Ergebnisse des adenoidzystischen Karzinoms	- 88 -

12.2 Ergebnisse des Mukoepidermoidkarzinoms	- 93 -
12.3 Gesamtergebnisse	- 96 -
13. Ergebnisse nach Gewebequalität: gesund vs. tumorös	- 99 -
13.1 Vergleich der einzelnen gesunden Drüsen mit den einzelnen Tumoren	- 99 -
13.2 Globaler Vergleich zwischen gesundem und tumorösem Gewebe	- 101 -
V. Diskussion	- 104 -
14. Patientengut und Methode	- 104 -
14.1.1 Spendergruppen	- 104 -
14.1.2 Aufbereitung der Proben	- 105 -
14.1.3 TRPC6-Antikörper	- 105 -
14.1.4 Immunohistochemie	- 106 -
15. Einordnung der Ergebnisse in der Literatur	- 106 -
16. Diskussion der eigenen Ergebnisse	- 108 -
17. Schlussfolgerung und Ausblick	- 110 -
VI. Anhang	- 112 -
1. Abbildungsverzeichnis	- 112 -
2. Tabellenverzeichnis.....	- 113 -
3. Diagrammverzeichnis.....	- 113 -
VII. Literaturverzeichnis.....	- 115 -
VIII. Publikationen und Danksagung.....	- 131 -
1. Publikationen	- 131 -
2. Danksagung	- 131 -
IX. Lebenslauf	- 132 -

I. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A.	Arterie
ACC	adenoidzystisches Karzinom
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AQPs	Aquaporine
AR	Ankyrin repeats
CaM	Calmodulin
CDI	Calcium-dependent Inactivation
CH1	C-terminale Helix 1
CH2	C-terminale Helix 2
CIRB	Calmodulin and IP3-Receptor Binding
CRAC	Calcium-release-activated Calcium channels
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
EGF	epidermal growth factor
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
EZR	Extrazellularraum
FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glioblastom
GCPR	G-protein coupled receptor
GDP	Guanosindiphosphat
Gl.	Glandula
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	hepatocellular carcinoma
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	horseradish peroxidase
HSG	human submandibular gland cell line
hTRPC6	humanes TRPC6
ICD	intrazelluläre zytoplasmatische Domäne
IHC	Immunohistochemie
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor

IP ₆	Inositolhexaphosphat
IZR	Intrazellularraum
J	Jahre
JNR	Journalnummer
Kryo-EM	kryogene Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie
KS	Kaninchenserum
LH	Linker helices
m	männlich
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells
MEC	Mukoepidermoidkarzinom
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol
NGS	Normal Goat Serum
NOMPC	no mechanoreceptor potential C
NSCLC	non-small cell lung cancer
Orai1	Calcium-release-activated Calcium-modulator 1
SCC	squamous cell carcinoma
P1-2	Porenschleife 1-2
PBS	Phosphat buffered saline
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLC β	Phospholipase C Subtyp β
PLC γ	Phospholipase C Subtyp γ
PM	Plasmamembran
ROCE	rezeptor-operierter Calciumeinstrom
S1-6	transmembranöse α -Helices
SOCE	speicher-operierter Calciumeinstrom
STIM1	stromal interaction molecule 1
TMD	Transmembranösedomäne
TRP	transient receptor potential
TRPA	transient receptor potential ankyrin subtype
TRPC	transient receptor potential classical/canonical subtype
TRPC6	transient receptor potential classical/canonical subtype 6
TRPM	transient receptor potential melastatin subtype

TRPML	transient receptor potential mucolipin subtype
TRPN	transient receptor potential NOMPC subtype
TRPP	transient receptor potential polycystin subtype
TRPV	transient receptor potential vanilloid subtype
w	weiblich
ZNS	Zentralnervensystem

II. Zusammenfassung

1. Deutsche Zusammenfassung

Hintergrund: Dass Ca^{2+} -Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Proliferation von Krebszellen spielen, haben Studien der letzten drei Jahrzehnte gezeigt. Kanonische Transient Receptor Potential (TRPC)-Kanäle, die für Ca^{2+} permeabel sind, werden als zellmembranständige, nicht-selektive Kationenkanäle in vielen Gewebetypen exprimiert und sind an der Proliferation von Krebszellen beteiligt. Die Bedeutung des TRPC6-Subtyps in der Tumorentstehung wurde bisher unter anderem beim Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Ösophaguskarzinom, Nierenzellkarzinom, Leberzellkarzinom, Glioblastom, kleinzelligen Lungenkarzinom und Gebärmutterhalskarzinom nachgewiesen.

Das Vorkommen von TRPC6 in der Glandula submandibularis sowie die Bedeutung einiger TRPC-Kanäle (TRPC1 und TRPC3) in dieser Drüse wurden bisher am Tiermodell nachgewiesen. Bis jetzt gibt es nur wenige Daten über den Nachweis von TRPC6 in menschlichem Gewebe, insbesondere in menschlichem Tränen- und Unterkieferdrüsengewebe. Auch das Vorkommen von TRPC6 in Speicheldrüsentumoren ist kaum untersucht. Die Erforschung von TRPC6 erfolgt nämlich hauptsächlich an Tiermodellen. Die Untersuchung dieses Kanals am Menschen könnte zu neuen Therapien, mit TRPC6 als Zielmolekül, führen.

Eine Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente ist ein besseres Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung sowie der Lokalisierung von TRPC6 in menschlichem Drüsengewebe, insbesondere der Tränen- und Unterkieferdrüse sowie in Tumoren der Unterkieferdrüse. Während der TRPC6-Kanal im Tierversuch und auch beim Menschen auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, sind bisher keine systematischen Untersuchungen zum Nachweis des TRPC6-Proteins in der menschlichen Tränen- und Unterkieferdrüse sowie in Tumoren der Unterkieferdrüse bekannt. Das Hauptziel dieser Forschungsarbeit war der immunhistochemische Nachweis der Expression des TRPC6-Kanals in humanen Proben von physiologischen Tränen- und Unterkieferdrüsen sowie in Tumorproben von adenoid-zystischen Karzinomen und Mukoepidermoidkarzinomen. Eine systematische Analyse unter Berücksichtigung von Struktur, Geschlecht, Karzinomtyp und Gewebequalität wurde angestrebt.

Methode: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sieben (n=7) fixierte Körperspender untersucht, die von der Prosektur des Anatomischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt wurden. Die Entnahme der zehn (n=10) Gewebeproben erfolgte eigenständig unter Verwendung von Pinzetten und Skalpell aus der Glandula submandibularis und der Glandula lacrimalis. Die gewonnenen Proben wurden anschließend in mehreren Arbeitsschritten zu histologischen Schnittpräparaten verarbeitet und zunächst mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Zusätzlich wurden in dieser Studie sechs (n=6) Tumorpatienten einbezogen. Die sechs (n=6) Tumorproben wurden bereits als Tumorschnitte auf dem Objektträger von dem Pathologischen Institut und von der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikum des Saarlandes, zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung des Nachweises von TRPC6 in dem untersuchten Gewebe erfolgte mittels Immunhistochemie. Die immunhistochemische Färbung der ausgewählten Gewebeproben wurde durch indirekte Detektion mit einem primären TRPC6-Antikörper, einem sekundären HRP-konjugierten Antikörper und dem Chromogen Diaminobenzidin durchgeführt.

Ergebnisse: Der Nachweis von TRPC6 in allen (n=10) physiologischen Proben der Glandulae submandibulares und Glandulae lacrimales mittels immunohistochemische Analyse konnte somit bewiesen werden: Sie zeigten alle ein positives immunhistochemisches Signal, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität. Es konnten keine wesentlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede in Bezug auf die IHC festgestellt werden. Dazu konnte der Nachweis von TRPC6 in vier (n=4) von sechs Proben von malignen Veränderungen der Glandula submandibularis, wie dem ACC und dem MEC, mittels Immunhistochemie bestätigt werden.

Die Ausführungsgänge wiesen in jedem Gewebe, in dem sie gefunden wurden, TRPC6 auf. Das Tumorgewebe, insbesondere das Zytoplasma und die Zellkerne der Tumorzellen, wiesen ebenfalls TRPC6 auf, sowohl in ACC als auch in MEC. Die mukösen Tubuli und ihre Zellkerne zeigten im Allgemeinen kein Signal, ebenso die Zellkerne der Fettzellen. Die restlichen Strukturen (seröse Azini und ihre Zellkerne) zeigten ein schwaches Signal für TRPC6.

Schlussfolgerung: Mit dieser Arbeit konnte der Nachweis von TRPC6 in menschlichem exokrinen Drüsengewebe der Unterkiefer- und Tränendrüse sowie im Tumorgewebe der Unterkieferdrüse, des adenoid-zystischen Karzinoms und des Mukoepidermoidkarzinoms gezeigt werden. Die Erkenntnis über das Vorhandensein der Kanäle im Drüsengewebe gibt nun die Gelegenheit, die bislang ungeklärte Rolle dieser Kationenkanäle z.B in der Speicheldrüsenfunktion, d.h. in der Bildung des Speichels, weiter aufzuklären. Zusätzlich sollten weitere Speicheldrüsen auf TRPC6-Expression untersucht werden. Es ist nicht auszuschließen, dass es aufgrund seiner grundlegenden Funktion an der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase beteiligt sein könnte. Auch die funktionelle Bedeutung des nicht-selektiven Kanals in der Glandula lacrimalis und ihre Erkrankungen müssen noch geklärt werden. Darüber hinaus liefert die Entdeckung der Kanäle in diesen Tumoren somit die Grundlage, um die bis heute unbekannte Bedeutung dieser Kationenkanäle für die Tumorentstehung in ACC und MEC näher zu erforschen. So könnte TRPC6 als Angriffspunkt für Medikamente in der Therapie von diesen Tumoren dienen, die bereits in anderen Geweben zum therapeutischen Einsatz kommen. Welche Zusammenhänge zwischen TRPC6 und den Erkrankungen der Glandula submandibularis und Glandula lacrimalis tatsächlich bestehen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Weitere wissenschaftliche Arbeiten sind zu diesem Zweck notwendig.

2. Abstract

Background: Calcium channels play a crucial role in the proliferation of cancer cells, as studies over the last three decades have shown. Canonical transient receptor potential (TRPC) channels, which are permeable to Ca^{2+} , are expressed as cell membrane-bound, non-selective cation channels in many tissue types and are involved in the proliferation of cancer cells. The importance of the TRPC6 subtype in carcinogenesis has so far been demonstrated in prostate carcinoma, breast carcinoma, oesophageal carcinoma, renal cell carcinoma, hepatocellular carcinoma, glioblastoma, small cell lung carcinoma and cervical carcinoma, among others.

The presence of TRPC6 in the submandibular gland and the importance of some TRPC channels (TRPC1 and TRPC3) in this gland have so far been demonstrated in animal models. To date, there is limited evidence of TRPC6 in human tissues, especially in human lacrimal and submandibular gland tissue. The presence of TRPC6 in salivary gland tumors has also been hardly investigated. Research of TRPC6 is mainly carried out on animal models. The investigation of this channel in humans could lead to new therapeutic approaches using TRPC6 as a target molecule.

A prerequisite for the development of new drugs is a better understanding of the physiological and pathophysiological significance and localization of TRPC6 in human glandular tissue, particularly in the lacrimal and mandibular glands and in tumors of the mandibular gland. While the TRPC6 channel has been detected at the mRNA level in both animal experiments and in humans, no systematic studies on the detection of the TRPC6 protein in the human lacrimal and submandibular gland and in tumors of the submandibular gland are known to date. The main objective of this research was the immunohistochemical detection of TRPC6 channel expression in human samples of physiological lacrimal and submandibular glands and in tumor samples of adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma of the submandibular gland. A systematic analysis considering structure, gender, carcinoma type and tissue quality was aimed at.

Method: In the present study, seven (n=7) fixed body donors were examined, which were provided by the Prosecture of the Anatomical Institute of the Medical Faculty of Saarland University. The ten (n=10) tissue samples were taken autonomously from the submandibular and lacrimal gland using forceps and a scalpel. The collected samples were then processed in several steps into histological slides and first stained with Hematoxylin-Eosin. In addition, six (n=6) tumor patients were included in this study. The six (n=6) tumor samples were already provided as tumor slides by the Institute of Pathology and the Department of Otorhinolaryngology of the Saarland University Hospital. The detection of TRPC6 in the examined tissue was determined by immunohistochemistry. The immunohistochemical staining of the selected tissue samples was performed by indirect detection with a primary TRPC6 antibody, a secondary HRP-conjugated antibody and the chromogen diaminobenzidine.

Results: The detection of TRPC6 in all (n=10) physiological samples of the glandulae submandibulares and glandulae lacrimales by immunohistochemical analysis was therefore proven: all samples showed a positive immunohistochemical signal, although with different intensity. No significant gender-specific differences could be detected regarding IHC. In addition, the detection of TRPC6 in four (n=4) of six samples of malignant changes of the submandibular gland, such as the ACC and the MEC, could be confirmed by immunohistochemistry.

The excretory ducts showed TRPC6 in every tissue in which they were found. The tumor tissue, especially the cytoplasm and nuclei of the tumor cells, also showed TRPC6 in both ACC and MEC. The mucous tubules and their nuclei generally showed no signal, as did the nuclei of the fat cells. The remaining structures (serous acini and their nuclei) showed a weak signal for TRPC6.

Conclusion: This study provides evidence for the presence of TRPC6 in human exocrine gland tissue of the submandibular and lacrimal glands as well as in tumor tissue of the submandibular gland, adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma. The knowledge about the presence of these channels in glandular tissue now provides the opportunity to further clarify the previously unexplained role of these cation channels, e.g. in salivary gland function, i.e. in the formation of saliva. In addition, further salivary glands should be examined for TRPC6 expression. It cannot be ruled out that it could be involved in the regulation of cellular calcium homeostasis due to its fundamental function. The functional significance of the non-selective channel in the lacrimal gland and its diseases also remains to be clarified. Furthermore, the discovery of the channels in these tumors provides the groundwork for further research into the as yet unknown significance of these cation channels for tumor development in ACC and MEC. TRPC6 could therefore be used as a target for drugs in the treatment of these tumors which are already being used therapeutically in other tissues. However, the actual correlation between TRPC6 and diseases of the submandibular gland and lacrimal gland has not yet been fully established. Further scientific work is required in this regard.

3. Einleitung

TRP-Kanäle sind mittlerweile als bedeutsam für die menschliche Gesundheit anerkannt. Sie spielen eine zunehmend wichtige Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Funktionen, und eine Fehlfunktion dieser Kanäle könnte potenziell Krankheiten auslösen. Aus diesem Grund ist die Erforschung der TRP-Kanalfamilie und ihrer verschiedenen Untergruppen von großer Bedeutung. Insbesondere das Vorkommen und die Wirkung dieser Kanäle im menschlichen Körper sind noch weitgehend unbekannt. Dies gilt zum Beispiel für die exokrinen Drüsen des Gesichts, wie die Unterkieferdrüse und die Tränendrüse. Es wird jedoch vermutet, dass bestimmte Kanal-Subtypen, insbesondere TRPC6, in diesen Drüsen vorkommen könnten. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass TRPC-Kanäle und auch der Subtyp C6 in Tumoren vorkommen. Ob TRPC6 in Tumoren der Speicheldrüsen, insbesondere der Glandula submandibularis vorkommt, ist derzeit noch nicht geklärt. In den folgenden Abschnitten wird untersucht, ob die TRPC-Familie in den oben genannten exokrinen Drüsen sowie bei Tumoren der Speicheldrüsen eine Rolle spielt, insbesondere im Hinblick auf den Subtyp TRPC6.

3.1. TRP-Ionenkanäle

Die TRP-Ionenkanäle (transient receptor potential channels) bilden eine Superfamilie von 28 membranständigen Kationenkanälen, die in Säugetieren vorkommen und vielfältige physiologische Funktionen erfüllen, darunter die Wahrnehmung von Wärme, die Reaktion auf chemische Reize sowie den Transport von Mineralstoffen wie Magnesium und Eisen. Die TRP-Superfamilie gliedert sich in zwei Hauptgruppen, nämlich Gruppe 1 und Gruppe 2, die wiederum in sieben Unterfamilien unterteilt sind (Montell, 2005) (siehe **Tabelle 1**): Zur Gruppe 1 gehören fünf Unterfamilien von TRP-Kationenkanälen (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN und TRPA), während zur Gruppe 2, zwei Unterfamilien von TRP-Kationenkanälen (TRPP und TRPML) gehören (Wu et al., 2010).

TRP-Superfamilie
Gruppe 1
TRPC (canonical)
TRPV (vanilloid)
TRPA (ankyrin)
TRPM (melastatin)
TRPN (NOMPC)
Gruppe 2
TRPP (polycystin)
TRPML (mucolipin)

Tabelle 1: TRP-Unterfamilien

TRPs der Gruppe 1 und 2 unterscheiden sich in ihrer genetischen Sequenz und Topologie. Die TRPs der Gruppe 1 umfassen fünf Unterfamilien, die die engste Sequenzhomologie mit dem Drosophila-TRP, dem ältesten Mitglied der Superfamilie, aufweisen (Montell & Rubin, 1989).

Eine gemeinsame Eigenschaft aller TRPs besteht darin, dass sie sechs Transmembrandomänen besitzen. Diese Kanäle können sich zu Homotetrameren (vier identischen Untereinheiten) oder zu Heterotetrameren (vier unterschiedlichen Untereinheiten) zusammenschließen. Sie verfügen über eine Porenschleife zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment, die für Kationen, insbesondere Calcium, Natrium und Magnesium, nicht-selektiv permeabel ist (Venkatachalam & Montell, 2007). **Abbildung 1** zeigt schematisch den Aufbau aller TRP-Kanäle.

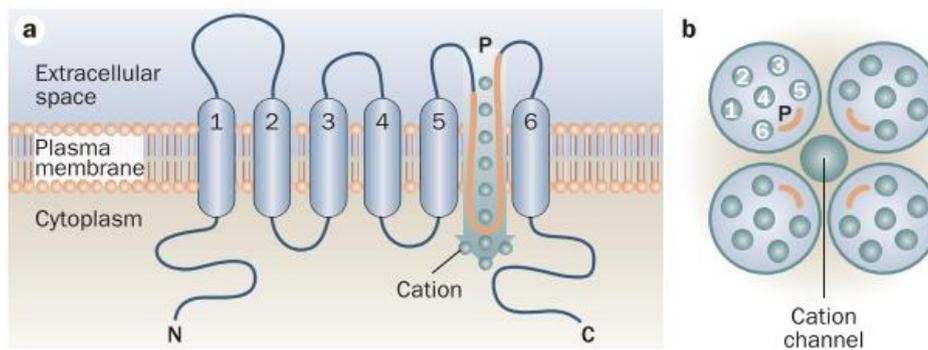


Abbildung 1: Struktur von TRP-Kanälen

a. Die sechs Transmembrandomänen (1–6) eines TRP-Kanals. Zwischen Domäne 5 und 6 befindet sich die Porenschleife (P). Der Aminoterminus (N) und der Carboxyterminus (C) sind im Zytoplasma lokalisiert. b. Aus vier TRP-Monomeren bildet sich ein funktioneller Kationenkanal (Abbildung aus Woudenberg-Vrenken et al., 2009).

3.1.1 Die Geschichte der TRP-Kanäle

Entdeckt wurden die TRP-Kanäle ursprünglich in sogenannten TRP-Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Man muss zunächst einen Blick in das Jahr 1969 werfen. Damals isolierten Wissenschaftler in Experimenten eine spontane Mutante der Fruchtfliege *Drosophila*, deren Fotorezeptoren auf einen hellen Lichtreiz mit einer transienten, also vorübergehenden Änderung des Rezeptorpotentials antworteten, wohingegen das Rezeptorpotential im Wildtyp während der gesamten Reizdauer verändert blieb. Diese Mutante schien also bei schwachem Umgebungslicht normal zu sehen, wurde jedoch blind, wenn sie länger als fünf bis zehn Sekunden hellem Licht ausgesetzt war. Dieses Phänomen zeigte sich als Auffälligkeit in der aufgezeichneten Wellenform eines Elektretinogramm (ERG) (Cosens & Manning, 1969; X. Chen et al., 2020). Die Wissenschaftler Minke, Wu und Pak bezogen sich im Jahr 1975 auf die Arbeiten von Consens und Manning und gaben dieser Mutante zum ersten Mal den Namen „transient receptor potential (trp)“ (Minke et al., 1975). Anschließend, wurde das mutierte TRP-Gen 1989 von zwei Gruppen kloniert und es zeigte sich, dass TRP ein integrales Membranprotein ist, das Sequenzhomologien mit bereits identifizierten spannungsabhängigen Kalium-, Natrium- und Calcium-Kanälen aufweist und eine Rolle bei der Signalübertragung spielt (Montell & Rubin, 1989; Wong et al., 1989). 1992 schließen Hardie und Minke daraus, dass das neu sequenzierte lichtempfindliche Kanalprotein TRP eine Gruppe lichtempfindlicher Ionenkanäle darstellt, die für den Inositid-vermittelten Calcium-Einstrom in die Fotorezeptorzelle notwendig sind. Sie vermuten, dass dieser Prozess für die Aufrechterhaltung der Erregung bei intensiver Beleuchtung in den Fotorezeptoren der Fliege benötigt wird. Eine Mutation im trp-Locus bewirkt eine vorübergehende Lichtreaktion, die durch einen zehnfachen Abstieg des

Calcium-Einstroms gekennzeichnet ist (Hardie & Minke, 1992; X. Chen et al, 2020). Bei *Drosophila* wird die Lichttransduktionskaskade ausgelöst, wenn Licht auf den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin trifft. Dadurch kommt es zur Stimulierung eines heterotrimeren G-Proteins, zur anschließenden Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und zum nachfolgenden Einstrom von Kationen in die Fotorezeptorzellen (Montell, 2003). Die Eigenschaft des TRP-Proteins, als Kanal zu fungieren, wurde in einer *in vivo*-Studie des Laboratoriums von Hardie in Zusammenarbeit mit Obukhov und Montell bestätigt. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Asp621-Rest in der vermuteten Porenschleife die wichtigste molekulare Komponente für die Calcium-Selektivität des *Drosophila*-TRP-Kanals ist (C. H. Liu et al., 2007). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass TRP in *Drosophila* entweder ein Calcium-permeabler Kationenkanal oder ein regulatorisches Protein ist, das für die Öffnung des Kanals notwendig ist. Die angenommene TRP-Struktur, die aus mehreren Transmembransegmenten besteht (Montell & Rubin, 1989), in Kombination mit heterologen Expressionsuntersuchungen (Vaca & Kunze, 1994; Xu et al., 1997) deutet darauf hin, dass TRP ein neuer Typ eines Calcium-permeablen Kationenkanals ist (zusammengefasst in Venkatachalam & Montell, 2007). Im Gegensatz zu den meisten Ionenkanälen werden TRP-Kanäle anhand ihrer Homologie und nicht anhand ihrer Ligandenfunktion oder -Selektivität charakterisiert, da ihre Funktionen uneinheitlich und häufig noch unbekannt sind (Clapham, 2003).

3.1.2 Zur physiologischen Bedeutung der TRP-Kanäle

Die physiologische Bedeutung der TRP-Superfamilie ist teilweise bereits etabliert. Die Mechanismen, über die ein bestimmtes TRP aktiviert und gesteuert wird, können nicht anhand seiner Unterfamilienzugehörigkeit vorhergesagt werden. Beispielsweise gehören die thermisch aktivierten TRPs zu den TRPA-, TRPM- und TRPV-Unterfamilien, während die regulatorische Exozytose den Einstrom von Kationen über verschiedene TRPC-, TRPV- und TRPM-Kanäle stimuliert. In einigen Fällen gibt es jedoch Ähnlichkeiten zwischen den Mitgliedern einer Unterfamilie, da alle TRPC-Kanäle durch Signalwege aktiviert werden, welche an die Stimulation der PLC gekoppelt sind (zusammengefasst von Venkatachalam & Montell, 2007).

Einige Mitglieder der TRP-Subfamilie spielen unter anderem eine Rolle bei der Nozizeption. TRPs spielen auch eine Rolle bei Blasendysfunktionen (TRPV1, TRPV4, TRPM8). Darüber hinaus sind TRPs vermutlich an verschiedenen zentralen Funktionen der Haut beteiligt, darunter Juckreiz, Proliferation, Differenzierung, Krebs und Entzündungsprozesse (TRPV1, TRPV3). Auch im Lungensystem werden TRPA1 und TRPV1 in dem dichten Geflecht von Sinnesfasern exprimiert, das die Wände auskleidet.

Die Aktivierung dieser Untergruppe von Nervenfasern löst zahlreiche Reflexe aus: Niesen, Husten, Schleimsekretion und Bronchospasmus (Moran et al., 2011).

Der aktuelle Wissensstand über die Rolle von TRP-Kanälen bei anderen Krankheiten wie Krebs ist noch nicht umfassend erforscht.

3.1.3 Die TRPC-Unterfamilie: Geschichte, Vorkommen und Bedeutung

Die TRPC-Unterfamilie entstand, nachdem TRPC1, der erste bekannte TRP-Kanal bei Säugetieren, 1995 identifiziert und kloniert wurde (Petersen et al., 1995; Wes et al., 1995). Da die TRPC-Subfamilie, insbesondere der Subtyp C6, für die vorliegende Dissertation von wesentlicher Bedeutung ist, wird im Folgenden auf diesen Subtyp eingegangen. Diese sind am engsten mit den TRP-Kanälen der *Drosophila* verwandt, weshalb die TRPC-Kanäle als „klassisch“ oder „kanonisch“ bezeichnet werden (X. Chen et al., 2020). Die ersten bei Säugetieren entdeckten TRP-Homologe von *Drosophila* wurden als TRPC1, TRPC2 und TRPC3 bezeichnet (Wes et al., 1995; X. Zhu et al., 1995), mittlerweile wurden jedoch sieben TRPC-Proteine für Säugetiere (TRPC1-7) identifiziert (Montell et al., 2002). Beim Menschen werden nur sechs TRPC-Kanäle exprimiert, wobei der TRPC2-Kanal nur bei der Maus exprimiert und beim Menschen als Pseudo-Gen angesehen wird (Wes et al., 1995; X. Zhu et al., 1996). Die sieben Säugetier-Homologe haben untereinander und mit den *Drosophila*-TRPCs über die N-terminalen 750–900 Aminosäuren eine 30 %ige Aminosäureübereinstimmung. Die TRPC-Unterfamilie lässt sich anhand von der Aminosäuresequenz-Homologie und funktionellen Ähnlichkeiten leicht in vier Untergruppen einteilen: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5 (Clapham, 2003; Montell, 2005; Plant & Schaefer, 2005; Venkatachalam & Montell, 2007; Wang et al., 2020). TRPC1 und TRPC2 sind nahezu einzigartig, wohingegen TRPC4 und TRPC5 zu ca. 65 % identisch sind. TRPC3, 6 und 7 repräsentieren eine strukturelle und funktionelle Unterfamilie mit 70–80 % Aminosäureidentität und teilen eine gemeinsame Empfindlichkeit gegenüber Diacylglycerol (DAG) (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999). Die Expression von TRPC-Kanälen in Tier- und Humanzellen und -geweben ist umfangreich und so diversifiziert wie ihre Aufgaben in den verschiedenen Geweben, wobei ein beträchtlicher Teil der Aufgaben nach wie vor unbekannt bleibt (Wang et al., 2020). TRPC-Kanäle haben einzigartige Eigenschaften und können verschiedene Arten von Kanälen bilden, entweder allein (Homomer) oder in Kombination mit anderen TRPC-Kanälen (Heteromer), was ihre Funktion und Regulierung beeinflusst (Wang et al., 2020).

Einige TRPCs wie TRPC1 werden ubiquitär exprimiert, besonders stark im Zentralnervensystem (ZNS), im Herzen, in den Eierstöcken und in den Hoden (Venkatachalam & Montell, 2007; Wes et al., 1995; X. Zhu et al., 1995). Ebenfalls bedeutsam ist TRPC1 bei der Flüssigkeitssekretion der Speicheldrüsen (X. Liu et al.,

2018). Eine wichtige pathologische Rolle spielt TRPC1 bei der Remodellierung der Lungengefäße. Diese Remodellierung ist für die Entstehung der hypoxiebedingten pulmonalen Hypertonie verantwortlich (Malczyk et al., 2013, 2015). TRPC1 spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei der HSV-1-Infektion, indem es das Eindringen des Virus erleichtert (He et al., 2020).

Der TRPC2-Kanal spielt, wie bereits beschrieben, beim Menschen nur die Rolle eines Pseudogens, weil das menschliche Gen für ein nicht funktionelles, verkürztes Protein kodiert (Vannier et al., 1999). Dagegen nimmt der C2-Subtyp bei Nagetieren in diversen Geweben unterschiedliche Aufgaben wahr (Wang et al., 2020): er ist in den Vomeronasalorganen, Teil des Geruchssystems, von Nagetieren stark vertreten (Liman et al., 1999), in welchem der Kanal ausschlaggebend für die Übertragung von Pheromonen zur Geschlechterdiskriminierung und Aggression zwischen Männchen dient (Leypold et al., 2002). Erythropoietin moduliert den Calciumeinstrom durch einen der TRPC-Kanäle, insbesondere TRPC2 (Chu et al., 2002).

TRPC3 ist ein polyvalenter zellulärer Signalüberträger mit einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Funktionen (Wang et al., 2020). Seine Expression findet sich in unterschiedlichen Geweben und ist im Zentralnervensystem am stärksten vertreten (X. Zhu et al., 1996), daneben auch in der Hypophyse und in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Hartmann et al., 2008; Riccio et al., 2002). Pathologisch beim Menschen ist TRPC3 auch in den Lungen von Patienten nachgewiesen worden, die an einer idiopathischen pulmonalen arteriellen Hypertonie (IPAH) der Lunge leiden, nicht aber bei gesunden Personen (Yu et al., 2004). Ebenfalls nachgewiesen wurde TRPC3 im Herzen von Nagetieren (Goel et al., 2007).

Ein weiterer Vertreter von TRPC-Kanälen ist TRPC4, der sich im gesamten menschlichen ZNS gleichmäßig exprimiert, dazu wurde seine Anwesenheit im kortikolimbischen Regionen der Nagetiere nachgewiesen (Fowler et al., 2007). Er zeigt peripher auch Expression, im Knochen aber am stärksten, darauffolgend im Herzen, in der Prostata, in der Plazenta und im Pankreas (Riccio et al., 2002). Weiterhin kommt er bei Nagetieren in Niere, Nebenniere, Lunge, Kleinhirn, Hoden und Eierstöcken vor (Garcia & Schilling, 1997).

Auch im ZNS, insbesondere im Gehirn in der Amygdala und im Kleinhirn, ist der TRPC5-Kanal vertreten (Okada et al., 1999; Riccio et al., 2002). In peripheren Geweben von Nagetieren wie der Niere spielt TRPC5 ebenfalls eine wichtige Rolle und es gibt in dieser Arbeit Hinweise darauf hin, dass die TRPC5-Aktivität krankheitsauslösend ist und dass TRPC5-Hemmer nützlich sein könnten, um fortschreitende Nierenerkrankungen zu behandeln (Y. Zhou et al., 2017). Außerdem wurde festgestellt, dass TRPC5 bei Nagetieren auch eine Rolle im Herz-Kreislauf-System eine zentrale Bedeutung für die

Wahrnehmung des Drucks an den Barorezeptoren der Aorta und somit für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks hat (Lau et al., 2016). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TRPC5 an der Angiogenese und Durchblutung von Mäusen beteiligt ist. Die Behandlung mit Riluzol, das TRPC5 in Endothelzellen aktivieren kann, führte bei Mäusen zu einer verbesserten Genesung nach Ischämie (Y. Zhu et al., 2019). TRPC1, TRPC5 sowie TRPC6 werden im Nebennierenmark von Schweinen exprimiert, und ihr Expressionsspiegel ist beim metabolischen Syndrom erhöht. Es wird angenommen, dass beim Metabolischen Syndrom eine krankhaft erhöhte Expression von TRPC in den Nebennieren für erhöhte Plasma-Katecholaminspiegel und eine erhöhte Herzfrequenz verantwortlich sein könnte, welche Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen sind. Daher sind TRPCs potenzielle therapeutische Ziele bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. (Hu et al., 2009).

TRPC7 wird, wie die zuvor erwähnten Vertreter im ZNS beim Menschen exprimiert, vor allem im Gehirn und in der Hypophyse, aber auch peripher vermehrt in der Niere (Riccio et al., 2002). Darüber hinaus konnte bei Nagetieren gezeigt werden, dass TRPC7 in Herz, Lunge, Auge stark, während er in Milz, Gehirn und Hoden schwächer exprimiert wird (Okada et al., 1999; Wang et al., 2020).

Betrachtet man die TRPC-Familie, so wird deutlich, dass sie sowohl bei Menschen als auch bei Tieren in ihrer Entwicklung und Funktion äußerst divers ist und dass es in diesem breiten Gebiet nach wie vor zahlreiche unbeantwortete Forschungsfragen gibt. Ein bisher noch nicht behandeltes Beispiel stellt der TRPC6-Kanal dar. Angesichts seiner Bedeutung für die vorliegende Thematik werden seine Struktur, seine Rolle, seine Relevanz und schließlich sein Auftreten in einem nachfolgenden Kapitel detailliert erläutert.

Diese Arbeit fasst den aktuellen Wissensstand über das Vorhandensein der TRPC6-Unterfamilie in exokrinen Drüsen und die mögliche Rolle dieser Proteine als Bausteine von Ca²⁺-permeablen Kanälen zusammen.

3.2. Der TRPC6-Subtyp: Aufbau und Funktion

Hochauflösende Strukturen von TRPCs waren bis 2018 nicht verfügbar, als die Technologie der kryogenen Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) es ermöglichte, hochauflösende Strukturen von TRPCs mit einer Auflösung von nahezu 3,8 Å (=10⁻¹⁰m) zu erhalten (Azumaya et al., 2018; Q. Tang et al., 2018). Die allgemeine Bauweise aller TRPCs ähnelt sich: Vier Protomere fügen sich symmetrisch zusammen und bilden eine zweilagige Architektur, die Ebene der intrazellulären zytoplasmatischen Domäne (ICD) und die Ebene der Transmembrandomäne (TMD). TRPC6-Kanäle sind

also im Allgemeinen nicht-selektive Kationenkanäle, die in der Plasmamembran (PM) von Zellen lokalisiert sind. Sie sind daher membranständige Proteine.

So zeigt die TMD eine tetramerische Struktur aus vier Untereinheiten, mit sechs transmembranöse α -Helices pro Untereinheit (S1-S6) (Azumaya et al., 2018; X. Chen et al., 2020; Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). Die ersten vier α -Helices (S1-S4) bilden eine spannungssensorartige Domäne, deren Struktur sehr verwandt mit den bisher bekannten spannungsabhängigen Ionenkanälen wie z.B. Ca^{2+} -Kanäle, Na^+ -Kanäle ist (Wang et al., 2020). Die letzten beiden α -Helices (S5+S6) bilden eine in ihrer Struktur konservierte ionenleitende Pore oder Porendomäne (P1+P2) (Venkatachalam & Montell, 2007), in einer symmetrischen Anordnung zu allen vier Untereinheiten. Somit wird in diesen Tetramerstrukturen die Spannungssensor-Domäne eines Protomers ausgetauscht, um mit der Porendomäne des benachbarten Protomers wechselzuwirken. Dadurch verbinden sich die vier Porendomänen im Zentrum des Tetramer-Komplexes zu einer ionenleitenden Pore, was in **Abbildung 2** zu erkennen ist (Wang et al., 2020). Teil des TMDs ist ebenfalls der sogenannte Prä-S1-Komplex, auch als pre-S1-elbow oder noch pre-S1-helix bezeichnet. Die Hälfte dieses Komplexes liegt innerhalb der PM und stellt ein Verbindungsstück zwischen der Transmembrandomäne S1 und den Linker-Helices (LH) dar, die bereits Bestandteil der ICD sind (Wang et al., 2020).

Im Folgenden werden die Strukturen beschrieben, die der ICD zugeordnet sind. Die bereits beschriebenen LHs, die sich an dem Prä-S1-Komplex verankern, untereinander Schleifen bilden, somit in einer antiparallelen Richtung zueinander verlaufen und miteinander in Wechselwirkung stehen. Sie knüpfen sich weiter nach N-Terminal zu drei bis vier Ankyrin-Repeats (AR1-AR4), die den äußeren Teil der zytoplasmatischen N-Terminal-Architektur bilden. Diese N-Terminale Struktur umgibt die aus vier Helix bestehende zweite C-terminalen Helix (CH2) (Azumaya et al., 2018; Philipp et al., 2000; Q. Tang et al., 2018). Der CH2-Domäne ist die erste C-terminalen Helix (CH1)-Domäne vorgeschaltet, die fast senkrecht (ca. $100\text{-}120^\circ$) zu CH2 verläuft, aber parallel zur PM (Q. Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). Der Anfang von CH1 enthält das charakteristische CIRB-Motiv (CIRB, Calmodulin and IP_3 Receptor Binding), was Bindungsstellen für Inositolhexaphosphat (IP_6) sowie für Calmodulin (CaM) und den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (IP_3 -R) darstellt (Kwon et al., 2007; Q. Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). Eine zur Hälfte in die Membran integrierte TRP-Reentrant-Helix befindet sich zwischen der S6- und der CH1-Domäne, welche noch die TRP-Box beinhaltet. Diese ist eine konstante Sequenz, die alle Mitglieder der TRPC-Familie besitzt und welche die Aminosäuresequenz EWKFAR enthält. Wichtig ist noch zu

merken, dass die zytoplasmatischen N-Termini, die C-Termini umgeben (Q. Tang et al., 2018; Wang et al., 2020).

Eine Besonderheit von TRPC3 und C6 ist die verlängerte S3-Transmembrandomäne nach extrazellulär. Dieser Auswuchs aus der Membranoberfläche kann zur Unterstützung einer extrazellulären Tasche beitragen, die möglicherweise von kleinen Molekülen angegriffen werden kann (Q. Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). Der Aufbau von TRPC6 ist daher hochkomplex und wird in **Abbildung 3** schematisch dargestellt.

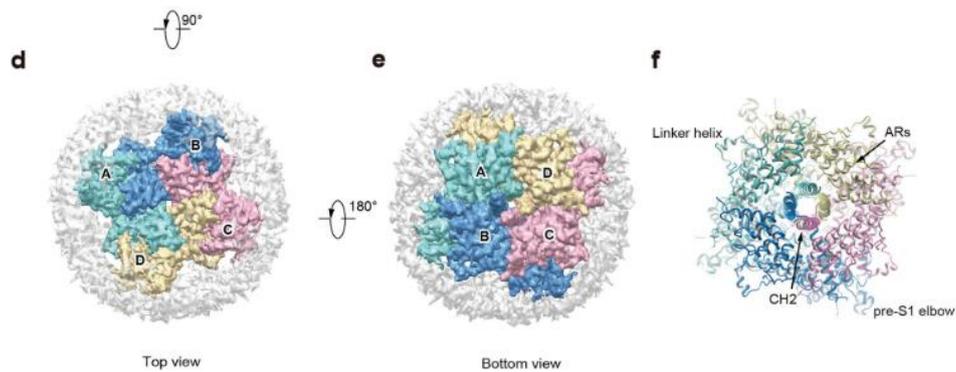


Abbildung 2: Karte der Dichte des menschlichen TRPC6-Kanals in Kryo-EM

In den Abbildungen sind die Untereinheiten des humanen TRPC6-Kanals farbcodiert sowie mit Buchstaben (A-D) beschriftet dargestellt. Der Kanal ist in der Aufsicht (d) und Untersicht (e) dargestellt. Aus der Farbcodierung kann man auch die Wechselwirkung der Untereinheiten untereinander erkennen, sodass sich ein Tetramer-Kanal mit einem zentralen Lumen ergibt. Es handelt sich dabei um die Pore des ionenleitenden Kanals. (f) ist die Untersicht des Kanals. AR bedeutet Ankyrin-Repeats, CH bedeutet C-terminale Helix (Abbildung modifiziert nach Tang et al., 2018).

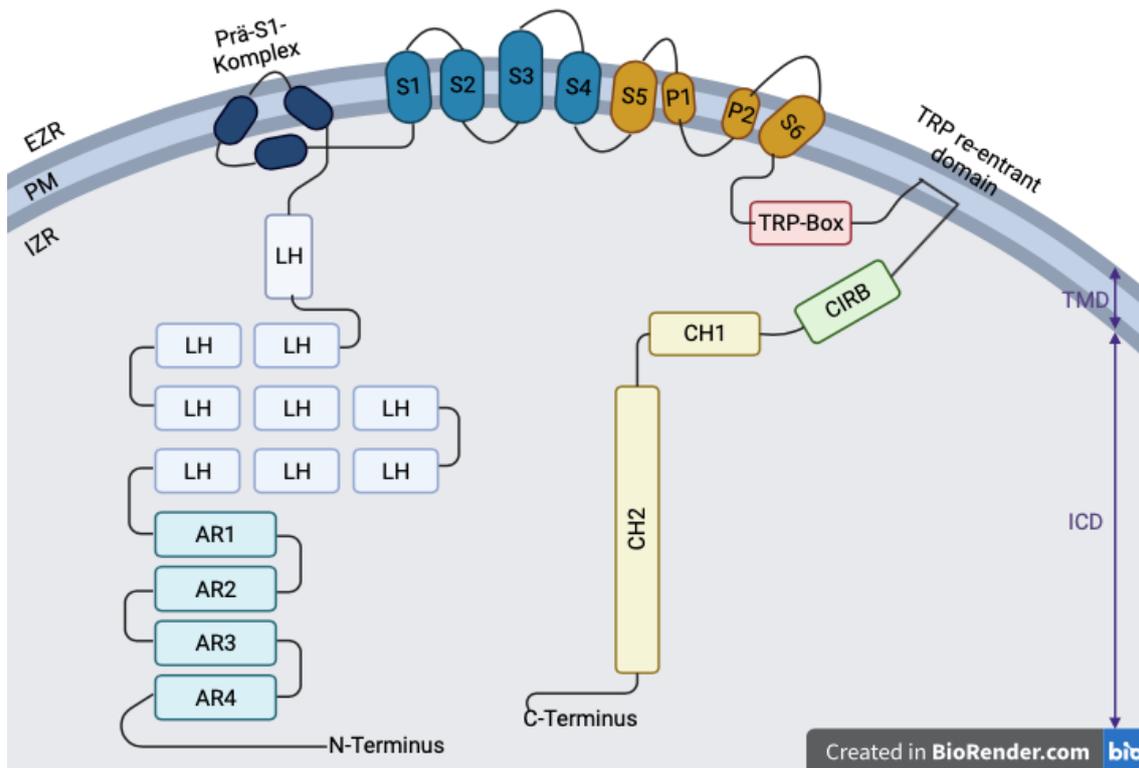


Abbildung 3: Aufbau einer TRPC6-Untereinheit

Zur Erklärung der grafischen Darstellung siehe die zugehörige Beschreibung.

EZR = Extrazellulärer Raum; PM = Plasmamembran; IZR = Intrazellulärer Raum; TMD = Transmembrandomäne; ICD = Intrazelluläre Zytoplasmadomäne; LH = Linker-Helix; AR 1–4 = Ankyrin-Repeat 1–4; S 1–6 = Transmembransegment 1–6; P 1–2 = Porenschleife 1–2; CIRB = Calmodulin- und IP₃-Rezeptor-Bindung; CH1 = C-terminale Helix 1; CH2 = C-terminale Helix 2 (Abbildung mit BioRender.com erstellt, modifiziert nach Q. Tang et al., 2018).

Betrachtet werden soll nun die Funktion des TRPC6-Kanals. Die Zellen des Körpers kommunizieren miteinander, um vielfältige Funktionen zu erfüllen. Dazu produzieren und nutzen sie extrazelluläre Botenstoffe, auch Liganden oder First Messenger genannt, wie z.B. Neurotransmitter oder Hormone, die die Zielzelle erreichen. Diese Liganden binden dann an einen Rezeptor, der sich je nach Art des Liganden auf der Zellmembran, im Zytoplasma oder im Zellkern befindet. Die Bindung des Liganden löst eine Signalkaskade verschiedener Second Messenger aus, die der intrazellulären Weiterleitung des extrazellulären Liganden dienen. Für uns von Bedeutung sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR, G protein-coupled receptor), da TRPC-Kanäle eine Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion spielen, durch Bindung eines Liganden an einen G-gekoppelten Rezeptor, bei TRPC6 insbesondere den Subtypen Gq/11 (X. Chen et al., 2020b; Rassow et al., 2016). Diese Rezeptoren sind mit einem G-Protein mit drei Untereinheiten assoziiert, dessen α -Untereinheit eine GDP-Aktivität (GDP, Guanosindiphosphat) besitzt, und ein Effektormolekül in der Form eines Enzyms

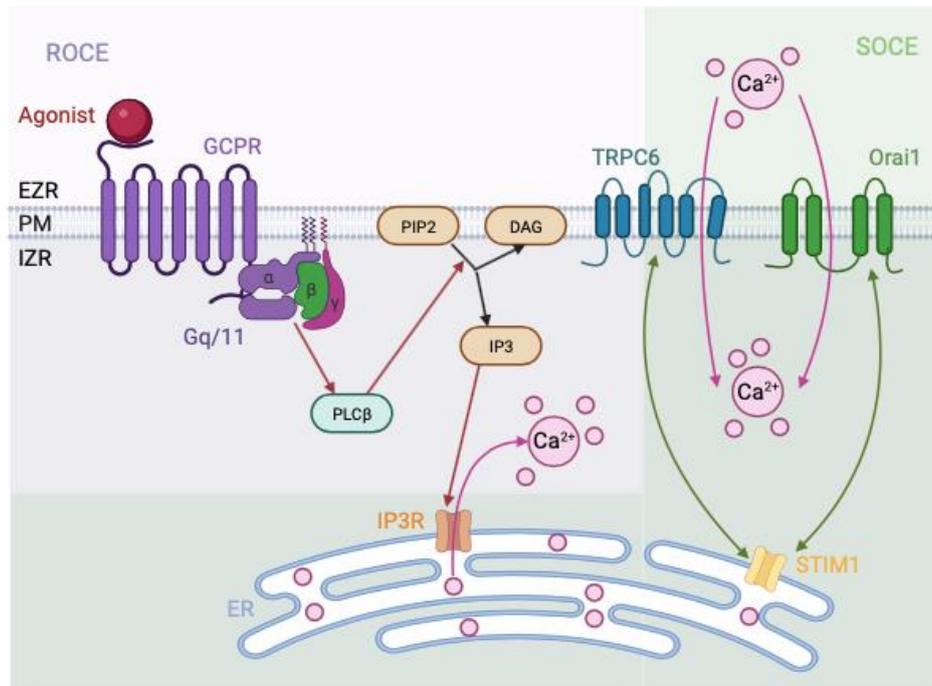
oder eines Ionenkanals. Die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Rezeptorseite führt zu seiner Konformationsänderung, er aktiviert das intrazelluläre G-Protein durch Austausch von GDP in GTP (GTP, Guanosintriphosphat) und die drei Untereinheiten (α , β und γ) dissoziieren in zwei Komplexe. Dies wiederum aktiviert das Effektormolekül. Die beiden Wege der intrazellulären Signaltransduktion sind dann entweder die Adenylatcyclase oder die Phospholipase C. Uns interessiert bei dem Subtyp Gq/11 der Phospholipase C-Weg (C. Liu & Montell, 2015). Durch die Aktivierung der α -Untereinheit des G-Proteins schaltet sie die Phospholipase β (PLC β) ein. Dies führt zur Hydrolyse des membranständigen Phosphatidylinositolbisphosphats (PIP₂) in die Second Messenger DAG und IP₃ (Kalwa et al., 2015). DAG bleibt nach Hydrolyse in der Membran zurück, während IP₃ sich im Zytosol verbreitet (Rassow et al., 2016). Alle TRPC-Ionenkanäle inkl. der TRPC6-Subtyp (Wang et al., 2020) bilden Ca²⁺-durchlässige Kationenkanäle (Gees et al., 2010), die durch DAG unmittelbar aktiviert werden, die sich somit öffnen und Calciumionen können aus dem extrazellulären Raum in die Zelle einströmen (Hofmann et al., 1999; Ma et al., 2000, 2002; Minke & Cook, 2002; Montell, 2001; Trebak et al., 2003; Venkatachalam et al., 2002; Wang et al., 2020). IP₃ bindet an den IP₃-Rezeptor (IP₃R), der an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist, und induziert die Freisetzung von Ca²⁺ aus den Ca²⁺-Speichern des ER über den IP₃R, einen gut charakterisierten intrazellulären Calcium-Freisetzungskanal, wodurch ebenfalls Calciumionen in das Zytosol strömen und weitere Zellreaktionen stimulieren (Rassow et al., 2016). Sowohl die Aktivierung der PLC β -Isoenzyme durch GPCR als auch der PLC γ -Isoformen durch Rezeptortyrosinkinasen führen zur Hydrolyse von PIP₂, um IP₃ und DAG (Dietrich et al., 2005). Dadurch kann man sagen, dass die Aktivierung von PLC-gekoppelten Membranrezeptoren durch First Messenger zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i führt. Calcium ist ein universeller Second Messenger, der an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt ist. Calcium formt Komplexe mit Proteinen, die daraufhin ihre Konformation ändern und somit löst Calcium seine Wirkung aus (Rassow et al., 2016).

Es wurden intensiv zwei Mechanismen untersucht, durch die PLC-verknüpfte Rezeptoren den Calcium-Eintrag über die Plasmamembran aktivieren: der speicheroperierte Einstrom von Ca²⁺ (SOCE, store-operated calcium entry) und der rezeptoroperierte Einstrom von Calcium (ROCE, receptor-operated calcium entry). ROCE-Kanäle werden durch die Bindung eines Agonisten an einen PLC-gekoppelten Zellmembranrezeptor aktiviert, der sich vom Kanalprotein selbst unterscheidet. Demgegenüber werden ligandengesteuerte Ionenkanäle durch die direkte Bindung eines Liganden an die Kanaluntereinheiten aktiviert. TRPC-Kanäle sind derartige ROCE-Kanäle. (Dietrich et al., 2005). Obwohl sich die Forschungsgruppen einig sind, dass für

alle TRPC-Kanäle einschließlich TRPC6 ein solcher rezeptor-operativer Calcium-Einstrom möglich ist, wie er z.B. bei der TRPC6-Aktivierung durch DAG auftritt, ist die Rolle und Bedeutung des SOCE bisher nicht eindeutig definiert und wird noch diskutiert (Dietrich et al., 2005; Wang et al., 2020) (siehe **Abbildung 4**). Alle TRPC-Kanäle wurden als mögliche molekulare Bausteine von SOCE-vermittelnden Kanälen vorgeschlagen. Jedoch sind die Daten für einige TRPCs nicht sehr einheitlich. Die erste Gruppe besteht aus TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanälen, die sowohl durch Rezeptorstimulation als auch durch Speicherentleerung reguliert werden können, wobei letztere die Assoziation des Kanals mit den Proteinen STIM1 (STIM1, stromal interaction molecule 1) und/oder Orai1 (Orai1, Ca²⁺-release-activated Ca²⁺-modulator) erfordert, weshalb sie als Komponenten der SOCE-Kanäle vorgeschlagen werden (Hwei et al., 2007; X. Liu et al., 2010). Die zweite Gruppe umfasst TRPC3/TRPC6/TRPC7, die durch Rezeptorstimulation aktiviert werden, also speicherunabhängig, sodass sie als Komponenten der ROCE-Kanäle in Frage kommen (X. Liu et al., 2018; Minke & Cook, 2002).

SOCE entsteht, wenn IP₃ oder ein anderes Signal Calcium aus den intrazellulären Speichern im ER freisetzt und diese erschöpft. Der nachfolgende Konzentrationsabfall von Calcium des ERs wird der Plasmamembran signalisiert, damit speichergesteuerte CRAC (CRAC, Ca²⁺ release-activated channels) der Plasmamembran aktiviert werden und ein Calcium-Einstrom folgt (Dietrich et al., 2005; Parekh & Putney, 2005). Hierzu spielt STIM1 die Rolle eines nicht-kanalisierten Verbindungsglied zwischen dem ER und der Plasmamembran, der sich in der ER-Membran befindet und sich als ein Sensor für das luminaire Calcium des ER erwiesen hat. Er besitzt ein EF-Hand-Motiv im Bereich seines N-Terminus, das im ER-Lumen lokalisiert ist, welches auf eine Rolle bei der Wahrnehmung von ER-Calciumspiegel schließen lässt. Im Grundzustand, wenn die ER-Calciumspeicher voll sind, liegt STIM1 als Dimer vor. Ist der ER-Calcium Speicher leer, kommt es zu einer Oligomerisierung von STIM1, welches dann zu PM translokiert wird, Komplexe mit sogenannten Orai-Proteinen bildet, die CRAC aktivieren und den nachfolgenden Calcium-Einstrom auslöst. Orai1 ist also ein entscheidender und essenzieller Bestandteil von SOCE (Cahalan, 2009; Hogan et al., 2010; Lewis, 2020; Prakriya, 2013). Die Diskussion über einen möglichen SOCE bei TRPC6 hat die beschriebene Korrelation zwischen STIM1, Orai1 und TRPC-Kanälen eröffnet. Zunächst im Jahr 2008 wurde nun eine dieser Assoziationen in Bezug auf TRPC6 und STIM1 beschrieben (El Boustany et al., 2008). Dieser Befund wurde einige Jahre später bestätigt: Es konnte gezeigt werden, dass STIM1 eine regulierende Wirkung auf TRPC6 ausübt. Hierbei handelte es sich um eine Translokation von TRPC6-Kanälen von der PM zur ER-Membran (Albarrán et al., 2014). Dadurch kommt es zu einem verminderten Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum, aber zu einer erhöhten

Calciumausschüttung aus dem ER, darüber hinaus konnten Beziehungen zwischen Orai1 und TRPC6 beobachtet werden (Cahalan, 2009; El Boustany et al., 2008; Liao et al., 2008). Die Hypothese, dass TRPC6 nicht nur rezeptorgesteuert, sondern auch speichergesteuert beeinflusst werden kann, ist demnach durchaus plausibel.



Created in BioRender.com bio

Abbildung 4: ROCE und SOCE des TRPC6-Kanals

In der Abbildung sind die einzelnen Funktionen im Überblick dargestellt. Zur Erklärung der grafischen Darstellung siehe die zugehörige Beschreibung.

EZR = Extrazellulärer Raum; PM = Plasmamembran; IZR = Intrazellulärer Raum; GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor; PLC β = Phospholipase C β ; PIP $_2$ = Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat; DAG = Diacylglycerin; IP $_3$ = Inositol-1,4,5-triphosphat; IP $_3$ R = IP $_3$ -Rezeptor; ER = endoplasmatisches Reticulum; ROCE = Rezeptor-operierter Calciumeinstrom; SOCE = Speicheroperierter Calciumeinstrom; STIM1 = stromal interaction molecule 1; Orai1 = Calcium release-activated calcium channel protein 1; roter Pfeil = Stimulierung/Aktivierung; grüner Pfeil = Interaktion; schwarzer Pfeil = Richtungspfeil (Abbildung mit BioRender.com erstellt, modifiziert nach Avila-Medina et al., 2018; Domínguez-Rodríguez et al., 2012).

Sowohl die Produkte der PLC-Aktivität als auch das Substrat PIP $_2$ spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des TRPC-Kanals. Studien zeigen eine Korrelation zwischen der PIP $_2$ -Reduktion und der TRPC6-Aktivierung und -Inaktivierung. Wenn man PIP $_2$ durch ein spezielles Enzym abbaut, werden die TRPC6-Kanäle inaktiviert, auch wenn noch DAG vorhanden ist. Die DAG hingegen, wie schon erwähnt, sorgt nur dafür, dass die Kanäle aktiviert werden, jedoch nicht für ihre Inaktivierung (Itsuki et al., 2014). PIP $_2$ spielt eine komplexe Rolle bei der Aktivierung des TRPC-

Kanals: Zum einen können die Kanäle durch die natürlichen PIP_2 -Spiegel und verwandte Moleküle wie Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PIP) und Phosphatidylinositol (PI) in der Zellmembran in gewisser Weise gehemmt werden. Wenn PIP_2 durch das Enzym PLC abgebaut wird, das auch PIP und PI in PIP_2 umwandelt, wird diese Hemmung aufgehoben und die Kanäle können aktiviert werden. Zum anderen könnte eine gewisse Menge PIP_2 notwendig sein, um die Aktivität der TRPC-Kanäle zu unterstützen, da PIP_2 das Ausgangsmaterial für die Produktion von DAG und IP_3 ist (Wang et al., 2020). Ferner besteht eine direkte Interaktion zwischen den IP_3 -Rezeptoren und den TRPC-Kanälen. Genauer betrachtet, bindet der N-Terminus des IP_3 -Rezeptors an die CIRB im C-Terminus-Bereich des TRPC-Kanals. Diese Bindung wurde bei allen drei Arten von IP_3 -Rezeptoren und allen TRPC-Kanal-Subtypen beobachtet (J. Tang et al., 2001). Weiterhin spielt IP_3 in Zusammenhang mit Calmodulin (CaM) eine Rolle in der Regulierung von TRPC6: Ca^{2+} /CaM wäre an der Hemmung der TRPC6-Aktivität beteiligt, wobei IP_3 die Dissoziation von CaM fördert. IP_3 reguliert also CaM und in diesen Fall bleibt die Hemmung von TRPC6 aus (Kwon et al., 2007). Die Aktivität von TRPC6-Kanälen wird ebenfalls von Calcium ebenso stimuliert als auch gehemmt, abhängig von der CaM-dependent Kinase. Sie werden stimuliert sowohl durch erhöhte Konzentrationen von Calcium (Ca^{2+}) außerhalb der Zelle $[\text{Ca}^{2+}]_e$ im Bereich von 0,1 bis 1 mM als auch durch erhöhte Konzentrationen von Calcium innerhalb der Zelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 20 auf 200 nM. Jedoch führt eine weitere Erhöhung der Calciumkonzentrationen zu einer Hemmung der Aktivität dieser Kanäle (Albert, 2004; J. Shi et al., 2004). Außerdem werden die TRPC6-Kanäle durch eine Calcium-abhängige Inaktivierung (CDI, Calcium-dependent Inactivation), ein negatives Rückkopplungssystem in Abhängigkeit von dem Calciumspiegel in der Zelle gesteuert, um einen übermäßigen Ionenfluss zu verhindern. Bei der fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS)-assoziierten TRPC6-Mutationen wurde nämlich festgestellt, dass CDI nicht richtig funktioniert, was bedeutet, dass die mutierten TRPC6-Kanäle bei einem Anstieg des Calciumspiegels nicht ordnungsgemäß abgeschaltet werden, was zu einer erhöhten Kanalaktivität führt (Polat et al., 2019). Es wurde auch ein exozytotischer Mechanismus für die Regulierung von TRPC6 vermutet. So löste die Aktivierung des Muskarinrezeptors eine Translokation von TRPC6 zur Plasmamembran aus, wo es verblieb, solange der Stimulus anhielt (Cayouette et al., 2004). Zudem wird der TRPC6-Ionenkanal durch Proteinphosphorylierung reguliert. Während Proteinkinase C (PKC) zur Inaktivierung des Kanals beizutragen scheint (Trebak et al., 2003), erhöht Fyn, ein Mitglied der Src-Familie der Protein-Tyrosinkinasen, die Kanal-Aktivität von TRPC6 (Hisatsune et al., 2004).

3.3. TRPC6: gewebsspezifisches Vorkommen und Bedeutung

Das Vorkommen von TRPC6 wurde erstmals 1997 beschrieben. Die cDNA von humanem TRPC6 wurde aus der Plazenta kloniert (Hofmann et al., 1999). Es wird vor allem in der Lunge, im Großhirn und in den Eierstöcken exprimiert (Garcia & Schilling, 1997). Im Jahr 2002 bestätigte Riccio dies in seiner Analyse der mRNA-Verteilung der menschlichen TRPC-Familie im ZNS und in peripheren Geweben und wies nach, dass TRPC6 im ZNS generell, in der Lunge, der Plazenta, der Pankreas, im Muskel- und Fettgewebe, im Herzen, in der Niere vorkommt. Der Kanal befand sich im ZNS ubiquitär, insbesondere im Großhirn, im Kleinhirn, in den Basalganglien, in der Hypophyse, im Rückenmark und in der Medulla oblongata (Riccio et al., 2002). TRPC6 befindet sich in Neuronen des Gehirns und der Retina und könnte der Hauptdarsteller sein bei der Regulierung grundlegender neuronaler Aufgaben durch die Steuerung des Ca^{2+} -Stroms in diese Nervenzellen (Bollimuntha et al., 2011; Y. Sun et al., 2014). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass TRPC6 bei menschlichen Blutplättchen eine Rolle bei dem Einstrom von Calcium spielt (Hassock et al., 2002). TRPC6-Kanäle werden in glatten Muskelzellen in Gefäßen aller Größen und in der glatten Muskulatur von Organen wie der Magen-Darm-Trakt, die Lunge und das Myometrium exprimiert und spielt eine Rolle bei der Kontraktion der glatten Muskelzellen (Beech et al., 2004; Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010; Startek et al., 2019; Yip et al., 2004). Der Kanal ist auch mit Pathologien der glatten Muskelzellen assoziiert, wie z.B. hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (Saleh et al., 2008), Hypertension (Firth et al., 2007), kardiales Remodelling (Kuwahara et al., 2006) und idiopathische pulmonale arterielle Hypertension. Bei dieser Erkrankung werden die TRPC6-Kanäle durch erhöhten Ca^{2+} -Einstrom getriggert und führen zum Fortschreiten der Krankheit (Yu et al., 2004) (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010).

In der Muskulatur spielt TRPC6 weitere notwendige Rollen, zum Beispiel bei der Wundheilung und Gewebesremodelling, damit sich fibroblastäre Zellen zu myofibroblastären Zellen differenzieren. Durch Überexpression von TRPC6 konnte die Myofibroblastentransformation vollständig eingeschaltet werden (Davis et al., 2012).

Weiter in der Lunge kommt TRPC6 in den Alveolarmakrophagen vor (Finney-Hayward et al., 2012).

TRPC6 ist für die ordnungsgemäße Regulierung der Podozytenstruktur und -funktion in der menschlichen Niere von wesentlicher Bedeutung (Reiser et al., 2005). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass TRPC6 ebenfalls eine Rolle in der Niere der Nagetiere in den Glomeruli, in Röhrenzellen der Nierenrinde und des äußeren und inneren Nierenmarks und in den Podozyten spielt (Goel et al., 2006). Mutationen des TRPC6-Gens werden mit Erbkrankheiten wie die fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) der Niere in Verbindung gebracht. Eine Aminosäuresubstitution in einer hoch

konservierten Region des Proteins verstärkt die TRPC6-vermittelten Calciumsignale als Reaktion auf Agonisten wie Angiotensin II und scheint die intrazelluläre Verteilung des TRPC6-Proteins zu verändern. Dies führt dann bei den Erkrankten zu Ödemen, Hämaturie, arterielle Hypertonie, Proteinurie und Niereninsuffizienz (Winn et al., 2005). Zusätzlich wurde der Mechanismus des TRPC6-Knockouts bei Diabetes mellitus Typ 2-induzierter Nierenfibrose in TRPC6-/- Mäusen untersucht. Die Studie legt nahe, dass das Ausschalten von TRPC6 die glomeruläre Fibrose lindern und das Fortschreiten der chronischen Nierenerkrankung verlangsamen kann, indem die $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung reduziert und der Calcineurin-NFAT2-Signalweg (NFAT2, Nuclear Factor of Activated T-cell 2) in Diabetes mellitus Typ 2-Mäusen gehemmt wird (R. Sun et al., 2024).

TRPC6 spielt eine Rolle bei der Therapie von Depression und Angststörungen. Bei der Untersuchung des molekularen Zieles des Hyperforins, Hauptwirkstoffs des Johanniskrautextrakts und verantwortlich für seine antidepressive Wirkung, wurde bewiesen, dass Hyperforin den Eintritt von Natrium und Calcium in TRPC6-exprimierenden Zellen induzierte, welcher hochspezifisch mit TRPC6 verbunden ist. Darüber hinaus wurde bewiesen, dass Hyperforin die neuronale axonale Sprossung in Abhängigkeit von TRPC6 induziert. Diese Ergebnisse bestätigen die Rolle der TRPC-Kanäle bei der Neuritenausdehnung und weisen Hyperforin als erstes selektives pharmakologisches Mittel zur Untersuchung der TRPC6-Funktion aus (Leuner et al., 2007).

In neurodegenerative Erkrankungen haben In-vitro- und In-vivo-Studien gezeigt, dass der TRPC6-Kanal ein molekulares Ziel für die Entwicklung von Neuroprotektiva darstellt. Sowohl bei Morbus Alzheimer als auch bei der zerebralen Ischämie wurde sowohl eine Hoch- als auch eine Unterregulierung der TRPC6-Kanalfunktionen beobachtet. Um Neuronen vor Alzheimer und zerebraler Ischämie zu schützen, sollte daher der Einsatz geeigneter TRPC6-Kanalmodulatoren notwendig sein (Prikhodko et al., 2020).

TRPC6-Kanäle sind auch an der menschlichen Krebsentstehung beteiligt und sind an der Proliferation und dem Überleben von Krebszellen beteiligt. Somit wird TRPC6 in Tumorgeweben stärker exprimiert als in den entsprechenden Normalgeweben (Ding et al., 2010). So kontrolliert unmittelbar TRPC6 die Zellproliferation in bösartige Zellen der Leber. Weil der Kanal nur in tumorösen Lebern exprimiert wird, ist es möglich, dass TRPC6 bei der Entstehung von menschlichen Hepatozellulärem Karzinom (HCC) eine bedeutende Rolle spielt, in dem TRPC6 SOCE vermittelt und die Zellproliferation reguliert (El Boustany et al., 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass TRPC6 in Tumorgeweben von Brustkrebs sogar überexprimiert wird (Guilbert et al., 2008), sowie bei gutartigem und bösartigem menschlichen Prostatakarzinom (Thebault et al., 2006;

Yue et al., 2009). Bei oralen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (SCC, squamous cell carcinoma) ist die Expression von TRPC6 ebenfalls signifikant höher als in normalem Gewebe. Zudem unterdrückte eine Inhibition des TRPC6 das Wachstum von SCC-Zellen sowohl in vitro als auch in Nagetiere (Ding et al., 2010; Y. Shi et al., 2009). Ein ähnliches Phänomen konnte bei dem Nierenzellkarzinom beobachtet werden: TRPC6 überexprimiert sich im Tumorgewebe und die Inhibition von den Kanälen unterdrückte die Zellproliferation (Song et al., 2013). Im Glioblastom (GBM), ein Gehirntumor, wurde festgestellt, dass TRPC6 verschiedene Eigenschaften von GBM beeinflusst, darunter Tumorwachstum, zelluläres Überleben, Invasivität und Angiogenese, somit verbindet sich die Hemmung von TRPC6 mit einer Reduktion des Gliomwachstums, der Invasion und Angiogenese verbunden (Chinigò et al., 2021). In der Lunge, die durch TRPC6 vermittelte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} durch Förderung der Zellzyklusprogression stimuliert die Zellproliferation von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC, non-small cell lung cancer) (Yang et al., 2016). Es wurde nachgewiesen, dass TRPC6 in zervikale Krebszellenlinien SiHa und HeLa exprimiert wird. Die Studie deutet darauf hin, dass die hohe Expression des Calciumkanals TRPC6 in HeLa- und SiHa-Gewebe mit dem aggressiven Verhalten der Gebärmutterhalskrebs-Zelllinien HeLa und SiHa in Verbindung gebracht werden kann. TRPC6 könnte ein neues Ziel für die Prävention und Behandlung von Gebärmutterhalskrebs sein (Bai et al., 2022). Ob TRPC6 in bösartigen Tumoren der Glandula submandibularis vorkommt, wird in dieser Arbeit untersucht.

3.4. Funktion des TRPC-Kanals in exokrinen Drüsen

Das Vorkommen und Bedeutung von TRPC-Kanälen in Drüsen wurde erstmal 2000 von Lius Arbeitsgruppe beschrieben, und zwar die Rolle des Trp1-Gens im Mechanismus des SOCE von Speicheldrüsenzellen. Die Gene Trp1, Trp3 und htrp1 (humanes Trp1) wurden in Speicheldrüsenzellen der Glandula submandibularis (HSG, human submandibular gland cell line) nachgewiesen. HSG-Zellen, die gentechnisch so verändert wurden, dass sie höhere Konzentrationen von htrp1 α , einer Variante von Trp1, wiesen eine erhöhte Konzentration von Trp1-Protein und eine 3- bis 5-fache Erhöhung des SOCE auf. Trp1 wurde außerdem in der Plasmamembranregion von azinären und duktalem Zellen in intakten submandibulären Drüsen der Ratte gefunden, also dort, wo der SOCE stattfinden soll. Ausgehend von diesen Ergebnissen legt die Studie nahe, dass Trp1 wahrscheinlich am SOCE-Mechanismus in Speicheldrüsenzellen beteiligt ist und reguliert vermutlich den Calciumeinstrom und die Flüssigkeitssekretion (X. Liu et al., 2000). Auch im Jahr 2000 beschrieb Ambudkar die komplexe Regulation der Flüssigkeitssekretion in den Speicheldrüsen durch Neurotransmitter-Signalübertragung und betont die zentrale Rolle von Calciumionen in diesem Prozess. Eine entscheidende

Komponente für die langanhaltende Sekretion ist ein bestimmter Calciumkanal in der Plasmamembran, der durch intrazelluläre Speicher gesteuert wird, aber bisher nicht identifiziert wurde (Ambudkar, 2000). 2005 beschrieb die Arbeitsgruppe von Bandyopadhyay, dass TRPC6 in polarisierten Epithelzellen von Nagetieren, einschließlich Madin-Darby-Canine-Kidney Zellen (MDCK) von Hunden und Speicheldrüsenepithelzellen der Glandula submandibularis, sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Region lokalisiert ist, was möglicherweise Auswirkungen auf die Regulierung des Calciumspiegels und der Sekretion in Speicheldrüsenengängen hat. Die Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls das Vorhandensein von TRPC1 und TRPC3 in diesen Zellen (Bandyopadhyay et al., 2005). Im Jahr 2006 untersuchte Ambudkar die TRPC-Kanäle und deren mögliche Funktion als Bestandteile des SOCE. Obwohl die genauen Funktionen und Regulierungsmechanismen der TRPC-Kanäle noch nicht vollständig verstanden sind, gibt es Hinweise darauf, dass sie in bestimmten Mikrobereichen innerhalb der Calcium-Signalkaskade lokalisiert und reguliert werden. Diese Kanäle spielen eine Rolle sowohl bei speicher-operierten als auch bei speicherunabhängigen Mechanismen des Calciumeinstroms, die beide durch die Hydrolyse von PIP_2 ausgelöst werden (Ambudkar, 2006). Die Rolle von TRPC1 bei der Speichelsekretion in Speicheldrüsen wurde später bestätigt: bei Mäusen mit TRPC1-Mangel ist die Sekretion von Speicheldrüsenflüssigkeit in HSG-Zellen sowie in Primärkulturen von Zellen der Bauchspeicheldrüse und der submandibulären Drüse stark beeinträchtigt (Hong et al., 2011; X. Liu et al., 2007). Nun gilt es als allgemein anerkannt, dass der primäre Weg der Ca^{2+} -Einstrom in Azinuszellen, der für die Flüssigkeitssekretion erforderlich ist, durch SOCE vermittelt wird. Später wurden an Zellkulturlinien und Nagetieren die entscheidenden Komponenten von SOCE in Speicheldrüsenzellen identifiziert: Orai1, TRPC1, TRPC3 und STIM1, wobei TRPC1/3 eine der wichtigsten Determinanten der Flüssigkeitssekretion ist. Es gibt eine wesentliche funktionelle Interaktion zwischen TRPC1/3, STIM1 und Orai1. Es wird vermutet, dass Orai1 für den Calciumeinstrom verantwortlich ist, der notwendig ist, um TRPC1 zu rekrutieren und es in die PM einzubauen. STIM1 fungiert als Torwächter für TRPC1. Wichtig ist, dass TRPC1 und Orai1 unterschiedliche Muster von Calcium-Signalen in den Zellen erzeugen, und diese Signale spielen eine Rolle bei der Regulierung bestimmter Zellfunktionen (Ambudkar, 2014; Cheng et al., 2011, 2013; Hong et al., 2011; Sun et al., 2015). Die Rolle von Orai1 in der Speicheldrüsenfunktion ist noch nicht eindeutig geklärt, allerdings wurde Orai1 in zwei exokrinen Drüsen, der Tränendrüse und der Bauchspeicheldrüse, untersucht. Orai1(-/-)-Mäuse zeigen einen Ausfall der Tränendrüsensfunktion und eine verminderte SOCE in den Azinuszellen der Tränendrüse (zusammengefasst von X. Liu et al., 2018; Xing et al., 2014). TRPC3 kann direkt durch DAG aktiviert werden und trägt unter

bestimmten Bedingungen auch zum SOCE bei Mäusen, denen TRPC3 fehlt, zeigen eine verminderte SOCE und Flüssigkeitssekretion (Kim et al., 2009). Es zeigt sich, dass der Beitrag von TRPC3 zum SOCE von der Anwesenheit von TRPC1 abhängt, da TRPC1(-/-)-Mäuse kein TRPC3-abhängiges SOCE aufweisen (Lee et al., 2014). Somit wurde vorgeschlagen, dass entweder die Kanäle als speichergesteuerter heteromerer Kanal zusammengebaut werden oder dass TRPC1 für die speicherabhängige Regulierung von TRPC3 erforderlich ist. Die Interaktion zwischen TRPC3 und TRPC1 ist tatsächlich notwendig für die STIM1-Regulierung der Kanäle in Speicheldrüsen-Gangzellen. Die beiden TRPC-Kanäle fallen nach Zellstimulation mit STIM1 zusammen aus. Der Verlust von TRPC1 hebt die Assoziation von STIM1 mit TRPC3 auf (Lee et al., 2014; X. Liu et al., 2018; Yuan et al., 2007). Weiterhin wurde eine Rolle von TRPC6 im SOCE in Nebenschilddrüsenzellen bewiesen. Diese Zellen besitzen nämlich keine spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle. Wenn jedoch die Calciumvorräte in der Zelle passiv geleert werden, wird ein signifikanter nicht-spannungsaktivierter, nicht selektiver SOCE-Kationenstrom durch Thapsigargin ausgelöst. Zu diesem Phänomen sollen TRPC6 sowie Schlüsselproteine von SOCE Orai1 und STIM1 beteiligt sein (Lu et al., 2010). Forschungen zeigen, dass ein erhöhter Calciumgehalt im Speichel mit der Bildung von Speichelsteinen (Sialolithiasis) zusammenhängt. Bei TRPC3(-/-)-Mäusen wurde ein verminderter Calciumstrom in den Speicheldrüsenengängen festgestellt, was zu einem höheren $[Ca^{2+}]$ im Speichel führt. Signifikant war, dass TRPC3 in duktalem Speicheldrüsenzellen von Mäusen und Menschen exprimiert wurde, während intraduktale Steine sowohl in Speicheldrüsen von Mäusen (TRPC3(-/-)) als auch von Patienten nachgewiesen wurden. Die Forscher fanden heraus, dass TRPC3 wichtig ist, um die Expression von Verkalkungsgenen (BMP2/6, Runx2) in duktalem Zellen zu unterdrücken, die zur Verkalkung der Speicheldrüsenengänge führen (Choi et al., 2023). Wie oben beschrieben, wurde die Rolle einiger TRPCs in Speicheldrüsenzellen und in der Speichelsekretion beschrieben, aber es gibt kaum Untersuchungen über das Vorkommen und die Rolle von TRPC6 in exokrinen Drüsen wie der Glandula submandibularis und der Glandula lacrimalis. Diese Arbeit ist somit von Bedeutung und trägt zur zukünftigen Erforschung von TRPC6 bei.

3.5. Das untersuchte Gewebe: Glandula submandibularis und Glandula lacrimalis

3.5.1 Was ist eine Drüse?

Unter einer Drüse, lateinisch Glandula, versteht man Epithelzellverbände oder Einzelzellen von Tieren oder Pflanzen, die eine Substanz synthetisiert, die dann in den Extrazellulärraum ausgeschieden wird. Zunächst wird die strukturelle Organisation der verschiedenen sekretorischen Drüseneinheiten, auch Endstücke genannt, sowie ihrer

Flüssigkeitstransportsysteme, die Ausführungsgänge, erläutert. Die Drüsen enden in Endstücken, ein Verband sezernierender Zellen. In ihrem Lumen finden die eigentliche Bildung und Freisetzung von Sekreten statt.

Die freigesetzte Substanz kann eine Rolle in der interzellulären Kommunikation spielen, wie z.B. Hormone, die von der Drüse in den Extrazellulärraum des umgebenden Bindegewebes abgegeben werden und somit in den Blutkreislauf gelangen: Man spricht dann von einer endokrinen Drüse. Von den Endstücken aus kann das Sekret auch über Ausführungsgänge oder direkt verbunden zur Oberfläche gelangen und über diesen Weg abtransportiert werden, z. B. über die Haut, den Verdauungstrakt oder die Atemwege: Das sind exokrinen Drüsen. Diese geben ihr Sekret über einen Ausführungsgang ab, was sie von den endokrinen Drüsen unterscheidet, die ihr Sekret direkt über die Blutkapillaren in den Blutkreislauf abgeben (Lüllmann-Rauch, 2015).

Die Einteilung der exokrinen Drüsen erfolgt nach:

- der Art der Sekretion: die merokrine Sekretion (die Substanz ist in intrazellulären Vesikeln eingeschlossen, die ihren Inhalt zum Zeitpunkt der eigentlichen Sekretion durch Diffusion oder Exozytose freisetzen), die holokrine Sekretion (die vollständig mit Substanz beladene Zelle löst sich vom Epithel und zerfällt zum Zeitpunkt der Sekretion; nur bei Talgdrüsen), die apokrine Sekretion (ein Teil der mit Sekret beladenen Zelle zerfällt und schließt sich dem Ausführungsgang an) oder die ekkrine Sekretion (Einzelne Moleküle und Ionen werden transportiert, und in der Regel folgt das Wasser diesem Transport aufgrund von osmotischem Druck),
- der Lage: intra- oder extraepithelial,
- der Form der Endstücke: azinös (beerenförmig), alveolär (blasenförmig), tubulös (schlauchförmig) und Kombinationen dieser Formen,
- der Struktur der Drüse: einfach (nur einen Ausführungsgang) oder zusammengesetzt (baumartig verzweigtes Ausführungsgangsystem),
- der Art des Sekrets: serös oder mukös.

In jedem Teil des Körpers ist die Struktur der Drüsen unterschiedlich angeordnet, um spezifische Aufgaben zu erfüllen. Im Folgenden werden die beiden in dieser Arbeit untersuchten Drüsen hinsichtlich ihrer gemeinsamen und unterschiedlichen Architektur beschrieben.

3.5.2 Die Kopfspeicheldrüsen am Beispiel der Glandula submandibularis: Struktur, Bedeutung und Physiologie

3.5.2.1 Makro- und mikroskopische Anatomie der Speicheldrüsen

Die größten Speicheldrüsen, bekannt als Hauptspeicheldrüsen, sind verantwortlich für den Großteil des menschlichen Speichels. Es gibt drei Hauptspeicheldrüsen: die Glandula parotis (Ohrspeicheldrüse), die Glandula sublingualis (Unterzungenspeicheldrüse) und die Glandula submandibularis (Unterkieferspeicheldrüse). Dazu zählen noch kleine Speicheldrüsen, die sich im gesamten oberen Aerodigestivtrakt befinden, insbesondere im Bereich der Zunge, der Lippen, der Wangen und des Gaumens. Alle Speicheldrüsen sind identisch aufgebaut. Sie sind zusammengesetzte Drüsen mit einem Ausführungsgangsystem und bestehen aus einem Parenchym, der durch Bindegewebssepten ausgehend der Kapsel in Lappen und Läppchen unterteilt ist. Außerdem besitzen die Drüsen sekretorische Endstücke und ein System von Ausführungsgängen mit spezialisierten Abschnitten, die das Sekret weiter modifizieren können.

Bei den großen Speicheldrüsen unterscheidet man je nach Art des Sekrets zwischen serösen, mukösen und gemischten Drüsen. Die serösen Drüsen sezernieren ein dünnflüssiges, proteinreiches Sekret. Sie besitzen meist azinöse Endstücke. Als Beispiel sei die Gl. parotis genannt. Die Zellen in diesen Drüsen sind basal mit einer großen Menge an rauem endoplasmatischem Retikulum ausgestattet, was unter dem Mikroskop als basophile Anfärbung erkennbar ist. Apikal der Zellen befinden sich Sekretgranula, die sich bei Färbung eosinophil abheben. Die mukösen Drüsen produzieren ein viskoses und mucinreiches Sekret und haben größtenteilstubuläre Endstücke. Ein Beispiel hierfür ist die Unterzungenspeicheldrüse (Gl. sublingualis). In histologischen Färbungen erscheint das Zytoplasma von mukösen Drüsenzellen normalerweise blass und hat eine wolkige Erscheinung. Die Zellkerne sind oft flach und befinden sich nahe der Basis der Zelle. Seromuköse Drüsen produzieren ein dünnflüssiges Sekret, das sowohl mucin- als auch enzymreich ist. Sie sind sogenannte gemischte Drüsen, da sie überwiegend tubuloazinöse Endstücke besitzen, wobei beide Arten von Endstücken sowohl separat als auch in direkter Kombination auftreten können. In diesem Fall weisen die Tubuli eine kappenartige Struktur auf, die als seröser Ebnerscher-Halbmond bezeichnet wird. Ein Beispiel hierfür ist die Unterkieferspeicheldrüse (Gl. submandibularis) (Lüllmann-Rauch, 2015).

In den Speicheldrüsen sowie in der Tränendrüse kommen noch Myoepithelzellen vor: Dies sind kontraktionsfähige Epithelzellen, die dazu dienen, das Sekret aus dem Endstück und dem Anfangsabschnitt des Ausführungsgangsystems zu verdrängen. Es handelt sich um dünne oder sternförmige, verzweigte Zellen, die basal an die

sekretorischen Endstückzellen und an das sich anschließende Ausführungsgang-Epithel anliegen (Lüllmann-Rauch, 2015).

Die Drainage der serösen Endstücke geschieht über eine definierte Reihenfolge von Gangabschnitten im Drüsenbaum. Zunächst gelangt das Sekret in den ersten Abschnitt, die Schaltstücke, die aus einem einschichtigen, flachen oder kubischen Epithel und einem großen Lumen bestehen und somit die dünnsten Segmente darstellen. Danach fließt das Sekret in die Streifen, die aus einem ebenfalls einschichtigen, aber zylindrischen Epithel bestehen. Diese beiden Abschnitte sind für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Das Sekret fließt anschließend in die interlobulären Gänge und weiter in die Hauptausführungsgänge (Lüllmann-Rauch, 2015).

3.5.2.2 Die Anatomie der Glandula submandibularis

Die Glandula submandibularis gehört zu den Speicheldrüsen. Es gibt zwei Unterkieferdrüsen, die hinter dem Unterkiefer direkt unter dem Kinn und der Zunge auf jeder Gesichtsseite im Trigonum submandibulare liegen. Dieses Dreieck ist von den Bäuchen des Musculus digastricus und dem unteren Rand des Unterkiefers gebildet und erstreckt sich nach oben tief in den Unterkiefer hinein. Die Drüse liegt unterhalb des Musculus mylohyoideus. Durch ihre ziemlich oberflächliche Lage ist sie gut unter dem Unterkieferrand palpierbar und vereinfacht die klinische Diagnose von Tumoren. Ihr Ausführungsgang ist der Ductus submandibularis, der in die Caruncula sublingualis unter der Zunge mündet. Die Glandula submandibularis ist wie oben genannt eine gemischte Speicheldrüse vom seromukösen Typ mit tubuloazinöser Drüsenarchitektur. Sie besteht hauptsächlich aus serösen Regionen aus Azini, Schalt- und Streifenstücke, neben denen sich muköse Regionen mit serösen Halbmonden befinden. Auch eine Darstellung eines Typen von pathologischer Veränderung der Glandula submandibularis, und zwar bösartige Tumoren, werden in dieser Arbeit besprochen und in Folge beschrieben.

3.5.2.3 Funktion und Bedeutung der Speicheldrüsen

Die Glandula submandibularis produziert im Ruhezustand den größten Teil des Speichels, während die Glandula parotis bei Stimulation den größten Teil des Speichels erzeugt. Speichel ist eine Mischung aus Wasser, Elektrolyte, Proteinen, Muzine und antibakterieller Stoffe, die eine sehr wichtige Rolle bei der Erhaltung der Mundgesundheit spielt. Ein Verlust der Speichelfunktion kann zu Mundtrockenheit (Xerostomie) führen, die eine Reihe negativer Folgen mit sich bringt, wie spontane Infektionen in der Mundhöhle, Behinderungen beim Essen und Schlucken fester Nahrung, Schädigungen der Mundschleimhaut und Sprachprobleme. Die Speicheldrüsen spielen eine wichtige Rolle bei der Verdauung, da sie Speichel produzieren und diesen über die

Ausführungsgänge in die Mundhöhle abgeben. Er enthält nämlich ein Enzym namens Ptyalins, eine α -Amylase, das dem Magen hilft, die Stärke aus der Nahrung leichter aufzuspalten (Rassow et al., 2016). Der Speichel hilft, die Nahrung anzufeuchten, damit wir sie leichter schlucken können. Auch für die Gesundheit des Mundes ist der Speichel von großer Bedeutung. Er beugt Infektionen im Mund- und Rachenraum vor durch Wirkstoffe der angeborenen (Lysozym, β -Defensin) und adaptiven Immunität (IgA-Antikörper), hilft Zahnbelag unter Kontrolle zu halten durch Proteasen (Rassow et al., 2016), remineralisiert die Zahnhartsubstanz, neutralisiert den niedrigen pH-Wert der Mundhöhle nach den Mahlzeiten und beugt somit Karies vor. Ferner sind Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor, EGF) im Speichel enthalten, die die rasche Heilung von Wunden in der Mundhöhle unterstützen. Außerdem befeuchtet der Speichel die Mundhöhle, was das Sprechen und Schlucken erleichtern (Lüllmann-Rauch, 2015). Die gesamte tägliche Speichelproduktion beträgt 1 bis 1,5 Liter (Farooq & Bugshan, 2021).

3.5.2.4 Physiologie der Speichelproduktion

Die Produktion von Speichel in den Speicheldrüsen wird ausgelöst, wenn bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche der Azinuszellen der Endstücke durch Neurotransmitter aktiviert werden (Ambudkar, 2000, 2014). Dies geschieht durch muskarinische cholinerge (M1 und M3) und α -adrenerge Rezeptoren (α 1A) (Ambudkar, 2014). Dies führt zur Aktivierung von PLC, die dann PIP_2 abbaut. Dadurch IP_3 , welches wiederum die Freisetzung von Calcium aus den Speichern des ER auslöst und zu einem Anstieg des Calciums im Zellinneren ($[Ca^{2+}]_i$) vermittelt (Ambudkar, 2000, 2014). Der Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ reguliert verschiedene Ionenkanäle und Ionentransporter, die für den Aufbau eines osmotischen Gradienten notwendig sind, der den Wasserabfluss über Aquaporin-Wasserkanäle (AQPs) in der apikalen Membran fördert. Darunter gehören Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle, den $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Co-Transporter in der basolateralen Membran und den Ca^{2+} -aktivierten Chloridkanal in der luminalen Membran. Diese Transporter sind an der Flüssigkeitssekretion beteiligt. Der SOCE-Mechanismus, der als Reaktion auf die Erschöpfung des ER- Ca^{2+} reguliert wird, bestimmt den anhaltenden Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$, der für eine anhaltende Flüssigkeitssekretion erforderlich ist. Schlüsselkomponenten des SOCE in den azinösen Zellen der Speicheldrüse sind Mitglieder der TRPC-Familie, sowie Orai1 und STIM1. Insbesondere ist TRPC1 ein wichtiger und nicht verzichtbarer Baustein des SOCE und der Flüssigkeitssekretion in den azinösen und duktaalen Zellen der Speicheldrüse. Sonstige TRP-Kanäle, die am Speichelfluss beteiligt sind, sind TRPC3 und TRPV4 (X. Liu et al., 2018). Ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ ist für die Regulierung der Speicheldrüsenfunktion erforderlich, wobei eine Störung der Calcium-Homöostase entweder in ruhenden oder stimulierten Zellen zu Funktionsstörungen der Speicheldrüse

führt (X. Liu et al., 2018). Die Übertragung von Ca^{2+} -Signalen sowie die Kontrolle der Flüssigkeitsausscheidung in den Azinuszellen der Speicheldrüse werden in der **Abbildung 5** im Überblick dargestellt. Jedoch wurde bisher die Funktion des Subtyps TRPC6 in den Speicheldrüsen, insbesondere bei der Speichelproduktion, noch kaum erforscht.

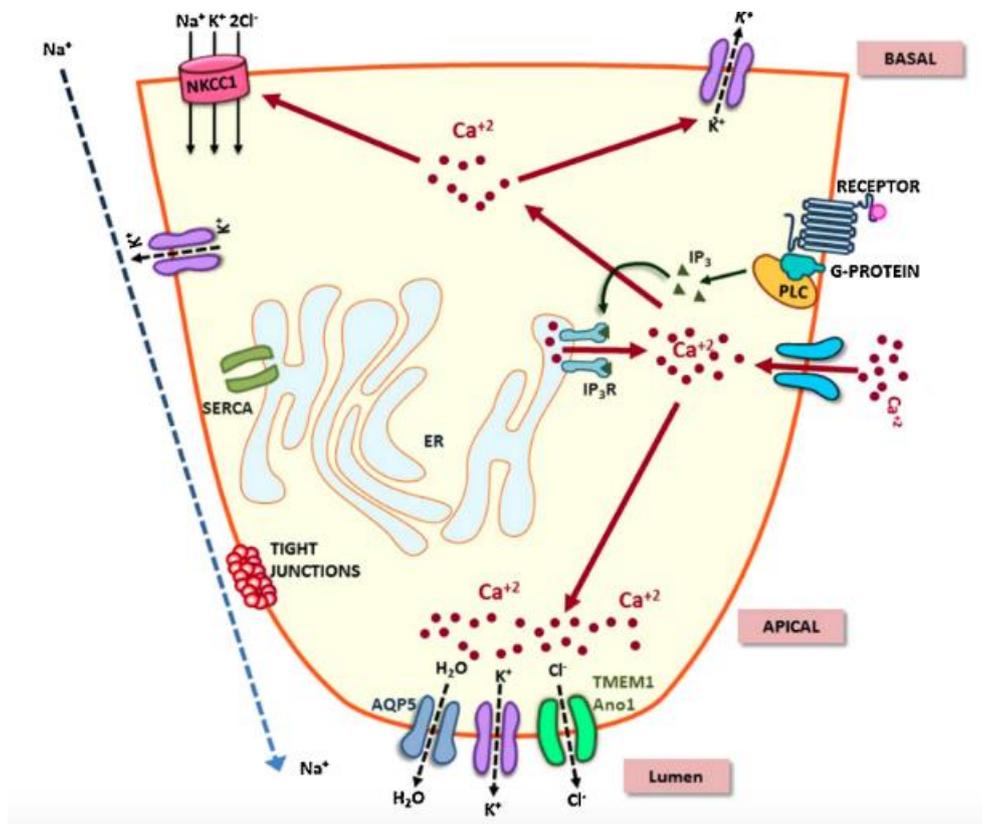


Abbildung 5: Ca^{2+} -Signaltransduktion und Steuerung der Flüssigkeitsausscheidung in Speicheldrüsenzellen

Diese Abbildung zeigt die wesentlichen Signalwege und Bestandteile, die an der Regulation der gezielten Flüssigkeitsfreisetzung in den Azinuszellen der Speicheldrüse beteiligt sind. Sowohl der Anstieg des Calciumspiegels im Zytosol als Reaktion auf die Stimulation durch Neurotransmitter als auch die intrazelluläre Calciumfreisetzung und der Calciumeinstrom in die Zelle tragen zur Regulation des Ionentransports, zur Entstehung eines osmotischen Gradienten und zur Kontrolle des Wasserstroms über die apikale Zellmembran bei.

NKCC1 = Na-K-Cl Cotransport; IP_3 = Inositol-1,4,5-trisphosphat; PLC = Phospholipase C; IP_3R = IP_3 -Rezeptor; SERCA = Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase; ER = endoplasmatisches Retikulum; AQP5 = Aquaporin 5; TMEM1 = Transmembran Protein 1; Ano1 = Anoctamin 1, calcium activated chloride channel (Abbildung aus Ambudkar, 2014).

3.5.3 Eine weitere exokrine Drüse des Kopfes: die Glandula lacrimalis

Als Tränendrüse, Glandula lacrimalis, bezeichnet man die Drüse, welche in der Fossa glandulae lacrimalis des Os frontale über dem seitlichen Augenlidwinkel liegt. Sie wird

durch die Sehne des Musculus levator palpebrae superioris in eine Pars palpebralis und eine Pars orbitalis unterteilt. Sie ist in Läppchen unterteilt und führt ihr Sekret in etwa 10 Ausführungsgängen in den oberen Fornix conjunctivae und von dort weiter in die Tränenwege. Diese Drüse besteht aus rein seröse tubulo-alveoläre oder sogar -azinöse Endstücke mit weitem Lumen, die den Endstücken von serösen Mundspeicheldrüsen ähneln und aus mehreren Ausführungsgängen, die Ductuli excretorii. Sie besitzen ebenfalls, wie oben genannt, Myoepithelzellen (Lüllmann-Rauch, 2015).

Sie ist Bestandteil des Tränenapparats und ihre Endstücke sind somit für die Produktion der isotonen Tränenflüssigkeit verantwortlich, die für die Spülung und Desinfektion des Auges dient, da sie antimikrobielle Wirkstoffe (u.a. Defensine, Lactoferrine, Lysozme) und Wachstumsfaktoren (EGF) zur Wundheilung beinhaltet. Die Tränenflüssigkeit ist dreischichtig zusammengesetzt, wobei in den Endstücken der Glandula lacrimalis die mittlere, wässrige Schicht gebildet wird. Ohne Schalt- oder Streifenstücke ist das Ausführungsgangsystem einfach aufgebaut.

Neoplasien der Glandula lacrimalis wie Tränendrüsentumoren wurden in dieser Arbeit nicht bearbeitet, da diese sehr selten sind.

Die Funktion des TRPC6-Subtyps in der Glandula lacrimalis, insbesondere bei Tränenflüssigkeitsproduktion, ist bislang noch wenig bekannt.

3.6. Tumoren in der Glandula submandibularis

Tumoren der Speicheldrüsen stellen etwa fünf Prozent der Kopf- und Halstumore dar und können gut- oder bösartig sein. Der Großteil der Speicheldrüsentumoren ist benigne und wächst in der Glandula parotis (80 %). 15 % dagegen bilden sich in der Glandula submandibularis. Die häufigsten malignen Tumoren dieser Drüse waren das adenoidzystische Karzinom (41,6 %), gefolgt vom Mukoepidermoidkarzinom (25 %) und dem Karzinom ex pleomorphes Adenom (16,7 %) (Luksic et al., 2022). Das üblichste Symptom ist eine schmerzlose Schwellung, die durch eine Biopsie histopathologisch untersucht werden muss. Diagnostisch sinnvoll sind außerdem Bildgebungsverfahren wie die CT und die MRT. Im Falle eines malignen Tumors erfolgt die Therapie durch die Exzision oder Resektion und gegebenenfalls die Strahlentherapie. Die Prognose ist abhängig von dem TNM-Stadium des Tumors. In **Tabelle 2** wird eine Übersicht über das TNM-Staging der malignen Tumoren der Speicheldrüsen gegeben.

Stadium	Primärtumor	Regionäre Lymphknotenmetastase	Fernmetastase
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVa	T1 T2 T3	N2	M0
	T4a	N0 N1 N2	M0
IVb	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: Tumorstadien nach UICC-Kriterien

(Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie, 2021)

Zugriff am 26.07.23

Grundsätzlich steigt das Risiko einer Bösartigkeit mit sinkender Speicheldrüsengröße. Das heißt, je kleiner die Drüse, desto wahrscheinlicher ist der Tumor maligne.

Man kann die bösartige tumoröse Veränderung der Kopfspeicheldrüsen in mehreren Subtypen unterteilen: das Mukoepidermoidkarzinom (MEC), das adenoid-zystisches Karzinom (ACC), das Acinuszellkarzinom, das Adenokarzinom und Metastasen anderer maligner Tumoren im Kopf- und Gesichtsbereich. Die Subtypen von Relevanz in dieser Arbeit sind das adenoid-zystische Karzinom und das Mukoepidermoidkarzinom. Ihre Beschreibung ist Bestandteil der folgenden Kapitel.

3.6.1 ACC

Das adenoidzystische Karzinom (ACC) wurde zunächst von Billroth als „Zylindrom“ beschrieben. Erst später 1928 von Ewing als adenoid-zystisches Karzinom definiert. Es ist ein eher seltener bösartiger Tumor der kleinen und großen Speicheldrüsen, der weniger als 1 % aller bösartigen Erkrankungen im Kopf- und Halsbereich und 10 % aller Speicheldrüsenneoplasien ausmacht (Dutta et al., 2002), mit einer Prävalenz von 3/1.000.000 Fälle pro Jahr weltweit. Dennoch ist es der zweithäufigste bösartige Tumor der Speicheldrüsen. In der Glandula parotis ist es ungewöhnlich. In den submandibulären Speicheldrüsen und kleineren Speicheldrüsen des harten Gaumens,

sowie auf der Zunge, in den Nasennebenhöhlen, am Nasopharynx, am Kehlkopf, an den Tränendrüsen und am äußeren Gehörgang ist es dagegen häufig. Darüber hinaus kann ACC auch in den Sekretionsdrüsen anderer Gewebe auftreten. Dazu gehören die Luftröhre und die Bronchien, die Speiseröhre, die Brust, die Lunge, die Prostata und der Gebärmutterhals, die Tränendrüsen, die Bartholin-Drüsen und die Haut. Sowohl Frauen als auch Männer sind vor allem in der 4. bis 6. Lebensdekade betroffen (Singh et al., 2010). An allen Lokalisationen – mit Ausnahme der Lunge und der Bronchien – sind mehr Frauen als Männer von ACC betroffen (Li et al., 2012). Der typische Verlauf des ACCs ist gekennzeichnet durch eine langsame Wachstumsrate, eine geringe Wahrscheinlichkeit der Ausbreitung auf die regionalen Lymphknoten und ein hohes Potenzial für eine hämatogene Ausbreitung (Cantù, 2021). Das ACC ist trotz seines langsamen Wachstums ein lebensbedrohlicher bösartiger Tumor, denn das Rezidivrisiko ist hoch. Die Rate tumorbedingter Todesfälle binnen 30 Jahren nach der Erstbehandlung ist hoch (Fan et al., 2020). Andere Forscher behaupten, dass das ACC der Glandula submandibularis mit einer frühzeitigen regionären Metastasierung in die Halslymphknoten und einer maskierten Fernmetastasierung assoziiert ist, die mit einer raschen Progression und einer schlechten Prognose einhergeht (M. Zhou et al., 2022). Es besteht aus duktalem Zellen und modifizierten basalen myoepithelialen Zellen und weist mikroskopisch verschiedene Muster auf (Frierson et al., 2002). Die histologische Wachstumsmuster werden als kribriform (siebförmig), tubulär und solid klassifiziert, wobei letzteres mit einer schlechteren Prognose verbunden ist. Ein einzelner Tumor zeigt normalerweise eine Mischung dieser Muster (B. Zhou et al., 2022) (W. liang Chen et al., 2022).

3.6.2 MEC

Das häufigste Karzinom der Speicheldrüsen ist das Mukoepidermoidkarzinom. Es macht weniger als 10 % aller Speicheldrüsentumore aus, aber etwa 30 % aller bösartigen Tumore der Speicheldrüsen (Boahene et al., 2004). Er bildet sich am häufigsten in der Gl. parotis, aber auch in der Gl. submandibularis oder in einer kleinen Speicheldrüse des Gaumens. 1945 führte Stewart den Begriff "mucoepidermoid" ein, um einen spezifischen Speicheldrüsentumor zu definieren. Das Merkmal dieses Tumors ist eine vielfältige histologische Mischung aus epithelialen (epidermoide) und schleimproduzierenden (muköse) Zellen. Zusätzlich wurde noch ein dritter Zelltyp identifiziert, die sogenannten „intermediate cells“, die vermutlich in der Lage sind, sich in muköse oder epidermoide Zellen zu differenzieren. Aufgrund dieser zellulären Vielfalt schwanken die histologische Beschaffenheit und der klinische Verlauf von MEC. Stewart hat in seinem ursprünglichen Bericht gutartige und bösartige Varianten von mukoepidermoidalen Tumoren beschrieben. Dennoch haben spätere Metastasen einiger der zuvor als gutartig

eingestuften Tumoren dazu geführt, dass alle mukoepidermoidalen Tumoren als Karzinome betrachtet werden. Sie können rezidivieren, und können Metastasen in regionale Lymphknoten oder Fernmetastasen bilden (Foote & Frazell, o. J.; Stewart et al., 1945). Klinisch zeigt sich der Tumor als eine langsam wachsende, indolente Schwellung.

3.7. Ziel der Arbeit

Zentrales Ziel der vorliegenden Dissertation war der immunhistochemische Expressionsnachweis von TRPC6-Kanälen in humanen, gesunden Glandulae submandibulares und Glandulae lacrimales sowie in Tumoren der Glandula submandibularis. Zu diesem Zweck wurden Drüsengewebe von physiologischen Glandulae submandibulares und lacrimales von sieben Körperspendern und tumoröse Veränderungen der Glandula submandibularis im Sinne von adenoid-zystischem Karzinom (ACC) und Mukoepidermoidkarzinom (MEC) von sechs Tumorpatienten untersucht. Die Ergebnisse wurden mittels immunhistochemischer Detektion unter Verwendung eines anti-TRPC6-Primärantikörpers und eines enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers ermittelt. Somit ergibt sich die Fragestellungen für meine Dissertation:

- 1) Ist TRPC6 in gesundem menschlichem Drüsengewebe der Glandula submandibularis und Glandula lacrimalis mittels immunhistochemischer Färbung nachweisbar?
- 2) Gibt es Unterschiede im Proteinnachweis zwischen histologischen Strukturen (z.B. Ausführungsgänge, Endstücke)?
- 3) Beeinflusst das Geschlecht den Nachweis von TRPC6 im Drüsengewebe?
- 4) Ist TRPC6 in humanen tumorösen Veränderungen der Glandula submandibularis wie ACC und MEC mittels immunhistochemischer Färbung nachweisbar?
- 5) Gibt es Unterschiede im Proteinnachweis zwischen histologischen Strukturen (z.B. Ausführungsgänge, Endstücke) und Tumorveränderungen (z.B. Zellkerne der Tumorzellen)?
- 6) Gibt es Unterschiede im Proteinnachweis zwischen gesundem und tumorösem Drüsengewebe?

III. Materialien und Methoden

4. Material

Zu den Materialien, die für die Bearbeitung von Proben benötigt werden, gehören eine Reihe von Geräten sowie Chemikalien, Lösungen, Antikörper und schließlich auch andere Verbrauchsmaterialien. Diese werden im Folgenden in separaten Kapiteln beschrieben. Ihre Verwendung wird in den folgenden Kapiteln behandelt.

4.1. Chemikalien und Lösungen

Chemikalien/Lösungen	Hersteller
2-Propanol 97 %	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Citratpuffer, Antigen Retrieval Buffer, pH6	Abcam (ab93678)
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Ethanol	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formalin-Fixierlösung nach Basler	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

Formol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Goat Serum Donor Herd	Sigma Aldrich, Zentr. ChL (Ref: G6767-500ML)
Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
ImmPACT, DAB EqV Substrate	Biozol Zentr. ChL (Ref.: SK-4103)
Kaninchenserum	Life Technologies AG, Carlsbad, USA (Ref.: A10547)
Methylbenzoat 99 %	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
NEP-Fixierlösung nach Weigner	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
NGS-Blockierlösung	Merck KGaA, Deutschland
Roti@fair 10x PBS Pulver 7,4	C. Roth, Zent. ChL. (Ref.: 1105.1)
TRPC6-Antigen Kontrollpeptid	Alomone Labs, Jerusalem, Israel (Ref.: BLP-CC017)
Wasserstoffperoxid 35 %	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland (Ref: 9683.4)
Xylol	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht der angewendeten Chemikalien und Lösungen

4.2. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Primärantikörper Anti-TRPC6- Antibody	Alomone Labs, Jerusalem, Israel (Ref.: ACC017)
Sekundärantikörper Anti-rabbit HRP	Invitrogen AG, Carlsbad, USA (Ref: A10547)

Tabelle 4: Übersicht der angewendeten Antikörper

4.3. Geräte / Laboraustattung

Geräte	Hersteller
Digitaler VWR INCU-Line IL 56 Inkubator	VWR International, Pennsylvania, USA
GFL Paraffinbad 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Karussell Gewebeeinbettter MTP	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlanlage für Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Kühlplatte MPS/C	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Labor-Abzugshaube Captair®Flex® M321	Erlab®group, Val-de-Reuil Cedex, Frankreich
Lichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2025	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Nikon ECLIPSE E200 LED-Fotomikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Paraffin Ausgießstation MPS/P1	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin-Dispenser	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
UHP Einkanalpipette 20 – 200µl / 100 – 1000µl	VWR International, Pennsylvania, USA
Vortexer-Vortex Mixer	Heathrow Scientific, Illinois, USA
VWR Heizplatte W10 für Histologie-Objekträger	Kunz Instruments, Sandelsgatan, Schweden
Wärme-/Trockenschrank VT6025	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht der angewendeten Geräte

4.4. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
ACU-Punch®Biopsie-Stanze 8/10mm	Acuderm inc., Fort Lauderdale, USA
Bovivet Einmalkanülen 14G 2,1x60mm	Kruuse, Langeskov, Dänemark
CELLSTAR®Tubes Zentrifugenröhrchen 15mL / 50mL	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
DakoPen Fettstift	Agilent, Santa Clara, USA (Ref.: S200230-2)
Deckgläser 22x22m / 24x50mm	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Discofix®Drei-Wege-Hahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland (Ref.: 4095111)
Einbettkassetten Macro, weiß	Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada (Ref.: M512)
Einbettringe	Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada (Ref.: M460)
Feuchte Kammer	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland (Ref.: 21049-B)
Filterpapiere	Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland (Ref.: 534018)
Histologischer Kleber Roti-Histokitt©	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen DB80	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Pipettenspitzen 20 – 200µl / 100 – 1000µl	VWR International, Pennsylvania, USA
PROLENE 1,0 Nahtmaterial	Ethicon US LLC, Cincinnati, USA
Reagiergefäße 1,5mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Roti® -Plast Paraffin-Pallets	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sterile Skalpellklingen Nr.22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Super Pap Pen Liquid Blocker Neu	Science Services GmbH, München, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R.Langensbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

Tabelle 6: Übersicht der angewendeten Verbrauchsmaterialien

5. Probenmaterial

Die menschliche exokrine Tränen- und Unterkieferdrüse stellen die untersuchten Gewebe dieser Dissertation dar. Diese wurden von Körperspendern des örtlichen anatomischen Instituts entnommen. Außerdem wurden noch Schnitte von malignen veränderten Glandulae submandibulares vom örtlichen pathologischen Institut erschaffen. Ziel dieses Kapitels ist eine detaillierte Auflistung und Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte in chronologischer Reihenfolge.

5.1. Ethikantrag

Für diese Forschungsarbeit wurde bei der Ständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eine ethische Stellungnahme beantragt. Zur Untersuchung von Ionenkanälen in Geweben von Körperspendern im Anatomischen Institut gilt die Identifikationsnummer 163/20. Zur Untersuchung von Gewebeproben aus Sektionen in der Pathologie lautet die Identifikationsnummer 130/21.

5.2. Prozess der Probenbearbeitung

Im Rahmen dieser Arbeit sind histologische Schnittpräparate angefertigt worden. Sie wurden nach einem festgelegten Schema hergestellt: Gewebeentnahme, Fixierung, Einbettung, Schneiden, Färbung, Eindeckung.

Alle oben genannte Arbeitsschritte (Gewebeentnahme, Gewebefixierung, Einbettung, Schneiden, Färben, Abdecken) wurden selbstständig durchgeführt. Nur die Fixierung der Körperspenden wurde nicht selbstständig durchgeführt. Die Gewebeentnahme, Fixierung, Einbettung und das Schneiden der Gewebeproben aus den Biopsien des Instituts für Pathologie wurden nicht eigenständig ausgeführt. Lediglich das Schneiden dieser Proben wurde nicht eigenständig durchgeführt, da dies die Verwendung eines Mikrotoms erforderte.

5.3. Körperspende

Rund 100 Körperspenden treffen jedes Jahr in der Prosektur des Anatomischen Instituts der Universitätsklinik in Homburg ein. Zu Lebzeiten haben sich alle Beteiligten mit dem Gedanken auseinandergesetzt, ihren Körper nach ihrem Tod der Wissenschaft zu spenden. Dies erfordert zunächst die Registrierung der potenziellen Körperspender auf der Spenderliste, die in der Regel einige Zeit vor dem Tod stattgefunden hat, als sich die Person in einem Zustand geistigen Wohlbefindens befand. Diese Registrierung der Betroffenen wird von dem Arbeiterteam um den Prosektor, Professor Thomas Tschernig, durchgeführt. Sobald der Tod eingetreten ist, wird der Spender von einem

Bestattungsunternehmen zu den Gebäuden der Prosektur gebracht, wo die Kühlanlagen aufgestellt sind. Jene sind auf etwa -6 °C abgekühlt und sollen dem Verwesungsprozess etwas entgegensetzen. Darüber hinaus werden durch die Kühlung optimale Voraussetzungen für eine mögliche Konservierung bzw. Fixierung geschaffen. Vor einer solchen Konservierung ist eine erneute medizinische Untersuchung des Verstorbenen zwingend erforderlich. Wenn keine Auffälligkeiten festgestellt werden, kann der nächste Schritt, die Fixierung, in die Wege geleitet werden. Hierfür ist es jedoch notwendig, zwischen den Zwecken zu unterscheiden, für die der Spender eingesetzt werden soll. Spender, die für den jährlichen Präparationskurs im dritten Semester des Medizinstudiums verwendet werden, müssen anders fixiert werden als Spender, die für einen Chirurkierkurs verwendet werden. Grundsätzlich werden in Homburg regelmäßig die Formalinfixierung und die NEP-Fixierung verwendet. In den Kapiteln 4.7 und 4.8 finden Sie weitere Informationen zu diesem Thema.

Die Spender werden nicht nur für vorbereitende und chirurgische Kurse, sondern auch für wissenschaftliche Arbeiten eingesetzt. Allein dies zeigt die Bedeutung und Relevanz der Körperspende für die ärztliche Lehre und Fortbildung, ebenso aber auch für die Forschung.

Deshalb bedanke ich mich herzlich bei den Spenderinnen und Spendern und ihren Familien und weiß es zu schätzen, dass sie Studierenden, Praktikerinnen und Praktikern sowie mich selbst eine solche Chance zur Aus- und Weiterbildung und zur wissenschaftlichen Arbeit geben.

5.4. Biopsie von Tumoren

Im Rahmen der Tumordiagnostik erfolgen oft Biopsien. Damit bezeichnet man die Entnahme und spätere histologische oder zytologische Analyse einer Probe unter chirurgischen Umständen. Eine Diagnose wird bei Verdacht auf Gewebeeränderungen mittels einer Pathohistologie der Biopsie bestätigt und bestimmt die weitere therapeutische Behandlung. Der Schwerpunkt dieser Dissertation lag auf der Untersuchung von bösartigen Tumoren der Glandula submandibularis allein, da solche bösartigen Veränderungen in der Glandula lacrimalis sehr selten sind. Pathologische Änderungen der Tränendrüse handeln sich eher um Entzündungsprozesse.

Die entnommenen Proben wurden nach Biopsie unmittelbar fixiert, indem die Proben in eine Formalinlösung eingelegt wurden, um Zersetzungen des Gewebes zu vermeiden. Die Proben verblieben nun 24 Stunden in der Fixierlösung und wurden so zum pathologischen Institut geschickt. Dort gehen sie dann den restlichen Probenverarbeitungsprozess wie üblich durch, das heißt Einbetten, Schneiden, Färben und Eindecken.

5.5. Übersicht über die in Anspruch genommenen Spender

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die eingesetzten Spender. Angegeben werden Geburtsjahr, Geschlecht, Todeszeitpunkt, Zeitpunkt des Eintreffens in der Prosektur, Zeitpunkt der Fixierung sowie die Mittel zur Fixierung (s. **Tabelle 7**).

Spender	Geburts-jahr	Tod	Ankunft	Fixierung	Fixier-lösung	Gesch-lecht	Gewe-be
Spender 1	1938	20.04.2021	20.04.2021	21.04.2021	NEP	M	SM + L
Spender 2	1937	27.04.2021	27.04.2021	28.04.2021	NEP	W	SM + L
Spender 3	1924	18.05.2021	18.05.2021	19.05.2021	NEP	W	SM + L
Spender 4	1940	04.06.2021	04.06.2021	07.06.2021	NEP	W	SM
Spender 5	1930	09.06.2021	09.06.2021	10.06.2021	NEP	M	SM
Spender 6	1940	10.06.2021	10.06.2021	14.06.2021	NEP	M	SM
Spender 7	1935	11.06.2021	14.06.2021	14.06.2021	NEP	M	L

Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der genutzten Spender des anatomischen Institutes

5.6. Übersicht über die in Anspruch genommenen Biopsien

Dieser Abschnitt bietet eine Übersicht der verwendeten Tumorbiopsien. Es werden Geburtsjahr, Geschlecht, der Alter bei der Entnahme, der Name des Tumors sowie Zeitpunkt der Biopsie und Mittel der Fixierung angegeben (siehe **Tabelle 8**).

Spender	Geburtsjahr	Datum der Biopsie	Alter bei Entnahme	Fixierlösung	Geschlecht	Tumor
Spender A	1959	08/2012	53 J	4 %iges gepuffertes Formalin	M	ACC
Spender B	1941	05/2016	75 J		M	ACC
Spender C	1935	08/2012	77 J		W	ACC
Spender D	1957	03/2018	61 J		M	ACC
Spender E	1961	03/2019	58 J		M	ACC
Spender F	1948	11/2013	65 J		M	MEC

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der genutzten Spender des pathologischen Institutes

5.7. NEP-Fixierung

Um einen histologischen Schnitt zu erzeugen, sollten die bei der Entnahme des Gewebes eintretende Sauerstoffversorgungsunterbrechung und Zelltod möglichst verzögern, damit es nicht zu morphologischen Veränderungen wie Nekrosen kommen kann. Somit kann man ein Bild der lebendigen Zellen mit ihren Strukturen und Zellkomponenten anschaffen. Dies erfolgt durch die Fixierung des Gewebes. Es handelt sich um eine Stabilisierung des Gewebes mittels Fixierlösungen. Im anatomischen Institut werden die Injektionsfixierung und die Immersionsfixierung durchgeführt.

Bei der Konservierung von Körperspendern im Anatomischen Institut des Universitätsklinikums Homburg gibt es ein fest vorgegebenes Protokoll, das weiter unten genauer beschrieben wird. Nachdem die Körperspender komplett ausgekleidet wurden, was auch für die letzte Untersuchung des Körpers vorgeschrieben ist, werden sie gewogen. Im Anschluss werden sämtliche am Körper des Spenders befindlichen, bspw. Pflaster, Schmuck usw. oder in diesen eingeführten (z. B. Ernährungssonde) Objekte entnommen. Außerdem werden die Kopf- und Körperhaare rasiert, bevor dem Spender sogenannte Journalnummern (JNR) zugeteilt werden: hierbei geht es um eine Vierzahlenkombination, mit der die Identität des Spenders dauerhaft festgestellt werden kann. Die Journalnummern sind an beiden Ohren, an beiden Zeigefingern und an beiden großen Zehen zu finden. Nach den Vorbereitungs- und Identifikationsmaßnahmen beginnt nun der Prozess der Fixierung. Zu diesem Zweck wird die rechte Oberschenkelarterie (A.femoralis) im mittleren und medialen Teil des Oberschenkels erkundet und nach Aufschneiden der Haut mittels eines Skalpells freigelegt. Durch einen vertikalen, in Strömungsrichtung verlaufenden Einschnitt wird das Gefäß eröffnet und mit zwei Venenverweilkanülen mit Knopfspitze kanüliert, die über einen zwischengeschalteten Dreiwegehahn an ein Schlauchsystem geschraubt werden. Die Kanülierung verläuft sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung. Damit die Verweilkanülen nicht verrutschen, werden diese mit Arterienklemmen befestigt. Durch das Schlauchsystem wird die Fixierlösung geleitet, die in einem Behälter gelagert wird. Ermöglicht wird dies durch eine Pumpe, die sich im Behälter befindet. Zu diesem Zweck erzeugt die Pumpe Drücke zwischen 1 und 2 bar, mit denen die NEP-Lösung in das Gefäßsystem gedrängt wird. Gewisse Bereiche können auf diese Weise nicht oder nur insuffizient erzielt werden und müssen separat mit einer 18G-Einmalkanüle nachfixiert werden, indem die entsprechende Region injiziert wird. Dabei wird die Region mittels der Kanüle bestochen und die Fixierlösung in das Gewebe injiziert, wo sich diese dann ausbreiten kann. Zu den betroffenen Regionen gehören die gesamten Extremitäten, die Nuchalregion, die Glutealregion sowie die Finger- und Zehenglieder. Weil die Fixierlösung bei diesem Prozess in den Körperspender injiziert wird, nennt man dies auch interne Konservierung oder Infusionsfixierung. Bei dieser werden etwa 10 bis 15 L Fixierlösung pro Spender benötigt. Die Menge der Infusionslösung wird dokumentiert. Auf die interne Konservierung schließt sich die sogenannte externe Konservierung, auch Immersionsfixierung genannt, an. Bei der NEP-Fixierung kommt der Körperspender in einen großen Behälter mit einer Mischung aus 3 %igem Formalin und NEP-Lösung und wird somit vollständig in die Fixierlösung eingelegt. Darin verbleibt er für einige Tage bis zu maximal drei Monaten, bis er für die Kurse bereitgestellt wird. Sobald alles

dokumentiert und alle verwendeten Werkzeuge gesäubert sind, ist die NEP-Konservierung beendet.

Die Konservierungen in NEP dieser Arbeit wurden durch das erfahrene Personal des anatomischen Instituts durchgeführt. Ich durfte ebenfalls einmal bei diesem Prozess zuschauen.

5.8. Formalinfixierung

Formalin ist ein sehr verbreitete Fixierlösung und dient neben der Stabilisierung des Gewebes noch zu seiner Haltbarkeit. Die Aufbewahrungszeit der Gewebe wird somit verlängert und der durch die Fixierung erreichte Zustand bleibt erhalten. Auf diese Weise fixierte Spender werden unter anderem in den Präparierkursen für Studenten verwendet. Gegenüber der NEP-Fixierung sind die Organsysteme hier gehärtet, die Morphologie und die Farbe sind so verändert, dass es einen kleinen, diskreten Unterschied zum Normalzustand gibt. Auch bei der Fixierungsmethode gibt es leichte, aber signifikante Unterschiede. Die beschriebene Konservierung folgt ebenfalls einem Protokoll, das fast identisch mit dem der CIP-Fixierung ist, was im Folgenden beschrieben wird.

Die Methoden und Merkmale der Vorbereitung sind die gleichen wie bei den zuvor erläuterten Protokollen. Erster Unterschied ist die verwendete Lösung, die über die Oberschenkelarterie perfundiert wird. Hier dient die Basler Lösung nach Kurz als Fixierlösung zur internen Konservierung. Zur externen Konservierung muss der Spender lediglich für mindestens vier Monate in eine 3 %ige Formalinlösung gelegt werden. Danach werden die Spender in hermetisch verschlossenen Phoropack-Sarg (Foliensarg) bei einer Temperatur von etwa 14 °C in sogenannten Thalheimer Kühlkammern gelagert, die alle drei Monate zur Auswertung geöffnet werden und so längere Lagerzeiten ermöglichen. Auf diese Weise können fortschreitender Verfall und andere Veränderungen möglichst frühzeitig erkannt und entsprechende Maßnahmen ergriffen werden. Die Verwendung anderer Lösungen für die interne und externe Konservierung sowie die Aufbewahrungszeit bilden daher die Hauptunterschiede im Vergleich zu der NEP-Fixierung.

Die Konservierungen in Formalin dieser Arbeit wurden durch das erfahrene Personal des pathologischen Instituts durchgeführt.

5.9. Probenauswahl

In dieser Arbeit wurden physiologische Gewebeproben menschlicher exokriner Drüsen von einzelnen Leichenspendern verwendet. Als Erstes wurde eine Auswahl von Drüsen getroffen. Es wurden die Drüsen Glandula submandibularis und Glandula lacrimalis

ausgewählt. Die Glandula submandibularis hatte den Vorteil, dass sie leicht zugänglich ist, da sie relativ oberflächlich am Unterkieferrand liegt.

Es handelt sich um eine Speicheldrüse, die man dann zu einer anderen Art von exokriner Drüse gut vergleichen könnte, wie die Glandula lacrimalis. Diese war jedoch schwieriger zu finden, da sie viel kleiner ist und ihr Zugang ist durch das obere Augenlid teilweise erschwert, da bei einigen Körperspender die Hornhaut entfernt und dementsprechend die Augen zugenäht wurden.

Die Entnahmestelle an der Glandula submandibularis wurde so ausgesucht, dass der Unterkieferrand palpiert und entlang dieses Randes eingeschnitten wurde. Zur Entnahme der Glandula lacrimalis wird ein Zugang in die Innenseite des Oberlides geschnitten.

Darüber hinaus wurden sechs Spender für diese Arbeit ausgewählt, lebende Patienten, bei denen im Rahmen der Tumordiagnostik Biopsien durchgeführt wurden und wovon wir Schnitte erhalten haben. Es handeln sich um fünf adenoid-zystische Karzinome (ACC) und einen Mukoepidermoidkarzinom (MEC) der Glandula submandibularis.

Wie die Probegewinnung durchgeführt wird, ist im nächsten Kapitel beschrieben und wird dort näher erläutert.

Es ist darauf hinzuweisen, dass der große Unterschied zwischen den Proben des pathologischen Instituts und denen des anatomischen Instituts, abgesehen von der Art der Proben hinsichtlich ihrer Pathologie, in der Fixierung besteht. Die Proben der Anatomie wurden alle in NEP fixiert, während die Proben der Pathologie alle in Formalin fixiert wurden. Dies kann zu unterschiedlichen Reaktionen mit primären und sekundären Antikörpern führen. Aus diesem Grund ist es schwierig, eine genaue Korrelation zwischen den Ergebnissen in Bezug auf die Färbung zwischen den physiologischen und den pathologischen Proben herzustellen.

6. Methode

6.1. Bearbeitung der Proben

6.1.1. Gewinnung der Proben

Die bereits im vorigen Kapitel erwähnte Entnahme von Glandulae submandibularis und lacrimalis wurden selbstständig durchgeführt. Die Biopsie der Tumoren erfolgte unabhängig von dieser Arbeit operativ, also nicht selbstständig.

Herr Prof. Dr. M. Wagner, Facharzt für Pathologie im pathologischen Institut des Universtitätsklinikum des Saarlandes, hat mir freundlicherweise im Rahmen dieser Arbeit sechs Schnitte von Tumoren der Glandula submandibularis zur Verfügung gestellt, mit Erlaubnis von Prof. Dr. M. Linxweiler, leitender Oberarzt der örtlichen Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Alle Arbeitsschritte bis zur Färbung, das heißt die Gewebeentnahme, ihre Fixierung, Einbettung und das Schneiden wurden nicht eigenständig durchgeführt.

Die übrigen, physiologischen Proben wurden selbstständig von fixierten Spendern entnommen, wie bereits einleitend beschrieben. Zu diesem Zweck wurde mittels eines Skalpell eine Inzision an der beschriebenen Stelle, die den zu untersuchenden Drüsen zeigt, vorgenommen und die Drüsen vollständig an der letzten definierten Stelle entnommen. Die Dicke der Drüsen war unterschiedlich, da die Drüsen von Spender zu Spender geringfügig unterschiedlich sind. Auf diese Weise wurden die Drüsen geteilt, so dass drei Biopsien pro Drüse entnommen wurden, wobei zwei Biopsien als Sicherheitsprobe diente. Bei der Entnahme der Glandula lacrimalis war dies aufgrund ihrer Größe nicht möglich. Sie wurde daher immer beidseitig als Ganzes entnommen. Somit diente die Hälfte der Proben als Sicherheitsproben. Letztendlich standen pro Spender fünf Proben zur Verfügung. Diese wurden abschließend, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, weiterverarbeitet.

Nach der Entnahme wurden die Proben in voretikettierte Einschlusskassetten gegeben. Der Spender, von dem die Probe stammt, und die Drüsenprobe, um die es sich handelt, müssen jederzeit anhand der Kennzeichnung identifiziert werden können.

Die Einbettkassetten, in denen sich die Proben befanden, wurden nun wieder in einen Eimer mit einer 3,5-3,7 %igen Formalinlösung transferiert und in einem Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Proben wurden über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Kassetten in eine reine PBS-Lösung (PBS, Phosphat buffered saline) überführt, in der sie für mindestens weitere 24 Stunden blieben, ebenfalls im Kühlschrank. Die

Formalinlösung diente der Konservierung der Proben. PBS wurde zum Wässern und Waschen verwendet.

Die Proben wurden nun für die anschließende Einbettung bereitgestellt. Dazu wurden die Kassetten aus der PBS-Lösung genommen und in einen Behälter gelegt. Dieser wurde 3 stundenlang unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden die Kassetten für weitere 3 Stunden in eine 70%ige 2-Propanol-Lösung getaucht, gefolgt von der eigentlichen Paraffinwachseinbettung. Dieser Vorgang ist Gegenstand des nächsten Kapitels und wird dort diskutiert.

6.1.2. Paraffinwachseinbettung nach Formalinfixierung

Damit das fixierte Gewebe in einem Zustand ist, der mikrofeine Schnitte ermöglicht, muss es dem Einbettungsverfahren unterzogen werden. Dies erfolgt durch eine Fixierflüssigkeit, in dieser Arbeit durch Paraffin. Diese füllt die Hohlräume und ersetzt die das Gewebe imprägnierende Flüssigkeit.

Die gewässerte und in 70 %ige 2-Propanol-Lösung eingelegte Proben waren bereit für die Einbettung in Paraffin.

Die Einbettung der Proben erfolgte in einem Karussell, einen sogenannten Einbettungsautomaten. Dieser Automat war vom Typ ein Gewebe-Transfer-Prozessor, in dem sich mit Lösungen gefüllte Gefäße im Kreis angeordnet befanden. Die Kassetten wurden dabei in einen großen Korb gelegt und in den verschiedenen Lösungen dem Programm entsprechend über 17 Stunden 40 Minuten über Nacht, nach einem bestimmten Schema (s. Abbildung) eingetunkt. Die Proben verblieben erstmal 3 Stunden in 70 %iger 2-Propanol, anschließend jeweils 1,5 Stunden in 1 x 80 %iger-, 1 x 90 %iger- und 2 x 100 %iger 2-Propanol. Diese aufsteigende Alkoholreihe dient der Entwässerung bei Körpertemperatur (37 °C) der Proben, also das Verdrängen von Wasser aus dem Gewebe. Formalin ist nämlich hydrophil und Paraffin hydrophob. Dann gingen sie über in 3 x Methylbenzoat für jeweils 1,5 Stunden, als Intermedium zwischen Alkohol und Paraffin. Dann wurden die Proben zur Infiltration in Paraffin für 2 x 2 Stunden eingetaucht bei 60 °C, über dem Schmelzpunkt des Paraffins.

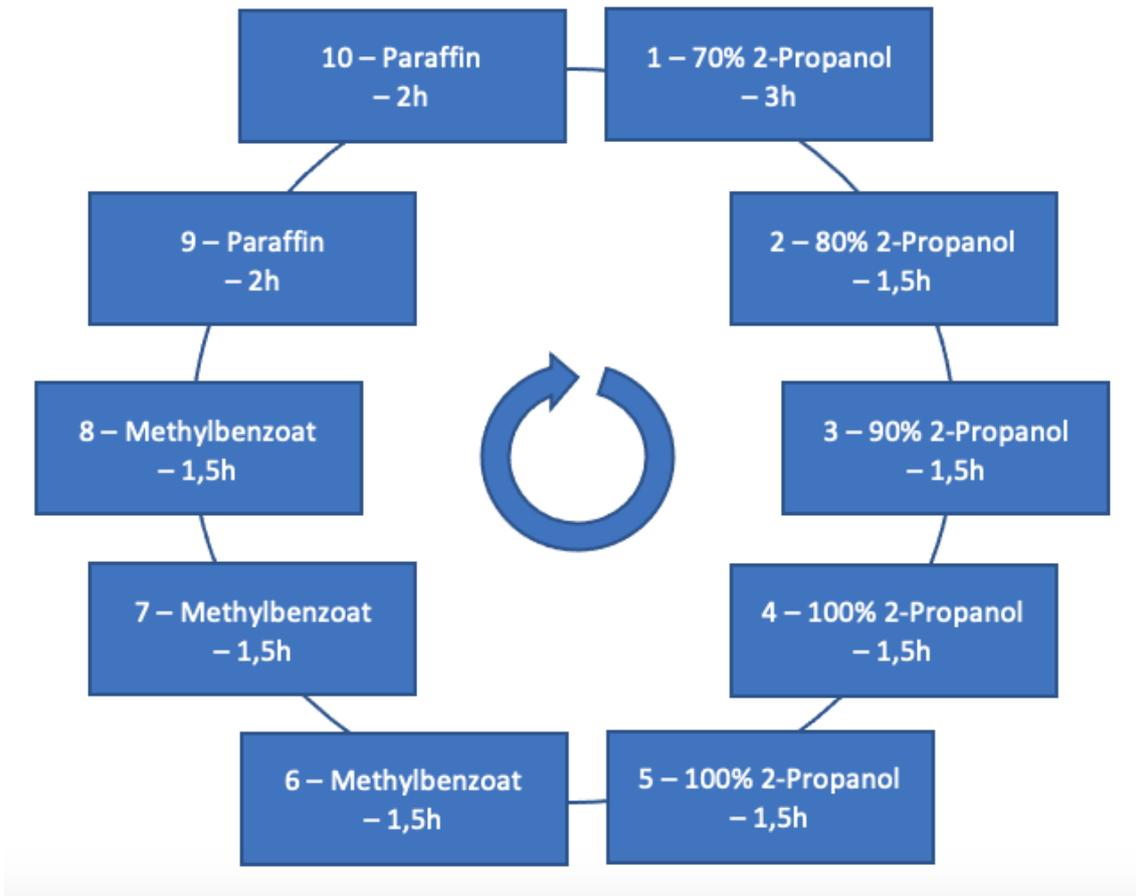


Abbildung 6: Übersicht der Stationen im Gewebeeinbettautomaten

Nach Abschluss des Prozesses über Nacht wurden die Proben am nächsten Morgen weiterverarbeitet. Das Ausgießgerät musste dann rechtzeitig angeschaltet werden, damit sich sein Paraffinreservoir erwärmt und das Paraffin seinen Schmelzpunkt erreichen kann und somit flüssig wurde. Die Kühlplatte (-10 °C) sowie die Wärmeplatte (51 °C) und der Paraffinspender sollten auch angeschaltet werden. Die Proben befanden sich noch in den Kassetten in flüssigem Paraffin. Sie wurden im Korb belassen und in einem neuen Gefäß mit flüssigem Paraffin eingelegt. Zum Einbetten bzw. Ausgießen in Paraffinblöcke verwendet man Paraffin mit hohem Schmelzpunkt, bei 60 °C. Der Boden des Ausgießschälchens wurde bereits mit einer geringen Menge an Paraffin bedeckt. Die Kassette wurde geöffnet, das Gewebe wurde einzeln mit einer Pinzette entnommen und auf dem Boden des Ausgießschälchens gelegt und richtig ausgerichtet. Es ergab sich dann eine wechselnde Reihenfolge zwischen Gießen und Härten. Das Paraffin wurde dann nach und nach auf das Gewebe mittels Paraffinspender ausgegossen, inzwischen jedes Mal auf die Kühlplatte gelegt, damit das Gewebe in seiner gewünschten Position stabilisiert werden konnte. Der mit Journalnummer und Gewebename beschriftete Kassettenboden wurde auf dem Schälchen gesetzt und

haftete durch Erstarren des Paraffins. Anschließend verblieben die fertig ausgegossenen Blöcke auf der Kühlplatte zur weiteren vollständigen Aushärtung. Das Ausgießschälchen konnte durch leichten Zug vom Block entfernt werden. Die Blöcke stehen dann bereit zum Schneiden. Sie wurden dann im Kühlschrank gelagert, um den nächsten Schritt des Schneidens am Mikrotom zu vereinfachen.

6.1.3. Paraffinschnitte mit dem Mikrotom

Um mikroskopische Präparate am Mikroskop beobachten zu können, musste man sehr dünne Schnitte der Gewebelöcke herstellen. Für unsere Lichtmikroskopie reichten Schnitte von 7 μm . Diese Schnitte ermöglicht uns das Mikrotom, ein Gerät, was die Paraffinlöcke manuell in μm schneiden kann.

Vor dem Schneiden erfolgt eine Vorbereitung des Arbeitsplatzes: das Befüllen mit destilliertem Wasser und Anschaltung eines Wasserbades. Seine Temperatur soll 37 °C erreichen und wird mit einem Thermometer geprüft. Auf dieser Temperatur wurden auch eine Heizplatte und einen Inkubatorschrank angeschaltet. Die eingespannte Metallklinge des Mikrotoms wurde geprüft und ggf. gewechselt. Eine dickere Klinge zum Abschneiden des überschüssigen Paraffins sowie Pinsel und ein Becher mit Wasser zum Ablösen der Schnitte von der Klinge wurden bereitgestellt. Glasobjektträger mit Mattstreifen wurden mit Journalnummer und Gewebeiname beschriftet.

Die Paraffinlöcke wurden bisher im Kühlschrank gelagert und sind somit bereits gekühlt und lassen sich besser schneiden. Ein Block wurde ausgewählt, die Paraffinüberschüsse um das Gewebe mit einem dickeren Messer in genügendem Abstand zum Gewebe entfernt und der Block in den Probenhalter des Mikrotoms eingespannt. Anschließend wurde der Block auf die Klinge zugeschoben, bis sich die Blockoberfläche knapp vor der Messerkante befand. Mit Hilfe einer Kurbel konnte der Probenblock dann manuell entlang der Klinge hoch und runter bewegt werden. Zunächst wurde der Block grob angeschnitten durch 10 μm Schnitte, was man durch eine Messschraube aussuchen konnte, bis die Gewebeoberfläche sichtbar wurde. Diese wirkt matt. Die Klinge wurde dann mit einem Pinsel sauber gemacht. Die Schneidedicke wurde dann auf 7 μm gedreht, damit man feine Schnitte schneiden konnte. War ein Schnitt optimal, wurde er mit dem befeuchteten Pinsel von unterhalb des Schnittes von der Klinge gelöst und die glänzende Unterseite des Schnittes wurde vorsichtig in das Wasserbad überführt. Man sollte darauf achten, die Schnitte so flach wie möglich in das Bad zu legen, weil sich Falten oder gerollte Schnitte durch einen stumpfen Messer nicht mehr entfernen oder öffnen lassen. Weitere Schneidartefakte sind u.a. Streifen im Längsschnitt durch Verschmutzung des Messers oder abwechselnd dünne und dicke Schnitte durch Lockerung des Blocks oder des Messers. Um die Schnitte im Wasser zu fangen, musste der Objektträger steil auf den schwimmenden Schnitt geführt werden.

War er in der erwünschten Position, legte man den Objektträger mit dem Schnitt auf die Heizplatte zum Trocknen. So konnten die Schnitte auf Objektträgern bis zu den verschiedenen Färbungen staubgeschützt in Kästen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Dieser Arbeitsschritt wurde für die physiologischen Präparate der Gl. Submandibularis und lacrimalis eigenständig im anatomischen Institut durchgeführt. Die Entnahme, Fixierung, Einbettung und das Schneiden der Präparate der Tumoren wurden im pathologischen Institut realisiert. Alle Schnittpräparate weisen eine Schnittdicke von 5 bis 7 μm auf.

6.2. Färbung

Die angefertigten Präparate von dem entnommenen Probenmaterial mussten dann gefärbt werden, damit man sie am Lichtmikroskop beobachten konnte. Dies erfolgte durch die weit verbreitete HE-Färbung und letztlich auch die immunohistochemische IHC-Färbung. In diesem Kapitel werden diese zwei Färbungen kurz vorgestellt und ihre Protokolle genauer erläutert.

6.2.1. HE-Färbung

6.2.1.1. Vorstellung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) an formalin-fixiertes Gewebe setzte sich durch, weil sie sich unempfindlich und unaufwändig zeigte. 1876 wurden die zwei Einzelfärbungen von Wissowsky miteinander verbunden. Sie dient dazu, Übersichtsfärbungen eines Gewebes zur morphologischen Untersuchung anzufertigen. So können die Strukturen und die Intaktheit des Gewebes untersucht werden. Deswegen wurde vor jeder IHC-Färbung zunächst eine HE-Färbung jeder Schnittserie angefertigt, um die Integrität des Gewebes zu kontrollieren.

Der Grundsatz der HE-Färbung beruht auf der chemischen Wechselwirkung von Gewebe und Farbstoff. Hämatoxylin ist basisch und färbt alle sauren basophilen Strukturen blau, insb. Zellkerne (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der alle basische azidophile Strukturen rot färbt, vor allem Zytoplasma, Erythrozyten, Muskel und Kollagen. Nach der Hämatoxylin-Färbung ist der pH-Wert noch niedrig und deswegen sehen zunächst die Zellkerne rötlich aus. Durch das Bläuen in Wasser erhöht sich der pH-Wert und die Kerne scheinen blauviolett.

6.2.1.2. Übersicht

HE-FÄRBUNG	
Entparaffinieren (unter dem Abzug)	
Lösung	Dauer
1. Xylol	} Jeweils 5 Minuten
2. Xylol	
3. Xylol	
4. 100 %iger 2-Propanol	
5. 100 %iger 2-Propanol	
6. 90 %iger 2-Propanol	
7. 80 %iger 2-Propanol	
Färben	
8. Gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich	8 Minuten
9. Destilliertes Wasser	Bis Überschussfarbe entfernt ist
10. Fließendes Leitungswasser	12 Minuten
11. Destilliertes Wasser	30 Sekunden
12. 0,1 %ige Eosin mit 2 Tropfen Eisessig	2 Minuten 30 Sekunden
13. 90 %iger 2-Propanol	} Jeweils 5 Minuten
14. 100 %iger 2-Propanol	
15. 100 %iger 2-Propanol	
16. Xylol	
17. Xylol	
18. Xylol	
Eindecken mit Kleber (Roti-Histokitt), über Nacht aushärten	

Abbildung 7: Tabellarische Übersicht der HE-Färbung

6.2.1.3. Protokoll

Die zur HE Färbung ausgewählte Proben wurden zunächst unter einem Abzug entparaffiniert und gingen ein bestimmtes Schema durch (s. **Abbildung 8**). Die Zeiten wurden mit einer Stoppuhr kontrolliert. Die Proben wurden in einem Objektträgerkorb gestellt und in der Reihenfolge in drei Glasküvetten Xylol für jeweils fünf Minuten, zwei Küvetten 100 % 2-Propanol für jeweils fünf Minuten, eine Küvette 90 % 2-Propanol für fünf Minuten und eine Küvette 80 % 2-Propanol für fünf Minuten getaucht. Nach zehn Durchgängen oder Verschmutzung der Lösungen mussten die Chemikalien ausgetauscht werden. Das 2-Propanol und Xylol werden zusammen in einem speziellen Gefäß entsorgt.

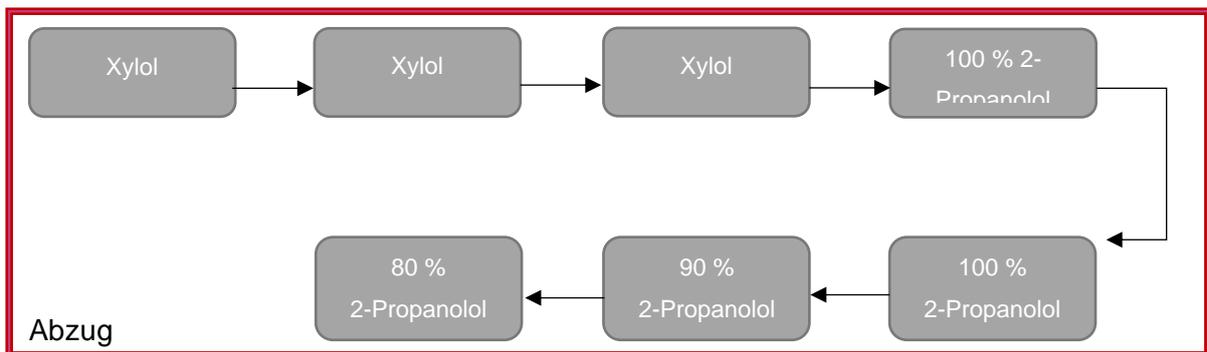
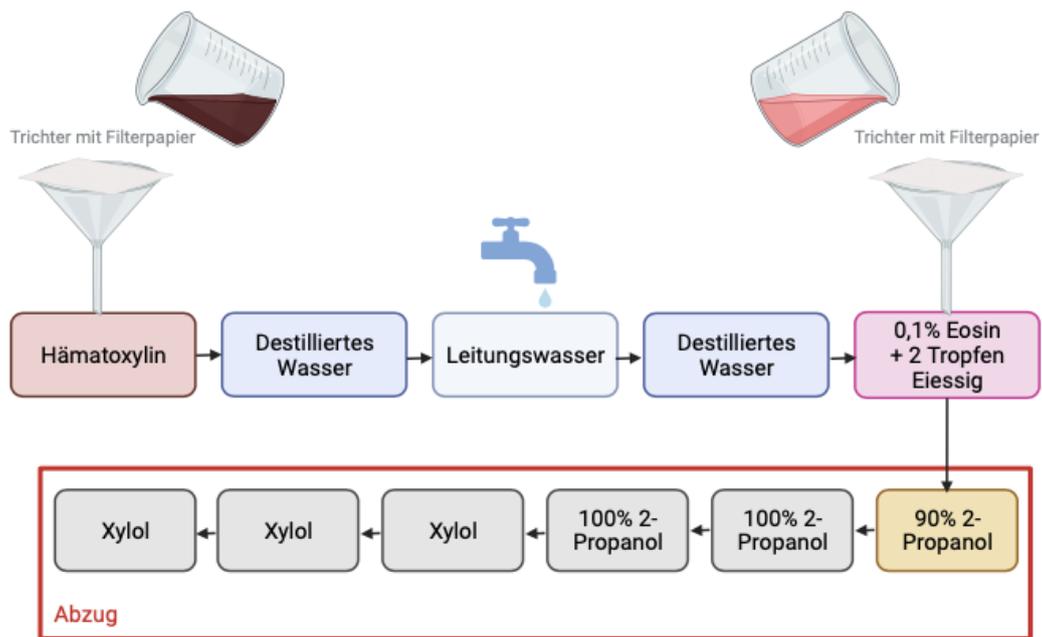


Abbildung 8: Teil 1 der HE-Färbung: Entparaffinieren unter dem Abzug

Dann begann das eigentliche Färben der Proben (s. **Abbildung 9**). Wir benutzten Hämatoxylin nach Ehrlich und 0,1 % Eosin, die vor Gebrauch gefiltert werden müssen. Eosin muss davor noch mit 2 Tropfen Eisessig verdünnt werden, und sollte somit unmittelbar vor dem Gebrauch filtriert werden, damit möglichst wenig Essigsäure verdunstet. Dafür wurde die Küvette mit filtriertem Eosin immer mit einem Deckel abgedeckt. Im nächsten Schritt wurden also die entparaffinierte Proben direkt von der 80 % 2-Propanolol Küvette in die gefilterte Hämatoxylinküvette übertragen und verblieben acht Minuten. Dann wurden die Proben in destilliertes Wasser gespült, bis die Überschussfarbe abgewaschen wurde. Die Proben wurden dann für zwölf Minuten unter fließendes Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Proben erneut in destilliertes Wasser für 30s gespült, und somit in die 0,1 %-Eosinküvette überführt, wo sie zweieinhalb Minuten verblieben. Sie wurden dann in 90 % 2-Propanolol eingetunkt, bis die erwünschte Farbe erreicht wurde. Darüber hinaus wurden die Proben in der umgekehrten Reihenfolge wie zuvor wieder in zwei Küvetten 100 % 2-Propanolol für jeweils fünf Minuten und drei Küvetten Xylol ebenfalls für jeweils fünf Minuten eingetaucht. Die Färbung war somit abgeschlossen, nun mussten die Proben auf dem Objektträger eingedeckt werden. Dies erfolgte mit dem Roti-Histokitt und die Objektträger härteten über Nacht bei Raumtemperatur aus.



Created in BioRender.com

Abbildung 9: Teil 2 und Teil 3 der HE-Färbung: Färbung mit Hämatoxylin und Eosin; Entwässern unter dem Abzug

(Abbildung mit BioRender.com erstellt)

6.2.1.4. Abbildungen

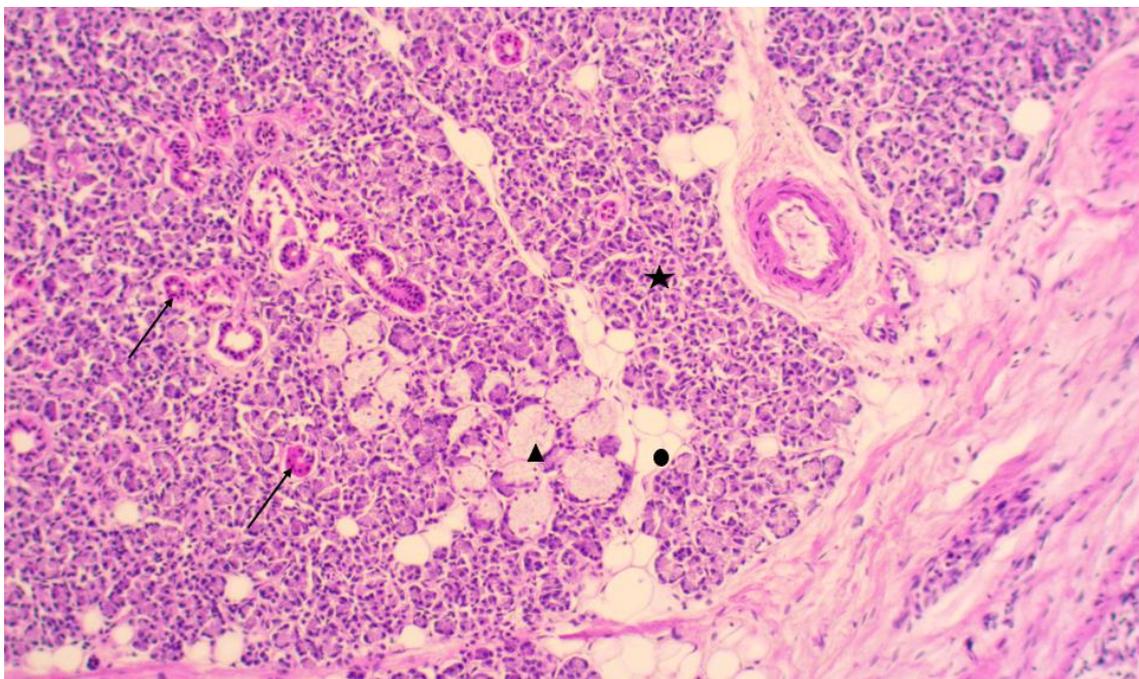


Abbildung 10: HE-Färbung des Spenders 1, Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung

Pfeile = Ausführungsgänge; Stern = seröse Azini; Punkt = Fettzellen; Dreieck = muköse Tubuli.

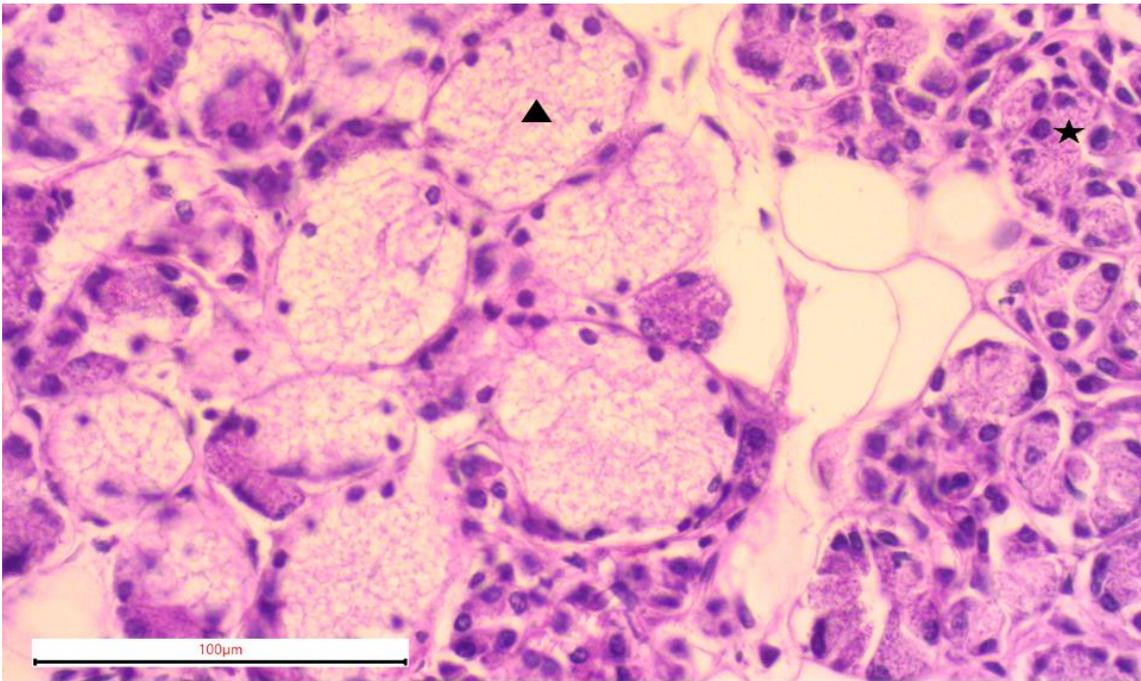


Abbildung 11: HE-Färbung des Spenders 1, Glandula submandibularis in 40x Vergrößerung

Stern = seröse Azini; Dreieck = muköse Tubuli.

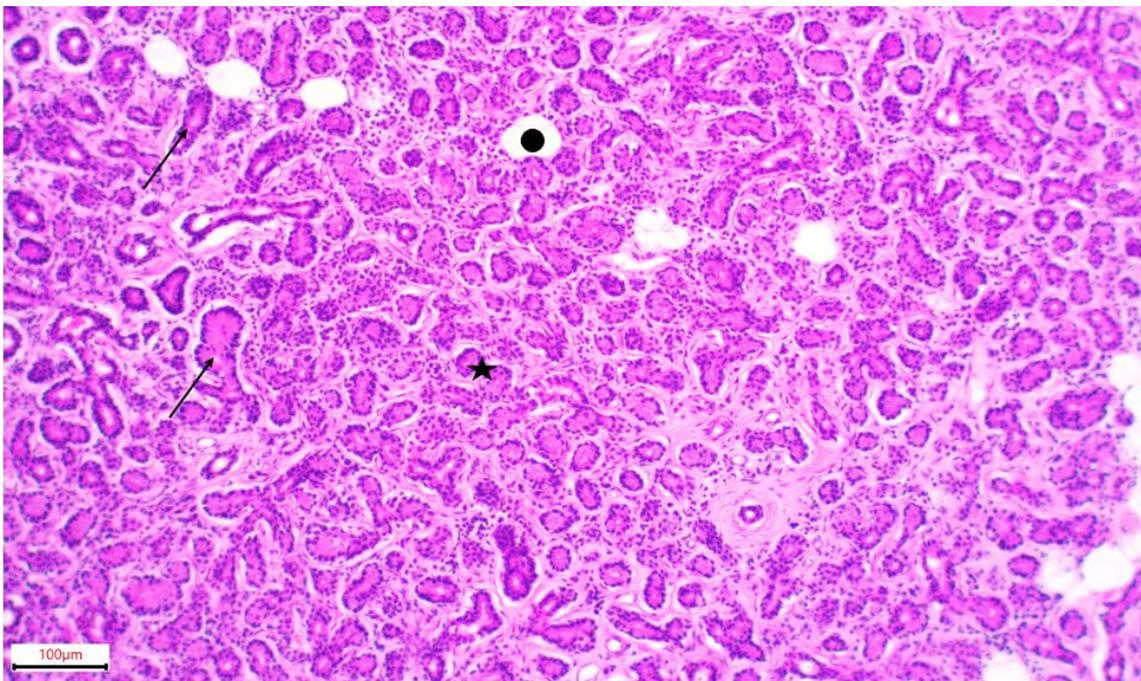


Abbildung 12: HE-Färbung des Spenders 7, Glandula lacrimalis in 10x Vergrößerung

Pfeile = Ausführungsgänge; Stern = seröse Azini; Punkt = Fettzellen.

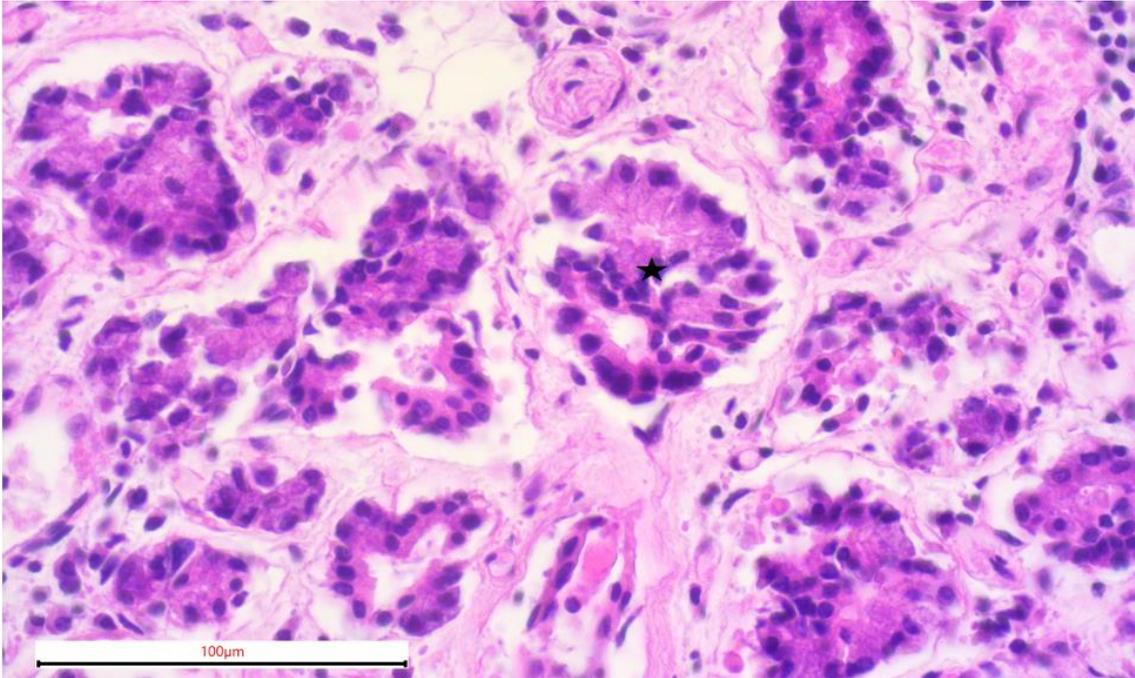


Abbildung 13: HE-Färbung des Spenders 2, Glandula lacrimalis in 40x Vergrößerung
Stern = seröse Azini.

6.2.2. IHC-Färbung

6.2.2.1. Vorstellung

Die immunhistochemische Färbung dient der Erkennung von Gewebeeigenschaften anhand spezifischer Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Der unkonjugierte primäre Antikörper bindet spezifisch zu seinem Antigen, anschließend bindet noch ein konjugierter Sekundärantikörper am Primärantikörper. Der Sekundärantikörper spielt die Rolle einer „Brücke“ zwischen Antigen-Antikörper-Komplex und Detektionsverfahren und verstärkt das Signal. Er wird in Verbindung mit dem Erkennungsverfahren sichtbar. Bei dieser Arbeit erfolgte dies durch Zugabe eines Chromogens, ein farbgebendes Substrat, was eine sichtliche Anfärbung zeigte. Dafür muss aber das Antigen zuallererst im untersuchten Gewebe vorhanden sein, gut erreichbar von dem Antikörper sein und spezifisch genug, damit nicht andere Gewebestrukturen sich durch unspezifische Bindungen anfärben. Das Antigen der vorliegenden Arbeit war das Protein TRPC6.

Die Färbung nach der IHC-Methode schließt sich an die HE-Färbung an. Zu Beginn meiner Laborarbeit lag bereits ein Protokoll vor und wurde bereits erstellt. Die Färbungen, die nach dem vorläufigen Protokoll durchgeführt wurden, waren jedoch zunächst erfolglos. Daraufhin wurden innerhalb der Doktorandengruppe potenzielle Fehlerquellen identifiziert und nach und nach beseitigt. Dies erforderte mehrere Färbungen, in denen die vermeintlichen Fehlerquellen beseitigt wurden. Beispielsweise

wurde Xylol immer frisch angesetzt. Die Entparaffinierung durch Xylol wurde von dreimal fünf auf dreimal acht Minuten verlängert. Nach ein paar Testläufen erwies sich die 1:50-Verdünnung als optimal geeignet für menschliche Drüsen, insb. die Unterkieferspeicheldrüse und die Tränendrüse, während die 1:100-Verdünnung zu schwach war. Letztendlich wurde die IHC-Färbung erfolgreich durchgeführt. Der Erfolg wurde durch weitere IHC-Färbungen nachgewiesen, wodurch das definitive Färbungsprotokoll festgelegt werden konnte.

6.2.2.2. Übersicht

IHC-FÄRBUNG		
Tag 1		
Schritt	Maßnahme	Dauer
1. Vorbereitung	Citratpuffer (frisch angesetzt) im Wärmeschrank vorwärmen (95 °C)	
2. Entparaffinieren (unter dem Abzug)	Xylol	3 x 8 Minuten
	100 %iger 2-Propanol	2 x 5 Minuten
	90 %iger 2-Propanol	1 x 5 Minuten
	80 %iger 2-Propanol	1 x 5 Minuten
	70 %iger 2-Propanol	1 x 5 Minuten
	Destilliertes Wasser	1 x 5 Minuten
3. Demaskierung	Citratpuffer bei 95 °C im Wärmeschrank mit Deckel	60 Minuten
	Citratpuffer bei Raumtemperatur abkühlen lassen, ohne Deckel	30 Minuten
	PBS	1 Minuten
	Umrandung des Gewebes mit DakoPen	
4. Blockierung	10 %iges NGS (Normal Goat Serum) in PBS auf Schnitte in Feuchtekammer pipettieren	
	Inkubation in Feuchtekammer bei Raumtemperatur	1 Stunde
5. Primärantikörper	10 %iges NGS in PBS abklopfen Schnitte in Feuchtekammer legen Primärantikörper in 1:50 Verdünnung auf Positivkontrollen pipettieren Kaninchenserum in 1:500 Verdünnung auf Negativkontrolle pipettieren	
	Inkubation in Feuchtekammer bei Raumtemperatur	Über Nacht

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der IHC-Färbung Tag 1

Tag 2		
6. Peroxidase- Inaktivierung	Lösungen abklopfen	
	PBS (Küvette)	2 x 2 Minuten
	3 %iger H ₂ O ₂ in PBS (frisch angestezt) auf Schnitte in Feuchtekammer pipettieren	
	Inkubation in Feuchtekammer bei Raumtemperatur	10 Minuten
	PBS (Küvette)	2 x 2 Minuten
7. Sekundärantikörper	PBS abklopfen Schnitte in Feuchtekammer legen HRP-konjugierter Antikörper in NGS 1:500 auf Schnitte pipettieren	
	Inkubation in Feuchtekammer bei Raumtemperatur	1 Stunde
	PBS (Küvette)	2 x 2 Minuten
	DAB-Lösung (DAB, Diaminobenzidin) in 1:1 Verdünnung unter dem Mikroskop auf Schnitte pipettieren, inkubieren, bei ausreichender brauner Färbung stoppen und Zeit für eine Serie beibehalten	2-15 Minuten
8. Gegenfärbung	Destilliertes Wasser	1 Minuten
	Hämatoxylin	1 Sekunde
	Destilliertes Wasser	2-3 Sekunden
	Fließendes Leitungswasser	5 Minuten
9. Entwässerung (unter dem Abzug)	70 %iger 2-Propanol	1 x 5 Minuten
	80 %iger 2-Propanol	1 x 5 Minuten
	90 %iger 2-Propanol	1 x 5 Minuten
	100 %iger 2-Propanol	2 x 5 Minuten
	Xylol	3 x 5 Minuten
Eindecken mit Kleber (Roti-Histokitt), über Nacht aushärten		

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der IHC-Färbung Tag 2

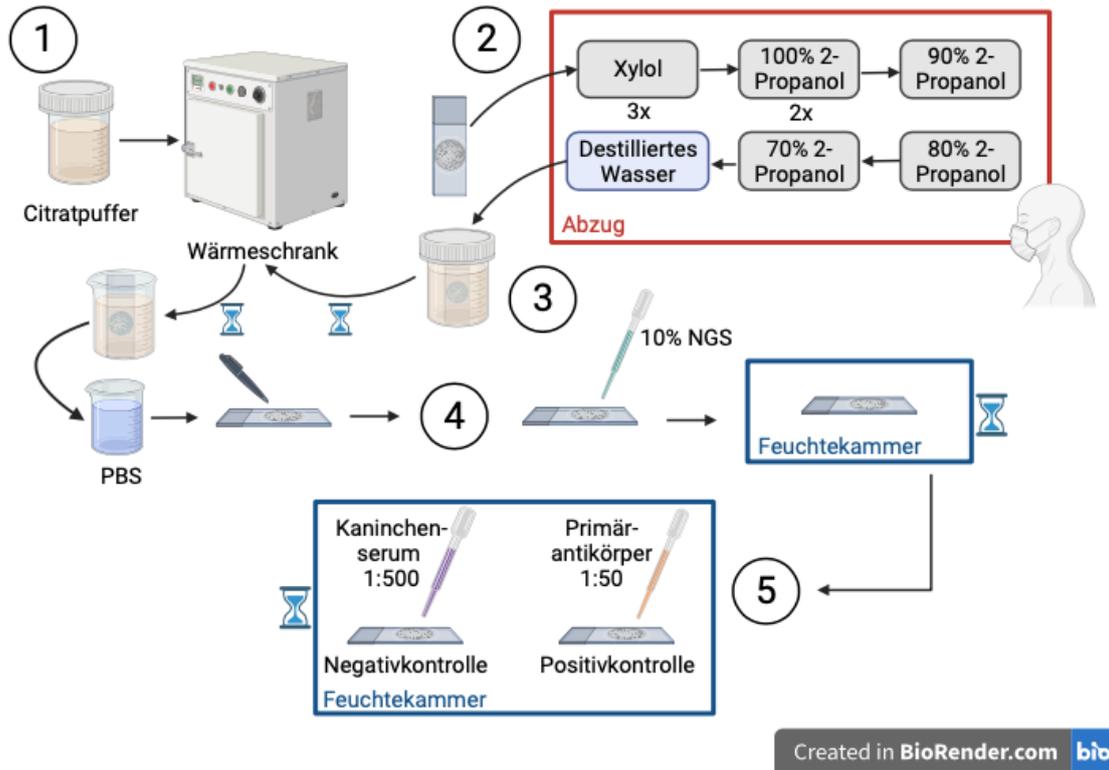


Abbildung 14: Schematische Übersicht der IHC-Färbung Tag 1

(Abbildung erstellt mit BioRender.com)

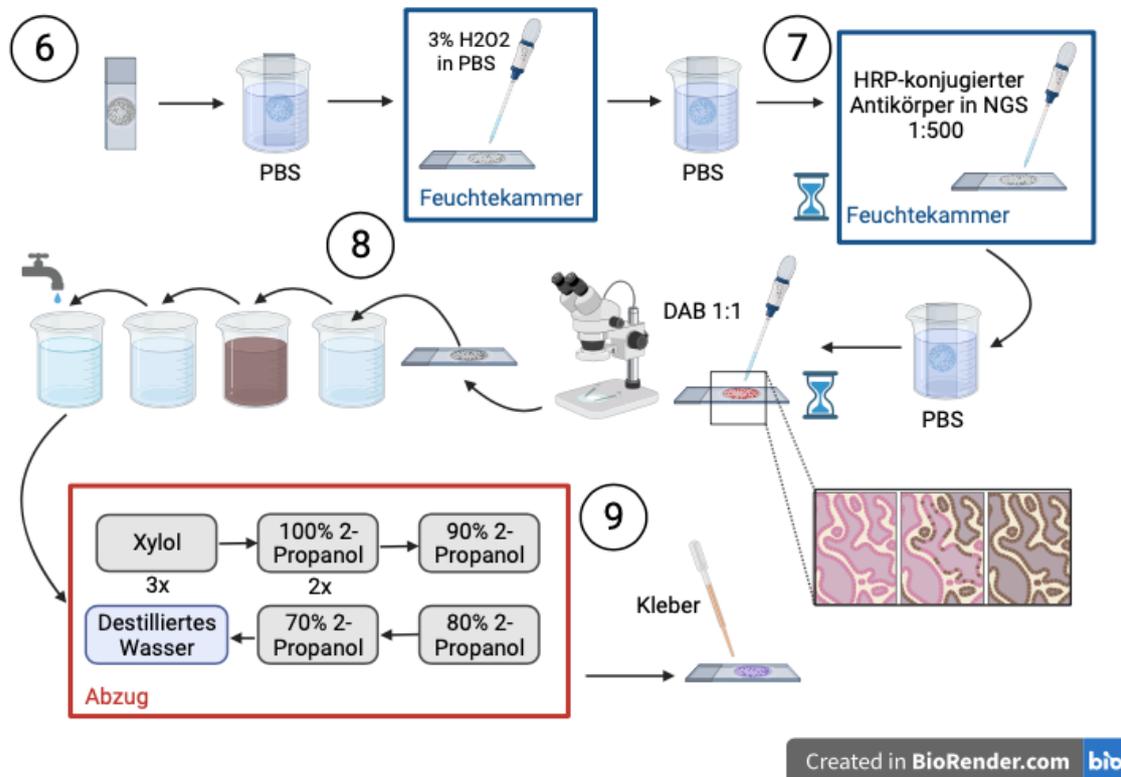


Abbildung 15: Schematische Übersicht der IHC-Färbung Tag 2

(Abbildung erstellt mit BioRender.com)

Tag 1		
Schritt	Chemikalien/Lösungen	Vorgehen
1	Citratpuffer pH6	2,5 mL Citratpuffer + 247,5 mL Aqua dest.
2	Xylol 100 %iger 2-Propanol 90 %iger 2-Propanol 80 %iger 2-Propanol 70 %iger 2-Propanol	Rein Rein 90 mL 2-Propanol + 10 mL Aqua dest. 80 mL 2-Propanol + 20 mL Aqua dest. 70 mL 2-Propanol + 30 mL Aqua dest.
3	1 x PBS	10xPBS-Beutel auf 1 Liter Aqua dest. : 100 ml 10xPBS + 900 ml Aqua dest = 1 Liter 1x PBS
4	10 %ige NGS-Blockierlösung	fertig angesetzt in Gefrierfach, bestehend aus: - NGS - 0,1% Triton - PBS
5	Primärantikörper Kaninchenserum	1:50 vorverdünnter Antikörper in Gefrierfach Kaninchenserum (KS) in Gefrierfach: 50 µl KS + 24.950 µl PBS = 25 ml KS 1:500
Tag 2		
6	3 %iger H2O2	8,57 ml 35 % H2O2 + 91,43 ml PBS
7	Sekundärantikörper DAB	20 µl Sekundärantikörper + 980 µl 10 %NGS = 1 ml 1:50 Verdünnung 100 µl der 1:50 Verdünnung + 900 µl 10 %NGS = 1 ml 1:500 Verdünnung Mischungsverhältnis 1:1, zur Herstellung von 1 ml = 500 µl Reagens 1 + 500 µl Reagens 2

Tabelle 11: Übersicht der Lösungen der IHC-Färbung

6.2.2.3. Protokoll

Die pro Durchführung der Färbung benötigten zehn Schnitte, fixiert auf zehn Objektträger, wurden so ausgewählt, damit eine Negativkontrolle von dem untersuchten Gewebe und eine Positivkontrolle von Herzgewebe, das sicher das TRPC6-Protein

enthält, mitgefärbt werden. Somit wurden pro Durchführung der Färbung acht positive Schnitte von unserem Gewebe positiv gefärbt.

Die Objektträger wurden wie folgt beschriftet, um sie einfacher zu unterscheiden: mit der Journalnummer, mit dem Namen des Gewebes, die Positivkontrollen mit „+“ und „Anti-TRPC6 1:50“ und die Negativkontrolle mit einer „-“ und „Kaninchenserum 1:500“.

Die IHC-Färbung wird auf zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

6.2.2.3.1. Tag 1

Schritt 1: Vorbereitung

Am ersten Tag wurde eine 1 %ige-Citratpufferlösung frisch hergestellt, in dem 2,5 ml Citrat mit 247,5 ml destilliertem Wasser gepuffert wurde. Dieser wurde dann in einem Wärmeschrank auf 95 °C in einer Küvette mit Deckel vorgewärmt (Citratpuffer: Antigen Retrieval Buffer, pH6; Ref.: ab93678; Abcam AG, Cambridge, United Kingdom).

Schritt 2: Entparaffinieren

Die Lösungen zum Entparaffinieren waren bereits in Küvetten unter dem Abzug gelagert. Sie sind mit Namen der Lösung und Pfeiler beschriftet. Diese werden nach zehn Durchgängen immer ausgetauscht, was wir anhand einer Eintragsliste kontrollieren konnten. Trotzdem mussten die Lösungen vor dem Färben immer visuell auf Verunreinigungen überprüft werden. Die Lösungen wurden dann entsprechend ausgetauscht. Xylol wurde bei dieser Färbung immer frisch angesetzt.

Die zur IHC-Färbung ausgewählte Proben wurden zunächst in einem Objektträgerkorb gestellt, dann ähnlich zu der HE Färbung unter einem Abzug entparaffiniert und gingen ein bestimmtes Schema durch. Die Zeiten wurden mit einer Stoppuhr kontrolliert. Die Proben wurden in drei Küvetten Xylol für jeweils acht Minuten getaucht und anschließend zur Rehydrierung des Gewebes in eine absteigende Alkoholreihe von zwei Küvetten 100 % 2-Propanol für jeweils fünf Minuten, eine Küvette 90 % 2-Propanol für fünf Minuten, eine Küvette 80 % 2-Propanol für fünf Minuten und letztlich eine Küvette 70 % 2-Propanol für fünf Minuten getaucht. Dieser letzte Schritt gab es bei der HE-Färbung nicht. Bei den Färbungen dieser Arbeit wurden dreimal acht Minuten Xylol ausgesucht, weil sich dadurch bessere Ergebnisse, bzw. eine stärkere braune Färbung des Gewebes, gezeigt haben. Am Ende der Entparaffinierung wurden die Proben noch mit destilliertem Wasser für fünf Minuten gespült.

Schritt 3: Demaskierung

Die Schnitte wurden dann für 60 Minuten im Citratpuffer im 95 °C Wärmeschrank mit Glasdeckel demaskiert. Nach 60 Minuten wurden die Proben im Citratpuffer belassen,

aus dem Schrank entnommen und wieder auf Raumtemperatur für 30 Minuten ohne Deckel abgekühlt.

Währenddessen wurde eine Küvette mit PBS-Lösung bereitgestellt sowie auch der DakoPen.

Die Schnitte wurden nach Abkühlung eine Minute mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden dann aus der Küvette entnommen, einzeln trocken abgeklopft und das Gewebe wurde dann mit dem DakoPen-Fettstift umrandet (DakoPen: Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, US).

Schritt 4: Blockierung

Für diesen Schritt benötigen wir zunächst eine Feuchtekammer: Wir befeuchteten zwei Papiertücher, die wir dann zu den Maßen der Kammer falteten, damit wir die Tücher in diese flach auslegen konnten (Feuchtekammer: Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland). Diese Vorbereitung sollte während der Abkühlung im Schritt 3 erfolgen.

Die benötigte Lösung ist eine 10 % Normal Goat Serum (NGS) in PBS verdünnt, die als Blockierlösung dient. Diese sollte schon bei dem Schritt 3 entnommen werden, da sie als Fertiglösung im Gefrierfach angesetzt ist, damit sie auftauen kann.

Im nächsten Schritt folgte die Blockierung der Proben, indem die Objektträger in die Feuchtekammer gelegt und ca. 200 µl Blockierlösung auf die Proben pipettiert wurden. Die Schnitte wurden dann für eine Stunde auf Raumtemperatur in der geschlossenen Feuchtekammer inkubiert.

Schritt 5: Primärantikörper

Während der Inkubation in Schritt 4 wurden die TRPC6-Primärantikörperlösung und das Kaninchenserum angefertigt. Dazu wurde noch eine neue, frische Feuchtekammer vorbereitet.

Der unkonjugierte TRPC6-Antikörper (Ref.: Acc-017AN4802; Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) wurde im Gefrierfach in 1:50 Vorverdünnung in 1,5 ml fassende Mikroreaktionsgefäßen gelagert. Diese sollte schon bei dem Schritt 4 entnommen werden, da sie als Fertiglösung im Gefrierfach angesetzt ist, damit sie auftauen kann. Diese Vorverdünnung konnte noch auf 1:100 verdünnt werden, in dem es mit 10 %iger-NGS-Blockierlösung gemischt wird. Diese Verdünnung wurde ausgetestet, hat jedoch schwache Ergebnisse gezeigt. Wir benutzten also 1:50 Verdünnung bei allen relevanten Färbungen.

Das Kaninchenserum erhalten wir ebenfalls als 1:50, mit PBS vorverdünnte Stocklösung. Diese wurde dann auf 1:500 verdünnt, in dem wir 50 µl 1:50-Kaninchenserum mit 24,950 µl PBS im Vortexer mischten. Diese

Kaninchenserumlösung konnte dann bis zu zwei Monaten im Kühlschrank in einem Gefäß aufbewahrt werden.

Nach einer Stunde Inkubation in der Feuchtekammer, wurden die Schnitte aus diese entnommen, trocken abgeklopft und in eine frische Feuchtekammer gelegt. Dann wurde auf die Negativkontrolle ca. 200 µl von der 1:500 Kaninchenserumlösung, auf die positive Schnitte ca. 200 µl von der 1:50 TRPC6-Primärantikörperlösung pipettiert. Die Pipettenspitze wurde zwischen den Lösungen gewechselt. Die Schnitte wurden dann über Nacht auf Raumtemperatur in der geschlossenen Feuchtekammer inkubiert.

6.2.2.3.2. Tag 2

Schritt 6: Peroxidase-Inaktivierung

Am nächsten Tag wurden zuerst vier Küvetten mit PBS-Lösung gefüllt und eine frische 3 %ige-H₂O₂-Lösung angesetzt, in dem 300 µl H₂O₂ und 2,7 ml PBS gemischt wurden. Die Objektträger wurden aus der Feuchtekammer entnommen, die Lösungen auf den Schnitten wurden durch Klopfen entfernt und die Objektträger in einen Objektträgerkorb gestellt. Die Proben wurden dann zweimal zwei Minuten in PBS gewaschen und schließlich wieder aus dem Objektträgerkorb entnommen und trocken abgeklopft. Die Objektträger wurden dann in die frische Feuchtekammer gelegt und ca. 200µl der frisch angesetzten 3 %-H₂O₂-Lösung in PBS wurden auf die Schnitte pipettiert. Darauf folgte eine zehnmünütige Inkubation in der geschlossenen Feuchtekammer bei Raumtemperatur. Dieser Schritt dient der Peroxidase-Inaktivierung. Darauffolgend wurden die Schnitte wieder trocken abgeklopft und erneut in einen Objektträgerkorb gestellt und zweimal zwei Minuten in PBS gewaschen.

Schritt 7: Sekundärantikörper

Während der Inkubation in Schritt 6 wurde die HRP-konjugierte Sekundärantikörperlösung angefertigt (s. Abbildung). Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA) wurde im Gefrierfach in 200 µl Mikroreaktionsgefäßen gelagert. Diese sollte schon bei Anfang des Schrittes 6 entnommen werden, damit sie auftauen kann. Wir stellten zusätzlich drei Küvetten, gefüllt mit PBS-Lösung und eine frische Feuchtekammer bereit.

Zunächst wurden 20 µl Sekundärantikörper und 980 µl 10 %ige-NGS-Blockierungslösung in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, im Vortexer gemischt und ergaben 1 ml 1:50 verdünnte Sekundärantikörperlösung. Diese Lösung wurde dann nochmal bis zu 1:500 verdünnt, in dem 100 µl 1:50 Sekundärantikörperlösung und 900µl 10 %ige-NGS-Blockierungslösung in einem neuen Mikroreaktionsgefäß überführt und im Vortexer gemischt wurden, was 1 ml 1:500 verdünnte Sekundärantikörperlösung ergab. Von dieser Lösung fertigen wir 3 ml an.

Nach dem Waschen in PBS im Schritt 6 wurden die Schnitte wieder aus dem Korb entnommen, trocken abgeklopft und in die frische Feuchtekammer gelegt. Ca. 200 µl der 1:500 verdünnten Sekundärantikörperlösung wurden dann auf die Schnitte pipettiert, darauf folgte eine 60-minütige Inkubation in der geschlossenen Feuchtekammer auf Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte erneut in einen Objektträgerkorb gestellt und zweimal zwei Minuten in PBS gewaschen.

Während der Inkubation konnten wir die Chromogen Diaminobenzin (DAB) Lösung (Ref.: 7411-49-6; Vector Laboratories Inc.; Burlingame, USA) für die anschließende DAB-Färbung ansetzen. Die Reagentien (Puffer und Substrat) wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Diese Lösung wurde immer kurz vor Gebrauch frisch angesetzt, in dem wir 500µl jeweils der ImmPACT DAB Reagent 1 Lösung und der ImmPACT DAB Reagent 2 Lösung 1:1 in einem 1,5 ml. Mikroreaktionsgefäß gemischt haben. Dies wurde dreimal wiederholt, so dass wir 3 ml Lösung anfertigen. Wichtig war zu beachten, dass bei dem Pipettieren der jeweiligen Reagentien jedes Mal die Pipettenspitze entsorgt wurde, damit man immer eine frische Pipette benutzte. Darüber hinaus wurden alle für diesen Arbeitsschritt verwendeten Materialien, bzw. die, die mit DAB in Kontakt kamen, in einem speziellen, mit Deckel verschließbaren Mülleimer entsorgt.

Nach dem Spülen mit PBS wurden die Objektträger wieder aus dem Korb entnommen und trocken abgeklopft, um sie mit DAB zu färben. Ca. 200 µl der neu angefertigten DAB-Lösung wurde auf die Schnitte pipettiert. An diesem Punkt starteten wir einen Timer. Ein positiver Schnitt wurde ausgesucht, um den Ablauf der Färbung unter dem Mikroskop visuell zu kontrollieren. Wir beobachteten, dass es nämlich progressiv braune Färbungen im Gewebe auftraten. Die Inkubation sollte zwischen zwei und 15 Minuten dauern, sie ist jedoch antikörperabhängig. Bei unserem Gewebe haben wir elf Minuten ausgesucht, weil sich bis dann Veränderungen an der Färbung des Gewebes gezeigt haben, jedoch danach nicht mehr signifikativ. Diese Dauer wurde bei allen Schnitten beibehalten. Nach Erfolg der Inkubation wurden die Schnitte anschließend erneut in einen Objektträgerkorb gestellt und die Reaktion wurde dann durch Eintauchen in PBS gestoppt. Die Schnitte konnten dann nochmals unter dem Mikroskop bewertet und gegebenenfalls nachgefärbt werden.

Schritt 8: Gegenfärben

Darauffolgend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Ehrlich. Dafür stellten wir zwei Küvetten mit destilliertem Wasser, eine mit gefiltertem Hämatoxylin und eine mit Leitungswasser bereit, bereits während der Inkubation in Schritt 6. Die Gegenfärbung diente der Darstellung der Morphologie, in dem die Kerne in einer zum Chromogen

kontrastierenden Farbe gefärbt werden. Diese sollte aber nur kurz einwirken, um nicht die IHC-Färbung zu überdecken.

Die Schnitte wurden dann erneut in einen Objektträgerkorb gestellt, und dann nacheinander eine Minute in destilliertem Wasser, eine Sekunde in Hämatoxylin, dann wieder für paar Sekunden in destilliertem Wasser eingetaucht und dann fünf Minuten in fließendes Leitungswasser gebläut.

Anschließend werden die Schnitte unter dem Abzug entwässert. Die Lösungen zum Entwässern waren bereits in Küvetten unter dem Abzug wie bei der Entparaffinieren gelagert. Sie sind mit Namen der Lösung und Pfeiler beschriftet. Diese werden auch nach zehn Durchgängen immer ausgetauscht und wurden zwischendrin immer vor dem Färben visuell überprüft.

Das Entwässern folgt dem Schema 70 %iger-Propanol – 80 %iger-Propanol – 90 %iger-Propanol – zweimal 100 %-iger-Propanol – dreimal Xylol für jeweils fünf Minuten.

Die Färbung war somit abgeschlossen, nun mussten die Proben auf dem Objektträger eingedeckt werden. Dies erfolgte mit dem Roti-Histokitt-Kleber und die Objektträger härteten über Nacht bei Raumtemperatur aus.

6.2.2.4. Abbildungen

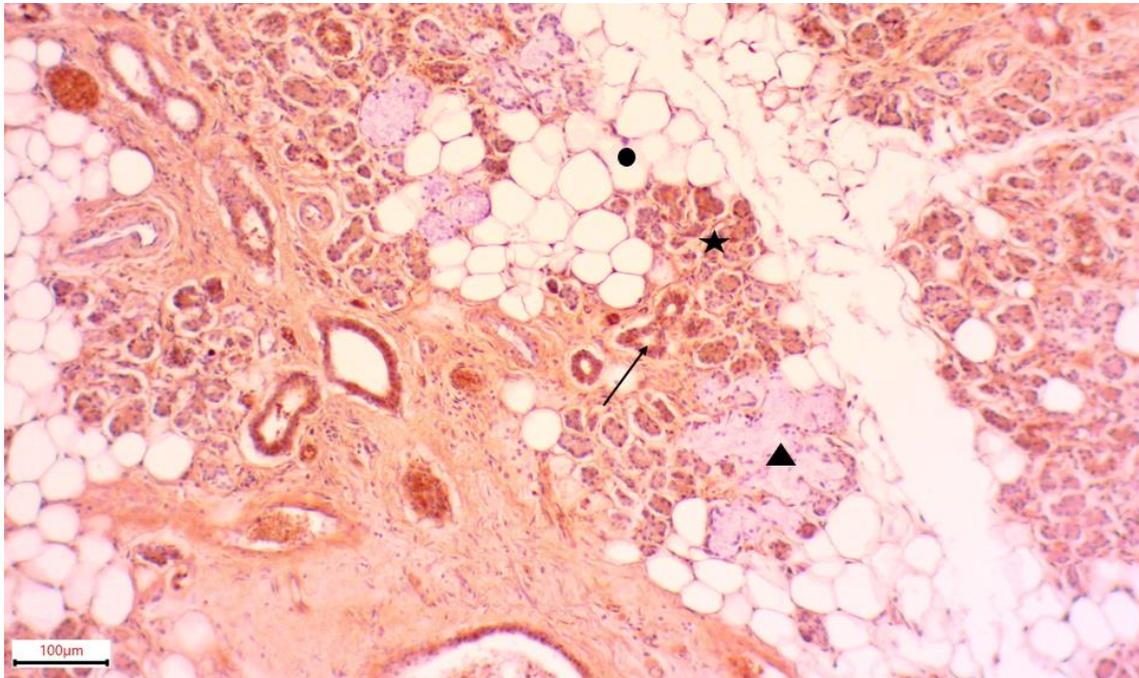


Abbildung 16: Positivkontrolle des Spenders 4, Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung

Pfeile = Ausführungsgänge; Stern = seröse Azini; Punkt = Fettzellen; Dreieck = muköse Tubuli.

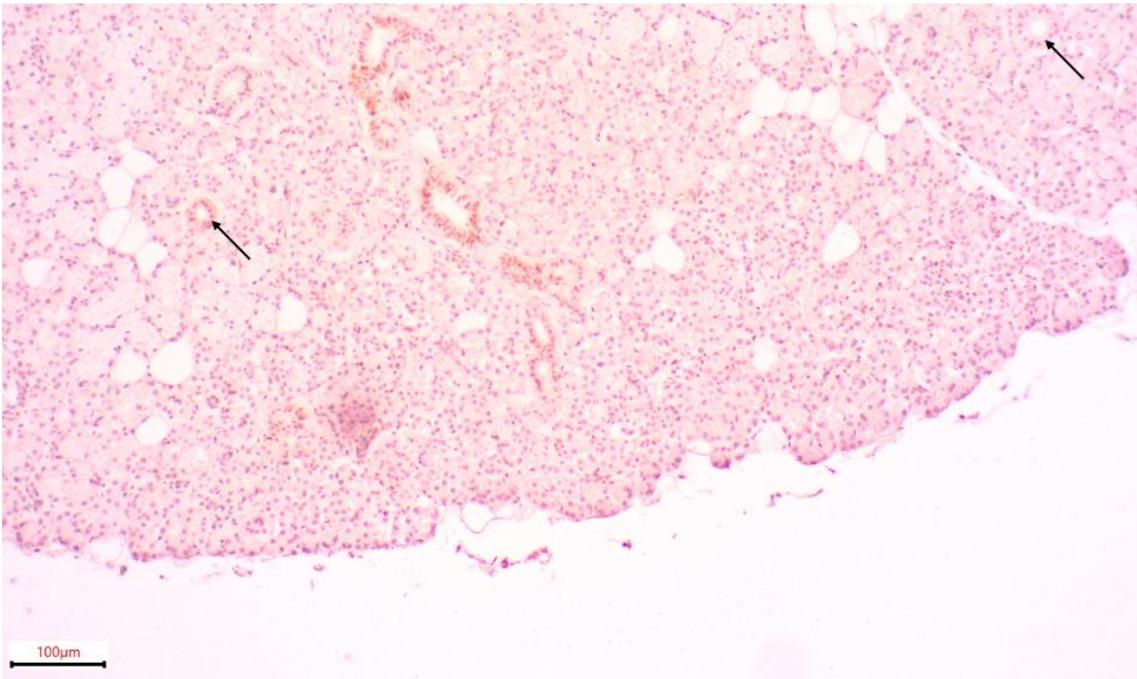


Abbildung 17: Negativkontrolle des Spenders 4, Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung

Pfeile = Ausführungsgänge.

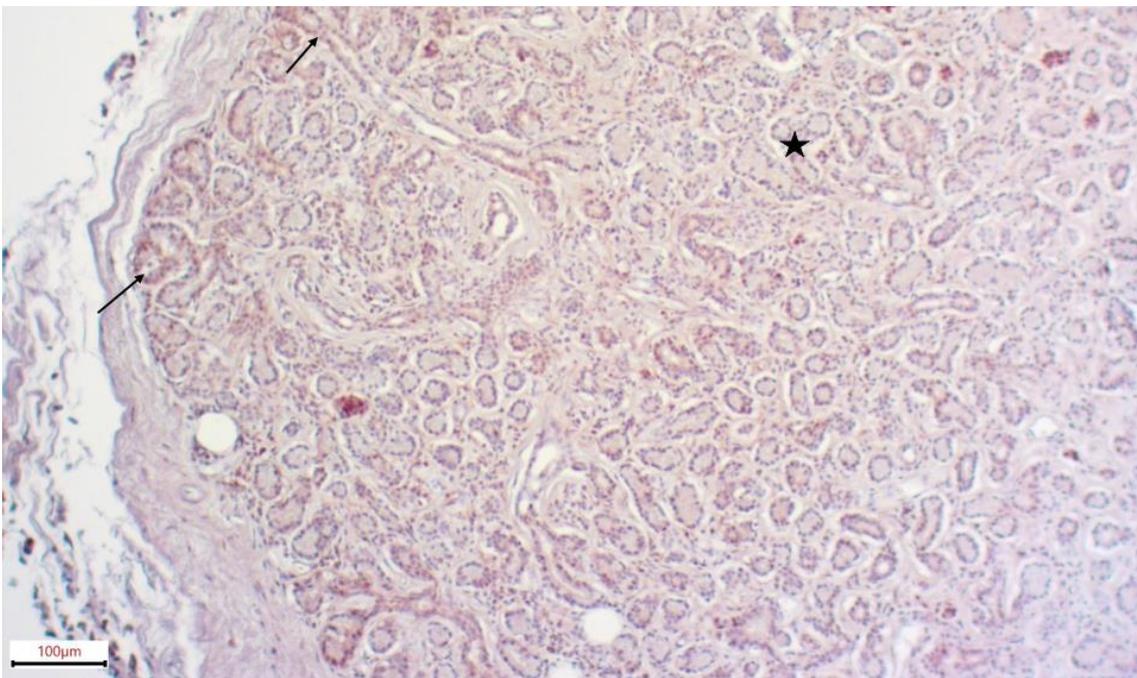


Abbildung 18: Positivkontrolle des Spenders 7, Glandula lacrimalis in 10x Vergrößerung

Pfeile = Ausführungsgänge; Stern = seröse Azini.

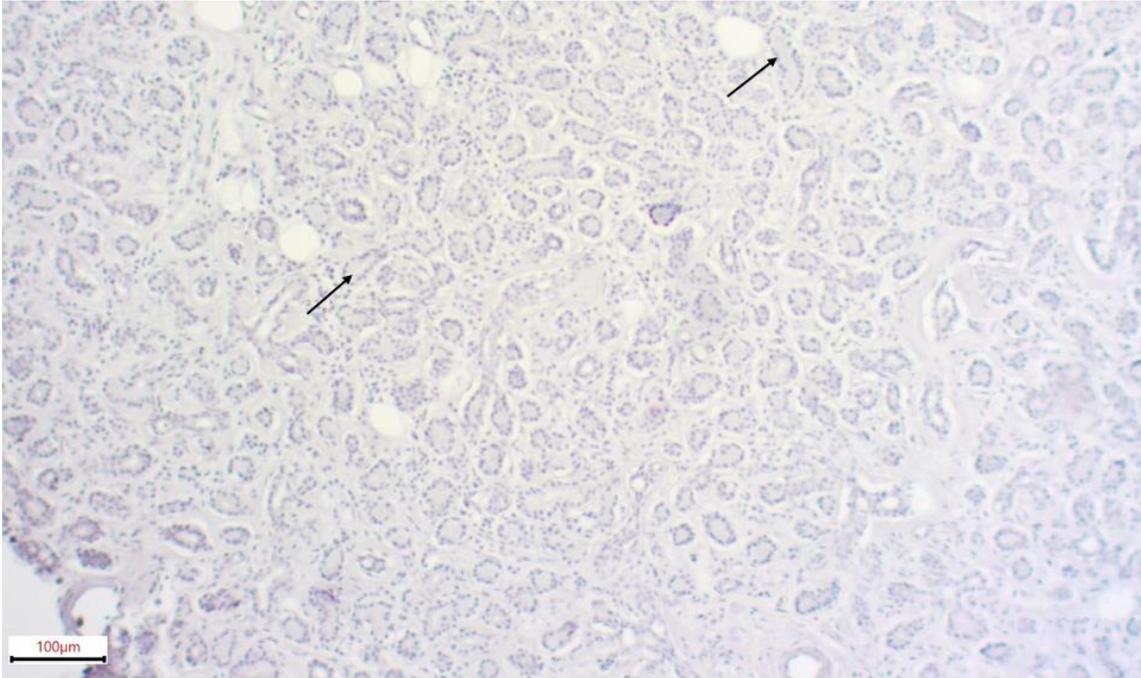


Abbildung 19: Negativkontrolle des Spenders 7, Glandula lacrimalis in 10x Vergrößerung
Pfeile = Ausführungsgänge.

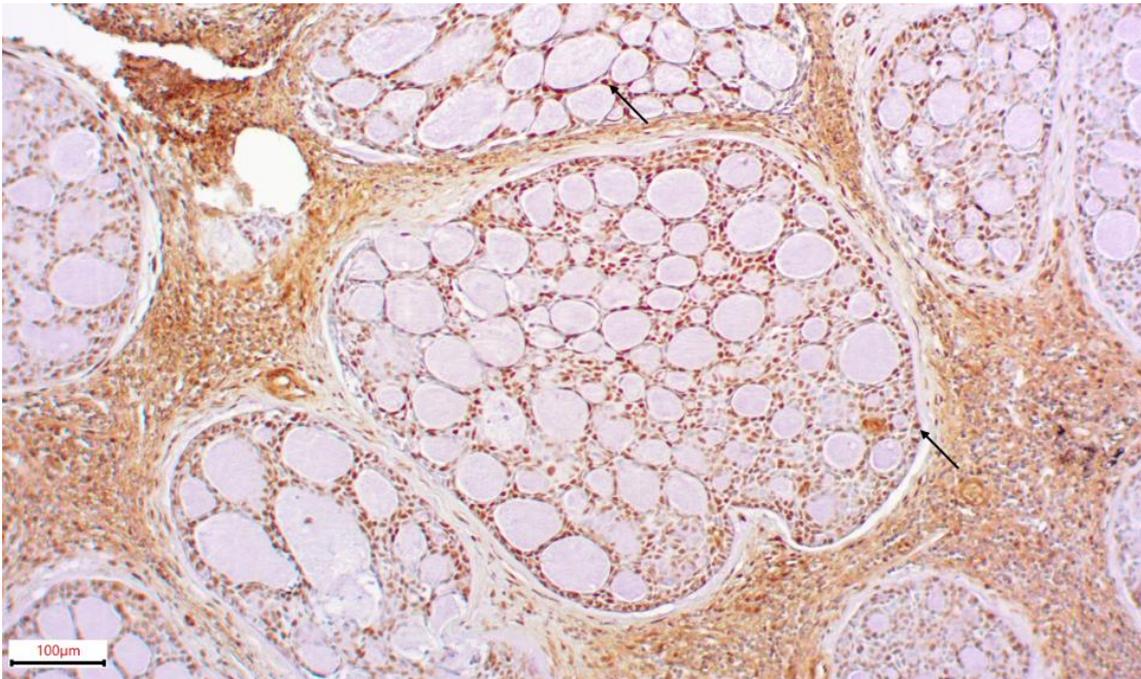


Abbildung 20: Positivkontrolle des Tumorensponders A, adenoid-zystisches Karzinom der Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung
Pfeile = Zellkerne der Tumorzellen.

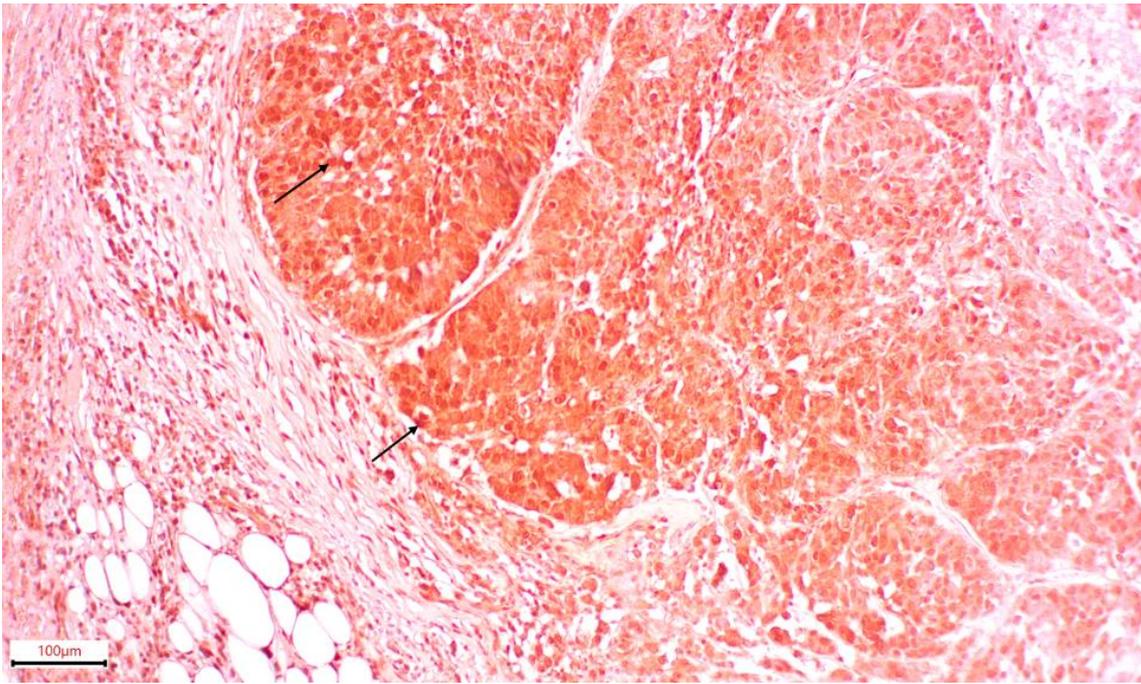


Abbildung 21: Positivkontrolle des Tumorensponders F, Mukoepidermoidkarzinom der Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung

Pfeile = Zellkerne der Tumorzellen.

7. Histologische Auswertung der Daten

7.1 Auswertungsparameter

Für die Datenauswertung wurde ein Lichtmikroskop verwendet, wobei die erste Beurteilung eigenständig und die zweite Beurteilung von einer neutralen, nicht medizinischen Person durchgeführt wurde. Vor der Bewertung der Proben nach dem Bewertungsschema (siehe Kapitel 8) wurden die Teilnehmer in die Handhabung des Mikroskops eingewiesen. Bei der Auswertung der histologischen Schnitte wurde anhand ihrer Färbung eine Schlussfolgerung hinsichtlich des Vorhandenseins (= Braunfärbung) oder Nichtvorhandenseins (= keine Braunfärbung) von TRPC6 gezogen. Die Negativkontrollfärbung und die Positivfärbung in jedem Färbedurchgang wurden miteinander verglichen. Zur Minimierung von Bias war es wichtig, dass die Negativkontrollen keine Braunfärbung zeigten, das Gewebe morphologisch unbeschädigt war und sämtliche Schnitte einheitlich verarbeitet wurden. Mithilfe einer Aufnahmesoftware wurden Bilder von ausgesuchten Bereichen angefertigt. Die Ergebnisse dieser Beurteilungen werden im folgenden Kapitel dargestellt. Die Braunfärbung bzw. die Signalintensität wurde nach dem folgenden Schema klassifiziert: stark positiv, positiv, schwach positiv und negativ.

7.2 Statistische Auswertung

Die Auswertung der vorliegenden Daten erfolgte deskriptiv und teilweise semiquantitativ. Auf die Berechnung von Mittelwerten und die Durchführung von vergleichenden Analysen wurde verzichtet.

IV. Ergebnisse

Gemäß den zu Beginn dieser Arbeit festgelegten Zielen (siehe Kapitel 2.7) werden im folgenden Verlauf der Arbeit die einzelnen Ergebnisse ausführlich erläutert, bevor das Gesamtergebnis präsentiert wird.

8. Übersicht

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt sechzehn Gewebeproben (ausschließlich Positivkontrollen) von dreizehn Spendern immunhistochemisch analysiert. Diese Proben wurden in mehreren Färbedurchläufen bearbeitet, wobei jeweils eine Probe pro Durchlauf als negative Kontrolle verwendet wurde. Es ist wichtig anzumerken, dass bei Tumorpatienten keine physiologischen Gewebeproben entnommen wurden, weshalb ihre Ergebnisse getrennt von denen der anderen Spender bewertet werden.

Dementsprechend wurden nun zehn Gewebeproben aus gesundem Gewebe von insgesamt sieben Spendern als Positivkontrollen immunhistochemisch untersucht. Bei allen zehn dieser getesteten gesunden Proben konnten positive immunhistochemische Signale nachgewiesen werden, wenn auch in unterschiedlicher Intensität.

	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 5	Spender 6	Spender 7
Glandula submandibularis	X	X	X	X	X	X	
Glandula lacrimalis	X	X	X				X

Tabelle 12: Auswertungsschema der IHC der physiologischen Proben

Die Kästchen, die mit einem „X“ markiert sind, geben an, dass die entsprechende Probe einer IHC unterzogen wurde. Kästchen ohne Markierung zeigen hingegen an, dass die betreffende Probe nicht im Rahmen der IHC untersucht wurde.

Es wurden nun sechs Tumor-Proben von insgesamt sechs Spendern als Positivkontrollen immunhistochemisch untersucht. Positive IHC-Signale, wenn auch in unterschiedlicher Intensität, wurden bei vier von den sechs getesteten Tumor-Proben festgestellt. Die Karzinomtypen unterteilten sich wie in **Diagramm 1** dargestellt.

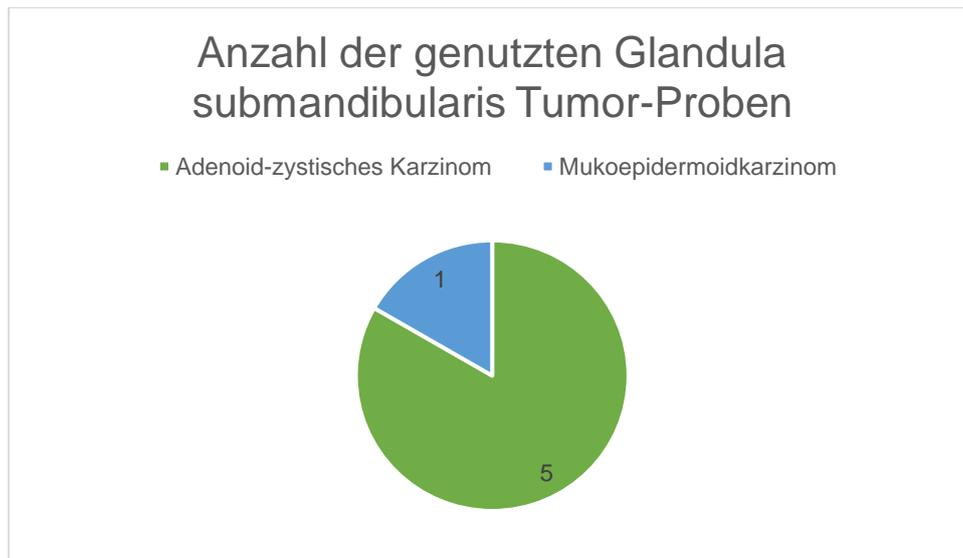


Diagramm 1: Überblick über die Anzahl der verwendeten Proben von Tumoren der Glandula submandibularis

Im Diagramm ist die Aufteilung der insgesamt 6 eingesetzten Glandula submandibularis Tumor-Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Jeweils fünf Proben stammen von adenoid-zystischen Karzinome und eine Probe von einem Mukoepidermoidkarzinom.

9. Allgemeine Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse

Bei der mikroskopischen Untersuchung habe ich die Präparate anhand ihrer verschiedenen Bestandteile analysiert und sie abhängig von den Ergebnissen der immunhistochemischen Analyse (IHC) in folgende Kategorien eingeteilt: Präparate mit starkem Signal, Präparate mit mittlerem Signal, Präparate mit schwachem Signal und Präparate ohne Signal. Hierfür jeweils nach den serösen Azini und ihren Zellkernen gesucht, gegebenenfalls nach den mukösen Tubuli und ihren Zellkernen sowie nach den Ausführungsgängen, insbesondere den Schaltstücken, den Streifenstücken und letztlich den Zellkernen der Fettzellen. Ein starkes Signal wurde definiert als eine dunkle und gleichmäßige Braunfärbung der untersuchten Strukturen. Wenn der Großteil der untersuchten Strukturen (> 50 % der Strukturen) braun oder weniger intensiv gefärbt war, wurde das Präparat der Gruppe mit mittlerem Signal zugeordnet. Ein schwaches Signal wurde festgelegt, wenn die nicht gefärbten oder blau gefärbten Bereiche dominierten (> 50 % der Strukturen), das heißt, wenn der braun gefärbte Anteil weniger als die Hälfte der Strukturen ausmachte. Schließlich wurde bei Abwesenheit jeglicher Braunfärbung in der Probe kein Signal angegeben.

10. Ergebnisse nach den Strukturen der Drüsen

Diese Studie basiert, wie zu Beginn beschrieben, auf Proben aus der physiologischen Glandula submandibularis sowie auf Proben aus der physiologischen Glandula lacrimalis. Die Ergebnisse der einzelnen Spendergruppen werden in diesem Kapitel dargestellt und am Ende zusammengefasst.

10.1 Ergebnisse der Glandula submandibularis

In die Untersuchung wurden insgesamt acht Proben der Glandula submandibularis einbezogen, wobei verschiedene Gewebeanteile berücksichtigt wurden. Diese Anteile umfassten:

- die serösen Azini,
- die Zellkerne dieser Azini,
- die mukösen Tubuli,
- die Zellkerne dieser Tubuli,
- die Ausführungsgänge, die in Schalt- und Streifenstücke unterteilt wurden,
- die Zellkerne der Fettzellen.

Je nach Anteil der Drüse ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Signalintensität. Drei Proben zeigten ein starkes Signal in der IHC, insbesondere die Streifenstücke (Spender 3 – 4 – 5), drei Gewebeproben zeigten nur ein mittleres Signal, ebenfalls bei den Streifen- sowie auch Schaltstücke und serösen Azini (Spender 1 – 3 – 4). Schwache Signale zeigten sich bei allen Proben, bei den Schalt- und Streifenstücke und bei den serösen Azini. Bei den Zellkernen der Fettzellen, den mukösen Tubuli und ihre Zellkerne und die Zellkerne der serösen Azini zeigte sich kein Signal.

In der Fremdauswertung wurden die Streifenstücke nun nur noch bei zwei Proben als starkes Signal eingestuft und die 2. Probe wurde auch bei einem anderen Spender als starkes Signal eingestuft (Spender 1 – 5).

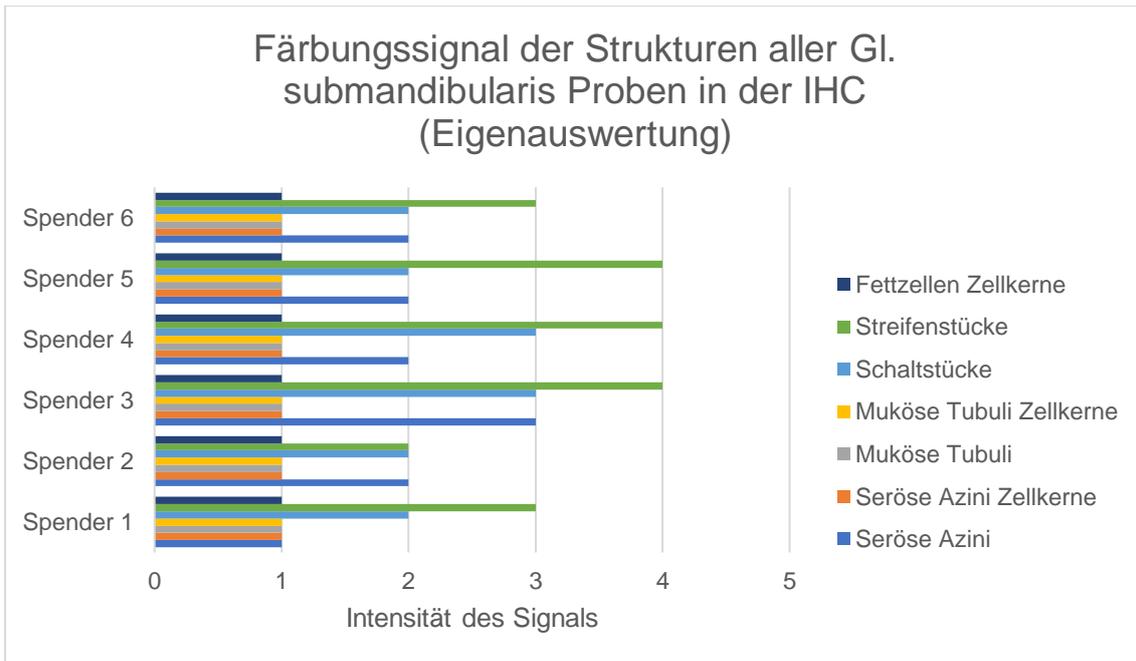


Diagramm 2: Färbungssignal der Strukturen aller GI. Submandibularis Proben in der IHC (Eigenauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller Glandula submandibularis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

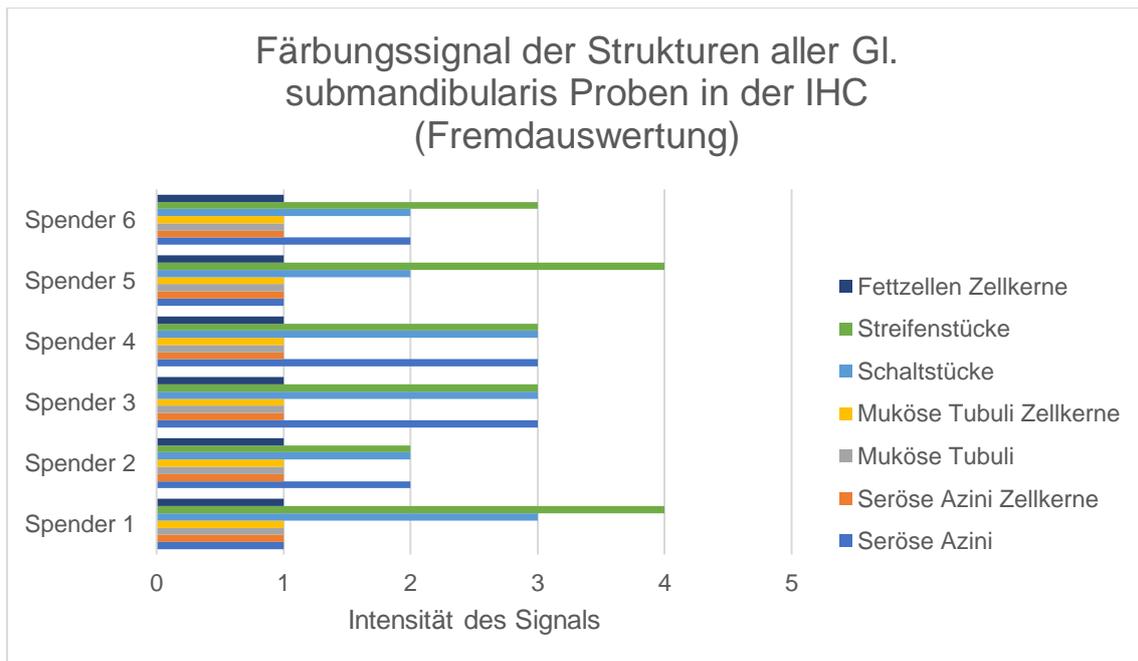


Diagramm 3: Färbungssignal der Strukturen aller Gl. submandibularis Proben in der IHC (Fremdauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller Glandula submandibularis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

Der Nachweis von TRPC6 in physiologischen Proben von Glandulae submandibulares mittels IHC konnte somit unter Bezugnahme der Zielsetzung Nr. 1 und 2 (Kapitel 2.7) nachgewiesen werden und die erhaltenen Ergebnisse sind auch zueinander in Übereinstimmung zu bringen. Anhand dieser Ergebnisse kann ausgegangen werden, dass die Streifenstücke der Ausführungsgänge, die stärksten bzw. besten Ergebnisse zeigen.

Das Ergebnis der IHC an Glandulae submandibulares ist exemplarisch in den anliegenden **Abbildungen 22 bis 24** dargestellt.

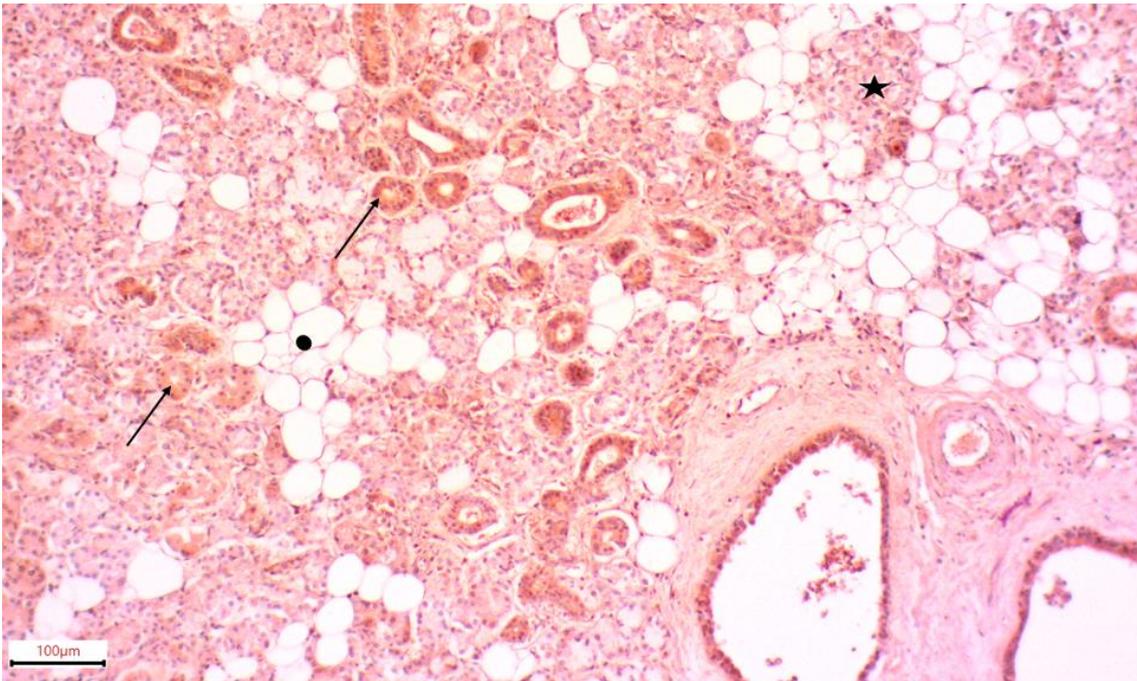


Abbildung 22: Positivkontrolle der Gl. submandibularis des Spenders 5 in 10x Vergrößerung

Alle Ausführungsgänge zeigen eine bräunliche Färbung (s. Pfeile), ebenso die serösen Azini (s. Stern), während die Kerne der Fettzellen (s. Punkt), die mukösen Tubuli und ihre Kerne sowie die Kerne der serösen Azini kein Signal aufweisen.

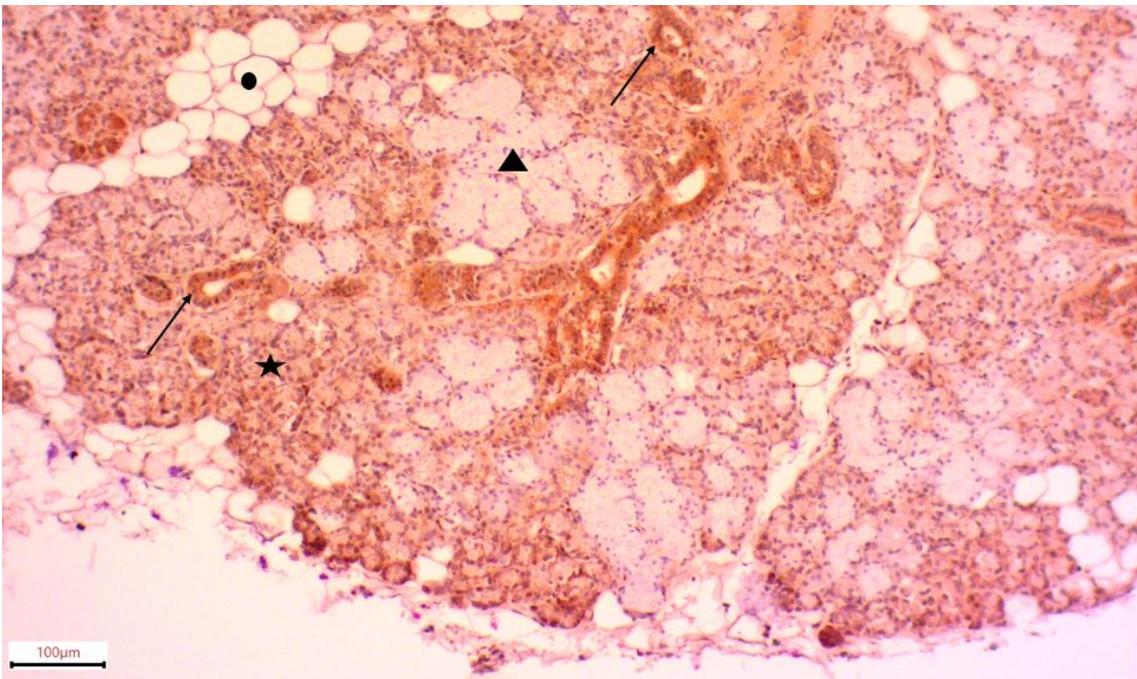


Abbildung 23: Positivkontrolle der Gl. submandibularis des Spenders 4 in 10x Vergrößerung

Alle Ausführungsgänge zeigen eine bräunliche Färbung (s. Pfeile), ebenso die serösen Azini (s. Stern), während die Kerne der Fettzellen (s. Punkt), die mukösen Tubuli und ihre Kerne (s. Dreieck) sowie die Kerne der serösen Azini kein Signal aufweisen.

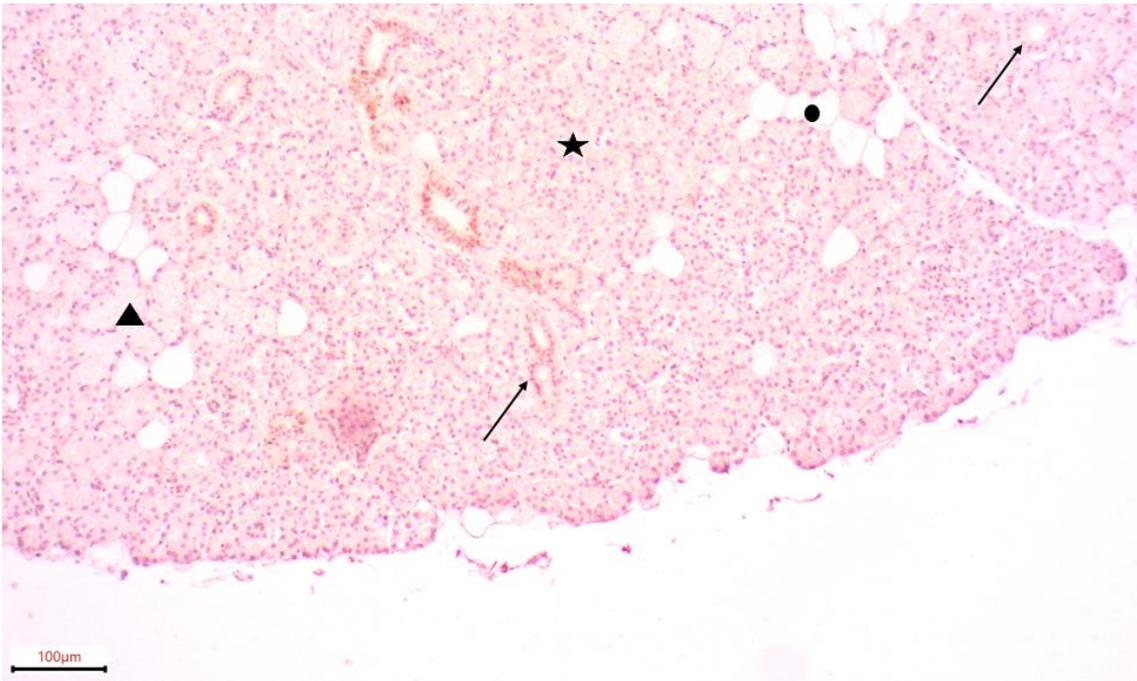


Abbildung 24: Negativkontrolle der Gl. submandibularis des Spenders 4 in 10x Vergrößerung

Entsprechende Negativkontrolle: Die Ausführungsgänge sind nicht mit brauner Farbe markiert (s. Pfeile), ebenso wenig wie die serösen Azini (s. Stern). Auch die Kerne der Fettzellen (s. Punkt), die mukösen Tubuli und ihre Kerne (s. Dreieck) sowie die Kerne der serösen Azini wiesen ebenfalls kein Signal auf.

10.2 Ergebnisse der Glandula lacrimalis

Weiterhin wurden Gewebeproben von vier Tränendrüsen untersucht, wobei ähnlich zu der Glandula submandibularis nach den einzelnen Anteilen nachgeschaut wurde:

- die serösen Azini und ihre Zellkerne,
- die Ausführungsgänge,
- die Zellkerne der Fettzellen.

Auch hier waren Unterschiede in der Intensität bzw. Auslöschungen des Signals in Teilbereichen der Proben festzustellen.

Eine Probe zeigte ein starkes Signal in der IHC, insbesondere die Zellkerne der serösen Azini (Spender 1). Schwache Signale zeigten sich bei allen Proben, bei den Ausführungsgängen und bei den serösen Azini. Bei den Zellkernen der Fettzellen, den serösen Azini und ihren Zellkernen zeigte sich meistens kein Signal (Spender 2 – 3 – 7). Insgesamt gab es auch in diesem Fall kleine wesentlichen Abweichungen zwischen Eigen- und Fremdbeurteilung. In der Fremdauswertung wurden die Ausführungsgänge nun bei einer Probe (Spender 1) als starkes Signal und bei allen anderen Proben als mittleres Signal eingestuft (Spender 2 – 3 – 7). Die serösen Azini wurden bei einer Probe

(Spender 1) als mittleres Signal und bei allen anderen Proben als schwaches Signal eingestuft (Spender 2 – 3 – 7).

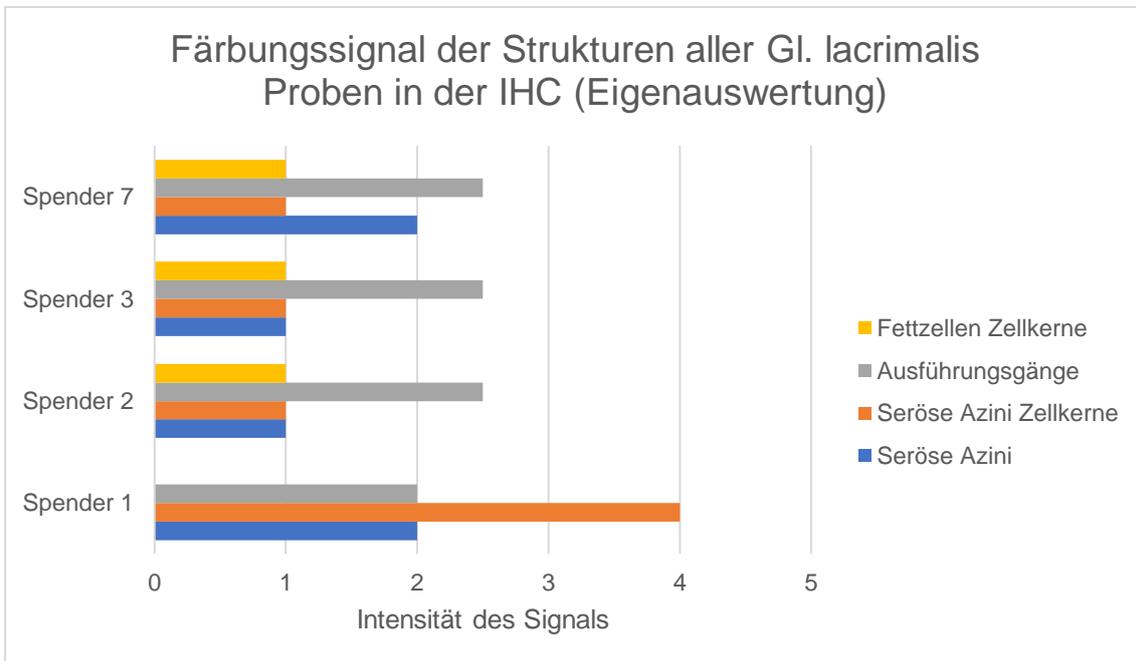


Diagramm 4: Färbungssignal der Strukturen aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC (Eigenauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller Glandula lacrimalis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

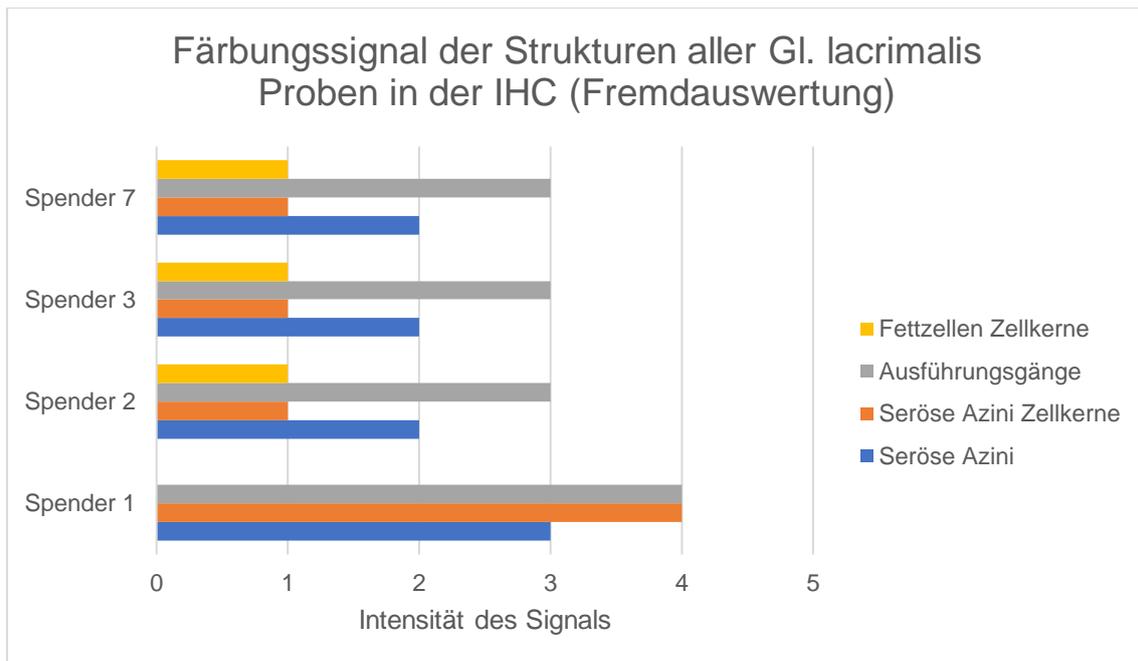


Diagramm 5: Färbungssignal der Strukturen aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC (Fremdauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller Glandula lacrimalis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

Der Nachweis von TRPC6 in gesunden Proben der Glandulae lacrimales mittels IHC konnte gemäß den formulierten Zielen Nr. 1 und 2 (siehe Kapitel 2.7) erfolgreich erbracht werden, und die erhaltenen Resultate sind miteinander kohärent. Basierend auf diesen Befunden lässt sich schließen, dass die Ausführungsgänge die stärksten und besten Ergebnisse erzielten.

Ein repräsentatives Beispiel für das IHC-Ergebnis an Glandulae lacrimales ist in der beigefügten **Abbildungen 25 bis 27** veranschaulicht.

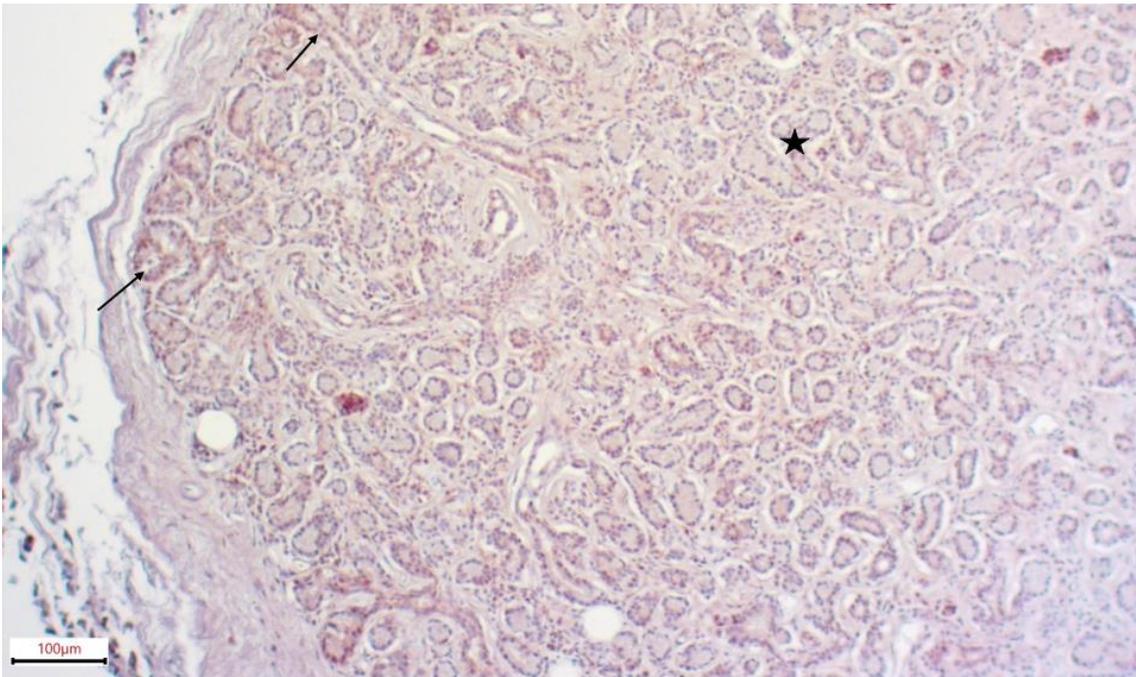


Abbildung 25: Positivkontrolle der Gl. lacrimalis des Spenders 7 in 10x Vergrößerung

Alle Ausführungsgänge zeigen eine bräunliche Färbung (s. Pfeile), ebenso die serösen Azini (s. Stern), während die Kerne der Fettzellen sowie die Kerne der serösen Azini kein Signal aufweisen.

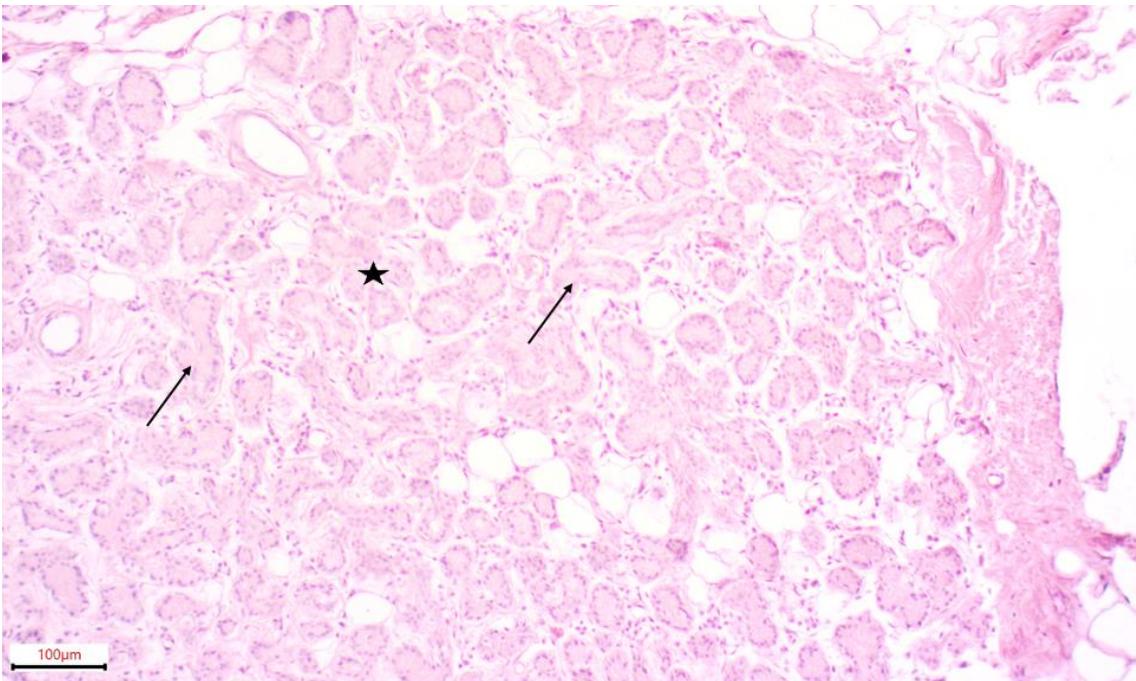


Abbildung 26: Positivkontrolle der Gl. lacrimalis des Spenders 3 in 10x Vergrößerung

Alle Ausführungsgänge zeigen eine bräunliche Färbung (s. Pfeile), ebenso die serösen Azini (s. Stern), während die Kerne der Fettzellen sowie die Kerne der serösen Azini kein Signal aufweisen.

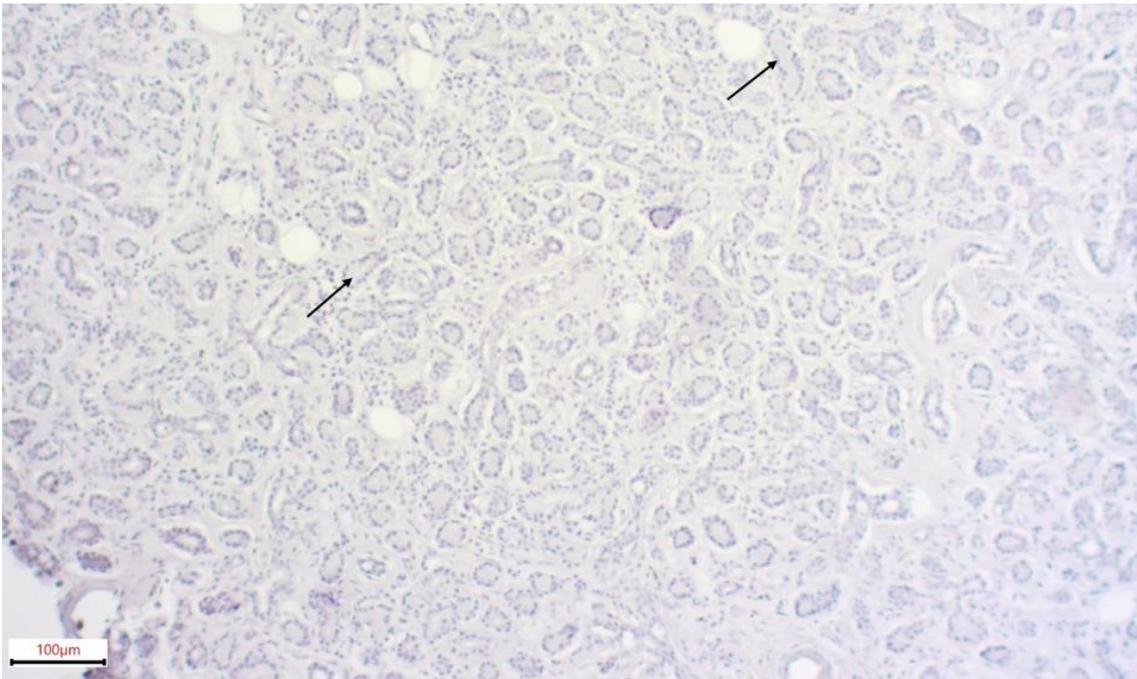


Abbildung 27: Negativkontrolle der Gl. lacrimalis des Spenders 7 in 10x Vergrößerung

Entsprechende Negativkontrolle: Die Ausführungsgänge sind nicht mit brauner Farbe markiert (s. Pfeile), ebenso wenig wie die serösen Azini. Auch die Kerne der Fettzellen sowie die Kerne der serösen Azini wiesen ebenfalls kein Signal auf.

10.3 Gesamtergebnis

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der immunhistochemischen Analyse (IHC) aller untersuchten exokrinen Drüsen, sei es die Glandula submandibularis als Beispiel für eine Speicheldrüse oder die Glandula lacrimalis, ein positives Signal für TRPC6 nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigt den Nachweis von TRPC6 in menschlichem exokrinem Drüsengewebe. Die Ergebnisse zeigten eine kohärente Übereinstimmung sowohl innerhalb jeder untersuchten Gruppe als auch zwischen den verschiedenen Gruppen, obwohl einige Proben leicht schwächere Signale aufwiesen oder bestimmte Bereiche nicht gefärbt waren. Die möglichen Gründe für diese Unterschiede werden im Kapitel V ausführlich erörtert. Diese Erkenntnisse wurden durch eine unabhängige Bewertung zusätzlich bestätigt, die in allen analysierten Proben ein positives Signal ergab. Bezüglich der Einschätzung der Signalstärke wurden keine wesentlichen Abweichungen von den Ergebnissen der eigenen Bewertung festgestellt.

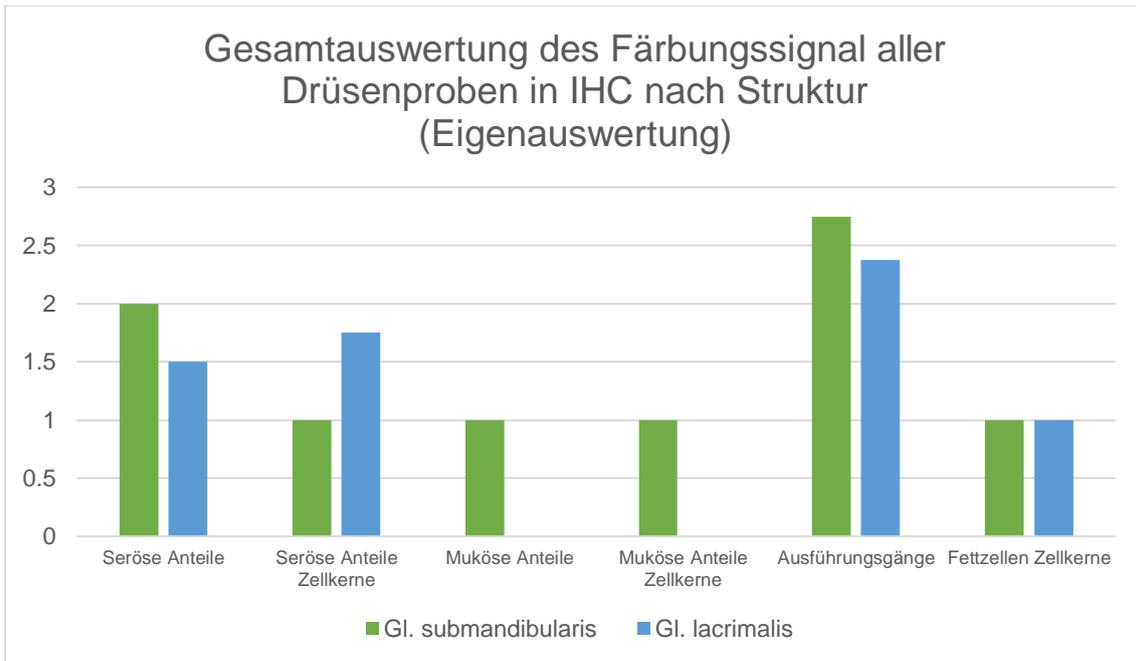


Diagramm 6: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Struktur (Eigenauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Eigenauswertung aller Glandula lacrimalis und Glandula submandibularis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den Drüsen (siehe Legende).

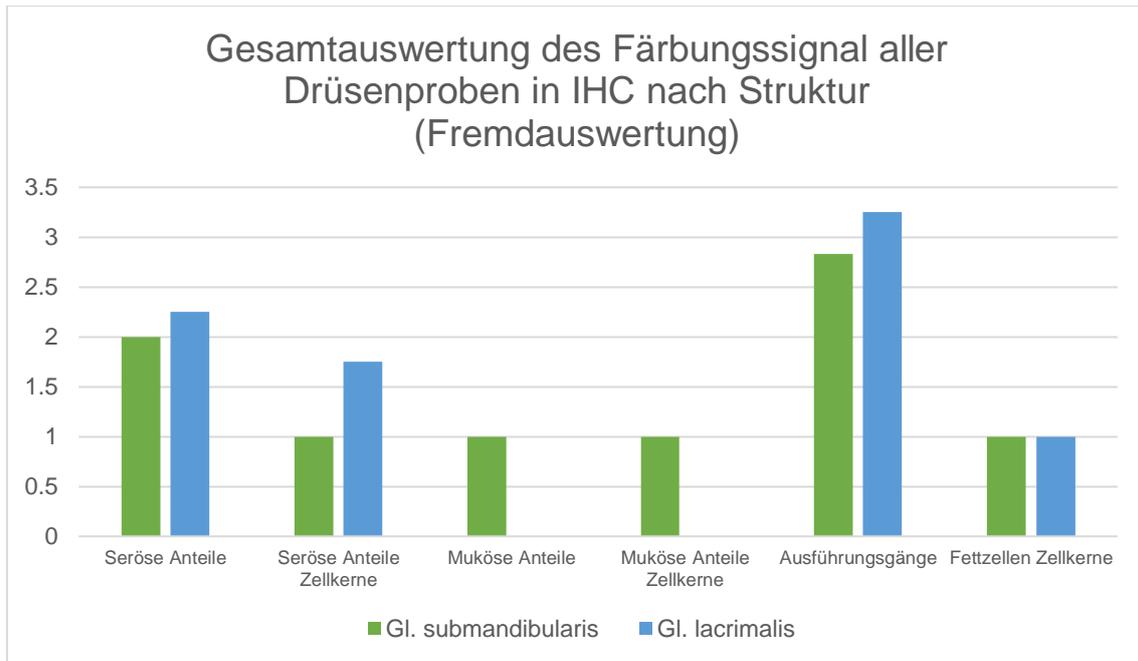


Diagramm 7: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Struktur (Fremdauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Fremdauswertung aller Glandula lacrimalis und Glandula submandibularis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den Drüsen (siehe Legende).

11. Ergebnisse nach dem Geschlecht

Zur Auswertung der Ergebnisse in Abhängigkeit vom Geschlecht wurden drei Proben von weiblichen und vier Proben von männlichen Spendern untersucht. Bei sechs von ihnen wurde die Glandula submandibularis untersucht. Sie stammten von drei weiblichen und drei männlichen Spendern; bei vier von diesen Proben wurde die Glandula lacrimalis untersucht, jeweils von zwei weiblichen und männlichen Spendern. Somit ergab sich insgesamt eine ausgewogene Verteilung.

11.1 Ergebnisse der Glandula submandibularis

In die Untersuchung wurden insgesamt sechs Proben der Glandula submandibularis von drei weiblichen und drei männlichen Spendern einbezogen.

Es wurden geringfügige geschlechtsspezifische Unterschiede in der Signalintensität festgestellt. Bei den weiblichen Proben wies eine ein mittleres und zwei ein schwaches Signal im IHC auf. Alle drei männlichen Proben zeigten nur ein schwaches Signal.

In der Fremdauswertung wurden alle weiblichen Proben als schwach angefärbt eingestuft. Weitere Unterschiede zwischen Fremd- und Eigenauswertung gibt es jedoch nicht.

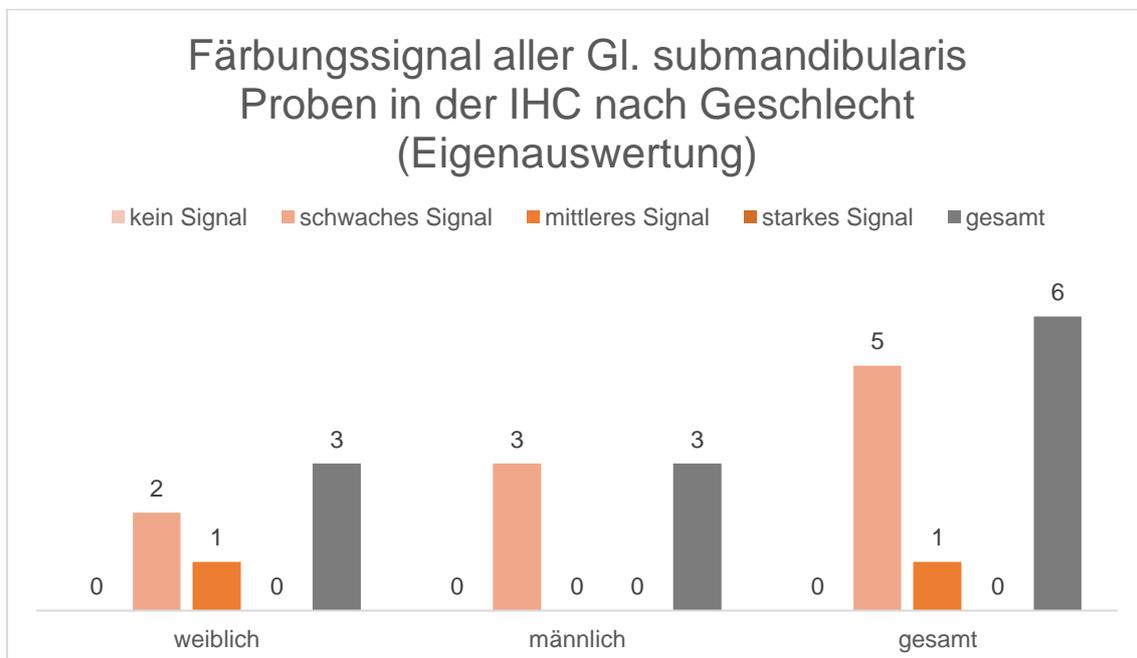


Diagramm 8: Färbungssignal aller Gl. submandibularis Proben in der IHC nach Geschlecht (Eigenauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller Glandula submandibularis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt Anzahl der Spender, die x-

Achse stellt eine Aufteilung in weiblich, männlich und in Gesamt dar. Die Farbcodierung entspricht die Intensität des Signals (siehe Legende).

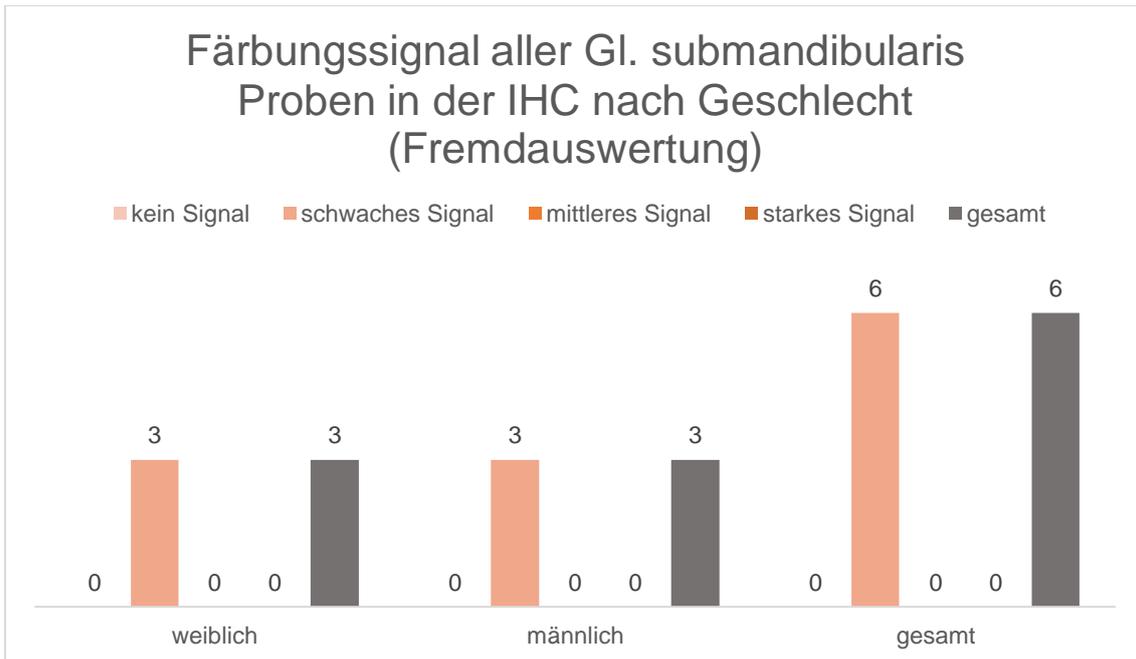


Diagramm 9: Färbungssignal aller Gl. submandibularis Proben in der IHC nach Geschlecht (Fremdauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller Glandula submandibularis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt Anzahl der Spender, die x-Achse stellt eine Aufteilung in weiblich, männlich und in Gesamt dar. Die Farbcodierung entspricht die Intensität des Signals (siehe Legende).

11.2 Ergebnisse der Glandula lacrimalis

In die Untersuchung wurden insgesamt vier Proben der Glandula lacrimalis einbezogen, und zwar jeweils von zwei weiblichen und männlichen Spendern.

In Bezug auf das Geschlecht ergaben sich geringfügige Unterschiede in den Ergebnissen bezüglich der Signalintensität. Beide weiblichen Proben wurde in der IHC mit mittlerem Signal eingestuft, während bei den männlichen Proben bei einer ein schwaches Signal und bei der anderen ein mittleres Signal beobachtet wurde.

In der unabhängigen Fremdauswertung wurde bei den weiblichen Proben nun bei den zwei Proben ein starkes Signal festgestellt, während die männlichen Proben als starkes und mittleres Signal eingestuft werden. Es gibt dementsprechend eine geringfügige Diskrepanz in der Wahrnehmung des Signales zwischen der Eigen- und Fremdauswertung.

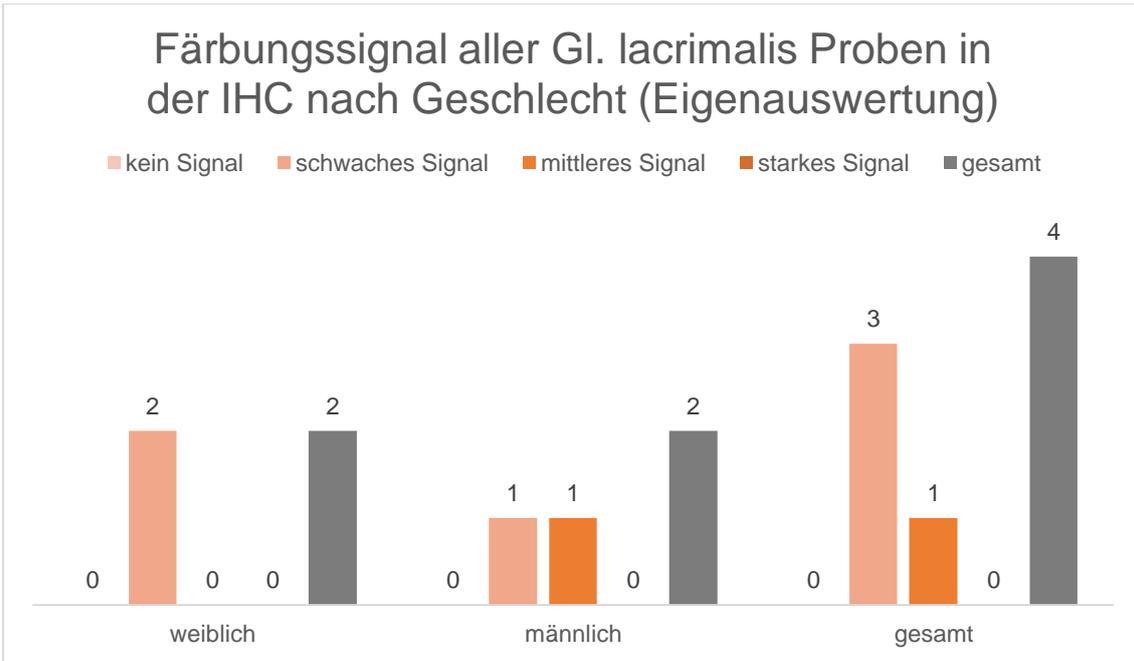


Diagramm 10: Färbungssignal aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC nach Geschlecht (Eigenauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller Glandula lacrimalis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt Anzahl der Spender, die x-Achse stellt eine Aufteilung in weiblich, männlich und in Gesamt dar. Die Farbcodierung entspricht die Intensität des Signals (siehe Legende).

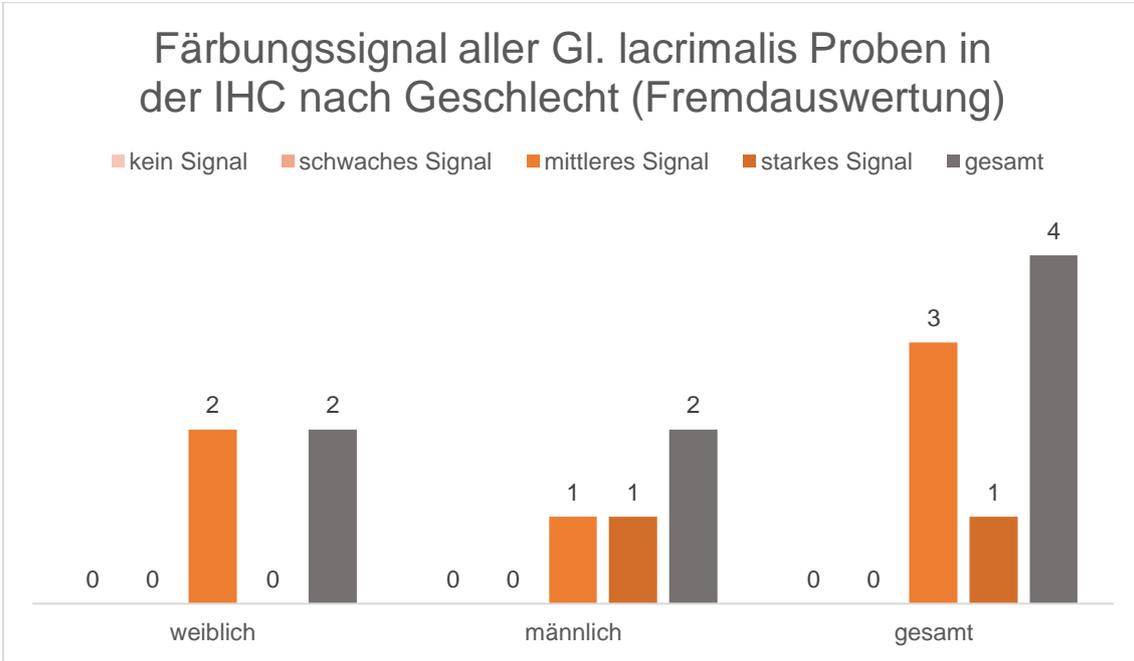


Diagramm 11: Färbungssignal aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC nach Geschlecht (Fremdauswertung)

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller Glandula lacrimalis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt Anzahl der Spender, die x-Achse stellt eine Aufteilung in weiblich, männlich und in Gesamt dar. Die Farbcodierung entspricht die Intensität des Signals (siehe Legende).

11.3 Gesamtergebnis

In der Auswertung der weiblichen Gruppe wurden in der IHC ausschließlich positive Signale festgestellt. Von den fünf untersuchten Proben zeigte eine ein mittleres Signal, während vier Proben ein schwaches Signal aufwiesen. Bei den fünf Gewebeproben der männlichen Spender wurde ebenfalls in der IHC durchweg ein positives Signal beobachtet. Eine Probe wies ein mittleres Signal auf, während die übrigen Proben ein schwaches Signal zeigten. Es gab jedoch eine Abweichung zwischen der eigenen Auswertung und der unabhängigen Fremdauswertung. In der Fremdauswertung wurden bei der weiblichen Gruppe von den fünf Proben zwei mit einem mittleren Signal und drei mit einem schwachen Signal bewertet. Während in der männlichen bei den Männern von den fünf Proben eine mit einem starken Signal, eine mit einem mittleren Signal und drei mit einem schwachen Signal eingestuft wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gemäß dem Ziel Nr. 3 (Kapitel 2.7) keine wesentlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede in Bezug auf die IHC festgestellt werden konnten.

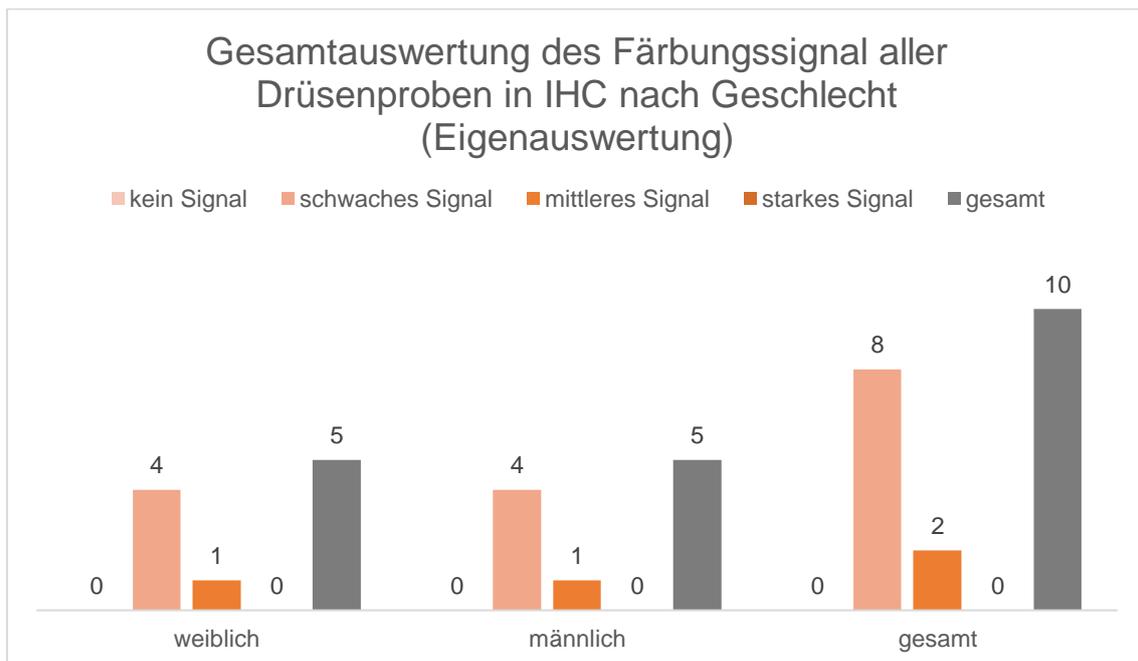


Diagramm 12: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Geschlecht (Eigenauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Eigenauswertung aller Glandula submandibularis und lacrimalis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt Anzahl der Spender, die x-Achse stellt eine Aufteilung in weiblich, männlich und in Gesamt dar. Die Farbcodierung entspricht die Intensität des Signals (siehe Legende).

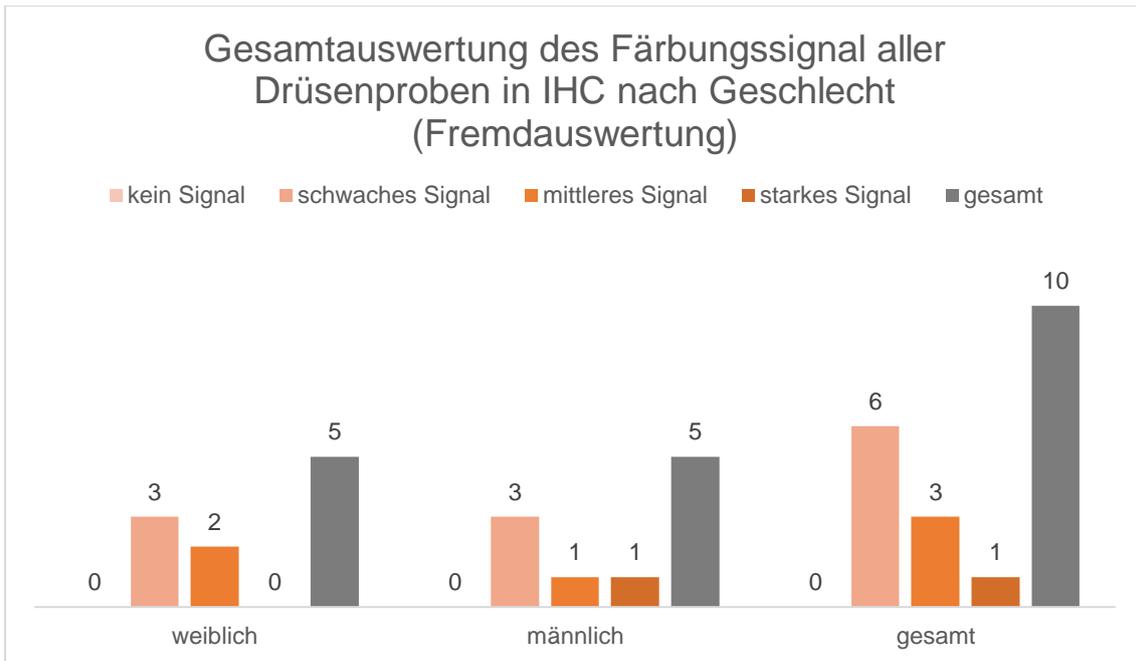


Diagramm 13: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Geschlecht (Fremdauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Fremdauswertung aller Glandula submandibularis und lacrimalis Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt Anzahl der Spender, die x-Achse stellt eine Aufteilung in weiblich, männlich und in Gesamt dar. Die Farbcodierung entspricht die Intensität des Signals (siehe Legende).

12. Ergebnisse nach Karzinom der Gl. submandibularis

Diese Arbeit stützt sich, wie anfangs erläutert, neben der physiologischen Glandula submandibularis auch auf Gewebeproben von Tumoren dieser Drüse. Wir haben zwei Arten von bösartigen Veränderungen der Glandula submandibularis untersucht: das adenoid-zystische Karzinom (ACC) und das Mukoepidermoidkarzinom (MEC). Die Resultate der verschiedenen Spendergruppen werden in diesem Abschnitt vorgestellt und abschließend in einem Vergleich zusammengefasst.

12.1 Ergebnisse des adenoidzystischen Karzinoms

Insgesamt wurden fünf Proben des adenoid-zystischen Karzinoms der Glandula submandibularis in die Untersuchung aufgenommen, unter Berücksichtigung verschiedener Gewebeanteile. Wie bei den physiologischen Proben waren dies die serösen Azini, die Zellkerne dieser Azini, die mukösen Tubuli und ihre Zellkerne sowie die Ausführungsgänge, unterteilt in Schalt- und Streifenstücke, und die Zellkerne der Fettzellen, sofern diese Anteile im erkrankten Gewebe vorhanden waren. Ferner wurde das Tumorgewebe als Ganzes untersucht, genauer die Tumorzellen und ihr Zytoplasma selbst sowie ihre Zellkerne.

Zuerst betrachteten wir die typischen Anteile einer Unterkieferspeicheldrüse, bei denen die Ergebnisse in Bezug auf die Signalintensität variierten. Eine Probe zeigte ein starkes Signal in der IHC, insbesondere die Schalt- und Streifenstücke (Spender B), sowie ein schwaches Signal in den Zellkernen der serösen Azini. In den anderen Drüsenstrukturen bei diesem Spender zeigte sich kein Signal. Die Zellkerne der Fettzellen zeigten bei der Probe des Spenders A ein schwaches Signal. Die anderen Spenderproben zeigten jedoch keine der typischen Drüsenstrukturen, d.h. kein Signal, da sie vollständig mit Tumorgewebe durchsetzt waren. Ihre Signalintensität konnte daher nicht untersucht werden.

In Bezug auf das Tumorgewebe wurde bei vier der fünf Proben eine positive IHC-Färbung festgestellt, bei drei Proben war das Signal mittelstark (Spender A – B – C) und bei der letzten Probe schwach (Spender E). Die stärkste Signalintensität wurde bei drei Proben (Spender A – B – C) in den Zellkernen der tumorösen Zellen festgestellt. Das Zytoplasma der Tumorzellen der gleichen Proben zeigte ein mittleres Signal. Die Probe von Spender D zeigte im Allgemeinen keine positive Färbung.

Nun wurden in der Fremdauswertung die Zellkerne der Tumorzellen nur bei einer Probe (Spender B) als starkes Signal, das Zytoplasma der Tumorzellen nur bei einer Probe (Spender B) als mittleres Signal und das Tumorgewebe generell nur bei drei Proben als

positiv bewertet, da in der Probe von Spender E laut Beurteilung kein Signal erzeugt wurde.

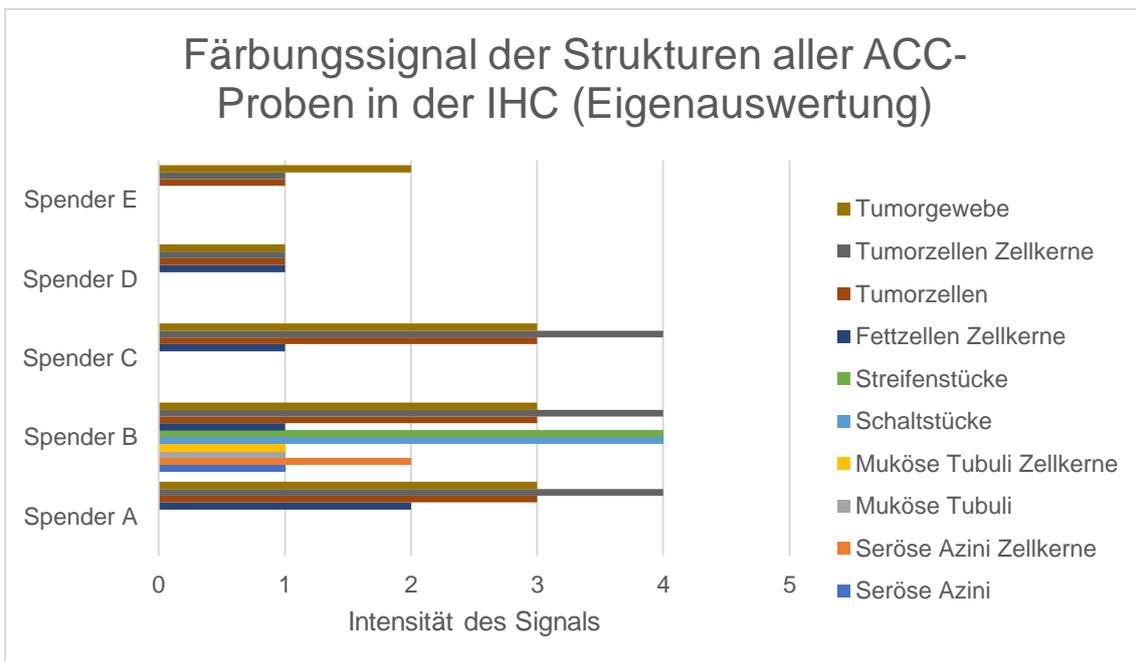


Diagramm 14: Färbungssignal der Strukturen aller adenoid-zystischen Karzinomproben in der IHC (Eigenauswertung)

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Fremdauswertung der in der Arbeit verwendeten ACC-Proben in der IHC. Auf der y-Achse sind die Gewebestrukturen, auf der x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

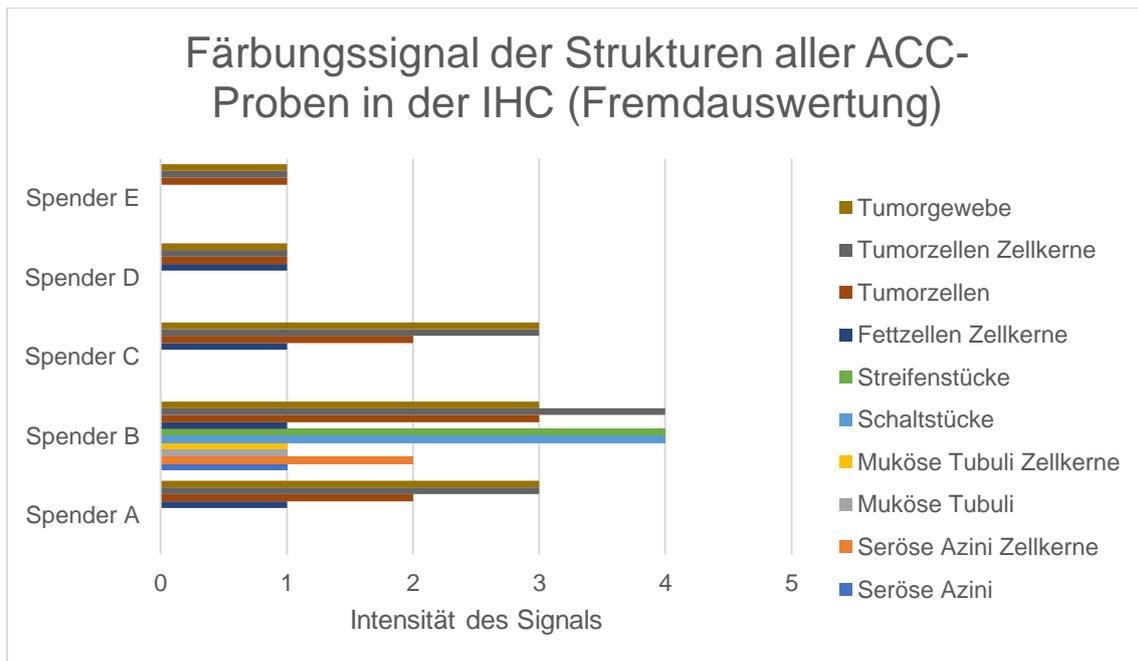


Diagramm 15: Färbungssignal der Strukturen aller adenoid-zystischen Karzinomproben in der IHC (Fremdauswertung)

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Fremdauswertung der in der Arbeit verwendeten ACC-Proben in der IHC. Auf der y-Achse sind die Gewebestrukturen, auf der x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

Somit konnte der Nachweis von TRPC6 in Proben von malignen Veränderungen der Glandula submandibularis, wie dem ACC, mittels IHC entsprechend der Zielsetzungen Nr. 4 und 5 (Kapitel 2.7) bestätigt werden und die erhaltenen Ergebnisse sind auch untereinander konsistent. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das Tumorgewebe, insbesondere die Zellkerne der Tumorzellen, die stärksten bzw. besten Färbeergebnisse zeigen.

Das Ergebnis der IHC am ACC ist beispielhaft in den beiliegenden **Abbildungen 28 bis 32** dargestellt.

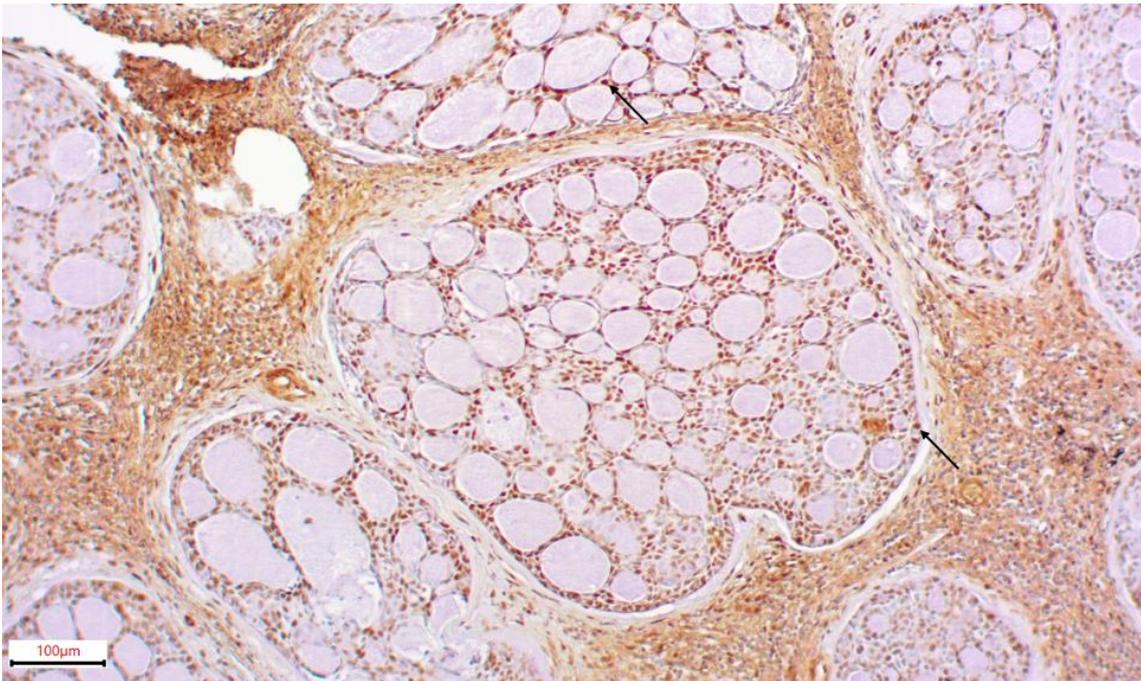


Abbildung 28: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender A in 10x Vergrößerung

Das Tumorgewebe weist eine bräunliche Färbung auf, insbesondere die Zellkerne der Tumorzellen (s. Pfeile). Das Zytoplasma der Tumorzellen ist ebenfalls gefärbt. Andere Strukturen sind nicht erkennbar.

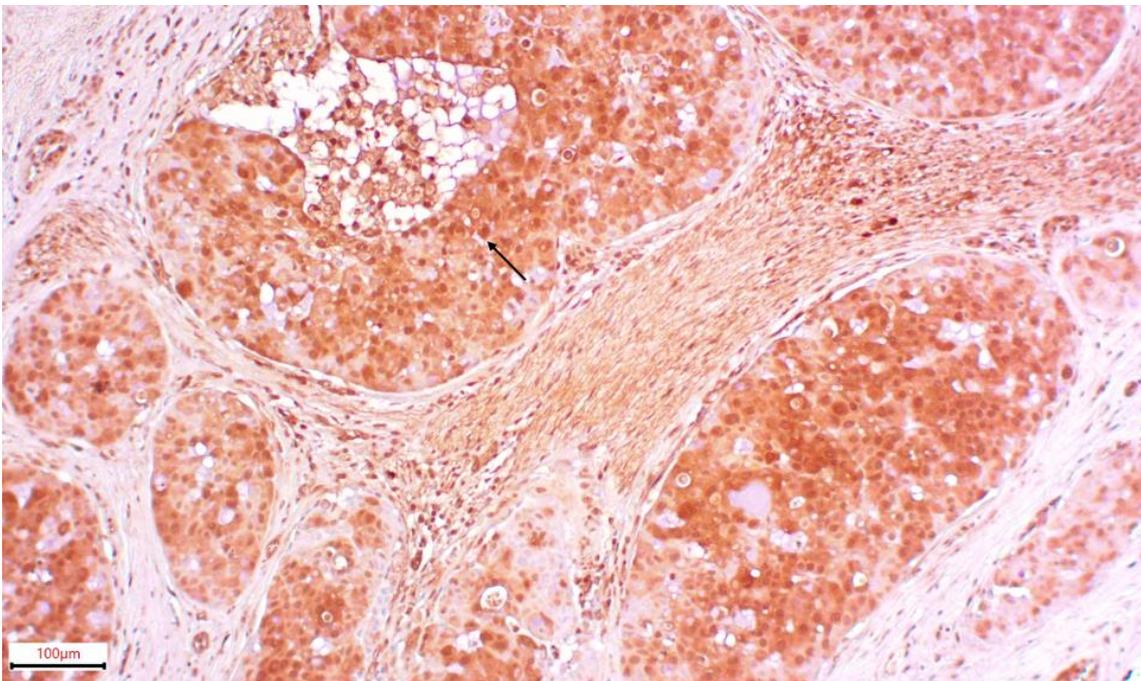


Abbildung 29: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender B in 10x Vergrößerung

Sämtliche Ausführungsgänge sind bräunlich gefärbt, ebenso die Zellkerne der Tumorzellen (s. Pfeil). Die Kerne der serösen Azinien zeigen Färbung, während die serösen Azini selbst, die Fettzellen und ihre Kerne keine Färbung aufweisen. Andere Strukturen sind nicht vorhanden.

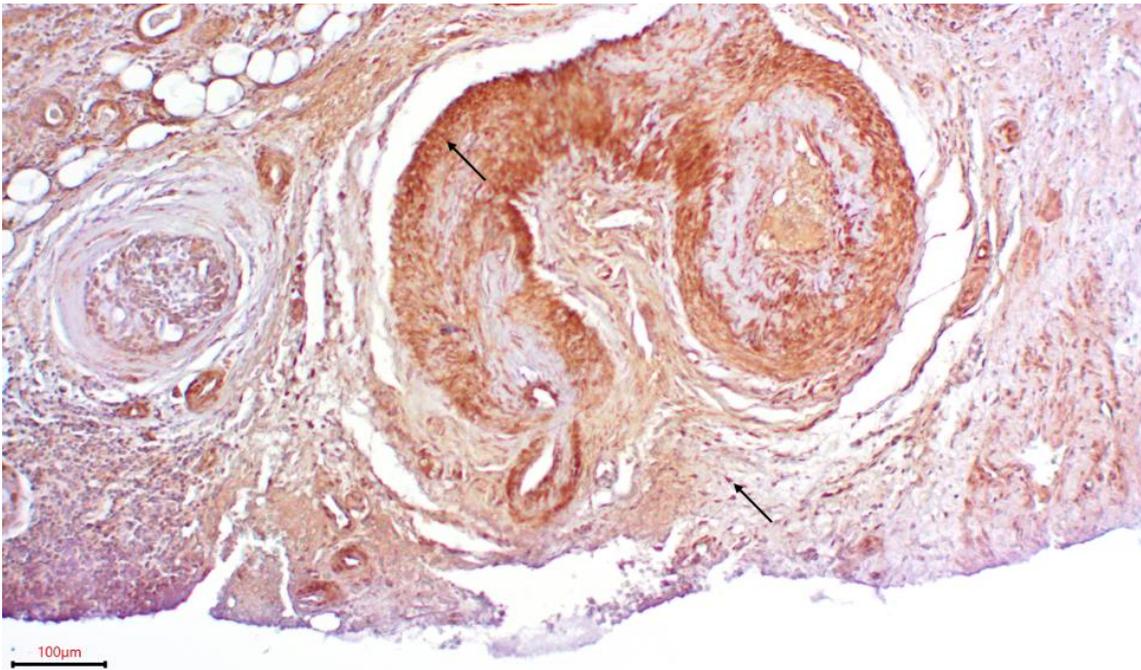


Abbildung 30: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender C in 10x Vergrößerung

Das Tumorgewebe ist bräunlich gefärbt, insbesondere die Zellkerne der Tumorzellen (s. Pfeil) und ihr Zytoplasma. Andere Strukturen sind nicht vorhanden.

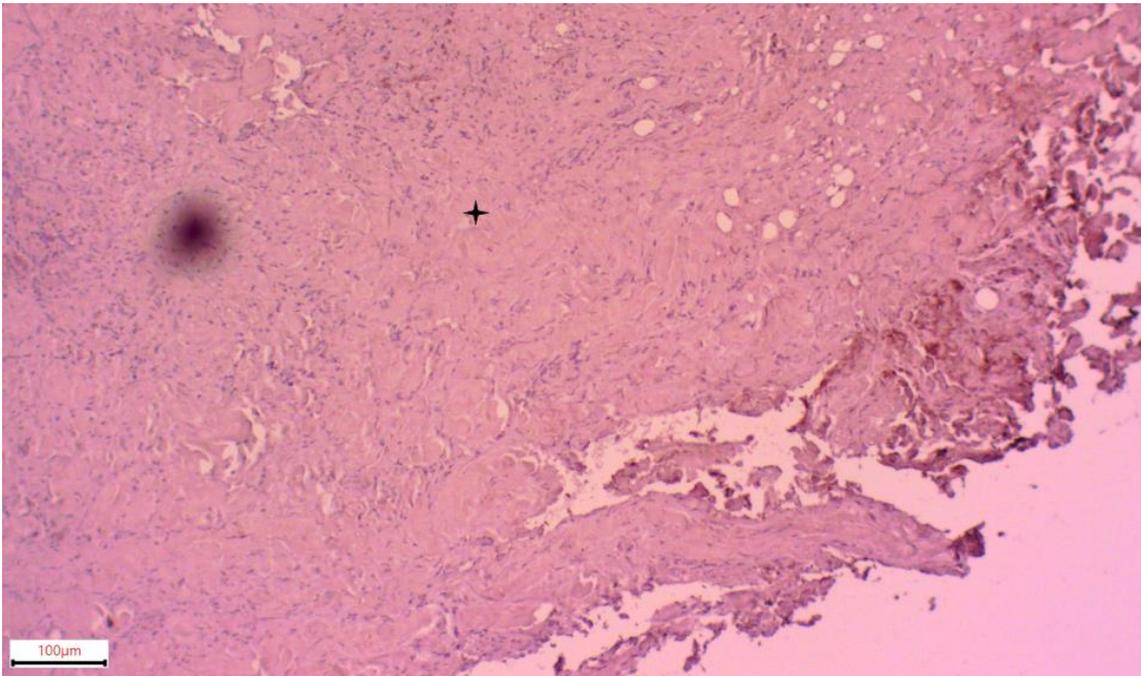


Abbildung 31: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender D in 10x Vergrößerung

Das Tumorgewebe weist keinerlei bräunliche Färbung auf (s. vierzackiger Stern). Es sind keine anderen Strukturen vorhanden.

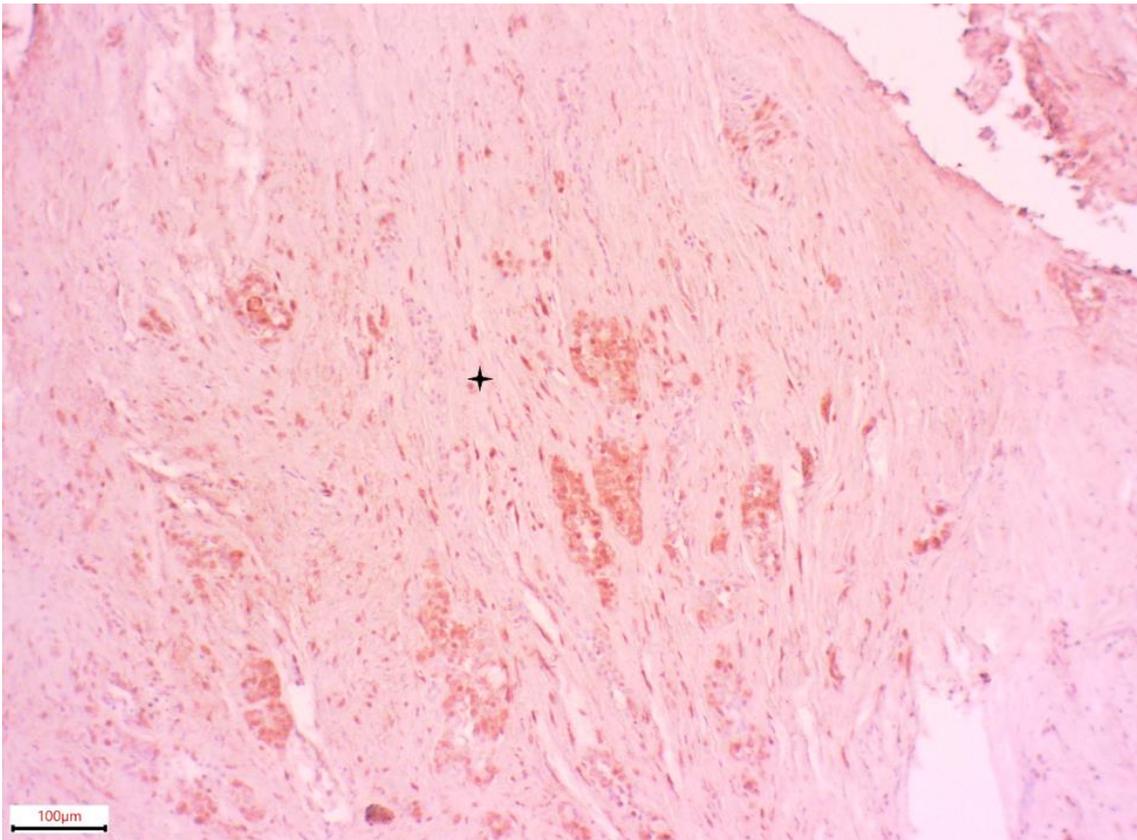


Abbildung 32: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender E in 10x Vergrößerung

Das Tumorgewebe zeigt im Allgemeinen kaum eine bräunliche Färbung (s. vierzackiger Stern). Es sind keine anderen Strukturen vorhanden.

12.2 Ergebnisse des Mukoepidermoidkarzinoms

Es wurde nur eine Probe des Mukoepidermoidkarzinoms der Glandula submandibularis (Spender F) in die Untersuchung einbezogen, wobei ähnlich wie bei der Bewertung des ACC verschiedene Gewebeanteile berücksichtigt wurden.

Es wurden zunächst die typischen Anteile einer Unterkieferspeicheldrüse untersucht, wobei nur die Zellkerne der Fettzellen als einzige Vertreter dargestellt wurden und kein Signal erzeugten.

In Bezug auf das Tumorgewebe wurden Signalintensitäten der IHC festgestellt. Das Tumorgewebe im Allgemeinen wurde mit einem starken Signal eingestuft, ebenso die Zellkerne der Tumorzellen. Das Zytoplasma der Tumorzellen wurde mit einem mittleren Signal bewertet.

Die Fremdauswertung wies keine Unterschiede zur Eigenauswertung auf.

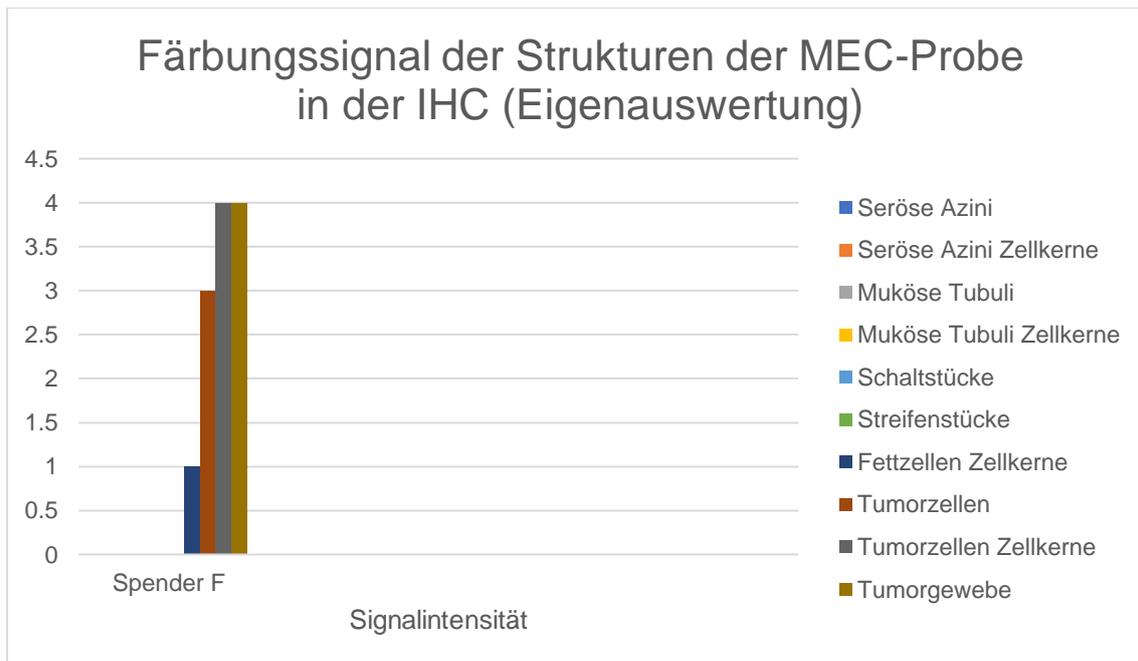


Diagramm 16: Färbungssignal der Strukturen der Mukoepidermoidkarzinomprobe in der IHC (Eigenauswertung)

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Eigenauswertung der in der Arbeit verwendete MEC-Probe in der IHC. Auf der y-Achse sind die Gewebestrukturen, auf der x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

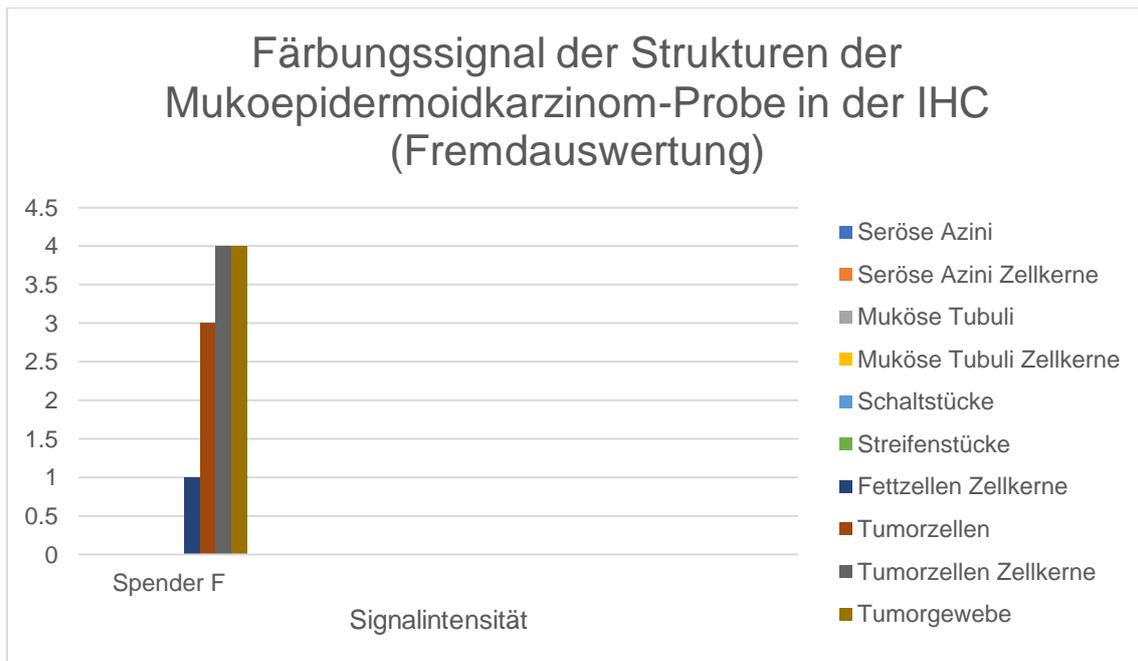


Diagramm 17: Färbungssignal der Strukturen Mukoepidermoidkarzinomprobe in der IHC (Fremdauswertung)

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Fremdauswertung der in der Arbeit verwendete MEC-Probe in der IHC. Auf der y-Achse sind die Gewebestrukturen, auf der x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Strukturen in der Drüse (siehe Legende).

Damit konnte der TRPC6-Nachweis in Proben von malignen Veränderungen der Glandula submandibularis, hier dem MEC, mittels IHC gemäß den Zielen 4 und 5 (Kapitel 2.7) verifiziert werden und die erhaltenen Ergebnisse sind auch untereinander konsistent. Basierend auf diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass das Tumorgewebe, insbesondere die Zellkerne der Tumorzellen, die stärksten bzw. besten Färbeergebnisse zeigen.

Das Ergebnis der IHC am MEC ist in der **Abbildung 33** beispielhaft zu sehen.

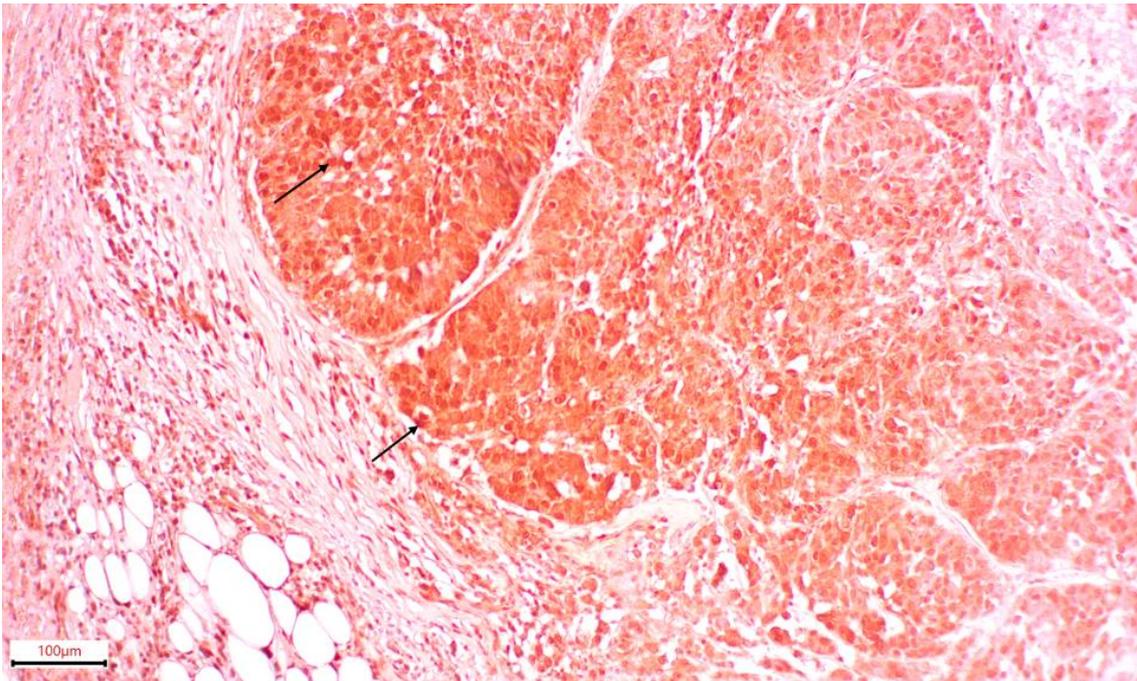


Abbildung 33: Positivkontrolle des Mukoepidermoidkarzinoms bei Spender F in 10x Vergrößerung

Das Tumorgewebe zeigt bräunlich gefärbte Kerne der Tumorzellen (siehe Pfeile) sowie bräunlich gefärbtes Zytoplasma. Fettzellen zeigen kein Signal und sonstige Strukturen fehlen.

12.3 Gesamtergebnisse

Zusammenfassend konnte in vier der sechs untersuchten Tumoren der Glandula submandibularis, sowohl ACC als auch MEC, in der immunhistochemischen Analyse (IHC) ein positives Signal für TRPC6 nachgewiesen werden. Dies bestätigt den Nachweis von TRPC6 in humanen Kopfspeicheldrüsentumoren. Die Ergebnisse zeigten eine kohärente Übereinstimmung sowohl innerhalb jeder untersuchten Gruppe als auch zwischen den verschiedenen Gruppen, obwohl einige Proben leicht schwächere Signale aufwiesen oder bestimmte Bereiche nicht gefärbt waren. Der Grund für das Fehlen eines Signals in einer Probe im Vergleich zu einer anderen Probe des gleichen Tumortyps kann in der Tumordiversität liegen. Diese bezieht sich auf die Vielfalt der Tumorzellen innerhalb eines Tumors oder zwischen Tumoren desselben Typs bei verschiedenen Patienten. In Kapitel V werden die Ursachen für diese Unterschiede ausführlich diskutiert. Diese Ergebnisse wurden durch eine zusätzliche unabhängige Auswertung unterstützt, die für vier der sechs untersuchten Proben ein positives Signal ergab. Bei der Beurteilung der Signalstärke wurden keine signifikanten Diskrepanzen zu den Ergebnissen der eigenen Beurteilung festgestellt.

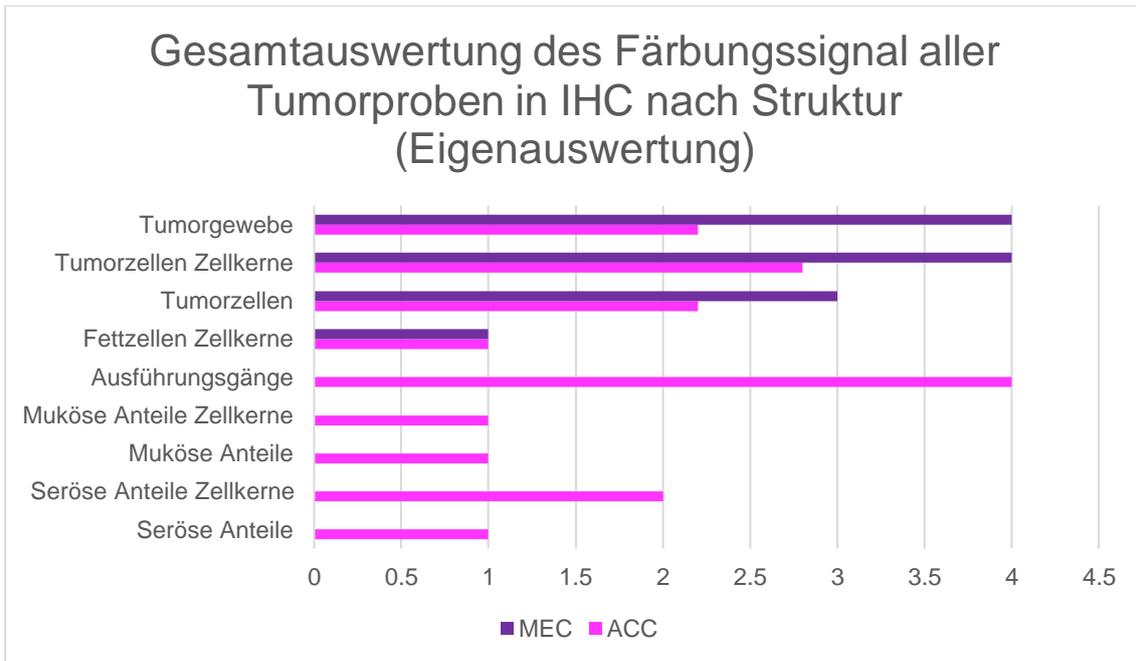


Diagramm 18: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Tumorproben der Glandula submandibularis in IHC nach Struktur (Eigenauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Eigenauswertung aller ACC- und MEC-Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Tumortypen (siehe Legende).

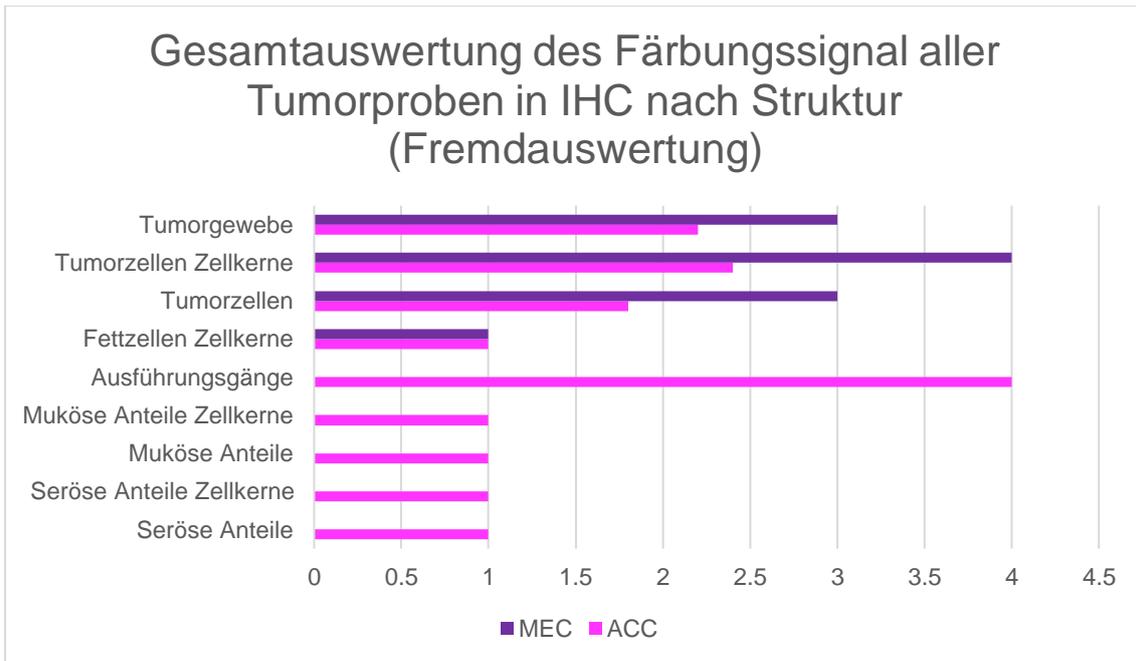


Diagramm 19: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Tumorproben der Glandula submandibularis in IHC nach Struktur (Fremdauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Fremdauswertung aller ACC- und MEC-Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung entspricht den verschiedenen Tumortypen (siehe Legende).

13. Ergebnisse nach Gewebequalität: gesund vs. tumorös

Wir haben uns jeweils mit den Ergebnissen von gesunden Proben der Glandula submandibularis und den Ergebnissen von zwei Arten von Tumoren dieser Drüse, dem ACC und dem MEC, in der IHC beschäftigt. Diese Ergebnisse wurden nun miteinander verglichen. Die daraus resultierenden Schlussfolgerungen werden in diesem Kapitel dargestellt und anschließend in einem Vergleich zusammengefasst.

Insgesamt wurden acht Proben der gesunden Glandula submandibularis, vier Proben der gesunden Glandula lacrimalis und sechs Proben von ACC und MEC der Gl. submandibularis in die Auswertung aufgenommen, unter Berücksichtigung verschiedener Gewebeanteile und ihrer Signalintensität in der IHC. Zu diesen gehörten, wie bereits in den letzten Kapiteln genannt, die serösen Azini, die Zellkerne dieser Azini, die mukösen Tubuli und ihre Zellkerne sowie die Ausführungsgänge und die Zellkerne der Fettzellen. Darüber hinaus wurde das Tumorgewebe untersucht, insbesondere das Zytoplasma der Tumorzellen und deren Zellkerne.

13.1 Vergleich der einzelnen gesunden Drüsen mit den einzelnen Tumoren

Die Ergebnisse der Signalintensität waren je nach Drüsen- und Tumoranteil unterschiedlich.

Die Strukturen mit der intensivsten Signalintensität in der IHC waren die Ausführungsgänge in den gesunden Drüsen und im ACC (diese Struktur fehlt im MEC). Es folgt das Tumorgewebe mit dem Zytoplasma und den Zellkernen der Tumorzellen, die ebenfalls stark angefärbt waren, insbesondere im MEC. Diesbezüglich war das Signal schwächer bei dem ACC. Schwächere Signale fanden sich in den serösen Azini der gesunden Drüsen, speziell der Glandula submandibularis, sowie in den Zellkernen dieser Zellen, vorwiegend im ACC. Die mukösen Tubuli und ihre Zellkerne zeigten im Allgemeinen kein Signal oder fehlten. Die Zellkerne der Fettzellen zeigten generell kein Signal.

In der Fremdauswertung wurden die stärksten Signale an den gleichen Strukturen bewertet. Es zeigten sich kleine Unterschiede in der Beurteilung, u.a. wurden die Signale der Gl. lacrimalis in den serösen Azini und den Ausführungsgängen als etwas intensiver eingestuft als bei der Eigenauswertung. Im ACC hingegen wurden die Signale der Tumorzellen und ihrer Zellkerne als schwächer eingestuft. Dies sind jedoch keine signifikanten Abweichungen.

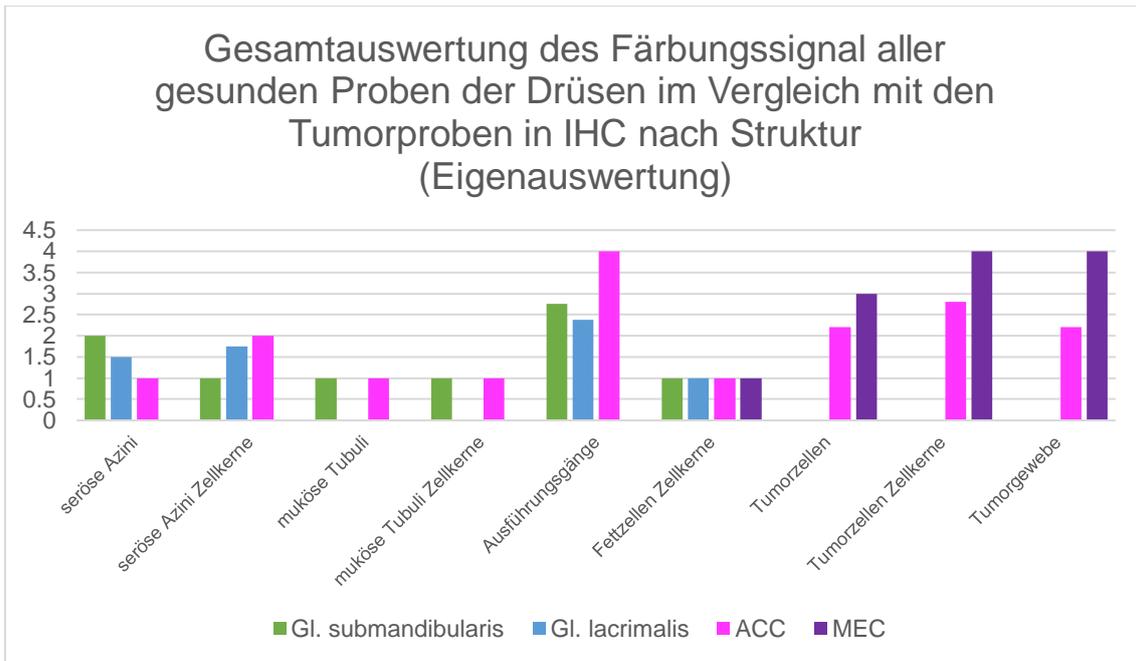


Diagramm 20: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Gl. submandibularis und Gl. lacrimalis im Vergleich mit den Tumorproben in IHC nach Struktur (Eigenauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Eigenauswertung aller gesunden Proben der Gl. Submandibularis und lacrimalis, sowie ACC- und MEC-Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung gibt an, ob es sich um physiologisches Gewebe oder um einen Tumor handelt (siehe Legende).

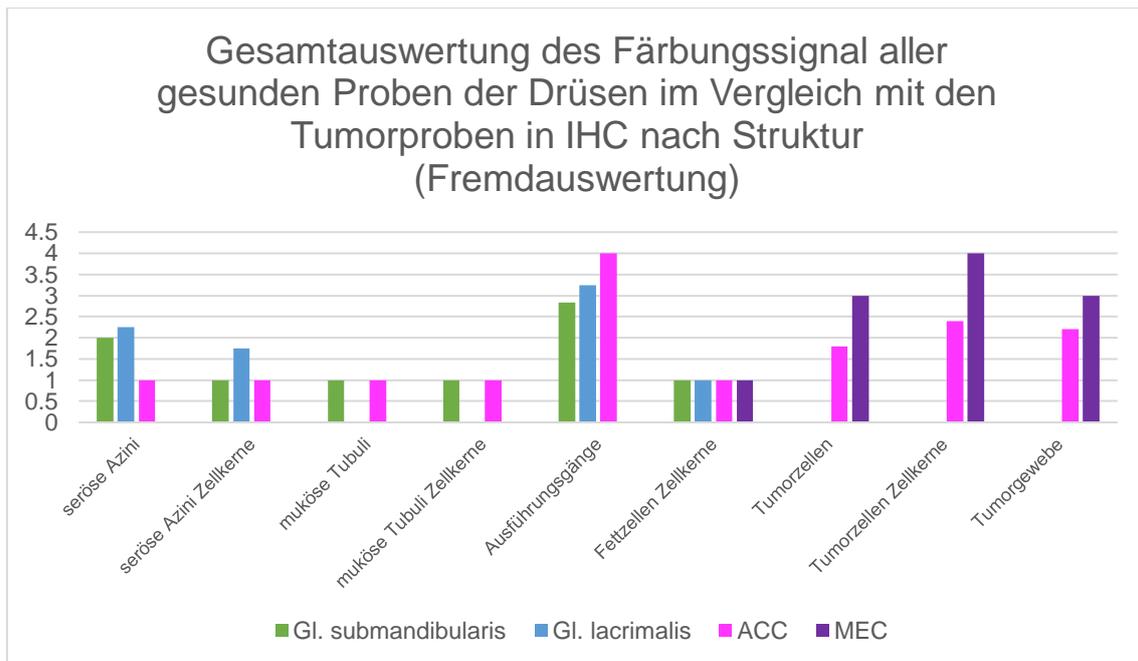


Diagramm 21: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Gl. submandibularis und Gl. lacrimalis im Vergleich mit den Tumorproben in IHC nach Struktur (Fremdauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Fremdauswertung aller gesunden Proben der Gl. Submandibularis und lacrimalis, sowie ACC- und MEC-Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung gibt an, ob es sich um physiologisches Gewebe oder um einen Tumor handelt (siehe Legende).

13.2 Globaler Vergleich zwischen gesundem und tumorösem Gewebe

Die Ergebnisse der Signalintensität waren je nach Drüsen- und Tumoranteil unterschiedlich.

Auch hier erkennt man, dass die am intensivsten gefärbten Gewebestrukturen, d.h. mit der stärksten Signalintensität, die Ausführungsgänge sind, insbesondere in den Tumoren. Bei den Tumoren folgen die Zellkerne der Tumorzellen, das Tumorgewebe im Allgemeinen und dann das Zytoplasma der Tumorzellen. Schließlich waren noch die Zellkerne der serösen Azini schwach angefärbt.

Bei gesunden Drüsen zeigen die Ausführungsgänge das stärkste Signal, gefolgt von den serösen Azini und deren Zellkernen.

In der Fremdauswertung wurde keine wesentliche Abweichung zu der oben beschriebenen Eigenbeurteilung festgestellt.

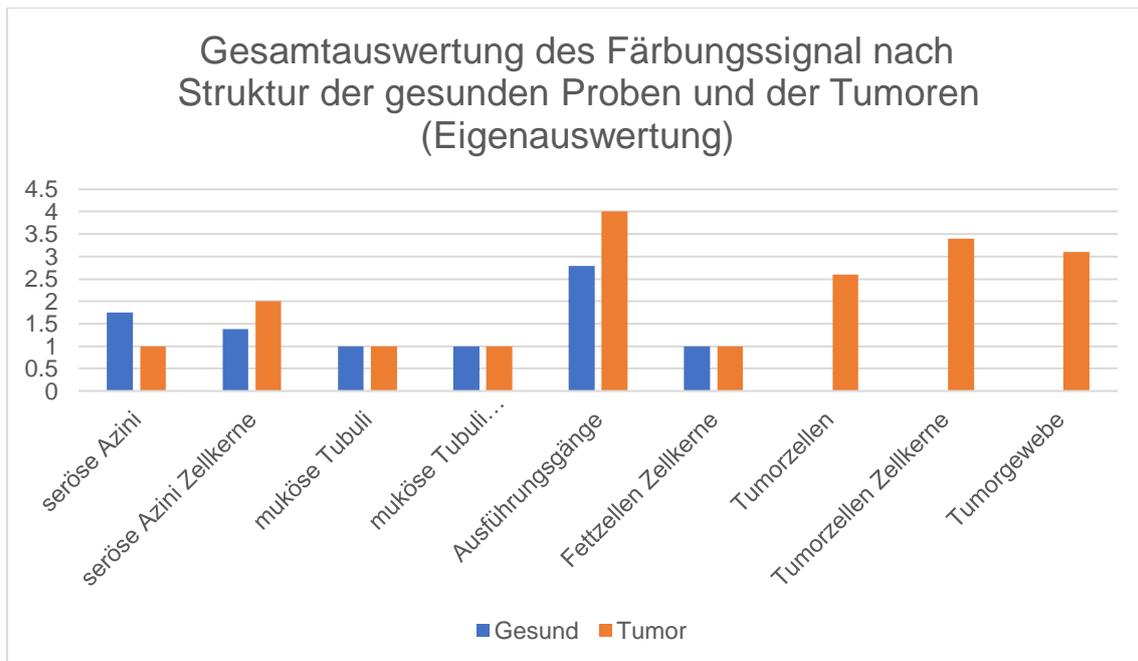


Diagramm 22: Globale Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Drüsen im Vergleich mit den Tumorproben der Gl. submandibularis in IHC nach Struktur (Eigenauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Eigenauswertung aller gesunden Proben der Gll. Submandibularis und lacrimalis, sowie ACC- und MEC-Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Der Einfachheit halber wird hier die Gesamtheit der gesunden Proben direkt mit den Tumorproben verglichen. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung gibt an, ob es sich um physiologisches Gewebe oder um einen Tumor handelt (siehe Legende).

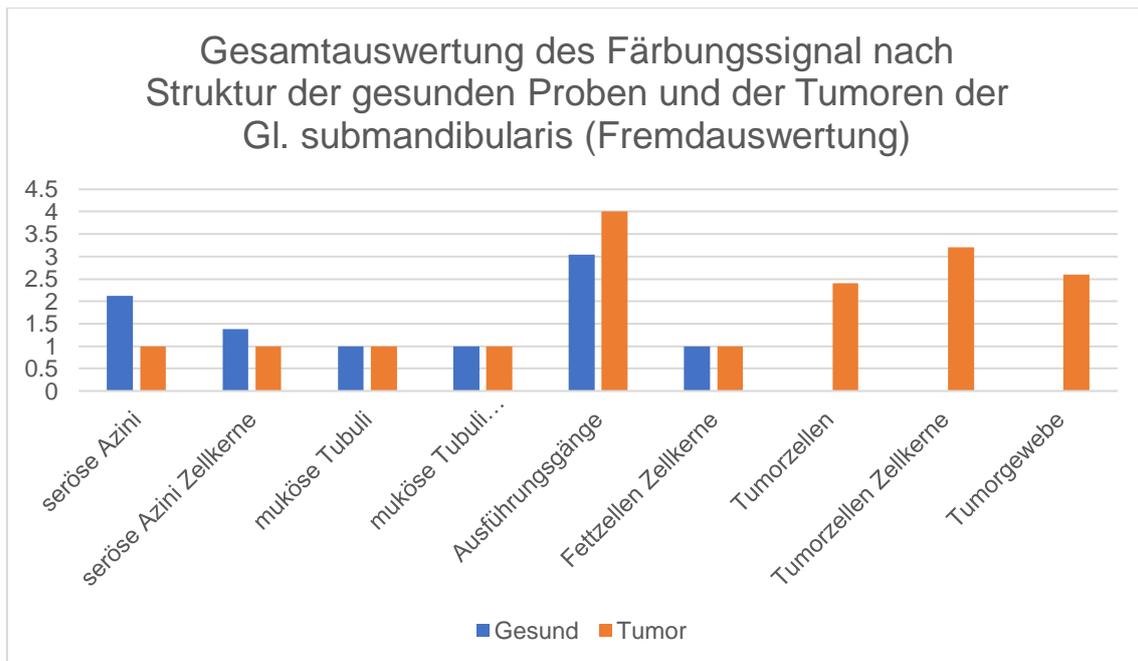


Diagramm 23: Globale Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Drüsen im Vergleich mit den Tumorproben der Gl. submandibularis in IHC nach Struktur (Fremdauswertung)

Im Diagramm ist das Gesamtergebnis der Fremdauswertung aller gesunden Proben der Gll. Submandibularis und lacrimalis, sowie ACC- und MEC-Proben, die in der Arbeit verwendet wurden, in der IHC. Der Einfachheit halber wird hier die Gesamtheit der gesunden Proben direkt mit den Tumorproben verglichen. Die y-Achse zeigt die Gewebestrukturen, die x-Achse die Signalintensität nach Zahl: sie werden von 1 bis 4 eingeteilt (0= Struktur fehlt, 1=kein Signal, 2=schwaches Signal, 3=mittleres Signal und 4=starkes Signal). Die Farbcodierung gibt an, ob es sich um physiologisches Gewebe oder um einen Tumor handelt (siehe Legende).

Damit konnten Unterschiede im TRPC6-Nachweis zwischen Proben von malignen Veränderungen der Glandula submandibularis und gesundem Drüsengewebe mittels IHC gemäß dem Ziel 6 (Kapitel 2.7) verifiziert werden und die erhaltenen Ergebnisse sind auch untereinander konsistent.

V. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war der immunhistochemische Nachweis des TRPC6 Ionenkanals in humanem, exokrinen, gesunden Drüsengewebe der Glandulae submandibularis und lacrimalis und in Tumorgewebe der Glandula submandibularis an ausgewählten histologischen Strukturen. Zwar wurde der TRPC6-Kanal im Tierversuch und auch beim Menschen auf mRNA-Ebene nachgewiesen, jedoch gibt es bisher keine systematischen Untersuchungen zum Nachweis des TRPC6-Proteins in der menschlichen Glandula lacrimalis und Glandula submandibularis sowie in Neoplasien der letzteren. Die Anwesenheit des TRPC6-Proteins in den genannten Geweben konnten wir mit dieser Arbeit zum ersten Mal nachweisen.

14. Patientengut und Methode

14.1.1 Spendergruppen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 16 Proben von 13 Spendern untersucht. Aufgrund der geringen Probenzahl muss das Ergebnis nochmals relativiert werden. Es wurden zehn Gewebeproben aus der Glandula submandibularis und der Glandula lacrimalis von sieben fixierten Körperspendern aus dem Institut für Anatomie entnommen. Davon waren drei Frauen, was 42,85% der Proben entspricht. Die Spender wurden alle zwischen 1924 und 1940 geboren (Mittelwert: 1934) und verstarben alle zwischen dem 20.04.2021 und dem 11.06.2021. Eine wichtige Einschränkung unserer Studie könnte die begrenzte Altersspanne (16 Jahre) sein, da das Durchschnittsalter der untersuchten Leichen zum Zeitpunkt des Todes 87 Jahre und die Median 84 Jahre betrug. Eine Aussage über das Vorkommen von TRPC6 in physiologischem Drüsengewebe von Gl. submandibularis und lacrimalis von jungen Menschen kann daraus nicht abgeleitet werden. Mit dem Alterungsprozess der Zellen und damit auch der Organe könnte sich die Verteilung von TRPC6 verändern. Die Spender kamen alle am Tag ihres Todes im Institut an, mit Ausnahme von Spender 7, der 3 Tage nach seinem Tod aufgenommen wurde. Vier der sieben Spender wurden am nächsten Tag fixiert, einer am selben Tag, einer drei Tage später und einer sogar vier Tage später. Diese postmortalen Unterschiede zeigen ebenfalls eine Einschränkung der Methode. Leider konnten Vorerkrankungen, welche sich in irgendeiner Weise negativ auf das Drüsengewebe auswirken, nicht erfasst werden. Dies limitiert zusätzlich die

Aussagekraft des Ergebnisses, auch wenn in der Übersichtsfärbung keine morphologischen Abweichungen zu erkennen waren.

Ferner waren nur zwei Tumoren vertreten: ACC und MEC. Daher konnte keine Aussage über das Vorkommen von TRPC6 in anderen menschlichen Kopfspeicheldrüsentumoren gemacht werden. Dazu wurden sechs Tumorproben von sechs Patienten aus der HNO-Klinik und dem Institut für Pathologie untersucht. Die Spender sind alle zwischen 1935 und 1959 geboren (Mittelwert: 1950) und ihr Durchschnittsalter bei der Probenentnahme beträgt 64 Jahre. Damit ist diese Kohorte deutlich jünger als die Körperspendergruppe des Anatomischen Instituts. Der jüngste Patient war nun 53 Jahre alt, sodass keine Aussage über das Vorkommen von TRPC6 in ACC und MEC bei jüngeren Menschen gezogen werden kann.

14.1.2 Aufbereitung der Proben

Die Entnahme der Probe erfolgte standardisiert, jedoch stellten einige anatomische Eigenheiten eine Herausforderung dar, wie z.B. Übergewicht, Atrophie der Drüse, zugenähte Augenlider nach Hornhautspende, Kachexie.

Die Proben wurden auf die gleiche Weise behandelt, d. h. in Paraffin eingebettet, geschnitten, mit IHC gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Bei der IHC-Färbung wurde festgestellt, dass die ausgewählten Gewebe eine längere Entparaffinierungsphase benötigten. Dies führte zu schlechteren Ergebnissen im Sinne einer schlechteren Zugänglichkeit der TRPC6-Kanäle, so dass der Primärantikörper nicht an sie binden kann. Dieses Phänomen erklärt vermutlich die in einigen Bereichen der untersuchten Proben teilweise reduzierte Signalstärke und die Intensität der Braunfärbung. Es konnte mikroskopisch beobachtet werden, wenn die Objektträger nach dem bestehenden Färbeprotokoll zur Entparaffinierung nur dreimal fünf Minuten in Xylol getaucht wurden. Zur Behebung dieses Problems wurden bei den nachfolgenden Färbungen die Proben zur Entparaffinierung dreimal acht Minuten in immer frisch angesetztes Xylol getaucht. Verunreinigungen der zahlreichen eingesetzten Chemikalien, fehlerhafte Verdünnungen oder falsch gelagerte Antikörper können sich verheerend auswirken.

14.1.3 TRPC6-Antikörper

Der eingesetzte Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der aus Kaninchen gewonnen wird. Dieser Antikörper zielt auf verschiedene Bindungsstellen des Zielantigens ab und ist daher nicht spezifisch für eine bestimmte Bindungsstelle. Diese unspezifische Bindung kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen, wie beispielsweise einer unspezifischen Hintergrundfärbung. Ein Vorteil solcher polyklonaler Antikörper besteht

darin, dass sie weniger empfindlich auf äußere Einflüsse wie pH-Wert-Veränderungen reagieren. Er wurde für die Erkennung von TRPC6 aus Maus-, Ratten- und Humanproben entwickelt.

14.1.4 Immunohistochemie

Für die Erstellung eines standardisierten immunhistochemischen Färbungsprotokolls war es erforderlich, die richtige Antikörperverdünnung für den Versuch zu finden. Es wurden verschiedene Antikörperverdünnungen ausprobiert. Die 1:100-Verdünnung des Primärantikörpers im bestehenden Protokoll erwies sich für das ausgewählte Gewebe als zu niedrig. Dies äußerte sich auch in einem negativen oder fraglich negativen Färbeergebnis, trotz Anwesenheit des gesuchten TRPC6. Nach einigen Versuchen hat sich die Verdünnung 1:50 als geeignet für menschliche Drüsen erwiesen, insbesondere für die Unterkieferspeicheldrüse und die Tränendrüse.

Bei der Gegenfärbung der immunhistochemischen Schnitte mit destilliertem Wasser, Hämatoxylin nach Ehrlich und dem Bläuen in fließendem Leitungswasser, wurde eine sehr kurze Verweildauer von 1 s in Hämatoxylin und ein erneutes anschließendes Spülen von 2 bis 3 s in destilliertem Wasser vor dem Bläuen in Leitungswasser ausgewählt. Bei den ersten Versuchen führte eine längere Hämatoxylin-Färbung ohne zusätzliches Spülen zu einer Überdeckung der Braunfärbung, was fälschlicherweise bei der Auswertung als falsch-negativ betrachtet werden könnte.

15. Einordnung der Ergebnisse in der Literatur

Die mRNA-Expression von TRPC6 beim Menschen wurde zunächst mittels RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) bestimmt: Das Protein wurde einheitlich im gesamten ZNS und in peripheren Geweben exprimiert, wobei die höchsten Werte in der Plazenta und der Lunge gemessen wurden. Als exokrine Drüsen wurden nur die Bauchspeicheldrüse und die Prostata untersucht (Riccio et al., 2002).

Das Vorkommen und die Rolle von TRPC6-Kanälen in der Glandula submandibularis des Menschen sind bis heute ungeklärt. Umfassender untersucht wurde der Subtyp TRPC1. Trp1 ist wahrscheinlich am Mechanismus des Einstroms von Calcium in die Zellen der menschlichen Glandula submandibularis beteiligt, was in Zellkulturen nachgewiesen wurde. Auch in der Plasmamembran der azinären und duktaalen Zellen der Glandula submandibularis der Ratte, wo dieser Mechanismus des Calciumeinstroms

stattfinden soll, fanden sie Trp1 (X. Liu et al., 2000). Dazu bildet TRPC1 einen Komplex mit Caveolin-1 in der Plasmamembran von menschlichen submandibulären Zellen und MDCK, um in der Plasmamembran zu verbleiben und das Eindringen von Calcium in die Zellen zu ermöglichen (Brazer et al., 2003). TRPC3 wurde in den apikalen Regionen der Gänge und Azini in Zellkulturen von MDCK und der Gl. submandibularis von Nagetieren lokalisiert. TRPC1 war dagegen basolateral lokalisiert, und TRPC6 konnte basolateral und apikal detektiert werden (zusammengefasst in Bandyopadhyay et al., 2005). TRPC1 spielt eine entscheidende Rolle beim SOCE und bei der Sekretion sowohl in Speichel- als auch in Pankreas-Azinuszellen. Weiterhin konnten Orai1 und STIM1 als Schlüsselkomponenten des SOCE ermittelt werden, welche für die Funktion von TRPC1 notwendig sind (Ambudkar, 2006, 2007, 2012; Ambudkar et al., 2007; Birnbaumer, 2009; X. Liu et al., 2000; Melvin et al., 2005). Dazu wurde es unter anderem immunohistochemisch nachgewiesen, dass TRPC3 bei Nagetieren eine Rolle bei der Ca^{2+} -Rückresorption aus dem Speichel spielt, indem es apikale Ca^{2+} -sensitive Rezeptoren in der Gl. submandibularis aktiviert. Diese Rückresorption im Ductus kann zur Regulierung des Speichelflusses beitragen, der ein kritischer Faktor bei der Sialolithiasis ist (Bandyopadhyay et al., 2012).

Bis heute ist nicht klar, welchen Einfluss die TRP-Kanäle auf die menschliche Glandula lacrimalis haben. Die Expression von TRPC, insbesondere des Subtyps C6, wurde in der Tränendrüse noch nicht umfassend erforscht. Nun wurde die Expression der TRPV1 mRNA mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) und des TRPV1 Proteins mittels IHC in Kaninchen- und Menschaugen untersucht: mRNA und Protein wurden unter anderem in den sekretorischen Zellen der Kaninchen-Tränendrüse gefunden. TRPV1 wird also in Zellen exprimiert, die besonders aktiv im Ca^{2+} -Austausch sind, sowie in Zellen mit signifikanter Wassertransportaktivität. Da TRPV1 ein Ca^{2+} -Kanal ist, spielt es wahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation des Wasser- und Ca^{2+} -Haushalts im Augengewebe (Martínez-García et al., 2013). Der TRPM3-Kanal wird als wichtiger Kandidat für die Entwicklung und Funktion der Gl. lacrimalis angesehen, seine Untersuchung erfolgte mittels qRT-PCR bei Nagetieren in verschiedenen Entwicklungsstadien und mittels IHC. Die Expression von TRPM3 in dieser Drüse ist altersabhängig und ist in der apikalen Membran des Drüsenepithels lokalisiert (Kanewska et al., 2020). Im Jahr 2018 berichteten Forscher über eine funktionelle Interaktion zwischen dem TRPV4-Protein und ANO1 in Azinuszellen, die aus der Gl. submandibularis und der Gl. lacrimalis der Maus isoliert wurden. TRPV4 tritt mit IP3-Rezeptoren und ANO1 in Wechselwirkung, um den muskarinischen Signalweg zu regulieren, welcher Speichel- und Tränenfluss vermittelt (Derouiche et al., 2018).

Ob TRPC6-Kanäle auch mit menschlichem glandulärem Krebs assoziiert ist, konnte durch seine Rolle bei der Proliferation von Prostatakrebszellen, unter anderem auf Molekularebene durch RT-PCR und Western Blot, gezeigt werden (Thebault et al., 2006). Ein Vergleich der Expression von TRPC6 in benignem im Vergleich zu malignem Drüsengewebe beim Menschen wurde in der Brust/im Mammakarzinom (Guilbert et al., 2008), in der Prostata/im Prostatakarzinom (Yue et al., 2009), im Ösophagus/im Ösophaguskarzinom (SCC) (Ding et al., 2010) und in der Niere/im Nierenzellkarzinom (Song et al., 2013) ebenfalls wie in unserer Arbeit mittels Immunhistochemie untersucht. Zusätzlich zu dieser Methode wurde oftmals noch Western blot und RT-PCR durchgeführt. TRPC6 wird im SCC stark exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und im Zellzyklus, sodass eine Hemmung von TRPC6 in humanen SCC-Zellen deren Proliferation unterdrückt und zu einer Blockade der G2/M-Phase führt (Ding et al., 2010). Welchen Einfluss TRP-Kanäle auf ACC- und MEC-Tumoren der Glandula submandibularis haben und ob sie überhaupt in diesen Tumoren vorkommen, ist bisher nicht untersucht worden.

16. Diskussion der eigenen Ergebnisse

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass das TRPC6-Protein hauptsächlich in den Ausführungsgängen der Glandula submandibularis, der Glandula lacrimalis sowie im ACC und MEC der Glandula submandibularis lokalisiert ist. Es konnte außerdem in den serösen Azini und deren Zellkernen nachgewiesen werden. In Tumorgewebe ist TRPC6 ebenfalls stark vertreten, insbesondere in den Zellkernen und im Zytoplasma der Tumorzellen. Unsere immunhistochemische Analyse von Paraffinschnitten zeigte, dass die Expression von TRPC6 in signifikantem Zusammenhang mit der Invasion des Drüsengewebes bei ACC und MEC stand.

In jedem Drüsenschnitt der Glandula submandibularis und der Glandula lacrimalis sowie in vier Schnitte der sechs Tumoren zeigten verschiedene Zellen eine mittlere bis starke Braunfärbung. Die Ausführungsgänge wiesen in jedem Drüsenschnitt eine Braunfärbung auf; im Tumorschnitt, in dem sich Ausführungsgänge befanden, wiesen sie ebenfalls eine Braunfärbung auf. Die serösen Azinuszellen zeigten eine Braunfärbung in fünf der sechs submandibulären Schnitte und in zwei der vier lacrimalen Schnitte; im Tumorschnitt mit serösen Azinuszellen zeigten sie ebenfalls eine Braunfärbung. Die Zellkerne der serösen Azinuszellen zeigten eine Braunfärbung in einem Lacrimalschnitt

und in dem Tumorschnitt, in dem die Struktur vorhanden war. Das Zytoplasma der Tumorzellen zeigte in vier von sechs Tumorschnitten eine Braunfärbung, ebenso die Zellkerne.

Die mukösen Endstücke, deren Zellkerne und die Zellkerne der Fettzellen wurden in keinem Präparat positiv angefärbt, d.h. in diesen Strukturen konnte kein TRPC6-Protein nachgewiesen werden.

Allerdings zeigten zwei Tumorschnitte überhaupt keine positive Färbung. Der Grund für das Fehlen eines Signals in einer Probe im Vergleich zu einer anderen Probe des gleichen Tumortyps kann in der Tumordiversität liegen. Diese bezieht sich auf die Vielfalt der Tumorzellen innerhalb eines Tumors oder zwischen Tumoren desselben Typs bei verschiedenen Patienten (Mroz & Rocco, 2017). Selbst innerhalb eines einzelnen Tumortyps, wie hier z.B. ACC, kann es eine große Tumordiversität geben. Dies wird als Intra-Tumor-Heterogenität bezeichnet (Gay et al., 2016). Diese Vielfalt kann auf verschiedenen Ebenen auftreten, z. B. auf zellulärer Ebene, da innerhalb eines Tumors verschiedene Arten von Krebszellen vorhanden sein können. Auch auf genetischer Ebene: Die genetische Vielfalt innerhalb eines Tumors kann auf kleine Fehler bei der DNA-Replikation zurückgeführt werden. Diese Fehler summieren sich bei den Milliarden von Zellteilungen, die zur Bildung eines klinisch nachweisbaren Tumors erforderlich sind, und können zu einer erheblichen genetischen Vielfalt im Tumor führen (Gay et al., 2016). Ein Tumor kann sowohl Tumorstammzellen enthalten, die die Fähigkeit haben, sich selbst zu vermehren und einen Tumor zu bilden, als auch differenzierte Krebszellen, die spezialisierte Funktionen erfüllen (Meacham & Morrison, 2013). Auch die Tumorumgebung, zu der das umgebende Gewebe, Immunzellen und Blutgefäße gehören, kann stark variieren. Die Zusammensetzung und Aktivität dieser Mikroumgebung kann die Tumordiversität beeinflussen. So können Biopsien einer kleinen Tumorregion möglicherweise nicht zu einer repräsentativen Charakterisierung der genetischen, epigenetischen und/oder phänotypischen Veränderungen im gesamten Tumor führen (Bedard et al., 2013; Gerlinger et al., 2012). Aus diesem Grund erscheint es interessant, den Proteinnachweis in ACC und MEC bei einer größeren Patientenzahl zu erforschen und mehrere Anteile derselben Biopsie zu untersuchen.

Außerdem konnte nur ein MEC-Schnitt angefärbt und untersucht werden. Da es sich um einen seltenen Tumor der Unterkieferdrüse handelt, stand für diese Arbeit nur ein Exemplar zur Verfügung. Es wäre sinnvoll, den Proteinnachweis in diesem Tumor an einer größeren Fallzahl zu untersuchen.

17. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass wir das TRPC6-Protein immunhistochemisch in menschlichen exokrinen Drüsen wie der Tränen- und der Unterkieferspeicheldrüse sowie in zwei Tumoren der Unterkieferspeicheldrüse, dem adenoid-zystischen Karzinom und dem Mukoepidermoidkarzinom, nachweisen konnten. Das Vorkommen von TRPC6 in der Glandula submandibularis wurde von anderen Forschungsgruppen bereits am Tiermodell gezeigt (Bandyopadhyay et al., 2005). Um unsere Resultate zu vertiefen und den Nachweis zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen zum Vorkommen von TRPC6 in diesen Geweben anhand einer größeren Fallzahl erforderlich.

Die funktionelle Rolle von TRPC6 in der Glandula lacrimalis und ihre Erkrankungen müssen jedoch noch weiter untersucht werden. Es wäre auch sinnvoll, gesundes und erkranktes Tränendrüsengewebe zu untersuchen und zu vergleichen, ähnlich unserer Arbeit an der Unterkieferdrüse. Möglicherweise gibt es Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Gruppen. Erkrankungen der Glandula lacrimalis, die untersucht werden könnten, sind die Entzündung dieser Drüse (Dakryoadenitis) und Tumoren benignen und malignen Genese, wobei letztere äußerst selten zu beobachten sind.

Zur Ergänzung dieser Arbeit wäre es außerdem interessant, TRPC6 in anderen exokrinen Drüsen, insbesondere Speicheldrüsen, nachzuweisen. Beispiele wären die Glandula parotis oder die Glandula sublingualis. Darüber hinaus sollte nach der Expression weiterer TRPC-Proteine in den von uns untersuchten Geweben gesucht werden, um das Wissen über TRPC-Kanäle in Tränen- und Speicheldrüsen zu erweitern.

TRPC6 wird bei vielen Krankheiten als therapeutischer Angriffspunkt verwendet, sei es durch hemmende, modulierende oder auch agonistische Medikamente (Bon & Beech, 2013). Es ist daher davon auszugehen, dass TRPC6 auch als Zielstruktur in der Therapie von ACC und MEC eingesetzt werden könnte. TRPC6 zeigt eine breite Expression sowohl in Tumor- als auch in gesundem Gewebe. Daher müssen mögliche Nebenwirkungen sorgfältig berücksichtigt werden, wenn TRPC6 als Ziel für eine Krebstherapie in Betracht gezogen wird. Da TRPC6 ebenfalls in Neuronen, glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen und Nierenzellen exprimiert wird, besteht die potenzielle Gefahr, dass eine Hemmung der TRPC6-Aktivität in diesen Zellen deren normale Funktion beeinträchtigen könnte. Eine gründliche Untersuchung der möglichen Nebenwirkungen von TRPC6-Inhibitoren auf gesunde Gewebe und Organe ist daher von

großer Bedeutung (Ding et al., 2010). Eine zukünftige Herausforderung bei der Entwicklung von TRPC6-Inhibitoren besteht darin, eine gezielte Wirkung auf ACC- und MEC-Tumorzellen zu erzielen, ohne dabei unerwünschte Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe hervorzurufen. Darüber hinaus könnte TRPC6 beim Menschen wie TRPC3 bei Nagetieren eine Rolle bei der Ca^{2+} -Rückresorption in Speicheldrüsen aus dem Speichel, damit bei der Regulation des Speichelflusses und somit auch bei der Bildung von Speichelsteinen spielen. Auch hier könnte es als Zielmolekül für die Therapie der Sialolithiasis dienen. Die Speicheldrüsen können an verschiedenen Erkrankungen neben den Tumoren und Speichelsteinen leiden, z.B. Entzündungen (Sialoadenitis), Hypertrophie (Sialadenose) oder auch Hyposalivation (Xerostomie) infolge von Vorerkrankungen oder Medikation. Daher sollten die Funktion, Bedeutung und Rolle des TRPC6-Proteins in den Speicheldrüsen, insbesondere in der Glandula submandibularis, im gesunden physiologischen Drüsengewebe und im erkrankten Drüsengewebe, näher erforscht werden. Dies könnte zu neuen Therapien, mit TRPC6 als Zielmolekül, führen.

VI. Anhang

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Struktur von TRP-Kanälen</i>	- 9 -
<i>Abbildung 2: Karte der Dichte des menschlichen TRPC6-Kanals in Kryo-EM</i>	- 15 -
<i>Abbildung 3: Aufbau einer TRPC6-Untereinheit</i>	- 16 -
<i>Abbildung 4: ROCE und SOCE des TRPC6-Kanals</i>	- 19 -
<i>Abbildung 5: Ca²⁺-Signaltransduktion und Steuerung der Flüssigkeitsausscheidung in Speicheldrüsenzellen</i>	- 30 -
<i>Abbildung 6: Übersicht der Stationen im Gewebeeinbettautomaten</i>	- 47 -
<i>Abbildung 7: Tabellarische Übersicht der HE-Färbung</i>	- 50 -
<i>Abbildung 8: Teil 1 der HE-Färbung: Entparaffinieren unter dem Abzug</i>	- 51 -
<i>Abbildung 9: Teil 2 und Teil 3 der HE-Färbung: Färbung mit Hämatoxylin und Eosin; Entwässern unter dem Abzug</i>	- 52 -
<i>Abbildung 10: HE-Färbung Spender 1, Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung</i>	- 52 -
<i>Abbildung 11: HE-Färbung Spender 1, Glandula submandibularis in 40x Vergrößerung</i>	- 53 -
<i>Abbildung 12: HE-Färbung Spender 7, Glandula lacrimalis in 10x Vergrößerung</i>	- 53 -
<i>Abbildung 13: HE-Färbung Spender 7, Glandula lacrimalis in 40x Vergrößerung</i>	- 54 -
<i>Abbildung 14: Schematische Übersicht der IHC-Färbung Tag 1</i>	- 58 -
<i>Abbildung 15: Schematische Übersicht der IHC-Färbung Tag 2</i>	- 58 -
<i>Abbildung 16: Positivkontrolle Spender 4, Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung</i> .	- 64 -
<i>Abbildung 17: Negativkontrolle Spender 4, Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung</i> -	65 -
<i>Abbildung 18: Positivkontrolle Spender 7, Glandula lacrimalis in 10x Vergrößerung</i>	- 65 -
<i>Abbildung 19: Negativkontrolle Spender 7, Glandula lacrimalis in 10x Vergrößerung</i>	- 66 -
<i>Abbildung 20: Positivkontrolle Tumorensponder A, adenoid-zystisches Karzinom der Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung</i>	- 66 -
<i>Abbildung 21: Positivkontrolle Tumorensponder F, Mukoepidermoidkarzinom der Glandula submandibularis in 10x Vergrößerung</i>	- 67 -
<i>Abbildung 22: Positivkontrolle der Gl. submandibularis Spender 5 in 10x Vergrößerung</i>	- 75 -
<i>Abbildung 23: Positivkontrolle der Gl. submandibularis Spender 4 in 10x Vergrößerung</i>	- 75 -
<i>Abbildung 24: Negativkontrolle der Gl. submandibularis Spender 4 in 10x Vergrößerung</i>	- 76 -
<i>Abbildung 25: Positivkontrolle der Gl. lacrimalis Spender 7 in 10x Vergrößerung</i>	- 79 -
<i>Abbildung 26: Positivkontrolle der Gl. lacrimalis Spender 3 in 10x Vergrößerung</i>	- 79 -
<i>Abbildung 27: Negativkontrolle der Gl. lacrimalis Spender 7 in 10x Vergrößerung</i>	- 80 -
<i>Abbildung 28: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender A in 10x Vergrößerung</i>	- 91 -

Abbildung 29: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender B in 10x Vergrößerung	- 91 -
Abbildung 30: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender C in 10x Vergrößerung	- 92 -
Abbildung 31: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender D in 10x Vergrößerung	- 92 -
Abbildung 32: Positivkontrolle des adenoidzystischen Karzinoms bei Spender E in 10x Vergrößerung	- 93 -
Abbildung 33: Positivkontrolle des Mukoepidermoidkarzinoms bei Spender F in 10x Vergrößerung	- 96 -

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TRP-Unterfamilien.....	- 8 -
Tabelle 2: Tumorstadien nach UICC-Kriterien.....	- 32 -
Tabelle 3: Übersicht der angewendeten Chemikalien und Lösungen	- 36 -
Tabelle 4: Übersicht der angewendeten Antikörper.....	- 36 -
Tabelle 5: Übersicht der angewendeten Geräte	- 37 -
Tabelle 6: Übersicht der angewendeten Verbrauchsmaterialien.....	- 38 -
Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der genutzten Spender des anatomischen Institutes.....	- 41 -
Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der genutzten Spender des pathologischen Institutes....	- 41 -
Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der IHC-Färbung Tag 1	- 56 -
Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der IHC-Färbung Tag 2	- 57 -
Tabelle 11: Übersicht der Lösungen der IHC-Färbung.....	- 59 -
Tabelle 12: Auswertungsschema der IHC der physiologischen Proben	- 69 -

3. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Überblick über die Anzahl der verwendeten Proben von Tumoren der Glandula submandibularis.....	- 70 -
Diagramm 2: Färbungssignal der Strukturen aller Gl. Submandibularis Proben in der IHC (Eigenauswertung).....	- 73 -
Diagramm 3: Färbungssignal der Strukturen aller Gl. submandibularis Proben in der IHC (Fremdauswertung).....	- 74 -
Diagramm 4: Färbungssignal der Strukturen aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC (Eigenauswertung).....	- 77 -

Diagramm 5: Färbungssignal der Strukturen aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC (Fremdauswertung).....	- 78 -
Diagramm 6: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Struktur (Eigenauswertung).....	- 81 -
Diagramm 7: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Struktur (Fremdauswertung).....	- 82 -
Diagramm 8: Färbungssignal aller Gl. submandibularis Proben in der IHC nach Geschlecht (Eigenauswertung).....	- 83 -
Diagramm 9: Färbungssignal aller Gl. submandibularis Proben in der IHC nach Geschlecht (Fremdauswertung).....	- 84 -
Diagramm 10: Färbungssignal aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC nach Geschlecht (Eigenauswertung).....	- 85 -
Diagramm 11: Färbungssignal aller Gl. lacrimalis Proben in der IHC nach Geschlecht (Fremdauswertung).....	- 85 -
Diagramm 12: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Geschlecht (Eigenauswertung).....	- 86 -
Diagramm 13: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Drüsenproben in IHC nach Geschlecht (Fremdauswertung).....	- 87 -
Diagramm 14: Färbungssignal der Strukturen aller adenoid-zystischen Karzinomproben in der IHC (Eigenauswertung).....	- 89 -
Diagramm 15: Färbungssignal der Strukturen aller adenoid-zystischen Karzinomproben in der IHC (Fremdauswertung).....	- 90 -
Diagramm 16: Färbungssignal der Strukturen der Mukoepidermoidkarzinomprobe in der IHC (Eigenauswertung).....	- 94 -
Diagramm 17: Färbungssignal der Strukturen Mukoepidermoidkarzinomprobe in der IHC (Fremdauswertung).....	- 95 -
Diagramm 18: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Tumorproben der Glandula submandibularis in IHC nach Struktur (Eigenauswertung).....	- 97 -
Diagramm 19: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller Tumorproben der Glandula submandibularis in IHC nach Struktur (Fremdauswertung).....	- 98 -
Diagramm 20: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Gl. submandibularis und Gl. lacrimalis im Vergleich mit den Tumorproben in IHC nach Struktur (Eigenauswertung).....	- 100 -
Diagramm 21: Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Gl. submandibularis und Gl. lacrimalis im Vergleich mit den Tumorproben in IHC nach Struktur (Fremdauswertung).....	- 101 -
Diagramm 22: Globale Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Drüsen im Vergleich mit den Tumorproben der Gl. submandibularis in IHC nach Struktur (Eigenauswertung).....	- 102 -

Diagramm 23: Globale Gesamtauswertung des Färbungssignal aller gesunden Proben der Drüsen im Vergleich mit den Tumorproben der Gl. submandibularis in IHC nach Struktur (Fremdauswertung)..... - 103 -

VII. Literaturverzeichnis

- Albarrán, L., Dionisio, N., Lopez, E., Salido, G. M., Redondo, P. C., & Rosado, J. A. (2014). STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location. *The Biochemical journal*, 463(3), 373–381. <https://doi.org/10.1042/BJ20140523>
- Albert, A. P. (2004). Activation of TRPC6 channel proteins: evidence for an essential role of phosphorylation. *The Journal of Physiology*, 561(Pt 2), 354. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2004.077131>
- Ambudkar, I. S. (2000). Regulation of Calcium in Salivary Gland Secretion. <http://dx.doi.org/10.1177/10454411000110010301>, 11(1), 4–25. <https://doi.org/10.1177/10454411000110010301>
- Ambudkar, I. S. (2006). Ca²⁺ signaling microdomains:platforms for the assembly andregulation of TRPC channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2005.11.008>
- Ambudkar, I. S. (2007). TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 1), 96–100. <https://doi.org/10.1042/BST0350096>
- Ambudkar, I. S. (2012). Polarization of Calcium Signaling and Fluid Secretion in Salivary Gland Cells. *Curr Med Chem*, 19(34), 5774–5781.
- Ambudkar, I. S. (2014). Ca²⁺ signaling and regulation of fluid secretion in salivary gland acinar cells. *Cell calcium*, 55(6), 297–305. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2014.02.009>
- Ambudkar, I. S., Ong, H. L., Liu, X., Bandyopadhyay, B., & Cheng, K. T. (2007). TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell calcium*, 42(2), 213–223. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2007.01.013>
- Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., Rosado, J. A., & Smani, T. (2018). The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells. *Frontiers in Physiology*, 9(MAR), 347990. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00257/BIBTEX>
- Azumaya, C. M., Sierra-Valdez, F., Cordero-Morales, J. F., & Nakagawa, T. (2018). Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential

- cation channel subfamily C member 6 (TRPC6). *The Journal of Biological Chemistry*, 293(26), 10381. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.003183>
- Bai, L. ping, Chen, Y. li, & Zheng, A. (2022). Pharmacological targeting transient receptor potential canonical channel 6 modulates biological behaviors for cervical cancer HeLa and SiHA cell. *Cancer Cell International*, 22(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12935-022-02556-4/FIGURES/9>
- Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Liu, X., Redman, R. S., Patterson, R. L., & Ambudkar, I. S. (2005). Apical Localization of a Functional TRPC3/TRPC6-Ca²⁺-Signaling Complex in Polarized Epithelial Cells: ROLE IN APICAL Ca²⁺ INFLUX. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12908–12916. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410013200>
- Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Sarkar, A., Liu, X., & Ambudkar, I. S. (2012). Extracellular Ca²⁺ Sensing in Salivary Ductal Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30305. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.394122>
- Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J., & Siu, L. L. (2013). Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, 501(7467), 355. <https://doi.org/10.1038/NATURE12627>
- Beech, D. J., Muraki, K., & Flemming, R. (2004). Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *The Journal of Physiology*, 559(3), 685–706. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2004.068734>
- Birnbaumer, L. (2009). The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca²⁺ concentrations. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49, 395–426. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.48.113006.094928>
- Boahene, D. K. O., Olsen, K. D., Lewis, J. E., Pinheiro, A. D., Pankratz, V. S., & Bagniewski, S. M. (2004). Mucoepidermoid Carcinoma of the Parotid Gland: The Mayo Clinic Experience. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 130(7), 849–856. <https://doi.org/10.1001/ARCHOTOL.130.7.849>
- Bollimuntha, S., Selvaraj, S., & Singh, B. B. (2011). Emerging Roles of Canonical TRP Channels in Neuronal Function. *Advances in experimental medicine and biology*, 704, 573. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_31
- Bon, R. S., & Beech, D. J. (2013). In pursuit of small molecule chemistry for calcium-permeable non-selective TRPC channels -- mirage or pot of gold? *British journal of pharmacology*, 170(3), 459–474. <https://doi.org/10.1111/BPH.12274>
- Brazer, S. ching W., Singh, B. B., Liu, X., Swaim, W., & Ambudkar, I. S. (2003). Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca²⁺ influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *The Journal of biological chemistry*, 278(29), 27208–27215. <https://doi.org/10.1074/JBC.M301118200>

- Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nature cell biology*, 11(6), 669–677. <https://doi.org/10.1038/NCB0609-669>
- Cantù, G. (2021). Adenoid cystic carcinoma. An indolent but aggressive tumour. Part A: from aetiopathogenesis to diagnosis. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 41(3), 206. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-N1379>
- Cayouette, S., Lussier, M. P., Mathieu, E. L., Bousquet, S. M., & Boulay, G. (2004). Exocytotic Insertion of TRPC6 Channel into the Plasma Membrane upon Gq Protein-coupled Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7241–7246. <https://doi.org/10.1074/JBC.M312042200>
- Chen, W. liang, Wang, Y., Zhou, B., Liao, J. kun, & Chen, R. (2022). Radical resection and reconstruction in patients with adenoid cystic carcinoma in the minor salivary glands of the palate. *Head & Face Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S13005-022-00312-7>
- Chen, X., Sooch, G., Demaree, I. S., White, F. A., & Obukhov, A. G. (2020a). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/CELLS9091983>
- Chen, X., Sooch, G., Demaree, I. S., White, F. A., & Obukhov, A. G. (2020b). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells*, 9(9), 1983. <https://doi.org/10.3390/cells9091983>
- Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., Swaim, W., & Ambudkar, I. S. (2011). Local Ca²⁺ Entry Via Orai1 Regulates Plasma Membrane Recruitment of TRPC1 and Controls Cytosolic Ca²⁺ Signals Required for Specific Cell Functions. *PLOS Biology*, 9(3), e1001025. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001025>
- Cheng, K. T., Ong, H. L., Liu, X., & Ambudkar, I. S. (2013). Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Current Topics in Membranes*, 71, 149–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X>
- Chinigò, G., Castel, H., Chever, O., & Gkika, D. (2021). TRP Channels in Brain Tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.617801>
- Choi, B. E., Shin, S., Evans, S., Singh, B. B., & Bandyopadhyay, B. C. (2023). Ablation of TRPC3 disrupts Ca²⁺ signaling in salivary ductal cells and promotes sialolithiasis. *Scientific Reports 2023* 13:1, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32602-8>
- Chu, X., Cheung, J. Y., Barber, D. L., Birnbaumer, L., Rothblum, L. I., Conrad, K., Abrasonis, V., Chan, Y. M., Stahl, R., Carey, D. J., & Miller, B. A. (2002). Erythropoietin modulates calcium influx through TRPC2. *The Journal of biological chemistry*, 277(37), 34375–34382. <https://doi.org/10.1074/JBC.M205541200>

- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2004 426:6966, 426(6966), 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 1969 224:5216, 224(5216), 285–287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>
- Davis, J., Burr, A. R., Davis, G. F., Birnbaumer, L., & Molkentin, J. D. (2012). A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Developmental cell*, 23(4), 705. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2012.08.017>
- Derouiche, S., Takayama, Y., Murakami, M., & Tominaga, M. (2018). TRPV4 heats up ANO1-dependent exocrine gland fluid secretion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(4), 1841–1854. <https://doi.org/10.1096/FJ.201700954R>
- Deutsche Gesellschaft für Mund-, K. G. e. V. (DGMKG). (2021). S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. *Leitlinienprogramm Onkologie, Version 3.0*, 50–52. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version_3/LL_Mundhoehlenkarzinom_Kurzversion_3.0.pdf
- Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., Kalwa, H., Storch, U., & Gudermann, T. (2005). Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 371(4), 257–265. <https://doi.org/10.1007/S00210-005-1052-8/FIGURES/3>
- Ding, X., He, Z., Shi, Y., Wang, Q., & Wang, Y. (2010). Targeting TRPC6 channels in oesophageal carcinoma growth. *Expert opinion on therapeutic targets*, 14(5), 513–527. <https://doi.org/10.1517/14728221003733602>
- Domínguez-Rodríguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Benitah, J. P., & Gómez, A. M. (2012). The other side of cardiac Ca²⁺ signaling: Transcriptional control. *Frontiers in Physiology*, 3 NOV, 27409. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2012.00452/BIBTEX>
- Dutta, N. N., Baruah, R., & Das, L. (2002). Adenoid cystic carcinoma — Clinical presentation and cytological diagnosis. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 54(1), 62. <https://doi.org/10.1007/BF02911012>
- 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 (Baltimore, Md.)*, 47(6), 2068–2077. <https://doi.org/10.1002/HEP.22263>
- Fan, J., Yang, J., Qiao, W., Liu, W., & Xing, C. (2020). LAPT4B-35 expression is associated with pathological grades and clinical stages in salivary adenoid cystic carcinoma. *Oncology Letters*, 19(1), 317. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.11124>

- Farooq, I., & Bugshan, A. (2021). The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. *F1000Research* 2021 9:171, 9, 171. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.3>
- Finney-Hayward, T. K., Popa, M. O., Bahra, P., Li, S., Poll, C. T., Gosling, M., Nicholson, A. G., Russell, R. E. K., Kon, O. M., Jarai, G., Westwick, J., Barnes, P. J., & Donnelly, L. E. (2012). Expression of Transient Receptor Potential C6 Channels in Human Lung Macrophages. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0373OC>, 43(3), 296–304. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2008-0373OC>
- Firth, A. L., Remillard, C. V., & Yuan, J. X. J. (2007). TRP channels in hypertension. *Biochimica et biophysica acta*, 1772(8), 895–906. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2007.02.009>
- Foote, F. W., & Frazell, E. L. (o. J.). 'TUMORS OF THE MAJOR SALIVARY GLANDS HERE ARE FEW RECORDED STUDIES of major. <https://doi.org/10.1002/1097-0142>
- Fowler, M. A., Sidiropoulou, K., Ozkan, E. D., Phillips, C. W., & Cooper, D. C. (2007). Corticolimbic Expression of TRPC4 and TRPC5 Channels in the Rodent Brain. *PLoS ONE*, 2(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000573>
- Frierson, H. F., El-Naggar, A. K., Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Cheng, J., Saku, T., Moskaluk, C. A., & Hampton, G. M. (2002). Large Scale Molecular Analysis Identifies Genes with Altered Expression in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 161(4), 1315. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64408-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64408-2)
- Garcia, R. L., & Schilling, W. P. (1997). Differential Expression of Mammalian TRP Homologues across Tissues and Cell Lines. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 239, 279–283.
- Gay, L., Baker, A. M., & Graham, T. A. (2016). Tumour Cell Heterogeneity. *F1000Research*, 5. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7210.1>
- Gees, M., Colsoul, B., & Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A003962>
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., ... Swanton, C. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *The New England journal of medicine*, 366(10), 883. <https://doi.org/10.1056/NEJMOMA1113205>

- Goel, M., Sinkins, W. G., Zuo, C. Di, Estacion, M., & Schilling, W. P. (2006). Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 290(5), 1241–1252. https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00376.2005/SUPPL_FILE/F-00376-2005_SUPPLEMENTAL.PDF
- Goel, M., Zuo, C. Di, Sinkins, W. G., & Schilling, W. P. (2007). TRPC3 channels colocalize with Na⁻/Ca²⁺ exchanger and Na⁺ pump in axial component of transverse-axial tubular system of rat ventricle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(2), 874–883. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00785.2006/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40020772140008.JPEG>
- Gonzalez-Cobos, J. C., & Trebak, M. (2010). TRPC channels in smooth muscle cells. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 15(3), 1023. <https://doi.org/10.2741/3660>
- Guilbert, A., Dhennin-Duthille, I., Hiani, Y. EL, Haren, N., Khorsi, H., Sevestre, H., Ahidouch, A., & Ouadid-Ahidouch, H. (2008). Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-125>
- Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The trp Gene Is Essential for a Light-Activated Ca⁺ Channel in Drosophila Photoreceptors. *Neuron*, 8, 643–651.
- Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H. A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., & Konnerth, A. (2008). TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination. *Neuron*, 59(3), 392. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2008.06.009>
- Haddock, S. R., Zhu, M. X., Trost, C., Flockerzi, V., & Authi, K. S. (2002). Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood*, 100(8), 2801–2811. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-03-0723>
- He, D. X., Mao, A. Q., Li, Y. R., Tam, S. C., Zheng, Y. T., Yao, X. Q., Birnbaumer, L., Ambudkar, I. S., & Ma, X. (2020). TRPC1 participates in the HSV-1 infection process by facilitating viral entry. *Science advances*, 6(12). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAZ3367>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18887–18894. <https://doi.org/10.1074/JBC.M311274200>

- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999 397:6716, 397(6716), 259–263. <https://doi.org/10.1038/16711>
- Hogan, P. G., Lewis, R. S., & Rao, A. (2010). Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology*, 28, 491–533. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132550>
- Hong, J. H., Li, Q., Kim, M. S., Shin, D. M., Feske, S., Birnbaumer, L., Cheng, K. T., Ambudkar, I. S., & Muallem, S. (2011). Polarized but Differential Localization and Recruitment of STIM1, Orai1 and TRPC Channels in Secretory Cells. *Traffic*, 12(2), 232–245. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2010.01138.X>
- Hu, G., Oboukhova, E. A., Kumar, S., Sturek, M., & Obukhov, A. G. (2009). Canonical transient receptor potential channels expression is elevated in a porcine model of metabolic syndrome. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(5), 689–699. <https://doi.org/10.1210/ME.2008-0350>
- Hwei, L. O., Kwong, T. C., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B., Gill, D., & Ambudkar, I. S. (2007). Dynamic Assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 Ternary Complex Is Involved in Store-operated Calcium Influx: Evidence for Similarities in Store-Operated and Calcium Release-Activated Calcium Channel components*, S. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 9105. <https://doi.org/10.1074/JBC.M608942200>
- Itsuki, K., Imai, Y., Hase, H., Okamura, Y., Inoue, R., & Mori, M. X. (2014). PLC-mediated PI(4,5)P2 hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *The Journal of General Physiology*, 143(2), 183. <https://doi.org/10.1085/JGP.201311033>
- Kalwa, H., Storch, U., Demleitner, J., Fiedler, S., Mayer, T., Kannler, M., Fahlbusch, M., Barth, H., Smrcka, A., Hildebrandt, F., Gudermann, T., & Dietrich, A. (2015). Phospholipase C Epsilon (PLCε) Induced TRPC6 Activation: A Common but Redundant Mechanism in Primary Podocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 230(6), 1389–1399. <https://doi.org/10.1002/JCP.24883>
- Kanewska, A., Ito, M., Karasawa, Y., Inada, M., Garreis, F., Paulsen, F., & Takeuchi, M. (2020). Developmental change in the gene expression of transient receptor potential melastatin channel 3 (TRPM3) in murine lacrimal gland. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 231. <https://doi.org/10.1016/J.AANAT.2020.151551>
- Kim, M. S., Hong, J. H., Li, Q., Shin, D. M., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., & Muallem, S. (2009). Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca²⁺ influx and the

- severity of acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 137(4), 1509–1517.
<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2009.07.042>
- Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3114.
<https://doi.org/10.1172/JCI27702>
- Kwon, Y., Hofmann, T., & Montell, C. (2007). Integration of Phosphoinositide and Calmodulin Mediated Regulation of TRPC6. *Molecular cell*, 25(4), 491.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.01.021>
- Lau, O. C., Shen, B., Wong, C. O., Tjong, Y. W., Lo, C. Y., Wang, H. C., Huang, Y., Yung, W. H., Chen, Y. C., Fung, M. L., Rudd, J. A., & Yao, X. (2016). TRPC5 channels participate in pressure-sensing in aortic baroreceptors. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS11947>
- Lee, K. P., Choi, S., Hong, J. H., Ahuja, M., Graham, S., Ma, R., So, I., Shin, D. M., Muallem, S., & Yuan, J. P. (2014). Molecular determinants mediating gating of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *The Journal of biological chemistry*, 289(10), 6372–6382.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M113.546556>
- Leuner, K., Kazanski, V., Muller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C., & Müller, W. E. (2007). Hyperforin—a key constituent of St. John’s wort specifically activates TRPC6 channels. *The FASEB Journal*, 21(14), 4101–4111.
<https://doi.org/10.1096/FJ.07-8110COM>
- Lewis, R. S. (2020). Store-Operated Calcium Channels: From Function to Structure and Back Again. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(5), a035055.
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A035055>
- Leypold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F., & Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6376.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.082127599>
- Li, N., Xu, L., Zhao, H., El-Naggar, A. K., & Sturgis, E. M. (2012). A comparison of the demographics, clinical features, and survival of patients with adenoid cystic carcinoma of major and minor salivary glands versus less common sites within the Surveillance, Epidemiology, and End Results registry. *Cancer*, 118(16), 3945–3953. <https://doi.org/10.1002/CNCR.26740>
- Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M. X., Armstrong, D. L., & Birnbaumer, L. (2008). Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2895–2900. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0712288105>
- Liman, E. R., Corey, D. P., & Dulac, C. (1999). TRPC2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5791. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.10.5791>
- Liu, C. H., Wang, T., Postma, M., Obukhov, A. G., Montell, C., & Hardie, R. C. (2007). In Vivo Identification and Manipulation of the Ca²⁺ Selectivity Filter in the Drosophila Transient Receptor Potential Channel. *Journal of Neuroscience*, 27(3), 604–615. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4099-06.2007>
- Liu, C., & Montell, C. (2015). Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(1), 22–25. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.02.067>
- Liu, X., Cheng, K. T., Bandyopadhyay, B. C., Pani, B., Dietrich, A., Paria, B. C., Swaim, W. D., Beech, D., Yildirim, E., Singh, B. B., Birnbaumer, L., & Ambudkar, I. S. (2007). Attenuation of store-operated Ca²⁺ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17542–17547. https://doi.org/10.1073/PNAS.0701254104/SUPPL_FILE/01254FIG7.JPG
- Liu, X., Ong, H. L., & Ambudkar, I. (2018). TRP Channel Involvement in Salivary Glands—Some Good, Some Bad. *Cells*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS7070074>
- Liu, X., Ong, H. L., Pani, B., Johnson, K., Swaim, W. B., Singh, B., & Ambudkar, I. (2010). Effect of cell swelling on ER/PM junctional interactions and channel assembly involved in SOCE. *Cell calcium*, 47(6), 491. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2010.04.002>
- Liu, X., Wang, W., Singh, B. B., Lockwich, T., Jadlowiec, J., O'Connell, B., Wellner, R., Zhu, M. X., & Ambudkar, I. S. (2000). Trp1, a Candidate Protein for the Store-operated Ca²⁺Influx Mechanism in Salivary Gland Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3403–3411. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.5.3403>
- Lu, M., Bränström, R., Berglund, E., Höög, A., Björklund, P., Westin, G., Larsson, C., Farneboand, L. O., & Forsberg, L. (2010). Expression and association of TRPC subtypes with Orai1 and STIM1 in human parathyroid. *Journal of molecular endocrinology*, 44(5), 285–294. <https://doi.org/10.1677/JME-09-0138>
- Luksic, I., Mamic, M., & Sutton, P. (2022). Management of malignant submandibular gland tumors: A 30-year experience from a single center. *Oral surgery, oral*

- medicine, oral pathology and oral radiology*, 134(3), 302–309.
<https://doi.org/10.1016/J.OOOO.2022.01.023>
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie* (R. Lüllmann-Rauch, Hrsg.; 5. Auflage). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-003-124637>
- Ma, H. T., Patterson, R. L., Van Rossum, D. B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., & Gill, D. L. (2000). Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5458), 1647–1651. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5458.1647>
- Ma, H. T., Venkatachalam, K., Parys, J. B., & Gill, D. L. (2002). Modification of store-operated channel coupling and inositol trisphosphate receptor function by 2-aminoethoxydiphenyl borate in DT40 lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 277(9), 6915–6922. <https://doi.org/10.1074/JBC.M107755200>
- Malczyk, M., Veith, C., Fuchs, B., Hofmann, K., Storch, U., Schermuly, R. T., Witzentrath, M., Ahlbrecht, K., Fecher-Trost, C., Flockerzi, V., Ghofrani, H. A., Grimminger, F., Seeger, W., Gudermann, T., Dietrich, A., & Weissmann, N. (2013). Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(12), 1451–1459. https://doi.org/10.1164/RCCM.201307-1252OC/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF
- Malczyk, M., Veith, C., Schermuly, R. T., Gudermann, T., Dietrich, A., Sommer, N., Weissmann, N., & Pak, O. (2015). NADPH oxidases—do they play a role in TRPC regulation under hypoxia? *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2015 468:1, 468(1), 23–41. <https://doi.org/10.1007/S00424-015-1731-3>
- Martínez-García, M. C., Martínez, T., Pañeda, C., Gallego, P., Jimenez, A. I., & Merayo, J. (2013). Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid 1 in rabbit and human eyes. *Histology and histopathology*, 28(11), 1507–1516. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1507>
- Meacham, C. E., & Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), 328–337. <https://doi.org/10.1038/NATURE12624>
- Melvin, J. E., Yule, D., Shuttleworth, T., & Begenisich, T. (2005). Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annual review of physiology*, 67, 445–469. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYSIOL.67.041703.084745>
- Minke, B., & Cook, B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological Reviews*, 82(2), 429–472. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00001.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0220194008.JPEG>

- Minke, B., Wu, C. F., & Pak, W. L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 1975 258:5530, 258(5530), 84–87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>
- Montell, C. (2001). Physiology, Phylogeny, and Functions of the TRP Superfamily of Cation Channels. *Science's STKE*, 2001(90). <https://doi.org/10.1126/STKE.2001.90.RE1>
- Montell, C. (2003). Visual Transduction in *Drosophila*. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.231>, 15, 231–268. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.15.1.231>
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2005(272). <https://doi.org/10.1126/STKE.2722005RE3>
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Clapham, D. E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A. M., Schultz, G., Shimizu, N., & Zhu, M. X. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular cell*, 9(2), 229–231. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00448-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00448-3)
- Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular Characterization of the *Drosophila* trp locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction. *Neuron*, 2, 1313–1323.
- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Bíró, T., & Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 2011 10:8, 10(8), 601–620. <https://doi.org/10.1038/nrd3456>
- Mroz, E. A., & Rocco, J. W. (2017). The challenges of tumor genetic diversity. *Cancer*, 123(6), 917–927. <https://doi.org/10.1002/CNCR.30430>
- 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 Ca²⁺-PERMEABLE CATION CHANNEL THAT IS CONSTITUTIVELY ACTIVATED AND ENHANCED BY STIMULATION OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR**. <http://www.jbc.org>
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00057.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0020503621003.JPEG>
- Petersen, C. C. H., Berridge, M. J., Borgese, M. F., & Bennett, D. L. (1995). Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* trp and evidence for

- the existence of vertebrate homologues. *Biochemical Journal*, 311(Pt 1), 41. <https://doi.org/10.1042/BJ3110041>
- Philipp, S., Trost, C., Warnat, J., Rautmann, J., Himmerkus, N., Schroth, G., Kretz, O., Nastainczyk, W., Cavalié, A., Hoth, M., & Flockerzi, V. (2000). TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca²⁺-like channels in adrenal cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(31), 23965–23972. <https://doi.org/10.1074/JBC.M003408200>
- Plant, T. D., & Schaefer, M. (2005). Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 371(4), 266–276. <https://doi.org/10.1007/S00210-005-1055-5>
- Polat, O. K., Uno, M., Maruyama, T., Tran, H. N., Imamura, K., Wong, C. F., Sakaguchi, R., Ariyoshi, M., Itsuki, K., Ichikawa, J., Morii, T., Shirakawa, M., Inoue, R., Asanuma, K., Reiser, J., Tochio, H., Mori, Y., & Mori, M. X. (2019). Contribution of coiled-coil assembly to Ca²⁺/calmodulin-dependent inactivation of TRPC6 channel and its impacts on FSGS-associated phenotypes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(9), 1587–1603. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018070756/-DCSUPPLEMENTAL>
- Prakriya, M. (2013). Store-operated Orai channels: structure and function. *Current topics in membranes*, 71, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00001-9>
- 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(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS9112351>
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2016). *Biochemie* (4. Auflage). Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b-003-129341>
- Reiser, J., Polu, K. R., Möller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P. L., Clapham, D. E., & Pollak, M. R. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genetics*, 37(7), 739–744. <https://doi.org/10.1038/ng1592>
- Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kelsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D., Benham, C. D., & Pangalos, M. N. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, 109(1–2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00527-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00527-2)
- Saleh, S. N., Albert, A. P., Peppiatt-Wildman, C. M., & Large, W. A. (2008). Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in

- vascular myocytes. *The Journal of physiology*, 586(10), 2463–2476.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2008.152157>
- 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. *Journal of Physiology*, 561(2), 415–432.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2004.075051/>
- 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(11), 1443–1450.
<https://doi.org/10.1136/GUT.2009.181735>
- Singh, S., Gokkulakrishnan, Jain, J., Pathak, S., & Singh, K. T. (2010). Adenoid Cystic Carcinoma of Buccal Mucosa. *Journal of Maxillofacial & Oral Surgery*, 9(3), 273.
<https://doi.org/10.1007/S12663-010-0086-8>
- C, 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. *Molecular Biology Reports*, 40(8), 5115–5122. <https://doi.org/10.1007/S11033-013-2613-4/FIGURES/4>
- Startek, J. B., Boonen, B., Talavera, K., & Meseguer, V. (2019). TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 371*, 20(2), 371.
<https://doi.org/10.3390/IJMS20020371>
- Stewart, F. W., FoE, F. W., Becker, W. F., & York, N. (1945). Muco-Epidermoid Tumors of Salivary Glands. *Annals of Surgery*, 122(5), 820.
<https://doi.org/10.1097/00000658-194511000-00005>
- Sun, R., Han, M., Liu, Y., Su, Y., Shi, Q., Huang, L., Kong, L., Li, W., & Li, W. (2024). Trpc6 knockout protects against renal fibrosis by restraining the CN-NFAT2 signaling pathway in T2DM mice. *Molecular Medicine Reports*, 29(1).
<https://doi.org/10.3892/MMR.2023.13136>
- Sun, Y., Birnbaumer, L., & Singh, B. B. (2015). TRPC1 regulates calcium-activated chloride channels in salivary gland cells. *Journal of cellular physiology*, 230(11), 2848–2856. <https://doi.org/10.1002/JCP.25017>
- Sun, Y., Sukumaran, P., Bandyopadhyay, B. C., & Singh, B. B. (2014). Physiological Function and Characterization of TRPCs in Neurons. *Cells*, 3(2), 455.
<https://doi.org/10.3390/CELLS3020455>
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., & Zhu, M. X. (2001). Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *The Journal of*

- biological chemistry*, 276(24), 21303–21310.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M102316200>
- Tang, Q., Guo, W., Zheng, L., Wu, J.-X., Liu, M., Zhou, X., Zhang, X., & Chen, L. (2018). Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Research*, 28(7), 746–755. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0038-2>
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverbergh, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer research*, 66(4), 2038–2047. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0376>
- Trebak, M., Vazquez, G., Bird, G. S. J., & Putney, J. W. (2003). The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium*, 33(5–6), 451–461. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00056-3)
- Vaca, L., & Kunze, D. L. (1994). Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates a Ca(2+)-selective channel in vascular endothelium. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.4.C920>, 267(4 37-4).
<https://doi.org/10.1152/AJPCCELL.1994.267.4.C920>
- Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., & Birnbaumer, L. (1999). Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2060–2064. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.5.2060>
- Venkatachalam, K., & c, C. (2007). TRP Channels. *Annual review of biochemistry*, 76, 387. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142819>
- Venkatachalam, K., van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Ma, H. T., & Gill, D. L. (2002). The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell Biology* 2002 4:11, 4(11), E263–E272. <https://doi.org/10.1038/ncb1102-e263>
- Wang, H., Cheng, X., Tian, J., Xiao, Y., Tian, T., Xu, F., Hong, X., & Zhu, M. X. (2020). TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacology & therapeutics*, 209, 107497. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107497>
- Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenbergt, C., Stettent, G., Montell, C., & Lane, M. D. (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel Communicated by. *Cell Biology*, 92, 9652–9656.
- Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L., Pericak-Vance, M. A.,

- Howell, D. N., Vance, J. M., & Rosenberg, P. B. (2005). A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), 1801–1804. <https://doi.org/10.1126/science.1106215>
- Wong, F., Schaefer, E. L., Roop, B. C., LaMendola, J. N., 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(1), 81–94. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90117-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90117-7)
- Mberg-Vrenken, T. E., Bindels, J. J. M. G. J., Hoenderop,), Hoenderop, J. G. J., Woudenberg-Vrenken, T. E., Bindels, R. J. M., & Hoenderop, J. G. J. (2009). The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2009 5:8, 5(8), 441–449. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.100>
- Wu, L. J., Sweet, T. B., & Clapham, D. E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 381–404. <https://doi.org/10.1124/PR.110.002725>
- Xing, J., Petranka, J. G., Davis, F. M., Desai, P. N., Putney, J. W., & Bird, G. S. (2014). Role of Orai1 and store-operated calcium entry in mouse lacrimal gland signalling and function. *The Journal of physiology*, 592(5), 927–939. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2013.267740>
- Xu, X. Z. S., Li, H. S., Guggino, W. B., & Montell, C. (1997). Coassembly of TRP and TRPL Produces a Distinct Store-Operated Conductance. *Cell*, 89(7), 1155–1164. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80302-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80302-5)
- Yang, L.-L., Liu, B.-C., Lu, X.-Y., Yan, Y., Zhai, Y.-J., Bao, Q., Doetsch, P. W., Deng, X., Thai, T. L., Alli, A. A., Eaton, D. C., Shen, B.-Z., Ma, H.-P., Yang, L.-L., Liu, B.-C., Lu, X.-Y., Yan, Y., Zhai, Y.-J., Bao, Q., ... Ma, H.-P. (2016). Inhibition of TRPC6 reduces non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Oncotarget*, 8(3), 5123–5134. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14034>
- Yip, H., Chan, W. Y., Leung, P. C., Kwan, H. Y., Liu, C., Huang, Y., Michel, V., Yew, D. T. W., & Yao, X. (2004). Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. *Histochemistry and cell biology*, 122(6), 553–561. <https://doi.org/10.1007/S00418-004-0720-Y>
- Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C. V., Landsberg, J. W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D. D., Thistlethwaite, P. A., Rubin, L. J., & Yuan, J. X. J. (2004). Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(38), 13861. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0405908101>

- Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., & Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature cell biology*, 9(6), 636–645. <https://doi.org/10.1038/NCB1590>
- Yue, D., Wang, Y., Xiao, J. Y., Wang, P., & Ren, C. S. (2009). Expression of TRPC6 in benign and malignant human prostate tissues. *Asian Journal of Andrology*, 11(5), 541. <https://doi.org/10.1038/AJA.2009.53>
- Zhou, B., Huang, Z. shan, Chen, W. liang, Huang, Z. xian, Chen, R., Yuan, K. fang, Hong, L., & Chen, Y. ju. (2022). Outcomes of patients with mucoepidermoid carcinoma of minor salivary gland in palate undergoing radical resection followed by submental flap reconstruction. *Asian Journal of Surgery*, 45(6), 1225–1230. <https://doi.org/10.1016/J.ASJSUR.2021.08.039>
- Zhou, M., Ma, T., Wang, X., Zhang, S., Yang, G., Song, R., & Chen, X. (2022). High-risk subtype: Clinical manifestations and molecular characteristics of submandibular gland adenoid cystic carcinoma. *Frontiers in oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.1021169>
- Zhou, Y., Castonguay, P., Sidhom, E. H., Clark, A. R., Dvela-Levitt, M., Kim, S., Sieber, J., Wieder, N., Jung, J. Y., Andreeva, S., Reichardt, J., Dubois, F., Hoffmann, S. C., Basgen, J. M., Montesinos, M. S., Weins, A., Johnson, A. C., Lander, E. S., Garrett, M. R., ... Greka, A. (2017). A small-molecule inhibitor of TRPC5 ion channels suppresses progressive kidney disease in animal models. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6368), 1332. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL4178>
- Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., & Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene. *FEBS Letters*, 373(3), 193–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01038-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01038-G)
- Zhu, X., Jiang, M., & Peyton, M. (1996). *trp*, a Novel Mammalian Gene Family Essential for Agonist-Activated Capacitative Ca²⁺ Entry. *Cell*, 85, 661–671.
- Zhu, Y., Gao, M., Zhou, T., Xie, M., Mao, A., Feng, L., Yao, X., Wong, W. T., & Ma, X. (2019). The TRPC5 channel regulates angiogenesis and promotes recovery from ischemic injury in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(1), 28. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.005392>

VIII. Publikationen und Danksagung

1. Publikationen

Teile der Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Carl C., Wagner M., Linxweiler M., Tschernig T. (2023). Immunohistochemical expression of the cation channel TRPC6 in the submandibular and lacrimal gland and in salivary gland tumors, eingereicht.

2. Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. Thomas Tschernig für die Gelegenheit, bei ihm als Doktorvater meine Doktorarbeit zu schreiben und für seine hervorragende Betreuung. Für die Verwirklichung dieser Arbeit war seine Unterstützung nach wie vor unerlässlich. Vielen Dank für Ihre Geduld und Ihre Ratschläge - ich hätte mir keinen besseren Doktorvater als Sie wünschen können. Anatomie war mein Lieblingsfach in der Vorklinik und es war großartig, dass ich es mit meiner Doktorarbeit verbinden konnte.

Herrn Prof. Dr. Mathias Wagner, Facharzt für Pathologie im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes und Herrn Prof. Dr. M. Linxweiler, Oberarzt an der dortigen Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, danke ich für die Zurverfügungstellung von Schnitten adenoid-zystischer und mukoepidermoider Karzinome aus menschlichen Biopsien. Ich danke Prof. Dr. Wagner nochmals für die sehr interessanten und inspirierenden Gespräche.

Ich möchte mich auch herzlich bei der Sektionsassistentin der Prosektur Frau Irina Scheck bedanken. Sie hat mir die ersten Arbeitsschritte im Labor gezeigt und war immer da, um meine unzähligen Fragen zu beantworten. Sie konnte uns immer helfen und das Material herbeizaubern, wenn es mal knapp wurde. Ich bin dankbar für Deine Anwesenheit im Labor und Deine optimistische Art. Du hast mir die Zeit im Labor wirklich erleichtert.

Ich möchte den Menschen, die ihren Körper der Wissenschaft gespendet haben, um anatomische Forschung zu ermöglichen, meinen innigsten Dank ausdrücken. Die

Erkenntnisse dieser Forschungsarbeit können zur Verbesserung der Versorgung von Patienten und zur Erweiterung des Wissens der Menschheit im Allgemeinen beitragen. Unser größter Dank gilt daher diesen Spendern und ihren Familien.

Ich danke meiner Freundin Berfin Nargili für die Demonstration der IHC-Färbung und für die Unterstützung bei den ersten Schritten der Färbung. Mein Dank gilt auch meinen Laborkollegen, mit denen ich gemeinsam Zeit im Labor verbracht habe.

Ich möchte außerdem mich bei meinen Freundinnen Merve Bayar für das Korrekturlesen meiner Arbeit und Lili Karapetjanová für die Hilfe beim Mikroskopieren bedanken.

An meine Mutter Véronique, die meine erste Lehrerin war und die mir in allen sonnigen und stürmischen Zeiten meines Lebens zur Seite stand. An meinen Vater Dieter, der mich für den Beruf des Zahnarztes begeistert hat. An meine kleine Schwester Amélie, ma fierté, die nächste Dr. Carl an der Reihe.

An meine Freunde und an meinen Freund. Dank euch habe ich dieses Studium überlebt. In den Tiefen und in den Höhen waren wir zusammen, wenn es zu weinen oder zu feiern gab. In Homburg fühlte ich mich am richtigen Platz, dank euch.

IX. Lebenslauf

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

