

Aus dem
Department für Anatomie Tübingen
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie

**Gesamtcharakterisierung des humanen olfaktorischen
Epithels mithilfe der Multiplexing Methode**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Grünig, Jenny

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

2. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Ladurner

Tag der Disputation: 03.05.2024

Widmung

Meinen Eltern, die mich trotz mancher Meinungsverschiedenheiten doch immer kompromisslos unterstützt haben.

Auch meiner restlichen Familie und meinen Freunden, ohne die ich jetzt nie dort wäre, wo ich bin.

Kurzum: Allen meinen Herzensmenschen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Hinweise.....	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Das olfaktorische System.....	8
1.1.1 Makroskopie und Mikroskopie der Nase.....	8
1.2 Immunhistochemische Färbungen	16
1.2.1 Grundlagen der Immunologie	16
1.2.2 Prinzip der Immunhistochemie.....	17
1.2.3 Autofluoreszenz als Schwierigkeit bei Immunfluoreszenz- Färbungen	19
1.2.4 Schwierigkeiten bei Immunfluoreszenz-Färbungen mit mehr als vier Markern.....	20
1.3 Multiplexing Ansätze	21
1.4 Fragestellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Projektgliederung	26
2.2 Material	27
2.2.1 Humane Gewebeproben.....	27
2.2.2 EDTA-Dekalzifizierungslösung	28
2.2.3 Saccharose-Lösung.....	28
2.2.4 Magermilchpuffer-Blockierungslösung.....	29
2.2.5 Lösungen zur Autofluoreszenz-Reduktion	29
2.2.6 Lösungen zur Antikörper-Entfernung	30
2.2.7 Antikörper	32
2.2.8 Chemikalien.....	34
2.2.9 Laborverbrauchsmaterialien	35

2.2.10	Labormehrwegmaterialien	37
2.2.11	Laborgeräte	37
2.2.12	Programme.....	38
2.3	Methoden	39
2.3.1	Dekalzifizierung	39
2.3.2	Cryo-Fixierung	39
2.3.3	Cryo-Schnitte	39
2.3.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
2.3.5	Klassische Immunhistochemie-Färbung	41
2.3.6	Erster Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion	42
2.3.7	Zweiter Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion	44
2.3.8	Optimierter Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion	46
2.3.9	Antikörper-Entfernung.....	47
2.3.10	Zusammengeführte Multiplexing Protokolle.....	50
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Anfertigung von Schnitten und Etablierung von Markern am RE	56
3.1.1	Anfertigung von Cryo-Schnitten.....	56
3.1.2	Morphologische Darstellung der nasalen Strukturen im Verlauf ...	56
3.1.3	Testung von Antikörper-Markern am RE	59
3.1.4	Zusammenfassung – Cryo-Schnitte und etablierte Marker am RE	63
3.2	Reduktion der Autofluoreszenz	64
3.2.1	Erster Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE	64
3.2.2	Zweiter Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE	67
3.2.3	Optimierung des Protokolls zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE	70
3.2.4	Autofluoreszenz-Reduktion an unterschiedlichen Geweben.....	71
3.2.5	Autofluoreszenz-Reduktion mit Sudanschwarz optimiert für große Cryo-Schnitte mit RE	74
3.2.6	Zusammenfassung – Reduktion der Autofluoreszenz an unterschiedlichen Schnitten und Strukturen.....	77
3.3	Antikörper-Entfernung	78
3.3.1	Versuchsansatz zur Antikörper-Entfernung	78
3.3.2	Zusammenfassung – Antikörper-Entfernungsmethoden.....	83

3.4	Zusammengeführte Multiplexing Ansätze	83
3.4.1	Erster Multiplexing Test-Ansatz	84
3.4.2	Zweiter optimierter Multiplexing Ansatz	86
3.4.3	Multiplexing an großen Schnitten.....	90
3.4.4	Multiplexing an einem Nasenlängsschnitt mit OE	92
3.4.5	Zusammenfassung – Multiplexing Ansätze	104
4	Diskussion	105
4.1	Autofluoreszenz	105
4.1.1	Autofluoreszenz in Abgrenzung zu unspezifischer Bindung am RE 105	
4.1.2	Autofluoreszenz an neuronalem Gewebe	107
4.1.3	Zusammenfassung Autofluoreszenz.....	109
4.2	Autofluoreszenz-Reduktion	110
4.2.1	Verschiedene Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE ..	110
4.2.2	Autofluoreszenz-Reduktion an neuronalen Strukturen	113
4.2.3	Autofluoreszenz-Reduktion an großen Schnitten mit RE und neuronalen Strukturen	115
4.2.4	Zusammenfassung Autofluoreszenz-Reduktion	117
4.3	Antikörper-Entfernung	117
4.3.1	Verschiedene Ansätze zur Antikörper-Entfernung bei indirekter Immunhistochemie am RE	117
4.3.2	Antikörper-Entfernung bei indirekter Immunhistochemie am OE	122
4.3.3	Zusammenfassung Antikörper-Entfernung	123
4.4	Schwierigkeiten beim Multiplexing am RE.....	123
4.4.1	Das Nachlassen der Signalintensität	123
4.4.2	Die Gewebeschädigung.....	124
4.4.3	Zusammenfassung Schwierigkeiten beim Multiplexing am RE...	125
4.5	Immunfluoreszenz-Färbungen an verschiedenen nasalen Strukturen 125	
4.5.1	Immunfluoreszenz-Darstellungen am RE	125
4.5.2	Charakterisierung des OE mit der Multiplexing Methode.....	127
4.5.3	Zusammenfassung Charakterisierung des OE mit der Multiplexing Methode.....	134

4.6	Schlussfolgerungen und Ausblicke.....	135
4.6.1	Schlussfolgerungen aus den methodischen Ergebnissen zur Autofluoreszenz-Reduktion und zur Antikörper-Entfernung	135
4.6.2	Die Multiplexing Methode als Chance für die Diagnostik der Zukunft 136	
4.6.3	Ergänzendes Verständnis der Zusammensetzung und Funktion des OE beim Menschen	137
5	Zusammenfassung	140
6	Anhang	142
6.1	Negativkontrollen der Multiplexing Ansätze an Nasenlängsschnitten von H80 mit OE	142
6.2	Ergänzende Abbildung des zweiten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80	144
7	Literaturverzeichnis:.....	146
	Erklärung zum Eigenanteil.....	154
	Danksagung	155

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopische Anatomie der Nase	9
Abbildung 2: Schema des mikroskopischen Aufbaus des RE und Vorkommen einiger Immunfluoreszenz-Marker	11
Abbildung 3: Schema des mikroskopischen Aufbaus des OE	15
Abbildung 4: Schema zu Lage und Aufbau des Bulbus olfactorius	16
Abbildung 5: Schema zum Prinzip der Immunfluoreszenz	19
Abbildung 6: Vereinfachtes Schema zum Multiplexing Ansatz mit Antikörper- Entfernung.....	23
Abbildung 7: Schema zum zeitlichen Ablauf der klassischen Immunhistochemie- Färbung.....	42
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Abweichungen der Autofluoreszenz- Protokolle des ersten Ansatzes von der klassischen Immunhistochemie- Färbung.....	43
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Abweichungen der Autofluoreszenz- Protokolle des zweiten Ansatzes von der klassischen Immunhistochemie- Färbung.....	45
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ansätze zur Antikörper-Entfernung	48
Abbildung 11: Graphische Darstellung der verschiedenen Protokolle der Multiplexing Ansätze	51
Abbildung 12: Darstellung von Nasenpräparat H84 aus verschiedenen Ansichten.....	57
Abbildung 13: Morphologische Entwicklung der nasalen Strukturen im Verlauf von frontal nach dorsal anhand von HE-Färbungen des Nasenpräparats H84	58
Abbildung 14: Färbung von E-Cadherin am RE	60
Abbildung 15: Färbung von K19 am RE	60
Abbildung 16: Färbung von ACE2 am RE	61
Abbildung 17: Färbung von ANXA1 am RE.....	62
Abbildung 18: Färbung von K5 am RE	63
Abbildung 19: Vergleich der Autofluoreszenz-Reduktion des ersten Ansatzes	66
Abbildung 20: Vergleich der Autofluoreszenz-Reduktion des zweiten Ansatzes	69

Abbildung 21: Vergleich der Autofluoreszenz am RE	72
Abbildung 22: Vergleich der Autofluoreszenz am Bulbus olfactorius.....	74
Abbildung 23: Vergleich der Autofluoreszenz-Reduktion durch unterschiedliche Sudanschwarz-Protokolle an großen Schnitten mit RE	77
Abbildung 24: Vergleich der Ansätze zur Antikörper-Entfernung.....	81
Abbildung 25: Schema des entwickelten Multiplexing Ansatzes	84
Abbildung 26: erster Multiplexing Test-Ansatz	85
Abbildung 27: zweiter optimierter Multiplexing Ansatz	88
Abbildung 28: Schema Multiplexing Ansatz für große Schnitte	91
Abbildung 29: erster Multiplexing Ansatz an H80 gezeigt an einem Nasenlängsschnitt	95
Abbildung 30: erster Multiplexing-Ansatz an H80 gezeigt an einem Ausschnitt mit OE	96
Abbildung 31: zweiter Multiplexing Ansatz an H80, gezeigt an einem Ausschnitt mit OE	101
Abbildung 32: Abgrenzung zwischen Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörper-Bindung am RE.....	106
Abbildung 33: Autofluoreszenz-Reduktion am Bulbus olfactorius	114
Abbildung 34: Optimierte Autofluoreszenz-Reduktion für große Schnitte.....	116
Abbildung 35: Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen am RE.....	127
Abbildung 36: Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen am OE.....	134
Abbildung 37: Negativkontrollen von Färbung 1 der Multiplexing Ansätze an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE	142
Abbildung 38: Negativkontrollen von Färbung 2 des ersten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE	143
Abbildung 39: Negativkontrollen von Färbung 2 und Färbung 4 des zweiten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE.....	143
Abbildung 40: Negativkontrollen von Färbung 3 des ersten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE	144
Abbildung 41: Vierte Färbung des zweiten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80.....	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Absorptions- und Emissionsmaxima einiger Sekundärantikörper	18
Tabelle 2: Übersicht der Vor- und Nachteile verschiedener Multiplexing Ansätze	24
Tabelle 3: Informationen zu den Körperspendern	27
Tabelle 4: Liste der verwendeten Primärantikörper	32
Tabelle 5: Liste der verwendeten Sekundärantikörper	33
Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien	34
Tabelle 7: Liste der verwendeten Laborverbrauchsmaterialien	36
Tabelle 8: Liste aller verwendeten Labormehrwegmaterialien	37
Tabelle 9: Liste aller verwendeten Laborgeräte	37
Tabelle 10: Liste aller verwendeten Programme	38
Tabelle 11: Protokolle zum ersten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion	64
Tabelle 12: Protokolle zum zweiten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion	68
Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse der ersten zwei Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion	70
Tabelle 14: Vergleich Ergebnisse Antikörper-Entfernungsmethoden	82
Tabelle 15: Ergebnisse der gefärbten Marker am OE in Multiplexing Ansätzen an Nasenlängsschnitten von H80	103
Tabelle 16: Übersicht der Ergebnisse der Ansätze zur Autofluoreszenz- Reduktion	110
Tabelle 17: Übersicht der Ergebnisse des Ansatzes zu den Antikörper- Entfernungsmethoden am RE	118

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
≥	Größer gleich
®	Registered (registrierte Marke)
°C	Grad Celsius
ACE2	Angiotensin-converting-enzyme 2 (Angiotensin-umwandelndes-Enzym 2)
ANXA1	Annexin 1
ANXA2	Annexin 2
ANXA5	Annexin 5
ANXA5	Annexin 5
BME	Beta-Mercaptoethanol
CD56 (NCAM)	Cluster of differentiation 56 (neural cell adhesion molecule) (neuronales Zell-Adhäsionsmolekül)
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin
DPX	Dibutylphthalat Polystyrol Xylol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
GBZ	Globose Basalzellen
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
ggf.	Gegebenenfalls

HBZ	Horizontale Basalzellen
HE	Hämatoxylin-Eosin
K14	Keratin 14
K15	Keratin 15
K19	Keratin 19
K5	Keratin 5
Ki67	Kiel-Antigen Nummer 67
L	Liter
MIBI	Multiplexed ion beam imaging (Multiplexing-Ionenstrahl-Bilderzeugung)
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP-Lösung	Magermilchpuffer-Blockierungslösung
ms	Millisekunden
NeuroD1	Neuronal differentiation 1 (neuronale Differenzierung 1)
NGN1	Neurogenin 1
nm	Nanometer
OE	Olfaktorisches Epithel
OMP	Olfaktorisches Marker-Protein
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

pH	Pondus Hydrogenii
RE	Respiratorisches Epithel
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOX2	Sex determining region Y-box 2 (geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2)
TMU	Tumormikroumgebung
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
TSA	Tyramide signal amplification (Tyramid-Signalverstärkung)
™	Trade mark (Handelsmarke)
UEA1	Ulex Europaeus Agglutinin 1
w/v	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)
ZNS	Zentrales Nervensystem
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer

Hinweise

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

1 Einleitung

1.1 Das olfaktorische System

1.1.1 Makroskopie und Mikroskopie der Nase

1.1.1.1 Die nasalen Strukturen – makroskopische Übersicht

Die Nase besteht aus den Cavum nasi dexter und sinister, welche durch das Septum nasi getrennt werden (Jones, 2001) (Abbildung 1).

An den lateralen Nasenscheidewänden befinden sich die drei Conchae nasales inferior, media und superior, welche Verbindungsgänge zu den ipsilateralen Nasennebenhöhlen ausbilden (Jones, 2001) (Abbildung 1). Zu den Nasennebenhöhlen zählen der Sinus maxillaris, frontalis und sphenoidalis sowie mehrere Cellulae ethmoidales (Jones, 2001).

Alle diese Strukturen gehören in der Regel größtenteils zur Regio respiratoria und sind dementsprechend mit respiratorischem Epithel (im Folgenden als RE abgekürzt) bedeckt (Harkema et al., 2006).

Im kranio-dorsalen Anteil der Nase liegt in den meisten Fällen die Regio olfactoria, welche von olfaktorischem Epithel (im Folgenden als OE abgekürzt) bedeckt ist (Harkema et al., 2006). Dieses OE wird von der Schädelhöhle durch einen dünnen Knochen getrennt, die Lamina cribrosa (Harkema et al., 2006).

Durch diesen Knochen ziehen die Fortsätze der olfaktorischen Rezeptorneurone (im Folgenden als ORN abgekürzt), welche im Epithel lokalisiert sind, um im Bulbus olfactorius weiter verschaltet zu werden (Harkema et al., 2006).

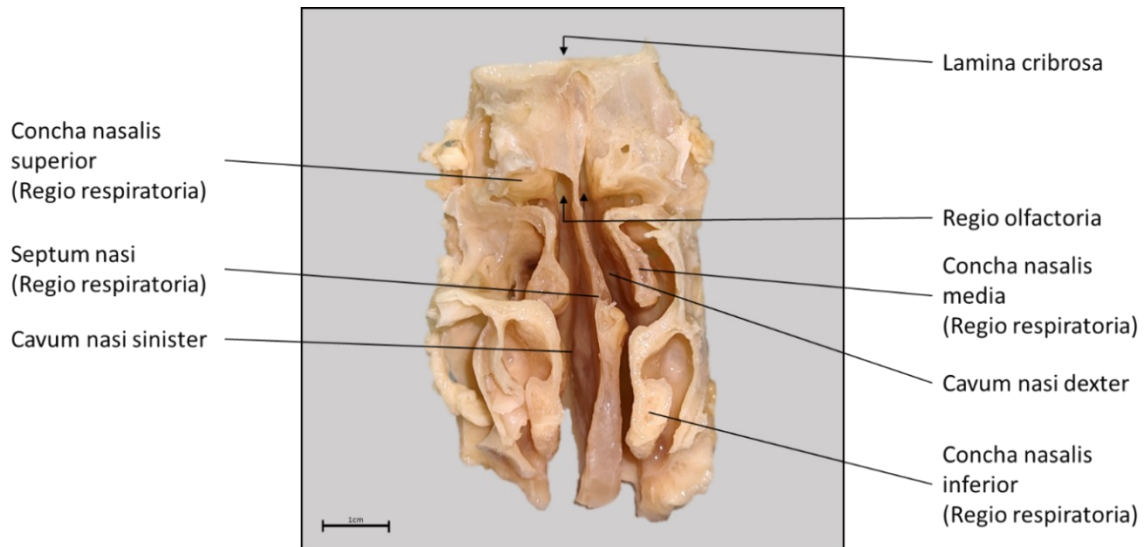


Abbildung 1: Makroskopische Anatomie der Nase

Darstellung von Präparat H88 in der Ansicht von dorsal. Wichtige makroskopische anatomische Strukturen sind beschriftet.

Maßstabsbalken 1cm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

1.1.1.2 Das RE

1.1.1.2.1 Mikroskopischer Aufbau des RE

Der Großteil der Nase ist als Teil der Regio respiratoria mit RE ausgekleidet (Harkema et al., 2006). Das RE findet sich hauptsächlich auf dem Septum nasi und den Conchae nasales und damit auf dem Großteil der Cavum nasales (Harkema et al., 2006).

Das RE ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel, welches von einer Schleimschicht bedeckt ist (Jones, 2001) (Abbildung 2). Das gesamte Epithel liegt einer Basalmembran auf, welche es vom subepithelialen Bindegewebe und der Lamina propria abgrenzt. In der Lamina propria unterhalb des Epithels finden sich viele seromuköse Drüsen (Glandulae nasales), die zusammen mit den intraepithelialen Becherzellen den Schleim produzieren und auf das Epithel absondern (Harkema et al., 2006). Außerdem finden sich im RE Basalzellen, die als Zellreserve dienen (Harkema et al., 2006) (Abbildung 2). Die beweglichen Kinozilien an den apikalen Zellpolen erfüllen die wichtige Funktion der Mukoziliären Clearance, des Selbstreinigungsmechanismus des RE. Weitere

wichtige Funktionen des RE sind die Erwärmung und Befeuchtung der Atemluft sowie der Schutz vor Fremdpartikeln, Viren und Bakterien (Jones, 2001).

1.1.1.2.2 Immunfluoreszenz Marker am RE

Es sind einige Marker bezüglich ihres Vorkommens am RE beschrieben, wobei jedoch die meisten Marker nicht ausschließlich spezifisch für das RE sind. Häufig handelt es sich allgemein um epitheliale Proteine, die ebenfalls am RE ein Expressionsmuster aufweisen.

Hierzu zählen beispielweise die Keratine, welche früher als Cytokeratine bezeichnet wurden und eine Gruppe von vielen verschiedenen Proteinen darstellen (Moll et al., 2008). Die Expression von Keratin 5 (im Folgenden als K5 abgekürzt) ist in Basalzellen von Epithelien beschrieben, was auch auf die Basalzellen des RE zutrifft (Oliva et al., 2022, Tanos et al., 2017). Keratin 19 (im Folgenden als K19 abgekürzt) konnte hingegen an den hochprismatischen Flimmerepithelzellen des RE gefunden werden (Nishijima et al., 2022, Child et al., 2018).

Eine weitere Klasse an epithelialen Proteinen sind solche, die am Zell-Zell-Kontakt beteiligt sind, wozu unter anderem E-Cadherin zählt. In der Literatur ist die Expression des E-Cadherin am RE an den Zellmembranen und Zellgrenzen der Epithelzellen beschrieben (Yuksel et al., 2021, Luo et al., 2012).

Collagen IV, welches ebenfalls an vielen Epithelien nachgewiesen werden kann, zeigt eine Expression an der Basalmembran (Khoshnoodi et al., 2008).

Ein anderer Marker, der im RE positiv gefunden werden konnte, ist Annexin 1 (im Folgenden als ANXA1 abgekürzt). Das Expressionsmuster von ANXA1 wurde hierbei an den apikalen Kinozilien der Epithelzellen des humanen und des Kaninchen RE nachgewiesen (Dreier et al., 1998, Mayran et al., 1996).

Die Ergebnislage ist allerdings nicht immer eindeutig, da sich auch Marker finden, für die unterschiedliche Beschreibungen der Expressionsmuster vorliegen. Dieser Umstand trifft beispielsweise auf das Angiotensin-converting-enzyme 2 (im Folgenden als ACE2 abgekürzt) zu. Für ACE2 finden sich einerseits Literaturangaben, wonach es ein isoliertes Signal an den apikalen Zellmembranen der Epithelzellen des RE zeige (Jia et al., 2005). Andererseits gibt es auch Beschreibungen über das Vorkommen von ACE2 sowohl apikal als

auch basal an den Flimmerepithelzellen und an den Schleim bildenden Zellen des RE (Zhang et al., 2020). Weitere Autoren konnten eine Expression von ACE2 am humanen RE ebenfalls an den Flimmerepithelzellen und den Schleim bildenden Zellen sowie zusätzlich an den Basalzellen nachweisen (Klingenstein et al., 2020).

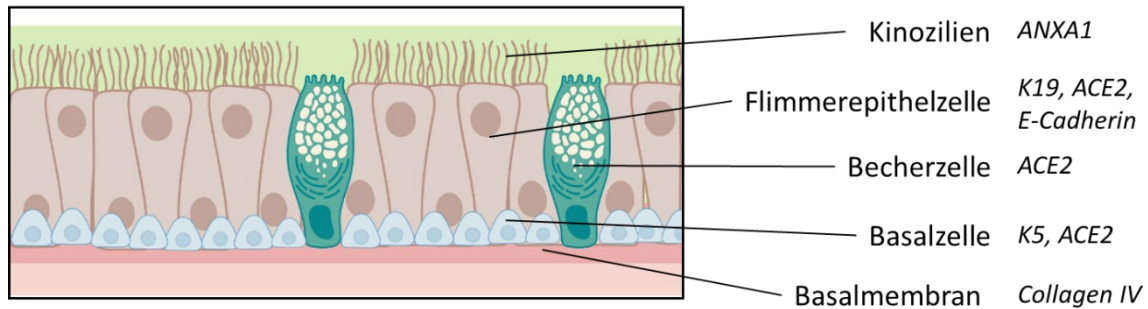


Abbildung 2: Schema des mikroskopischen Aufbaus des RE und Vorkommen einiger Immunfluoreszenz-Marker

Schematische Abbildung des mikroskopischen Aufbaus des respiratorischen Flimmerepithels. Die wichtigsten Zelltypen sind dargestellt und beschriftet. Außerdem finden sich rechts in der Abbildung, in kursiv geschriebenen, einige am RE vorkommende Marker.

Erstellt mit Biorender.com

1.1.1.3 Das OE

1.1.1.3.1 Mikroskopischer Aufbau des OE

Zu dem olfaktorischen System wird neben dem OE auch der Bulbus olfactorius gezählt. Dabei werden über das OE Duftstoffe wahrgenommen und diese Informationen an den Bulbus olfactorius als Teil des Zentralen Nervensystems (im Folgenden als ZNS abgekürzt) weitergeleitet. Dort finden bereits erste Verarbeitungsprozesse der einkommenden Geruchsinformationen statt und die prozessierten Informationen werden an höher geschaltete Bereiche im Gehirn weitergeleitet (Jones, 2001, Moran et al., 1982b). Das OE findet sich in der Regio olfactoria, welche eine deutlich kleinere Fläche als die Regio respiratoria einnimmt, und ist meist am kranio-dorsalen Teil der Nase, Teilen der Concha nasalis superior und superioren Anteilen des Septum nasi lokalisiert (Morrison and Costanzo, 1990, Viktorov et al., 2006). Es stellt sich histologisch als

mehrschichtig hochprismatisches Epithel dar, bestehend aus unterschiedlichen Zelltypen (Morrison and Costanzo, 1990, Moran et al., 1982b) (Abbildung 3).

Basal im OE liegen die Basalzellen, welche als eine Art Reservezellen fungieren, aus denen sich regelmäßig wieder die Zellen des OE nachbilden (Bryche et al., 2021, Jones, 2001) (Abbildung 3). Damit ist das OE, im Gegensatz zu den meisten anderen Anteilen des ZNS, regenerationsfähig und kann sich innerhalb einiger Wochen wieder komplett neu ausbilden (Jones, 2001, Viktorov et al., 2006). Zwischen den Basalzellen unterscheidet man die globosen Basalzellen (im Folgenden als GBZ abgekürzt) und die horizontalen Basalzellen (im Folgenden als HBZ abgekürzt) (Abbildung 3). Es wird vermutet, dass die HBZs Vorläufer der GBZs bilden sowie als Stammzellen der olfaktorischen Hüllzellen dienen, wohingegen die GBZ als multipotente Stammzellen für die stetige Erneuerung der restlichen Zellen des OE verantwortlich sind (Viktorov et al., 2006, Beites et al., 2005).

Somit finden sich im OE häufig ORN unterschiedlichen Reifegrades. Die ORN sind bipolar, liegen mit ihren Zellkörpern in einer Schicht über den Basalzellen und reichen mit ihren Zilien bis über das OE hinaus (Escada et al., 2009, Viktorov et al., 2006, Moran et al., 1982b) (Abbildung 3). Dort binden die Geruchsstoffe, verstärkt durch die Wirkung von olfaktorischen Bindeproteinen, welche sich in einem aufliegenden Riechschleim sammeln (Bryche et al., 2021, Jones, 2001). Dieser Schleim wird in den Glandulae olfactoriae, auch bezeichnet als Bowman-Drüsen, gebildet, die als seröse Drüsen in der Lamina propria unter dem OE liegen (Escada et al., 2009, Jones, 2001) (Abbildung 3).

Zwischen den Rezeptorneuronen liegen die Stützzellen, die das OE auffüllen und mehrere wichtige Funktionen erfüllen (Morrison and Costanzo, 1990) (Abbildung 3). Zu den Aufgaben der Stützzellen zählen neben der Phagozytose alter abgestorbener ORN, die Entgiftung von aus der Atemluft stammenden Noxen sowie der unterstützende Halt der ORN im OE (Beites et al., 2005).

Ein weiterer Zelltyp, der im OE differenziert werden konnte, sind die mikrovillösen Zellen, welche mit ihren Zellkörpern über den Stützzellen liegen und an ihrem apikalen Pol Mikrovilli sowie an ihrem basalen Pol einen feinen axonalen Fortsatz aufweisen (Moran et al., 1982a) (Abbildung 3). Diese Morphologie lässt

vermuten, dass es sich bei den mikrovillösen Zellen eventuell um neuronale Chemorezeptoren handeln könnte, wobei die Funktion dieser Zellen noch nicht abschließend geklärt ist (Moran et al., 1982a, Doyle et al., 2018).

Die basalen Fortsätze der ORN ziehen als Nervenfasern, den Fila olfactoria, durch die Lamina cribrosa in die Schädelhöhle zum Bulbus olfactorius (Morrison and Costanzo, 1990, Harkema et al., 2006). Hierbei werden die Fila olfactoria von olfaktorischen Hüllzellen begleitet, welche die Nervenfasern schützen (Beites et al., 2005, Escada et al., 2009). Außerdem wird angenommen, dass die olfaktorischen Hüllzellen an der Fähigkeit der ORNs zur Neuroregeneration beteiligt sind (Beites et al., 2005, Viktorov et al., 2006).

1.1.1.3.2 Immunfluoreszenz-Marker am OE

Am OE konnten schon viele verschiedene Marker unterschiedlicher Proteinklassen nachgewiesen werden.

Das olfaktorische Marker-Protein (im Folgenden als OMP abgekürzt) ist dabei ein Marker für reife ORN, welches spezifisch für diese Zellen des OE ist (Borgmann-Winter et al., 2015, Farbman and Margolis, 1980, Monti-Graziadei et al., 1977). Als weiterer neuronaler Marker, welcher an den ORN nachgewiesen werden konnte, dient das Beta-Tubulin III (Viktorov et al., 2006, Beites et al., 2005). Dieses findet sich sowohl in den unreifen als auch in den reifen ORN (Borgmann-Winter et al., 2015, Roskams et al., 1998).

K5 ist ein Marker von Basalzellen in vielen Epithelien und lässt sich neben dem oben bereits beschriebenen Vorkommen am RE auch im OE finden. Allerdings liegen im OE zwei verschiedene Typen an Basalzellen vor, die GBZ und die HBZ, welche interessanterweise auch eine unterschiedliche Expression von K5 aufweisen (Beites et al., 2005, Viktorov et al., 2006). Nur die HBZ werden, im Gegensatz zu den GBZ, als Keratin positive Basalzellen beschrieben, wobei sich diese klare Trennung mehr bei Nagetieren als beim Menschen finden lässt (Beites et al., 2005, Borgmann-Winter et al., 2015). Die HBZ zeigen dementsprechend auch eine Expression von K5, wohingegen die GBZ für K5 negativ sind (Viktorov et al., 2006).

Wie am RE konnten auch am OE bereits Expressionen aus der Gruppe der Annexine nachgewiesen werden. ANXA1, ebenso wie Annexin 5 (im Folgenden

als ANXA5 abgekürzt), sind hierbei in Mäusen und Fröschen mit einer gemeinsamen Lokalisation an den apikalen Zilien des OE beschrieben worden (Uebi et al., 2007, Kuhlmann et al., 2014).

Als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül ist E-Cadherin nicht spezifisch für das OE, konnte an diesem aber auch schon nachgewiesen werden (Akins et al., 2007). In Mäusen fand sich E-Cadherin dabei über das gesamte OE verteilt, sowohl an den Stützzellen als auch an den ORN und den Basalzellen (Akins et al., 2007).

Ein weiterer Marker ist Collagen IV, welches spezifisch für die unter einem Epithel liegende Basalmembran ist, wo es sich auch am OE finden lässt (Khoshnoodi et al., 2008, Koujitani et al., 2001).

Ulex Europaeus Agglutinin 1 (im Folgenden als UEA1 abgekürzt) ist ein Protein aus der Gruppe der Lectine und wurde in verschiedenen Spezies bereits am OE dargestellt (Plendl and Sinowatz, 1998). So konnte UEA1 in Ratten an apikalen Membranteilen der ORN, an Zellen innerhalb des OE sowie in der Nervenzellschicht und der Glomerularschicht im Bulbus olfactorius gefunden werden (Barber, 1989). Untersuchungen am humanen Bulbus olfactorius zeigten ebenfalls eine Expression in der Nervenzellschicht und der Glomerularschicht sowie ergänzend in der äußeren plexiformen Schicht und der Körnerzellschicht (Nagao et al., 1993). Im Pferd hingegen wurde UEA1 vor allem in den intraepithelialen Bowman-Drüsen nachgewiesen (Lee et al., 2016).

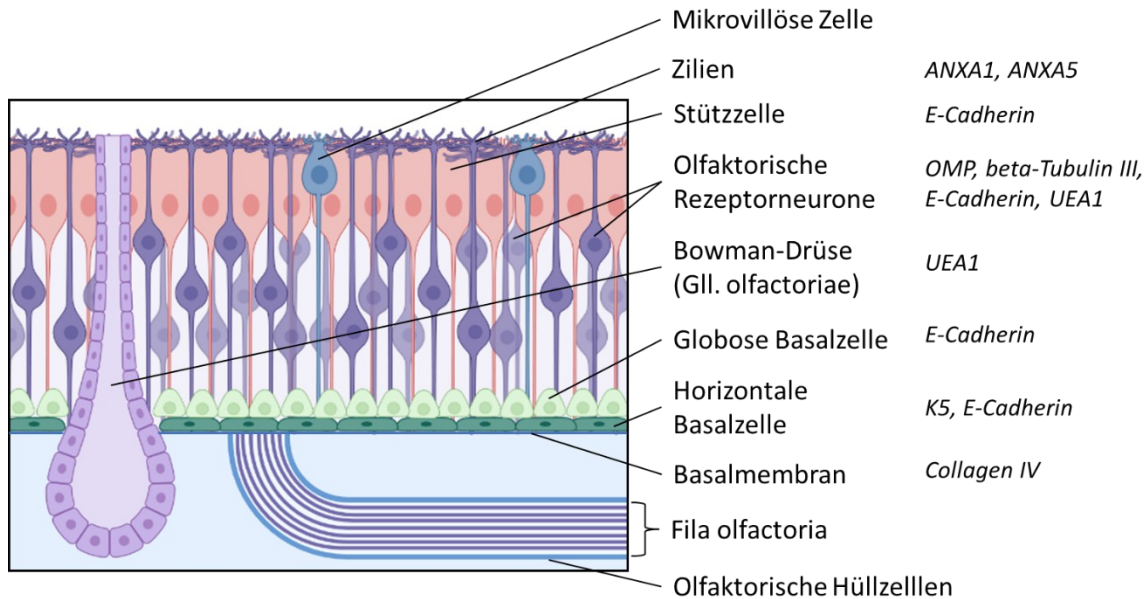


Abbildung 3: Schema des mikroskopischen Aufbaus des OE

Schematische Darstellung des mikroskopischen Aufbaus des OE. In dem Schema finden sich die mikrovillösen Zellen, die Stützzellen, die Bowman-Drüsen, die beiden Typen der Basalzellen (globose und horizontale) sowie die Rezeptorneurone mit ihren apikalen Zilien und ihren axonalen Fortsätzen, welche aus dem Epithel austreten und als Fila olfactoria im subepithelialen Bindegewebe Richtung Lamina cribrosa ziehen. Zudem befindet sich rechts neben den einzelnen Zelltypen jeweils eine Auflistung einiger in der Literatur bereits beschriebener Marker.

Erstellt mit Biorender.com

1.1.1.4 Der Bulbus olfactorius

Der Bulbus olfactorius liegt über der Lamina cribrosa innerhalb des Craniums und ist in verschiedenen Schichten organisiert (Abbildung 4).

Die äußerste Nervenzellschicht besteht aus den einkommenden Nervenendigungen der ORN (Harkema et al., 2006). Die neuronalen Signale der ORN werden in den Glomeruli, welche in der Glomerularschicht lokalisiert sind, auf nachfolgende Zellen verschaltet (Nagayama et al., 2014) (Abbildung 4). Hierbei werden oft Signale von mehreren ORN desselben Rezeptortyps auf eine Zelle verschaltet, wodurch es zu einer Konvergenz kommt (Jones, 2001).

Der Glomerularschicht schließt sich die äußere plexiforme Schicht an, welche an die Mitralzellschicht angrenzt (Nagayama et al., 2014) (Abbildung 4).

Anschließend daran finden sich die innere plexiforme Schicht sowie die Körnerzellschicht, welche am weitesten proximal liegt (Nagayama et al., 2014) (Abbildung 4).

Die teilweise bereits gefilterten und sortierten Signale des Geruchssinns werden dann an Strukturen des ZNS, beispielsweise an die Amygdala, den Hippocampus und den Thalamus weitergeleitet (Jones, 2001).

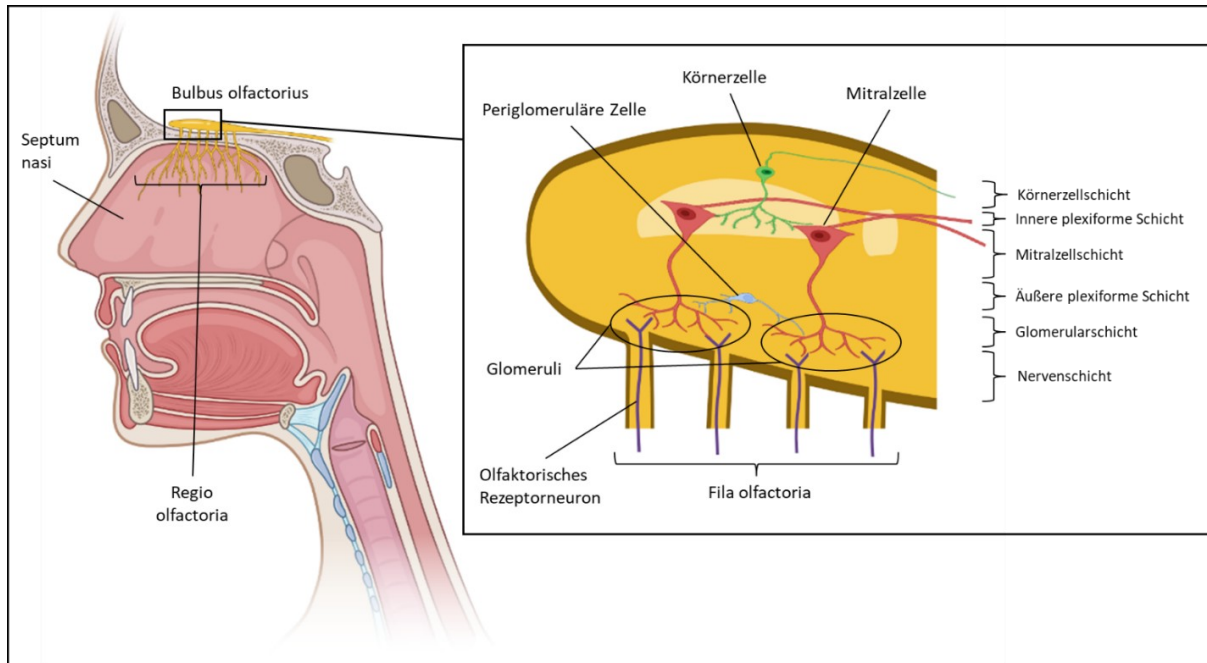


Abbildung 4: Schema zu Lage und Aufbau des Bulbus olfactorius

Auf der linken Seite findet sich eine schematische Darstellung der anatomischen Lage des Bulbus olfactorius im Cranium. Schematische Abbildung des mikroskopischen Aufbaus des Bulbus olfactorius und dessen Schichtung auf der rechten Seite. Die wichtigsten Zelltypen sind dargestellt und beschriftet.

Erstellt mit Biorender.com

1.2 Immunhistochemische Färbungen

1.2.1 Grundlagen der Immunologie

Um die Funktionsweise immunhistochemischer Färbungen zu verstehen ist ein grundlegendes Verständnis der Immunologie relevant.

Bei Kontakt mit nicht-eigenen Strukturen kann ein Organismus diese Antigene als fremd identifizieren (Kaufmann, 2019). Um bei zukünftigen Kontakten mit der gleichen Struktur diese schneller erkennen und gegebenenfalls (im Folgenden als ggf. abgekürzt) schneller reagieren zu können, bilden die Immunzellen, genauer die B-Lymphozyten, passende Antikörper aus (Ma and O'Kennedy, 2015). Die Antikörper können dabei mit ihrer Antigen-Bindungsdomäne

spezifisch an dieses Antigen binden und eine Immunantwort auslösen (Ma and O'Kennedy, 2015, Kaufmann, 2019).

Antikörper sind Proteine, die neben der spezifischen Antigen-Bindungsdomäne auch ein konstantes Fragment besitzen, das verschiedene Funktionen im Organismus aufweist (Ma and O'Kennedy, 2015). Die Antikörper-Antigen-Bindung bildet sich bei Kontakt des Antikörpers mit dem Antigen durch verschiedene Arten von nicht-kovalenten Bindungen aus (Yang et al., 2014). Solch eine Bindung kann beispielweise über Wasserstoffbrücken, Ionen-Wechselwirkungen oder Van-der-Waals Kräfte erzeugt werden und ist somit zwar insgesamt stark, aber dennoch reversibel (Yang et al., 2014).

1.2.2 Prinzip der Immunhistochemie

Eine Standardmethode zur Untersuchung von Zellstrukturen, wie sie in der Tumordiagnostik von hoher Relevanz ist, stellt die Immunhistochemie dar. Für die Klassifizierung der entnommenen Tumorbiosien ist eine Darstellung der exprimierten Antigene der Zellen wichtig. Diese Informationen über die vorhandenen Zellstrukturen sind vor allem im Zeitalter der aufkommenden personalisierten Medizin immer mehr von Interesse (Boisson et al., 2021).

Ein Ziel der modernen Medizin ist unter anderem die Untersuchung, nicht nur der Tumorzellen selbst, sondern auch ihrer Tumormikroumgebung (im Folgenden als TMU abgekürzt), um damit ein besseres Verständnis der individuellen Interaktionen des Tumors mit seiner Gewebe- und Zellumgebung zu erhalten (Boisson et al., 2021, Roversi et al., 2023). Hierbei ist es insbesondere von Vorteil, wenn man zur Analyse der TMU möglichst viele verschiedene Marker für viele verschiedene Zelltypen und Proteine nutzen kann, um prognostisch günstige und ungünstige Biomarker sowie die Anordnungen der Zellen zueinander zuverlässig identifizieren zu können (Roversi et al., 2023, Jia et al., 2022). Auf Grundlage solcher umfangreichen Diagnostik ist die Umstellung auf gezieltere und individuellere Therapien der Tumore möglich, womit ein besseres Ansprechen erreicht werden kann (Keren et al., 2018, Jia et al., 2022).

Die Grundlage immunhistochemischer Färbungen liegt in der Antikörper-Antigen-Interaktion, die auf genau dem gleichen Prinzip beruht wie die physiologische

Immunantwort der von B-Lymphozyten produzierten Antikörper auf eindringende Antigene (Ramos-Vara, 2005).

Hierbei bindet ein Primärantikörper spezifisch an ein gesuchtes Antigen (Moreno et al., 2022, Ramos-Vara, 2005) (Abbildung 5). Diese primären Antikörper werden dabei meist in Tieren erzeugt, die nach Kontakt mit dem gewollten Antigen Antikörper bilden, welche anschließend isoliert und aufgereinigt werden (Ramos-Vara, 2005). Für immunhistochemische Färbungen werden besonders Antikörper aus den Spezies Kaninchen, Maus und Ziege verwendet (Ramos-Vara, 2005).

Spezifisch können nun Sekundärantikörper an das konstante Fragment der Antikörper der primären Spezies binden, welche über eine (Fluoreszenz-) Markierung detektiert werden können (Ramos-Vara, 2005) (Abbildung 5). Durch unterschiedliche Fluoreszenz-Markierungen der Sekundärantikörper können dann die entsprechenden Antigenstrukturen in einem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden (Moreno et al., 2022).

Die Fluorophore, welche an die Sekundärantikörper gekoppelt sind, besitzen sowohl ein Absorptionsmaximum als auch ein Emissionsmaximum (mit unterschiedlichen Wellenlängen). Für einige dieser Antikörper der Firma Thermo Fisher Scientific^{trade mark} ((Handelsmarke) im Folgenden als TM abgekürzt), welche in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, sind in der Tabelle 1 diese Maxima in Nanometer (im Folgenden als nm abgekürzt) aufgeführt.

Zur Vereinfachung ist im Weiteren bei der Erwähnung eines Sekundärantikörpers der Name des entsprechenden Alexa Fluor *registered* ((registrierte Marke) im Folgenden als ® abgekürzt) als Wellenlänge angegeben.

Tabelle 1: Absorptions- und Emissionsmaxima einiger Sekundärantikörper

Aufgeführt sind die Absorptions- und Emissionsmaxima von drei in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sekundärantikörpern der Firma Thermo Fisher ScientificTM nach Angaben des Herstellers.

Alexa Fluor® Sekundärantikörper	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa Fluor® 488	496 nm	519 nm
Alexa Fluor® 546	556 nm	573 nm
Alexa Fluor® 647	650 nm	665 nm

Dieses Prinzip mit Primär- und Sekundärantikörper wird als indirekte Form der Immunfluoreszenz bezeichnet (Moreno et al., 2022). Gibt es hingegen nur Primärantikörper, die selbst Fluoreszenz markiert sind, spricht man von direkter Immunfluoreszenz (Moreno et al., 2022) (Abbildung 5).

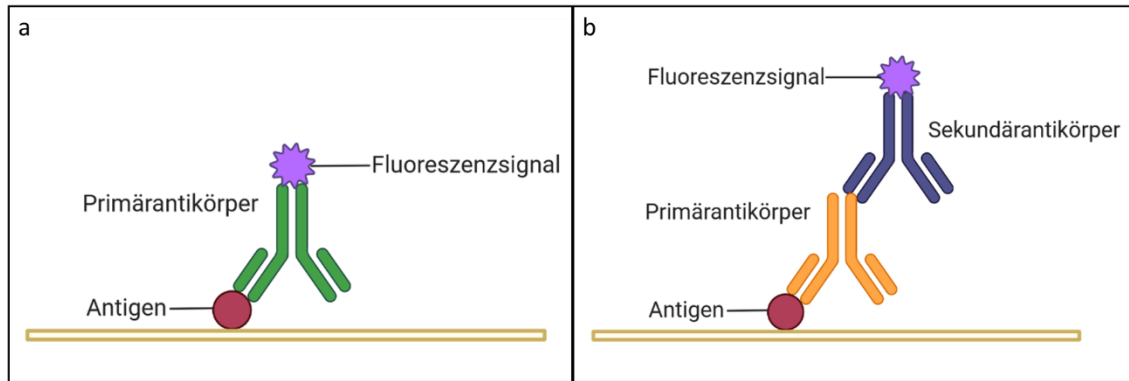


Abbildung 5: Schema zum Prinzip der Immunfluoreszenz

[a] Schematische Darstellung der direkten Immunfluoreszenz. Ein Fluoreszenz markierter Antikörper bindet an das gesuchte Antigen und generiert direkt ein Signal.

[b] Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz. Ein Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen, woraufhin ein Fluoreszenz markierter Sekundärantikörper an den gebundenen Primärantikörper bindet und ein Signal generiert.

Erstellt mit Biorender.com

1.2.3 Autofluoreszenz als Schwierigkeit bei Immunfluoreszenz-Färbungen

Fluorophore sind Moleküle, die in immunhistochemischen Färbungen zu einem positiven Farbsignal führen. Wird ein Fluorophor nicht von extern der Probe zugeführt, beispielsweise gekoppelt an einen Antikörper, sondern ist bereits Bestandteil der Zellen und des Gewebes, spricht man von endogenen Fluorophoren (Monici, 2005). Autofluoreszenz beschreibt das Fluoreszenzsignal im Hintergrund einer Färbung, welches vom untersuchten Gewebe selbst ausgeht, und entsteht durch endogene Fluorophore (Monici, 2005).

Fluorophore sind Moleküle, die in der Lage sind, Energie in Form von Licht zu absorbieren (Monici, 2005). Diese aufgenommene Energie hebt das Energielevel des Moleküls und kann nachfolgend als Emission, in Form von Licht, wieder abgegeben werden (Monici, 2005). Hierbei hat das emittierte Licht weniger Energie, und damit eine größere Wellenlänge als das absorbierte Licht (Monici, 2005).

Solche endogenen Fluorophore sind unter anderem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat), Kollagene, Lipofuszin, Porphyrine und Flavine (Monici, 2005). Diese haben eigene Absorptions- und Emissionsspektren, ebenso wie die exogenen, an Antikörper gekoppelten Fluorophore (Monici, 2005). Dadurch kann es neben den Farbsignalen durch die an die Antikörper gekoppelten Fluorophore auch zu Farbsignalen in Form von Autofluoreszenz kommen, was die Darstellung der spezifischen Färbungen erschwert oder sogar verschleiern kann.

1.2.4 Schwierigkeiten bei Immunfluoreszenz-Färbungen mit mehr als vier Markern

Aus der Kombination der primären und sekundären Antikörper bei der indirekten Immunfluoreszenz ergibt sich noch ein technisches Problem: Die gekoppelten Antikörper, und indirekt damit auch die gesuchten Antigene, sind in der Anzahl der angewendeten Spezies begrenzt (Boisson et al., 2021). Bei der parallelen Verwendung von mehreren Primärantikörpern aus derselben Spezies kann es zu Kreuzreaktionen durch die Sekundärantikörper kommen (Ramos-Vara, 2005). In Laboren, die routinemäßig Immunfluoreszenz-Färbungen durchführen, stehen demnach in der Regel vier verschiedene Primärantikörper-Spezies zur Verfügung (Maus, Kaninchen, Ziege, Hühnchen), wodurch sich auch nur vier Proteine gleichzeitig in dem analysierten Gewebe detektieren lassen.

Ein weiteres Problem ergibt sich aus den gekoppelten Fluorophoren in der Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür stehen standardmäßig neben einem Kernfarbstoff noch drei weitere Fluorophore mit definierter Wellenlänge zur Verfügung. Für komplexere Ansätze sind sehr spezialisierte Mikroskope und kostspielige Sets mit speziell gefertigten Antikörpern notwendig, die sich für Routinefärbungen nicht anwenden lassen. Selbst unter Verwendung solcher speziellen Fluorophor markierten Antikörpern mit unterschiedlichen Wellenlängen ist die Anzahl der anwendbaren Antikörper allerdings begrenzt.

Damit es zu keinen beeinträchtigenden Überschneidungen der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorophore kommt, sollten die Wellenlängen dieser Emissionsspektren weit genug auseinanderliegen und in ihrer maximalen Ausdehnung möglichst schmal sein (Angelo et al., 2014, Francisco-Cruz et al., 2020). Ist dies nicht der Fall, können bei der Detektion einer

für ein Fluorophor spezifischen Wellenlänge auch Störsignale der Emissionsspektren der angrenzenden Fluorophore aufgenommen werden, womit die selektive Darstellung des gesuchten Antigens nicht mehr sicher gegeben wäre (Dunkenberger et al., 2022).

1.3 Multiplexing Ansätze

Um die oben genannten Problematiken der begrenzten Anzahl an Spezies für die Gewinnung von Primärantikörpern und die begrenzte Anzahl an Wellenlängen für die gekoppelten Fluorophore zu umgehen, kann man sich die Multiplexing Methodik zu Nutze machen. Die Idee dieser erweiterten Immunhistochemie ist es mehr als nur vier Marker, wie es häufig bei der klassischen immunhistochemischen Färbung der Fall ist, gleichzeitig auf einem Schnitt darstellen zu können. Für diese Multiplexing Methode gibt es bereits mehrere mögliche experimentelle Ansätze, die in der Literatur beschrieben sind (Tan et al., 2020, Parra et al., 2019). Allerdings weisen diese verschiedenen Multiplexing Methoden auch unterschiedliche Vor- und Nachteile auf, von denen die wichtigsten in der Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Bei einem dieser Ansätze, dem *Multiplexed ion beam imaging* (zu übersetzen als Multiplexing-Ionenstrahl-Bilderzeugung, im Folgenden als MIBI abgekürzt) sind die primären Antikörper direkt mit Metallisotopen markiert (Tan et al., 2020). Nach dem Aufbringen der markierten Antikörper wird die Probe unter einen Ionenstrahl gebracht, welcher Ionen aus den gebundenen Metallen herauslöst (Angelo et al., 2014, Tan et al., 2020). Diese freigesetzten Ionen können nach unterschiedlicher Masse mit einem Massenspektrometer detektiert werden und ergeben das Abbild, der durch die Antikörper erzeugten Signale (Angelo et al., 2014). Dadurch können viele Antikörper gleichzeitig gefärbt und gemeinsam an einem Schnitt dargestellt werden, auch aus derselben Spezies. Diese direkte Form der Immunfluoreszenz ist allerdings insgesamt ungenauer und schwächer als die indirekte Immunfluoreszenz. Außerdem sind solche speziell markierten Antikörper auch deutlich teurer und deshalb als Standardmethode für das Multiplexing eher nicht geeignet (Tan et al., 2020, Ehrenberg et al., 2020).

Eine mögliche indirekte Immunfluoreszenz-Methode ist die Anwendung von *Tyramide signal amplification* (zu übersetzen als Tyramid-Signalverstärkung, im Folgenden als TSA abgekürzt), welche auf einer kovalenten Bindung an Tyrosin-Reste in oder nahe dem gesuchten Antigen basiert (Parra et al., 2019, Sun et al., 2021). Dabei werden Fluoreszenz markierte Tyramide mit einer Meerrettich-Peroxidase durch Radikalbildung aktiviert, was die kovalenten Bindungen ermöglicht (Parra et al., 2019, Sun et al., 2021). Im Anschluss können die Antikörper wieder entfernt und eine erneute Runde mit Färbungen durchgeführt werden, wobei die Fluoreszenz-Markierungen verbleiben. Diese Methode wird bereits zur Diagnostik von B-Zell-Lymphomen angewendet (Hong et al., 2019). Sie ist als kommerziell erhältliches Opal™ Protokoll beschrieben, da hier meistens entsprechende Fluorophore der Firma PerkinElmer® verwendet werden (Sun et al., 2021).

Neben den Ansätzen zu direktem und indirektem Multiplexing gibt es noch eine weitere Methode zur Färbung von mehreren Antigenen auf der gleichen Probe. Bei diesem Ansatz werden mehrere Färberunden der klassischen indirekten Immunhistochemie auf einen Schnitt angewendet. Die einzelnen aufeinanderfolgenden Färbungen müssen aufgrund der nicht-kovalenten Bindungen mit einem Mikroskop registriert und aufgenommen werden. Anschließend werden die Färbung sowie die Fluoreszenz-Markierungen wieder von dem Schnitt gelöst und entfernt, sodass nachfolgend eine weitere Färberunde an demselben Schnitt durchgeführt werden kann (Ehrenberg et al., 2020, Sun et al., 2021, Klingenstein et al., 2026) (Abbildung 6).

Je nachdem wie oft man diesen Zyklus wiederholt, können entsprechend viele Marker an einem identischen Schnitt dargestellt werden. Als Qualitäts- und Negativkontrolle wird dabei in allen Zyklen das Beiseitenehmen je eines Schnittes empfohlen (Ehrenberg et al., 2020) (Abbildung 6). Dieser Multiplexing-Ansatz ist im untenstehenden Schema der Abbildung 6 vereinfacht gezeigt.

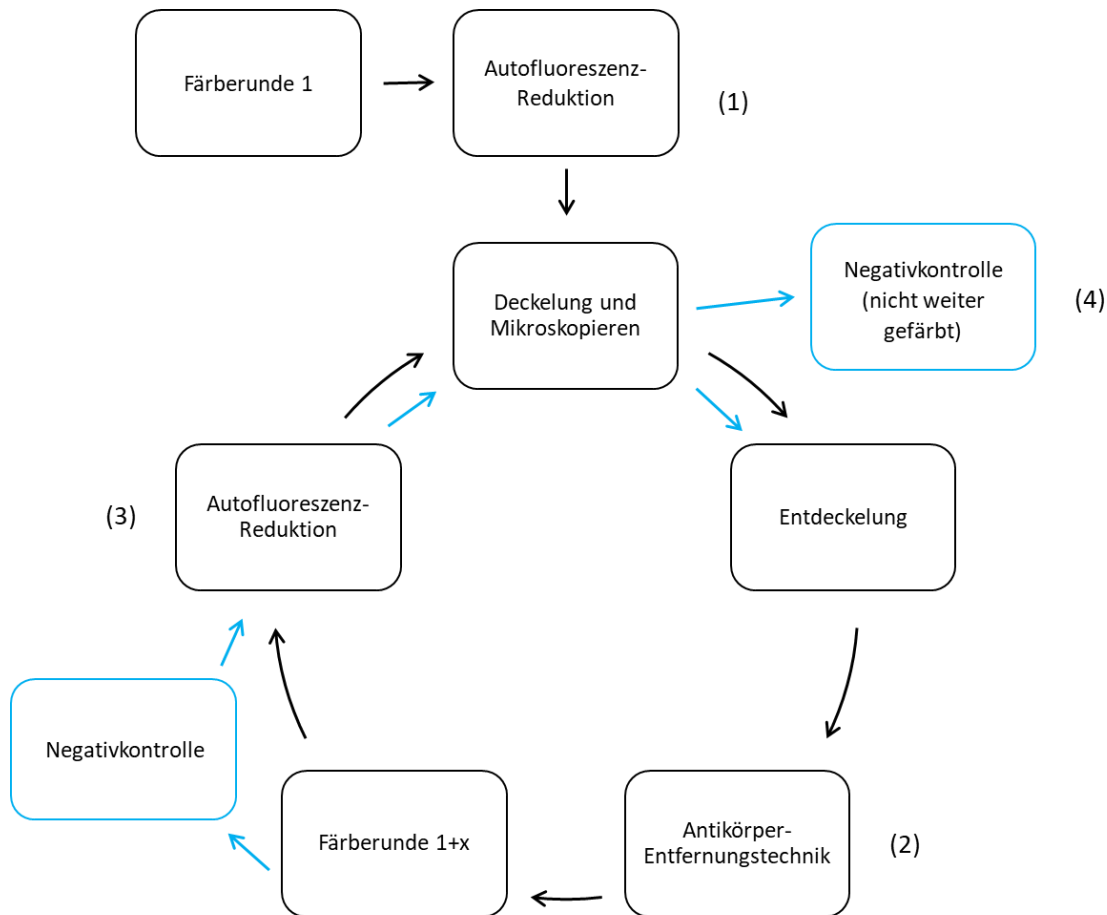


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema zum Multiplexing Ansatz mit Antikörper-Entfernung
 Schematische Darstellung des Prinzips eines Multiplexing Ansatzes basierend auf der Antikörper-Entfernung. Es wird eine klassische Immunhistochemie-Färbung durchgeführt, ggf. ergänzt durch eine Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion (1), und mikroskopiert. Dann wird derselbe Schnitt entdeckelt und die Antikörper-Bindungen der ersten Färbung durch eine Antikörper-Entfernungstechnik wieder gelöst (2). Danach wird eine zweite Färbung, im Sinne einer klassischen Immunhistochemie-Färbung, ggf. wieder ergänzt durch eine Autofluoreszenz-Reduktionsbehandlung, auf demselben Schnitt angewendet (3), und wieder mikroskopiert. Dieser Zyklus kann in der Theorie mehrfach wiederholt werden. Zur parallelen Überprüfung der Effektivität der Antikörper-Entfernung bei jeder einzelnen Färbung empfiehlt es sich, für jede Runde je eine Negativkontrolle mitlaufen zu lassen, die nach dem Mikroskopieren aus dem Zyklus ausgeschleust (4) und nicht mehr weiter behandelt wird. Die abweichenden Schritte der Negativkontrolle sind in Hellblau gezeigt.

In der Literatur finden sich mehrere Möglichkeiten zur Entfernung von Antikörpern von Gewebeschnitten, um diese in mehreren Runden färben zu können.

Neben der Verwendung von Borhydrid-Lösung, was zu einer Fluoreszenz-Löschung führen soll, ist auch die Behandlung durch einen Citrat-Puffer mit einem pondus Hydrogenii (im Folgenden als pH abgekürzt) von 6 unter zusätzlicher Hitze-Wirkung möglich (Sun et al., 2021, Adams et al., 2016).

Darüber hinaus kann ein Glycin/Natriumdodecylsulfat-Puffer (im Englischen als *Sodium dodecyl sulfate* bezeichnet, deshalb im Folgenden als Glycin/SDS-Puffer abgekürzt) mit einem sehr sauren pH von 2 verwendet werden (Pirici et al., 2009). Als eine weitere Methode wird die Anwendung einer beta-Mercaptoethanol/SDS-Lösung (im Folgenden als BME/SDS-Lösung abgekürzt) unter Hitze beschrieben (Ehrenberg et al., 2020, Klingenstein et al., 2026).

Allerdings wird bei diesen Techniken zur Antikörper-Entfernung auch eine Schädigung des Gewebes und damit ein Verlust von Signalen bei zu häufiger und intensiver Anwendung, in zu vielen Färberunden, vermutet (Sun et al., 2021).

Tabelle 2: Übersicht der Vor- und Nachteile verschiedener Multiplexing Ansätze

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der wichtigsten Vor- und Nachteile verschiedener Multiplexing Ansätze, welche in der Literatur bereits experimentell beschrieben wurden.

Multiplexing Methode	Vorteile	Nachteile
Markierung mit Metallisotopen (MIBI)	- Keine Limitierung durch Emissionsspektren der Fluorophore - Keine Limitierung durch Antikörper-Spezies	- Spezielle Antikörper-Sets notwendig (kostenintensiv) - Sehr teuer
TSA basierte Markierung	Dauerhaftes Signal durch kovalente Bindungen	- Spezielle Antikörper-Sets notwendig (kostenintensiv) - Spezielle Mikroskope oder Filter notwendig - Limitierung durch Emissionsspektren der Fluorophore
Antikörper-Entfernung	- In Standardlaboren anwendbar - Wenig kostenintensiv	- Gewebeschädigung möglich - Verminderung oder Verlust des Fluoreszenzsignals mit zunehmenden Runden möglich

Dennoch wird die Multiplexing Methode in der Literatur als effektiver Ansatz zur genauen Charakterisierung und Untersuchung im Besonderen von Tumorzellen beschrieben. Beispielsweise ist mit dieser Methode eine Klassifizierung von Tumorzellen und der T-Zell-Antwort in metastasierten Melanomen (Halse et al., 2018) sowie die Untersuchung mehrerer Tumormarker an Proben von Brustkrebs

möglich (Yeong et al., 2020). Hierbei ist vor allem hervorzuheben, dass die Multiplexing Immunhistochemie im Vergleich zur klassischen Immunhistochemie sehr gewebesparend arbeitet, weshalb sie besonders bei kleinen Probenmengen, wie Tumorbiopsien, eine immer gefragter werdende Färbetechnik ist (Yeong et al., 2020).

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Färbung möglichst vieler Marker und damit die Darstellung mehrerer Strukturen an einem humanen Gewebeanschnitt mittels der Multiplexing Methode. Dies wurde spezifisch an Cryo eingebetteten Proben aus dem olfaktorischen und respiratorischen System getestet.

Hierfür sollten unterschiedliche, bereits in der Literatur beschriebene Multiplexing Ansätze erprobt und spezifisch für die vorliegenden Gewebeproben angepasst und optimiert werden, insbesondere die verschiedenen Antikörper-Entfernungstechniken.

Geplant war außerdem einen Ansatz zu suchen, um die starke Autofluoreszenz des respiratorischen und olfaktorischen Gewebes so weit wie möglich reduzieren zu können. Die Idee war eine detaillierte Charakterisierung des humanen olfaktorischen Systems, mit verminderter Überstrahlung der darzustellenden Strukturen durch Hintergrund-Färbungen.

Im Fokus stand das Ziel, die olfaktorischen Strukturen noch weiter zu klassifizieren und Wissen über bereits bekannte olfaktorische Marker zu ergänzen. Dadurch sollten weitere Grundlagen für das Verständnis der strukturellen Gegebenheiten des olfaktorischen Systems geschaffen werden.

Mit der weiteren Optimierung der Multiplexing Methode, besonders an Cryo-Schnitten von humanen Proben, war die Intention dieser Arbeit zudem, einen Ansatz zur einfacheren und umfangreicheren, beispielsweise diagnostischen, Untersuchung des olfaktorischen Systems zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Projektgliederung

1. Stufe

In der ersten Stufe wurden verschiedene Antikörper auf ihre Expressionsmuster untersucht. Ziel hierbei war das Eruiere von passender Antikörper von exprimierten Proteinen, die in den weiteren Projektabschnitten dann zur eindeutigen Färbung der Gewebe genutzt werden konnten.

2. Stufe

In der nächsten Stufe wurden verschiedene Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion gegeneinander getestet. Es wurden vier verschiedene Behandlungen miteinander verglichen:

- Klassische Immunhistochemie-Färbung
- 3 Prozent (im Folgenden als % abgekürzt) Wasserstoffperoxid-Lösung
- 0,3 % Sudanschwarz
- Wasserstoffperoxid-Lösung + 0,3 % Sudanschwarz

Dabei wurden zu Beginn zwei verschiedene Sudanschwarz-Protokolle mit unterschiedlichen Behandlungszeiten und Waschschrinen angewendet und getestet.

3. Stufe

Nach positiver Validierung der Primärantikörper und der geeigneten Methode zur Autofluoreszenz-Reduktion wurden die ersten Vorversuche zum Multiplexing durchgeführt. Das Ziel war zunächst, die effektivste Antikörper-Entfernungsmethode zu bestimmen. Dafür wurden drei mögliche Entfernungsmethoden miteinander verglichen, die in der Literatur bereits als erfolgreich beschrieben worden sind:

- BME/SDS-Lösung
- Hitze-Behandlung in Citrat-Puffer
- Glycin/SDS-Lösung

4. Stufe

Aus den Zwischenergebnissen der einzelnen Stufen ergab sich zum Schluss ein Multiplexing Ansatz mit einer Behandlung zur Reduktion der Autofluoreszenz und effektiver, aber schonender Antikörper-Entfernungsmethode, die mehrere Runden von Färbungen erlaubte. Damit war die Multiplexing Färbung eines isolierten Nasenlängsschnitts unter Verwendung mehrerer verschiedener Marker möglich. Dieser finale Multiplexing Ansatz wurde für die Anwendung an großen Cryo-Schnitten der humanen Nase (mit ihren unterschiedlichen Epithelien und Geweben) speziell angepasst.

Teile der im Rahmen dieses Promotionsprojektes durchgeführten Ansätze wurden bereits veröffentlicht (Klingenstein et al., 2026).

2.2 Material

2.2.1 Humane Gewebeproben

Der Forschungsarbeit zu Grunde liegende Ethikantrag mit der Nummer 428/2022BO2 wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen positiv bewertet.

In der Arbeit wurde postmortales Gewebe von Körperspendern verwendet, bestehend aus sieben anonymisierten Nasenpräparaten. Die Entnahme der Nasenpräparate der Körperspender und die Formalin-Fixierung waren vor Beginn dieser Arbeit erfolgt.

Die untenstehende Tabelle 3 veranschaulicht die Informationen zu Geschlecht und Todesalter, die zu den Körperspender bekannt sind.

Tabelle 3: Informationen zu den Körperspendern

Körperspender	Geschlecht	Todesalter
H80	weiblich	85
H81	weiblich	68
H82	männlich	80
H84	weiblich	94
H85	männlich	85
H86	männlich	86
H88	männlich	91

Das Präparat H80 wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit in Cryo eingebettet und von Frau Sabine Conrad und Herrn Dr. rer. nat. Moritz Klingenstein geschnitten. Von diesem Präparat wurden somit bereits Objektträger mit angefertigten Cryo-Schnitten eines Nasenlängsschnitts zur Verfügung gestellt.

Die Präparate H81, H82, H84, H85, H86, H88 wurden in einer 10 % Ethylendiamintetraacetat-Lösung (im Folgenden als EDTA-Lösung abgekürzt) zur Verfügung gestellt. Zu Beginn waren H81, H82, H84, H85 und H88 bei 4 Grad Celsius (im Folgenden als °C abgekürzt) im Kühlschrank und H86 bei 37 °C im Wärmeschränk untergebracht. Zwischenzeitlich wurden diese sechs Präparate dann für etwa vier Monate bei 37 °C im Wärmeschränk gelagert und danach alle bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2 EDTA-Dekalzifizierungslösung

Da die Präparate der Nasen noch sehr viel Knochen enthielten und dieser sich sehr schlecht scheiden ließ, war initial eine Dekalzifizierung notwendig. Um das Dekalzifizieren der Präparate zu erreichen, mussten diese in 10 % (*weight per volume*) (übersetzt als Gewicht pro Volumen, im Folgenden als (w/v) abgekürzt) EDTA-Lösung inkubiert werden. Diese Lösung wurde wie folgt angesetzt: Zunächst lösten sich 200 Gramm (im Folgenden als g abgekürzt) EDTA in 1.800 – 1.900 Milliliter (im Folgenden als mL abgekürzt) demineralisierten Wassers mithilfe eines Rührfischs. Es folgte die Zugabe von etwa 80 g Natriumhydroxid in Plätzchen mit einer Konzentration von größer gleich (im Folgenden als $\geq$ abgekürzt) 98 %. Im Anschluss erfolgte die Einstellung der Lösung mit 45 %-iger Natronlauge auf einen pH von 7,4. Um eine Verdünnung des EDTA auf 10 % zu erzielen, wurde die Lösung zum Schluss mit demineralisiertem Wasser auf 2.000 mL aufgefüllt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Verwendung der EDTA-Lösung ist unter 2.3.1 Dekalzifizierung beschrieben.

2.2.3 Saccharose-Lösung

Zum Schutz des Gewebes während der schnellen Gefrierung im Rahmen der Cryo-Fixierung wurden die Proben davor in 30 % (w/v) Saccharose-Lösung eingelegt. Für 250 mL Lösung mussten zu 75 g Saccharose 2,5 mL AntiAnti (Anti-bakteriell und Anti-mykotisch wirksam) unter möglichst sterilen Bedingungen

zugegeben werden. Anschließend erfolgte das möglichst sterile Auffüllen der Lösung auf 250 mL mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (im Englischen als *Phosphate buffered saline* bezeichnet, deshalb im Folgenden als PBS abgekürzt) und das Rühren für etwa 10 Minuten (im Folgenden als min abgekürzt) auf einer Magnetplatte mit einem Rührfisch. Die Lösung wurde dann gut verschlossen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und vor Gebrauch entsprechend in ein Gefäß abgefüllt, in welches die einzubettende Probe eingelegt werden konnte.

Die Verwendung der Saccharose-Lösung ist unter 2.3.2 Cryo-Fixierung beschrieben.

2.2.4 Magermilchpuffer-Blockierungslösung

Als Blockierungs- und Permeabilisierungslösung für die Immunhistochemie-Färbungen an Cryo-Schnitten wurde eine Magermilchpuffer-Blockierungslösung (im Folgenden als MMP-Lösung abgekürzt) verwendet und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert. Die Bestandteile dieser Lösung sind nachfolgend aufgelistet:

- 10 % *Normal donkey serum* (übersetzt mit normales Affen-Serum)
- 1,25 % *Bovine serum albumin* (übersetzt mit Rinderalbumin-Serum)
- 4 % Magermilchpulver
- 0,1 % Triton

2.2.5 Lösungen zur Autofluoreszenz-Reduktion

Im Folgenden sind die Lösungen aufgeführt, welche verwendet wurden, um die Autofluoreszenz des Nasengewebes zu reduzieren.

Die Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion, in denen die Lösungen getestet wurden, sind unter 2.3.6 Erster Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion und 2.3.7 Zweiter Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion dargestellt.

2.2.5.1 Wasserstoffperoxid-Lösung (angepasst nach: (Ehrenberg et al., 2020))

Es wurde eine Lösung aus 3 % Wasserstoffperoxid und 80 % Methanol angesetzt, mit einer Gesamtmenge von 500 mL. Hierfür erfolgte das Mischen von 400 mL Methanol, 50 mL von 30 %-igem Wasserstoffperoxid und 50 mL demineralisiertem Wasser.

Die Lösung konnte bei Raumtemperatur (im Folgenden als RT abgekürzt) gelagert werden.

2.2.5.2 Sudanschwarz-Lösung (angepasst nach: (Ehrenberg et al., 2020))

Eine Lösung aus 0,3 % (w/v) Sudanschwarz in 70 %-igem Ethanol wurde zubereitet, mit einer Gesamtmenge von 50 mL Lösung. Es erfolgte zunächst das Ansetzen von 1 Liter (im Folgenden als L abgekürzt) 70 %-iger Ethanol-Lösung, indem 700 mL Ethanol und 300 mL demineralisiertes Wasser miteinander vermischt wurden. Es folgte das Abwiegen von 0,15 g Sudanschwarz in ein mit Alufolie umwickeltes Laborglas und unter dem Abzug das Auffüllen mit der 70 %-igen Ethanol-Lösung auf 50 mL. Diese Lösung wurde dann lichtgeschützt unter dem Abzug für 2 bis 4 Stunden mit einem Rührfisch gemischt und im Anschluss über Nacht oder über ein Wochenende lichtgeschützt unter dem Abzug bei RT stehen gelassen.

Die Lagerung der Lösung erfolgte unter Lichtschutz in einem mit Alufolie umwickelten Laborglas im Abzug bei RT. Vor Gebrauch musste die Sudanschwarz-Lösung nochmals durch einen Papierfilter filtriert und dann zentrifugiert werden, bevor sie auf die Schnitte gegeben werden konnte. Bei Verwendung sollte die angesetzte Lösung maximal 4 Wochen alt sein.

2.2.6 Lösungen zur Antikörper-Entfernung

Die folgenden Lösungen wurden für die Antikörper-Entfernung getestet. Die Protokolle, in denen die Lösungen verwendet wurden, sind unter 2.3.9 Antikörper-Entfernung, dargestellt.

2.2.6.1 Citrat-Puffer-Lösung (angepasst nach: (Tóth and Mezey, 2007))

Es erfolgte zunächst die Berechnung, wie viel Citrationsäure für einen 10 millimolaren (im Folgenden als mM abgekürzt) Puffer angesetzt werden musste:

- Formel: $Masse = Molare\ Masse \times Konzentration \times Volumen$
 - $Molare\ Masse = 210,14\ Gramm\ pro\ Mol$
 - $Konzentration = 10\ mM = 0,01\ Mol\ pro\ L$
 - $Volumen = 100\ mL = 0,1\ L$
 - Daraus ergab sich: $Masse = 0,21014\ g$

Es wurden dementsprechend 0,21 g Citratsäure in 100 mL demineralisiertem Wasser gelöst, woran sich die Einstellung des pH auf 6,0 mit 45 %-iger Natronlauge und 37 %-iger Salzsäure anschloss.

Die Lösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.2.6.2 Glycin/SDS-Lösung mit pH 2,0 (angepasst nach: (Pirici et al., 2009))

Zuerst wurde eine 20 % (w/v) SDS-Lösung unter dem Abzug angesetzt, indem 20 g SDS mit demineralisiertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt wurden. Zur besseren Löslichkeit des SDS erfolgte die Erhitzung der Lösung in einem Wasserbad auf etwa 30 °C und das Mischen mit einem Rührfisch. Im Anschluss wurden 0,94 g Glycin abgewogen, in 25 mL der 20% (w/v) SDS-Lösung gelöst und anschließend auf 500 mL mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt. Zum Schluss musste der pH mit 37 %-iger Salzsäure und 45 %-iger Natronlauge auf 2,0 eingestellt werden.

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

2.2.6.3 BME/SDS-Lösung (angepasst nach: (Gendusa et al., 2014))

Für die BME/SDS-Lösung wurden zunächst mehrere Einzellösungen angesetzt. Die erforderliche Masse an Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (im Folgenden als Tris-HCl abgekürzt) für eine 0,5 molare Tris-HCl-Lösung wurde folgendermaßen berechnet:

- Formel: $Masse = molare\ Masse \times Konzentration \times Volumen$
 - $Molare\ Masse = 157,60\ Gramm\ pro\ Mol$
 - $Konzentration = 0,5\ Molar = 0,5\ Mol\ pro\ L$
 - $Volumen = 100\ mL = 0,1\ L$
 - Daraus ergab sich: $Masse = 7,88\ g$

Folglich wurden 7,88 g Tris-HCl mit demineralisiertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt und gelöst. Anschließend erfolgte die Einstellung der Lösung mit 45 %-iger Natronlauge und 37 %-iger Salzsäure auf einen pH von 6,8.

Es wurde eine 10 % (w/v) SDS-Lösung angesetzt, entweder durch Verdünnung von 50 mL einer 20 % (w/v) SDS-Lösung (Verweis 2.2.6.2 Glycin/SDS-Lösung mit pH 2,0) mit 50 mL demineralisiertem Wasser oder durch direktes Ansetzen einer 10 % (w/v) SDS-Lösung. Für das direkte Ansetzen mussten 10 g SDS mit

demineralisiertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt, im Wasserbad auf etwa 30 °C erwärmt und danach unter Rühren gelöst werden.

Es folgte das Ansetzen der gewünschten BME/SDS-Lösung, indem 20 mL der 10 % (w/v) SDS-Lösung und 12,5 mL der Tris-HCl-Lösung (pH 6,8) gemischt und mit demineralisiertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt wurden. Zum Schluss erfolgte unter dem Abzug die Zugabe von 0,8 mL 99 %-igem BME.

Die Lösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.2.7 Antikörper

Die Tabellen 4 und 5 listen alle verwendeten Antikörper auf sowie die jeweilige Spezies, in der die Antikörper gewonnen wurden, die Verdünnung, in welcher sie zur Anwendung kamen, und Angaben zum Hersteller und der Artikelnummer. Tabelle 4 stellt hierbei die Primärantikörper und Tabelle 5 die Sekundärantikörper, dar.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma, Hauptsitz	Artikelnummer
Anti-ACE2	Kaninchen	1:100	Abcam®, Cambridge, UK	ab15348
Anti-Agglutinin (UEA1)	Ziege	1:500	DyLight® 649 (Dyomics GmbH), Jena, DE	DL-1068
Anti-ANXA1	Kaninchen	1:100	Abcam®, Cambridge, UK	ab214486
Anti-ANXA2	Kaninchen	1:100	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA	HPA046964
Anti-ANXA5	Kaninchen	1:100	Abcam®, Cambridge, UK	ab108194
Anti-beta-Tubulin III (TUJ-1)	Maus	1:500 - 1:1000	Bio Legend, San Diego, USA	801202
Anti-beta-Tubulin III (TUJ-1)	Kaninchen	1:500	Bio Legend, San Diego, USA	802001
Anti-CD56 (NCAM)	Maus	1:100	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	MA5-11563

Anti-K14	Maus	1:100	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	MA5-11599
Anti-K15	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, USA	Sc-47697
Anti-K19	Maus	1:50	Santa Cruz Biotechnology®, Dallas USA	Sc-376126
Anti-K5	Kaninchen	1:100	Bio Legend, San Diego, USA	905501
Anti-Collagen IV	Ziege	1:50	Merck Millipore, Burlington, USA	AB769
Anti-DCX	Ziege	1:50	Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, USA	sc-8066
Anti-E-Cadherin	Ziege	1:100	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF648
Anti-GFAP	Huhn	1:100	Aves Labs Inc., Davis, USA	GFAP837980
Anti-Ki67 (D3B5)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	9129S
Anti-NeuroD1 (A-10)	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, USA	sc-46684
Anti-Neurogenin1 (NGN1)	Maus	1:100	Abnova GmbH, Taipei, Taiwan	H00004762-M06
Anti-OMP	Ziege	1:200	FUJIFILM Wako Chemicals GmbH, Neuss, DE	019-22291
Anti-SOX2 (D6D9)	Kaninchen	1:100	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	3579S

Tabelle 5: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma, Hauptsitz	Artikelnummer
Anti-Huhn-IgG (Alexa Fluor® 647)	Ziege	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A32933TR

Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A32790
Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 546)	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A10040
Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A31573
Anti-Maus-IgG (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A32766
Anti-Maus-IgG (Alexa Fluor® 546)	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A10036
Anti-Ziege-IgG (Alexa Fluor® 546)	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A11056
Anti-Ziege-IgG (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	A32849TR

2.2.8 Chemikalien

In Tabelle 6 findet sich eine Zusammenfassung aller verwendeten Chemikalien, mit ergänzenden Informationen zu der jeweiligen Firma und der Artikelnummer.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien

Material	Firma, Hauptsitz	Artikelnummer
2-Mercaptoethanol 99%, p.a.	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	4227.2
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke 500 mL	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, DE	B230672
Citronensäure-Monohydrat (Citric acid monohydrate)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	5949-29-1
D(+)-Sucrose for molecular biology A2211,1000	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE	57-50-1
DPX Neu, wasserfreies Eindeckmittel für die Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.00579.0500

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-CaCl₂, -MgCl₂), (D)PBS (1X)	Gibco® (Thermo Fisher Scientific™ Inc.), Waltham, USA	14190-094
EDTA BioChemica A1103,1000	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE	60-00-4
Eosin G-Lösung 1% wässrig	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	3137.2
Ethanol 99%, vergällt mit MEK + Bitrex + IPA	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE	ETO-10000-99-1
Glycin PUFFERAN® ≥99%, p.a.	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	3908.2
Hydrogenperoxide 30%	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, DE	8.22287.1000
Mayers Hämaunlösung für die Mikroskopie	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA	1.09249.2500
Methanol ≥ 99.8%, puriss. p.a., ACS Reagent, Reag. ISO, Reag Ph. Eur. 2,5 L	Honeywell, Riedel-de-Haën™, Seelze, DE	32213-2.5L
Mounting Medium, Moviol	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	0713.2
Natriumhydroxid ≥ 98%, p.a., ISO, in Plätzchen	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	6771.1
Natronlauge 45%, reinst	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	0993.1
Salzsäure 37%, reinst	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	9277.1
SDS für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE	151-21-3
Sudanschwarz B (Sudan black B)	E. Merck AG, Darmstadt, DE	26150
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura® Finetek, Umkirch, DE	12351753
Tris - Hydrochlorid für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE	1185-53-1
Wasser demin., nicht keimfrei	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	3175.1
Xylenes Xylol	Honeywell, Riedel-de-Haën™, Seelze, DE	534056-4L

2.2.9 Laborverbrauchsmaterialien

In Tabelle 7 sind alle verwendeten Laborverbrauchsmaterialien dargestellt, mit Angaben zur herstellenden Firma und der jeweiligen Artikelnummer.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Laborverbrauchsmaterialien
 (Millimeter als mm abgekürzt, Mikroliter als μL abgekürzt)

Material	Firma, Hauptsitz	Artikelnummer
Deckgläser 24 x 50 mm, Stärke 1	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE	01-2450/1
Deckgläser 24 x 40 mm, Stärke 1	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA	MEZ102440
epT.I.P.S.® Standard Pipettenspitzen 1000 μL	Eppendorf SE, Hamburg, DE	0030000978
Kim-Wipe Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark® Professional, Surrey, UK	05511 7552
neolab-Deckgläser, Ø 20 mm	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, DE	1-6288
Objektträger geputzt / gebrauchsfertig 26 x 76 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE	03-0004
PAP Pen (hydrophober Stift)	Abcam®, Cambridge, UK	ab2601
PARAFILM®	Bemis Company Inc., Neenah, USA	P7793-1EA
Reagiergefäß 0,5 mL (Micro tube 0.5 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	72.699
Reagiergefäß 1,5 mL (Micro tube 1.5 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	72.690.001
Rotilabo®-Aluminiumfolie, Stärke 16 μm	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	1770.1
Safeguard Pipettenspitzen 10 μL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE	81-1010
Safeguard Pipettenspitzen 100 μL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE	81-1012
Safeguard Pipettenspitzen 200 μL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE	81-1030
Sarstedt serological Pipettenspitzen 10 mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	86.1254.001
SuperFrost® Plus Microscope Slides Objektträger 25 x 75 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE	03-0060
Tissue-Tek® Cryomold® Intermediate Einfrierförmchen	Sakura® Finetek, Umkirch, DE	94-4566
Zentrifugenröhrchen 50 mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	62.547.004

2.2.10 Labormehrwegmaterialien

Die Tabelle 8 zeigt eine Übersicht aller verwendeten Labormehrwegmaterialien, je mit Angabe des entsprechenden Herstellers.

Tabelle 8: Liste aller verwendeten Labormehrwegmaterialien

Material	Firma, Hauptsitz
Glas Färbeküvette nach Hellendahl	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Laborglasflasche 100 mL	Duran®, Wertheim, DE
Laborglasflasche 2000 mL	Duran®, Wertheim, DE
Laborglasflasche 250 mL	Duran®, Wertheim, DE
Laborglasflasche 500 mL	Duran®, Wertheim, DE
Messzylinder 100 mL (100:1)	Duran®, Wertheim, DE
Messzylinder 500 mL (500:10)	Duran®, Wertheim, DE
Plastik Färbetrog nach Hellendahl, PMP	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, DE

2.2.11 Laborgeräte

Die Tabelle 9 zeigt einen Überblick über alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Laborgeräte, mit Angaben zu der jeweiligen Herstellerfirma und der Artikelnummer.

Tabelle 9: Liste aller verwendeten Laborgeräte

Gerätename	Firma, Hauptsitz
Abzug nach DIN EN 14 175	Wesemann® International GmbH, Wangen im Allgäu, DE
Axio Imager.M2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Jena, DE
Axiostar Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, DE
Eppendorf Research plus Pipette 0,1 – 2,5 µL	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Eppendorf Research plus Pipette 0,5 – 5 mL	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Eppendorf Research plus Pipette 10 – 100 µL	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Eppendorf Research plus Pipette 100 – 1000 µL	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Eppendorf Research plus Pipette 20 – 200 µL	Eppendorf SE, Hamburg, DE
EW Präzisionswaage ZERO TARE	KERN® & Sohn GmbH, Balingen, DE
Forma 900 Series Model 5905 Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA

GS 1323 Gefrierschrank Typ 400751	Liebherr, Bulle, CH
Heraeus™ Fresco™ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA
HERATHERM Incubator IGS180 Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA
IKAMAG® Typ RCT Magnetprüher	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br., DE
inoLab® Plus pH7110 pH-Meter	WTW, Weilheim, DE
KTe 1840 Kùhlschrank – Tischmodell Elektronik Typ 111734	Liebherr, Bulle, CH
MICROM HM 560 Cryostat	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, USA
Mikrowellen Herd MW 13145 W	Amina International GmbH, Ascheberg, DE
neoVortex® Schüttler D-6012	neoLab®, Heidelberg, DE
pipetus®-akku Pipette 1 – 10 mL	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
VS 7316.1 WEISS Vollraumkùhlschrank	C. Bomann® GmbH, Kempen, DE
Wasserbad Typ 1052	GFL® Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, DE

2.2.12 Programme

In Tabelle 10 sind alle verwendeten Programme angegeben, mit Informationen zur jeweiligen Firma und dem Verwendungszweck für die Arbeit.

Tabelle 10: Liste aller verwendeten Programme

Programm Name	Firma, Hauptsitz	Verwendung
Affinity Photo 2	Serif (Europe) Ltd, Nottingham, UK	Abbildungen
AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE	Mikroskopie
BioRender 2022	bioRender, Toronto, CA	Abbildungen
Excel Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Schreiben
PowerPoint Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Abbildungen
Word Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Schreiben
ZEN 3.6 (blue edition)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE	Mikroskopie

2.3 Methoden

2.3.1 Dekalzifizierung

Die 10 % (w/v) EDTA-Lösung und die Gläser, in welchen die Präparate inkubiert waren, wurden wöchentlich ausgetauscht. Im Zuge dieses EDTA-Wechsels wurde immer der jeweilige Dekalzifizierungsgrad der Präparate subjektiv beurteilt.

2.3.2 Cryo-Fixierung

Es wurden Teile der Präparate durch Schneiden mittels Skalpellklinge entnommen oder das gesamte Präparat verwendet. Anschließend mussten die Proben im Kühlschrank in 30 % (w/v) Saccharose-Lösung inkubiert werden, bis die Proben in der Lösung abgesunken waren. Dies dauerte ungefähr einen bis drei Tage. Danach wurde ein, der Probengröße angepasstes, Einfrierförmchen ausgesucht, wofür entweder vorgefertigte Cryomold® aus Plastik verwendet oder mit Alufolie selbst Förmchen geformt wurden. Es folgte die Entfernung überschüssiger Saccharose-Lösung von den Proben mittels Präzisionswischtüchern und das Einlegen in das Einfrierförmchen mit vorgegossenem O.C.T.TM Compound. Daran schloss sich die Ausrichtung der Proben entsprechend der späteren Schnittrichtung an. Die Proben wurden dann mit O.C.T.TM Compound vollständig übergossen. Zur endgültigen Fixierung mussten die Proben auf einer mit Alkohol überzogenen Metall-Kühlplatte einer Kühlbox aus dem Gefrierschrank bei -80 °C schockgefroren werden.

Die fixierten, eingefrorenen Gewebelöcke wurden in einem Becher bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Cryo-Schnitte

Für die Cryo-Schnitte wurden die zuvor fixierten, schockgefrorenen Gewebeproben aus den Einfrierförmchen gelöst und unter Zuhilfenahme von O.C.T.TM Compound auf einer Metallscheibe befestigt, welche dann in die Halterung des Cryostat eingespannt werden konnte. Die Temperatur des Cryostat war auf -21 °C eingestellt und der Gewebelöck entsprechend zur Schnittrichtung des Messers ausgerichtet. Es folgten Annäherungen an den Gewebelöck mit 30 Mikrometern (im Folgenden als μm abgekürzt) oder 14 μm

Schnitten, sodass anschließend 14 µm Schnitte der Probe angefertigt werden konnten. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und in einem ersten Mikroskopieren auf ihre Schnittqualität beurteilt.

Die Schnitte auf den Objektträgern mussten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend in einem Histologie Kasten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (im Folgenden als HE abgekürzt) war der erste Schritt die Dehydrierung der Schnitte für 5 bis 10 min in PBS. In dieser Zeit konnten entweder die Färbelösungen frisch angesetzt werden, oder es wurden bereits angesetzte Lösungen verwendet.

Die Hämalaun-Lösung musste in einer 1:2 Verdünnung mit demineralisiertem Wasser angesetzt werden. Das Eosin war als Eosin-G-Lösung 1 % bereits gebrauchsfertig. Beide Lösungen wurden vor der Anwendung nochmal durch einen Papierfilter gefiltert.

Zuerst erfolgte ein Waschen der Schnitte für 30 Sekunden (im Folgenden als s abgekürzt) in demineralisiertem Wasser, dann eine Inkubation für 30 s in der Hämalaun-Lösung und im Anschluss das Bläuen für 30 s in Leitungswasser. Nun folgte ein weiteres Waschen für etwa 1 min in einer Küvette mit Leitungswasser, mit an einer Ecke einlaufendem Wasser. Die Färbestärke, welche bei einem ersten Mikroskopieren beurteilt wurde, entschied darüber, ob eine weitere Färberunde mit Hämalaun-Lösung notwendig war.

Danach wurden die Schnitte für die Eosin-Färbung zuerst kurz in demineralisiertem Wasser gewaschen, für 15 s in Eosin inkubiert und nochmals kurz in demineralisiertem Wasser gewaschen. Es schloss sich erneut ein Mikroskopieren zur Beurteilung der Färbestärke an, woraufhin ggf. eine weitere Färberunde mit Eosin erfolgte.

Darauffolgend wurden die Schnitte für je 30 s in einer aufsteigenden Alkoholreihe, mit einmal 70 %, einmal 95 % und einmal 100 % Ethanol, gewaschen. Zur Fixierung folgte die Inkubation der Schnitte für mindestens 30 s in Xylol, in welchem sie bis zum Eindecken mit Dibutylphthalat Polystyrol Xylol (im Folgenden als DPX abgekürzt) verweilen. Nach der Entnahme aus dem Xylol

und dem Abtropfen der Schnitte wurde etwas DPX auf ein Deckglas passender Größe gegeben, welches langsam auf die Schnitte auf dem Objektträger abgesenkt wurde. Die fertig gedeckelten Schnitte mussten für mindestens 10 min unter dem Abzug verbleiben, damit das restliche Xylol verdampfen konnte.

Im Anschluss wurden die Schnitte für 24 Stunden bei RT getrocknet und danach im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.3.5 Klassische Immunhistochemie-Färbung

Das folgende Protokoll wurde im Rahmen des Promotionsprojektes durchgeführt und in Teilen publiziert (Klingenstein et al., 2026).

Zur Rehydrierung wurden die angefertigten Schnitte für 5 min in PBS inkubiert. Im Anschluss erfolgte zur Antigenbehandlung die Dehydrierung in einer Alkoholreihe, wobei die Schnitte für je 30 s erst aufsteigend in 70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol und dann wieder absteigend in 95 % Ethanol, 70 % Ethanol inkubiert wurden. Es folgte ein Waschen der Schnitte in PBS für 5 min gefolgt von einer Umrandung der Schnitte mit einem hydrophoben Stift. Während der Inkubation der Schnitte für etwa 30 bis 60 min mit MMP-Lösung in einer feuchten Kammer bei RT, erfolgte das Ansetzen der Primärantikörper. Hierbei wurden immer alle Primärantikörper einer Färbung in ihrem jeweiligen Verhältnis in einer gemeinsamen MMP-Lösung verdünnt. Nach Abschluss der Inkubation mit MMP-Lösung folgte das Auftragen der angesetzten Primärantikörper-Lösung, welche über Nacht für etwa 18 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert wurde (Abbildung 7).

Jeweils am darauffolgenden Tag war das Waschen der Schnitte für etwa 15 min in PBS der erste Schritt. Die Sekundärantikörper wurden währenddessen bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin erfolgte in einer gemeinsamen Lösung die Verdünnung der Sekundärantikörper sowie der Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (im Folgenden als DAPI abgekürzt) in PBS, alle je im Verhältnis 1:1000. Diese angesetzte Lösung mit den Sekundärantikörpern und DAPI konnte anschließend auf die Schnitte pipettiert und für 45 bis 60 min bei RT inkubiert werden. Danach folgte das Waschen der Objektträger für etwa 5 min in PBS im

Dunklen sowie für etwa 10 s durch aufpipettiertes Ampuwa® Wasser (Abbildung 7).

Zum Schluss wurden die Schnitte mit Moviol eingedeckelt und nochmals für 1 Stunde bei RT getrocknet, bevor sie mikroskopiert und danach dunkel bei 4 °C gelagert wurden (Abbildung 7).

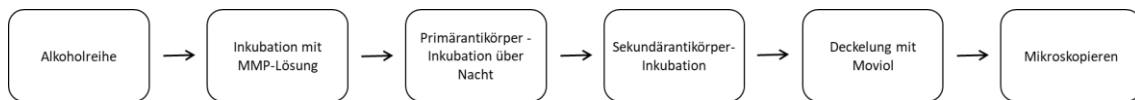


Abbildung 7: Schema zum zeitlichen Ablauf der klassischen Immunhistochemie-Färbung
 Dargestellt sind die groben Schritte, welche für das Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung durchlaufen wurden. Das Schema wird im weiteren Verlauf zur Verdeutlichung der Abweichungen der Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion wieder aufgegriffen.

2.3.6 Erster Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion

Die untenstehenden beschriebenen Protokolle zum ersten Ansatz der Autofluoreszenz-Reduktion wurden alle im Rahmen des Promotionsprojektes durchgeführt und in Teilen bereits in Klingenstein et al. (2026) veröffentlicht.

Die unterschiedlichen Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion enthielten je verschiedene Abwandlungen oder Ergänzungen des klassischen Immunhistochemie-Färbungsprotokolls (Verweis unter 2.3.5). Ausgeführt sind deshalb hier nur die entsprechenden Abweichungen vom klassischen Protokoll. Zur Verdeutlichung dient das Schema in Abbildung 8, welches die einzelnen Stellen in Rot hervorhebt, an denen die Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion in das klassische Protokoll eingreifen.

Für die erweiterten Protokolle (Multiplexing (Sudanswarz) + Wasserstoffperoxid und Sherry Lab (Sudanswarz) + Wasserstoffperoxid) wurden die unten aufgeführten Ergänzungen zur klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) miteinander kombiniert und das klassische Protokoll an den jeweiligen Stellen abgewandelt.

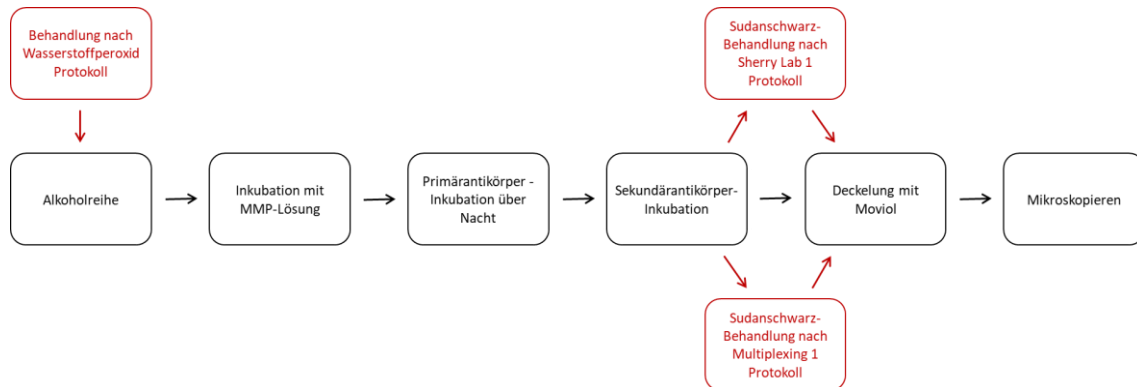


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Abweichungen der Autofluoreszenz-Protokolle des ersten Ansatzes von der klassischen Immunhistochemie-Färbung

Dargestellt ist das Schema zum Ablauf der klassischen Immunhistochemie-Färbung aus Abbildung 7, ergänzt in Rot durch die Stellen, an welchen die Protokolle aus dem ersten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion abweichen.

2.3.6.1 Sudanschwartz-Protokoll 1.1: Multiplexing 1 (Sudanschwartz) (angepasst nach: (Ricciuti et al., 2014, Romijn et al., 1999, Sun et al., 2011, Ehrenberg et al., 2020))

Bis zum Schritt der Inkubation der Sekundärantikörper für 45 bis 60 min bei RT wurde bei diesem Protokoll nach der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) verfahren.

Im Anschluss erfolgte das Waschen der Schnitte für 5 min im Dunklen in PBS. Nachdem die Schnitte aus dem PBS herausgenommen wurden, folgte ein kurzes Eintauchen in 70 % Ethanol und die Behandlung mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwartz-Lösung (Verweis 2.2.5.2). Die Sudanschwartz-Lösung wurde aufpipettiert und im Dunklen unter dem Abzug für 35 min inkubiert. Es schlossen sich mehrere Waschschrte an: Zweimal für jeweils 10 s in 70 % Ethanol und anschließend für 5 min im Dunkeln in PBS.

Danach erfolgte die Deckelung der Schnitte wieder nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung. (Verweis 2.3.5)

2.3.6.2 Sudanschwartz-Protokoll 2.1: Sherry Lab 1 (Sudanschwartz) (angepasst nach: (Sun et al., 2011, Romijn et al., 1999, Ricciuti et al., 2014))

Bis zum Schritt der Inkubation der Sekundärantikörper für 45 bis 60 min bei RT wurde bei diesem Protokoll nach der klassischen Immunhistochemie-Färbung

(Verweis 2.3.5) verfahren. Es folgte das Waschen der Schnitte für 5 min im Dunklen in PBS und die Behandlung mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwarz-Lösung (Verweis 2.2.5.2). Nach dem Aufpipettieren der Sudanschwarz-Lösung dauerte die Inkubation 10 min im Dunklen unter dem Abzug. Dann wurden die Schnitte für jeweils 2 min viermal in PBS im Dunklen gewaschen.

Anschließend erfolgte die Deckelung der Schnitte wieder nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5).

2.3.6.3 Wasserstoffperoxid (angepasst nach: (Ehrenberg et al., 2020))

Die Schnitte wurden zu Beginn für 5 min in PBS gewaschen. Danach schloss sich unter dem Abzug die Inkubation in einer 3 % Wasserstoffperoxid und 80 % Methanol Lösung (Verweis 2.2.5.1) für 30 min an. Es folgte das Waschen der Schnitte für 5 min in PBS.

Ab diesem Schritt wurde mit der Behandlung in einer auf- und absteigenden Alkoholreihe wieder wie nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) verfahren.

2.3.7 Zweiter Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion

Die im Folgenden beschriebenen Protokolle zum zweiten Ansatz der Autofluoreszenz-Reduktion wurden im Rahmen des Promotionsprojektes durchgeführt und ebenfalls in Teilen bereits publiziert (Klingenstein et al., 2026). Die Protokolle des zweiten Ansatzes zur Autofluoreszenz-Reduktion orientierten sich ebenfalls an dem klassischen Immunhistochemie-Färbungsprotokoll (Verweis 2.3.5), weshalb erneut nur die entsprechenden Abweichungen vom klassischen Protokoll ausgeführt sind.

Das Schema in Abbildung 9 hebt in Rot hervor, an welchen Stellen die Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion des zweiten Ansatzes in das klassische Protokoll eingreifen.

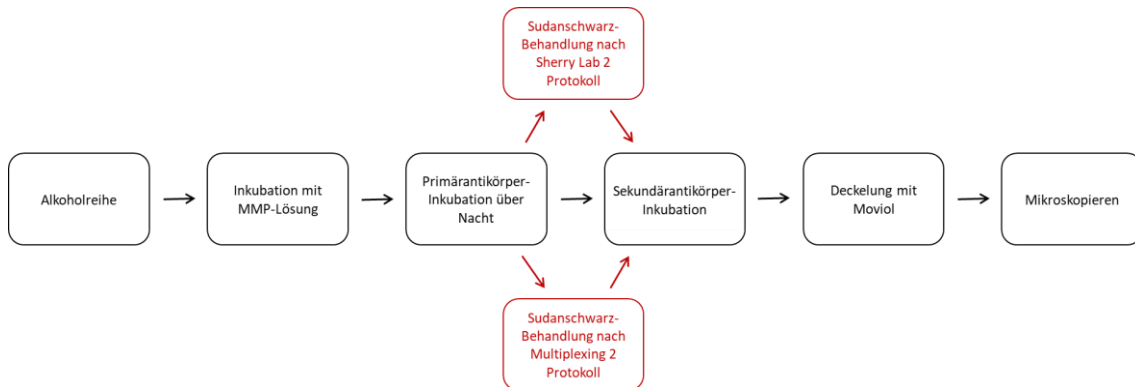


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Abweichungen der Autofluoreszenz-Protokolle des zweiten Ansatzes von der klassischen Immunhistochemie-Färbung

Darstellung des Schemas zum Ablauf der klassischen Immunhistochemie-Färbung aus Abbildung 7, wobei die Stellen, an welchen die Protokolle aus dem zweiten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion abweichen, in Rot gekennzeichnet sind.

Bis zum Schritt der Inkubation der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C wurde bei diesen Protokollen nach der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) verfahren.

Am darauffolgenden Färbetag erfolgte zunächst das Waschen der Schnitte für 15 min in PBS, an welche sich je die Sudanschwartz-Behandlungen anschlossen, welche im Folgenden beschrieben werden.

2.3.7.1 Sudanschwartz-Protokoll 1.2: Multiplexing 2 (Sudanschwartz) (angepasst nach: (Ricciuti et al., 2014, Romijn et al., 1999, Sun et al., 2011, Ehrenberg et al., 2020))

Die Schnitte wurden aus dem PBS herausgenommen, kurz in 70 % Ethanol eingetaucht und mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwartz-Lösung (Verweis 2.2.5.2) behandelt. Diese Sudanschwartz-Behandlung erfolgte in einem kleinen Schälchen, in welchem die Schnitte in die Lösung eingelegt wurden, sodass sie komplett bedeckt waren. Die Inkubationszeit betrug 35 min im Dunklen unter dem Abzug. Es schlossen sich mehrere Waschschrte an: Zweimal für jeweils 10 s in 70 % Ethanol und für 5 min im Dunkeln in PBS. Danach folgte die Inkubation der Sekundärantikörper für 45 bis 60 min im Dunklen bei RT und die Deckelung der Schnitte.

Ab diesem Schritt wurde wieder nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) verfahren.

2.3.7.2 Sudanschwarz-Protokoll 2.2: Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) (angepasst nach: (Sun et al., 2011, Romijn et al., 1999, Ricciuti et al., 2014))

Nachdem die Schnitte aus dem PBS herausgenommen waren, erfolgte die Behandlung mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwarz-Lösung (Verweis 2.2.5.2), indem die Schnitte in einem kleinen Schälchen in die Sudanschwarz-Lösung eingelegt wurden, sodass sie komplett bedeckt waren. Dann wurde das Sudanschwarz im Dunklen unter dem Abzug für 10 min inkubiert. Es schloss sich das viermalige Waschen der Schnitte für jeweils 2 min in PBS im Dunklen, an. Danach erfolgte die Inkubation der Sekundärantikörper für 45 bis 60 min im Dunklen bei RT und die Deckelung der Schnitte.

Ab hier wurde wieder nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) verfahren.

2.3.8 Optimierter Ansatz – Autofluoreszenz-Reduktion

2.3.8.1 Optimiertes Sudanschwarz-Protokoll 2.4: Sherry Lab 4 (Sudanschwarz)

Bis zum Schritt der Inkubation der Primärantikörper über Nacht bei 4°C wurde bei diesem Protokoll wieder nach der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) verfahren. Am darauffolgenden Färbetag erfolgte zunächst das Waschen der Schnitte für 15 min in PBS, gefolgt von der Sudanschwarz-Behandlung, welche im Folgenden beschrieben wird.

Die Inkubation der Schnitte erfolgte mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwarz-Lösung (Verweis 2.2.5.2), welche vor dem Gebrauch durch einen Papierfilter gefiltert und anschließend zentrifugiert wurde. Es folgte ein vorsichtiges Trockentupfen der Grenzen des hydrophoben Stifts mit einem Präzisionswischtuch, bevor die gleiche Lösungsmenge an Sudanschwarz aufgebracht wurde, die jeweils für die Antikörper-Lösungen verwendet worden war, sodass die Schnitte komplett bedeckt waren. Die Inkubationszeit unter dem Abzug betrug 3 bis 5 min, wobei während der Inkubation ggf. tropfenweise maximal zweimal Sudanschwarz-Lösung nachpipettiert werden konnte, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Es schlossen sich mehrere Schritte zum Waschen der Schnitte an: Kurzes Schwenken in 70 % Ethanol und viermal Waschen für jeweils 2 min in PBS im Dunklen. Vor dem Aufbringen der Sekundärantikörper-Lösung wurden

grobe Überreste des Sudanschwarz vorsichtig mit einem Präzisionswischtuch entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Sekundärantikörper für 45 bis 60 min im Dunklen bei RT und die Deckelung der Schnitte.

Ab hier wurde wieder nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) verfahren.

2.3.9 Antikörper-Entfernung

Die nachfolgenden Versuche zur Antikörper-Entfernung wurden im Rahmen des Promotionsprojektes durchgeführt und in Teilen bereits in Klingenstein et al. (2026) publiziert.

Im Rahmen der Protokolle zur Antikörper-Entfernung wurde das Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5) unterschiedlich abgewandelt.

Das Schema in Abbildung 10 stellt die Abweichungen und Ergänzungen des Sherry Lab 3 Protokolls zur Autofluoreszenz-Reduktion und der Protokolle zur Antikörper-Entfernung vom Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung vereinfacht graphisch dar.

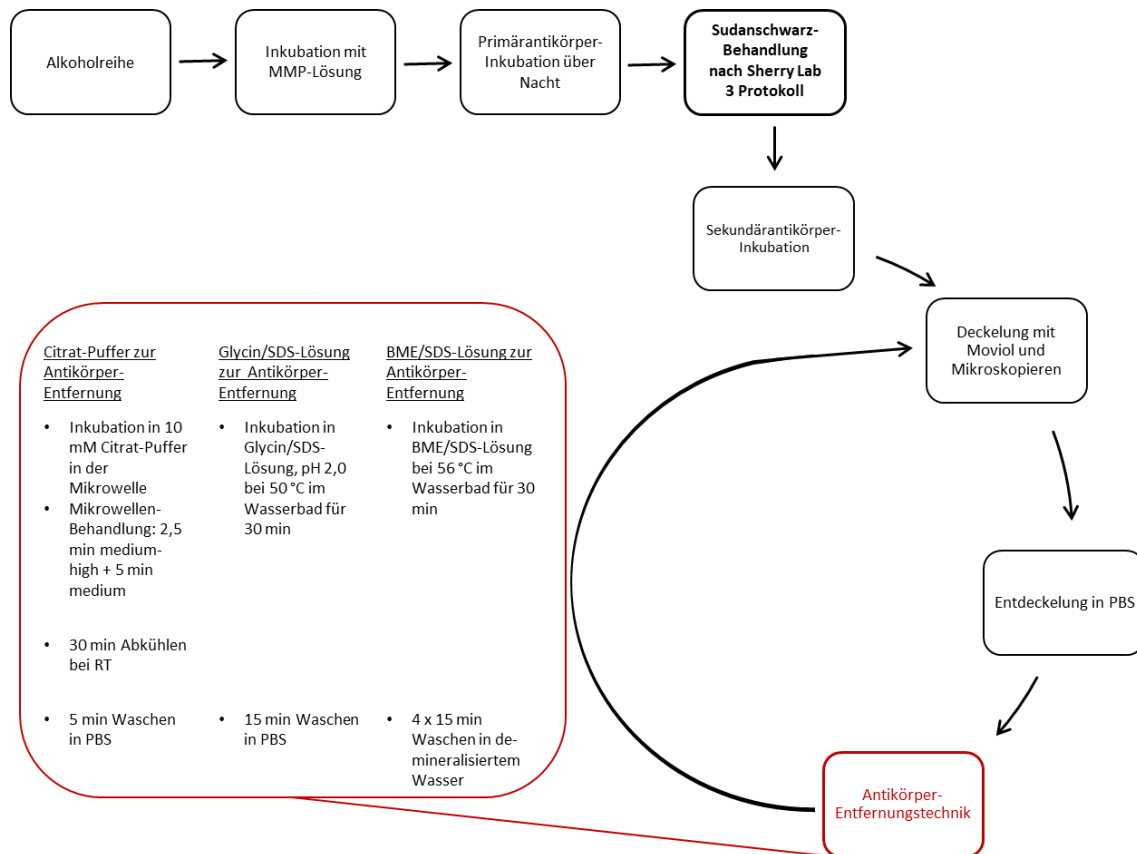


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ansätze zur Antikörper-Entfernung

Dargestellt ist eine erweiterte und abgewandelte Form des Schemas zum Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung aus Abbildung 7. Die Grafik ist durch die Sudanschwarz-Behandlung nach dem Sherry Lab 3 Protokoll ergänzt, was dick in Schwarz hervorgehoben ist. Außerdem finden sich nach der Deckelung mit Moviol und dem Mikroskopieren die neuen ergänzenden Schritte, welche für die Protokolle zur Antikörper-Entfernung erforderlich waren. Der Schritt der Antikörper-Entfernung ist in Rot hervorgehoben. Die Besonderheiten der einzelnen getesteten Protokolle sind in Stichworten im roten Kasten aufgeführt.

2.3.9.1 Sudanschwarz-Protokoll 2.3: Sherry Lab 3 (Sudanschwarz)

Bis zur Inkubation der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C erfolgten alle Schritte nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5). Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zuerst für 15 min in PBS gewaschen, woraufhin sich die Behandlung mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwarz-Lösung (Verweis 2.2.5.2) anschloss. Es folgte das Aufbringen der zuvor durch einen Papierfilter gefilterten Sudanschwarz-Lösung, sodass die Schnitte komplett bedeckt waren. Die Inkubation des Sudanschwarz erfolgte für 10 min im Dunklen unter dem Abzug, woran sich ein kurzes Eintauchen in 70 % Ethanol und viermal Waschen für jeweils 2 min in PBS anschlossen. Danach wurden die

Sekundärantikörper für 45 bis 60 min im Dunklen bei RT inkubiert und die Schnitte gedeckelt.

Ab diesem Schritt entsprachen die Abläufe der Protokolle wieder dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung (Verweis 2.3.5), welches fertiggestellt und im Anschluss durch die folgenden Schritte ergänzt wurde.

Nachdem die Schnitte mikroskopiert worden waren, folgte die Entdeckung durch Inkubation in PBS im Wärmeschrank bei 37 °C für 1 bis 1,5 Stunden. Sobald sich beim Herausziehen der Objektträger die Deckgläser von ersteren lösten, waren die Schnitte fertig entdeckt. Nun folgten die verschiedenen Antikörper-Entfernungstechniken, welche im Folgenden dargestellt sind.

2.3.9.2 Citrat-Puffer zur Antikörper-Entfernung (angepasst nach: (Tóth and Mezey, 2007))

Die Schnitte wurden aus dem Wärmeschrank genommen und in eine Plastik-Küvette mit einem 10 mM Citrat-Puffer (Verweis 2.2.6.1) gestellt. Nun folgte die Behandlung der Schnitte in dem Citrat-Puffer in einer Mikrowelle für etwa 2,5 min bis zum Kochen der Lösung bei der Einstellung *medium-high* und danach für weitere 5 min bei der Einstellung *medium*. Anschließend wurden die Schnitte bei RT für 30 min in dem Citrat-Puffer abgekühlt. Dann erfolgte ein Waschschrift in PBS für 5 min.

2.3.9.3 Glycin/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung (angepasst nach: (Pirici et al., 2009))

Es wurde eine Glasküvette, gefüllt mit einer Glycin/SDS-Lösung mit pH 2,0 (Verweis 2.2.6.2), in einem Wasserbad auf 50 °C vorgeheizt. Nach der Entdeckung erfolgte die Inkubation der Schnitte in der vorgeheizten Glycin/SDS-Lösung für 30 min bei etwa konstanter Temperatur von 50 °C im Wasserbad. Im Anschluss folgte ein Waschen der Schnitte für 15 min in PBS.

2.3.9.4 BME/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung (angepasst nach: (Gendusa et al., 2014))

Es wurde eine Glasküvette mit einer BME/SDS-Lösung (Verweis 2.2.6.3) in einem Wasserbad auf 56 °C vorgeheizt. Danach folgte die Inkubation der

entdeckelten Schnitte in der vorgeheizten BME/SDS-Lösung für 30 min bei etwa konstanter Temperatur von 56 °C im Wasserbad. Anschließend erfolgte ein Waschen in demineralisiertem Wasser für viermal 15 min.

Nach der Anwendung der Antikörper-Entfernungsmethoden entsprechend den Protokollen unter 2.3.9.2, 2.3.9.3 und 2.3.9.4 wurden bei allen Protokollen die Schnitte erneut mit Moviol eingedeckelt und vor dem erneuten Mikroskopieren für etwa 1 Stunde bei RT getrocknet.

2.3.10 Zusammengeführte Multiplexing Protokolle

Die im Folgenden beschriebenen Multiplexing Protokolle wurden alle im Rahmen des Promotionsprojektes durchgeführt und in Teilen veröffentlicht (Klingenstein et al., 2026).

In den Multiplexing Ansätzen wurden mehrere Färbungen hintereinander durchgeführt, wofür das Sudanschwarz zur Autofluoreszenz-Reduktion und die BME/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung gewählt wurden.

Zunächst erfolgte die Rehydrierung der Schnitte für 5 min in PBS. Zur Antigenbehandlung wurden die Schnitte dann jeweils für 30 s erst aufsteigend in 70 %, 95 %, 100 % Ethanol und wieder absteigend in 95 %, 70 % Ethanol dehydriert. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Schnitte für 5 min in PBS sowie die Umrandung mit einem hydrophoben Stift. Während die Schnitte für etwa 30 bis 60 min mit MMP-Lösung in einer feuchten Kammer bei RT inkubierten, wurden alle Primärantikörper einer Färbung mit ihrer jeweiligen Verdünnung in einer gemeinsamen MMP-Lösung angesetzt. Nach der Inkubation der MMP-Lösung konnte die angesetzte Primärantikörper-Lösung auf die Schnitte aufgetragen und diese über Nacht für etwa 18 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert werden.

Im Folgenden sind die weiteren Schritte, welche für die einzelnen Multiplexing Ansätze zur Durchführung kamen, aufgeführt.

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 11 der grobe Ablauf der Multiplexing Protokolle dargestellt, wobei sich ergänzende Stichworte zu den Abwandlungen und Unterschieden der jeweiligen Protokolle finden.

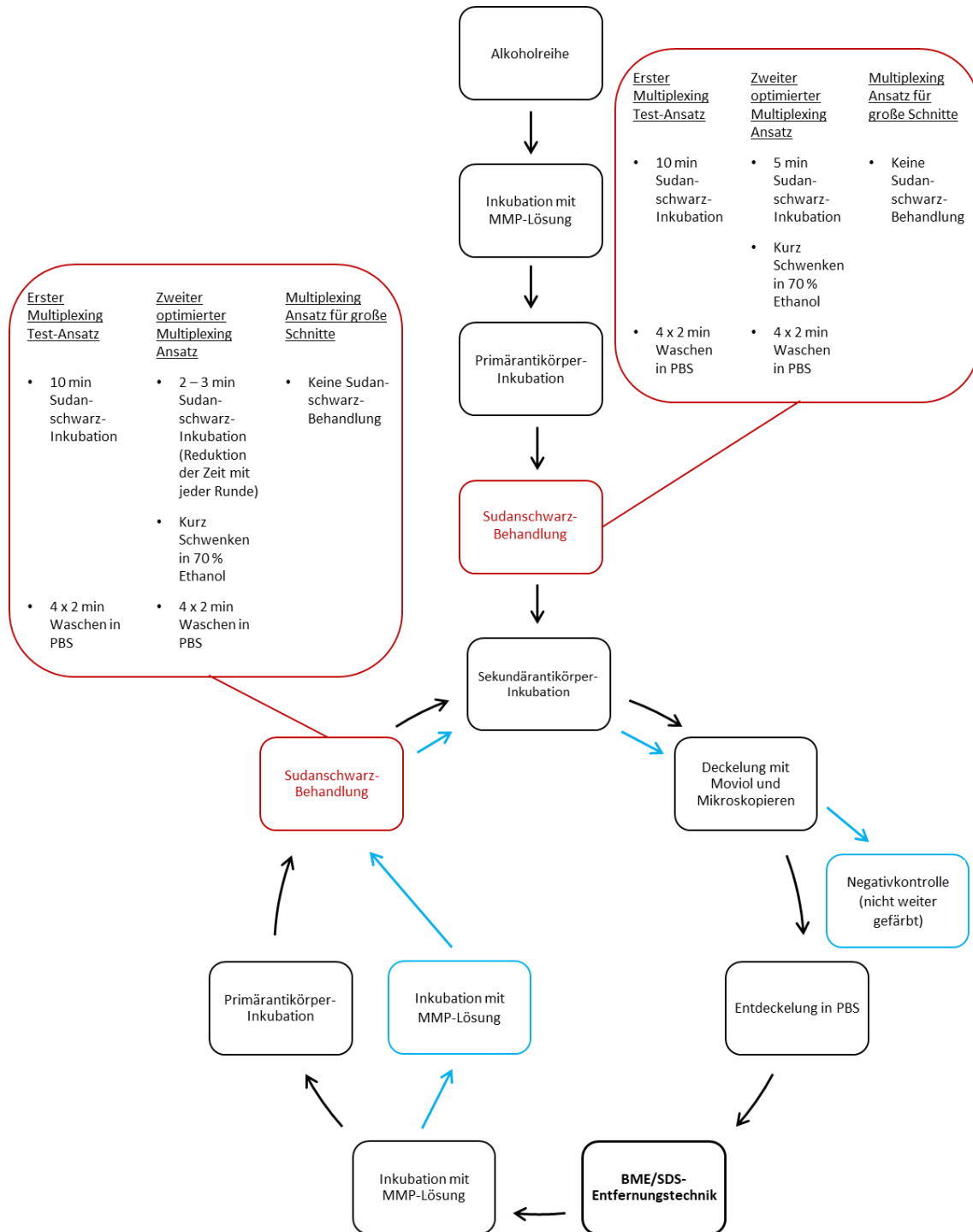


Abbildung 11: Graphische Darstellung der verschiedenen Protokolle der Multiplexing Ansätze

Gezeigt ist die erweiterte Fusion des Schemas aus Abbildung 7 (zum Protokoll zur klassischen Immunhistochemie-Färbung) und des Schemas aus Abbildung 6 (zur vereinfachten Darstellung des Prinzips des Multiplexing). Dick in Schwarz hervorgehoben ist die Antikörper-Entfernungstechnik mit einer BMS/SDS-Lösung. Die Schritte der Sudanschwarz-Behandlung sind in Rot hervorgehoben. Hier lassen sich die Unterschiede der verschiedenen Multiplexing

Protokolle finden, welche in den roten Kästen jeweils stichwortartig zusammengefasst sind. Die gesonderten Schritte der mitlaufenden Negativkontrolle sind in Hellblau gekennzeichnet.

2.3.10.1 Erster Multiplexing Test-Ansatz

Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst das Waschen der Schnitte für 15 min in PBS, woran sich die Behandlung mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwarz-Lösung (Verweis 2.2.5.2) anschloss. Die Schnitte wurden durch die aufpipettierte Sudanschwarz-Lösung, welche zuvor gefiltert und zentrifugiert worden war, komplett bedeckt und für 10 min im Dunklen unter dem Abzug inkubiert. Es folgte das viermalige Waschen der Schnitte für jeweils 2 min in PBS, während die Sekundärantikörper bei 4 °C zentrifugiert und anschließend zusammen mit der DAPI-Kernfärbung, je im Verhältnis 1:1000, in PBS verdünnt wurden. Diese gemeinsam angesetzte Lösung mit den Sekundärantikörpern und DAPI konnte nun auf die Schnitte pipettiert werden und musste dort für 45 bis 60 min bei RT inkubieren. Danach erfolgten mehrere Waschschrte: Zunächst für etwa 5 min in PBS im Dunklen und danach für etwa 10 s mit Ampuwa® Wasser. Nun folgte das Eindeckeln der Objektträger mit Moviol, wonach sie für 30 bis 60 min bei RT trockneten, bevor sie mikroskopiert wurden.

Nach dem Mikroskopieren der Schnitte schloss sich die Entdeckung an, wofür die Objektträger ungefähr 30 bis 60 min in PBS im Wärmeschrank bei 37 °C behandelt wurden. Sobald sich beim Herausziehen der Objektträger die Deckgläser von ersteren lösten, waren die Schnitte fertig entdeckt. Die BME/SDS-Lösung (Verweis 2.2.6.3) wurde in einem Wasserbad auf 56 °C vorgeheizt. In dieser Lösung erfolgte dann die Antikörper-Entfernung der entdeckelten Schnitte für 30 min bei etwa konstanter Temperatur von 56 °C im Wasserbad. Anschließend folgte das Waschen für viermal 15 min in demineralisiertem Wasser.

Nun konnte eine erneute Färbung angeschlossen werden, indem die Schnitte nochmals für etwa 5 min in PBS gewaschen, ggf. erneut mit dem hydrophoben Stift umrandet und wieder für 30 bis 60 min mit MMP-Lösung inkubiert wurden. Es wurde ein neuer Zyklus begonnen, wieder entsprechend dem obenstehenden Protokoll.

2.3.10.2 *Zweiter optimierter Multiplexing Ansatz*

Am darauffolgenden Tag erfolgte das Waschen der Schnitte für 15 min in PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit einer 0,3 % (w/v) Sudanschwarz-Lösung (Verweis 2.2.5.2) behandelt, welche zuvor gefiltert und zentrifugiert worden war. Die Menge der aufgetragenen Sudanschwarz-Lösung entsprach dabei jeweils der Lösungsmenge, welche für die Antikörper-Lösungen auf die Schnitte angewendet wurden, sodass sie komplett bedeckt waren. Vor dem Aufbringen der Sudanschwarz-Lösung erfolgte das vorsichtige Trocknen der Grenzen des hydrophoben Stifts mit einem Präzisionswischtuch. Es folgte die Inkubation der Schnitte mit der Sudanschwarz-Lösung für 3 bis 5 min, wobei die Inkubationszeit mit jeder weiteren Färberunde immer etwas mehr reduziert wurde. In der ersten Runde betrug sie dementsprechend 5 min und 2 bis 3 min in allen darauffolgenden Runden. Um ein Austrocknen der Schnitte während der Inkubation zu verhindern, konnte ggf. tropfenweise Sudanschwarz-Lösung nachpipettiert werden, allerdings maximal zweimal. Dann wurden die Schnitte kurz in 70 % Ethanol geschwenkt und im Anschluss im Dunklen, für jeweils 2 min, viermal in PBS gewaschen. Währenddessen erfolgte die Zentrifugation der Sekundärantikörper bei 4 °C. Daran schloss sich die Verdünnung der Sekundärantikörper zusammen mit der DAPI-Kernfärbung in PBS je im Verhältnis 1:1000 an. Grobe Überreste des Sudanschwarz wurden vorsichtig mit einem Präzisionswischtuch von den Schnitten entfernt und die gemeinsame Lösung mit Sekundärantikörpern und DAPI aufgebracht, welche für 45 bis 60 min bei RT inkubiert werden musste. Der Inkubation schloss sich das Waschen der Schnitte für etwa 5 min in PBS im Dunklen und darauffolgend für etwa 30 s mit Ampuwa® Wasser an. Nun wurden die Objektträger mit Moviol gedeckelt, für 30 bis 60 min bei RT getrocknet und im Anschluss mikroskopiert.

Dem Mikroskopieren folgte die Entdeckung der Schnitte für ungefähr 30 bis 60 min in PBS im Wärmeschrank bei 37 °C, bis sich beim Herausziehen der Objektträger die Deckgläser von ersteren lösten. Die Antikörper-Entfernung mit einer BME/SDS-Lösung (Verweis 2.2.6.3) wurde angeschlossen: Nach dem Vorheizen der BME/SDS-Lösung auf 56 °C im Wasserbad wurden die entdeckelten Schnitte bei etwa konstanter Temperatur von 56 °C im Wasserbad

für 30 min behandelt, gefolgt von viermaligem Waschen für je 15 min in demineralisiertem Wasser. Die verwendete BME/SDS-Lösung wurde nach jeder Anwendung direkt verworfen.

Nun konnte eine erneute Färbung angeschlossen werden, indem die Schnitte nochmals für etwa 5 min in PBS gewaschen, ggf. erneut mit dem hydrophoben Stift umrandet und wieder für 30 bis 60 min mit MMP-Lösung inkubiert wurden. Es begann ein neuer Zyklus, wieder entsprechend dem obenstehenden Protokoll.

2.3.10.3 Multiplexing Ansatz für große Schnitte

Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst das Waschen der Schnitte für 15 min in PBS. Die Sekundärantikörper wurden währenddessen bei 4 °C zentrifugiert und anschließend zusammen mit der DAPI-Kernfärbung in PBS verdünnt, je im Verhältnis 1:1000. Es folgte das Aufbringen dieser gemeinsam angesetzten Lösung mit Sekundärantikörpern und DAPI auf die Schnitte und deren Inkubation für 45 bis 60 min bei RT. Danach schloss sich das Waschen der Schnitte für etwa 5 min in PBS im Dunklen sowie das Waschen für etwa 30 s mit Ampuwa® Wasser an. Nun wurden die Objektträger mit Moviol gedeckelt, für 30 bis 60 min bei RT getrocknet und anschließend mikroskopiert.

Dem Mikroskopieren folgte die Entdeckung der Schnitte für ungefähr 30 bis 60 min in PBS im Wärmeschrank bei 37 °C, bis sich beim Herausziehen der Objektträger die Deckgläser von ersteren lösten. Es erfolgte die Behandlung mit der BME/SDS-Lösung (Verweis 2.2.6.3), indem die entdeckelten Schnitte in der auf 56 °C vorgeheizten Lösung bei etwa konstanter Wärme im Wasserbad für 30 min inkubiert wurden. Anschließend erfolgte ein Waschen für viermal 15 min in demineralisiertem Wasser. Die verwendete BME/SDS-Lösung wurde nach jeder Anwendung direkt verworfen.

Nun konnte eine erneute Färbung angeschlossen werden: Die Schnitte wurden für etwa 5 min in PBS gewaschen, ggf. erneut mit dem hydrophoben Stift umrandet und wieder für 30 bis 60 min mit MMP-Lösung inkubiert, wonach ein neuer Zyklus begann, wieder entsprechend dem obenstehenden Protokoll.

Zu beachten gilt, dass es in jeder Runde neben der Färbung auch einen Schnitt als Negativkontrolle gab, welcher nur mit Sekundärantikörpern und nicht mit Primärantikörpern inkubiert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Anfertigung von Schnitten und Etablierung von Markern am RE

3.1.1 Anfertigung von Cryo-Schnitten

Für die ersten Test-Ansätze wurden zunächst Cryo-Schnitte von kleinen Gewebeproben der Präparate angefertigt. Die Proben, welche erwartungsgemäß zunächst nur RE enthielten, waren alle je etwa 0,3 – 1,0 Zentimeter (im Folgenden als cm abgekürzt) lang, breit und hoch und wurden vom dorsalen mittleren Septum nasi entnommen.

Zur Darstellung von anderen nasalen Strukturen, wie dem Bulbus olfactorius, dem OE und den Conchae nasales, wurden größere Proben (zwischen 2,0 – 2,5 cm breit und 3,0 – 4,0 cm hoch) eingebettet und geschnitten. Das Präparat H82 wurde hierfür dreigeteilt und wies im kranialen Anteil auch Anschnitte der Lamina cribrosa und des Bulbus olfactorius auf. Mit diesen Schnitten wurden Versuche zur Autofluoreszenz-Reduktion am Bulbus olfactorius, als beispielhaftes neuronales Gewebe, durchgeführt. Das Präparat H84 wurde hingegen als Ganzes eingebettet und geschnitten. Dessen Nasenlängsschnitte wurden zur Darstellung der morphologischen Veränderungen der nasalen Strukturen im Verlauf von frontal nach dorsal verwendet. Die zusammengeführten Multiplexing Ansätze am OE wurden an Nasenlängsschnitten von H80 durchgeführt, welche etwa 2,1 cm breit und 3,3 cm hoch waren. Diese Schnitte enthielten je das Septum nasi und eine Concha nasalis superior und media.

3.1.2 Morphologische Darstellung der nasalen Strukturen im Verlauf

Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden bereits in Klingenstein et al. (2026) publiziert.

Die Nasenpräparate wurden vor dem Einbetten fotografiert und vermessen (Abbildung 12). Das Präparat H84 hatte von frontal nach dorsal eine ungefähre Tiefe von 3,5 cm sowie eine Breite von rechts nach links von etwa 2,5 cm (Abbildung 12). Damit war während des Schneidens ein Nachvollziehen der Position der Anschnitte möglich. Hierdurch sollten das Erkennen und die Zuordnung der nasalen Strukturen im Schnittverlauf erleichtert werden.

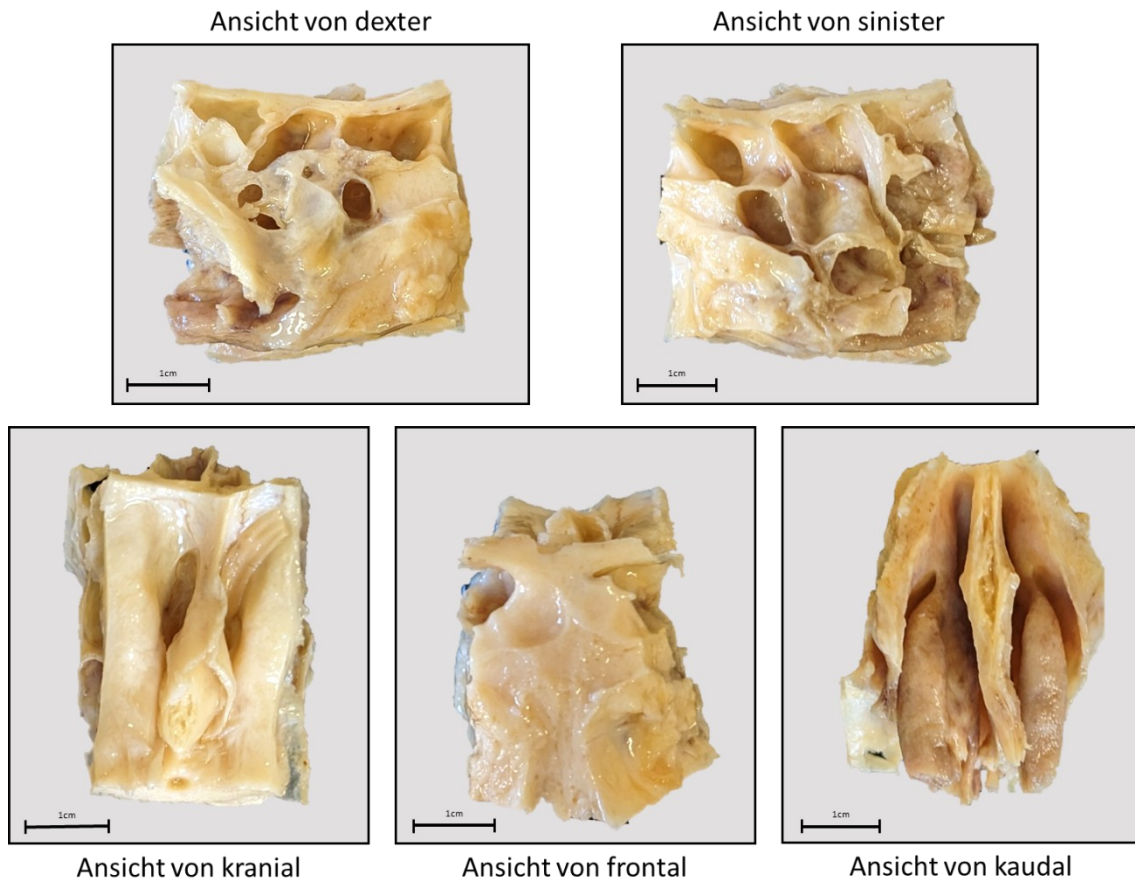


Abbildung 12: Darstellung von Nasenpräparat H84 aus verschiedenen Ansichten
 Dargestellt ist das Nasenpräparat H84, vor der Fixierung in einem Cryo-Block. Es wurden Aufnahmen aus verschiedenen Richtungen angefertigt. Die entsprechende Richtung der Aufsicht ist am jeweiligen Bild angegeben und beschreibt die Seite, welche betrachtet wird.
 Maßstabsbalken 1 cm

Von frontal ausgehend wurde das Nasenpräparat H84 in 2.150 je 14 μm dicken Schnitten bis auf etwa 3 cm Tiefe geschnitten. Mit den angefertigten Objektträgern dieses Präparats erfolgte anschließend die genaue Darstellung und Beschreibung der nasalen Strukturen im Verlauf von frontal nach dorsal. Hierfür wurden alle 50 bis 150 Schnitte, was einer Schnitttiefe von 0,07 cm bis 0,21 cm entsprach, HE-Färbungen angefertigt und in ihrem Verlauf charakterisiert (Abbildung 13). Als Grundlage zur Orientierung dienten dabei die Aufnahmen der Nase vor dem Einbetten (Abbildung 12).

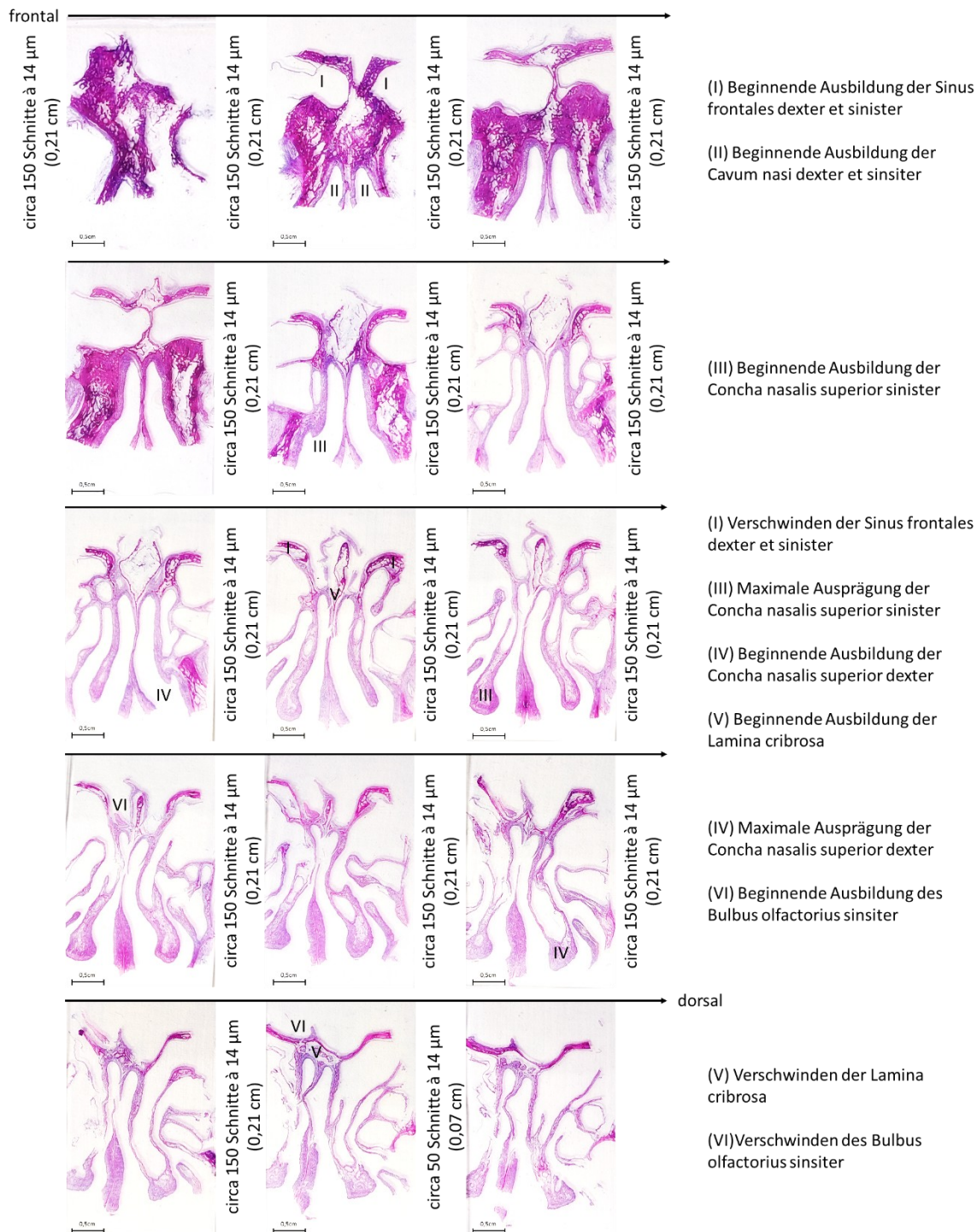


Abbildung 13: Morphologische Entwicklung der nasalen Strukturen im Verlauf von frontal nach dorsal anhand von HE-Färbungen des Nasenpräparats H84

Dargestellt sind HE-Färbungen der Nase H84, in Abständen von je ungefähr 50 bis 150 Schnitten mit einer jeweiligen Schnittstärke von 14 µm. Der entsprechende Abstand zwischen den einzelnen Schnitten ist jeweils zwischen den Bildern angegeben. Die Schnitte sind chronologisch geordnet und folgen dem Schnittverlauf von frontal nach dorsal, was mit darüberliegenden Pfeilen veranschaulicht ist. In der rechten Spalte neben den HE-Färbungen finden sich Beschreibungen der morphologischen Entwicklungen der nasalen Strukturen, welche in den Aufnahmen mit römischen Zahlen beziffert sind. Die Ausführungen sind immer auf die jeweilige Zeile bezogen. Maßstabsbalken 0,5 cm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

Ab einer, von frontal aus, betrachteten Tiefe von etwa 300 Schnitten (0,42 cm) waren sowohl die Sinus frontales dexter et sinister als auch eine beginnende Ausbildung der Cavum nasi dexter et sinister erkennbar. Die Übersicht zeigt auch, dass ab einem ungefähren Abstand von 750 Schnitten (1,05 cm) von frontal in der Cavum nasi sinister ein erster Ansatz der Concha nasalis superior zu erkennen war. Diese weitete sich innerhalb der folgenden 150 Schnitte (0,21 cm) bereits deutlich aus und zeigte ihre maximale Ausprägung ungefähr ab 1.350 Schnitten (1,89 cm). In der Cavum nasi dexter zeigte sich der erste Ansatz der Concha nasalis superior hingegen erst nach etwa 1.050 Schnitten (1,47 cm), welche sich dann aber in den folgenden 150 Schnitten (0,21 cm) bereits stärker ausbildete. Die maximale Ausprägung der Concha nasalis superior dexter war bei einer Schnitttiefe von ungefähr 1.800 (2,52 cm) zu finden. Bis zu einer Tiefe von 1.050 Schnitten (1,47 cm) Richtung dorsal ließen sich außerdem die Sinus frontales in beiden Nasenhälften noch erkennen. Ab dem ungefähr 1.200 Schnitt (1,68 cm) von frontal Richtung dorsal wurde zudem die Trennschicht zwischen den Cavum nasi und der Cavum cranii in beiden Hälften immer dünner. Nach etwa 1.500 Schnitten (2,1 cm) konnte sich in der linken Vertiefung der Cavum cranii über der Lamina cribrosa ein Anschnitt des Bulbus olfactorius sinister finden lassen. Dieser vergrößerte sich für etwa 450 Schnitte noch weiter, bis er ab dem ungefähr 2.100 Schnitt (2,94 cm) in den Anschnitten wieder verschwunden war, ebenso wie die Lamina cribrosa.

3.1.3 Testung von Antikörper-Markern am RE

Die dargelegten Ergebnisse des folgenden Kapitels wurden in Teilen bereits veröffentlicht (Klingenstein et al., 2026).

Um die Versuche zur Autofluoreszenz-Reduktion und zur Antikörper-Entfernung testen zu können, mussten zunächst einige Antikörper bestimmt werden, die anschließend in diesen Untersuchungen als positive Marker-Proteine dienen konnten. Zwei dieser Antikörper, welche nach ihrer Expression am RE untersucht wurden, waren K19 und E-Cadherin. Beide zeigten in Färbungen ein positives Signal an den Zellmembranen der Epithelzellen (Abbildung 14, Abbildung 15).

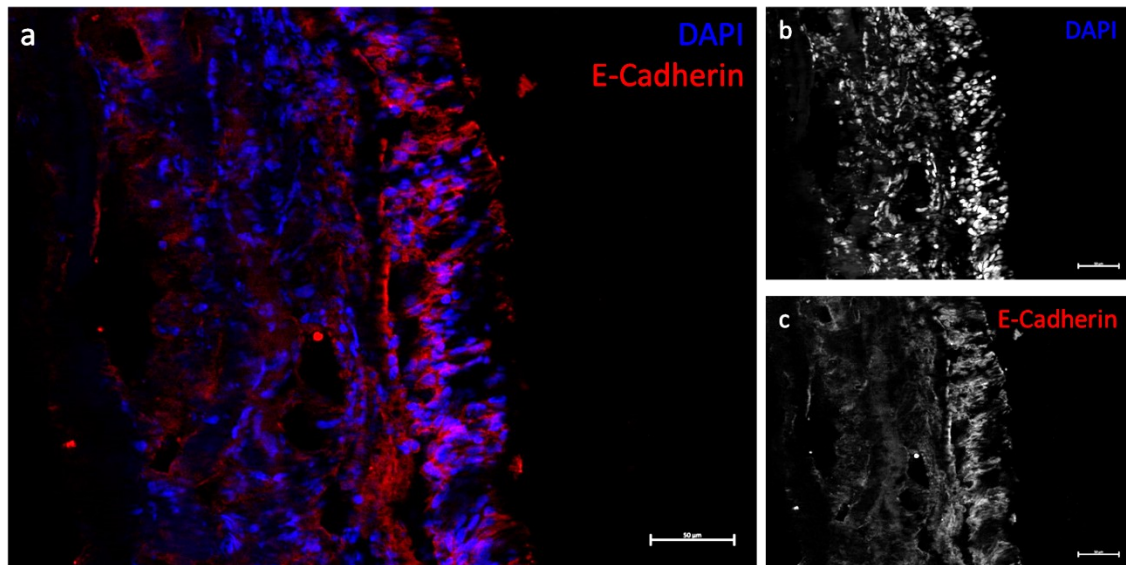


Abbildung 14: Färbung von E-Cadherin am RE

Färbung an einem Schnitt von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist E-Cadherin in Rot und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. E-Cadherin zeigt eine deutliche Expression an den Zellmembranen der Epithelzellen, sowohl basolateral als auch apikal am RE. Die Färbung wurde nach dem Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll durchgeführt.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

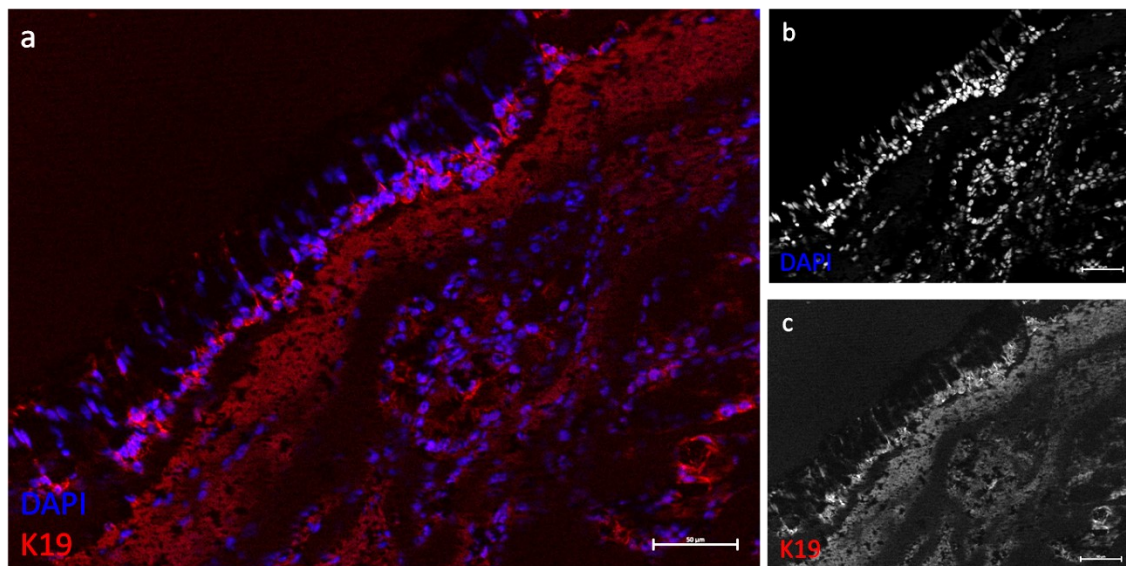


Abbildung 15: Färbung von K19 am RE

Färbung an einem Schnitt von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist K19 in Rot und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. Die Expression von K19 zeigt sich an den Zellmembranen der Epithelzellen, besonders an den basalen. Die Färbung wurde nach dem Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll durchgeführt.

Maßstabsbalken 50 µm

Hierbei zeigte sich bei E-Cadherin eine Lokalisation am basolateralen Zellpol sowie teilweise am apikalen Zellpol der Epithelzellen des RE (Abbildung 14).

Bei K19 erwies sich die Expression hingegen nur am basolateralen Zellpol der Epithelzellen, am stärksten aber an den Basalzellen, als positiv (Abbildung 15).

In weiteren Färbungen zeigte sich außerdem ACE2 am RE positiv. Wie in Abbildung 16 veranschaulicht, wies ACE2 hierbei eine Expression an den Epithelzellen, vor allem am basolateralen und apikalen Pol der Zellen, auf. Dieses Expressionsmuster hatte Ähnlichkeiten mit dem von E-Cadherin am RE. Allerdings zeigte ACE2 zusätzlich ein Vorkommen an den Basalzellen des RE.

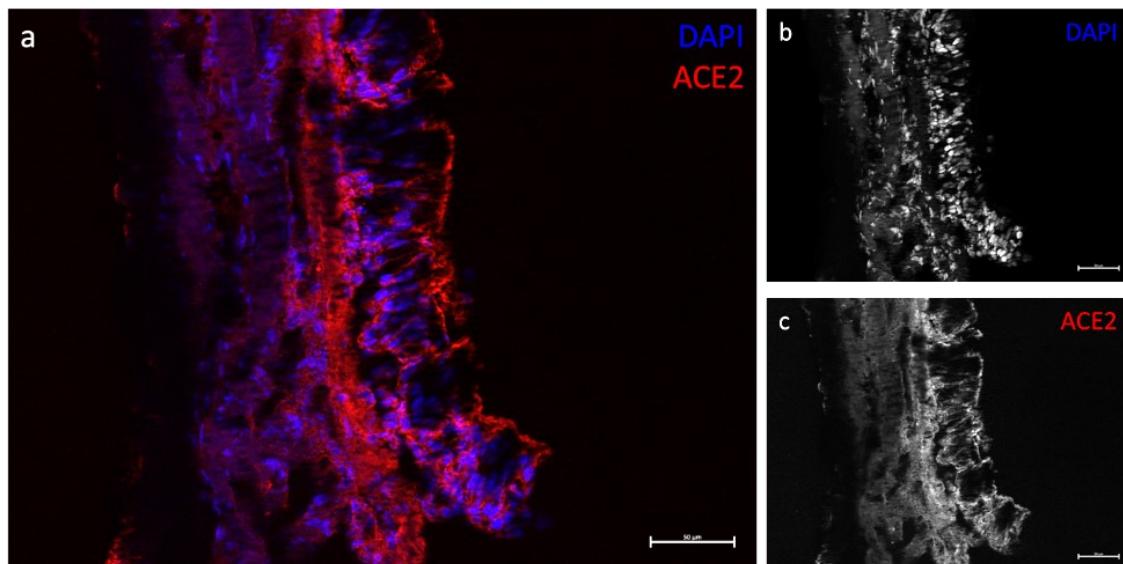


Abbildung 16: Färbung von ACE2 am RE

Färbung an einem Schnitt von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist ACE2 in Rot und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. Das Signal von ACE2 ist besonders an den basolateralen und apikalen Polen der Epithelzellen sowie an den Basalzellen des RE ausgeprägt. Die Färbung wurde nach dem Sherry Lab 2 (Sudanschwartz) Protokoll durchgeführt.

Maßstabsbalken 50 µm

Im RE konnte außerdem ANXA1 im apikalen Anteil der Flimmerepithelzellen dargestellt werden (Abbildung 17). In der Färbung zeigte sich durch den ANXA 1 Antikörper ein klares durchgehendes Signal am apikalen Pol der Flimmerepithelzellen, im Bereich der Kinozilien.

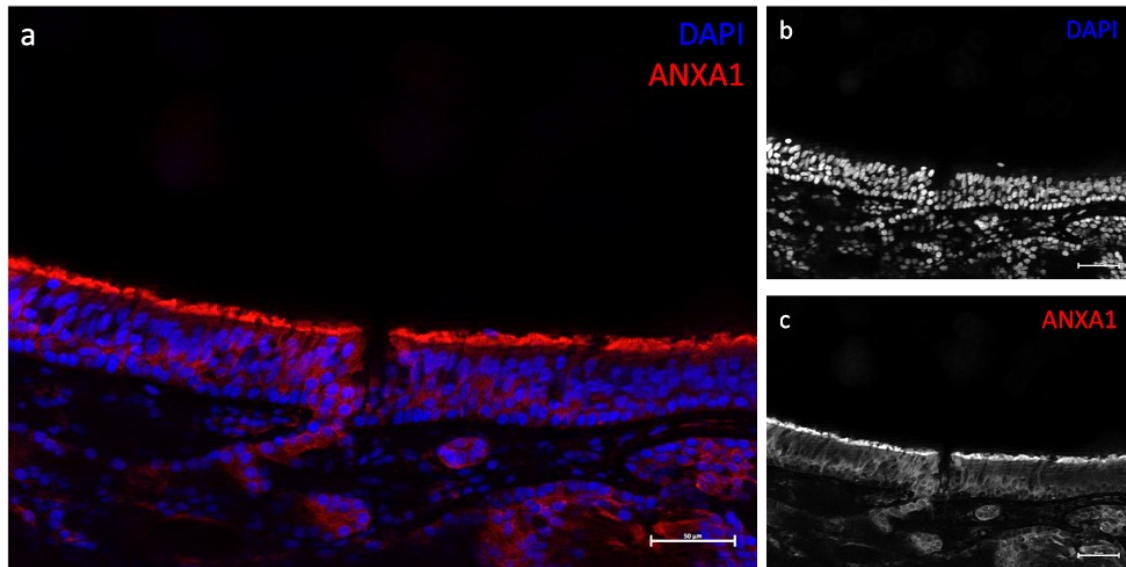


Abbildung 17: Färbung von ANXA1 am RE

Färbung an einem Schnitt von Präparat H82 mit RE. Dargestellt ist ANXA1 in Rot und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. ANXA1 hat ein starkes Signal im Bereich der Kinozilien, apikal an den Flimmerepithelzellen des RE. Die Färbung wurde nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung durchgeführt.

Maßstabsbalken 50 µm

Am RE konnte zudem mit K5 ein eindeutig positives Signal nachgewiesen werden, welches sich als selektiv an den Basalzellen beschreiben lässt (Abbildung 18). Die Expression von K5 beschränkte sich dabei nicht nur auf die Basalzellen des RE sondern konnte auch an Basalzellen von Drüsen in der Lamina propria nachgewiesen werden (Abbildung 18).

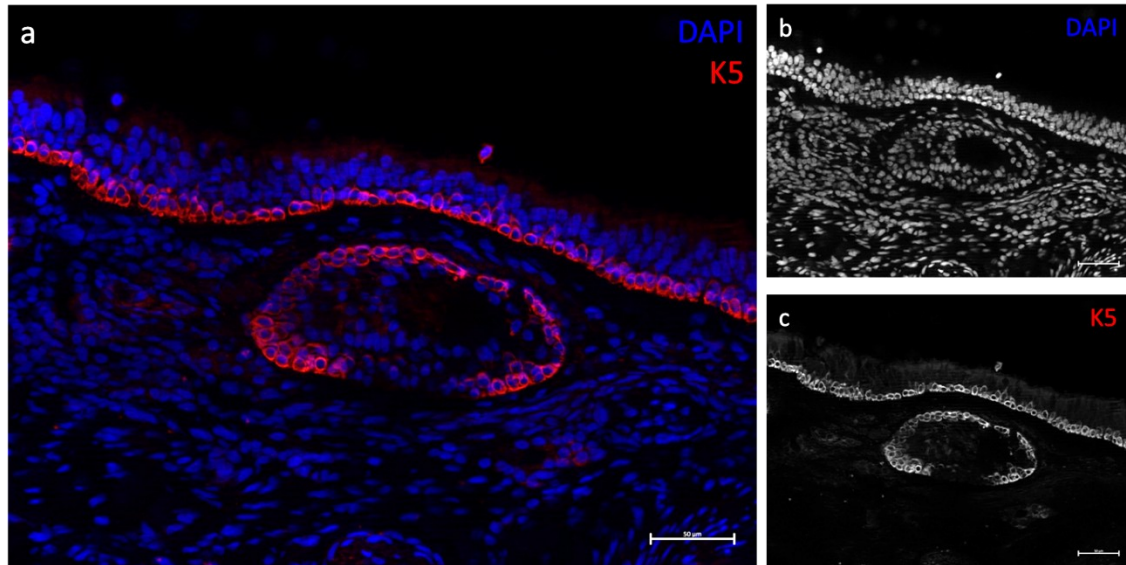


Abbildung 18: Färbung von K5 am RE

Färbung an einem Schnitt von Präparat H82 mit RE. Dargestellt ist K5 in Rot und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. K5 ist an den Basalzellen des RE und an denen von subepithelialen Drüsen lokalisiert. Die Färbung wurde nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung durchgeführt.

Maßstabsbalken 50 µm

Die oben aufgeführten Marker, welche ein eindeutiges positives Signal am RE gezeigt hatten, wurden nachfolgend in den Vorversuchen für den Aufbau des am Ende stehenden Multiplexing Ansatzes als Test-Färbungen verwendet. Hierbei kam insbesondere K5 häufig zur Anwendung, da dieser Antikörper ein sehr klares positives Signal an den Basalzellen lieferte.

3.1.4 Zusammenfassung – Cryo-Schnitte und etablierte Marker am RE

- In der ersten Stufe des Projekts wurden die Nasenpräparate genauer untersucht und für die weiteren Stufen vorbereitet. Es wurden Proben verschiedener Größe genommen, eingebettet und geschnitten. An diesen Proben ließen sich unterschiedliche Epithelien und Gewebetypen identifizieren, wie das RE, der Bulbus olfactorius und das OE.
- Mit komplett eingebetteten Präparaten und sich daraus ergebenden Nasenlängsschnitten konnten die morphologischen Veränderungen und Entwicklungen der nasalen Strukturen untersucht und gezeigt werden.
- An kleineren Probestücken mit RE konnten verschiedene Marker getestet und beschrieben werden: E-Cadherin war an den Zellgrenzen der

Epithelzellen exprimiert, ACE2 zeigte sich am basolateralen und am apikalen Pol der Epithelzellen sowie an den Basalzellen, K19 zeigte eine Expression am basolateralen Zellpol der Epithelzellen, ANXA1 zeigte sich in den apikalen Zilien des Epithels und K5 an den Basalzellen.

- ➔ Für die Test-Ansätze zur Reduktion der Autofluoreszenz sollten zunächst die kleineren Gewebestücke mit RE verwendet werden. Im Anschluss war die Testung der Autofluoreszenz-Reduktion auch an Schnitten mit Bulbus olfactorius geplant.
- ➔ Für Färbungen sollten die, bereits auf ihre Expression untersuchten, Marker aus der ersten Stufe zur Anwendung kommen. Insbesondere K5 war dafür geeignet, da es sich besonders deutlich am RE zeigte.

3.2 Reduktion der Autofluoreszenz

3.2.1 Erster Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden in Teilen bereits publiziert (Klingenstein et al., 2026).

Im ersten Ansatz zur Reduktion der Autofluoreszenz wurde eine Versuchsreihe mit mehreren Protokollen eingeleitet (Tabelle 11) und die Ergebnisse dieser Protokolle miteinander verglichen.

Neben den Versuchen zur Autofluoreszenz an den Schnitten erfolgte die zusätzliche Anfertigung einer Negativkontrolle, welche ohne Antikörper-Inkubationen nur mit Moviol eingedeckelt wurde. Diese sollte zur vergleichenden Veranschaulichung der reinen Autofluoreszenz des Gewebes dienen.

Tabelle 11: Protokolle zum ersten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion

Protokollname	– Verweis im Methodenteil
Klassische Immunhistochemie-Färbung	– Verweis 2.3.5
Multiplexing 1 (Sudanschwarz)	– Verweis 2.3.6.1
Sherry Lab 1 (Sudanschwarz)	– Verweis 2.3.6.2
Wasserstoffperoxid	– Verweis 2.3.6.3
Multiplexing 1 (Sudanschwarz) + Wasserstoffperoxid	– Verweis 2.3.6.1 + 2.3.6.3
Sherry Lab 1 (Sudanschwarz) + Wasserstoffperoxid	– Verweis 2.3.6.2 + 2.3.6.3

Zur Färbung in dem ersten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion wurde K5 verwendet, da mit diesem Antikörper in vorangegangenen Färbungen bereits eine klare Darstellung an den Basalzellen des RE gezeigt werden konnte. Des Weiteren wurde für jedes Protokoll der gleiche Sekundärantikörper mit einem Fluorophor im Wellenbereich 546 nm verwendet. Für alle Schnitte wurden dabei jeweils gemeinsame Antikörper-Lösungen der Primär- und Sekundärantikörper angesetzt.

Neben dem Grad an Reduktion der Autofluoreszenz erfolgte die Beurteilung der Ergebnisse anhand des Erhalts der Gewebeintegrität. Für die Autofluoreszenz-Reduktion wurden Bilder mit einheitlichen Belichtungszeiten aufgenommen, um die Intensität des Farbsignals objektiv bewerten zu können.

Die Protokolle Multiplexing 1 (Sudanschwarz) und Sherry Lab 1 (Sudanschwarz) zeigten beide eine Reduktion der Autofluoreszenz. Allerdings stellte sich ebenso die gesuchte Färbung, in Form der Signale von K5 und DAPI, deutlich schwächer dar als bei der klassischen Immunhistochemie-Färbung ohne Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion. Dies führte dazu, dass für eine optimale Darstellung der gesuchten Farbsignale deutlich längere Belichtungszeiten, über 2.000 Millisekunden (im Folgenden als ms abgekürzt), notwendig waren. Zudem waren die Schnitte der Protokolle Multiplexing 1 (Sudanschwarz) und Sherry Lab 1 (Sudanschwarz) bei der Betrachtung im Mikroskop von einer Art Farbschleier überzogen, wodurch die gesamte Abbildung undeutlich wurde.

Für die kombinierten Protokolle zeigte sich, dass die Farbsignale zu stark reduziert waren. Das Multiplexing 1 (Sudanschwarz) + Wasserstoffperoxid Protokoll, zeigte hierbei eine komplette Auslöschung des K5 Signals. Das Sherry Lab 1 (Sudanschwarz) + Wasserstoffperoxid Protokoll zeigte ebenso fast eine komplette Auslöschung des Farbsignals, allerdings war die K5 Färbung noch sehr schwach ausmachbar.

Im Gegensatz dazu kam es bei dem Wasserstoffperoxid-Protokoll nur zu einer geringen Reduktion der K5-Färbung, während sich keine wesentliche Reduktion der Autofluoreszenz beobachten ließ.

Abbildung 19 veranschaulicht die Ergebnisse der Autofluoreszenz-Reduktion des ersten Ansatzes bildlich. Es sind Aufnahmen von Schnitten gezeigt, die jeweils den unterschiedlichen Protokollen unterzogen wurden. Um die Betrachtung hierbei vergleichbar zu machen, wurde für alle Aufnahmen die gleiche Belichtungszeit verwendet, wobei die optimale Darstellung in der klassischen Immunhistochemie-Färbung als Referenz diente. Von jeder getesteten Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion des ersten Ansatzes sowie von einer klassischen Immunhistochemie-Färbung und einer Negativkontrolle, ohne Antikörper-Inkubationen, sind Aufnahmen einander gegenübergestellt (Abbildung 19).

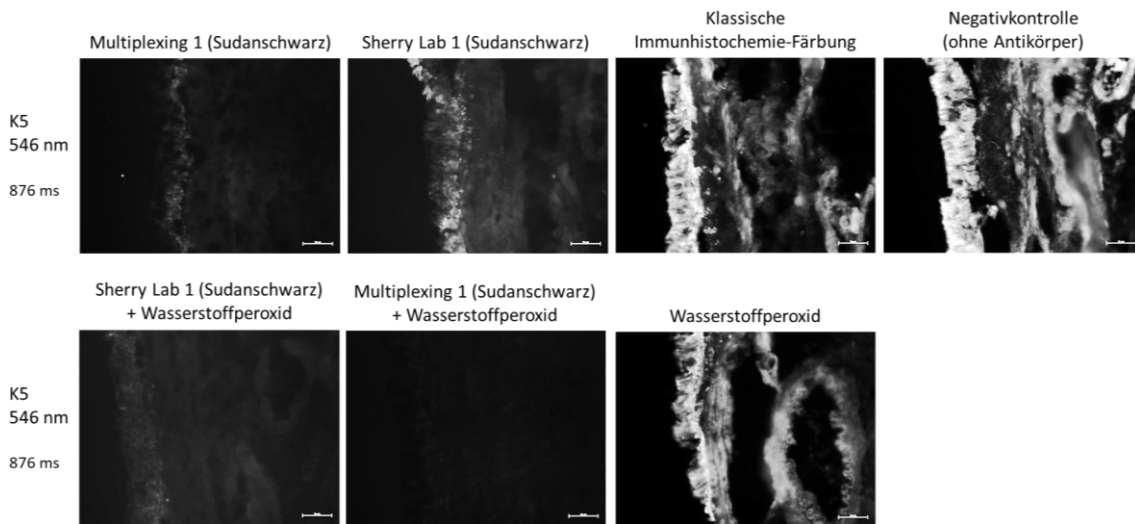


Abbildung 19: Vergleich der Autofluoreszenz-Reduktion des ersten Ansatzes

Färbung (alle Ansätze): K5 546 nm

Färbungen an Schnitten von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist K5 in Weiß. Es wurden verschiedene Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion angewendet. Diese wurden mit einer klassischen Immunhistochemie-Färbung und einer Negativkontrolle, ohne Antikörper-Inkubationen, verglichen. Die besten Ergebnisse zeigten sich für das Multiplexing 1 (Sudanswarz) Protokoll und das Sherry Lab 1 (Sudanswarz) Protokoll, allerdings waren diese noch nicht optimal und wurden weiter überarbeitet. Für alle Aufnahmen wurde eine identische Belichtungszeit von 876 ms verwendet.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

Der Erhalt der Gewebeintegrität wurde subjektiv anhand des Zustands der Schnitte während und nach den Autofluoreszenz-Behandlungen bewertet. Bei der Durchführung der verschiedenen Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion kam es bei den Protokollen Multiplexing 1 (Sudanswarz) und Multiplexing 1

(Sudanschwarz) + Wasserstoffperoxid zu einem Eintrocknen der Schnitte während der 35 min Inkubationszeit der Sudanschwarz-Lösung, was als zusätzliche Belastung des Gewebes bei der Behandlung gewertet wurde. Der Umstand erwies sich zudem als schädlich für diese Schnitte, da sich bei der Betrachtung nach der Autofluoreszenz-Behandlung vermehrt Risse im Gewebe und abgelöste Zellen darstellten.

Die Behandlung mit 0,3 % Sudanschwarz-Lösung zeigte im Gesamtbild das beste Ergebnis. Dennoch ließ sich aus diesen Ergebnissen noch kein optimales Protokoll zur Autofluoreszenz-Reduktion ableiten. Die zur Anwendung gebrachten Protokolle mussten demnach noch weiter abgewandelt werden, weshalb in einem nächsten Ansatz die Behandlung mit Sudanschwarz vor Aufbringen der Sekundärantikörper getestet werden sollte.

3.2.2 Zweiter Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE

Die im Folgenden ausgeführten Ergebnisse wurden in Teilen bereits in Klingenstein et al. (2026) veröffentlicht.

In einem zweiten Ansatz wurden die kombinierten Protokolle Multiplexing 1 (Sudanschwarz) + Wasserstoffperoxid und Sherry Lab 1 (Sudanschwarz) + Wasserstoffperoxid sowie das Protokoll Wasserstoffperoxid weggelassen. Diese Protokolle zeigten im ersten Ansatz eine zu starke oder zu schwache Reduktion der Fluoreszenz-Signale.

Die Protokolle Multiplexing 1 (Sudanschwarz) und Sherry Lab 1 (Sudanschwarz) wurden abgewandelt, sodass die Behandlung mit Sudanschwarz nun vor der Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte (Tabelle 12). Es wurden erneut Färbungen mit K5 durchgeführt. Zudem wurden in diesem Ansatz für alle Protokolle jeweils sowohl ein Schnitt mit einem 488 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper und einer mit einem 546 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper gefärbt, wobei für alle Schnitte mit der gleichen Färbung je eine gemeinsame Antikörper-Lösung angesetzt wurde. Zum Vergleich wurde außerdem für jeden Sekundärantikörper je eine Negativkontrolle angesetzt, die nur mit Sekundärantikörpern und nicht mit Primärantikörpern inkubiert wurde.

Tabelle 12: Protokolle zum zweiten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion

Protokollname	– Verweis im Methodenteil
Klassische Immunhistochemie-Färbung	– Verweis 2.3.5
Multiplexing 2 (Sudanschwarz)	– Verweis 2.3.7.1
Sherry Lab 2 (Sudanschwarz)	– Verweis 2.3.7.2

Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte durch den Vergleich sowohl der Protokolle als auch der unterschiedlichen Sekundärantikörper, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Autofluoreszenz an humanem, respiratorischem, postmortalem Gewebe.

Unter dem Multiplexing 2 (Sudanschwarz) Protokoll zeigte sich ein fast fehlendes DAPI-Signal sowie ein sehr schwaches K5-Signal, weshalb die Reduktion der gesuchten Färbung als zu stark eingestuft wurde. Außerdem wirkten die Schnitte beschädigt, mit teilweise zerstörtem Epithel.

Bei dem Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll stellte sich eine reduzierte Autofluoreszenz und damit ein klareres Muster des gesuchten Farbsignals dar. Allerdings führte die Behandlung auch zu einer Reduktion des Signals von K5. Dementsprechend war für optimale Bildaufnahmen eine deutlich längere Belichtungszeit, verglichen mit den Färbungen der klassischen Immunhistochemie, notwendig. Der Farbschleier, der sich im ersten Ansatz zur Autofluoreszenz-Reduktion auf den Färbungen zeigte, war insbesondere bei dem Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll deutlich reduziert.

Zur vergleichbaren Gegenüberstellung wurden Aufnahmen aller Protokolle von beiden Farbkanälen (488 nm und 546 nm) mit jeweils der gleichen Belichtungszeit angefertigt. Die optimale Belichtungszeit zur Darstellung des K5-Signals in der klassischen Immunhistochemie-Färbung wurde hierbei als Referenz genommen.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse des zweiten Ansatzes zur Autofluoreszenz Reduktion im bildlichen Vergleich. Die gelungene Autofluoreszenz-Reduktion, neben der klareren Darstellung des K5 positiven Farbsignals, zeigt sich deutlich an den Bildern des Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokolls. Dieses Ergebnis ließ sich unter Verwendung sowohl des 488 nm Fluorophor markierten

Sekundärantikörpers als auch des 546 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörpers nachweisen.

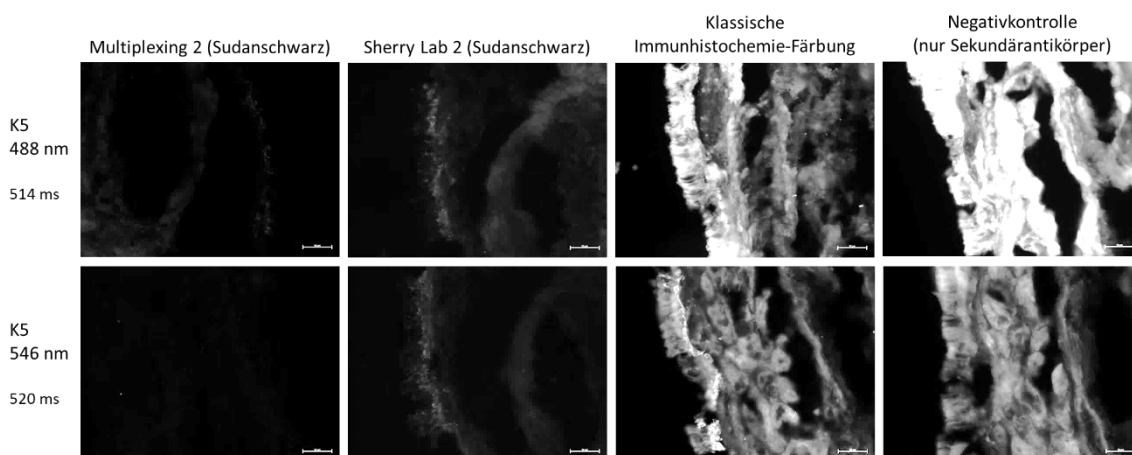


Abbildung 20: Vergleich der Autofluoreszenz-Reduktion des zweiten Ansatzes

Färbung (obere Zeile): K5 488 nm

Färbung (untere Zeile): K5 546 nm

Färbungen an Schnitten von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist K5 in Weiß. Es wurden verschiedene Protokolle zur Autofluoreszenz-Reduktion angewendet und mit einer klassischen Immunhistochemie-Färbung sowie einer Negativkontrolle verglichen. Das beste Ergebnis zeigte sich auf beiden Farbkanälen (488 nm und 546 nm) unter dem Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll. Für alle Aufnahmen in der oberen Zeile wurde eine identische Belichtungszeit von 514 ms verwendet. In der unteren Zeile wurde für alle Aufnahmen eine gleiche Belichtungszeit von 520 ms angewendet.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

Der Vergleich der Sekundärantikörper ergab, dass sich eine deutlich stärkere Färbung des gesamten Gewebes durch den Sekundärantikörper mit dem 488 nm Fluorophor zeigte. Diese Beobachtung traf bei allen Protokollen auf die jeweiligen Färbungen zu. Mit diesem Sekundärantikörper (488 nm) waren die Schnitte bei der klassischen Immunhistochemie-Färbung so überstrahlt, dass die gesuchte Färbung nicht mehr klar dargestellt werden konnte. Auch bei der Negativkontrolle stellte sich die Hintergrund-Autofluoreszenz des Gewebes auf dem 488 nm Fluoreszenzkanal deutlich stärker dar als auf dem 546 nm Kanal.

Die Bewertung der Ergebnisse der Protokolle des ersten und des zweiten Ansatzes zur Autofluoreszenz-Reduktion ist vereinfacht zusammengefasst in der untenstehenden Tabelle 13. Die unterschiedlichen Protokolle wurden anhand ihrer Qualität zur Reduktion der Autofluoreszenz, zur klaren Darstellung des

positiven K5-Signals, zur Abbildung des positiven DAPI-Kernsignals und zur Gewebeschonung, beurteilt.

Verglichen mit allen anderen Protokollen der ersten zwei Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion ergab sich das Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll als das Beste.

Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse der ersten zwei Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion

(Bewertung der Qualität der Kriterien: -- = sehr schlecht, - = schlecht, + = gut, ++ = sehr gut)

	Auto- fluoreszenz- Reduktion	K5 positives Signal	DAPI positives Signal	Gewebe- erhaltung / -schonung
Wasserstoffperoxid	--	++	++	++
Multiplexing 1 (Sudanschwarz)	++	+	+	-
Sherry Lab 1 (Sudanschwarz)	++	+	+	++
Wasserstoffperoxid + Multiplexing 1 (Sudanschwarz)	+	--	-	-
Wasserstoffperoxid + Sherry Lab 1 (Sudanschwarz)	+	-	-	++
Multiplexing 2 (Sudanschwarz)	++	-	--	--
Sherry Lab 2 (Sudanschwarz)	++	++	+	++

3.2.3 Optimierung des Protokolls zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE

Das Protokoll zur Autofluoreszenz wurde im Verlauf weiter optimiert, indem die Inkubation der Sudanschwarz-Lösung und das anschließende Waschen der Schnitte noch angepasst wurden (Verweis 2.3.8).

Aus den Optimierungen ergab sich, dass neben der Dauer der Sudanschwarz-Inkubation auch die Menge der aufgetragenen Lösung einen Unterschied im Farbergebnis zeigte.

Eine Inkubationszeit von 3 bis 5 min erwies sich hierbei als ausreichend.

Zudem sollte auf die Schnitte nur die Lösungsmenge an Sudanschwarz aufgebracht werden, die auch zur Inkubation der Antikörper-Lösungen angewendet wurde. Um dabei ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, sollte tropfenweise, maximal zweimal Sudanschwarz-Lösung nachpipettiert werden.

Das vorsichtige Trockentupfen der Grenzen des hydrophoben Stifts mit einem Präzisionswischtuch half außerdem, das Verlaufen der Sudanschwarz-Lösung auf den Schnitten zu vermeiden.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass ein gründliches Abwaschen von Sudanschwarz-Überresten nach der Inkubation das Ergebnis ebenfalls verbessern konnte. Demnach sollten die Schnitte kurz in 70 % Ethanol geschwenkt, viermal für jeweils 2 min in PBS gewaschen und im Anschluss grobe noch verbleibende Reste des Sudanschwarz vorsichtig mit einem Präzisionswischtuch entfernt werden.

So war es möglich einen Farbschleier, der sich am Mikroskop auf den Schnitten zeigte, wesentlich weiter zu reduzieren.

3.2.4 Autofluoreszenz-Reduktion an unterschiedlichen Geweben

Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden bereits publiziert (Klingenstein et al., 2026).

3.2.4.1 Autofluoreszenz-Reduktion am RE

Bei der Darstellung von K5 am RE mit dem 488 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper zeigte sich zwischen mit oder ohne Sudanschwarz-Anwendung ein deutlicher Unterschied.

In der klassischen Immunhistochemie-Färbung ohne Sudanschwarz stellte sich das gesamte RE auf dem 488 nm Kanal so stark gefärbt dar, dass das eigentliche positive Signal nicht von der allgemeinen Autofluoreszenz zu unterscheiden war und die Färbung mit K5 negativ oder nicht beurteilbar wirkte (Abbildung 21).

Die gleiche Färbung, nach dem Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll, zeigte hingegen eine Art Demaskierung des positiven Signals der K5 positiven Basalzellen (Abbildung 21). Die Autofluoreszenz des RE konnte durch die Sudanschwarz-Behandlung stark reduziert werden, wodurch das positive Signal

der K5-Antikörper-Markierung an den Basalzellen erst deutlich zur Darstellung kam (Abbildung 21).

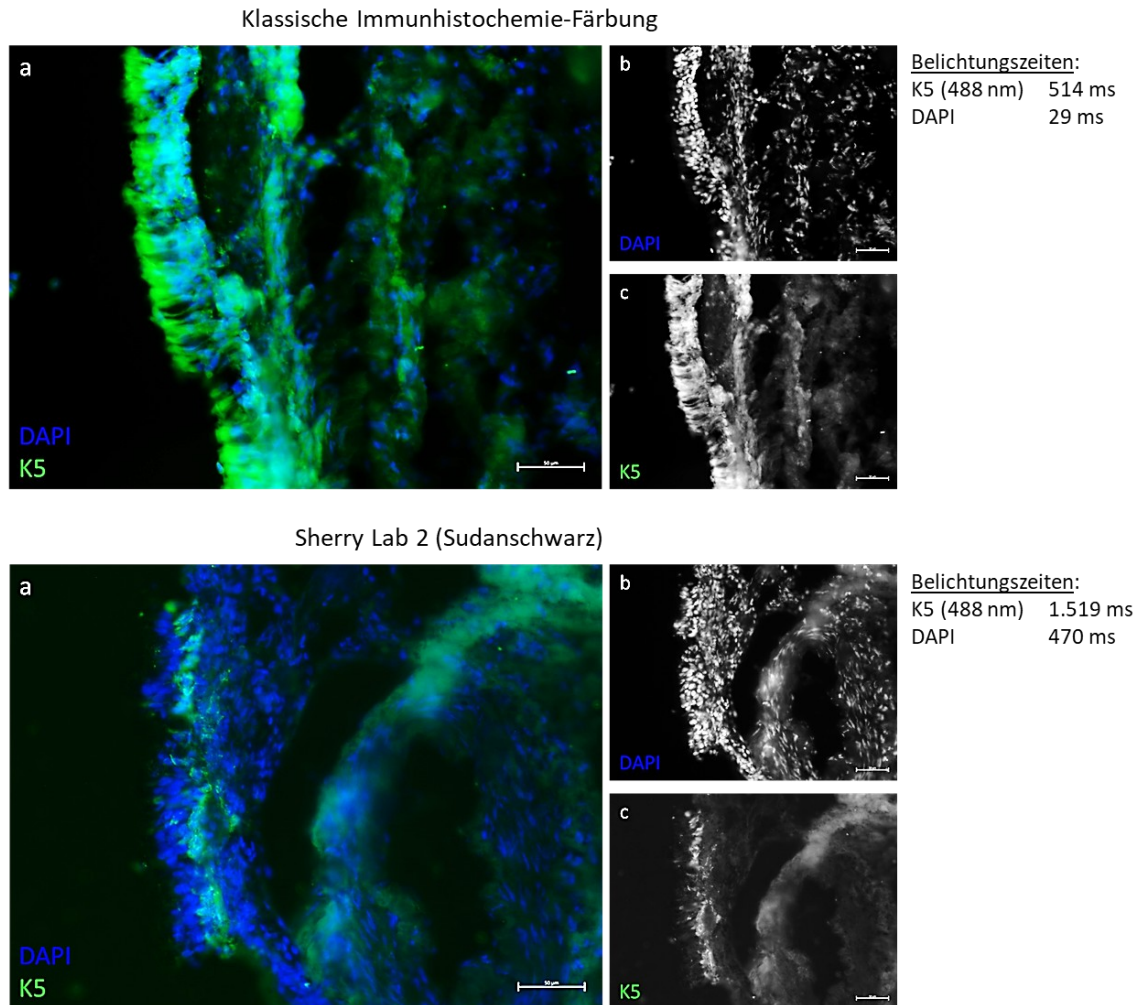


Abbildung 21: Vergleich der Autofluoreszenz am RE

Färbung (obere und untere Abbildung): K5 488 nm + DAPI

Färbungen an Schnitten von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist je K5 in Grün und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. In der oberen Abbildung wurde die Färbung nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung durchgeführt. In der unteren Abbildung wurde das Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll zur Reduktion der Autofluoreszenz angewendet. Es zeigt sich die deutliche Reduktion und damit klarere Darstellung der K5 positiven Färbung unter der Sudanschwarz-Behandlung. Die Belichtungszeiten für die unterschiedlichen Farbkanäle der einzelnen Abbildungen sind jeweils auf der rechten Seite angegeben.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

Es zeigte sich außerdem, dass unter der Sudanschwarz-Behandlung zur optimalen Darstellung des positiven Farbsignals deutlich längere

Belichtungszeiten nötig waren (Abbildung 21). So wurden unterschiedliche Belichtungszeiten für die Aufnahmen der klassischen Immunhistochemie-Färbung (kürzer) und des Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokolls (länger) verwendet.

3.2.4.2 Autofluoreszenz-Reduktion am Bulbus olfactorius

Die Demaskierung eines positiven Farbsignals durch die Sudanschwarz-Behandlung konnte nicht nur am RE, sondern auch an neuronalem Gewebe, wie beispielhaft am Bulbus olfactorius, gezeigt werden. Besonders das Farbsignal des beta-Tubulin III mit einem 488 nm Fluorophor markierten Sekundärantikörper wurde durch das Sherry Lab 4 (Sudanschwarz) Protokoll (Verweis 2.3.8.1) deutlicher dargestellt.

An den Schnitten mit der klassischen Immunhistochemie-Färbung zeigte sich erneut eine starke Autofluoreszenz des gesamten Gewebes, ohne das spezifische Signal des beta-Tubulin III Antikörpers klar darzustellen. Unter der Sudanschwarz-Behandlung hingegen konnte das faserartige positive Signal des beta-Tubulin III der Neurone im Bulbus olfactorius verdeutlicht werden (Abbildung 22).

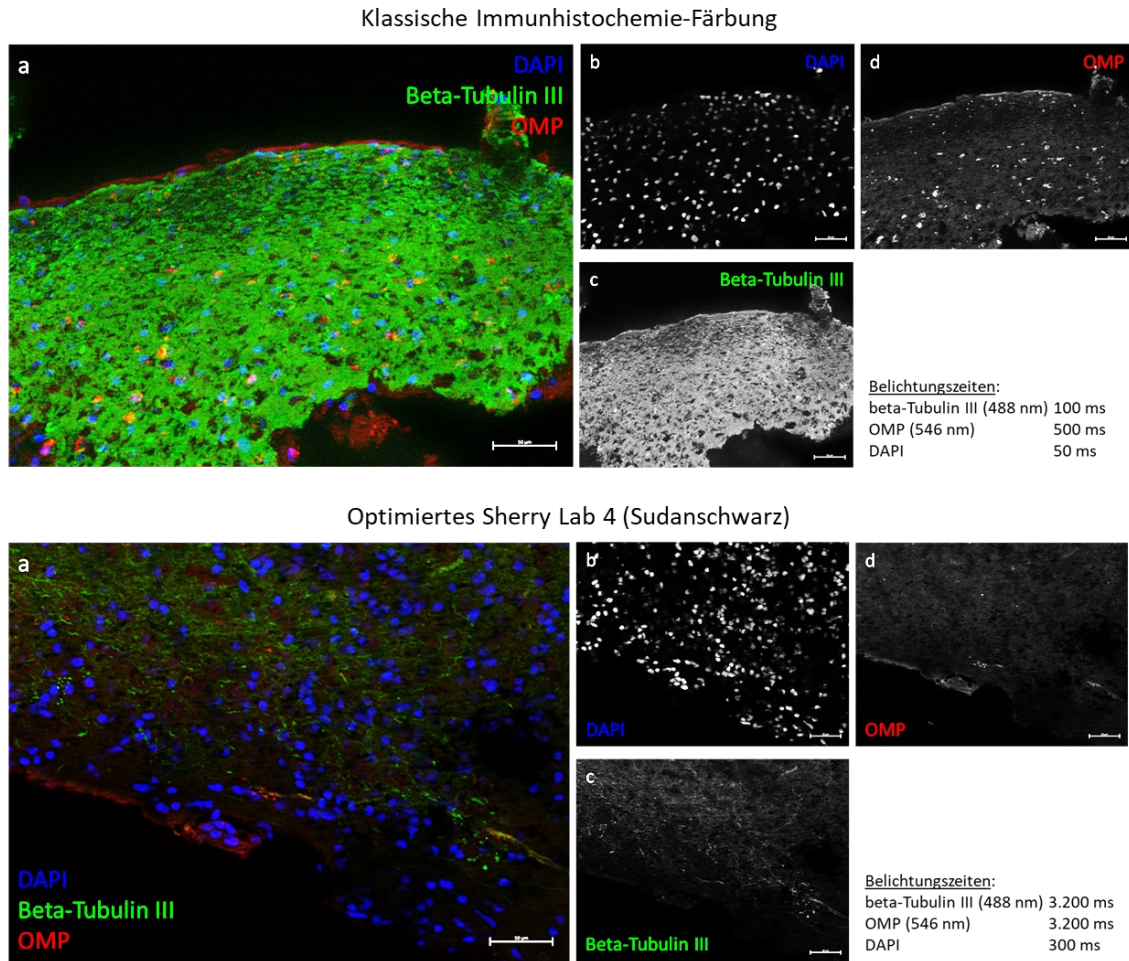


Abbildung 22: Vergleich der Autofluoreszenz am Bulbus olfactorius

Färbung (obere Abbildung): beta-Tubulin III 488 nm + OMP 546 nm + DAPI

Färbung (untere Abbildung): beta-Tubulin III 488 nm + OMP 546 nm + DAPI

Färbungen an Schnitten von Präparat H82 mit Bulbus olfactorius. Dargestellt ist jeweils beta-Tubulin III in Grün, OMP in Rot und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. In der oberen Abbildung wurde die Färbung nach dem Protokoll der klassischen Immunhistochemie-Färbung durchgeführt. In der unteren Abbildung wurde das optimierte Sherry Lab 4 (Sudanschwarz) Protokoll zur Reduktion der Autofluoreszenz angewendet. Besonders auf dem 488 nm Farbkanal mit der beta-Tubulin III Färbung zeigte sich unter der Sudanschwarz-Anwendung eine deutliche Reduktion der Autofluoreszenz an dem neuronalen Gewebe. Die Belichtungszeiten für die unterschiedlichen Farbkanäle der einzelnen Abbildungen sind jeweils in der rechten unteren Ecke angegeben.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

3.2.5 Autofluoreszenz-Reduktion mit Sudanschwarz optimiert für große Cryo-Schnitte mit RE

Die geschilderten Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Teilen in Klingenstein et al. (2026) bereits veröffentlicht.

Bei der Anwendung des Sherry Lab 4 (Sudanschwarz) Protokolls, das für kleine Schnitte mit RE etabliert und optimiert wurde, zeigten sich an größeren Nasenlängsschnitten mit RE einige Schwierigkeiten. Die Cryo-Schnitte eines Nasenlängsschnitts enthielten mehr knöcherne Anteile als die zuvor zur Etablierung verwendeten Schnitte und waren in ihrer Gesamtfläche deutlich größer.

Betrachtet wurde eine Färbung mit K5, welche bereits in vorangegangenen Versuchen ein deutlich positives Signal an den epithelialen Basalzellen zeigte. Außerdem kamen erneut zwei verschiedene Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Fluorophoren (488 nm und 647 nm) zur Anwendung. Das Sherry Lab 4 (Sudanschwarz) Protokoll wurde mit 3 bis 5 min Inkubationszeit des Sudanschwarz zur Reduktion der Autofluoreszenz durchgeführt, wie es in Vorversuchen an kleinen Gewebeproben mit RE optimiert worden war. Allerdings zeigten sich durch diese Sudanschwarz-Behandlung auf den größeren Schnitten die spezifischen Fluoreszenz-Signale der Antikörper am RE stark reduziert. Die Sudanschwarz-Behandlung sorgte damit neben der Reduktion der Autofluoreszenz auch für eine zu starke Reduktion der gewünschten Fluoreszenz-Markierungen (Abbildung 23, obere Zeile).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Inkubationszeit des Sudanschwarz weiter auf 2 min reduziert. Das restliche Sherry Lab 4 (Sudanschwarz) Protokoll wurde beibehalten. Es stellte sich heraus, dass an den großen Schnitten auch bei dieser reduzierten Inkubationszeit die gesuchten Fluoreszenz-Signale der Marker am RE zu schwach und kaum detektierbar waren (Abbildung 23, obere Zeile).

Aufgrund dessen wurde die Versuchsreihe mit weiteren Abwandlungen der Sudanschwarz-Behandlung an großen in Cryo eingebetteten Nasenlängsschnitten mit RE fortgesetzt. Hierfür wurde das Sherry Lab 4 (Sudanschwarz) Protokoll erneut angepasst, indem die aufgetragene Menge der 0,3 % Sudanschwarz-Lösung jener Menge entsprach, welche für die Antikörper-Lösungen aufgebracht wurde. Zudem wurde kein Sudanschwarz nachpipettiert, die Inkubationszeit auf ein Minimum von ungefähr 10 s reduziert und das Sudanschwarz direkt wieder abgewaschen.

In einer weiteren Abwandlung des Protokolls wurde mit einer auf 0,1 % verdünnten Sudanschwarz-Lösung gearbeitet. Hierbei erfolgte eine Inkubation für 1,5 min und nach dem Aufbringen der Lösung wurde nur einmalig nachpipettiert.

Es ergab sich, dass sowohl die maximal reduzierte Inkubationszeit auf einige Sekunden mit der etwas höher konzentrierten 0,3 % Sudanschwarz-Lösung sowie die etwas reduzierte Inkubationszeit von 1,5 min mit geringer konzentrierter 0,1 % Sudanschwarz-Lösung ziemlich ähnliche Ergebnisse erzielten. In beiden Fällen zeigte sich die deutliche Reduktion der Autofluoreszenz im Vergleich zur klassischen Immunhistochemie-Färbung sowie das spezifische Fluoreszenz-Signal der Färbung klar erkennbar und nur leicht abgeschwächt (Abbildung 23, untere Zeile).

Allerdings konnte erneut ein Unterschied in der Intensität der Autofluoreszenz abhängig von dem jeweiligen Sekundärantikörper festgestellt werden. Bei dem K5-Signal mit einem 488 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper zeigte sich die Autofluoreszenz und das spezifische Farbsignal deutlich stärker als bei dem gleichen Primärantikörper gefärbt mit einem 647 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper. Die benötigte Belichtungszeit zur Abbildung des Farbsignals erwies sich für die Darstellung über den 647 nm Kanal mit über 3.000 ms auch als deutlich länger. Im Fall der Färbung von K5 mit dem 647 nm Fluorophor prägte sich die Autofluoreszenz in der klassischen Immunhistochemie-Färbung sogar so schwach aus, dass eine Sudanschwarz-Behandlung für die großen Schnitte nicht mehr zwingend nötig erschien.

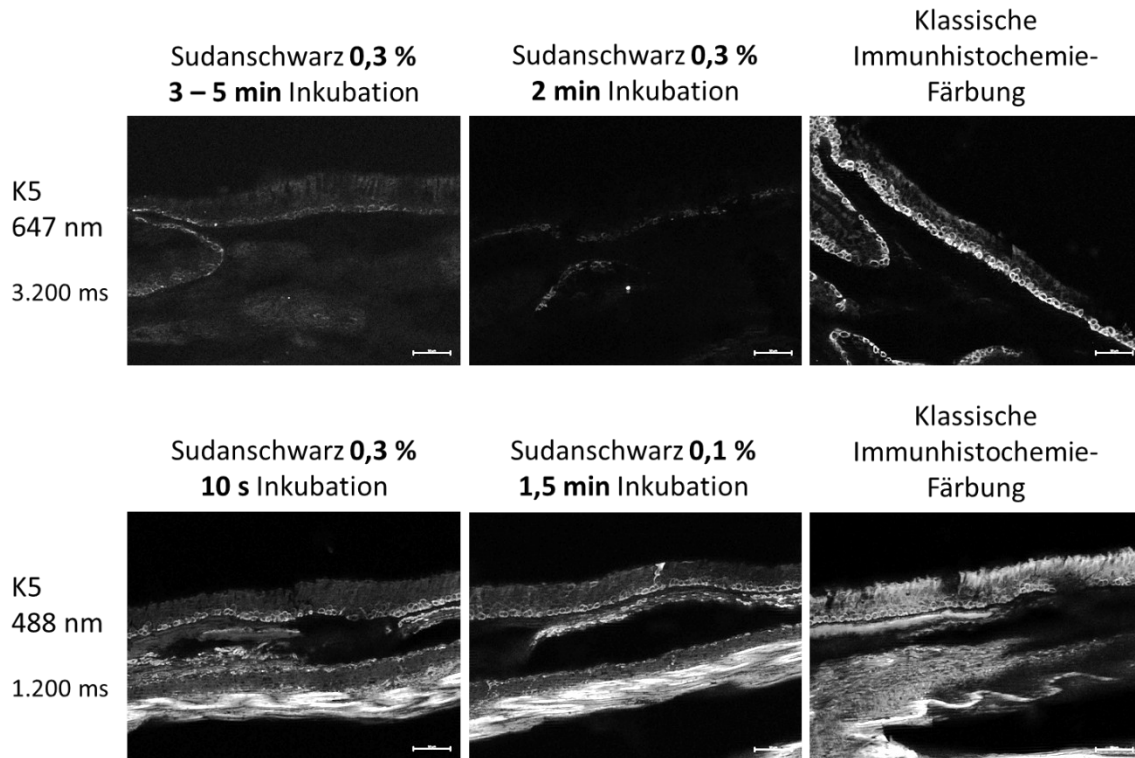


Abbildung 23: Vergleich der Autofluoreszenz-Reduktion durch unterschiedliche Sudanschwarz-Protokolle an großen Schnitten mit RE

Färbung (obere Zeile): K5 647 nm

Färbung (untere Zeile): K5 488 nm

Färbungen an Schnitten von Präparat H84 als gesamte Nasenlängsschnitte mit RE. Dargestellt ist jeweils K5 in Weiß an den Basalzellen des RE. Es wurden unterschiedliche Protokolle verwendet, um die Autofluoreszenz-Reduktion mit einer Sudanschwarz-Behandlung an großen Nasenschnitten weiter zu optimieren. Die jeweils verwendete Sudanschwarz-Konzentration und die Inkubationszeit sind entsprechend an jeder Aufnahme angegeben. Für jede Zeile wurde eine identische Belichtungszeit verwendet, die links dargestellt ist. In der rechten Spalte findet sich außerdem je eine Aufnahme einer Färbung nach der klassischen Immunhistochemie-Färbung, ohne Sudanschwarz-Behandlung. An den großen Schnitten zeigte sich eine geringer konzentrierte Sudanschwarz-Lösung und eine verkürzte Inkubationszeit als ausreichend zur Reduktion der Autofluoreszenz des Epithels. Die Autofluoreszenz stellte sich dabei auf den Färbungen mit den 488 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörpern deutlich stärker dar. Unter der klassischen Immunhistochemie-Färbung auf dem 647 nm Kanal erscheint eine Reduktion der Autofluoreszenz an diesen Schnitten nicht zwingend nötig.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

3.2.6 Zusammenfassung – Reduktion der Autofluoreszenz an unterschiedlichen Schnitten und Strukturen

- Die zweite Stufe zur Reduktion der Autofluoreszenz zeigte nach Testung verschiedener Protokolle in mehreren Ansätzen die beste Reduktion an den kleinen Schnitten mit RE durch das Sherry Lab 2 (Sudanschwarz)

Protokoll. Hierfür wurde eine 0,3 % Sudanschwarz-Lösung mit einer Pipette aufgebracht, inkubiert für 3 bis 5 min, kurz gewaschen in 70 % Ethanol und dann viermal 2 min in PBS gewaschen.

- Das Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll zeigte ebenfalls eine Autofluoreszenz-Reduktion an mittelgroßen Schnitten mit Bulbus olfactorius.
- Für die großen Nasenlängsschnitte musste die Autofluoreszenz-Behandlung angepasst werden, da das Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll hier eine zu starke Reduktion der gewünschten Fluoreszenz-Signale zeigte. Die besten Ergebnisse ergab eine abgewandelte Anwendung von nur 0,1% Sudanschwarz-Lösung für 1,5 min oder 0,3 % Sudanschwarz-Lösung für wenige Sekunden. Ebenso zeigte sich in den Versuchen, dass für die größeren Nasenlängsschnitte zur klaren Darstellung der Fluoreszenz-Signale nicht zwingend eine Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion angewendet werden musste.
- ➔ Zur Etablierung eines Multiplexing Ansatzes sollten in der nächsten Stufe verschiedene Antikörper-Entfernungsmethoden getestet werden. Die ersten Versuchsansätze sollten wieder an kleineren Schnitten mit RE durchgeführt werden. In den Färbungen sollten die bereits untersuchten Marker aus der ersten Stufe verwendet werden.
- ➔ Die Protokolle der Antikörper-Entfernungsmethoden sollten bereits mit den Ergebnissen zur Autofluoreszenz-Reduktion zusammengeführt werden.

3.3 Antikörper-Entfernung

3.3.1 Versuchsansatz zur Antikörper-Entfernung

Die im Folgenden dargelegten Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Teilen bereits publiziert (Klingenstein et al., 2026).

Es wurden verschiedene Lösungen getestet, mit der die Entfernung von Antikörpern einer Färbung möglich sein sollte, um mehrere Runden von Färbungen hintereinander an demselben Schnitt durchführen zu können (Verweis 2.3.9.).

Der Vergleich der verschiedenen Protokolle erfolgte sowohl hinsichtlich ihrer Effizienz zur Antikörper-Entfernung als auch anhand der Gewebeschonung unter der Anwendung der Techniken.

Es wurden drei Methoden in einem Versuchsansatz getestet: Ein Protokoll mit einem 10 mM Citrat-Puffer (Verweis 2.3.9.2), eine Glycin/SDS-Lösung mit einem stark sauren pH von 2,0 (Verweis 2.3.9.3) und eine BME/SDS-Lösung (Verweis 2.3.9.4). Bei allen diesen drei Protokollen kam zusätzlich Hitze als Effekt zur Antikörper-Entfernung zur Anwendung.

Es erfolgte zunächst eine Färbung nach dem Sherry Lab 3 (Sudanschwarz) Protokoll (Verweis 2.3.9.1), welche dann mikroskopiert und mit vergleichbaren Belichtungszeiten aufgenommen wurde. Diese Bilder zeigten auf allen Schnitten die positive Färbung durch die Antikörper K5, K19 und E-Cadherin, um das grundlegende Gelingen der Färbung nachzuweisen.

Es schloss sich die Anwendung der Antikörper-Entfernungstechniken auf je einen Schnitt an, wobei ein weiterer Schnitt als Negativkontrolle nicht weiter behandelt wurde. Nach der Antikörper-Entfernung folgte die Deckelung der Schnitte, ohne eine erneute Sudanschwarz-Behandlung oder Färbung durchzuführen.

Um die Effektivität der Antikörper-Entfernung zu beurteilen wurde untersucht, ob sich nach Anwendung der Entfernungsmethoden noch ein spezifisches Farbsignal auf einem der Kanäle zeigte und inwieweit die Wirkung des Sudanschwarz zur Autofluoreszenz-Reduktion beeinflusst worden war. Dabei konnte jedem Schnitt nach Anwendung der Antikörper-Entfernungstechnik eine Aufnahme als Positivkontrolle von vor der Antikörper-Entfernungstechnik gegenübergestellt werden (Abbildung 24). Je schwächer das spezifische Antikörper-Farbsignal war und je stärker die Wirkung des Sudanschwarz aufgehoben wurde, desto besser wurde das Ergebnis der Entfernungsbehandlung gewertet.

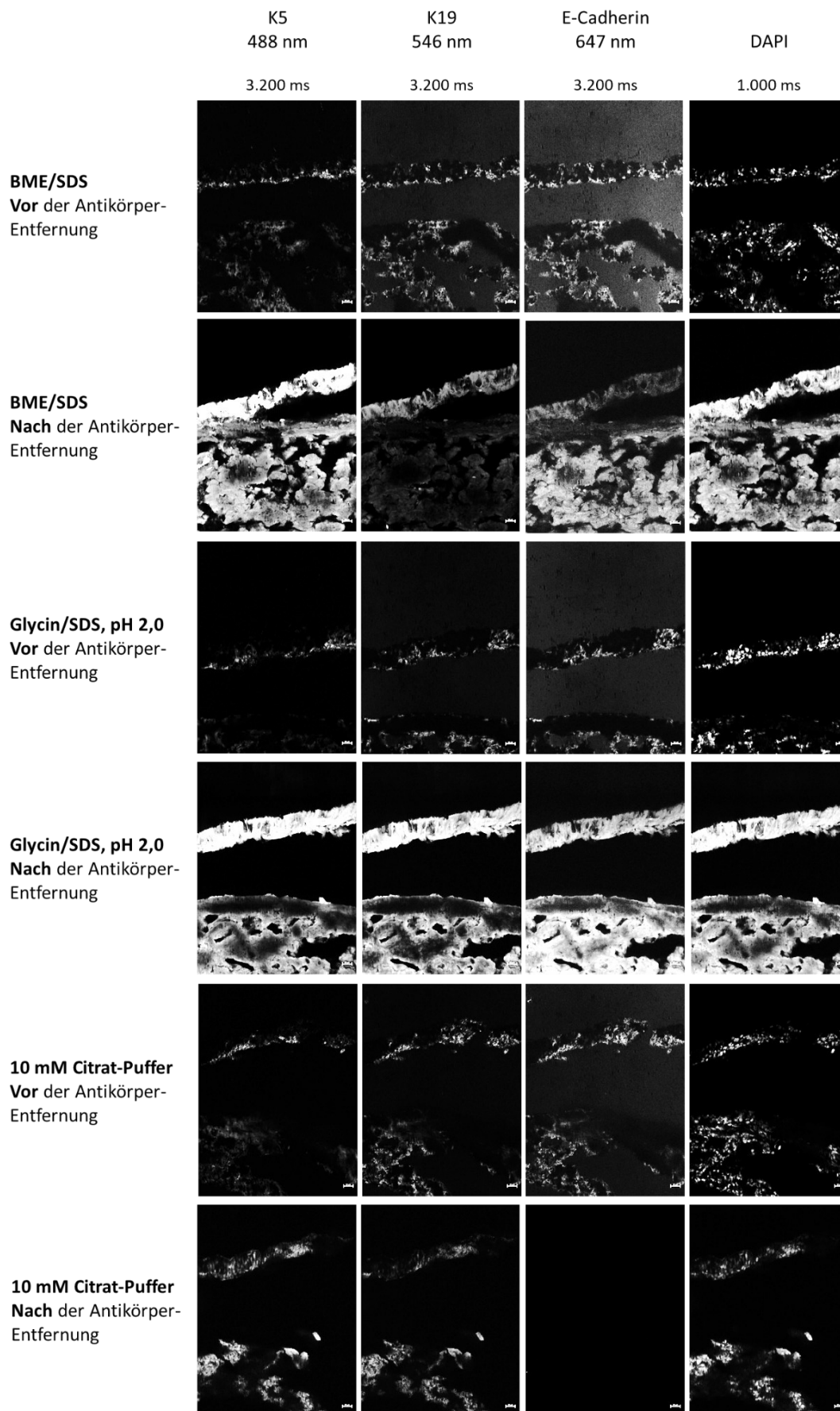


Abbildung 24: Vergleich der Ansätze zur Antikörper-Entfernung

Färbung (vor der Antikörper-Entfernung): K5 488 nm + K19 546 nm + E-Cadherin 647 nm + DAPI Färbungen an Schnitten von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist, je in einer Spalte, K5, K19, E-Cadherin und eine Kernfärbung mit DAPI, je in Weiß. Es wurden verschiedene Protokolle zur Antikörper-Entfernung getestet. Vor der Antikörper-Entfernung wurde die Färbung unter Autofluoreszenz-Reduktion durchgeführt. Die Aufnahmen in den Zeilen entsprechen jeweils denen vor oder nach der Anwendung der Antikörper-Entfernungstechniken. Das angewendete Protokoll und der Zeitpunkt der Aufnahme sind links neben der jeweiligen Zeile angegeben. Die Glycin/SDS-Lösung und die BME/SDS-Lösung zeigten in der Entfernung der Antikörper und des Sudanschwarz vergleichbar gute Ergebnisse. Für alle Aufnahmen von K5, K19 und E-Cadherin wurde eine Belichtungszeit von 3.200 ms verwendet. Für alle DAPI-Aufnahmen wurde eine Belichtungszeit von 1.000 ms verwendet.

Maßstabsbalken 20 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

Aus den Ansätzen zur Antikörper-Entfernung ergab sich, dass der 10 mM Citrat-Puffer schlechte und die Glycin/SDS-Lösung sowie die BME/SDS-Lösung vergleichbar gute Ergebnisse erzielten.

Durch die Anwendung des Citrat-Puffers unter Hitze in einer Mikrowelle, wurde das Gewebe deutlich beschädigt. Dies zeigte sich in gerissenen Gewebeanteilen, womit es zu einer Störung der Gewebeintegrität kam. Außerdem erwies sich der Citrat-Puffer als nicht effektiv in der Antikörper-Entfernung, da sich im DAPI-Kanal immer noch ein schwaches spezifisches Kern-Farbsignal zeigte. In den anderen Farbkanälen war kein spezifisches Antikörper-Signal mehr erkennbar, allerdings konnte die Wirkung des Sudanschwarz zur Autofluoreszenz-Reduktion nicht aufgehoben werden (Abbildung 24). Die Methode mit dem 10 mM Citrat-Puffer unter Mikrowellen-Hitze-Wirkung zeigte somit weder in der Effektivität der Entfernung noch in der Schonung des Gewebes ein befriedigendes Ergebnis. Besonders in der Voraussicht, dass für die endgültige Anwendung der Multiplexing Methode mehrere Runden von Färbungen und Antikörper-Entfernungen hintereinander durchgeführt werden sollten, stellte sich diese Methode als nicht geeignet für die vorliegenden Proben heraus.

Das Protokoll mit Glycin/SDS mit pH 2,0 und das Protokoll mit BME/SDS konnten hingegen vergleichbar gute Ergebnisse liefern. Hierbei arbeiteten beide Protokolle ebenfalls mit Hitze, allerdings wurde diese durch ein Wasserbad zugeführt. Bei beiden Schnitten konnte nach der entsprechenden Antikörper-Entfernung in allen Farbkanälen, auch im DAPI-Kanal, kein spezifisches Antikörper-Signal mehr nachgewiesen werden. Da durch die beiden

Entfernungstechniken nicht nur die Antikörper, sondern auch das Sudanschwarz aus der vorangegangenen Färbung von den Schnitten entfernt wurden, war auch die Autofluoreszenz wieder stark (Abbildung 24). Die Gewebeintegrität war bei beiden Methoden nach der Anwendung noch erhalten und zeigte die Proben nur minimal beschädigt.

Die Vergleichsaufnahmen der Schnitte mit der Glycin/SDS- und der BME/SDS-Lösung, dargestellt in Abbildung 24, zeigen die Unterschiede zwischen vor und nach Anwendung der Entfernungstechnik. Die Bilder veranschaulichen erneut deutlich die Reduktion der Autofluoreszenz durch die Sudanschwarz-Lösung und die gegenteilige Aufhebung dieser Wirkung durch die Glycin/SDS- und die BME/SDS-Lösung. Das Aufheben der Sudanschwarz-Wirkung und die Entfernung der Antikörper-Färbungen erschienen dabei unter dem Protokoll der BME/SDS-Lösung ein bisschen besser erzielt zu werden.

Die untenstehende Tabelle 14 fasst die Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Antikörper-Entfernungsmethoden nochmals zusammen.

Tabelle 14: Vergleich Ergebnisse Antikörper-Entfernungsmethoden

(Bewertung der Qualität der Kriterien: -- = sehr schlecht, - = schlecht, + = gut, ++ = sehr gut)

	Entfernungseffizienz					Gewebe- erhaltung / -schonung
	K5	K19	E-Cadherin	DAPI	Sudan- schwarz	
10mM Citrat- Puffer	++	++	++	-	-	--
Glycin/ SDS (pH 2,0)	++	++	++	++	+	+
BME/ SDS	++	++	++	++	++	+

Aufgrund der etwas effizienteren Antikörper- und vor allem Sudanschwarz-Entfernung durch das Protokoll mit der BME/SDS-Lösung, wurde diese

Entfernungstechnik für die weitere Verwendung in der Multiplexing Methode beibehalten.

3.3.2 Zusammenfassung – Antikörper-Entfernungsmethoden

- Es wurden verschiedene Antikörper-Entfernungstechniken an kleinen Schnitten mit RE getestet und bezüglich der Antikörper-Entfernungseffizienz und der Gewebeschonung miteinander verglichen. Die besten Ergebnisse erzielte dabei eine Behandlung der Schnitte mit einer BME/SDS-Lösung für 30 min im Wasserbad.
- Die BME/SDS-Lösung konnte sowohl die Antikörper-Färbungen als auch das Sudanschwarz entfernen. Die Schnitte wurden dabei nicht in ihrer Integrität gestört.
- ➔ In einer nächsten Stufe sollten die Ergebnisse zur Autofluoreszenz-Reduktion und zur Antikörper-Entfernung in einem Multiplexing Ansatz zusammengeführt werden.
- ➔ Das Multiplexing sollte zunächst an kleinen Schnitten mit RE etabliert werden. Es sollten bis zu vier Färberunden erreicht werden, mit den Markern, die in der ersten Stufe bereits auf ihre Expression am RE untersucht wurden.

3.4 Zusammengeführte Multiplexing Ansätze

Die Ergebnisse der vorangegangenen Einzelversuche zur Autofluoreszenz-Reduktion und Antikörper-Entfernung wurden zusammengeführt zu einem Multiplexing Ansatz. Für die Multiplexing Ansätze (Verweis 2.3.10) wurde Sudanschwarz verwendet, um die Autofluoreszenz des Gewebes zu reduzieren. Nach einer Färberunde wurden die Schnitte mit einer BME/SDS-Lösung unter Hitze im Wasserbad behandelt, um die Antikörper und das Sudanschwarz wieder zu entfernen und eine neue Färberunde anschließen zu können. Dieses Prozedere konnte in mehreren Runden hintereinander wiederholt werden, sodass mehrere Marker der gleichen Spezies nacheinander am gleichen Schnitt dargestellt werden konnten (Abbildung 25).

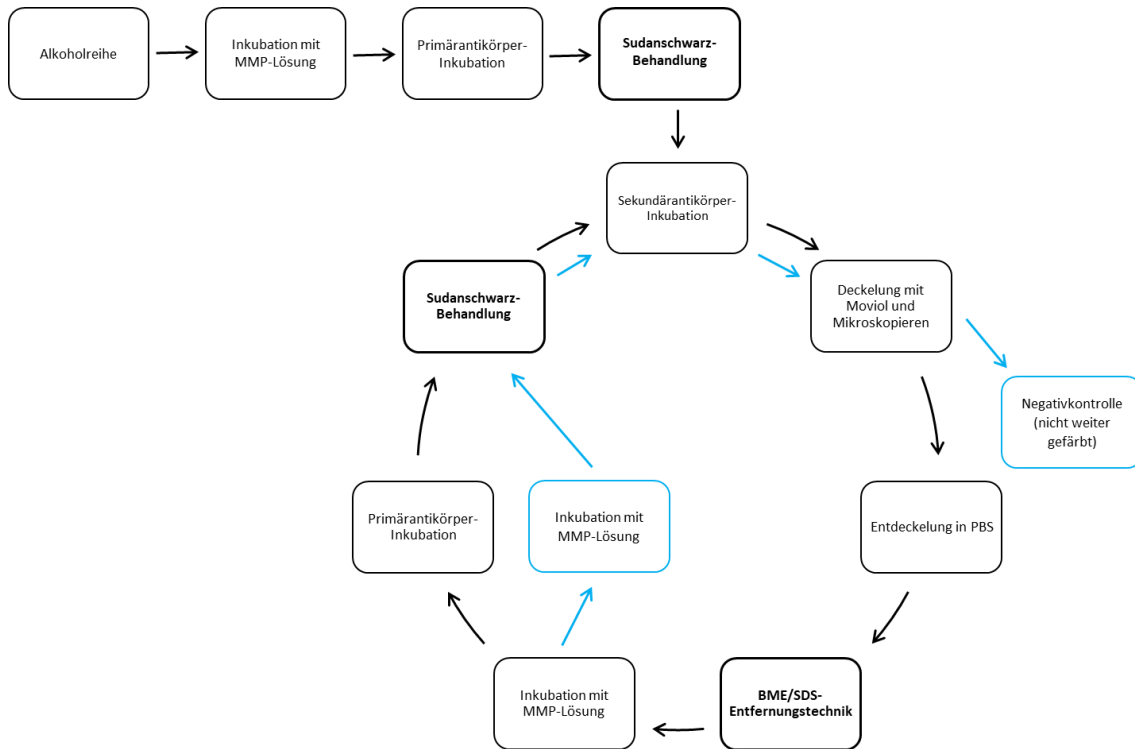


Abbildung 25: Schema des entwickelten Multiplexing Ansatzes

Dargestellt ist ein Schema für mehrere Färbezyklen des entwickelten Multiplexing Ansatzes, basierend auf dem Schema zum Grundprinzip des Multiplexing aus Abbildung 6. Er ist zusammengesetzt aus den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche zur Autofluoreszenz-Reduktion und zur Antikörper-Entfernung, welche an den jeweiligen Stellen ergänzt und dick schwarz hervorgehoben sind. Die extra Schritte für die mitlaufende Negativkontrolle ist in Hellblau gekennzeichnet.

Zu beachten gilt, dass in jeder Runde ergänzend zu den Färbungen auch je ein Schnitt als Negativkontrolle, nur mit Sekundärantikörpern inkubiert, mitlaufen sollte. Dementsprechend waren für jeden Multiplexing Ansatz mit n Runden je n + 1 Schnitte nötig.

3.4.1 Erster Multiplexing Test-Ansatz

Für den ersten Multiplexing Test-Ansatz (Verweis 2.3.10.1) wurde das Sherry Lab 2 (Sudanschwarz) Protokoll, in minimal abgewandelter Form, zur Reduktion der Autofluoreszenz des Gewebes angewendet. Mit der BME/SDS-Lösung unter Hitze im Wasserbad wurde die Entfernung der Antikörper und des Sudanschwarz für anschließende Färberunden durchgeführt.

Der Ansatz bestand aus drei Runden von Färbungen, welche hintereinander an einem Schnitt durchgeführt wurden, während zwischendurch zweimal die

Antikörper-Entfernung zum Einsatz kam. Es erfolgte die Untersuchung eines Schnitts an immer der gleichen Region des RE (Abbildung 26).

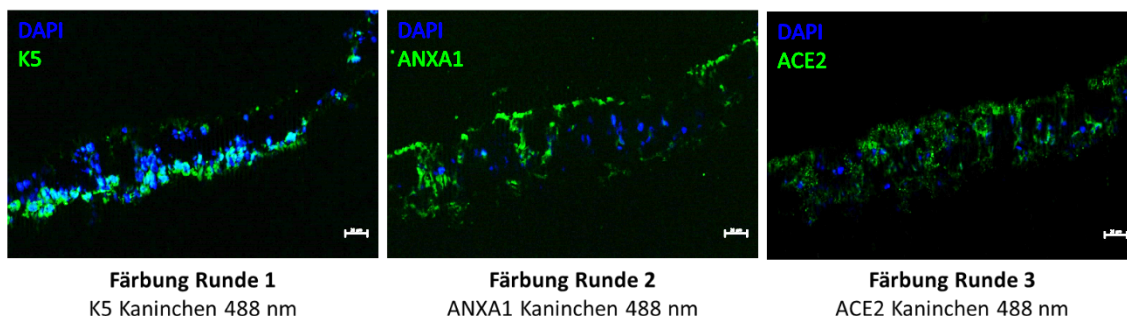


Abbildung 26: erster Multiplexing Test-Ansatz

Färbung Runde 1: K5 Kaninchen 488 nm + DAPI

Färbung Runde 2: ANXA1 Kaninchen 488 nm + DAPI

Färbung Runde 3: ACE2 Kaninchen 488 nm + DAPI

Färbungen an einem Schnitt von Präparat H88 mit RE. Dargestellt sind K5, ANXA1 und ACE2, je in Grün, und eine Kernfärbung mit DAPI in Blau. Es wurde ein erster Multiplexing Test-Ansatz durchgeführt, unter Sudanschwarz-Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion. Zwischen den Färbungen wurden die Antikörper mit einer BME/SDS-Lösung entfernt. Alle drei Färbungen wurden je an demselben Schnitt dargestellt, an etwa der gleichen Epithel-Region. Unter den Abbildungen sind die jeweilige Färberunde, die Primärantikörper und der verwendete Sekundärantikörper angegeben. Für die Aufnahmen von K5, ANXA1 und ACE2 wurde je die gleiche Belichtungszeit von 3.200 ms verwendet, wobei sich die Abnahme der Intensität des Farbsignals mit zunehmender Rundenzahl zeigt. Für alle DAPI-Aufnahmen wurde eine Belichtungszeit von 1.000 ms verwendet.

Maßstabsbalken 20 µm

Alle der drei dargestellten Antikörper, K5, ANXA1 und ACE2, stammten aus der Spezies Kaninchen und wurden mit dem gleichen Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper 488 nm gefärbt. Die dennoch spezifische Färbung jeweils unterschiedlicher Strukturen in jeder Färberunde verdeutlicht, dass die Antikörper-Entfernung in jeder Runde erfolgreich war. K5 stellte sich in der ersten Runde an den Basalzellen des RE dar, ANXA1 war in der zweiten Runde apikal lokalisiert, wohingegen ACE2 in der dritten Runde eine Expression an den Flimmerepithelzellen aufwies (Abbildung 26).

Auffällig zeigte sich jedoch, dass bei vergleichbarer Belichtungszeit die positiven Farbsignale mit jeder Runde an Intensität abnahmen. Sowohl die Farbsignale der Antikörper-Komplexe als auch das DAPI-Signal erschienen bei gleicher Belichtungszeit mit zunehmender Rundenzahl schwächer (Abbildung 26).

Die Autofluoreszenz-Reduktion durch das Sudanschwarz war in allen drei Runden effektiv. Allerdings erschien die BME/SDS-Lösung nach der zweiten Antikörper-Entfernungsrunde deutlich dunkel verfärbt und konnte das Sudanschwarz etwas schlechter entfernen, da noch einige Rückstände des Sudanschwarz an den Schnitten erkennbar waren. Aus diesem Grund wurde in der dritten Runde nur noch für 5 min mit dem Sudanschwarz inkubiert. Trotzdem zeigten sich die Farbsignale, wie oben bereits beschrieben, in der dritten Färbung weiter abnehmend an Intensität.

Während und nach der Anwendung von drei Färberunden und zwei Antikörper-Entfernungen zeigte sich das Gewebe der Schnitte jederzeit intakt. Die Qualität und Integrität der Schnitte waren bei diesem ersten Multiplexing Test-Ansatz durchgängig ausreichend erhalten.

Als Endergebnis aus diesem ersten Test-Ansatz ergab sich dementsprechend, dass drei Runden Färbungen hintereinander an einem Schnitt möglich waren, ohne überlagernde Signale durch Primärantikörper aus der gleichen Spezies auszulösen. Der Ansatz musste allerdings noch weiter optimiert werden, besonders in Hinsicht auf die mit jeder Runde abnehmende Signalintensität.

3.4.2 Zweiter optimierter Multiplexing Ansatz

Die im folgenden Kapitel ausgeführten Ergebnisse wurden in Teilen bereits in Klingenstein et al. (2026) veröffentlicht.

In einem zweiten optimierten Multiplexing-Ansatz (Verweis 2.3.10.2) lag der Fokus auf einer Anpassung des Protokolls, um die Intensität des Farbsignals in allen Runden gleich stark erhalten zu können. Dafür wurde in jeder Runde die gleiche Färbung aufgebracht und alle Farbkanäle mit je den gleichen Belichtungszeiten betrachtet, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erzeugen.

Es erfolgte die Durchführung von insgesamt fünf Runden, wobei in jeder Runde die Sudanschwarz-Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion etwas variiert wurde. In der ersten Färberunde wurde die Sudanschwarz-Lösung tropfenweise auf die Schnitte aufgebracht, immer wieder nachpipettiert und für 5 min inkubiert. Damit zeigte sich die Autofluoreszenz-Reduktion erfolgreich. Nach der Antikörper-Entfernung mit der BME/SDS-Lösung ließen sich allerdings schon

minimale Rückstände des Sudanschwarz an den Schnitten erkennen, wobei der verwendete Anteil der BME/SDS-Lösung dunkel verfärbt erschien und deshalb nach einmaliger Anwendung verworfen wurde. Für jede weitere Antikörper-Entfernung wurde ebenso mit dem verwendeten Anteil der BME/SDS-Lösung verfahren.

In den Runden 2 und 3 entsprach die aufgetragene Menge an Sudanschwarz der Lösungsmenge, welche für die jeweiligen Antikörper-Lösungen verwendet wurde. Außerdem erfolgte während der 3 min Inkubation ein Nachpipettieren an Sudanschwarz-Lösung nur mit maximal 1 bis 2 Tropfen. Dabei zeigte sich die Autofluoreszenz noch ausreichend reduziert und das positive K5-Farbsignal war klar darstellbar. Allerdings ließen sich in den Runden 2 und 3 nach der Antikörper-Entfernung immer noch Reste des Sudanschwarz auf den Schnitten erkennen.

Die Entfernung der Sudanschwarz-Reste sollte mit den Runden 4 und 5 effektiver werden. Mit jeder Runde bildeten sich etwas mehr Rückstände auf den Schnitten, trotz BME/SDS-Behandlung. Die Sudanschwarz-Behandlung der zwei Runden zuvor wurde deshalb durch ein zusätzliches kurzes Waschen in 70 % Ethanol vor dem Waschen in PBS ergänzt. In den Färbungen zeigte sich eine ausreichende Autofluoreszenz-Reduktion bei gleichzeitig immer noch starkem und klarem K5- und DAPI-Signal.

Abbildung 27 stellt die Ergebnisse dieser 5 Runden an Färbungen und Antikörper-Entfernungen im zweiten Multiplexing Ansatz bildlich dar.

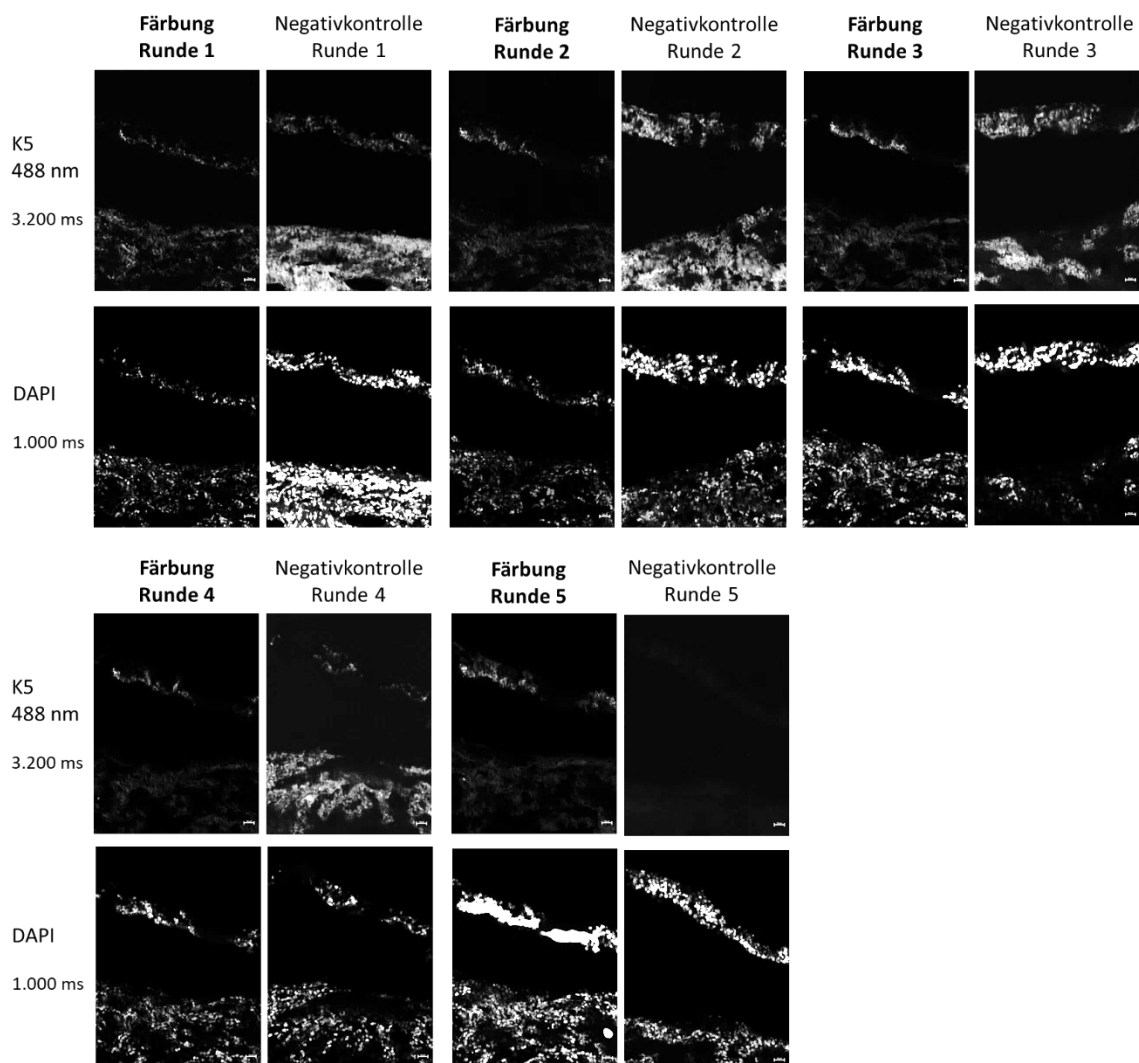


Abbildung 27: zweiter optimierter Multiplexing Ansatz

Färbung Runde 1 – 5: K5 488 nm + DAPI

Färbungen an Schnitten von Präparat H88 mit RE. Dargestellt ist, je in einer Zeile, K5 und eine Kernfärbung mit DAPI, beide in Weiß. Der zweite Multiplexing Ansatz zur Optimierung wurde unter Sudanschwarz-Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion durchgeführt. Diese Sudanschwarz-Behandlung wurde während der Färberunden angepasst, um einen Intensitätsverlust des Fluoreszenz-Signals mit zunehmender Rundenzahl zu vermeiden. Zwischen den Färbungen wurden die Antikörper mit einer BME/SDS-Lösung entfernt. Alle fünf Färbungen wurden an demselben Schnitt dargestellt, an etwa der gleichen Epithel-Region. In jedem Färbezyklus wurde je ein Schnitt als Negativkontrolle ausgeschleust. Diese Schnitte sind hier als Negativkontrollen dargestellt und wurden jeweils nur mit Sekundärantikörpern inkubiert. Die Angabe über Färbung oder Negativkontrolle und die Rundennummer der Aufnahme sind über der jeweiligen Spalte angegeben. Für alle Aufnahmen von K5 wurde eine identische Belichtungszeit von 3.200 ms verwendet. Für alle DAPI-Aufnahmen wurde eine Belichtungszeit von 1.000 ms verwendet.

Maßstabsbalken 20 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

Für den zweiten optimierten Multiplexing Ansatz wurde nacheinander an einem Schnitt immer wieder die gleiche Färbung mit K5 durchgeführt und immer etwa die gleiche Epithel-Region betrachtet und aufgenommen, um die Vergleichbarkeit im Laufe der Runden zu erhalten (Abbildung 27).

Parallel liefen mehrere Schnitte mit, an denen ebenfalls immer wieder die Färbung mit K5 durchgeführt wurde, bis sie als Negativkontrolle einer Runde fungierten. Die Funktion der Negativkontrollen war eine Darstellung der Effektivität der Antikörper-Entfernung unter möglichst repräsentativen Bedingungen, weshalb von diesen in jeder Runde je ein Schnitt nur mit Sekundärantikörpern inkubiert und nicht weiter behandelt wurde. Der Schnitt mit der Negativkontrolle Runde 3 beispielsweise wurde in den Runden 1 und 2 gefärbt und in der dritten Runde nur der Antikörper-Entfernung unterzogen und mit Sekundärantikörpern inkubiert, ohne erneute Färbung durch den Primärantikörper. Es zeigte sich an den Negativkontrollen, dass die Antikörper-Entfernung in allen Runden erfolgreich das positive Signal der Basalzellen durch den K5-Marker entfernte (Abbildung 27).

Durch die Abwandlungen der Sudanschwarz-Behandlung in den verschiedenen Runden konnte das Abnehmen der Farbsignalintensität verhindert werden (Abbildung 27). Dieser Umstand verdeutlicht den großen Anteil des Sudanschwarz an der Schwächung der Signalintensität, welche sich im ersten Multiplexing Test-Ansatz als deutliche Schwierigkeit gezeigt hatte.

Zudem zeigten sich nach allen 5 Runden nur leichte Störungen der Gewebeintegrität, sodass die Schnitte erst ab Runde 3 teilweise kleine Risse aufwiesen.

Der zweite optimierte Multiplexing Ansatz ergab dementsprechend, dass selbst fünf Runden Färbungen, mit Antikörper-Entfernungen dazwischen, unter Gewebeschonung und ohne ein Ablösen der Schnitte von den Objektträgern möglich waren. Da die Sudanschwarz-Behandlung in mehreren Anwendungsrunden auch eine sehr große Auswirkung auf den Grad der Signalintensität zu haben schien, musste vor allem an dieser Stelle das Multiplexing Protokoll angepasst werden. Es ließ sich ableiten, dass immer nur die Lösungsmenge Sudanschwarz auf die Schnitte aufgetragen werden sollte wie

die Menge, die auch für die Antikörper-Lösungen auf die Schnitte angewendet wurde. Zudem sollte maximal zweimal und nur tropfenweise Sudanschwarz-Lösung nachpipettiert werden, um die gesamte Menge an Sudanschwarz auf den Schnitten zu reduzieren. Die Anwendung von zu viel Volumen an Sudanschwarz-Lösung zeigte in mehreren Runden Anwendung einen eher negativen Effekt, wie der Vergleich zwischen dem ersten und dem zweiten Multiplexing Test-Ansatz verdeutlichte. Außerdem sollte ein kurzes Waschen der Schnitte in 70 % Ethanol nach der Sudanschwarz-Inkubation erfolgen. Für die Inkubationszeit erwiesen sich in der ersten Runde 5 min und in allen anschließenden Runden 2 bis 3 min als optimal. Hiermit konnte weiterhin eine genügende Autofluoreszenz erreicht werden, ohne dabei auf Dauer die gesuchten Farbsignale ebenfalls zu schwächen.

3.4.3 Multiplexing an großen Schnitten

In Teilen wurden die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse bereits publiziert, in Klingenstein et al. (2026).

Für Multiplexing Ansätze an großen Gewebeschnitten, wie beispielsweise dem Nasenlängsschnitt, wurde die Sudanschwarz-Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion nicht eingesetzt, weil das Fluoreszenz-Signal hierdurch zu stark abgeschwächt wurde. Zudem wurden zur erleichterten Anwendung und Proben-Einsparung die mitlaufenden Negativkontrollen ausgespart, sodass nur ein Schnitt in dem Multiplexing Zyklus behandelt wurde. Die Anfertigung der Negativkontrollen und die Qualitätsprüfung der Methode für die Nasenlängsschnitte erfolgte nach dem Multiplexing-Schema in gesonderten Ansätzen mit allen am OE positiv nachgewiesenen Markern (Anhang Abbildungen 37 bis 40).

Die untenstehende Abbildung 28 zeigt schematisch den Ansatz des Multiplexing für große Schnitte, ohne gleichzeitiges Mitlaufen von Negativkontrollen.

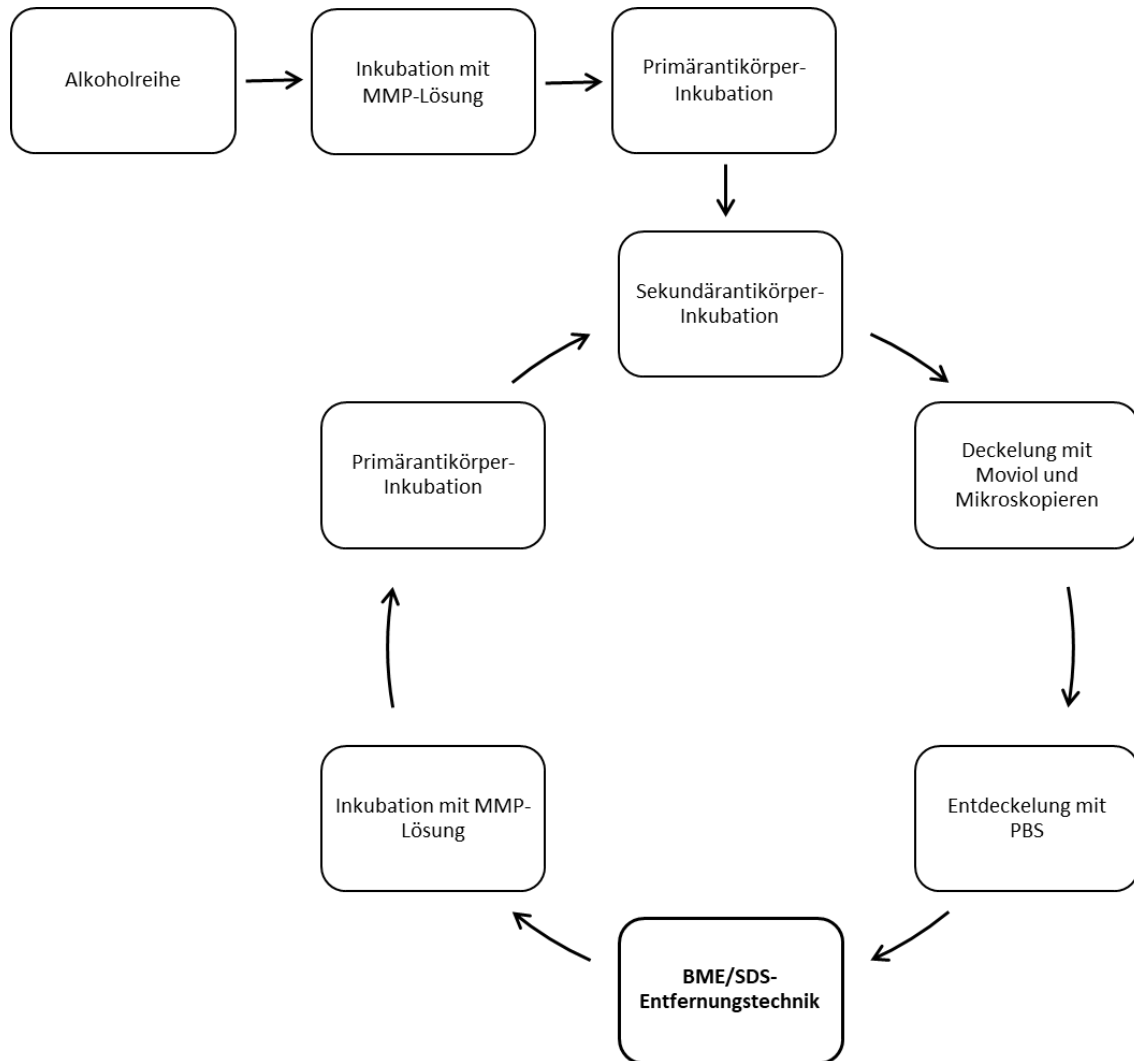


Abbildung 28: Schema Multiplexing Ansatz für große Schnitte

Dargestellt ist ein Schema für mehrere Färbezyklen eines Multiplexing Ansatzes an einem Schnitt einer großen Probe. Es wird keine Autofluoreszenz-Reduktion mit Sudanschwärz durchgeführt. Die mitlaufende Negativkontrolle für jede Färberunde wird ausgespart und sollte zur Qualitätskontrolle in einem separaten Ansatz ergänzend durchgeführt werden. Die etablierte Behandlung mit BME/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung ist dick hervorgehoben.

Aus den Versuchen zur Optimierung der Autofluoreszenz-Reduktion mit Sudanschwärz an großen Cryo-Schnitten mit RE ergab sich, dass eine verringerte Konzentration Sudanschwärz-Lösung und eine verkürzte Inkubationszeit die besten Ergebnisse erzielte. Allerdings zeigte sich ebenso, dass das Sudanschwärz besonders bei solchen Schnitten einen starken Einfluss auf die Intensität des gewünschten Fluoreszenz-Signals hatte. Dementsprechend wurden auch Ansätze ohne Sudanschwärz-Behandlung getestet, wobei sich herausstellte, dass für die Fluoreszenzkanäle 546 nm und

647 nm an den großen Schnitten nicht unbedingt eine Autofluoreszenz-Reduktion nötig war. Die stärkste Autofluoreszenz fand sich auf dem Fluoreszenzkanal 488 nm, weshalb dieser Kanal mit besonders signalstarken Markern besetzt wurde, um dennoch ein ausreichend klares Farbsignal erzielen zu können.

Die mitlaufenden Negativkontrollen zur Überprüfung der Effektivität der Antikörper-Entfernung wurden für die großen Schnitte aus dem Multiplexing Zyklus entfernt und in separaten Ansätzen durchgeführt, welche im Anhang zu finden sind (Abbildungen 37 bis 40). Damit sollten ein einfacherer Ablauf der Multiplexing Runden ermöglicht sowie Schnitte eingespart werden.

3.4.4 Multiplexing an einem Nasenlängsschnitt mit OE

Teile der Ergebnisse, welche in diesem Kapitel dargelegt werden, wurden bereits veröffentlicht (Klingenstein et al., 2026).

Das Multiplexing am OE wurde an mehreren Nasenlängsschnitten der Probe H80 durchgeführt. Als Antikörper-Entfernungsmethode kam die BME/SDS-Lösung zur Anwendung, während keine gesonderte Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion eingesetzt wurde (Verweis 2.3.10.3). Die Schnitte zeigten Anschnitte einer Nasenhälfte, inklusive Septum nasi sowie Conchae nasales superior et media.

Um das Vorliegen von OE nachzuweisen, wurden in jedem Ansatz in der ersten Färbung OMP und beta-Tubulin III gefärbt. Diese Region mit OE war auf allen betrachteten Schnitten am medialen Septum nasi lokalisiert.

In einem ersten Multiplexing Ansatz an H80 wurde neben OMP und beta-Tubulin III in der ersten Runde noch K5 gefärbt. Mit der anschließenden zweiten Runde erfolgte die Färbung von ANXA1, Keratin 14 (im Folgenden als K14 abgekürzt) und E-Cadherin, am selben Schnitt. Die dritte Runde des ersten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt mit OE bestand aus den Markern Neurogenin 1 (im Folgenden als NGN1 abgekürzt), Kiel-Antigen Nummer 67 (im Folgenden als Ki67 abgekürzt) und Collagen IV. Manche der Marker konnten zwar am OE nicht positiv nachgewiesen werden, zeigten aber an anderen Lokalisationen des Nasenlängsschnittes positive Signale.

Die folgende Abbildung 29 zeigt die Aufnahmen aller Kanäle aller drei Färbungen an dem gesamten Längsschnitt und eine HE-Färbung eines Schnitts derselben Probe.

Der Schnitt der HE-Färbung veranschaulicht die Morphologie der Probe H80 und dient zur Orientierung der vorliegenden anatomischen Strukturen. Es ist eine Nasenhälfte und das Septum nasi dargestellt sowie die stark ausgeprägte Concha nasalis media und die weniger stark ausgeprägte Concha nasalis superior (Abbildung 29 a).

Die Übersichtsbilder der Multiplexing Färbungen verdeutlichen, dass sich sowohl in Färbung (1) (Abbildung 29 b) als auch in Färbung (3) (Abbildung 29 d) positive Signale der neuronalen Marker beta-Tubulin III und NGN1 an, der in Richtung Cranium gerichteten Seite, der Lamina cribrosa finden ließen. Beide Antikörper, beta-Tubulin III und NGN1, wurden auf dem 488 nm Kanal gefärbt. In Färbung (2) (Abbildung 29 c) findet sich dieses positive Signal mit ANXA1 auf dem 488 nm Kanal nicht, weshalb von erfolgreichen Entfernungen der Antikörper zwischen den Färbungen auszugehen ist. An der beta-Tubulin III und NGN1 positiven Fläche des Craniums würde man die, durch die Lamina cribrosa tretenden, Filae olfactoria und den Bulbus olfactorius erwarten.

In der Übersicht zeigt sich ebenso deutlich das unterschiedliche Expressionsmuster der einzelnen Marker auf dem 647 nm Kanal. Bei Färbung (1) (Abbildung 29 b) ist klar das positive Signal von K5 am Epithel erkennbar, während in Färbung (3) (Abbildung 29 d) das positive Signal von Collagen IV in der Basalmembran und dem Bindegewebe lokalisiert ist. Hierdurch ist erneut die erfolgreiche Antikörper-Entfernung zwischen den einzelnen Färberunden zu vermuten.

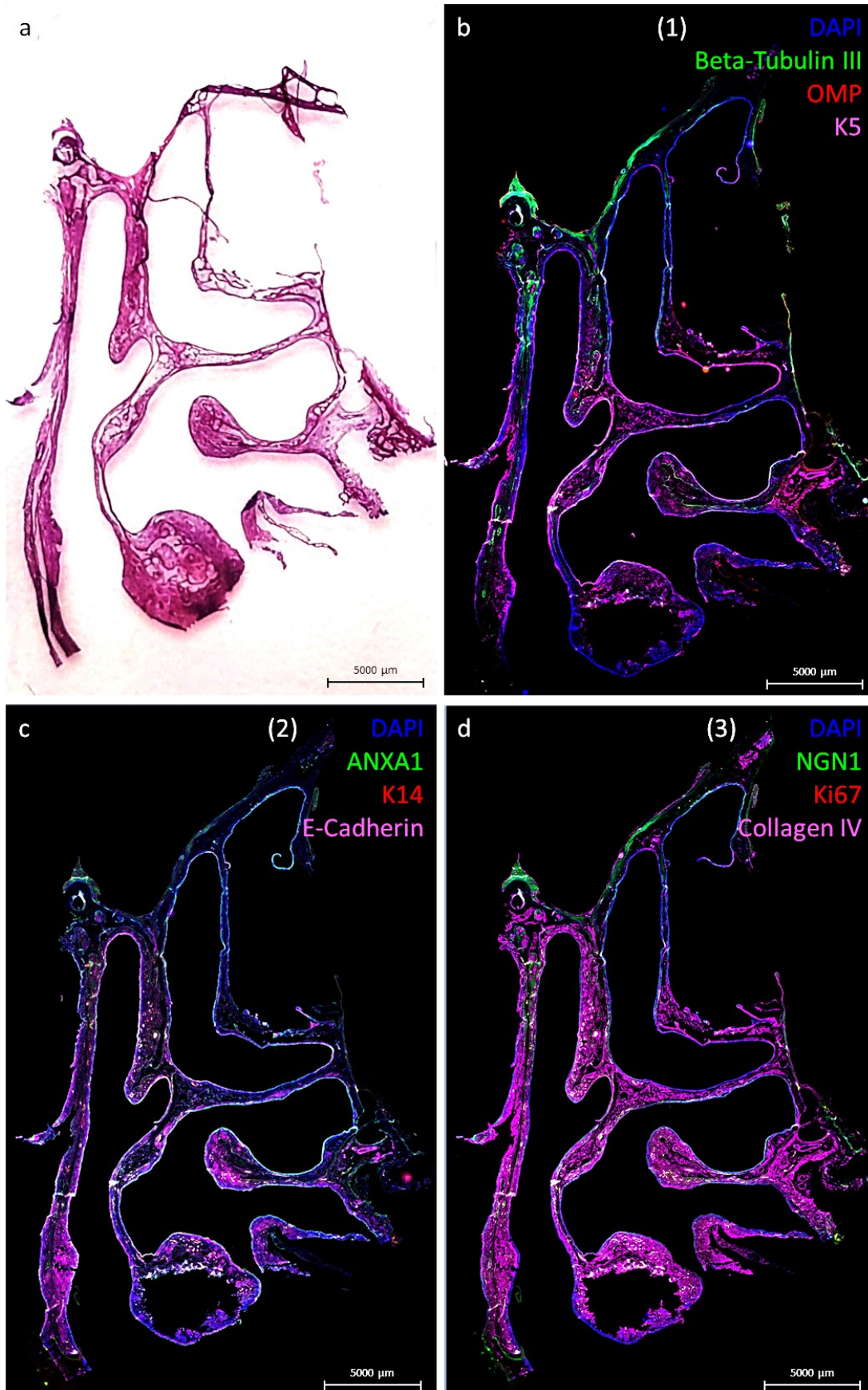


Abbildung 29: erster Multiplexing Ansatz an H80 gezeigt an einem Nasenlängsschnitt

Färbung Runde (1): Beta-Tubulin III Maus 488 nm (Grün) + OMP Ziege 546 nm (Rot) + K5 Kaninchen 647 nm (Magenta) + DAPI (Blau)

Färbung Runde (2): ANXA1 Kaninchen 488 nm (Grün) + K14 Maus 546 nm (Rot) + E-Cadherin Ziege 647 nm (Magenta) + DAPI (Blau)

Färbung Runde (3): NGN1 Maus 488 nm (Grün) + Ki67 Kaninchen 546 nm (Rot) + Collagen IV Ziege 647 nm (Magenta) + DAPI (Blau)

Dargestellt ist ein Nasenlängsschnitt von H80 mit einer HE-Färbung und den drei Färberunden des ersten Multiplexing Ansatzes am OE. In den Abbildungen [b] bis [d] finden sich je in der rechten oberen Ecke die dargestellten Marker, welche in der Farbe eingefärbt sind, in welcher sie in der Abbildung gezeigt sind. Die vor den Markern gezeigte Nummerierung verdeutlicht die entsprechende Färberunde.

[a] – [d] Maßstabsbalken 5000 µm

[a] Abgebildet ist eine HE-Färbung eines Schnittes von Präparat H80. Es zeigt sich ein Nasenlängsschnitt einer Nasenhaupthöhle, inklusive des Septum nasi, mit den Chonchae nasales superior et media sowie der Lamina cribrosa.

[b] Die Abbildung stellt alle Kanäle der ersten Färbung des ersten Multiplexing Ansatzes an H80 dar. Dargestellt ist ein Nasenlängsschnitt mit DAPI in Blau, beta-Tubulin III in Grün, OMP in Rot und K5 in Magenta. Das positive Signal von K5 ist vor allem am Epithel lokalisiert, wohingegen beta-Tubulin III an der kranialen Seite der Lamina cribrosa, in der Vertiefung, in welcher man den Bulbus olfactorius erwarten würde, zu finden ist.

[c] Dargestellt ist die zweite Färbung des ersten Multiplexing Ansatzes mit allen gefärbten Kanälen. Gezeigt sind DAPI in Blau, ANXA1 in Grün, K14 in Rot und E-Cadherin in Magenta.

[d] Die Aufnahme veranschaulicht die dritte Färbung des zweiten Multiplexing Ansatzes an H80. Es zeigt sich das Signal von DAPI in Blau, NGN1 in Grün, Ki67 in Rot und Collagen IV in Magenta. Das positive Signal von NGN1, findet sich, wie das positive Signal von beta-Tubulin III in der ersten Färbung, in der kranialen Vertiefung über der Lamina cribrosa. Das Signal von Collagen IV zeigt sich hingegen deutlich im Bindegewebe und an der Basalmembran.

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

Neben den großen Übersichtsaufnahmen des gesamten Nasenlängsschnitts zur Untersuchung der Expressionen der Marker an verschiedenen nasalen Strukturen wurden von den Färbungen des ersten Multiplexing Ansatzes an H80 auch Nahaufnahmen von einem Ausschnitt des OE gemacht (Abbildung 30).

Alle drei Marker der ersten Färbung des ersten Multiplexing Ansatzes an H80 stellten sich am OE positiv dar. OMP und beta-Tubulin III färbten intraepitheliale Zellen am OE, die ORN. K5 zeigte sich hingegen vor allem an den Basalzellen des OE (Abbildung 30).

ANXA1 aus der zweiten Färbung präsentierte sich mit einem positiven Signal im apikalen Anteil des OE und des RE, wohingegen E-Cadherin vor allem die Zell-Zell-Grenzen der Epithelien darstellte (Abbildung 30). K14 ließ kein Signal am Epithel erkennen und wurde somit als negativ gewertet.

In der dritten Runde zeigte sich nur Collagen IV positiv, und zwar an der Basalmembran (Abbildung 30). Die beiden anderen Marker, NGN1 und Ki67, stellten sich am Epithel negativ dar.

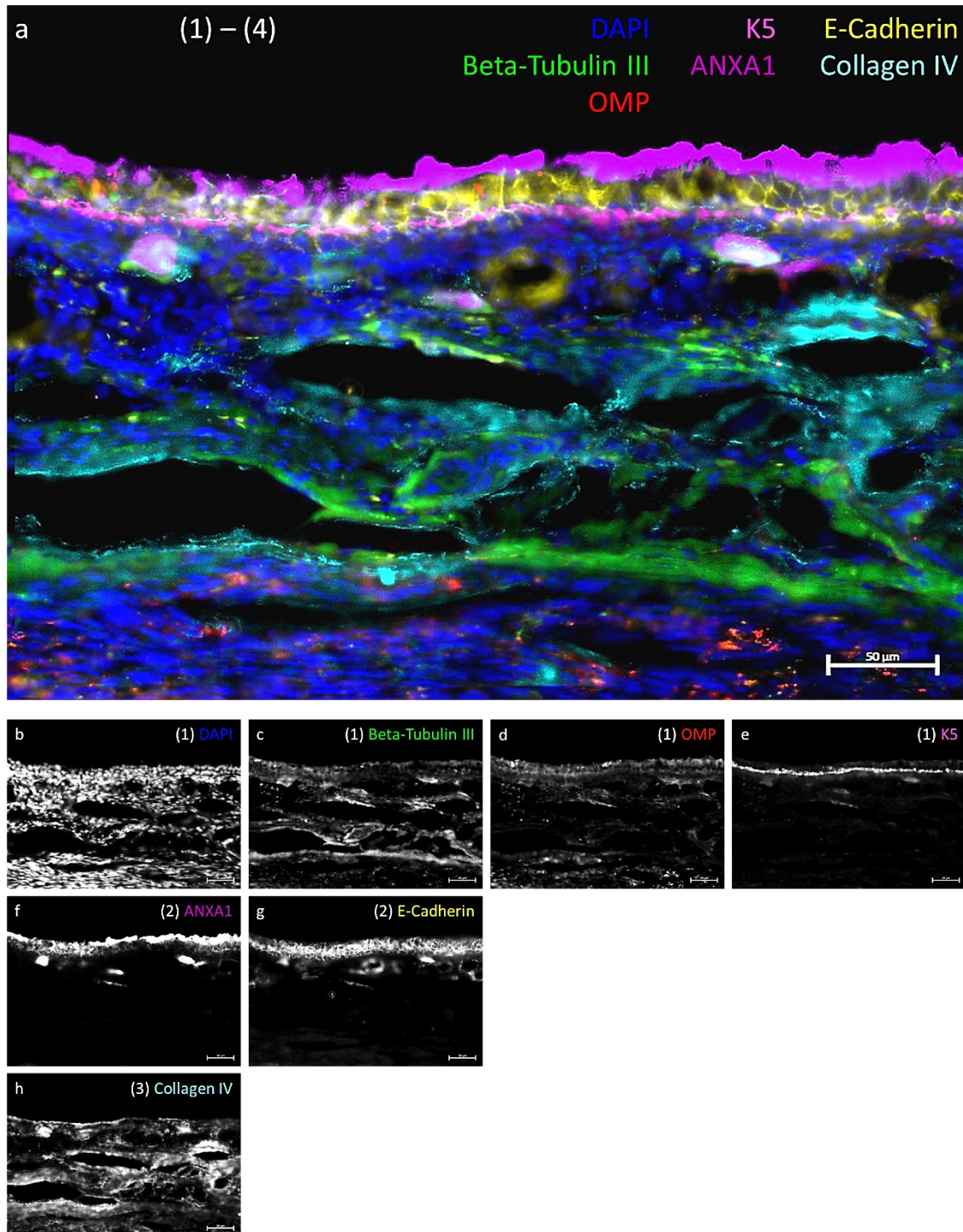


Abbildung 30: erster Multiplexing Ansatz an H80 gezeigt an einem Ausschnitt mit OE
 Färbung Runde (1): beta-Tubulin III Maus 488 nm (Grün) + OMP Ziege 546 nm (Rot) + K5 Kaninchen 647 nm (Magenta) + DAPI (Blau)
 Färbung Runde (2): ANXA1 Kaninchen 488 nm (Lila) + E-Cadherin Ziege 647 nm (Gelb)
 Färbung Runde (3): Collagen IV Ziege 647 nm (Türkis)

Dargestellt sind jeweils die positiven Signale der drei Färberunden des ersten Multiplexing Ansatzes an einem Ausschnitt von H80 mit OE. Jede Aufnahme zeigt denselben Ausschnitt desselben Schnitts in den verschiedenen Runden des Multiplexing. Die einzelnen Abbildungen zeigen je in der rechten oberen Ecke die dargestellten Marker, welche in der Farbe eingefärbt sind, in welcher sie in der großen Abbildung in [a] gezeigt sind. Die vor den Markern gezeigte Nummerierung steht für die entsprechende Färberunde.

[a] – [h] Maßstabsbalken 50 µm

[a] Die große Abbildung stellt alle positiven Signale der Marker aus dem ersten Multiplexing Ansatz am OE von Präparat H80 dar. Die verschiedenen Kanäle der exprimierten Marker sind zusammengeführt zu einer gemeinsamen Abbildung, welche mit Affinity Photo 2 erstellt wurde. Es zeigt sich DAPI in Blau, beta-Tubulin III in Grün, OMP in Rot, K5 in Magenta, ANXA1 in Lila, E-Cadherin in Gelb und Collagen IV in Türkis.

[b] – [e] Dargestellt sind alle Kanäle der ersten Färberunde des ersten Multiplexing Ansatzes am OE. **[b]** An den Kernen findet sich das positive Signal von DAPI. **[c] [d]** Beta-Tubulin III und OMP zeigen ein positives Expressionsmuster an den ORN. **[e]** K5 ist an den Basalzellen des Epithels dargestellt.

[f] – [g] Die positiven Signale der zweiten Färbung des ersten Multiplexing Ansatzes am OE von H80 sind veranschaulicht. **[f]** Es zeigt sich das positive Signal von ANXA1 am apikalen Zellpol des Epithels. Das Fluoreszenzsignal der Färbung ist in der Aufnahme sehr intensiv und überstrahlt in der Gesamtabbildung von [a] manche anderen Signale. **[g]** E-Cadherin findet sich deutlich an den Zellgrenzen der Epithelzellen.

[h] Abgebildet ist das positive Signal der Färberunde 3 des ersten Multiplexing Ansatzes am OE. Collagen IV zeigt hierbei ein Expressionsmuster an der Basalmembran des Epithels und im Bindegewebe.

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

Dieser erste Multiplexing Ansatz zeigte somit, dass drei Runden von Färbungen nacheinander auch an einem großen Schnitt, im Genaueren einem Nasenlängsschnitt, möglich waren.

Das Gewebe war noch gut erhalten und zeigte keine auffälligen Beschädigungen. Daraus ließ sich ableiten, dass, rein von der technisch-methodischen Seite aus betrachtet, noch mehr Färberunden möglich erschienen. Auch zeigten sich in jeder Runde jeweils andere spezifische Färbemuster, ohne dass es zu überlappenden Restsignalen von vorangegangenen Färbungen kam. Ebenso war die Autofluoreszenz nicht zu intensiv, sodass positive Signale noch differenziert werden konnten. Am stärksten zeigte sich die Autofluoreszenz auf dem Kanal 488 nm, weshalb hier vor allem ausgewählte signalstarke Marker verwendet werden sollten.

Der erste Multiplexing-Ansatz am OE konnte sechs von neun gefärbten Markern positiv nachweisen, wobei es in jeder Färberunde mindestens ein spezifisches positives Signal gab und diese alle unterschiedliche Expressionsmuster aufwiesen.

Es wurde ein zweiter Multiplexing Ansatz an einem Nasenlängsschnitt von H80 durchgeführt mit vier Färberunden.

Die erste Färbung erfolgte erneut mit beta-Tubulin III, OMP und K5 zum Nachweis des Vorliegens von OE (Abbildung 31).

In der zweiten Färbung konnte UEA1 (Agglutinin) positiv am Epithel nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei sowohl am OE als auch am RE ein positives Signal am apikalen Pol des Epithels und an einzelnen Zellen innerhalb der Epithelien. Hierbei konnte nicht eindeutig abgegrenzt oder definiert werden, um welche Zellen es sich bei den UEA1 positiv gefärbten handelte. Allerdings wiesen die Zellen keine Koexpression mit einem der anderen gefärbten Marker des Multiplexing Ansatzes auf, womit zumindest davon ausgegangen werden kann, dass es sich weder um die ORN noch um die Basalzellen handelte (Abbildung 31). Die anderen beiden Marker der zweiten Färbung, Keratin 15 (im Folgenden als K15 abgekürzt) und Annexin 2 (im Folgenden als ANXA2 abgekürzt) stellten sich negativ dar.

In Runde 3 wurde mit folgenden Markern gefärbt: Neuronales Zell-Adhäsionsmolekül (im Englischen als *cluster of differentiation 56 (neural cell adhesion molecule)* bezeichnet, deshalb im Folgenden als CD56 (NCAM) abgekürzt), geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2 (im Englischen als *sex determining region Y-box 2* bezeichnet, deshalb im Folgenden als SOX2 abgekürzt) und Doublecortin (im Folgenden als DCX abgekürzt). Keiner dieser drei gefärbten Marker aus Runde 3 des zweiten Multiplexing Ansatzes an H80 zeigte sich am Epithel positiv. Jedoch konnte CD56 (NCAM) als neuronaler Marker in einem Nerven innerhalb des Gewebes nachgewiesen werden, womit das technische und methodische Gelingen des Multiplexing gezeigt werden konnte (Abbildung 31 h).

Die vierte und letzte Färbung ergab, dass sowohl neuronale Differenzierung 1 (im Englischen als *neuronal differentiation 1*, im Folgenden als NeuroD1 abgekürzt) als auch saures Gliafaserprotein (im Englischen als *glial fibrillary acidic protein*, deshalb im Folgenden als GFAP abgekürzt) kein positives Signal am Epithel zeigten. Allerdings konnte das Signal von GFAP an der kranialen Seite der Lamina cribrosa nachgewiesen werden, wovon Aufnahmen im Anhang zu finden

sind (Abbildung 41). Der dritte Marker der vierten Runde, Annexin 5 (im Folgenden als ANXA5 abgekürzt), stellte sich jedoch als positiv heraus (Abbildung 31). Am OE und am RE zeigte ANXA5 ein Expressionsmuster apikal an den Zellen, wobei sich dieses zwischen den beiden Epithelarten in seiner Ausprägung deutlich unterschied. Am OE zeigte sich das apikale Signal von ANXA5 eher dünn und nur stellenweise ausgeprägt, wohingegen es sich am RE als durchgängiges, breiteres positives Signal zeigte. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster ließ eine klare Differenzierung in die beiden Epithelien zu. Es zeigten sich unterschiedliche Epithelabschnitte, welche als OE oder RE abgegrenzt werden konnten, durch das veränderte apikale ANXA5 Signal (Abbildung 31 j).

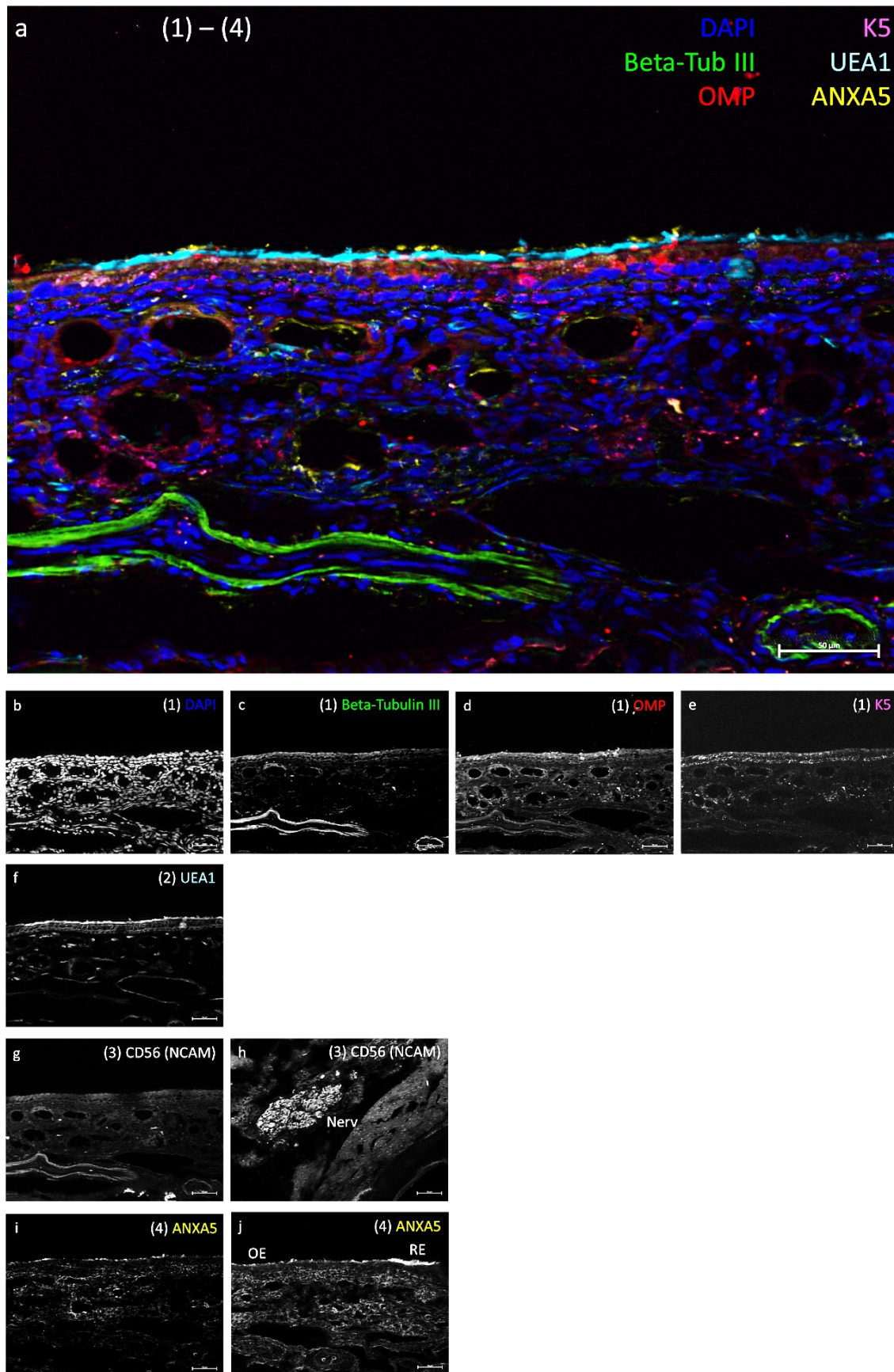


Abbildung 31: zweiter Multiplexing Ansatz an H80, gezeigt an einem Ausschnitt mit OE

Färbung Runde (1): Beta-Tubulin III Maus 488 nm (Grün) + OMP Ziege 546 nm (Rot) + K5 Kaninchen 647 nm (Magenta) + DAPI (Blau)

Färbung Runde (2): UEA1 Ziege 647 nm (Türkis)

Färbung Runde (3): CD56 (NCAM) Maus 488 nm

Färbung Runde (4): ANXA5 Kaninchen 488 nm (Gelb)

Dargestellt ist der zweite Multiplexing Ansatz nach dem Protokoll Multiplexing für große Schnitte, an einem Schnitt von H80. Betrachtet wird in [a] bis [g] und in [i] immer derselbe Ausschnitt der Probe mit OE. In jeder einzelnen Abbildung finden sich in der rechten oberen Ecke, vor der Bezeichnung der jeweils dargestellten Marker, Nummerierungen. Diese stehen für die jeweilige Färberunde, in der die dargestellten Aufnahmen angefertigt wurden. Die positiven Marker sind in der Beschriftung jeweils in der Farbe eingefärbt, in welcher sie in dem zusammengeführten Gesamtbild unter [a] dargestellt sind.

[a] – [j] Maßstabsbalken 50 µm

[a] Die große Abbildung oben zeigt alle positiven Marker am OE der einzelnen Färbungen des zweiten Multiplexing Ansatzes an H80 an einem Ausschnitt der Probe. Die zusammengeführte Abbildung der Kanäle wurde mit Affinity Photo 2 erstellt. Es zeigen sich DAPI in Blau, beta-Tubulin III in Grün, OMP in Rot, K5 in Magenta, UEA1 (Agglutinin) in Türkis und ANXA5 in Gelb.

[b] – [e] Die vier unterschiedlichen Kanäle der ersten Färbung des zweiten Multiplexing Ansatzes an H80 sind dargestellt. Es zeigen sich je die positiven Signale der Färbung am OE in Weiß. [b] DAPI zeigt sich als Kernfärbung. [c] [d] Beta-Tubulin III und OMP sind an den ORN exprimiert.

[e] K5 stellt sich an den Basalzellen des Epithels dar.

[f] Es ist das positive Signal des Markers UEA1 (Agglutinin) aus der zweiten Färberunde am OE dargestellt, in Weiß. Dieses Signal zeigt sich apikal am Epithel und an intraepithelialen Zellen.

[g] – [h] Beide Aufnahmen zeigen das Signal von CD56 (NCAM) aus der dritten Färbung, je in Weiß. [g] Die Abbildung stellt die Aufnahme des betrachteten Ausschnitts des OE dar. In dieser ist das CD56 (NCAM)-Signal am Epithel negativ. [h] Es zeigt sich hingegen das positive Signal von CD56 (NCAM) an einem Nerv desselben Schnitts derselben Färbung. Damit wird das methodische Gelingen des Multiplexing Ansatzes nachgewiesen. Die Aufnahme von CD56 (NCAM) am OE wurde in dem Gesamtbild unter [a] nicht berücksichtigt, weshalb die Beschriftungen in Weiß gehalten sind.

[i] – [j] Die Aufnahmen zeigen jeweils die positiven Signale des Markers ANXA5 im Rahmen der vierten Färberunde des Ansatzes. [i] Die Abbildung stellt das apikale Expressionsmuster von ANXA5 am betrachteten Ausschnitt des OE dar. [j] Die Aufnahme veranschaulicht den Übergang von dem Abschnitt mit OE zu RE, anhand der deutlichen Änderung des Expressionsmusters von ANXA5 am apikalen Zellpol.

Der zweite Multiplexing Ansatz an einem Nasenlängsschnitt mit OE der Probe H80 ergab somit, dass auch vier Färberunden im Rahmen dieser Multiplexing Methode möglich waren.

Das Gewebe zeigte sich auch nach der vierten Färbung noch weitestgehend intakt und nicht auffällig beschädigt. Ebenso bestätigte sich, dass sich bei diesem Multiplexing Ansatz die Autofluoreszenz an dem Schnitt von H80 in Grenzen hielt und nicht unbedingt einer zusätzlichen Reduktion bedurfte. Es gab auch keine deutlich überlappenden Restsignale aus vorangegangenen Färbungen. Allerdings konnte beobachtet werden, dass in der vierten Färberunde an manchen Stellen des Epithels ein schwaches Restsignal des UEA1 (Agglutinin) auf dem 647 nm Fluoreszenzkanal zu erkennen war. Somit funktionierte die

Antikörper-Entfernung zwar größtenteils effizient, war aber für Marker auf dem 647 nm markierten Fluoreszenz-Kanal am wenigsten zuverlässig.

Insgesamt konnten im zweiten Multiplexing Ansatz fünf von zwölf Markern am OE eines Nasenlängsschnitts positiv nachgewiesen werden.

Die untenstehende Tabelle 15 fasst alle gefärbten Marker aus den zwei Multiplexing Ansätzen an Nasenlängsschnitten der Probe H80 noch einmal zusammen. Es ist aufgeführt, welche Antikörper von welcher Spezies in welcher Verdünnung verwendet wurden. Außerdem ist dargestellt, ob der Marker am OE ein negatives oder positives Signal zeigte. Im Falle eines positiven Signales ist zudem eine kurze Ausführung des Expressionsmusters und damit der Lokalisation des Signals ergänzt.

Tabelle 15: Ergebnisse der gefärbten Marker am OE in Multiplexing Ansätzen an Nasenlängsschnitten von H80

(+ = positives Signal, - = negatives Signal)

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

Verwendeter Marker	Spezies	Färbung an Nasenlängsschnitt		Färbung am OE	
		Signal	Lokalisation	Signal	Lokalisation
Beta-Tubulin III	Maus	+	OE	+	ORN
OMP	Ziege	+	OE	+	ORN
K5	Kaninchen	+	Basalzellen	+	Basalzellen
ANXA 1	Kaninchen	+	Zilien von OE und RE	+	Apikale Zilien
K14	Maus	-		-	
E-Cadherin	Ziege	+	Epitheliale Zellgrenzen	+	Epitheliale Zellgrenzen
NGN1	Maus	-		-	
Ki67	Kaninchen	-		-	
Collagen IV	Ziege	+	Basalmembran	+	Basalmembran
ANXA 2	Kaninchen	-		-	
K15	Maus	-		-	
UEA1 (Agglutinin)	Ziege	+	Apikaler Epithelpol, intraepitheliale Zellen in OE und RE	+	Apikaler Epithelpol, intraepitheliale Zellen
CD56 (NCAM)	Maus	+	Nerv	-	
SOX2	Kaninchen	-		-	
DCX	Ziege	-		-	
ANXA5	Kaninchen	+	Zilien von OE und RE, Expression unterschiedlich	+	Apikale Zilien (unterschiedliche Expression zu RE)
NeuroD1	Maus	-		-	
GFAP	Hühnchen	+	kraniale Seite von Lamina cribrosa, intrakranielle Gliazellen	-	

3.4.5 Zusammenfassung – Multiplexing Ansätze

- Die Autofluoreszenz-Reduktion mit Sudanschwarz und die Antikörper-Entfernung mit einer BME/SDS-Lösung wurden zu einem Multiplexing Ansatz zusammengeführt.
- Die Schwierigkeit des Nachlassens des Fluoreszenz-Signals mit zunehmenden Färberunden konnte durch Variation der Sudanschwarz-Behandlungen behoben werden. Die Behandlung wurde mit den zunehmenden Färberunden immer mehr reduziert.
- An kleinen Schnitten mit RE konnten erfolgreich bis zu fünf Färberunden hintereinander an einem Schnitt gezeigt werden.
- Für große Schnitte eines Nasenlängsschnitts musste der Multiplexing Ansatz optimiert und angepasst werden. Hierfür wurde die Sudanschwarz-Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion weggelassen, da das Fluoreszenz-Signal auch ohne diese deutlich und klar genug war.
- Es wurden zwei finale Multiplexing Ansätze an Nasenlängsschnitten mit OE durchgeführt. Insgesamt wurde dabei die Expression von 18 verschiedenen Markern untersucht: 10 waren positiv und davon wiederum 8 positiv am OE. OMP und beta-Tubulin III konnten an den ORN dargestellt werden. K5 zeigte eine Expression in den Basalzellen des OE. ANXA1 war in den apikalen Zilien des OE exprimiert. E-Cadherin stellte die epithelialen Zellgrenzen dar. Mit Collagen IV konnte die Basalmembran veranschaulicht werden. UEA1 war apikal am Epithel und in intraepithelialen Zellen des RE und des OE exprimiert. Der Marker CD56 (NCAM) zeigte zwar ein negatives Signal am OE, konnte jedoch in Nervengewebe des Bindegewebes positiv dargestellt werden. ANXA5 war, ebenso wie ANXA1, in den apikalen Zilien von RE und OE exprimiert. Es zeigte sich hierbei allerdings ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen den beiden Epithelarten. Am OE war das apikale Signal von ANXA5 deutlich schmaler und etwas schwächer als am RE. GFAP konnte am OE zwar nicht nachgewiesen werden, zeigte aber eine klare Expression an der kranial gelegenen Seite der Lamina cribrosa, wo die Fila olfactoria und der Bulbus olfactorius zu erwarten wären.

4 Diskussion

4.1 Autofluoreszenz

4.1.1 Autofluoreszenz in Abgrenzung zu unspezifischer Bindung am RE

Bei vorhandenem unspezifischem Hintergrund-Signal in einer Immunfluoreszenz-Färbung muss zunächst zwischen dem Begriff der Autofluoreszenz und dem Phänomen der unspezifischen Färbung unterschieden werden (Baschong et al., 2001).

Antikörper besitzen an ihrer Antigen-Bindungsstelle dreidimensionale chemische Strukturen, welche am stärksten an ein spezifisches Antigen binden können (Ma and O'Kennedy, 2015). Es kann allerdings auch zu fälschlichen, weniger starken und unspezifischen Bindungen eines Antikörpers an ein ähnliches Antigen kommen. Dadurch kann ein positives Signal in der Immunfluoreszenz-Färbung imitiert werden, was als unspezifische Färbung bezeichnet wird (Ehlers et al., 2022). Die Autofluoreszenz zeigt sich in immunhistochemischen Färbungen hingegen auch ohne Antikörperbindungen bereits aufgrund der endogenen Fluorophore.

Der Unterschied zwischen reiner Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung zeigt sich also vor allem am Vorkommen der Autofluoreszenz auch ohne Anwendung jeglicher Antikörper. In der vorgestellten Arbeit wurde an den Gewebeproben der postmortalen Nasenpräparate eine starke Autofluoreszenz gezeigt, die zu Beginn reduziert werden sollte. Bei Aufnahmen von Schnitten, welche weder mit Primär- noch mit Sekundärantikörpern inkubiert wurden, zeigte sich ein sehr starkes Farbsignal im Hintergrund, was auf eine Autofluoreszenz zurückzuführen ist und nicht auf unspezifische Bindungen. Auch unter vergleichbaren Belichtungszeiten stellte sich das Hintergrund-Signal in den Negativkontrollen ohne Antikörper ähnlich stark dar wie in den positiven Immunfluoreszenz-Färbungen (Abbildung 32).

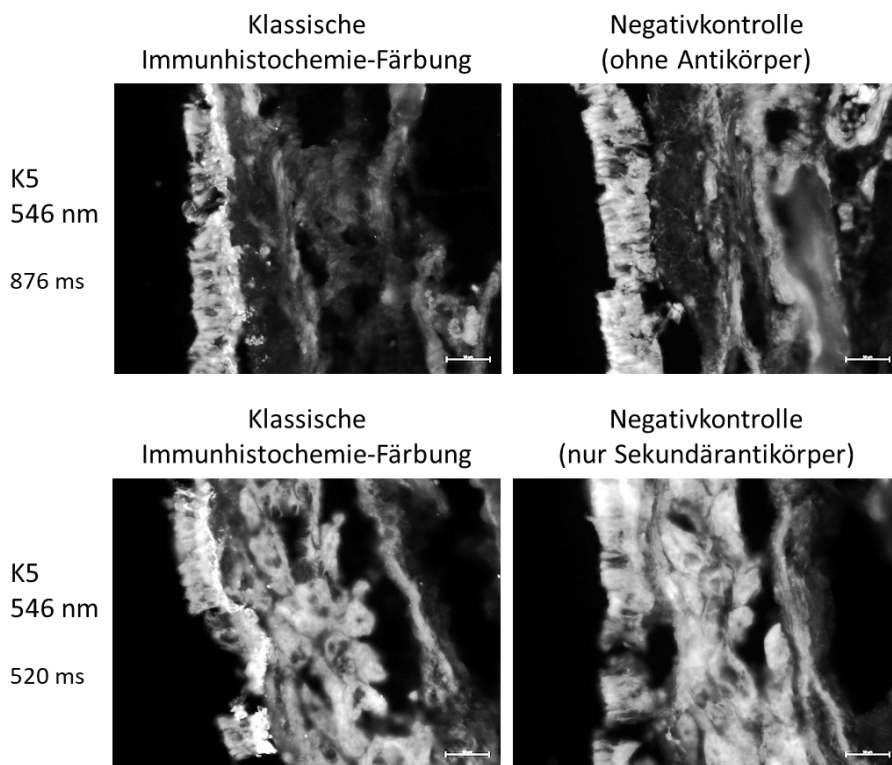


Abbildung 32: Abgrenzung zwischen Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörper-Bindung am RE

Dargestellt ist die Autofluoreszenz an Schnitten von H88 mit RE. Die beiden Zeilen zeigen je im linken Bild eine Färbung mit K5 auf dem 546 nm Kanal und rechts einen Schnitt der gleichen Probe als Negativkontrolle. In beiden Zeilen wurde je die gleiche, links angegebene Belichtungszeit zur Aufnahme verwendet. Die Negativkontrolle der unteren Zeile wurde dabei nur mit Sekundärantikörpern inkubiert und zeigt somit ein Hintergrund-Signal, das durch unspezifische Bindungen entstanden sein könnte. Die Negativkontrolle der oberen Zeile wurde nicht mit Antikörpern inkubiert und veranschaulicht damit die reine Autofluoreszenz des Gewebes. Diese präsentiert sich hier als ähnlich starkes Hintergrund-Signal.

Maßstabsbalken 50 μm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

In der vorliegenden Arbeit wurden 488 nm, 546 nm, und 647 nm Fluoreszenz markierte Antikörper verwendet. Diese Angaben beziehen sich jeweils auf die ungefähre Wellenlänge des durch das Fluoreszenzmikroskop eingestrahlt und von der Probe absorbierte Licht. Die Fluorophore der Sekundärantikörper weisen allerdings für ihr Absorptions- sowie für ihr Emissionsmaximum unterschiedliche Wellenlängen auf; diese Maxima sind für die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Antikörper in Tabelle 1 (Verweis 1.2.2) aufgeführt.

Bei den verwendeten 488 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörpern liegt das Emissionsmaximum laut Hersteller bei 519 nm. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Autofluoreszenz sind Moleküle, die vermehrt auch im nasalem

Gewebe vorkommen und über eine ähnliche Emission verfügen. Flavine weisen ein Emissionsmaximum bei ungefähr 520 nm auf (Monici, 2005). Es wäre somit möglich, dass die starke Autofluoreszenz auf dem 488 nm Fluoreszenzkanal, welche beobachtet werden konnte, unter anderem durch das Vorliegen von Flavinen in dem Gewebe zu erklären ist. Flavine sind als Anteil des Elektronenüberträgers Flavin-Adenin-Dinucleotid (im Folgenden als FAD abgekürzt) wichtiger Bestandteil in der Atmungskette der Mitochondrien. Hiervon finden sich viele in den Flimmerzellen des RE, da die apikalen Kinozilien des RE Adenosintriphosphat (ATP) abhängig aktiv beweglich sind.

Auf dem 546 nm Fluoreszenzkanal ließ sich bei den Schnitten des RE allerdings auch Autofluoreszenz nachweisen. Die entsprechenden exogenen 546 nm Fluorophore an den Antikörpern weisen laut Hersteller ein Emissionsmaximum von 573 nm auf. Lipofuszin könnte sowohl auf dem 488 nm als auch auf dem 546 nm Fluoreszenz-Kanal Autofluoreszenz generieren, da dieses ein Emissionsspektrum zwischen 450 nm und 600 nm hat, mit einem Emissionsmaximum bei etwa 600 nm (Monici, 2005). Lipofuszin kann sich unter anderem in alternden Zellen mit der Zeit ansammeln (Di Guardo, 2015). Alle Körperspender der vorliegenden Präparate hatten zum Zeitpunkt des Todes mindestens das 68. Lebensjahr erreicht. Das Vorliegen altersbedingter Zellveränderungen ist somit naheliegend und würde die Autofluoreszenz auf diesen Wellenlängen begünstigen.

4.1.2 Autofluoreszenz an neuronalem Gewebe

4.1.2.1 Autofluoreszenz am Bulbus olfactorius

Im Rahmen von Immunhistochemie-Färbungen an Cryo-Schnitten des Bulbus olfactorius stellte sich die Autofluoreszenz bei einer Färbung des neuronalen Markers beta-Tubulin III auf dem 488 nm Fluoreszenzkanal am stärksten dar. Wie im vorangegangenen Absatz bereits beschrieben, liegt das Emissionsmaximum der 488 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper laut Hersteller bei etwa 519 nm. Dieses befindet sich somit im Emissionsspektrum von Lipofuszin, welches als Produkt der Zellalterung mit zunehmendem Lebensalter unter anderem vermehrt in Nervenzellen vorkommt (Moreno-García

et al., 2018, Monici, 2005). Da zur Färbung des Bulbus olfactorius Proben des Präparates H82 verwendet wurden, welches von einem verstorbenen Körperspender im Alter von 80 Jahren stammte, ist das Vorliegen von altersbedingtem Lipofuszin in der Probe wahrscheinlich. Speziell im Bulbus olfactorius konnte Lipofuszin außerdem bereits bei Proben von jungen Mäusen nachgewiesen werden. Diese Ablagerungen fanden sich hierbei insbesondere in den Mikroglia der Nervenzellschicht und der Glomerularschicht, wobei davon ausgegangen wird, dass sich das Lipofuszin dort als Abbaurest, der sich ständig erneuernden ORN des OE schon frühzeitig beginnt anzusammeln (Kosaka et al., 2009).

Das Vorkommen von Flavinen, mit ihrem Emissionsmaximum bei etwa 520 nm, könnte ebenfalls einen Beitrag zur Autofluoreszenz auf dem 488 nm Fluoreszenzkanal im Bulbus olfactorius leisten (Monici, 2005). Elektronenüberträger, wie FAD, sind für die Funktion von Neuronen, wie sie auch im Bulbus olfactorius vorliegen, unabdingbar. Dort finden einige Energie abhängige Prozesse statt, wie der aktive Transport von Ionen über die Zellmembran, um eine Membranspannung erzeugen zu können. In Ratten konnte an frischen neuronalen Proben des Cortex, des Hippocampus und des Nucleus olivaris superior eine enorme Reduktion der durch Elektronenüberträger (wie unter anderem FAD) bedingten Autofluoreszenz durch eine Blockierung der Atmungskette erzielt werden (Brosel et al., 2018). Diese Ergebnisse legen nahe, dass FAD bei der Entstehung der Autofluoreszenz auch an anderen neuronalen Strukturen wie dem Bulbus olfactorius einen großen Einfluss haben könnte.

4.1.2.2 Autofluoreszenz am OE

Bei Färbungen an Nasenlängsschnitten mit OE zeigte sich interessanterweise eine weniger starke Autofluoreszenz als am RE und am Bulbus olfactorius. Das Präparat H80, an welchem das OE untersucht wurde, stammte von einem 85 Jahre alten Körperspender. Somit wäre anzunehmen, dass sich in den Zellen der Probe bereits größere Lipofuszin-Ablagerungen gesammelt hätten, welche eine Autofluoreszenz begünstigen könnten. Allerdings gibt es in der Literatur Anhaltspunkte, dass die Menge angesammelter Lipofuszin-Granula neben dem absoluten Alter auch mit anderen Faktoren in Zusammenhang stehen könnte,

beispielsweise mit dem Vorliegen einer neurodegenerativen Erkrankung wie Morbus Parkinson oder einer Alzheimer-Demenz (Moreno-García et al., 2018). Denkbar wäre demnach, dass es Unterschiede im klinischen Bild des Körperspenders von H80 zu den anderen Körperspendern gab. Zur Krankengeschichte der Körperspender lagen aber keine Informationen vor, weshalb sich diese Theorie nicht überprüfen lässt.

Der methodische Unterschied zu allen anderen verwendeten Proben und Cryo-Schnitten lag bei H80 zudem vor allem darin, dass die Cryo-Schnitte nach ihrer Anfertigung ungefähr ein Jahr lang im Kühlschrank zwischengelagert worden waren, bevor die vorliegenden Versuche damit durchgeführt wurden. Eine mögliche Ursache für die schwächere Autofluoreszenz an den Schnitten von H80 mit OE könnte demzufolge ebenso in der Verarbeitung der Schnitte und ihrem nicht mehr frischen Zustand liegen.

Das Vorhandensein von Autofluoreszenz kann von Gewebe zu Gewebe und von Probe zu Probe variieren. Sie ist abhängig von der Art und der Menge der enthaltenen endogenen Fluorophore. Autofluoreszenz kann damit zwar spezifische Immunfluoreszenz-Färbungen erschweren, bietet aber auch einen möglichen Ansatz zur pathophysiologischen Diagnostik von Gewebeproben, wenn beispielsweise das Vorkommen des endogenen Fluorophors untersucht werden soll (Monici, 2005). Die Stärke und die Wellenlänge der Autofluoreszenz ist demnach vermutlich auch abhängig von der molekularen Zusammensetzung des betrachteten Gewebes und kann sich krankheitsbedingt verändern.

4.1.3 Zusammenfassung Autofluoreszenz

- Ursache für Autofluoreszenz können FAD, Lipofuszin oder andere Moleküle sein.
- Die Autofluoreszenz war in den analysierten Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt. Am schwächsten stellte sie sich an der Probe H80 dar.
- Eine Ursache für veränderte oder unterschiedlich starke Autofluoreszenz können pathologische Vorgänge und molekulare Veränderungen der Zellen in diesem Zusammenhang sein.

4.2 Autofluoreszenz-Reduktion

4.2.1 Verschiedene Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion am RE

Die Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion an kleinen Schnitten mit RE.

Tabelle 16: Übersicht der Ergebnisse der Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion

Die Ergebnisse der Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion sind zusammengefasst. Gezeigt sind die einzelnen Protokolle, welche in den jeweiligen Ansätzen gegeneinander getestet wurden, mit einer kurzen Auflistung der relevanten Unterschiede zwischen den Methoden. Unter jedem Protokoll, außer unter dem finalen optimierten Ansatz Sherry Lab 4, finden sich je die Gründe für das Ablehnen und die Überarbeitung des jeweiligen Protokolls.

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

Erster Ansatz	Zweiter Ansatz	Optimierter Ansatz
Sherry Lab 1 0,3 % Sudanschwarz, 10 min Inkubation - Waschen in PBS - Nach Primär- und Sekundärantikörper-Inkubation → undeutliches Farbsignal	Sherry Lab 2 0,3 % Sudanschwarz, 10 min Inkubation - Waschen in PBS - Nach der Primär-, vor der Sekundärantikörper-Inkubation → Farbsignale reduziert	Sherry Lab 4 0,3 % Sudanschwarz, 3 – 5 min Inkubation - Kurz Eintauchen in 70 % Ethanol, Waschen in PBS - Entfernen von Sudanschwarz-Partikeln mit Präzisionswischtuch - Vor der Sekundärantikörper-Inkubation
Multiplexing 1 0,3 % Sudanschwarz, 35 min Inkubation - Waschen in 70 % Ethanol - Nach Primär- und Sekundärantikörper-Inkubation → undeutliches Farbsignal → Gewebeschädigung	Multiplexing 2 0,3 % Sudanschwarz, 35 min Inkubation - Waschen in 70 % Ethanol - Nach der Primär-, vor der Sekundärantikörper-Inkubation → Gewebeschädigung	
Wasserstoffperoxid 3 % Wasserstoffperoxid und 80 % Methanol 10 min Behandlung - Vor der Färbung → zu wenig Autofluoreszenz-Reduktion		

Wasserstoffperoxid + Sherry Lab (Sudanschwarz) 1 → zu starke Autofluoreszenz-Reduktion		
Wasserstoffperoxid + Multiplexing (Sudanschwarz) 1 → zu starke Autofluoreszenz-Reduktion		

Die Behandlung der Schnitte mit einer Lösung mit 3 % Wasserstoffperoxid und 80 % Methanol zeigte bei den Versuchen zur Autofluoreszenz-Reduktion die schlechtesten Ergebnisse. Im Vergleich zur klassischen Immunhistochemie-Färbung zeigte sich fast kein Unterschied in der Intensität der Autofluoreszenz (Tabelle 16). Wasserstoffperoxid-Behandlung wird beispielsweise bei Peroxidase abhängigen Färbemethoden auf Schnitte angewendet, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren, da Peroxidasen Wasserstoffperoxid abhängige Redoxreaktionen katalysieren (Felsenthal and Zelzer, 2021, Ehrenberg et al., 2020, O'Brien, 2000). Außerdem können endogene Peroxidasen die Ursache von Hintergrund-Autofluoreszenz sein, besonders in Geweben, die reich an endogenen Peroxidasen sind, wie unter anderem Leukozyten, Erythrozyten, exokrine Milch-, Speichel- und Tränendrüsen sowie Skelettmuskelzellen (Felsenthal and Zelzer, 2021, O'Brien, 2000). Die betrachteten Epithelien der verwendeten nasalen Proben enthielten demnach wenig Peroxidase reiches Gewebe, womit sich die geringe Reduktion der Autofluoreszenz durch Wasserstoffperoxid erklären lässt. Die Autofluoreszenz durch endogene Peroxidasen war an den vorliegenden Proben somit weniger relevant.

Die besten Ergebnisse zur Autofluoreszenz-Reduktion zeigten sich mit der Inkubation einiger Tropfen Sudanschwarz-Lösung für 3 bis 5 min, mit anschließendem kurzem Waschen in 70 % Ethanol und viermal 2 min Waschen in PBS (Tabelle 16) (Klingenstein et al., 2026). In der vorliegenden Arbeit wurde eine 0,3 % Sudanschwarz-Lösung mit 70 % Ethanol angesetzt und in

verschiedenen Protokollen getestet, wobei sich die deutliche dunkle Verfärbung der Gewebeschnitte beobachten ließ.

In der optimierten Anwendung des Sudanschwarz-Protokolls wurden einzelne größere Sudanschwarz-Partikel mit einem Präzisionswischtuch vorsichtig vor dem Fortführen des Protokolls entfernt (Tabelle 16). Aufgrund der Dunkelfärbung und den sichtbaren Sudanschwarz-Partikeln auf den Schnitten kann die Vermutung gestützt werden, dass es durch das Sudanschwarz zu einer Bedeckung des Gewebes, ohne chemische Veränderungen auf der Molekülebene, kommt (Schnell et al., 1999, Sun et al., 2011, Baschong et al., 2001). Damit können einfallende Lichtstrahlen des Fluoreszenzmikroskops nicht mehr von endogenen Fluorophoren emittiert werden.

Es ist ebenso bekannt, dass Sudanschwarz spezifisch an Lipofuszin bindet (Evangelou and Gorgoulis, 2017). Dies eröffnet die Möglichkeiten, einerseits Lipofuszin anzufärben oder Lipofuszin zur Reduktion der Autofluoreszenz gezielt zu blocken (Evangelou and Gorgoulis, 2017). Insbesondere in gealterten Zellen finden sich vermehrt Lipofuszin Ablagerungen, welche sich hauptsächlich intrazellulär in den Lysosomen ansammeln (Evangelou and Gorgoulis, 2017). Die Körperspender, der zur Verfügung gestellten Proben, waren zu ihrem Todeszeitpunkt alle bereits mindestens 68 Jahre alt. Das Vorliegen von vielen Lipofuszin-Granula aufgrund des Zellalters ist eine Erklärung für die erfolgreiche Autofluoreszenz-Reduktion durch Sudanschwarz in den Test-Ansätzen.

Diese Reduktion konnte besonders auf den Fluoreszenzkanälen 488 nm und 546 nm nachgewiesen werden, wobei es auf ersterem zur subjektiv stärksten Reduktion kam. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Romijn et al., 1999). Interessanterweise konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass die Sudanschwarz-Behandlung der Schnitte vor der Inkubation der Sekundärantikörper bessere Ergebnisse zeigte als am Ende des Immunfluoreszenz-Protokolls. In der Literatur geht hingegen aus mehreren Quellen hervor, dass die Sudanschwarz-Behandlung nach der Inkubation von Primär- und Sekundärantikörpern gute Ergebnisse zur Autofluoreszenz-Reduktion zeige (Romijn et al., 1999, Schnell et al., 1999). Die möglichen Ursachen für diese Differenzen könnten in unterschiedlichen Sudanschwarz-

Lösungen, unterschiedlichen Protokollen oder unterschiedlichen Proben liegen: In manchen Arbeiten wurde die Sudanschwarz-Lösung in 70 % Methanol angesetzt (Schnell et al., 1999), während in anderen Hypothalamus-Schnitte und damit andere Gewebetypen (Romijn et al., 1999) oder Proben von anderen Spezies wie Affen (Schnell et al., 1999), verwendet wurden. Es finden sich außerdem unterstützende Ergebnisse in der Literatur, wonach durch eine Anwendung von Sudanschwarz vor der Immunfluoreszenz-Färbung keine Verschlechterung der Fluoreszenz-Signale beobachtet werden konnte (Erben et al., 2016).

4.2.2 Autofluoreszenz-Reduktion an neuronalen Strukturen

In neuronalen Strukturen wie dem Bulbus olfactorius lässt sich Lipofuszin ebenfalls mit Sudanschwarz blockieren, womit eine Reduktion der Autofluoreszenz erzielt werden kann (Kosaka et al., 2009). Insbesondere wenn eine neurodegenerative Erkrankung bei dem Spender oder Probanden, der zu untersuchenden Probe, bekannt ist, könnten Lipofuszin-Ablagerungen einen größeren Beitrag an der Autofluoreszenz haben, da es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Lipofuszin-Ansammlungen in Neuronen und Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder einer Alzheimer-Demenz gibt (Moreno-García et al., 2018).

Die an Schnitten mit RE optimierte Anwendung von Sudanschwarz wurde deshalb auch an Proben mit Anschnitten des Bulbus olfactorius getestet, womit eine deutliche Reduktion der Autofluoreszenz besonders auf dem 488 nm Fluoreszenzkanal möglich war. Vergleichbar zu den Versuchen am RE zeigte sich das gefärbte beta-Tubulin III Signal erst durch die Sudanschwarz-Behandlung klar und konnte von der Autofluoreszenz abgegrenzt werden (Abbildung 33).

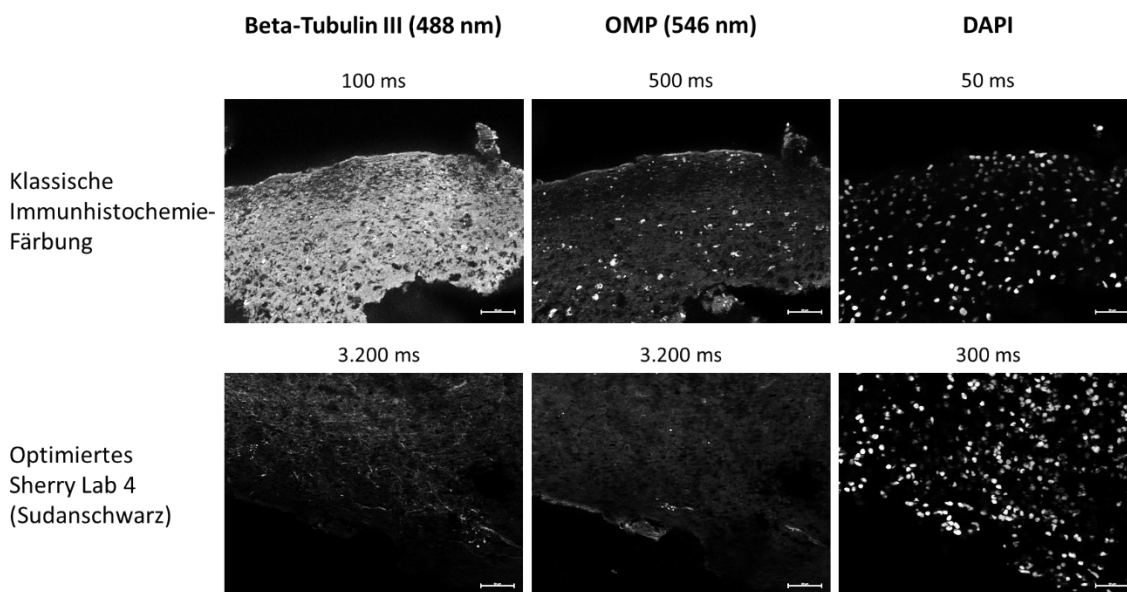


Abbildung 33: Autofluoreszenz-Reduktion am Bulbus olfactorius

Dargestellt ist die Reduktion der Autofluoreszenz am Bulbus olfactorius mit Sudanschwarz. Es wurde zweimal die gleiche Färbung angewendet, aber nach unterschiedlichen Protokollen. Die obere Zeile zeigt Aufnahmen einer Färbung nach der klassischen Immunhistochemie, wobei sich sowohl auf dem mit beta-Tubulin III gefärbten 488 nm Fluoreszenz-Kanal als auch auf dem mit OMP gefärbten 546 nm Kanal eine starke Autofluoreszenz zeigt. In der unteren Zeile wurden die gleichen Marker unter Anwendung einer Sudanschwarz-Behandlung nach dem Sherry Lab 4 Protokoll gefärbt. Die Autofluoreszenz konnte selbst bei den deutlich längeren benötigten Belichtungszeiten sichtbar reduziert werden. Es wurden keine einheitlichen Belichtungszeiten verwendet, weshalb über jedem einzelnen Bild die entsprechend verwendete Belichtungszeit gesondert aufgeführt ist.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

Autofluoreszenz kann allerdings außer durch Lipofuszin auch durch das Vorliegen von FAD bedingt sein, welches speziell in neuronalen Geweben vermehrt vorkommt (Kolenc and Quinn, 2019). Ein experimenteller Ansatz zur Reduktion der Autofluoreszenz könnte dementsprechend die Blockierung der Atmungskette und damit der Generierung von FAD sein. In der Literatur finden sich nur wenige Beschreibungen, in welchen die Blockierung der Atmungskette im Zusammenhang mit der Autofluoreszenz genannt wird. Für den Nucleus olivaris superior als auditorisches Kerngebiet wurde eine solche Methode bei Ratten ausgeführt, wobei mehrere Enzyme, unter anderem Komplexe der Atmungskette, blockiert wurden und messbare Reduktionen von sowohl FAD als auch der Autofluoreszenz erreicht werden konnten (Brosel et al., 2018).

Allerdings wurden in diesem Ansatz frische Hirnschnitte verwendet und unter elektrischer Stimulation der Neuronen untersucht.

Dieser Ansatz könnte dementsprechend je nach vorliegender Gewebeprobe eine Option zur generellen Anwendung an neuronalen Proben darstellen und eine eventuelle Alternative bieten, falls die Autofluoreszenz-Reduktion mit Sudanschwarz zu gering oder zu stark ausfallen sollte, wie es in der vorliegenden Arbeit für das OE der Fall war. Hierfür müssten aber erst breitere experimentelle Untersuchungen an unterschiedlichen Gewebetypen in vergleichbaren Ansätzen weiter erprobt werden.

4.2.3 Autofluoreszenz-Reduktion an großen Schnitten mit RE und neuronalen Strukturen

Die Behandlung mit Sudanschwarz wurde auch an großen Nasenlängsschnitten angewendet, führte dort aber zu einer zu starken Reduktion der Immunfluoreszenz-Signale.

Dieser Umstand könnte durch die vermehrte absolute Sudanschwarz-Menge bedingt sein, die aufgetragen werden musste, um den gesamten Schnitt mit Lösung zu bedecken. Es wurden in Konzentration und Inkubationszeit angepasste Sudanschwarz-Protokolle getestet, um diese für große Schnitte zu optimieren. Aus den Versuchen ergaben sich Protokolle mit 0,1 % Sudanschwarz-Lösung inkubiert für 1,5 min und 0,3 % Sudanschwarz-Lösung inkubiert für 10 s als die besten Ergebnisse. Somit konnte entweder durch deutliche Reduktion der Inkubationszeit oder durch moderate Reduktion der Sudanschwarz-Konzentration und der Inkubationszeit die gewünschte Autofluoreszenz-Reduktion auch an großen Schnitten erreicht werden (Abbildung 34).

Im Abgleich mit der Literatur findet sich, dass eine noch weiter reduzierte Sudanschwarz-Konzentration (unter 0,1 %) in anderen Studien an Gewebeproben des ZNS keine ausreichende Autofluoreszenz-Reduktion mehr zeigte (Schnell et al., 1999). In diesen Studien erwiesen sich hingegen Sudanschwarz-Konzentrationen bis 10 % als noch effektiv gegen die Autofluoreszenz (Schnell et al., 1999). Diese Ansätze basierten auf einer

Reduktion der Autofluoreszenz durch Lipofuszin, welches besonders gehäuft in gealterten Zellen des ZNS zu finden ist (Schnell et al., 1999).

Demnach wäre zu erwarten gewesen, dass Sudanschwarz auch an den großen Schnitten, speziell am OE, zu einer guten Autofluoreszenz-Reduktion hätte führen sollen. In den Färbungen an den großen Schnitten zeigten sich allerdings gegenteilige Ergebnisse. Die Autofluoreszenz erwies sich auch bei klassischen Färbungen ohne Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion als nur schwach ausgeprägt. Daraus wurde abgeleitet, dass nicht immer eine Sudanschwarz-Behandlung zur Reduktion der Autofluoreszenz notwendig ist.

Ergänzend dazu wurde schon beschrieben, dass an Cryo-Schnitten die Behandlung mit 70 % Ethanol bereits zu einer Reduktion der Autofluoreszenz führen kann (Sun et al., 2011). In der Literatur finden sich außerdem Hinweise auf das Vorliegen verschiedener Lipofuszin-Untertypen in unterschiedlichen Geweben (Schnell et al., 1999). Auch dies könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Effektivität der Autofluoreszenz-Reduktion an verschiedenen Geweben sein.

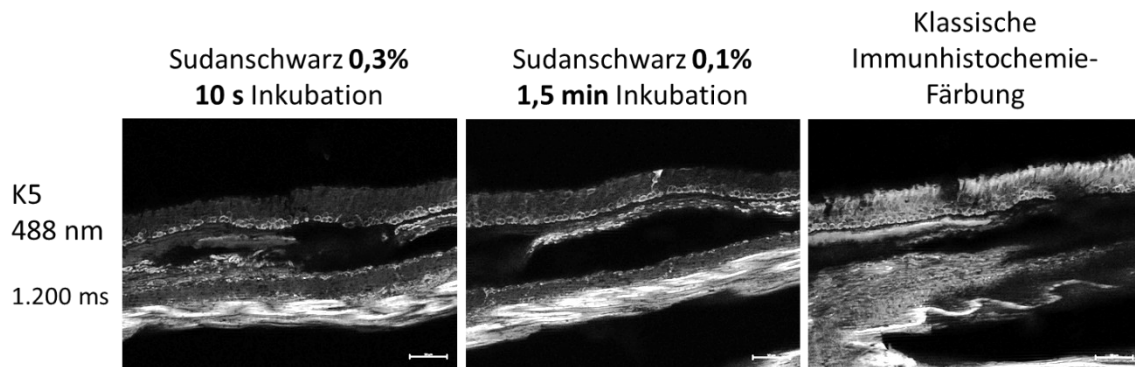


Abbildung 34: Optimierte Autofluoreszenz-Reduktion für große Schnitte

Dargestellt sind Färbungen am RE eines Nasenlängsschnitt von Präparat H84. Es wurde bei allen Schnitten dieselbe Färbung durchgeführt und Aufnahmen mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Das Protokoll der Sudanschwarz-Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion wurde für große Schnitte angepasst. Sowohl eine stark reduzierte Inkubationszeit von 10 s als auch eine verminderte Sudanschwarz-Konzentration von 0,1 % mit kürzerer Inkubationszeit von 1,5 min zeigten gute Ergebnisse.

Maßstabsbalken 50 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, *Experimental and Molecular Pathology*)

4.2.4 Zusammenfassung Autofluoreszenz-Reduktion

- Sudanschwarz bindet an Lipofuszin. Die effektive Autofluoreszenz-Reduktion durch eine Sudanschwarz-Lösung an nasalem Gewebe könnte in dem vermehrten Vorliegen von Lipofuszin-Granula begründet sein.
- FAD kann neben Lipofuszin in neuronalem Gewebe für Autofluoreszenz sorgen. Durch eine Blockierung der Atmungskette könnte dieses reduziert werden.
- Autofluoreszenz-Reduktion war nicht für jede der analysierten Gewebeproben notwendig. Ursachen dafür könnten unter anderem die Art der Schnitte oder verschiedene Lipofuszin-Untertypen sein.

4.3 Antikörper-Entfernung

4.3.1 Verschiedene Ansätze zur Antikörper-Entfernung bei indirekter Immunhistochemie am RE

Die Grundidee des vorliegenden Multiplexing Ansatzes basierte auf mehreren Runden von Färbungen hintereinander an einem Schnitt. Hierfür war eine Methode zur Entfernung der Antikörper nötig, um die vorangegangene Färbung wieder lösen zu können.

Das Grundprinzip dieser Antikörper-Entfernungsmethoden beruhte dabei auf einer Destabilisierung der Tertiärstruktur der Antikörper und in einer Trennung der nicht-kovalenten Bindungen der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe (Pirici et al., 2009, Ehrenberg et al., 2020, Crivianu-Gaita et al., 2015). Proteine, und damit auch Antikörper, denaturieren unter Extrembedingungen, wozu unter anderem sehr hohe Temperaturen und maximale pH-Werte gehören, welche die Ansätze für die meisten Methoden zur Antikörper-Entfernung darstellen (Pirici et al., 2009, Gendusa et al., 2014). Durch die Denaturierung wird die Reaktionsfähigkeit der Antikörper auf ein Minimum reduziert, womit erneute Färbungen möglich werden (Tornehave et al., 2000). Allerdings gibt es Hinweise, wonach Antikörper auch bei Temperaturen bis 60 °C noch nicht denaturieren (Gendusa et al., 2014). Dies könnte bedingen, dass ein rein thermischer Einfluss nicht ausreicht, sondern zusätzlich chemische Faktoren notwendig sind, wie sie

in der vorliegenden Arbeit für die Ansätze zur Antikörper-Entfernung verwendet wurden.

Tabelle 17: Übersicht der Ergebnisse des Ansatzes zu den Antikörper-Entfernungsmethoden am RE

Veranschaulicht sind die Ergebnisse der verschiedenen Protokolle der getesteten Methoden zur Antikörper-Entfernung. Es sind je die jeweiligen Erfolge und Defizite der einzelnen Methoden aufgelistet. Es ist verdeutlicht, dass der Ansatz mit dem Citrat-Puffer die meisten Defizite aufwies, wohingegen die BME/SDS-Lösung die meisten Erfolge erzielte.

	Citrat-Puffer in der Mikrowelle	Glycin/SDS-Lösung mit pH 2,0 bei 56 °C	BME/SDS-Lösung bei 56 °C
Erfolge	Entfernung der spezifischen Färbungen von K5, K19 und E-Cadherin auf den Kanälen 488 nm, 546 nm, 647 nm	- Entfernung der spezifischen Färbungen von K5, K19 und E-Cadherin auf den Kanälen 488 nm, 546 nm, 647 nm - Entfernung des DAPI-Signals	- Entfernung der spezifischen Färbungen von K5, K19 und E-Cadherin auf den Kanälen 488 nm, 546 nm, 647 nm - Entfernung des DAPI-Signals - Entfernung des Sudanschwartz
Defizite	- Überreste des DAPI-Signals vorhanden - Überreste des Sudanschwartz vorhanden - Schädigung des Gewebes	- Wenige Reste Sudanschwartz vorhanden - Gewebe minimal beschädigt	Gewebe minimal beschädigt

Die besten Ergebnisse zeigten sich mit der BME/SDS-Lösung für 30 min bei 56 °C, da hiermit auch das Sudanschwartz der vorangegangenen Färbung am effizientesten entfernt werden konnte (Tabelle 17) (Klingenstein et al., 2026).

Im Gegensatz dazu ergab die Anwendung des Citrat-Puffers bei Hitze in der Mikrowelle die schlechtesten Ergebnisse (Tabelle 17). Der Ansatz basierte vor allem auf einer Denaturierung der Antikörper durch die Hitzewirkung in der Mikrowelle (Tornerhave et al., 2000, Lan et al., 1995). Es kam zu Schädigungen der Gewebeschnitte nach der ersten Anwendung, während nicht alle Antikörper-

Signale eliminiert werden konnten. Hierbei verblieben insbesondere Kernsignale auf dem DAPI-Kanal teilweise positiv.

Diese unzureichende Antikörper-Entfernung durch einen Citrat-Puffer bei Anwendung in der Mikrowelle wurde in gleicher Form auch bereits in der Literatur beschrieben (Pirici et al., 2009). Quellen führen zudem ebenfalls auf, dass es zu Gewebeschäden und Ablösungen der Schnitte von den Objektträgern kam (Pirici et al., 2009, Ehrenberg et al., 2020). Als Ursache der schlechten Ergebnisse wäre die Anwendung des Protokolls oder die Art der Färbung denkbar. So ist beschrieben, dass eine Mindestdauer von zweimal 5 min bei 780 bis 800 Watt zur effizienten Antikörper-Entfernung notwendig sei (Tornerhave et al., 2000, Lan et al., 1995). In den verwendeten Protokollen wurden die Schnitte in der Mikrowelle für 2,5 min bei *medium-high* und im Anschluss für 5 min bei *high* im Citrat-Puffer inkubiert. Eine längere Anwendung des Citrat-Puffers in der Mikrowelle könnte demnach mehr Antikörper-Signale entfernen, jedoch bei wahrscheinlich gleicher oder stärkerer Schädigung der Gewebeintegrität.

Es finden sich Hinweise, dass die Anwendung eines Citrat-Puffers insbesondere bei Peroxidase- und TSA-abhängigen Färbungen möglich ist (Tóth and Mezey, 2007, Tornerhave et al., 2000, Lan et al., 1995). Die Wirkung des Citrat-Puffers basiert dabei auf einer Blockierung der endogenen und exogenen Peroxidase unter Erhalt der kovalent ausgebildeten TSA-Signale der Färbung (Tóth and Mezey, 2007, Tornerhave et al., 2000, Lan et al., 1995). Bereits unter 4.2.1 wurde eruiert, dass das Vorliegen endogener Peroxidasen bei den vorliegenden Geweben eine untergeordnete Rolle gespielt haben musste. Dies bestätigt sich erneut in der weniger effizienten Wirkung des Citrat-Puffers im Vergleich zu den anderen Antikörper-Entfernungsmethoden. Ebenso wurden keine exogenen Peroxidasen als Bestandteile der Färbungen in den Versuchen angewendet.

Die Blockierung von Peroxidasen, vor allem in Peroxidase abhängigen Färbungen, ist auch für die Anwendung einer Glycin/SDS-Lösung mit einem pH von 2,0 beschrieben (Pirici et al., 2009). Diese zeigte in den Versuchen deutlich bessere Ergebnisse in der Antikörper-Entfernung als die Anwendung des Citrat-Puffers in der Mikrowelle, unterlag allerdings den Ergebnissen der BME/SDS-Lösung. Es lässt sich vermuten, dass der Effekt, der durch die Blockierung der

Peroxidase hervorgerufen wird, bei der Glycin/SDS-Lösung in den vorliegenden Versuchen zu vernachlässigen war. Dies folgt aus der Grundlage der Ergebnisse der Wasserstoffperoxid-Lösung zur Autofluoreszenz-Reduktion und des Citrat-Puffers zur Antikörper-Entfernung.

Die Wirkung einer Glycin/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung basiert neben der Peroxidase-Blockierung auch auf einer Denaturierung der Antikörper durch den stark sauren pH von 2,0 (Pirici et al., 2009). Diese Formveränderung ist allerdings als nicht irreversibel beschrieben, womit sich bei einer ausreichenden Menge von Antikörpern nicht alle auswaschen ließen und eine erneute Bindung an die Antigene möglich wäre (Gendusa et al., 2014). Die Effizienz der Antikörper-Entfernung wäre demnach auch maßgeblich durch die Verdünnung der Antikörper bestimmt. Daneben könnte auch die Wahl der Antikörper und ihre Bindungsstärke an ihr betreffendes Antigen das Ergebnis der Antikörper-Entfernung durch die Glycin/SDS-Lösung beeinflussen (Gendusa et al., 2014). Diese Angaben decken sich mit den vorliegenden Ergebnissen. Die Glycin/SDS-Lösung zeigte gute Ergebnisse in der Antikörper-Entfernung. Auf allen Kanälen konnten die spezifischen Farbsignale ausgelöscht werden. Unter der Glycin/SDS-Lösung war allerdings die Entfernung des Sudanschwarz der vorangegangenen Autofluoreszenz-Reduktion weniger effizient als unter der BME/SDS-Lösung und es zeigten sich leichte Gewebeschädigungen.

Es finden sich Studien, in denen die Glycin/SDS-Lösung sowohl an Cryo- als auch an Paraffin-Schnitten in vier Färberunden als effektive Antikörper-Entfernungsmethode angewendet wurde (Pirici et al., 2009). Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Antikörper-Entfernung wird hier eine Inkubationszeit von mindestens 30 min unter stetigem Rühren aufgeführt (Pirici et al., 2009). Im verwendeten Protokoll der vorliegenden Arbeit wurde die Glycin/SDS-Lösung während der Wirkzeit von 30 min nicht gerührt. Unter einem weitergeführten Protokoll mit Rühren während der Inkubation wäre die Unterstützung der Antikörper-Entfernung durch die mechanische Bewegung sowie die Verhinderung der erneuten Bindung der Antikörper an die Antigene denkbar.

Als eine weitere mögliche Methode wird auch die Anwendung einer BME/SDS-Lösung unter Hitze beschrieben (Willemsen et al., 2021, Ehrenberg et al., 2020,

Gendusa et al., 2014). Die Anwendung einer solchen Lösung zeigte in der vorliegenden Arbeit die besten Signale bei der Antikörper-Entfernung, bei gleichzeitiger Schonung der Gewebeintegrität. BME ist aufgrund seiner Schwefelwasserstoffgruppe in der Lage Disulfidbrücken zu trennen, welche sich auch in der Proteinstruktur von Antikörpern finden lassen, und kann damit die Tertiärstruktur der Antikörper destabilisieren (Crivianu-Gaita et al., 2015, Ehrenberg et al., 2020). Dies führt zu einer irreversiblen Veränderung der Antikörper-Struktur. Eine BME/SDS-Lösung erzielte somit bei Anwendung auf Paraffin-Schnitten noch bessere Effekte in der Antikörper-Entfernung als eine Glycin/SDS-Lösung mit pH 2,0 und dies auch bei Antikörpern mit hoher Bindungsaffinität zu ihrem Antigen (Gendusa et al., 2014, Ehrenberg et al., 2020). Es gibt Hinweise, wonach durch die BME/SDS-Lösung auch unspezifische Bindungen getrennt werden können, womit ein klareres Farbsignal erzielt werden müsste (Gendusa et al., 2014).

Auch in mehreren Färberunden war die Anwendung dieser Lösung auf die Schnitte möglich und zeigte sogar nach fünf Runden noch ein positives, klares Farbsignal, ohne Ablösung der Schnitte von den Objektträgern oder ausgeprägte Schädigung des Gewebes. Dies lässt sich unterstützen durch Ergebnisse anderer Autoren, wonach die Antigenität der Gewebeproteine durch eine BME/SDS-Lösung wenig bis gar nicht beeinträchtigt wird (Gendusa et al., 2014). Somit sollte auch nach mehrfacher Anwendung eine Bindung der Antikörper an gewebeinterne Antigene möglich sein. Das Protokoll mit Anwendung der BME/SDS-Lösung zeigte auch bei der Entfernung des Sudanschwarz von den Schnitten die besten Ergebnisse im Vergleich zum Citrat-Puffer und der Glycin/SDS-Lösung.

Ergänzend hierzu lassen sich Ansätze finden, wonach die BME/SDS-Lösung auch eine HE-Färbung wieder von einem Schnitt entfernen kann (Gendusa et al., 2014), was in der vorliegenden Arbeit aber nicht getestet wurde. Es sind auch Studien beschrieben, in denen eine BME/SDS-Lösung zwar eine effektivere Antikörper-Entfernung als ein Citrat-Puffer, aber keine effektivere Antikörper-Entfernung als eine Glycin/SDS-Lösung mit pH 2,0 zeigte (Pirici et al., 2009). In diesen Fällen wurde eine Tris-SDS/BME-Lösung mit einem pH von 6,75 für 30

min bei 50 °C unter Rühren angewendet (Pirici et al., 2009). Das Protokoll und die BME/SDS-Lösung der vorliegenden Arbeit weichen allerdings von diesen Studien ab: Für die durchgeführten Versuche wurde die Lösung mit Tris-HCl (nicht mit Tris) angesetzt und bei 56 °C inkubiert.

In der Zusammenschau aller dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass ein Ansatz für eine effektive Antikörper-Entfernung mindestens zwei Wirkfaktoren benötigt. Dies würde erklären, wieso die vorliegende BME/SDS-Lösung – mit der Wirkung des BME einerseits und der zusätzlichen Säurewirkung durch das enthaltene Tris-HCl andererseits – im Vergleich zu der Glycin/SDS-Lösung und dem Citrat-Puffer bessere Ergebnisse in der Antikörper-Entfernung erzielte. Somit kann erneut die Vermutung aufgestellt werden, dass die Glycin/SDS-Lösung mit einem zweiten Faktor, wie beispielsweise der mechanischen Bewegung der Lösung während der Inkubation, noch bessere Ergebnisse erzielen könnte.

4.3.2 Antikörper-Entfernung bei indirekter Immunhistochemie am OE

An den älteren Schnitten von Proben mit OE wurde die am RE etablierte Antikörper-Entfernungsmethode mit der BME/SDS-Lösung verwendet, womit auf den 488 nm und 546 nm Fluoreszenzkanälen die Antikörper ebenfalls zuverlässig entfernt werden konnten. Auf dem 647 nm Kanal zeigten sich allerdings bei manchen Färbungen nach der BME/SDS-Antikörper-Entfernung Restsignale der gefärbten Antigene, womit für Marker, welche mit den entsprechenden 647 nm Fluoreszenz markierten Sekundärantikörpern gefärbt wurden, nicht immer eine komplette Antikörper-Entfernung garantiert werden konnte.

Wie bei den Versuchen an Schnitten mit RE kam es bei der Anwendung der BME/SDS-Lösung an Schnitten mit OE weder zu einer Schädigung des Gewebes noch zu einer Ablösung der Proben von den Objektträgern. Die erfolgreiche Anwendung einer BME/SDS-Lösung an postmortalen humanen Schnitten des Gehirns zur Entfernung von immunhistochemischen Färbungen an neuronalen Proben wurde bereits beschrieben (Ehrenberg et al., 2020). Dies deutet darauf hin, dass, anders als bei der Reduktion der Autofluoreszenz mit Sudanswarz, kein deutlicher Unterschied zwischen neuronalen und nicht-neuronalen oder

alten und frischen Schnitten bei einer Antikörper-Entfernung mit BME/SDS besteht. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die BME/SDS Antikörper-Entfernung nicht am Gewebe selbst wirkt, sondern mit den Antikörpern interagiert und somit bei Verwendung der gleichen Färbung gleiche Erfolge erzielen sollte.

4.3.3 Zusammenfassung Antikörper-Entfernung

- Antikörper-Entfernungsmethoden mit mindestens zwei Wirkfaktoren sind vermutlich zuverlässiger und effektiver.
- Ein Protokoll mit einer BME/SDS-Lösung zeigte sich zur Antikörper-Entfernung an Cryo-Schnitten aller analysierten Gewebetypen am effektivsten. Erklärung dafür könnte sein, dass BME die Disulfidbrücken der Antikörper irreversibel spaltet, wodurch die Wirkung unabhängig vom Gewebetyp oder der Art der Schnitte auftreten sollte.

4.4 Schwierigkeiten beim Multiplexing am RE

4.4.1 Das Nachlassen der Signalintensität

Während der Optimierung des Multiplexing Ansatzes an Schnitten mit RE stellte sich das Nachlassen der Signalintensität mit zunehmenden Färberunden als größtes Problem heraus.

Dieses Phänomen wurde bereits in der Literatur diskutiert, wobei als mögliche Ursache eine Veränderung der Antigenität der Gewebsproteine durch die mehrfache Anwendung der teilweise aggressiven Antikörper-Entfernungsmethoden vermutet wird (Gendusa et al., 2014). Auch für die Anwendung einer BME/SDS-Lösung unter einem Multiplexing Protokoll ist die stetige Abnahme der Signalintensität der Färbungen schon beschrieben (Willemsen et al., 2021). Als Lösung des Problems wird dort eine Anpassung der Verdünnungsverhältnisse der Primärantikörper mit zunehmender Rundenzahl vorgeschlagen, sodass in späteren Färberunden höhere Konzentrationen eingesetzt werden sollten (Willemsen et al., 2021).

In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen mit einer Optimierung der Behandlung zur Autofluoreszenz-Reduktion in einem Multiplexing Test-Ansatz die Signalintensität über fünf Runden etwa gleich stark erhalten werden, indem mit zunehmender Rundenzahl bei gleichbleibenden Verdünnungsverhältnissen

der Primärantikörper die Sudanschwarz-Anwendung immer mehr reduziert wurde. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die Antikörper-Entfernungstechniken, sondern auch die häufig parallel angewendeten Methoden zur Reduktion der Autofluoreszenz die Darstellung der Farbsignale erheblich beeinträchtigen können.

4.4.2 Die Gewebeschädigung

Eine weitere Schwierigkeit, die sich im Rahmen der Test-Ansätze zum Multiplexing ergab, war die Schädigung der Schnitte sowie das Ablösen einiger Zellen der Probe.

Auch zu diesem Umstand finden sich bereits Beschreibungen in der Literatur, wonach manche Antikörper-Entfernungstechniken bei mehrfacher Anwendung ein komplettes oder anteiliges Ablösen der Schnitte von den Objektträgern bedingen können (Willemsen et al., 2021, Gendusa et al., 2014, Ehrenberg et al., 2020). Als mögliche Ursachen werden hierbei zwei Hauptgründe aufgeführt: Einerseits soll vor allem die Entfernung des Deckglases von den gefärbten Proben im Zuge der Entdeckelung enorm zur Schädigung des Gewebes beitragen und somit die Anzahl möglicher Färberunden limitieren (Gendusa et al., 2014). Andererseits kann es zu einer Schädigung der Schnitte aufgrund der Methode der Antikörper-Entfernung kommen, wobei besonders Hitze basierte Techniken einen starken Einfluss auf die Gewebeintegrität haben, wie beispielsweise die Verwendung von Citrat-Puffer mit einem pH von 6,0 bei 95 °C für 5 min (Willemsen et al., 2021). Letzteres wird durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt, wonach ebenfalls die Verwendung eines Citrat-Puffers unter Hitze in der Mikrowelle für insgesamt 7,5 min deutliche Schäden an den Proben bereits nach einmaliger Anwendung zeigte.

Unter den Multiplexing Ansätzen mit der BME/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung war die Gewebeschädigung allerdings kein Problem und auch fünf Runden Färbungen mit vier Entdeckelungen stellten sich als problemlos heraus.

4.4.3 Zusammenfassung Schwierigkeiten beim Multiplexing am RE

- Anwendungen zur Autofluoreszenz-Reduktion und Antikörper-Entfernung können beim Multiplexing die Farbsignalintensität mit zunehmender Rundenzahl abschwächen.
- Gewebeschädigung kann als Problem beim Multiplexing auftreten, am ehesten bedingt durch die Entdeckelungen und die Antikörper-Entfernungstechnik.

4.5 Immunfluoreszenz-Färbungen an verschiedenen nasalen Strukturen

4.5.1 Immunfluoreszenz-Darstellungen am RE

Um validierte Färbungen für die Test-Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion und zur Antikörper-Entfernung verwenden zu können, wurden zu Beginn dieser Arbeit die Expressionen einiger Marker am RE untersucht. Hierfür wurden kleine Schnitte mit RE angefertigt und verschiedene Färbungen durchgeführt. Dabei erwiesen sich K5, K19, E-Cadherin, ACE2 und ANXA1 als positiv exprimierte Marker am RE (Abbildung 35) (Klingenstein et al., 2026).

Marker, die in der Literatur zur Färbung des RE beschrieben sind, sind häufig nicht rein spezifisch dafür. Die meisten sind Marker für Epithelien im Allgemeinen, die neben dem Vorkommen in anderen Epithelien auch im respiratorischen gefunden werden konnten.

Eine große Klasse an Proteinen, auf die diese Beschreibung zutrifft, sind die Keratine, von denen es viele verschiedene gibt (Moll et al., 2008). Am RE sind von diesen unter anderem K5 und K19 bereits beschrieben (Moll et al., 2008, Klingenstein et al., 2026). K5 ist dabei ein Marker für die Basalzellen in Epithelien, wie auch am RE. (Oliva et al., 2022, Tanos et al., 2017, Moll et al., 2008). Dieses Expressionsmuster an den epithelialen Basalzellen konnte in mehreren Färbungen bestätigt werden (Abbildung 35). K19 kann in der Literatur hingegen für die hochprismatischen Zellen des Flimmerepithels gefunden werden (Nishijima et al., 2022, Child et al., 2018, Moll et al., 2008). In den Färbungen der vorliegenden Arbeit konnte K19 ebenfalls an den Flimmerepithelzellen des RE nachgewiesen werden. Insbesondere am basolateralen Zellpol der Epithelzellen

und an den Basalzellen zeigte sich hierbei das positive Signal von K19 am RE (Abbildung 35).

Ebenso finden sich Moleküle für den Zell-Zell-Kontakt und die Zell-Adhäsion in einigen Epithelien und sind so auch im RE schon gefunden worden, wie das E-Cadherin (Yuksel et al., 2021, Luo et al., 2012). Aus den vorliegenden Färbungen zeigt sich, dass E-Cadherin in den Zellmembranen und Zellgrenzen der Epithelzellen des RE exprimiert ist (Abbildung 35). Dieses Expressionsmuster ist ebenso bereits in der Literatur beschrieben (Yuksel et al., 2021, Luo et al., 2012, Klingenstein et al., 2026).

ACE2 ist ein Enzym, das in den Renin-Angiotensin-Aldosteron Volumenhaushaltsregelkreis mit eingeschaltet ist. Seine Expression ist bereits für viele verschiedene humane Gewebe beschrieben worden, zum Beispiel für die Epidermis, Gefäße, Haarfollikel, Enterozyten und Lungen-Alveolen (Hamming et al., 2004). Aber auch im humanen RE finden sich bereits Beschreibungen über das Vorkommen von ACE2 (Zhang et al., 2020, Jia et al., 2005, Klingenstein et al., 2020). Interessanterweise gibt es hier aber unterschiedliche Darstellungen in der gefundenen Lokalisation der ACE2 Expression. So stellen manche Quellen die Expression von ACE2 im humanen RE vor allem an der apikalen Zellmembran der Flimmerepithelzellen dar (Jia et al., 2005). Andere Autoren beschreiben die Expression von ACE2 in allen Zellen des RE, sowohl in den apikalen als auch in den basalen und sogar in den Schleim bildenden Zellen (Klingenstein et al., 2020, Zhang et al., 2020). In Färbungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich letztere Expression von ACE2 bestätigt: Basolateral und apikal am Pol der Epithelzellen sowie an den Basalzellen des RE (Abbildung 35).

Aus der Gruppe der Annexine konnte ANXA1 an den apikalen Zellpolen des RE nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine deutliche Expression an den apikalen Zilien der Flimmerepithelzellen (Abbildung 35). In der Literatur ist die Expression an der apikalen Zellmembran der Zilien tragenden Zellen des RE von Kaninchen ebenfalls bereits beschrieben worden (Mayran et al., 1996). Diese Expression konnte auch in humanen Proben des RE vom oberen Respirationstrakt in der Literatur schon nachgewiesen werden (Dreier et al., 1998, Klingenstein et al.,

2026). Von den Annexinen wurde an Nasenlängsschnitten, an denen primär das OE untersucht wurde, auch ANXA5 gefärbt. Hierbei stellte sich am RE an den apikalen Zilien der Flimmerepithelzellen ebenfalls ein positives Expressionsmuster von ANXA5 dar, womit eine gemeinsame Lokalisation mit ANXA1 gezeigt werden konnte (Abbildung 35). Die Datenlage zu ANXA5 im RE ist hingegen etwas unklar: Aus manchen Quellen geht lediglich eine Beschreibung von ANXA5 in der Lunge hervor, sowohl in Ratten als auch in humanem Gewebe (Reutelingsperger et al., 1994, Giambanco et al., 1993). Zudem finden sich Beschreibungen von ANXA5 als prognostischer Marker in Nasopharynx-Karzinomen (Peng et al., 2014).

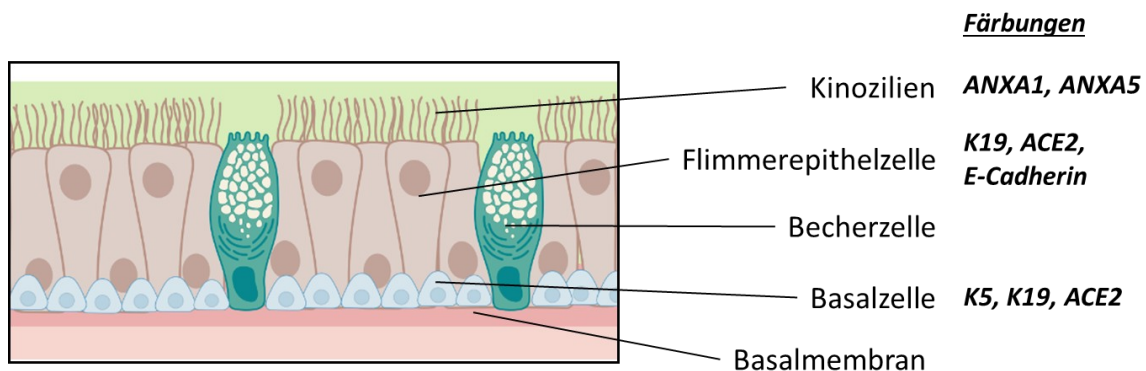


Abbildung 35: Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen am RE

Dargestellt ist ein Schema vom mikroskopischen Aufbau des RE. Es sind die wichtigsten Zelltypen und Strukturen beschriftet. Rechts neben den Beschriftungen sind jeweils die Marker aufgeführt, welche in Färbungen der vorliegenden Arbeit an den einzelnen Zellstrukturen oder Zelltypen gezeigt werden konnten.

4.5.2 Charakterisierung des OE mit der Multiplexing Methode

Aus den durchgeführten Multiplexing Ansätzen an einem Nasenlängsschnitt ergaben sich OMP, beta-Tubulin III, K 5, ANXA1, E-Cadherin, Collagen IV, UEA1 und ANXA5 als positive Marker am OE. GFAP und CD56 (NCAM) stellten sich ebenfalls positiv dar, zeigten aber keine Expression am OE. Weitere Marker, welche in den Multiplexing Ansätzen untersucht wurden, sich aber negativ zeigten, waren K14, NGN1, Ki67, ANXA2, K15, SOX2, DCX und NeuroD1.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten erneut bestätigen, dass OMP ein selektives positives Färbungsmuster am OE, genauer an den reifen ORN,

aufweist (Abbildung 36). Die Expression ist in dieser Form in der Literatur bereits seit Langem bekannt und schon häufig beschrieben worden, nicht nur an humanen Proben, sondern unter anderem auch an Ratten und Mäusen (Leopold et al., 2000, Farbman and Margolis, 1980, Monti-Graziadei et al., 1977). Eine Funktion von OMP in den reifen ORN liegt dabei wahrscheinlich in der Modulierung der Zellantwort auf die Bindung eines Odorants an das primäre Neuron (Dibattista et al., 2021).

Neben dem OMP konnte das beta-Tubulin III als neuronaler Marker am OE nachgewiesen werden, wobei sich sowohl eine gemeinsame Lokalisation der beiden Marker aufzeigte als auch Zellen, welche nur mit beta-Tubulin III und nicht durch OMP gefärbt werden konnten (Abbildung 36). Diese Ergebnisse unterstützen bisherige Angaben in der Literatur, wonach sich beta-Tubulin III ebenfalls an den ORN, sowohl an reifen als auch an unreifen finden lässt (Borgmann-Winter et al., 2015, Roskams et al., 1998). Durch das Färben mit OMP und beta-Tubulin III je in der ersten Runde eines Multiplexing Ansatzes konnte für die weiteren Runden garantiert werden, dass die betrachtete Epithelstelle mit den weiteren gefärbten Markern dem OE entsprach.

Als weiterer Marker wurde in den ersten Färberunden der Multiplexing Ansätze K5 mitgefärbt, da dieses bereits in den Voruntersuchungen am RE klare Signale an den Basalzellen liefern konnte, welche auch im OE damit angefärbt wurden (Abbildung 36). Die Besonderheit der Basalzellen am OE liegt in dem Vorkommen von zwei verschiedenen Arten von Zelltypen, den GBZ und den HBZ (Viktorov et al., 2006, Beites et al., 2005).

Für die HBZ finden sich einige Quellen, welche die positive Expression von K5 ebenfalls beschreiben, wohingegen die GBZ für SOX2, NGN1 und NeuroD1 positiv beschrieben werden (Holbrook et al., 2011, Beites et al., 2005, Borgmann-Winter et al., 2015). Es gibt allerdings Anhaltspunkte, dass die harte Trennung der Expressionsmuster zwischen den HBZ und GBZ vor allem bei Nagetieren zutrifft, wohingegen sich am humanen OE auch Überschneidungen der Expressionsmuster finden lassen (Beites et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit K5 eine nahezu durchgängige basale Zellschicht am OE dargestellt werden, welche der Basalmembran direkt auflag

und die positiv gefärbten HBZ darstellte. Zwischen diesen K5 positiven Basalzellen fanden sich einzelne Zellen, welche nicht oder nur schwach mit K5 gefärbt wurden. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um GBZ handeln könnte, die mit anderen Markern hätten nachgewiesen werden können. Für die GBZ sind verschiedene Entwicklungsstadien beschrieben, wobei diese unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen können: Die multipotenten Vorläuferzellen sind eher SOX2 positiv, in den neuronalen Vorläuferzellen findet sich vor allem NGN1 und für die direkten neuronalen Vorläuferzellen ist hauptsächlich NeuroD1 nachgewiesen (Packard et al., 2016, Packard et al., 2011, Beites et al., 2005). Unter diesen drei stellt SOX2 mit einer zusätzlichen Expression an den HBZ und an den Zellkernen der Stützzellen den einzigen Marker dar, der auch an anderen Zellen des OE gefunden werden kann (Borgmann-Winter et al., 2015). Allerdings waren sowohl SOX2 und NGN1 wie auch NeuroD1 in den Multiplexing Färbungen negativ am OE, was ein Fehlen aller genannten Differenzierungsstufen der GBZ suggerieren würde.

Für den Marker SOX2 ist dabei am ehesten anzunehmen, dass es sich bei der negativen Färbung um ein Antikörper bedingtes Problem gehandelt haben könnte. Studien zeigen, dass auch bei einem altersbedingten Verlust der GBZ und einer Atrophie des OE bis hin zu einer Metaplasie in RE noch SOX2 positive Signale am Epithel nachweisbar sind (Child et al., 2018). Diese positiven Farbsignale ließen sich an den Stützzellen und, im Falle der Metaplasie, an den Flimmerepithelzellen des RE darstellen (Child et al., 2018). Somit ist ein Fehlen jeglicher SOX2 positiver Zellen an einem Nasenlängsschnitt sehr unwahrscheinlich.

Nichtsdestotrotz ist für das OE eine altersbedingte Degeneration beschrieben, welche laut manchen Quellen ab einem Alter von 65 Jahren einsetzen kann (Oliva et al., 2022). Alle Körperspender der verwendeten Präparate wurden älter als 65 Jahre, womit ein Abbau und weniger aktiver Umbau des OE an den Proben nicht ausgeschlossen werden kann. Gestützt wird diese These damit, dass alle Proliferationsmarker und alle Marker der GBZ, welche für die Regeneration des OE verantwortlich sind, negativ ausfielen, wohingegen die HBZ klar angefärbt werden konnten. Dieses Phänomen findet sich für den altersbedingten Abbau

des OE bereits in der Literatur: Demnach würden die HBZ trotz der Degeneration bestehen bleiben, während die verschiedenen Subgruppen der GBZ im Verlauf nicht mehr darstellbar sind, weshalb ab einer Degeneration des OE vom Grad 2 nur noch vereinzelt sowohl SOX2 als auch NeuroD1 positiv nachgewiesen werden können (Fitzek et al., 2022, Child et al., 2018).

Eine gleiche Beobachtung wurde zudem mit dem allgemeinen Proliferationsmarker Ki67 gemacht, welcher ebenfalls ein Expressionsmuster an den GBZ aufweist und altersbedingt vermindert gezeigt werden konnte (Fitzek et al., 2022, Child et al., 2018). In den vorliegenden Ergebnissen der Multiplexing Ansätze am OE stellte sich Ki67 ebenfalls negativ dar, was sich mit der Hypothese einer Reduktion an proliferierenden GBZ decken würde. Allerdings könnte dieses negative Signal, neben einer fehlenden Expression, auch methodisch bedingt sein, weil speziell für Ki67 eine Interaktion bei der Verwendung einer BME/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung beschrieben wurde, wonach es bei Anwendung einer solchen Lösung vor der Färbung mit Ki67 zu einem verminderten Farbsignal kommen kann (Gendusa et al., 2014). Demnach ist bei der Verwendung gewisser Marker, beispielsweise für Ki67, nach dem vorliegenden Multiplexing Protokoll eine Färbung in der ersten Runde empfehlenswert, anstatt erst, wie hier durchgeführt, in der dritten Färberunde.

Interessant ist auch die Expression von K14, da sich hier sehr unterschiedliche Angaben über das Vorkommen an epithelialen Basalzellen der nasalen Strukturen in der Literatur finden lassen. Aus manchen Quellen geht hervor, dass es sowohl als Marker für die Basalzellen des humanen RE, als auch für Zellen des RE im Meerschweinchen gefunden werden konnte (Li et al., 2011, Moll et al., 2008). Allerdings finden sich auch Beschreibungen, wonach K14 kein Marker für Zellen des RE sondern nur für die HBZ des OE ist, wobei diese Ergebnisse an Gewebe von Mäusen erhoben wurden (Child et al., 2018). Andere Untersuchungen an humanen Gewebeproben konnten K14 nicht an den HBZ des OE nachweisen (Holbrook et al., 2011). Die Datenlage zeigt sich bisher dementsprechend unklar, ob K14 im humanen RE oder OE nachgewiesen exprimiert ist, oder ob die Expression von K14 eventuell Spezies abhängig ist (Tanos et al., 2017).

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte keine Expression von K14 an den HBZ gezeigt werden, was die Vermutung stützt, dass es sich am OE um ein Spezies abhängiges Vorkommen dieses Proteins handelt.

Aus der Gruppe der Annexine konnten ANXA1 und ANXA5 gemeinsam positiv an den apikalen Zilien des OE dargestellt werden, wobei sich dennoch ein Unterschied in ihren Expressionsmustern erkennen ließ (Abbildung 36). Die Co-Expression von ANXA1 und ANXA5 im OE wird in der Literatur bereits beschrieben (Uebi et al., 2007, Kuhlmann et al., 2014). Beide konnten apikal an den Zilien im OE gefunden werden, sowohl bei Mäusen als auch bei Fröschen (Kuhlmann et al., 2014, Uebi et al., 2007).

Das Farbsignal von ANXA1 zeigte sich sowohl am RE als auch am OE als stark und durchgängig am apikalen Epithelpol, wohingegen ANXA5 am RE zwar ein ähnliches Expressionsmuster aufwies, sich am OE aber nur als ein schmales, nicht durchgängiges Signal darstellte. Die verschiedenen Expressionen von ANXA5 am RE und OE könnten auf funktionelle Unterschiede dieses Proteins an den beiden Epithelien hinweisen.

Im Allgemeinen sind die Funktionen der Annexine noch nicht endgültig geklärt, aber als Calcium abhängige Phospholipid bindende Proteine wahrscheinlich vielfältig: Als Teil der Zellmembran sind sie vermutlich an deren Stabilisierung, an Prozessen der Exozytose sowie an Ionenflüssen und an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt (Wu et al., 2013, Xi et al., 2020, Gerke and Moss, 2002, Moss and Morgan, 2004). ANXA5 konnte darüber hinaus bereits an Endosomen und Mitochondrien gezeigt werden, was eine Beteiligung dieses Annexins in den Transportvorgängen und dem Stoffwchelsaustausch von Zellen, auch am OE, vermuten lassen könnte (Diakonova et al., 1997).

Allerdings wurde von den Autoren aufgeführt, dass die Annexine als Calcium abhängige Proteine von Chelatbildnern wie EDTA, welches bei den vorliegenden Präparaten zur Dekalzifizierung verwendet wurde, beeinflusst und manche ihrer Bindungen innerhalb der Zelle gelöst werden können (Diakonova et al., 1997). Eine technische Beeinflussung der Signale bei den untersuchten Annexinen kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

E-Cadherin erwies sich an den Zell-Zell-Grenzen im OE als positiv, was sich mit vergleichbaren Ausführungen und Darstellungen aus der Literatur deckt (Holbrook et al., 2011, Akins et al., 2007, Klingenstein et al., 2026) (Abbildung 36).

Ebenso konnte die Expression von Collagen IV an der Basalmembran unter dem OE mit dem Multiplexing bestätigt werden, wie es in der Literatur bereits beschrieben ist (Khoshnoodi et al., 2008, Koujitani et al., 2001, Klingenstein et al., 2026) (Abbildung 36).

Die Untersuchungen am OE zeigten zudem im humanen OE eine Expression von UEA1 am apikalen Epithelpol und an intraepithelialen Zellen (Abbildung 36). Diese UEA1 positiven Zellen im OE wiesen keine gemeinsame Expression mit einem der anderen im Multiplexing Ansatz analysierten Marker auf, womit davon auszugehen ist, dass es sich bei diesen Zellen weder um Basalzellen noch um ORN handelt.

Es gibt Quellen, die angeben, dass am OE von Pferden UEA1 an den Bowman-Drüsen gefunden wurde (Lee et al., 2016). Demnach kann das Vorkommen von UEA1 ebenso an den Bowman-Drüsen am humanen OE vermutet werden. Da sich das Signal außerdem apikal am Epithel zeigte, wäre zudem eine Färbung der supraepithelialen Schleimschicht, welche unter anderem aus den Bowman-Drüsen gebildet wird, denkbar.

Zur spezifischen Funktion von UEA1 am OE ist bisher nicht viel bekannt; als Lectin könnte es die Bindung und Wahrnehmung der Odoranten an den ORN unterstützen, wie es für diese Gruppe von Proteinen bereits formuliert wurde (Plendl and Sinowatz, 1998). Andere Autoren konnten UEA1 an apikalen Membrananteilen der ORN im OE lokalisieren (Barber, 1989). Aufgrund der fehlenden Co-Expression des positiven UEA1-Signals mit den ORN Markern OMP oder beta-Tubulin III in den vorliegenden Ergebnissen, ist an den humanen Proben allerdings nicht von einem Vorkommen an den ORN auszugehen.

Ein Marker, welcher in der Literatur sowohl an den reifen als auch an den unreifen ORN am OE positiv aufgeführt wird, ist CD56 (NCAM) (Borgmann-Winter et al., 2015, Holbrook et al., 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten für

dieses Protein allerdings keine Expression am OE, dafür aber an einem Nerv im Bindegewebe, womit das technische Gelingen der Färbungen nachgewiesen werden konnte.

Ein Grund für die fehlende Expression von CD56 (NCAM) kann ein Entzündungsprozess wie eine chronische Sinusitis sein, da in Mäusen gezeigt werden konnte, dass die Exposition gegenüber Entzündungsmediatoren nach mehreren Wochen nachweislich zu einer deutlichen Reduktion von CD56 (NCAM) am OE führte (Turner et al., 2010). Es kam darüber hinaus zu einer Reduktion der OMP positiven reifen und unreifen ORN, welche sich allerdings nach einem Aussetzen des entzündungsstimulierenden Faktors schnell wieder regenerierten (Turner et al., 2010). Ein solcher Anstieg an Entzündungsmediatoren kann aber nicht nur durch chronische Sinusitis, sondern beispielsweise auch durch chirurgische Operationen bedingt sein, wodurch insbesondere bei älteren Patienten bereits eine Beeinflussung des olfaktorischen Systems gezeigt werden konnte (Lan et al., 2021).

Die negative Darstellung von CD56 (NCAM) in den vorliegenden Ergebnissen könnte dementsprechend durch eine Einwirkung von Entzündungsfaktoren auf das OE – eventuell über einen längeren Zeitraum von mehreren Jahren – zu einer Beeinträchtigung der Integrität der olfaktorischen Strukturen geführt haben.

Auch GFAP konnte mit dem Multiplexing am OE nicht positiv dargestellt werden, aber es zeigten sich Farbsignale von GFAP an der kranial gelegenen Seite der Lamina cribrosa, wo das Vorliegen neuronaler Hüllzellen zu erwarten ist. Das Vorkommen von GFAP wurde bereits für die olfaktorischen Hüllzellen beschrieben, welche um die axonalen Fortsätze der ORN liegen, die vom OE wegführen (Borgmann-Winter et al., 2015).

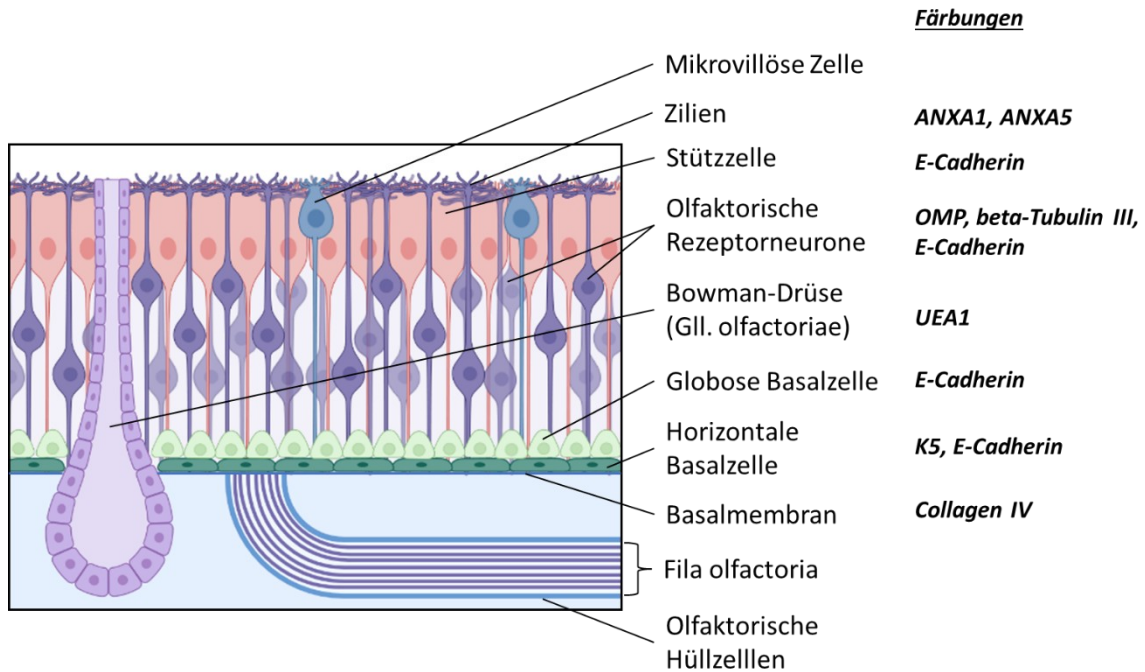


Abbildung 36: Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen am OE

Gezeigt ist eine schematische Abbildung des molekularen Aufbaus des OE mit Beschriftungen der wichtigsten Zelltypen. Rechts neben den Beschriftungen sind Marker aufgelistet, welche die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen aus der vorliegenden Arbeit präsentieren. Jedem Zelltyp sind dabei jene Marker zugeordnet, die an diesen Zellen lokalisiert werden konnten.

4.5.3 Zusammenfassung Charakterisierung des OE mit der Multiplexing Methode

- Bereits beschriebene Expressionsmuster einiger Marker am RE (K5, K19, E-Cadherin, ACE2, ANXA1) und am OE (OMP, beta-Tubulin III, K5, ANXA1, ANXA5, E-Cadherin, Collagen IV) konnten erneut bestätigt werden.
- Verschiedene Expressionen von ANXA5 am RE und OE konnten nachgewiesen werden. Der Unterschied im Expressionsmuster zwischen ANXA1 und ANXA5 an den Konzilien des OE könnten auf einen funktionellen Unterschied der beiden Proteine an diesem Epithel schließen lassen.
- UEA1 konnte am humanen OE nachgewiesen werden. Eine unterstützende Funktion in der Bindung und Wahrnehmung der Odoranten wäre denkbar.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblicke

4.6.1 *Schlussfolgerungen aus den methodischen Ergebnissen zur Autofluoreszenz-Reduktion und zur Antikörper-Entfernung*

Die Ansätze zur Autofluoreszenz-Reduktion konnten die erfolgreiche und überlegene Anwendung einer Sudanschwarz-Behandlung an Cryo-Schnitten bei immunhistochemischen Färbungen zeigen. Die Anwendung einer 0,1 % bis 0,3 % Sudanschwarz-Lösung erzielte hierbei insbesondere auf dem 488 nm Fluoreszenz-Kanal gute Ergebnisse. Allerdings stellte sich heraus, dass der Grad an Autofluoreszenz und dementsprechend auch die Notwendigkeit einer Autofluoreszenz-Reduktion von Probe zu Probe variierte, sodass insbesondere bei den größeren und älteren Cryo-Schnitten eine Autofluoreszenz-Reduktion demnach nicht zwingend erforderlich erschien (Klingenstein et al., 2026). Diese Beobachtung führt außerdem zu der Überlegung, ob sich der Grad an Autofluoreszenz speziell an neuronalen Gewebeproben mit dem Vorhandensein neurodegenerativer Erkrankungen verändert, weil es Anhaltspunkte gibt, wonach Lipofuszin-Ablagerungen und beispielsweise Morbus Parkinson in Zusammenhang stehen (Moreno-García et al., 2018). Hierzu müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, um einen solchen Zusammenhang genauer zu charakterisieren und zu spezifizieren. Daraus könnten sich einerseits direkte diagnostische Möglichkeiten ergeben, indem Lipofuszin mit Sudanschwarz angefärbt wird, und andererseits bestünde die Option einer optimierten Methodenanpassung zur Autofluoreszenz-Reduktion.

Anosmie, also der Verlust des Geruchssinns, kann ein klinisches Symptom bei Morbus Parkinson darstellen (Stern et al., 1994). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass sich insbesondere im olfaktorischen System viele Lipofuszin-Ansammlungen finden könnten, welche bei Immunfluoreszenz-Färbungen an entsprechenden Geweben wiederum zu einer besonders ausgeprägten Autofluoreszenz führen. Beispielsweise bei einer zu untersuchenden Probe eines Patienten mit Morbus Parkinson wäre demnach eine stärkere Lipofuszin-Autofluoreszenz zu erwarten, was in der angewendeten Methode berücksichtigt werden könnte, indem bei Färbungen direkt ergänzend mit 0,3 % Sudanschwarz-Lösung behandelt wird. Zudem erwies sich besonders bei mehrfacher

Anwendung einer Autofluoreszenz-Reduktion mit Sudanschwarz in Multiplexing Ansätzen mit zunehmender Rundenzahl eine reduzierte Behandlung als am vielversprechendsten, da sich sonst nach einigen Runden ein Nachlassen der Signalintensität der Färbungen einstellte.

Die Ergebnisse zur Antikörper-Entfernung stützen ebenfalls viele aktuelle Angaben in der Literatur, wonach sich eine BME/SDS-Lösung besser eignet als stark Hitze abhängige Verfahren wie die Anwendung eines Citrat-Puffers in der Mikrowelle (Willemsen et al., 2021, Ehrenberg et al., 2020). Das BME, mit der Fähigkeit zur Spaltung der Disulfidbrücken, greift an den Antikörpern der Färbung direkt an, wodurch die Entfernung gewährleistet ist.

Bei mehrfacher Anwendung der BME/SDS-Lösung in Multiplexing Ansätzen zeigte sich allerdings, dass insbesondere auf dem 647 nm Fluoreszenz-Kanal nicht jeder Antikörper komplett zuverlässig entfernt werden konnte. Es gibt Quellen die beschreiben, dass BME sich an die Proteine anlagert, mit welchen es reagiert. Dadurch könnte bei Anwendung in Multiplexing Ansätzen von mehr als drei Runden die Entfernung der Antikörper nicht mehr komplett gewährleistet sein, da die aufgetrennten Antikörper nicht mehr alle in Lösung gehen und abgewaschen werden können (Crivianu-Gaita et al., 2015).

Auf chemischer Ebene wäre deshalb auch die Anwendung von Dithiothreitol oder Dithiobutylamin zur Auftrennung der Antikörper denkbar, da diese ebenfalls an den Disulfidbrücken wirken (Crivianu-Gaita et al., 2015).

Eine Verwendung dieser Stoffe in Lösungen zur Antikörper-Entfernung im Rahmen von Multiplexing Ansätzen ist bisher nicht im großen Maß beschrieben, könnte aber noch eine Alternative zu BME darstellen und eventuell auch in größeren Multiplexing Ansätzen mit mehr als vier Runden zuverlässig wirken. Dies könnte ein Ansatz für weitere Untersuchungen darstellen, wobei allerdings auch die Schonung und Erhaltung des Gewebes gegeben bleiben sollte.

4.6.2 Die Multiplexing Methode als Chance für die Diagnostik der Zukunft

Im klinisch diagnostischen Kontext findet die Multiplexing Methode in der Literatur bereits häufig Erwähnung in Zusammenhang mit der Untersuchung der TMU. Der größte Vorteil des Multiplexing liegt darin, mehr als vier Marker gleichzeitig an

einem Schnitt darstellen zu können, womit eine genaue Analyse vieler Proteine gleichzeitig möglich ist. Auf Grundlage dieser Analysemuster ist nachfolgend eine spezifischere Klassifizierung des vorliegenden Tumor-Phänotyps und somit auch eine gezieltere Prognose über das Ansprechen eventueller Therapieversuche, beispielsweise durch Immuntherapie, möglich.

In einem Multiplexing Ansatz zur Untersuchung metastasierter Melanome konnte gezeigt werden, dass sich die Tumore in der Infiltration von Immunzellen unterscheiden, wobei vor allem die Lokalisation und die Art der infiltrierten Zellen für die Klassifizierung relevant waren (Halse et al., 2018). Eine weitere Studie konnte mithilfe der Multiplexing Methode die TMU von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen charakterisieren und eine höhere Rate an inaktiven infiltrierenden Immunzellen bei Tumoren mit einer Mutation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors feststellen (Toki et al., 2018). Daraus könnte sich eventuell ein schlechteres Ansprechen auf eine Immuntherapie mit manchen Checkpoint-Inhibitoren begründen (Toki et al., 2018).

In den meisten dieser Studien findet sich bisher die Anwendung einer TSA basierten Methode (häufig nach dem kostenintensiven Opal-Protokoll) an Paraffin-Schnitten. Mit der vorliegenden Arbeit konnte hingegen ein wenig kostenintensiver Multiplexing Ansatz an Cryo-Schnitten entwickelt und optimiert werden, der eine BME/SDS-Lösung zur Antikörper-Entfernung nutzt, welche in jedem Routinelabor angewendet werden kann. Mit den mehrfachen Färbungen und den danach folgenden Aufnahmen sowie Antikörper-Entfernungen konnte die Schwierigkeit des TSA basierten Opal-Protokolls umgangen werden, wonach die Anzahl der anwendbaren Sekundärantikörper durch die Interferenz der Wellenlängen immer noch begrenzt ist.

Das vorliegende etablierte Protokoll stellt somit eine einfache Alternative dar, welche ebenfalls zur Färbung vieler Marker für die Analyse von Tumorproben genutzt werden kann, zudem ohne beeinträchtigende Schädigung der Schnitte.

4.6.3 Ergänzendes Verständnis der Zusammensetzung und Funktion des OE beim Menschen

Viele der in den Multiplexing Ansätzen untersuchten Marker am OE konnten entsprechend den bisherigen Beschreibungen in der Literatur erneut bestätigt

werden. Es zeigten sich allerdings auch einzelne Abweichungen, für die verschiedene mögliche Ursachen in Betracht kommen.

Es ist bekannt, dass es altersbedingt zu Veränderungen am OE kommen kann, wobei sich diese insbesondere durch einen moderaten Rückgang der ORN und eine deutliche Reduktion an darstellbaren GBZ ausprägen können (Fitzek et al., 2022, Oliva et al., 2022, Child et al., 2018). Somit ist anzunehmen, dass die Regenerationsfähigkeit des olfaktorischen Systems mit dem Alter abnehmen kann und infolgedessen proliferative Marker vermindert oder nicht mehr an den Zellen des OE nachgewiesen werden können. Ergebnisse aktueller Studien lassen vermuten, dass die verminderte Anfärbbarkeit der GBZ im OE von Älteren weniger in einem aktiven Verlust dieses Zelltyps, sondern durch eine Umprogrammierung der HBZ begründet ist (Oliva et al., 2022).

Im Gegensatz zur Autofluoreszenz, wie es in obenstehenden Abschnitten diskutiert wurde, scheinen neurodegenerative Erkrankungen, beispielsweise Demenzen, keinen signifikanten Einfluss auf eine Degeneration des OE im Alter zu haben (Fitzek et al., 2022).

Dafür zeigen sich Hinweise, wonach große Operationen sowie altersbedingte Entzündungsprozesse die Funktionen des olfaktorischen Systems beeinträchtigen können (Lan et al., 2021, Child et al., 2018, Oliva et al., 2022).

Daraus kann zusammenfassend geschlossen werden, dass das Verständnis von altersbedingtem Umbau des OE bisher noch begrenzt und nicht abschließend analysiert ist.

Das Fehlen jeglicher positiver Signale von proliferativen Proteinen der GBZ, wie es aus den Multiplexing Ergebnissen hervorgeht, liefert hierbei einen weiteren Anhaltspunkt auf das Vorhandensein solcher altersbedingten Veränderungen am OE. Jedoch ist aufgrund mangelnder Informationen über den Krankheitsverlauf der Körperspender die genauere Aussage über die Wahrscheinlichkeit und die Genese einer olfaktorischen Degeneration nicht möglich. Es wären weiterführende Studien notwendig mit einer detaillierten Erfassung der Krankengeschichte der Probanden und Testung weiterer Marker, was mithilfe der Multiplexing Methode umfangreicheren Aufschluss liefern könnte über die pathophysiologischen Veränderungen des OE im Alter.

Zudem könnte ergänzend zu der Charakterisierung am OE eine Untersuchung der Expression von UEA1 am humanen Bulbus olfactorius von Interesse sein, um genauere Aussagen über das Vorhandensein dieses Agglutinins an weiteren neuronalen Strukturen treffen zu können, da sich hierzu bisher erst wenige Analysen finden (Nagao et al., 1993). Dieses Wissen könnte weitere Erkenntnisse zu möglichen Lectin und Agglutinin abhängigen Erkrankungen bringen und spezifischere Prognosen zu möglichen Auswirkungen solcher Krankheiten auf das olfaktorische System zulassen.

Die Expressionsmuster der Annexine am olfaktorischen System bieten ebenfalls interessante Anhaltspunkte für weitere Analysen mithilfe der Multiplexing Methode. Die vorhandenen Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die untersuchten Annexine ANXA1 und ANXA5 einen Unterschied in ihrem Signalmuster aufwiesen, wodurch verschiedene Funktionen ebenfalls denkbar wären. Eine Hypothese wäre, dass die beiden Annexine die Bindung von verschiedenen Odoranten an den ORN unterstützen und modulieren. Es bedarf jedoch noch weiterer Forschungen, um die Kenntnisse über die Annexine am OE zu vertiefen und spezifischere Zusammenhänge darstellen zu können.

Der Geruchssinn beschäftigt die Forschung schon lange und über das OE ist bereits vieles bekannt – dennoch ergeben sich weiterhin Fragen, auf die es bislang keine Antworten gibt. Mit der Idee der Multiplexing Methode ist ein neuer Ansatz geschaffen worden, mit dem noch detailliertere Untersuchungen von Proben möglich sind. Daraus eröffnen sich sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die klinische Diagnostik ergänzende Möglichkeiten, mit denen eventuell auch die Fragen nach der genauen Pathophysiologie des alternden OE mit seinen Einflussfaktoren sowie die genauen funktionellen Unterschiede der Annexine am OE noch weiter eruiert werden können.

5 Zusammenfassung

Zur Etablierung einer einfach anwendbaren Multiplexing Methode an großen Cryo-Schnitten sollten in einem experimentellen Projekt mehrere Ansätze miteinander verglichen und optimiert werden. Dafür wurden drei verschiedene Antikörper-Entfernungsmethoden getestet. Diese Methode wurde um eine weitere Technik zur Reduktion der Autofluoreszenz ergänzt.

Auf Grundlage dieser Multiplexing Methode strebte die Arbeit die indirekte Immunhistochemie-Färbung von mehr als vier verschiedenen Markern an einem Nasenlängsschnitt mit respiratorischem Epithel (RE) und olfaktorischem Epithel (OE) an. Dadurch sollte eine detaillierte Untersuchung der Proteinexpressionen am RE und OE möglich sein. Für die Etablierung der unterschiedlichen Methoden standen kleinere (zwischen etwa 3 – 10 Millimeter breit und hoch) humane Gewebeproben mit RE und große (etwa 21 x 33 Millimeter) isolierte Nasenlängsschnitte mit RE und OE zur Verfügung.

Die Versuche zur Autofluoreszenz-Reduktion zeigten an kleinen Cryo-Schnitten mit RE die vielversprechendsten Ergebnisse bei der Anwendung von 0,3 % (w/v) Sudanschwarz in 70 %-igem Ethanol für 3 – 5 Minuten, mit Waschschritten in Ethanol und PBS. Einige Quellen zeigen vergleichbare Ergebnisse an anderen Gewebetypen. Für die größeren Nasenlängsschnitte ergab sich eine – in der Inkubationszeit und/oder in der Konzentration – reduzierte Sudanschwarz-Anwendung zur Reduktion der Autofluoreszenz bereits als ausreichend. Es wurde festgestellt, dass an den Nasenlängsschnitten auf eine Autofluoreszenz-Reduktion verzichtet werden konnte.

Als effizienteste Antikörper-Entfernungsmethode für die Anwendung am RE stellte sich die BME/SDS-Lösung für 30 Minuten im Wasserbad heraus. Ähnliche Ergebnisse sind bereits von anderen Autoren beschrieben worden. Nahezu alle Antikörper-Farbsignale sowie die Sudanschwarz-Reste auf den Schnitten konnten erfolgreich entfernt werden. Zudem konnte nach mehrfacher Verwendung der Lösung keine Störung der Gewebeintegrität festgestellt werden. Die BME/SDS-Lösung als effektive Antikörper-Entfernung für einen Multiplexing Ansatz konnte für die Anwendung am OE bestätigt und optimiert werden.

Die optimierte Multiplexing Methode für Nasenlängsschnitte wurde in zwei finalen Durchgängen am OE angewendet. Dabei konnten im ersten Ansatz in drei Runden neun Marker und im zweiten Ansatz in vier Runden zwölf Marker gefärbt werden. Von den unterschiedlichen Markern konnten zehn als positiv nachgewiesen werden, wovon sich wiederum acht positiv am OE darstellten. In Test-Ansätzen waren mit der optimierten Multiplexing Methode sogar bis zu fünf Färbungen hintereinander an einem Schnitt möglich.

An den Basalzellen der Epithelien zeigte sich das Keratin 5 (K5) positiv. E-Cadherin veranschaulichte die Zellgrenzen der Epithelzellen, wohingegen sich Collagen IV spezifisch an der Basalmembran finden ließ. Die olfaktorischen Rezeptorneurone konnten mit dem olfaktorischen Marker-Protein (OMP) und beta-Tubulin III dargestellt werden. Das Signal des Lektins Ulex Europaeus Agglutinin 1 (UEA1) war an intraepithelialen Zellen (wahrscheinlich den Bowman-Drüsen) und apikal am OE (wahrscheinlich der Schleimschicht) lokalisiert. Diese Expression konnte in anderen Studien ebenfalls bereits nachgewiesen werden, jedoch nicht an humanem Gewebe. Die dortige Funktion des UEA1 müsste, auch im eventuellen Zusammenhang mit pathologischen Prozessen, erst weiter erforscht werden. Annexin 1 (ANXA1) und Annexin 5 (ANXA5) konnten beide an den Zilien des OE, allerdings mit unterschiedlichen Expressionsmustern gezeigt werden. Hierbei fiel insbesondere der Unterschied im Expressionsmuster von ANXA5 zwischen RE und OE auf. Dies könnte ein Hinweis auf funktionelle Differenzen des Proteins an den beiden Epithelien sein. Eine derartige Beschreibung findet sich bisher nicht.

Die aus den einzelnen Stufen erfolgreich entwickelte Multiplexing Methode ergibt einen einfachen, kostengünstigen und gewebesparenden Ansatz zur Untersuchung vieler Marker an einem Cryo-Schnitt. Dies bietet die Möglichkeit grundlegende und variable Proteinexpressionen im RE und OE detektieren zu können, um weitere Erkenntnisse über diese Epithelien zu erlangen.

6 Anhang

6.1 Negativkontrollen der Multiplexing Ansätze an Nasenlängsschnitten von H80 mit OE

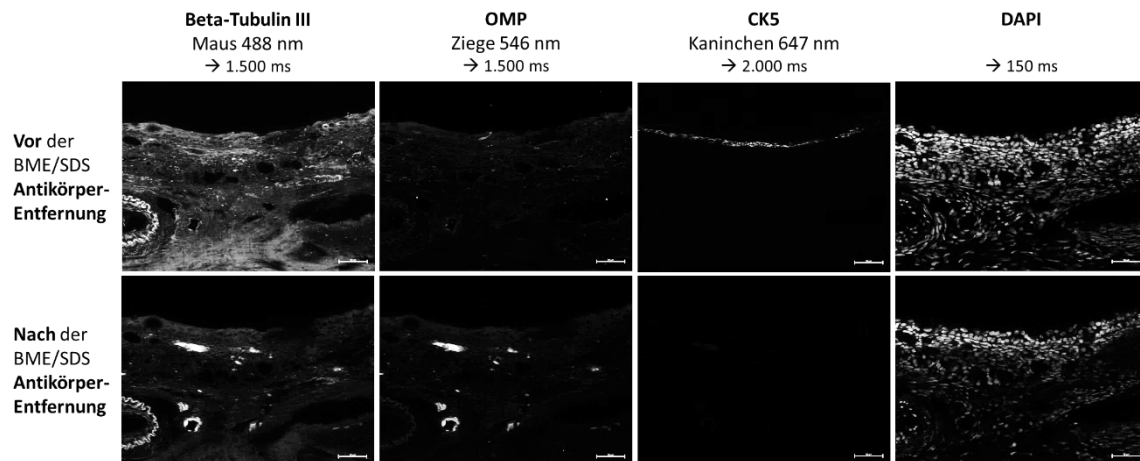


Abbildung 37: Negativkontrollen von Färbung 1 der Multiplexing Ansätze an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE

Gezeigt sind Aufnahmen vor der Antikörper-Entfernung, mit den positiven Signalen der Färbung, in der oberen Zeile und Aufnahmen nach der Antikörper-Entfernung in der unteren Zeile, wobei die Schnitte nur noch mit den Sekundärantikörpern inkubiert wurden. Für jeden Kanal wurden dabei die gleichen Belichtungszeiten verwendet. Die Färbung konnte erfolgreich entfernt werden.

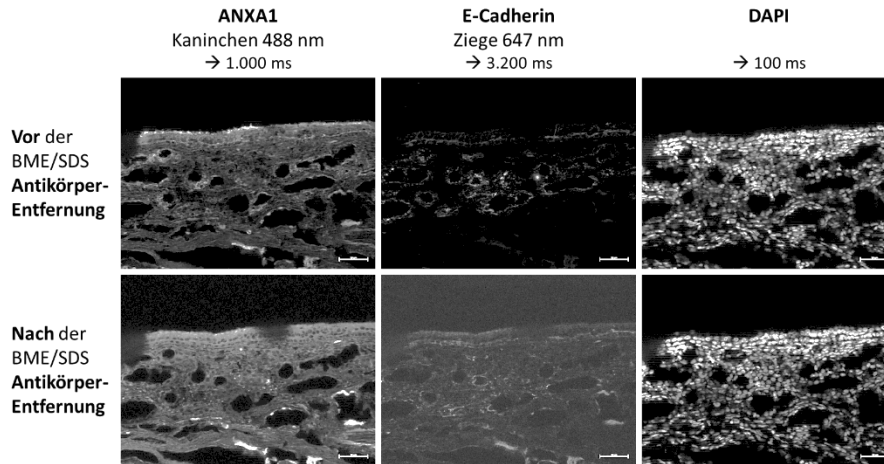


Abbildung 38: Negativkontrollen von Färbung 2 des ersten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE

Der dargestellte Ausschnitt konnte in der ersten Färbung als OE nachgewiesen werden. Die Aufnahmen in der oberen Zeile stellen den Schnitt vor der Antikörper-Entfernung dar (mit den positiven Signalen der Färbung). In der unteren Zeile zeigen sich Aufnahmen derselben Epithelstelle nach der Antikörper-Entfernung als Negativkontrolle mit der Inkubation von nur Sekundärantikörpern. Jeder Kanal wurde vor und nach der Entfernung mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Auf allen Kanälen wurde die Färbung erfolgreich entfernt. Allerdings war das positive Signal von E-Cadherin sehr schwach und nach der Antikörper-Entfernung stellte sich auf dem 647 nm Kanal eine stärkere unspezifische Hintergrund-Färbung dar.

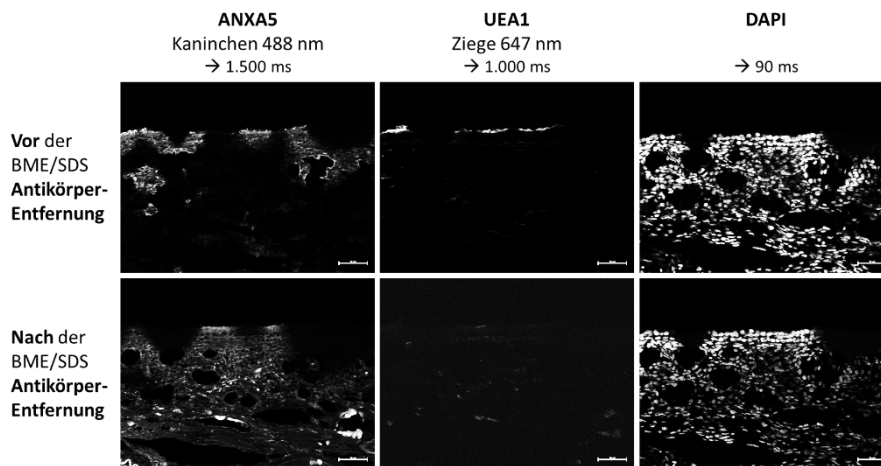


Abbildung 39: Negativkontrollen von Färbung 2 und Färbung 4 des zweiten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE

Es wurden Negativkontrollen der positiven Marker aus Färbung 2 (UEA1) und Färbung 4 (ANXA5) des zweiten Multiplexing Ansatzes an H80 durchgeführt. Die Bilder vor und nach der Antikörper-Entfernung wurden auf jedem Kanal mit je der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Dabei erfolgte nach der Antikörper-Entfernung nur die Inkubation mit Sekundärantikörpern. Die positiven Antikörperfärbungen konnten erfolgreich entfernt werden.

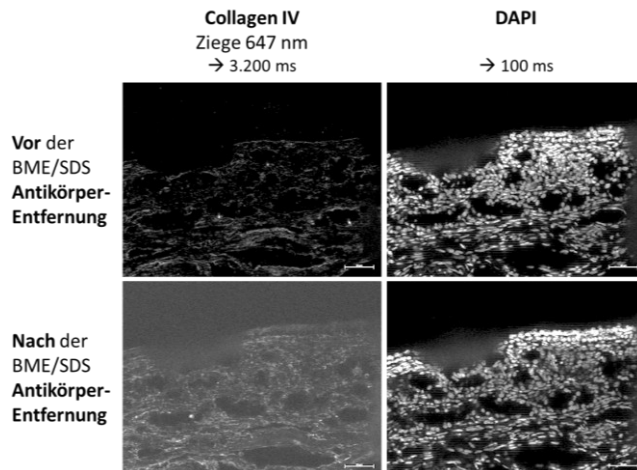


Abbildung 40: Negativkontrollen von Färbung 3 des ersten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80 mit OE

Dargestellt sind Aufnahmen vor der Antikörper-Entfernung mit dem positiven Marker der dritten Färbung des ersten Multiplexing Ansatzes an H80 und Aufnahmen der Negativkontrolle nach der Antikörper-Entfernung, welche mit Sekundärantikörpern inkubiert wurde. Für die Aufnahmen eines Fluoreszenz-Kanals wurden je die gleichen Belichtungszeiten verwendet. Die Antikörper-Entfernung war erfolgreich, allerdings war die Färbung des Collagen IV auf dem 647 nm Kanal sehr schwach und wie in der zweiten Färbung zeigt sich hier ein weiter verstärktes unspezifisches Hintergrund-Signal nach der Antikörper-Entfernung.

6.2 Ergänzende Abbildung des zweiten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80

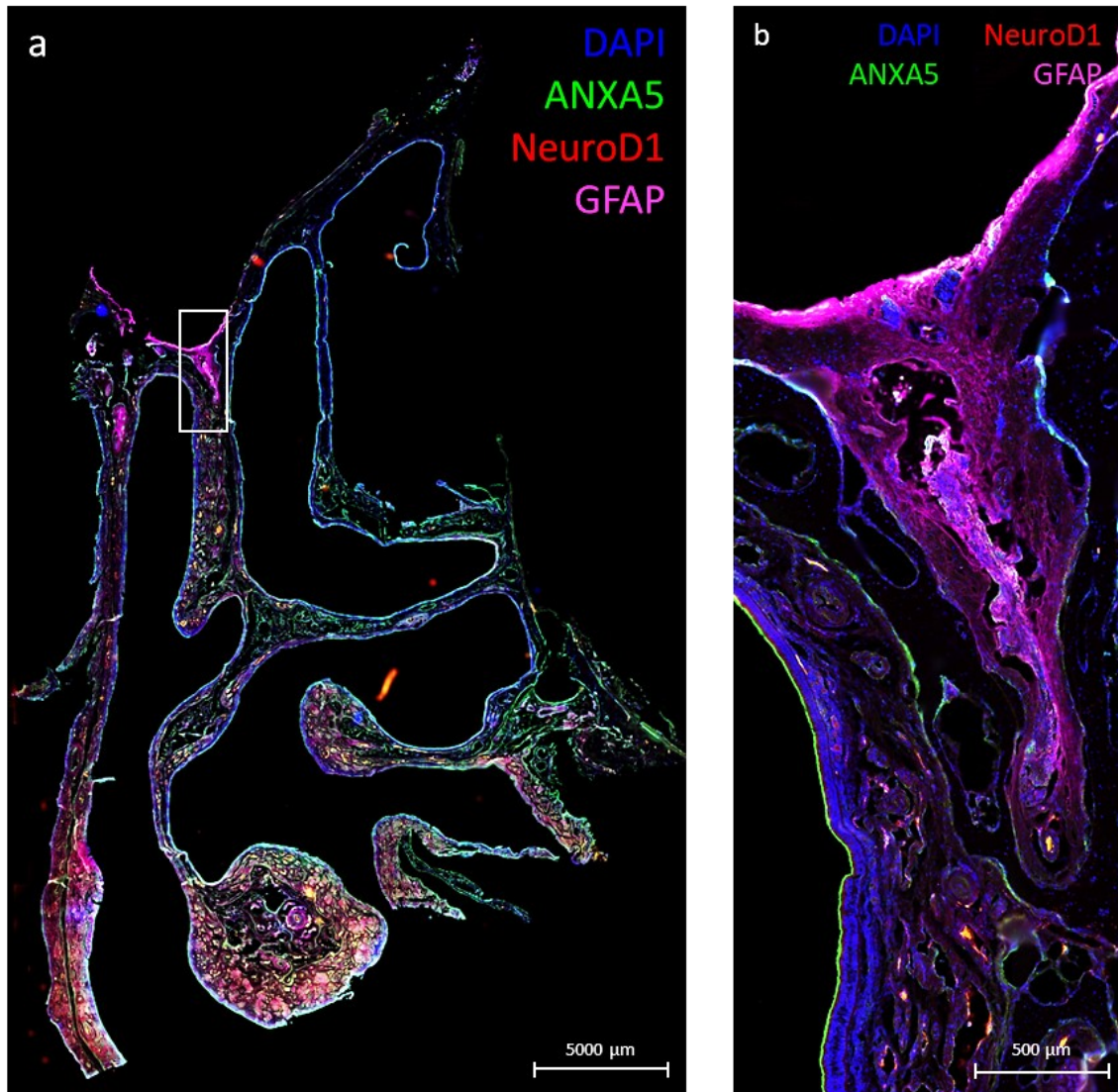


Abbildung 41: Vierte Färbung des zweiten Multiplexing Ansatzes an einem Nasenlängsschnitt von H80

Färbung: ANXA5 Kaninchen 488 nm (Grün) + NeuroD1 Maus 546 nm (Rot) + GFAP Ziege 647 nm (Magenta) + DAPI (Blau)

Gezeigt ist die vierte Runde des zweiten Multiplexing Ansatzes an einem Schnitt von H80, nach dem Protokoll für große Schnitte.

[a] Dargestellt ist der in der im zweiten Multiplexing Ansatz gefärbte Nasenlängsschnitt von H80 zur Übersicht. Es zeigen sich eine Kernfärbung mit DAPI in Blau, ANXA5 in Grün, NeuroD1 in Rot und GFAP in Magenta. Der weiß eingerahmte Abschnitt am Nasendach und der kranialen Seite der Lamina cribrosa ist in **[b]** freigestellt.

Maßstabsbalken 5000 µm

[b] Gezeigt ist der in **[a]** markierte Bereich welcher herausgestellt und vergrößert wurde, wobei die dargestellten Marker und Farben denen in **[a]** entsprechen. Der Ausschnitt stellt im nasalen Anteil nur RE, kein OE, das Nasendach und die kraniale Seite der Lamina cribrosa dar. ANXA5 präsentiert sich apikal am RE als durchgängiges Signal. Die Expression von GFAP ist insbesondere an der kranialen Seite der Lamina cribrosa sowie an einer Richtung kranial zuführenden Struktur deutlich stark ausgeprägt.

Maßstabsbalken 500 µm

(Modifiziert nach Klingenstein et al, 2026, Experimental and Molecular Pathology)

7 Literaturverzeichnis:

- Adams, D. L., Alpaugh, R. K., Tsai, S., Tang, C. M. & Stefansson, S. 2016. Multi-Phenotypic subtyping of circulating tumor cells using sequential fluorescent quenching and restaining. *Sci Rep*, 6, 33488. doi:10.1038/srep33488
- Akins, M. R., Benson, D. L. & Greer, C. A. 2007. Cadherin expression in the developing mouse olfactory system. *J Comp Neurol*, 501, 483-97. doi:10.1002/cne.21270
- Angelo, M., Bendall, S. C., Finck, R., Hale, M. B., Hitzman, C., Borowsky, A. D., Levenson, R. M., Lowe, J. B., Liu, S. D., Zhao, S., Natkunam, Y. & Nolan, G. P. 2014. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med*, 20, 436-42. doi:10.1038/nm.3488
- Barber, P. C. 1989. Ulex europeus agglutinin I binds exclusively to primary olfactory neurons in the rat nervous system. *Neuroscience*, 30, 1-9. doi:10.1016/0306-4522(89)90348-5
- Baschong, W., Suetterlin, R. & Laeng, R. H. 2001. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem*, 49, 1565-72. doi:10.1177/002215540104901210
- Beites, C. L., Kawauchi, S., Crocker, C. E. & Calof, A. L. 2005. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res*, 306, 309-16. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.027
- Boisson, A., Noël, G., Saiselet, M., Rodrigues-Vitória, J., Thomas, N., Fontsa, M. L., Sofronii, D., Naveaux, C., Duvillier, H., Craciun, L., Larsimont, D., Awada, A., Detours, V., Willard-Gallo, K. & Garaud, S. 2021. Fluorescent Multiplex Immunohistochemistry Coupled With Other State-Of-The-Art Techniques to Systematically Characterize the Tumor Immune Microenvironment. *Front Mol Biosci*, 8, 673042. doi:10.3389/fmolb.2021.673042
- Borgmann-Winter, K., Willard, S. L., Sinclair, D., Mirza, N., Turetsky, B., Berretta, S. & Hahn, C. G. 2015. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. *Transl Psychiatry*, 5, e527. doi:10.1038/tp.2014.141
- Brosel, S., Grothe, B. & Kunz, L. 2018. An auditory brainstem nucleus as a model system for neuronal metabolic demands. *Eur J Neurosci*, 47, 222-235. doi:10.1111/ejn.13789
- Bryche, B., Baly, C. & Meunier, N. 2021. Modulation of olfactory signal detection in the olfactory epithelium: focus on the internal and external environment, and the emerging role of the immune system. *Cell Tissue Res*, 384, 589-605. doi:10.1007/s00441-021-03467-y
- Child, K. M., Herrick, D. B., Schwob, J. E., Holbrook, E. H. & Jang, W. 2018. The Neuroregenerative Capacity of Olfactory Stem Cells Is Not Limitless: Implications for Aging. *J Neurosci*, 38, 6806-6824. doi:10.1523/JNEUROSCI.3261-17.2018
- Crivianu-Gaita, V., Romaschin, A. & Thompson, M. 2015. High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from

- F(ab)(2) units. *Biochem Biophys Rep*, 2, 23-28.
doi:10.1016/j.bbrep.2015.04.004
- Di Guardo, G. 2015. Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *Eur J Histochem*, 59, 2485. doi:10.4081/ejh.2015.2485
- Diakonova, M., Gerke, V., Ernst, J., Liautard, J. P., van der Vusse, G. & Griffiths, G. 1997. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci*, 110 (Pt 10), 1199-213.
doi:10.1242/jcs.110.10.1199
- Dibattista, M., Al Koborssy, D., Genovese, F. & Reisert, J. 2021. The functional relevance of olfactory marker protein in the vertebrate olfactory system: a never-ending story. *Cell Tissue Res*, 383, 409-427. doi:10.1007/s00441-020-03349-9
- Doyle, K. L., Cunha, C., Hort, Y., Tasan, R., Sperk, G., Shine, J. & Herzog, H. 2018. Role of neuropeptide Y (NPY) in the differentiation of Trpm-5-positive olfactory microvillar cells. *Neuropeptides*, 68, 90-98.
doi:10.1016/j.npep.2018.02.007
- Dreier, R., Schmid, K. W., Gerke, V. & Riehemann, K. 1998. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol*, 110, 137-48.
doi:10.1007/s004180050275
- Dunkenberger, L., Zapata, A. & Del Valle, L. 2022. Multiplexing and Spectral Microscopy. *Methods Mol Biol*, 2422, 163-177. doi:10.1007/978-1-0716-1948-3_11
- Ehlers, L., Kirchner, M., Mertins, P., Strehl, C., Buttgereit, F. & Gaber, T. 2022. The Anti-Glucocorticoid Receptor Antibody Clone 5E4: Raising Awareness of Unspecific Antibody Binding. *Int J Mol Sci*, 23.
doi:10.3390/ijms23095049
- Ehrenberg, A. J., Morales, D. O., Piergies, A. M. H., Li, S. H., Tejedor, J. S., Mladinov, M., Mulder, J. & Grinberg, L. T. 2020. A manual multiplex immunofluorescence method for investigating neurodegenerative diseases. *J Neurosci Methods*, 339, 108708.
doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108708
- Erben, T., Ossig, R., Naim, H. Y. & Schnekenburger, J. 2016. What to do with high autofluorescence background in pancreatic tissues - an efficient Sudan black B quenching method for specific immunofluorescence labelling. *Histopathology*, 69, 406-22. doi:10.1111/his.12935
- Escada, P. A., Lima, C. & da Silva, J. M. 2009. The human olfactory mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 266, 1675-80. doi:10.1007/s00405-009-1073-x
- Evangelou, K. & Gorgoulis, V. G. 2017. Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. *Methods Mol Biol*, 1534, 111-119. doi:10.1007/978-1-4939-6670-7_10
- Farbman, A. I. & Margolis, F. L. 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol*, 74, 205-15.
doi:10.1016/0012-1606(80)90062-7

- Felsenthal, N. & Zelzer, E. 2021. Immunofluorescent Staining of Adult Murine Paraffin-Embedded Skeletal Tissue. *Methods Mol Biol*, 2230, 337-344. doi:10.1007/978-1-0716-1028-2_19
- Fitzek, M., Patel, P. K., Solomon, P. D., Lin, B., Hummel, T., Schwob, J. E. & Holbrook, E. H. 2022. Integrated age-related immunohistological changes occur in human olfactory epithelium and olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 530, 2154-2175. doi:10.1002/cne.25325
- Francisco-Cruz, A., Parra, E. R., Tetzlaff, M. T. & Wistuba, II 2020. Multiplex Immunofluorescence Assays. *Methods Mol Biol*, 2055, 467-495. doi:10.1007/978-1-4939-9773-2_22
- Gendusa, R., Scalia, C. R., Buscone, S. & Cattoretti, G. 2014. Elution of High-affinity (>10⁹ KD) Antibodies from Tissue Sections: Clues to the Molecular Mechanism and Use in Sequential Immunostaining. *J Histochem Cytochem*, 62, 519-31. doi:10.1369/0022155414536732
- Gerke, V. & Moss, S. E. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, 82, 331-71. doi:10.1152/physrev.00030.2001
- Giambanco, I., Verzini, M. & Donato, R. 1993. Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development: immunochemical measurements. *Biochem Biophys Res Commun*, 196, 1221-6. doi:10.1006/bbrc.1993.2382
- Halse, H., Colebatch, A. J., Petrone, P., Henderson, M. A., Mills, J. K., Snow, H., Westwood, J. A., Sandhu, S., Raleigh, J. M., Behren, A., Cebon, J., Darcy, P. K., Kershaw, M. H., McArthur, G. A., Gyorki, D. E. & Neeson, P. J. 2018. Multiplex immunohistochemistry accurately defines the immune context of metastatic melanoma. *Sci Rep*, 8, 11158. doi:10.1038/s41598-018-28944-3
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G. & van Goor, H. 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*, 203, 631-7. doi:10.1002/path.1570
- Harkema, J. R., Carey, S. A. & Wagner, J. G. 2006. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol*, 34, 252-69. doi:10.1080/01926230600713475
- Holbrook, E. H., Wu, E., Curry, W. T., Lin, D. T. & Schwob, J. E. 2011. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope*, 121, 1687-701. doi:10.1002/lary.21856
- Hong, G., Fan, S., Phyu, T., Maheshwari, P., Hoppe, M. M., Phuong, H. M., de Mel, S., Poon, M., Ng, S. B. & Jeyasekharan, A. D. 2019. Multiplexed Fluorescent Immunohistochemical Staining, Imaging, and Analysis in Histological Samples of Lymphoma. *J Vis Exp*. doi:10.3791/58711
- Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S. & McCray, P. B., Jr. 2005. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*, 79, 14614-21. doi:10.1128/jvi.79.23.14614-14621.2005
- Jia, K., Chen, Y., Sun, Y., Hu, Y., Jiao, L., Ma, J., Yuan, J., Qi, C., Li, Y., Gong, J., Gao, J., Zhang, X., Li, J., Zhang, C. & Shen, L. 2022. Multiplex

- immunohistochemistry defines the tumor immune microenvironment and immunotherapeutic outcome in CLDN18.2-positive gastric cancer. *BMC Med*, 20, 223. doi:10.1186/s12916-022-02421-1
- Jones, N. 2001. The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv Drug Deliv Rev*, 51, 5-19. doi:10.1016/s0169-409x(01)00172-7
- Kaufmann, S. H. E. 2019. Immunology's Coming of Age. *Front Immunol*, 10, 684. doi:10.3389/fimmu.2019.00684
- Keren, L., Bosse, M., Marquez, D., Angoshtari, R., Jain, S., Varma, S., Yang, S. R., Kurian, A., Van Valen, D., West, R., Bendall, S. C. & Angelo, M. 2018. A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging. *Cell*, 174, 1373-1387.e19. doi:10.1016/j.cell.2018.08.039
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. & Hudson, B. G. 2008. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech*, 71, 357-70. doi:10.1002/jemt.20564
- Klingenstein, M., Klingenstein, S., Neckel, P. H., Mack, A. F., Wagner, A. P., Kleger, A., Liebau, S. & Milazzo, A. 2020. Evidence of SARS-CoV2 Entry Protein ACE2 in the Human Nose and Olfactory Bulb. *Cells Tissues Organs*, 209, 155-164. doi:10.1159/000513040
- Klingenstein, S., Grünig, J., Neckel, P. H., Hirt, B., Liebau, S. & Klingenstein, M. 2026. Optimized manual multiplex immunofluorescence protocol for human nasal tissue. *Exp Mol Pathol*, 145, 105028. doi:10.1016/j.yexmp.2026.105028
- Kolenc, O. I. & Quinn, K. P. 2019. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid Redox Signal*, 30, 875-889. doi:10.1089/ars.2017.7451
- Kosaka, K., Sawai, K., Tanaka, C., Imafuji, M., Kamei, A. & Kosaka, T. 2009. Distinct domainial and lamellar distribution of clustered lipofuscin granules in microglia in the main olfactory bulb of young mice. *Neurosci Res*, 65, 286-95. doi:10.1016/j.neures.2009.08.001
- Koujitani, T., Yasuhara, K., Toyosawa, K., Shimada, A., Onodera, H., Takagi, H., Tamura, T., Hirose, M. & Mitsumori, K. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural studies of 2,6-dimethylaniline-induced nasal proliferative lesions in a rat two-stage nasal carcinogenesis model initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol Pathol*, 29, 300-7. doi:10.1080/019262301316905255
- Kuhlmann, K., Tschapek, A., Wiese, H., Eisenacher, M., Meyer, H. E., Hatt, H. H., Oeljeklaus, S. & Warscheid, B. 2014. The membrane proteome of sensory cilia to the depth of olfactory receptors. *Mol Cell Proteomics*, 13, 1828-43. doi:10.1074/mcp.M113.035378
- Lan, H. Y., Mu, W., Nikolic-Paterson, D. J. & Atkins, R. C. 1995. A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens. *J Histochem Cytochem*, 43, 97-102. doi:10.1177/43.1.7822770
- Lan, Y., You, Z. J., Du, R., Chen, L. S. & Wu, J. X. 2021. Association of Olfactory Impairment and Postoperative Cognitive Dysfunction in Elderly Patients. *Front Mol Biosci*, 8, 681463. doi:10.3389/fmolb.2021.681463

- Lee, K. H., Park, C., Bang, H., Ahn, M., Moon, C., Kim, S. & Shin, T. 2016. Histochemical study of the olfactory mucosae of the horse. *Acta Histochem*, 118, 361-8. doi:10.1016/j.acthis.2016.03.006
- Leopold, D. A., Hummel, T., Schwob, J. E., Hong, S. C., Knecht, M. & Kobal, G. 2000. Anterior distribution of human olfactory epithelium. *Laryngoscope*, 110, 417-21. doi:10.1097/00005537-200003000-00016
- Li, Y., Wang, J., He, H. Y., Ma, L. J., Zeng, J., Deng, G. C., Liu, X., Engelhardt, J. F. & Wang, Y. 2011. Immunohistochemical demonstration of airway epithelial cell markers of guinea pig. *Tissue Cell*, 43, 283-90. doi:10.1016/j.tice.2011.05.003
- Luo, W., Fang, W., Li, S. & Yao, K. 2012. Aberrant expression of nuclear vimentin and related epithelial-mesenchymal transition markers in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 131, 1863-73. doi:10.1002/ijc.27467
- Ma, H. & O'Kennedy, R. 2015. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods Mol Biol*, 1348, 7-11. doi:10.1007/978-1-4939-2999-3_2
- Mayran, N., Traverso, V., Maroux, S. & Massey-Harroche, D. 1996. Cellular and subcellular localizations of annexins I, IV, and VI in lung epithelia. *Am J Physiol*, 270, L863-71. doi:10.1152/ajplung.1996.270.5.L863
- Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129, 705-33. doi:10.1007/s00418-008-0435-6
- Monici, M. 2005. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 227-56. doi:10.1016/s1387-2656(05)11007-2
- Monti-Graziadei, G. A., Margolis, F. L., Harding, J. W. & Graziadei, P. P. 1977. Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *J Histochem Cytochem*, 25, 1311-6. doi:10.1177/25.12.336785
- Moran, D. T., Rowley, J. C., 3rd & Jafek, B. W. 1982a. Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res*, 253, 39-46. doi:10.1016/0006-8993(82)90671-0
- Moran, D. T., Rowley, J. C., Jafek, B. W. & Lovell, M. A. 1982b. The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology*, 11, 721-746. doi:10.1007/BF01153516
- Moreno-García, A., Kun, A., Calero, O., Medina, M. & Calero, M. 2018. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front Neurosci*, 12, 464. doi:10.3389/fnins.2018.00464
- Moreno, V., Smith, E. A. & Piña-Oviedo, S. 2022. Fluorescent Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 2422, 131-146. doi:10.1007/978-1-0716-1948-3_9
- Morrison, E. E. & Costanzo, R. M. 1990. Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 297, 1-13. doi:10.1002/cne.902970102
- Moss, S. E. & Morgan, R. O. 2004. The annexins. *Genome Biol*, 5, 219. doi:10.1186/gb-2004-5-4-219
- Nagao, M., Oka, N., Kamo, H., Akiguchi, I. & Kimura, J. 1993. Ulex europaeus I and glycine max bind to the human olfactory bulb. *Neurosci Lett*, 164, 221-4. doi:10.1016/0304-3940(93)90896-s

- Nagayama, S., Homma, R. & Imamura, F. 2014. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits*, 8, 98. doi:10.3389/fncir.2014.00098
- Nishijima, H., Zunitch, M. J., Yoshida, M., Kondo, K., Yamasoba, T., Schwob, J. E. & Holbrook, E. H. 2022. Rapid fluorescent vital imaging of olfactory epithelium. *iScience*, 25, 104222. doi:10.1016/j.isci.2022.104222
- O'Brien, P. J. 2000. Peroxidases. *Chem Biol Interact*, 129, 113-39. doi:10.1016/s0009-2797(00)00201-5
- Oliva, A. D., Gupta, R., Issa, K., Abi Hachem, R., Jang, D. W., Wellford, S. A., Moseman, E. A., Matsunami, H. & Goldstein, B. J. 2022. Aging-related olfactory loss is associated with olfactory stem cell transcriptional alterations in humans. *J Clin Invest*, 132. doi:10.1172/jci155506
- Packard, A., Giel-Moloney, M., Leiter, A. & Schwob, J. E. 2011. Progenitor cell capacity of NeuroD1-expressing globose basal cells in the mouse olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 519, 3580-96. doi:10.1002/cne.22726
- Packard, A. I., Lin, B. & Schwob, J. E. 2016. Sox2 and Pax6 Play Counteracting Roles in Regulating Neurogenesis within the Murine Olfactory Epithelium. *PLoS One*, 11, e0155167. doi:10.1371/journal.pone.0155167
- Parra, E. R., Francisco-Cruz, A. & Wistuba, II 2019. State-of-the-Art of Profiling Immune Contexture in the Era of Multiplexed Staining and Digital Analysis to Study Paraffin Tumor Tissues. *Cancers (Basel)*, 11. doi:10.3390/cancers11020247
- Peng, B., Guo, C., Guan, H., Liu, S. & Sun, M. Z. 2014. Annexin A5 as a potential marker in tumors. *Clin Chim Acta*, 427, 42-8. doi:10.1016/j.cca.2013.09.048
- Pirici, D., Mogoanta, L., Kumar-Singh, S., Pirici, I., Margaritescu, C., Simionescu, C. & Stanescu, R. 2009. Antibody elution method for multiple immunohistochemistry on primary antibodies raised in the same species and of the same subtype. *J Histochem Cytochem*, 57, 567-75. doi:10.1369/jhc.2009.953240
- Plendl, J. & Sinowatz, F. 1998. Glycobiology of the olfactory system. *Acta Anat (Basel)*, 161, 234-53. doi:10.1159/000046461
- Ramos-Vara, J. A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42, 405-26. doi:10.1354/vp.42-4-405
- Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W., Hauptmann, R., Maassen, C., van Gool, R. G., de Leeuw, P. & Tiebosch, A. 1994. Differential tissue expression of Annexin VIII in human. *FEBS Lett*, 349, 120-4. doi:10.1016/0014-5793(94)00559-1
- Ricciuti, A., De Remigis, A., Landek-Salgado, M. A., De Vincentiis, L., Guaraldi, F., Lupi, I., Iwama, S., Wand, G. S., Salvatori, R. & Caturegli, P. 2014. Detection of pituitary antibodies by immunofluorescence: approach and results in patients with pituitary diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 99, 1758-66. doi:10.1210/jc.2014-1049
- Romijn, H. J., van Uum, J. F., Breedijk, I., Emmering, J., Radu, I. & Pool, C. W. 1999. Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence

- microscopy. *J Histochem Cytochem*, 47, 229-36.
doi:10.1177/002215549904700211
- Roskams, A. J., Cai, X. & Ronnett, G. V. 1998. Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience*, 83, 191-200. doi:10.1016/s0306-4522(97)00344-8
- Roversi, F. M., Bueno, M. L. P., da Silva, J. A. F., Assis-Mendonça, G. R. & Saad, S. T. O. 2023. Optimized multiplex immunofluorescence for the characterization of tumor immune microenvironment in neoplastic paraffin-preserved tissues. *J Cell Commun Signal*. doi:10.1007/s12079-023-00753-y
- Schnell, S. A., Staines, W. A. & Wessendorf, M. W. 1999. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem*, 47, 719-30. doi:10.1177/002215549904700601
- Stern, M. B., Doty, R. L., Dotti, M., Corcoran, P., Crawford, D., McKeown, D. A., Adler, C., Gollomp, S. & Hurtig, H. 1994. Olfactory function in Parkinson's disease subtypes. *Neurology*, 44, 266-8. doi:10.1212/wnl.44.2.266
- Sun, Y., Yu, H., Zheng, D., Cao, Q., Wang, Y., Harris, D. & Wang, Y. 2011. Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. *Arch Pathol Lab Med*, 135, 1335-42. doi:10.5858/arpa.2010-0549-OA
- Sun, Z., Nyberg, R., Wu, Y., Bernard, B. & Redmond, W. L. 2021. Developing an enhanced 7-color multiplex IHC protocol to dissect immune infiltration in human cancers. *PLoS One*, 16, e0247238.
doi:10.1371/journal.pone.0247238
- Tan, W. C. C., Nerurkar, S. N., Cai, H. Y., Ng, H. H. M., Wu, D., Wee, Y. T. F., Lim, J. C. T., Yeong, J. & Lim, T. K. H. 2020. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun (Lond)*, 40, 135-153.
doi:10.1002/cac2.12023
- Tanos, T., Saibene, A. M., Pipolo, C., Battaglia, P., Felisati, G. & Rubio, A. 2017. Isolation of putative stem cells present in human adult olfactory mucosa. *PLoS One*, 12, e0181151. doi:10.1371/journal.pone.0181151
- Toki, M. I., Mani, N., Smithy, J. W., Liu, Y., Altan, M., Wasserman, B., Tuktamyshov, R., Schalper, K., Syrigos, K. N. & Rimm, D. L. 2018. Immune Marker Profiling and Programmed Death Ligand 1 Expression Across NSCLC Mutations. *J Thorac Oncol*, 13, 1884-1896.
doi:10.1016/j.jtho.2018.09.012
- Tornehave, D., Hougaard, D. M. & Larsson, L. 2000. Microwaving for double indirect immunofluorescence with primary antibodies from the same species and for staining of mouse tissues with mouse monoclonal antibodies. *Histochem Cell Biol*, 113, 19-23. doi:10.1007/s004180050002
- Tóth, Z. E. & Mezey, E. 2007. Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *J Histochem Cytochem*, 55, 545-54.
doi:10.1369/jhc.6A7134.2007
- Turner, J. H., May, L., Reed, R. R. & Lane, A. P. 2010. Reversible loss of neuronal marker protein expression in a transgenic mouse model for sinusitis-associated olfactory dysfunction. *Am J Rhinol Allergy*, 24, 192-6.
doi:10.2500/ajra.2010.24.3460

- Uebi, T., Miwa, N. & Kawamura, S. 2007. Comprehensive interaction of dicalcin with annexins in frog olfactory and respiratory cilia. *Febs j*, 274, 4863-76. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06007.x
- Viktorov, I. V., Savchenko, E. A., Ukhova, O. V., Alekseyeva, N. Y. & Chekhonin, V. P. 2006. Multipotent stem and progenitor cells of the olfactory epithelium. *Bull Exp Biol Med*, 142, 495-502. doi:10.1007/s10517-006-0402-y
- Willemsen, M., Krebbers, G., Bekkenk, M. W., Teunissen, M. B. M. & Luiten, R. M. 2021. Improvement of Opal Multiplex Immunofluorescence Workflow for Human Tissue Sections. *J Histochem Cytochem*, 69, 339-346. doi:10.1369/00221554211007793
- Wu, N., Liu, S., Guo, C., Hou, Z. & Sun, M. Z. 2013. The role of annexin A3 playing in cancers. *Clin Transl Oncol*, 15, 106-10. doi:10.1007/s12094-012-0928-6
- Xi, Y., Ju, R. & Wang, Y. 2020. Roles of Annexin A protein family in autophagy regulation and therapy. *Biomed Pharmacother*, 130, 110591. doi:10.1016/j.biopha.2020.110591
- Yang, G., Velgos, S. N., Boddapati, S. P. & Sierks, M. R. 2014. Probing Antibody-Antigen Interactions. *Microbiol Spectr*, 2, Aid-0010-2013. doi:10.1128/microbiolspec.AID-0010-2013
- Yeong, J., Tan, T., Chow, Z. L., Cheng, Q., Lee, B., Seet, A., Lim, J. X., Lim, J. C. T., Ong, C. C. H., Thike, A. A., Saraf, S., Tan, B. Y. C., Poh, Y. C., Yee, S., Liu, J., Lim, E., Iqbal, J., Dent, R. & Tan, P. H. 2020. Multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence (mIHC/IF) for PD-L1 testing in triple-negative breast cancer: a translational assay compared with conventional IHC. *J Clin Pathol*, 73, 557-562. doi:10.1136/jclinpath-2019-206252
- Yuksel, H., Ocalan, M. & Yilmaz, O. 2021. E-Cadherin: An Important Functional Molecule at Respiratory Barrier Between Defence and Dysfunction. *Front Physiol*, 12, 720227. doi:10.3389/fphys.2021.720227
- Zhang, H., Rostami, M. R., Leopold, P. L., Mezey, J. G., O'Beirne, S. L., Strulovici-Barel, Y. & Crystal, R. G. 2020. Expression of the SARS-CoV-2 ACE2 Receptor in the Human Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*, 202, 219-229. doi:10.1164/rccm.202003-0541OC

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie (INDM) unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Stefan Liebau durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Stefanie Klingenstein, Mentorin und Herrn Dr. rer. nat. Moritz Klingenstein, Mentor.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die labortechnische Assistentin Frau Sabine Conrad von mir mit Unterstützung durch Frau Sabine Conrad durchgeführt. Die Fixierung und das Schneiden der Probe H80 wurde von Frau Sabine Conrad und Herrn Dr. rer. nat. Moritz Klingenstein vor Antritt des Projekts durchgeführt.

Teile der in dieser Dissertation dargestellten Datensätze wurden in der Publikation Klingenstein et al. (2026), Experimental and Molecular Pathology, veröffentlicht, an der ich als Koautorin und Zweitautorin beteiligt war. Es wurden keine Textpassagen aus dieser Publikation wörtlich übernommen. Einzelne Abbildungen und Tabellen dieser Arbeit entsprechen inhaltlich Darstellungen aus der genannten Publikation oder wurden daraus modifiziert übernommen. Die Verwendung erfolgt mit entsprechender Quellenangabe in den jeweiligen Legenden. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Analysen, Auswertungen und Interpretationen wurden eigenständig im Rahmen des Promotionsprojektes erarbeitet.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Stefanie Klingenstein verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 30.07.2026

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Stefan Liebau für die Bereitstellung des Projektthemas sowie für die Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen Mentoren Frau Dr. rer. nat. Stefanie Klingenstein und Herrn Dr. rer. nat. Moritz Klingenstein für die umfangreiche Unterstützung und Begleitung bei der Projektumsetzung. Die Gespräche begleitend zur praktischen Arbeit sowie die konstruktive Kritik beim Verfassen der Dissertationsschrift haben die Arbeit stets positiv vorangebracht.

Darüber hinaus danke ich insbesondere Frau Sabine Conrad, als labortechnische Assistentin, für die Einarbeitung im Labor und die Hilfestellungen bei Fragen zur praktischen Arbeit im Labor und zur Methodik.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie für die herzliche Aufnahme im Team.

Im Speziellen bedanke ich mich auch bei meinem Vater Herrn Thomas Grünig für die konstruktive Kritik an der geschriebenen Ausführung der Arbeit.

Des Weiteren danke ich allen meinen Freunden und meiner ganzen Familie für den Beistand und all die aufmunternden Worte während der gesamten Laufzeit des Projekts; ohne deren jahrelangen Rückhalt und Unterstützung wäre mein akademischer Werdegang vielleicht gar nicht erst möglich gewesen.