

Dissertation

vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Doktor Rerum Naturalium (Dr. rer. nat.) an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund

Zelluläre Volumenregulation als adaptiver Schutzmechanismus vor tiefen Temperaturen und Etablierung des Vasopressins als biologisch aktives Kryoprotektivum

von

Dipl.-Biol. Lale Azer

**Angefertigt in der Abteilung Systemische Zellbiologie
des Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund,
Arbeitsgruppe Zellphysiologie,
Prof. Dr. Frank Wehner**

**Referent: Prof. Dr. Frank Wehner, Max-Planck-Institut, Dortmund
Koreferent: Prof. Dr. Philippe Bastiaens, Max-Planck-Institut, Dortmund**

Dortmund 2014

Dissertation

Presented to obtain the degree Doctor Rerum Naturalium (Dr. rer. nat.)
at the Faculty of Chemistry and Chemical Biology, Technical University
Dortmund

Cell Volume Regulation as an Adaptive Mechanism at Low Temperatures and Establishing Vasopressin as a Biological Active Cryoprotectant

submitted by

Dipl.-Biol. Lale Azer

**Performed at the Department of Systemic Cell Biology
of the Max-Planck-Institute of moleculare Physiology, Dortmund,
Research Group of Cell Physiology,
Prof. Dr. Frank Wehner**

**First Supervisor: Prof. Dr. Frank Wehner, Max-Planck-Institute, Dortmund
Second Supervisor: Prof. Dr. Philippe Bastiaens, Max- Planck-Institute,
Dortmund**

Dortmund 2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 10

- 1.1 Kryokonservierung 10
- 1.2 Kryokonservierung durch langsames und schnelles Einfrieren 11
 - 1.2.1 Kryokonservierung durch langsames Einfrieren 11
 - 1.2.2 Kryokonservierung durch schnelles Einfrieren 14
- 1.3 Konventionelle Kryoprotektiva 15
- 1.4 Bedeutung der Zellvolumenregulation für die reversible Kryoarretierung 17
- 1.5 Mechanismen der Volumenregulation 18
- 1.6 Die „*Hypertonicity Induced Cation Channels*“ 21
 - 1.6.1 Der Amilorid-sensitive epitheliale Natriumkanal ENaC 21
- 1.7 Aquaporine 25
- 1.8 Hormon-basierte Regulierung der reversiblen Kryoarretierung 29
 - 1.8.1 Regulierung der reversiblen Kryoarretierung mit Vasopressin 29

2 Material und Methoden 33

- 2.1 Zellkultur-Methoden 33
 - 2.1.1 HepG2 Zellen 33
 - 2.1.2 Kultivierung von HepG2 Zellen 33
 - 2.1.3 Vektor-Transfektion der HepG2 Zellen mit LipofectaminTM 2000 34
 - 2.1.4 Stabile Transfektion der HepG2 mit Hilfe der Durchflusszytometrie 34
 - 2.1.5 siRNA-Transfektion der HepG2 Zellen mit DharmaFect 1 35
- 2.2 HeLa Zellen 35
 - 2.2.1 Kultivierung von HeLa Zellen 35
- 2.3 HDMEC Zellen 35
 - 2.3.1 Kultivierung von HDMEC Zellen 35
- 2.4 Zellgröße- und Vitalitätsbestimmung von HepG2 mit dem CountessTM Automated Cell Counter 36
- 2.5 Bestimmung des osmotisch inaktiven und aktiven Volumens von HepG2 und HeLa Zellen mit dem CountessTM Automated Cell Counter 36
- 2.6 Bestimmung von Aktivierungsenergien 37
- 2.7 Proliferationsanalysen 37
- 2.8 Kryokonservierung 38
 - 2.8.1 Standard Kryokonservierung von Zellen in Suspension zur

- Langzeitlagerung 38
- 2.8.2 Kryokonservierung von adhärennten Zellen auf Deckgläsern 38
- 2.8.3 Hormone als Kryoprotektiva: Optimierung der Kryokonservierung von adhärennten Zellen auf Deckgläsern 39
- 2.8.4 Kryokonservierung mit Hilfe der Linkam-*Stage* 39
- 2.9 Mikroskopie-Techniken 40
- 2.9.1 Scannende zeitaufgelöste akustische Mikroskopie 40
- 2.9.2 Aufbau und Funktionsweise der SAM 40
- 2.9.3 Messung der Temperatur- und Osmolaritätsabhängigkeit von RVI und Zellschrumpfen sowie die Bestimmung von Aktivierungsenergien vor und nach Kryokonservierung 43
- 2.10 Elektrophysiologische Messungen 44
- 2.10.1 *Whole-Cell Patch-Clamp* Technik 44
- 2.10.2 Aufbau und Grundlage der *Whole-Cell Patch-Clamp* Technik 44
- 2.10.3 Messung der Temperatur- und Osmolaritätsabhängigkeit von HICCs und Bestimmung der Aktivierungsenergien vor und nach Kryokonservierung 47
- 2.11 Erhöhung der intrazellulären Viskosität, Messung der HICC-Aktivierung und Bestimmung der Aktivierungsenergie 48
- 2.12 Molekularbiologische Methoden 49

3 Ergebnisse 50

- 3.1 Das osmotisch aktive Zellvolumen und die Kälte induzierte adaptative Zellhydratationsreduktion 50
- 3.2 Messung der Zellvolumenveränderungen und des Na⁺-Transports an HepG2 Zellen bei Hypertonizität 53
- 3.2.1 Messung des Zellschrumpfens, Zellschwellens und des RVI unter hypertoner Bedingung mittels SAM 53
- 3.2.2 Messung des Na⁺-Transports nach hypertoner Bedingung mittels *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen 56
- 3.2.3 RVI und Wassertransport nach Kühlung und Kryokonservierung – Verlangsamter Wassertransport und Aktivierung des RVI 56
- 3.3 Bestimmung der Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor und nach Kryokonservierung 58

- 3.3.1 Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor Kryokonservierung 58
- 3.3.2 Aktivierungsenergien der Wildtyp und Aquaporin 1 überexprimierenden HepG2 Zellen 60
- 3.3.3 Aktivierungsenergien der Zellvolumenregulation nach Kryokonservierung – Kryokonservierung stimuliert den RVI 62
- 3.4 Die erhöhte Zellviskosität beeinflusst die HICC-Aktivierung 63
- 3.5 Weitere potentielle HICC-Komponenten in HepG2 Zellen 64
- 3.6 Stimulierung des RVI mit dem Peptid-Hormon Vasopressin - Etablierung des Standard-Kryoprotokolls 66
 - 3.6.1 Stimulierung des RVI mit Vasopressin 66
 - 3.6.2 Das Peptid-Hormon Vasopressin als biologisch aktives Kryoprotektivum 67
 - 3.6.3 Vasopressin erhöht die Zellvitalität nach Kryokonservierung 68
 - 3.6.4 Vasopressin erhöht die Zellvitalität und Proliferation nach Kryokonservierung nur in α ENaC exprimierenden Zellen 70
 - 3.6.5 Erhöhte HICC-Stromdichte nach Vasopressin-Behandlung und Kryokonservierung 73

4 Diskussion 74

- 4.1 Das osmotisch inaktive Zellvolumen und die Kälte induzierte adaptive Reduktion der Zellhydratation 74
- 4.2 Messung der Zellvolumenveränderungen und des Na^+ -Transports an HepG2 Zellen bei Hypertonizität 75
 - 4.2.1 RVI und Wassertransport nach Kühlung und Kryokonservierung – Verlangsamter Wassertransport und Aktivierung des RVI 75
- 4.3 Bestimmung der Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor und nach Kryokonservierung 77
 - 4.3.1 Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor Kryokonservierung 77
 - 4.3.2 Aktivierungsenergien der Wildtyp und Aquaporin 1 überexprimierenden HepG2 Zellen 79
 - 4.3.3 Aktivierungsenergien der Zellvolumenregulation nach Kryokonservierung – Kryokonservierung stimuliert den RVI 79

-
- 4.4 Die erhöhte Zellviskosität beeinflusst die HICC-Aktivierung 80
 - 4.5 Weitere potentielle HICC-Komponenten in HepG2 82
 - 4.6 Stimulierung des RVI mit dem Peptid-Hormon Vasopressin - Etablierung des Standard-Kryoprotokolls 83
 - 4.6.1 Stimulierung des RVI mit Vasopressin 83
 - 4.6.2 Das Peptid-Hormon Vasopressin als biologisch aktives Kryoprotektivum 84
 - 4.6.3 Vasopressin erhöht die Zellvitalität nach Kryokonservierung 84
 - 4.6.4 Vasopressin erhöht die Zellvitalität und Proliferation nach Kryokonservierung nur in α ENaC exprimierenden Zellen 85
 - 4.6.5 Erhöhte HICC-Stromdichte nach Vasopressin-Behandlung und Kryokonservierung 86

Anhang 88

Abkürzungsverzeichnis 92

Literaturverzeichnis 96

Danksagung 104

Erklärung 105

Zusammenfassung

Die Kryokonservierung ermöglicht die Aufbewahrung von biologischem Material bei tiefen Temperaturen. Bei Bedarf kann das biologische Material wieder in den physiologischen Zustand zurück gebracht und verwendet werden, wenn einige physikalisch-chemischen Faktoren z.B. ein niedriger Wassergehalt in der Zelle, der Gebrauch von Kryoprotektiva und angemessene Einfrier- und Auftauraten berücksichtigt werden. Dennoch erleidet die Zellvitalität und die Zellfunktionen des biologischen Materials nach der Kryokonservierung Schäden. Das Verständnis über die grundlegenden zellulären und molekularen Mechanismen der Kryokonservierung könnte daher dazu beitragen, diese zu optimieren und möglicherweise neue Kryokonservierungsprotokolle zu etablieren.

Mit der Kryopräservierung von Zellen und der dabei entstehenden extrazellulären Eisbildung gehen extreme osmotische Bedingungen einher, die die Veränderung der Zellmorphologie über eine starke Kryodehydratation bewirkt. Diese Kryodehydratation ist ein osmotisch passiver Prozess, bei der Wassermoleküle sowohl durch die Lipiddoppelschicht als auch über Aquaporine aus der Zelle heraus diffundieren. Während der Auftauphase erlangt die Zelle im besten Fall ihre ursprüngliche Hydratation zurück. Die Rehydratation der Zelle erfolgt vermutlich über den aktiven zellvolumenregulatorischen Mechanismus der *Hypertonicity Induced Cation Channels* (HICCs), die den *Regulatory Volume Increase* (RVI) bewerkstelligen. Sie sind für den Kationen (Na^+)-Transport in die Zelle verantwortlich, so dass Wassermoleküle osmotisch den Ionen nachfolgen und so eine Rehydratation erreicht wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb angenommen, dass passive (Aquaporine) als auch aktive zellvolumenregulatorische Elemente (HICCs und damit der RVI) an der Volumenreduktion wie auch an der Volumengewinnung bei der Reversibilität von der thermischen Arretierung der Zellen verantwortlich sind. Hierbei wurden die Methodik der *Whole-Cell Patch-Clamp* Analyse und der *Scanning Acoustic Microscopy* (SAM) angewendet. Basierend auf der Charakterisierung von Aquaporinen und HICCs für die Reversibilität von Kryokonditionen war das Ziel ein biologisch aktives Verfahren zur Kryokonservierung zu etablieren, um die thermische reversible Arretierung der Zellen zu erleichtern.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit sinkender Temperatur und Kühlung der HepG2 Zellen eine Reduktion der Zellhydratation einhergeht. Das osmotisch aktive Volumen - das frei diffundierbare Wasser - betrug in HepG2 Zellen 69% und wurde bereits bei 10°C drastisch auf 18% reduziert. Diese Dehydratation scheint ein adaptiver Schutzmechanismus zur Kryokonservierung, den die Zellen benötigen um überschüssiges Wasser aus dem Zytoplasma zu transportieren, damit bei Eintritt der Eisnukleation die Anzahl intrazellulärer Eiskristalle gering gehalten werden. Es zeigte sich, dass eine Rehydratation der Zellen mittels vermehrtem Na⁺-Influx erreicht wird. Ein erhöhter RVI und eine erhöhte HICC-Aktivität nach Kryokonservierung wurden nachgewiesen. Dagegen zeigten Aquaporine kaum Änderung des Wasser-Transports nach Kryopräservierung. Ein Auslöser der HICC-Aktivierung nach Kryokonservierung war die intrazellulär erhöhte Viskosität. Mit Stimulation des α ENaC durch das diuretische Hormon Vasopressin wurden die Zellvitalität und die Proliferation der HepG2 Zellen nach Kryokonservierung merklich verbessert und das Standard-Kryoprotokoll optimiert. Dies ist auf die Modulation des Na⁺-Transports über α ENaC durch Vasopressin zurückzuführen. Somit wurde anhand der besseren zellulären und molekularen Verständnisse kryopräservierter Zellen auf der Basis des Vasopressin-Effektes auf α ENaC der Kryobiologie neue Wege bereit gestellt, um die reversible Kryoarretierung vom biologischem Material mittels eines hormonellen nicht-toxischen Kryoprotektivums, dem Vasopressin, zu erleichtern. Neben dem epithelialen Natrium Kanal α ENaC, wurden die transienten Rezeptor Potential Kanäle TRPM2, TRPM5 und der mechanosensitive Ionenkanal Piezo1 als weitere Komponenten der HICCs in HepG2 Zellen nachgewiesen. TRPM2, TRPM5 und Piezo1 wurden somit als potentielle Zielproteine für zukünftige Kryonanwendungen bereit gestellt.

1 Einleitung

1.1 Kryokonservierung

Unter Kryokonservierung wird die Aufbewahrung von biologischem Material bei tiefen bis ultratiefen Temperaturen (bis zu -196°C) verstanden. Dabei ermöglicht die Kryokonservierung eine Lagerung des biologischen Materials über einen längeren Zeitraum hinweg. Die biochemischen Prozesse in einer Zelle gelangen während dieser Zeit zu einem nahezu vollkommenen Stillstand. Bei Bedarf kann das biologische Material wieder in den physiologischen Zustand zurück gebracht werden. Die Erkenntnisse über die physikalisch-chemischen Faktoren, die bei der Kryokonservierung die Vitalität einer Zelle beeinflussen, müssen so umgesetzt werden, dass tiefe Temperaturen toleriert werden. Zu den bekannten Grundlagen der Kryokonservierung gehören daher die Faktoren:

- Unterkühlung der Zelle mit reduziertem Wassergehalt
- Gebrauch von Kryoprotektiva
- angemessene Einfrier- und Auftauraten

Werden diese Faktoren optimiert, können zellschädigende intra- bzw. extrazelluläre Eiskristallbildung in geringem Maße toleriert werden.

Kryokonservierung wird in der Reproduktionsbiologie zur Lagerung von Eizellen sowie Zygoten und in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung an immortalisierten Zelllinien und primäre Zellen angewandt. Die Problematik in der Kryobiologie ist allerdings, trotz der Berücksichtigung der oben genannten Faktoren, die niedrige Überlebensrate der Zellen nach der Kryokonservierung. Das Verständnis über die grundlegenden zellulären und molekularen Mechanismen der Kryokonservierung würde hilfreich sein, neue Wege zur Optimierung der Kryokonservierung zu schaffen. Grundsätzlich werden zwei Techniken zur Kryokonservierung angewandt. Diese sind das langsame und das schnelle Einfrieren von humanen Zellen.

1.2 Kryokonservierung durch langsames und schnelles Einfrieren

Gefahrenquellen für eine Beschädigung von biologischen Systemen während des Einfrierens und Auftauens sind die Bildung von zu großen Eiskristallen, osmotischen Drücken und mechanische Spannungen (Lovelock, 1953; Ebertz, 2002). Diese entstehen zunächst durch die Veränderung des Aggregatzustandes von Wassermolekülen bei Erreichen des Gefrierpunktes. Kommt es zur Eisnukleation, bilden Wassermoleküle ihre Wasserstoffbrückenbindungen nicht mehr mit Proteinen, Lipiden und Elektrolyten, sondern nur untereinander aus. Das Wachstum von Eiskristallen wird eingeleitet. Zum einem verlieren Proteine, Lipide und Elektrolyte ohne eine Hydrathülle an Stabilität in der Struktur, zum anderen werden in der verbleibenden flüssigen Phase des Wassers Proteine, Lipide und Elektrolyte aufkonzentriert (Dong, 2010). Zusätzlich üben Eiskristalle mechanische Spannungen in und zwischen Zellen aus.

Die Techniken zur Kryokonservierung basieren zum einem auf einem schnellen und zum anderen auf einen langsamen Einfrieren von biologischen Systemen. Beide Techniken erzielen eine erfolgreiche Lebendkonservierung mit Vor- und Nachteilen. Der Schlüsselweg ist dabei, dass Innere einer Zelle bei tiefen Temperaturen eisfrei zu halten, sei es durch Dehydrierung der Zelle oder (wenn es die technische Ausrüstung erlaubt) durch Bildung von vitrifiziertem (verglastem) Eis.

1.2.1 Kryokonservierung durch langsames Einfrieren

Die Kryokonservierung durch langsames Einfrieren ist eine seit langem etablierte Technik und wird in den meisten zellbiologischen Laboratorien routinemäßig an immortalisierten Zelllinien und primär gewonnenen Zellen angewandt. Das in dieser Einfriertechnik gebräuchlichste Kryoprotektivum ist das Dimethylsulfoxid (DMSO), welches in 10%iger (v/v) Konzentration verwendet wird. Mit dem Einsatz des Kryoprotektivums wird eine Gefrierpunktniedrigung des Kryomediums erreicht.

In der extrazellulären Umgebung von Zellen, die in wässrigen Medien langsam eingefroren werden, werden beim Eintritt der Lösung in den Gefrierpunkt Eiskristalle gebildet. Durch die Eisnukleation und das anschließende Kristallwachstum im extrazellulären Raum verringert sich das Volumen der Flüssigphase des extrazellulären Milieus dadurch zunehmend. Die Konzentration der gelösten extrazellulären Stoffe steigt dabei deutlich an und das osmotische Gleichgewicht zwischen extrazellulärem sowie intrazellulärem Raum gerät hierdurch zusätzlich aus dem Gleichgewicht. Dieser osmotische Gradient bewirkt, dass aus Zellen Wasser - freies, nicht gebunden – erst durch die Lipiddoppelschicht und dann über Aquaporine in den extrazellulären Raum diffundiert (Agre, 2004; Carbrey and Agre 2009). Zellen, welche im physiologisch stabilen Zustand aus 70% frei diffundierbarem und 10% gebundenem Wasser bestehen (Newton, 1999), dehydrieren und schrumpfen folglich bis die dehydrierten Zellen in einen quasi amorphen Zustand erstarren (Mazur, 1963; Pegg, 2007). Auf diese Weise wird die intrazelluläre letale Eiskristallbildung weitgehend vermieden, die aus intrazellulärem freiem Wasser entsteht (Mazur, 2005; Dong, 2010). Diese Kryodehydratation hängt von der Kühlrate ab, da der Wasserverlust der Zellen eine gewisse Zeit beansprucht, um aus dem Zytoplasma zu diffundieren. Mit sinkender Temperatur entstehen fortlaufend Eiskristalle, wodurch die Osmolarität der restlichen Flüssigphase und die zelluläre Dehydratation weiter zunehmen. Eine starke Dehydrierung führt zur weiteren Auflösung der Hydrathüllen an Lipiden und Proteinen, die als gebundenes Wasser bezeichnet werden. Die Auflösung der Hydrathüllen führt anschließend zur irreversiblen Schädigungen z.B. der Quartär- und Tertiärstrukturen von Proteinen.

Diese Form der Kryokonservierung bewirkt die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen einer Zelle, jedoch nicht die der zellulären Morphologie. Nicht nur das Zellvolumen, auch die intrazellulären Strukturen werden beeinflusst, wie z.B. die Depolymerisierung des Aktins nach Einfrier- und Auftau-Prozessen (Ragoonanan, 2010). Von entscheidender Bedeutung bei der langsamen Einfriertechnik ist die Geschwindigkeit von wenigen Graden Celsius pro Minute ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Dabei wird nur die Bildung von Eis außerhalb der Zelle toleriert,

während intrazellulär kaum Eiskristalle geduldet werden (Abb. 1). Die Arbeitsgruppe Li et al (2013) konnte zeigen, dass bei einer moderaten Einfrierrate von $-12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ extrazelluläres Eis - vermutlich durch „Membranporen“ (Mazur`s *pore theory*) - in den intrazellulären Raum eindringt und bis zu einem gewissen Maß nicht letal wirkt. Verläuft die Einfrierrate zu rasch ab, kann sich das DMSO nicht homogen verteilen und es kommt hier zur lokalen Aufkonzentrierung des Kryoprotektivums im Zytoplasma (Abb. 1) (Dong, 2010).

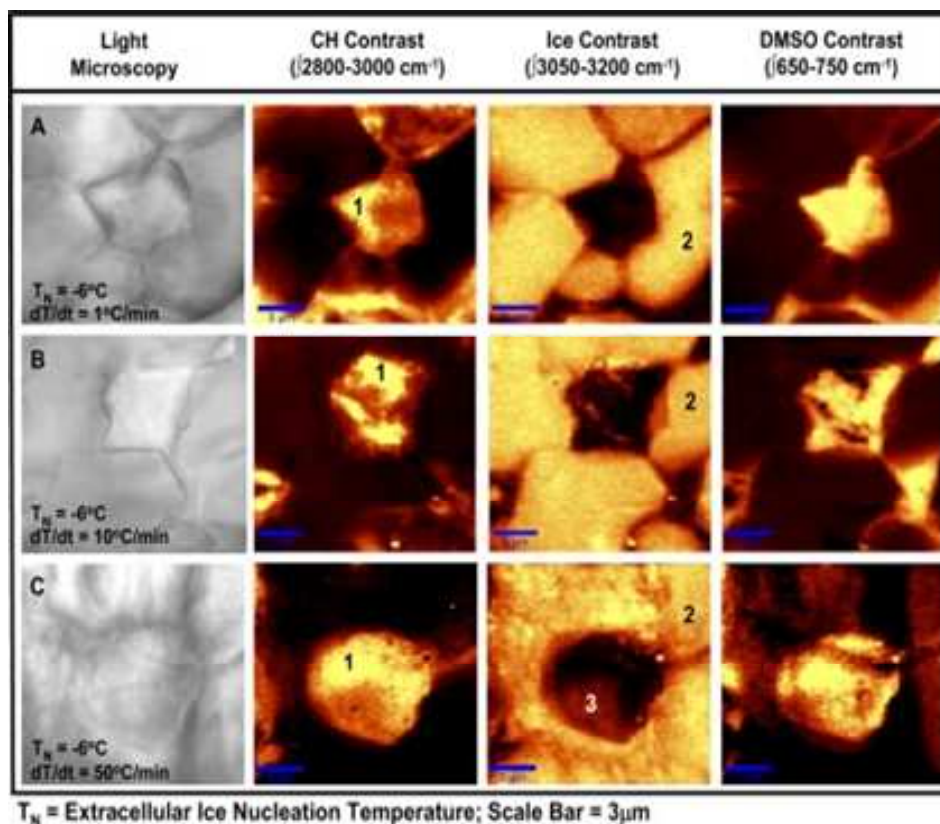


Abb. 1: Licht-mikroskopische (Säule I) und konfokale Raman-mikroskopische (Säule II, III und IV) Aufnahmen bei -50°C kryoarretierten Fibroblasten in PBS mit 10% DMSO. Die Einfrierraten betragen in A $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (langsam), in B $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (moderat) und in C $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (schnell). Die Licht-mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass nur beim schnellen Einfrieren die sphärische Morphologie der Zelle bewahrt wird. Im Kohlenwasserstoff-(CH)-Kontrast stellt ein heller Farbton den organischen Anteil (1) und im Eis-Kontrast das Eis (2) dar. Sowohl bei moderaten als auch bei schnellen Einfrierraten bildet sich intrazelluläres Eis (3), welches sich letal auswirkt. Der DMSO-Kontrast zeigt, dass sich das DMSO bei langsamen Einfrierraten am homogensten im Zytoplasma verteilt. Die Eisnukleationstemperatur T_N lag bei -6°C . Vergrößerung 100-fach. (Dong, 2010).

Die Kryokonservierung und die damit einhergehende Dehydratation führen zu einem stabilen amorphen Endzustand. Ohne den Einsatz von Kryoprotektiva gelingt es nicht, hohe Zellvitalitäten und somit reversible Kryoarretierung zu erzielen. Neben DMSO werden Glycerol, Ethan-1,2-diol und Propan-1,2-diol häufig als Kryoprotektiva verwendet (Lovelock, 1953; Liu, 2002; Pegg 2007). Jede Kühlrate und das passende Kryoprotektivum mit seiner idealen Konzentration müssen für den jeweiligen Zelltyp bzw. die Zelllinie empirisch ermittelt werden.

1.2.2 Kryokonservierung durch schnelles Einfrieren

Das Prinzip des schnellen Einfrierens zur Kryokonservierung von Zellen ist die Prävention der Bildung von Eis sowohl im intrazellulären als auch im extrazellulären Raum einer Zelle und beruht auf dem Überspringen des kritischen Bereichs zwischen der Eisnukleationstemperatur und der Glasübergangstemperatur. Letztere ist jene Temperatur (-130°C) bei der die Viskosität des flüssigen Wassers für die Bildung von Eiskristallen zu hoch wird und das Wasser verglast (Vitrifikation) (Wowk, 2010). Die Überschreitung des kritischen Bereiches erfordert sehr schnelle Kühlraten, die im Bereich von mehreren 1000°C/min liegen. Diese Größenordnung stellt eine Herausforderung für das schnelle Frieren vom biologischen Material dar. Außerdem muss, um eine Devitrifikation oder Rekristallisation zu vermeiden, die Glastemperatur konstant gehalten werden oder zumindest nicht über -130 °C steigen (Wowk, 2010). Ist die Vitrifizierung einer Zelle erreicht, ist ihr zellulärer Zustand kryofixiert. Da durch die hohe Kühlrate und die Überwindung des kritischen Bereiches die Formation von Eis „übersprungen“ wird, bleibt der Prozess der Kryodehydratation aus, wodurch morphologische oder chemische Modifikationen der Zelle durch Eisbildung ausbleiben. Diese Fixierung zellulärer Zustände ist für Untersuchungszwecke gut geeignet, um Zellen im nativen, aber vitrifizierten Zustand zu untersuchen. Dennoch gelingt es auch mit dieser schnellen Einfriertechnik nicht ohne den Einsatz von Kryoprotektiva, hohe Raten der Zellvitalitäten und damit die reversible Kryoarretierung zu erzielen. Die hier konventionellen Kryoprotektiva sind DMSO, Ethylenglycol, Dextran oder

Sucrose. Meistens wird eine sehr hohe Konzentration und ein Gemisch aus Kryoprotektiva verwendet (Sutton, 1991, Pegg, 2007).

Wie der Abkühlprozess während des Frierens von Zellen, ist der Prozess des Auftauens in beiden oben beschriebenen Einfriertechniken zur Kryokonservierung von enormer Bedeutung (Leibo, 1971). In beiden Fällen muss eine hohe Auftaurate stattfinden (100 bis 10,000 °C/min), aber zugleich eine Überhitzung der Zellen verhindert werden. Vor allem in vitrifizierten Proben muss der kritische Bereich schnellstmöglich durchschritten werden, um das Eiswachstum bzw. die Rekristallisation zu unterbinden. Die Rekristallisation ist sehr kritisch und deshalb ist das schnelle Einfrieren als gebräuchliches standard Verfahren schwierig anzuwenden.

1.3 Konventionelle Kryoprotektiva

Zu einem Kryoprotektivum gehört jede Art von Substanz, die als Gefrierschutzmittel wirkt und die Vitalität einer Zelle nach Kryokonservierung unterstützt und aufrechterhält. Kryoprotektiva führen im Allgemeinen zu einer Gefrierpunktserniedrigung der einzufrierenden Probe und verzögern somit die Bildung von Eiskristallen. Man unterscheidet dabei Membran-durchlässige und nicht-durchlässige Kryoprotektiva.

Es wird angenommen, dass die Wirkung eines Kryoprotektivums auf der Reduzierung der chemischen Aktivität des intrazellulären Wassers, der Stabilisierung zellulärer Strukturen und der Senkung des Gefrierpunktes beruht (Mazur, 1984). DMSO ist das herkömmlichste Kryoprotektivum, das in der Kryokonservierung verwendet wird. In der Kryokonservierung mittels langsamen Einfrierens diffundiert diese organische Bindung frei über die Zellmembran. Das DMSO bindet z.B. an Proteine und stabilisiert sie bei Dehydrierung der Zelle. Aufgrund der Wasser-ähnlichen Struktur des DMSO gelangt das Kryoprotektivum auch über Aquaporine in die Zelle (Edashige, 2007). Dong et al (2010) konnten zeigen, dass während des langsamen Einfrierens die intrazelluläre Hydratation durch DMSO nicht beeinflusst wurde, jedoch mit

höheren Kühlraten ein Zellschwellen auftrat. Infolge der Senkung des Gefrierpunktes des Zytoplasmas durch DMSO, erfolgt die Bildung der Eiskristalle erst zu einem späteren Zeitpunkt. Dadurch hat die Zelle mehr Zeit zur weiteren langsamen Dehydratation und folglich werden weniger intrazelluläre Eiskristalle gebildet (Anchordoguy, 1991). Wird DMSO in sehr hohen Konzentrationen (über 10%) verwendet, kann es ultrastrukturelle Schäden an Membran-umschlossenen Zellorganellen wie Mitochondrien, endoplasmatischem Reticulum und Nukleus verursachen. Bei Temperaturen über 25°C wirkt DMSO toxisch auf die Zelle und muss daher bei kalten Temperaturen (4°C) den Zellen zugegeben und entnommen werden. Im Vergleich zu anderen Kryoprotektiva bleibt DMSO jedoch das am wenigsten toxische und am besten membrandurchgängige Kryoprotektivum (Pozio, 1988). Innerhalb von 5 Minuten ist zwischen einer 10%igen (v/v) DMSO-Lösung und der Zelle ein Equilibrium erreicht mit einer äußerst homogenen Verteilung des DMSOs im Zytoplasma (Abb. 1, Dong, 2010). Weitere membranpermeable Kryoprotektiva sind Ethylenglykol und Acetamid (Liu, 2002; Seki, 2012).

Kryoprotektive Wirkungen weisen auch Polysaccharide auf. Polysaccharide sind membranimpermeabel und interagieren mit hydrophilen Hydroxylgruppen der Zellmembran durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die kryoprotektive Eigenschaft kommt dadurch zustande, dass Polysaccharide stabilisierend durch die Bildung von Hydrathüllen um die Zelle wirken. Außerdem erhöhen Polysaccharide die Viskosität und senken damit die Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen in der extrazellulären Umgebung einer Zelle. So wird die Eisbildung minimiert, denn das Eiskristallwachstum benötigt Diffusion, um neue Wassermoleküle an die Kristalloberflächen zu bringen. Beispiele solcher Kryoprotektiva sind Trehalose, Dextran und Sucrose (Gilmore, 1995; Spindler, 2012).

Nicht-konventionelle Kryoprotektiva sind selten verwendete Komponenten z.B. Weizen-Proteine, die einen zellschützenden Effekt aufweisen. Diese kryoprotektiv wirkenden Proteine erhöhen die Expression von β 1-Integrinen, E-Cadherinen und β -Catenin in Hepatozyten und verbessern die Adhäsionseffizienz nach Kryopräservation (Grondin, 2009). Weitere Studien

zeigten, dass die Weizen-Proteine während des kälteinduzierten Stresses in Pflanzen hoch reguliert werden und Pflanzen vor Gefrierschäden schützen (Charron, 2002, 2005). Diese Wirkung ist darauf zurückzuführen, dass hoch konservierte Proteinmotive, die eine Anhäufung von Serin und Threonin besitzen, mit der Eisoberfläche über Wasserstoffbrückenbindungen interagieren und extrazelluläres Eiswachstum mindern (Sidebottom, 2000).

1.4 Bedeutung der Zellvolumenregulation für die reversible Kryoarretierung

Bei der Kryokonservierung und den damit einhergehenden extremen osmotischen Bedingungen sowie der Veränderung der Morphologie durch Kryodehydratation wird angenommen, dass passive aber auch aktive zellvolumenregulatorische Elemente an der Volumenreduktion und auch an der Volumengewinnung verantwortlich sein könnten. Dabei entsteht um die einzufrierende Zelle bei Eintritt der Eiskernbildungstemperatur hexagonales Eis im Außenmedium. Dies bewirkt, dass Wassermoleküle osmotisch über die Lipiddoppelschicht und über die Aquaporine heraus diffundieren. Somit kommt es zur Kryodehydratation der Zelle. Während der Auftauphase erlangt die Zelle im besten Fall die ursprüngliche Hydratation zurück. Diese Rehydratation der Zelle erfolgt wahrscheinlich über den aktiven Mechanismus der *Hypertonicity Induced Cation Channels* (HICCs), die die Zelle mit Kationen beladen, so dass Wasser osmotisch nachfolgt und eine Rehydratation erreicht wird (Abb. 2). Die passiven und aktiven zellvolumenregulatorischen Elemente, die an der Rehydratation potentiell beteiligt sein könnten werden im Folgenden näher beschrieben.

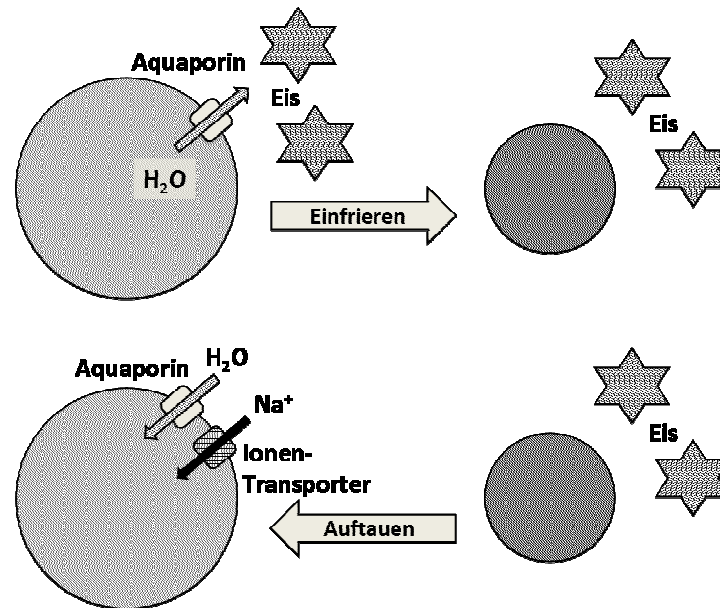


Abb.2: Schematische Darstellung der Kryokonservierung und der hypothetischen Volumenrückgewinnung durch Ionen-Transporter (aktive Zellvolumenregulation) und Aquaporine (passive Zellvolumenregulation) als zellvolumenregulatorische Elemente nach Kryoarretierung (Wehner, unveröffentlicht).

1.5 Mechanismen der Volumenregulation

Unter anisotonen Bedingungen verändern Zellen ihr Volumen bedingt durch den osmotischen Gradienten zwischen dem Zellinneren und Zelläußeren mit dem Bestreben ein neues thermodynamisches Gleichgewicht für Wasser zu erreichen. Dabei schrumpfen Zellen unter hypertonen und schwellen unter hypotonen Bedingungen unter passiver Abgabe bzw. Aufnahme von Wasser. Auf Dauer der Zellschrumpfung oder der Zellschwellung ausgesetzt, initiieren diese Stressfaktoren den Zelltod. Zellen umgehen diese Stresszustände jedoch, indem sie aktiv gegen die Zellschrumpfung oder die Zellschwellung das Zellvolumen regulieren. Diese Mechanismen der Zellvolumenregulation werden als *Regulatory Volume Increase (RVI)* oder *Regulatory Volume Decrease (RVD)* bezeichnet (Wehner, 1995; Wehner, 2006).

Der RVI ist der Mechanismus bei dem aktiv das Zellvolumen durch Aufnahme von Ionen vergrößert werden muss. Aufgrund des hohen Konzentrationsgefälles von Natrium-Ionen (Na^+) zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Milieu, erfolgt zunächst ein Na^+ -Einstrom in die Zelle. Dadurch depolarisiert das

Membranpotential, sodass Chlorid-Ionen (Cl^-) passiv in die Zelle folgen (Wehner, 2000). Den Na^+ -Einstrom bewerkstelligen HICCs, die z.B. den Hauptmechanismus des RVI in primären Rattenhepatozyten darstellen (Wehner, 1995). In primären Rattenhepatozyten und humanen Hepatozyten ist die Kanaluntereinheit des epithelialen Natriumkanals αENaC die eine wesentliche HICC-Komponente (Böhmer, 2001; Li, 2005; Plettenberg, 2013), während in HeLa Zellen die Hauptkomponente der TRPM2 ist (Numata, 2012). Zusätzlich zu dem HICC tragen in primären Rattenhepatozyten der Na^+ - H^+ -Austauscher und der Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Symporter in einem Verhältnis von 4:1:1 zum RVI bei (Wehner, 2000). Die Na^+ -Aufnahme durch HICCs sowie die Aufnahme des Cl^- durch Cl^- -Kanäle führt dazu, dass Wasser dem osmotischen Gradienten folgt und es zu einer Zunahme des Zellvolumens kommt. Die dadurch intrazellulär erhöhte Na^+ -Konzentration aktiviert die Na^+ - K^+ -ATPase, die nun die überschüssigen Na^+ -Ionen im Verhältnis von 3 Na^+ -Ionen zu 2 K^+ -Ionen - unter Verbrauch chemischer Energie - gegen das chemische Konzentrationsgefälle austauscht (Abb. 3). Auch unter isotonen Bedingungen hält die Na^+ - K^+ -ATPase mit einer kontinuierlichen basalen Aktivität den Gradienten über die Zellmembran aufrecht.

Der RVD ist der Mechanismus bei dem aktiv das Zellvolumen durch Abgabe von Ionen verkleinert werden muss. Die Aktivierung von K^+ -Kanälen führt zum Ausstrom von K^+ -Ionen, womit es zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials kommt und Cl^- -Ionen mit dem elektrochemischen Gradienten aus der Zelle ausströmen. Neben den K^+ -Kanälen und Cl^- -Kanälen wird in einigen Geweben ein K^+ / Cl^- -Symporter aktiviert, um K^+ - und Cl^- -Ionen freizusetzen (Okada und Maeno, 2001). Wassermoleküle folgen so dem osmotischen Gradienten, so dass eine Volumenreduktion resultiert (Abb. 3) (Okada, 2001; Wehner, 2003).

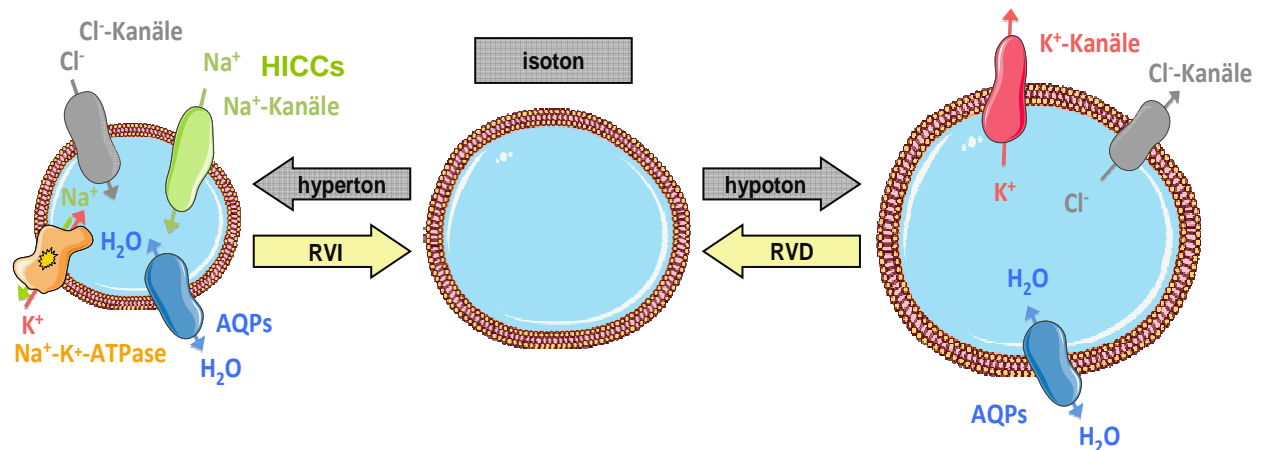


Abb. 3: Schematische Darstellung des *Regulatory Volume Increase* (RVI) und *Regulatory Volume Decrease* (RVD). Wird das extrazelluläre isotone Medium hyperton, erfolgt zunächst die Diffusion von intrazellulären Wassermolekülen über Aquaporine (AQP) ins extrazelluläre Milieu, so dass es zur Zellschrumpfung kommt. Nach Erhöhung der Na⁺-Leitfähigkeit, kommt es zum aktiven Na⁺-Influx über Na⁺-Kanäle. Passiv folgen Cl⁻-Ionen nach. Aufgrund der gestiegenen Ionenkonzentrationen folgen Wassermoleküle, so dass eine Volumenvergrößerung (RVI) hervorgerufen wird. Letztlich tauscht die Na⁺-K⁺-ATPase 2 Na⁺- gegen 3 K⁺-Ionen unter Verbrauch chemischer Energie aus. Wird das extrazelluläre isotone Medium hypoton, erfolgt eine Zellschwellung. Durch Erhöhung der K⁺-Leitfähigkeit, wird ein aktiver K⁺-Efflux über K⁺-Kanäle bewirkt. Passiv folgen Cl⁻-Ionen und Wassermoleküle nach (RVD).

Die beschriebenen Mechanismen der Volumenregulation (RVI und RVD) stehen im engen Zusammenhang zu den Zellprozessen der Proliferation und Apoptose. Neben Aktivierungen spezifischer Signalkaskaden, muss es bei einer Proliferation zunächst zur Volumenzunahme kommen, während bei einer Apoptose das Zellvolumen drastisch verringert wird (*Apoptotic Volume Decrease*, AVD). Der Prozess des AVD wird durch die Aktivierung von K⁺-Kanälen initiiert, wodurch es zu einer Zellvolumenreduktion kommt (Okada, 2001). Gleichzeitig konnte eine Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase während des AVDs beobachtet werden (Panayioditis, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass diese isoton aktivierten K⁺-Kanäle molekular dieselben Kanäle sind, die unter hypertonen Bedingungen am RVD beteiligt sind (Wang, 2004). Der zelluläre Prozess der Proliferation wird durch die Aktivierung der Kation-Kanäle initiiert. Es kommt zu einer Volumenzunahme der Zelle, die Grundvoraussetzung für eine Zellteilung ist. Dieselben Kation-Kanäle sind unter hypertonen Bedingungen

am RVI beteiligt (HICC). Somit ist der HICC nicht nur in hypertonen Bedingungen am RVI beteiligt, sondern wird auch unter isotonen Bedingungen bei der Proliferation von Zellen aktiviert (Bondarava, 2009).

1.6 Die „*Hypertonicity Induced Cation Channels*“

Dass die HICCs in Folge des Zellschrumpfens aktivieren, konnte in vielen Zelltypen gezeigt werden. Es werden 2 Typen des HICC unterschieden. In beiden Fällen sind die HICCs nicht-selektive Kationen-Transporter, die sich allerdings in der Pharmakologie unterscheiden. Diese sind zum einen die Amilorid-insensitiven HICCs, die jedoch sensitiv für Flufenamat und Gadolinium sind, und zum anderen die Amilorid-sensitiven HICCs, die keinerlei Sensitivität gegenüber Flufenamat und Gadolinium zeigen. Der letztere Typ der HICCs wird mit α ENaC in Beziehung gebracht (Wehner, 2006). Nicht nur in primären Hepatozyten, auch in der Zelllinie der humanen hepatozellulären Tumorzelllinie HepG2 wird dieser HICC-Typus dem α ENaC zugewiesen. Dass die HICCs am RVI in Rattenhepatozyten beteiligt sind, konnte von Wehner et al (1995, 1998 und 2000) demonstriert werden. Die vollständige Identität der HICCs konnte bisher nicht geklärt werden. Auch in humanen Hepatozyten wurden nicht-selektive Kation-Kanäle beschrieben, die für monovalente Ionen permeabel sind und auch Calcium (Ca^{2+}) teilweise transportieren (Li, 2005). Die Ca^{2+} -Leitfähigkeit wird den transienten Rezeptor Potential Kanälen (TRP) zugeschrieben.

1.6.1 Der Amilorid-sensitive epitheliale Natriumkanal ENaC

Der Amilorid-sensitive ENaC wird in einer Vielzahl verschiedener Zellen wie z.B. im distalen Nephron der Niere, Lunge, Darm und Leber exprimiert (nach Expressions-Atlas EMBL-EBI in 114 Gewebearten und 398 Zelllinien; Stand 12.10.2013). Seine Hauptfunktion ist der transepitheliale Na^+ -Transport. Es konnte gezeigt werden, dass ENaC in Relation zu den HICCs in Hepatozyten steht und somit am RVI beteiligt ist (Böhmer, 2001; Wehner, 2006). In Rattenhepatozyten sind die Kanaluntereinheiten α , β und γ identifiziert worden

(Böhmer, 2000). Die Restriktion der mRNA der α ENaC Untereinheit reduzierte den RVI um 70% und zeigte hierdurch, dass α ENaC die funktionelle Untereinheit des Kanals ist (Böhmer, 2001). Die drei Kanaluntereinheiten α , β und γ bilden einen heterooligomeren Transmembrankanal aus. Jeder dieser Kanaluntereinheiten besteht aus 2 Transmembran-Helices (TM 1 sowie TM 2) und aus einem extrazellulären *Loop*. Der *Loop* jeder Untereinheit bildet eine Haarnadelschleife aus, die zusammen zu der Kanalpore für Kationen assoziieren (Abb. 4, Rossier, 2002). Die Stöchiometrie der Kanaluntereinheiten ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird eine heterotrimere ($\alpha:\beta:\gamma$ 1:1:1) (Abb. 4) wie auch eine heterotetramere Struktur ($\alpha:\beta:\gamma$ 2:1:1) diskutiert (Dijkink, 2002; Rossier, 2002). Die Amino (N)- und Karboxyl (C)-Termini sind im Zytosol lokalisiert. Zusätzlich wurde eine 4. Kanaluntereinheit, δ ENaC, identifiziert, welche hohe Homologie in der Aminosäuresequenz zur α -Untereinheit aufweist. Zur Ausbildung eines typischen ENaC müssen die Kanaluntereinheiten α , β und γ anwesend sein. Da die δ -Untereinheit der α -Untereinheit sehr homolog ist, kann δ ENaC α ENaC ersetzen. Solche δ , β , γ ENaC werden in wenigen Gewebetypen exprimiert (Kellenberger, 2002). Dessen Funktion ist jedoch bisher noch unklar. Die Regulation des epithelialen Natriumkanals erfolgt über mehrere Faktoren. Diese sind extra- und intrazelluläre Proteasen (*channel-activating-proteases*, Furin und Trypsin), extra- und intrazelluläre Ionenkonzentrationen (Na^+ und Ca^{2+}), Kinasen (Sgk1, ERK oder Proteinkinase A), Osmolarität und Hormone (Aldosteron, Vasopressin, AngiotensinII und Insulin) (Kellenberger, 2002; Loffing, 2009; Rotin, 2011; Dooley, 2012).

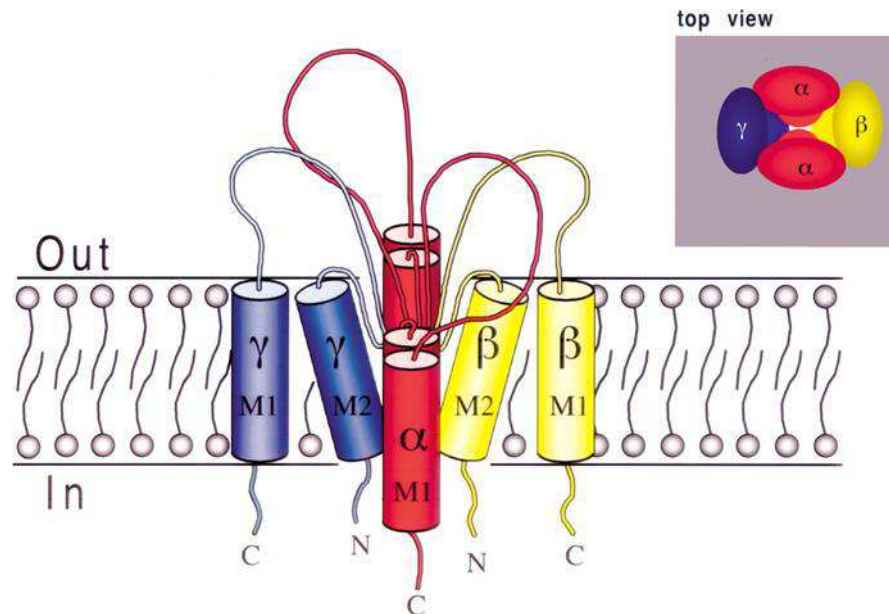


Abb. 4: Schematische Struktur des epithelialen Natrium Kanals ENaC. Die Untereinheiten α , β und γ besitzen 2 Transmembrandomaenen (M1 und M2) und bilden als heterotetramer oder heterotrimer einen typischen ENaC aus. Die Haarnadelschleifen jeder Kanaluntereinheit bilden zusammen die selektive Kanalpore aus. N- und C-Termini sind intrazellulaer lokalisiert und haben regulatorische Funktionen. Zusätzlich kommt im C-Terminus der β und γ Untereinheiten ein PY-Motiv vor, das für die Ubiquitinisierung des ENaC von Bedeutung ist (nicht dargestellt). Eine Aufsicht des ENaC ist oben links abgebildet (Rossier, 2002).

1.7.2 Die transienten Rezeptor Potential Kanäle

Die transienten Rezeptor Potential Kanäle (TRP-Kanäle) werden in 7 Unterfamilien gegliedert. Man unterscheidet die Familien TRPC (-klassischer Kanal), TRPV (-Vanilloid), TRPM (-Melastatin), TRPN (-NOMPC), TRPA (-ANKTM1), TRPML (-Mucolipin) und TRPP (-Polycystin). Allen gemeinsam ist, dass sie 6 Transmembrandomaenen besitzen und permeabel für Kationen sind. Die N- und C-Termini sind zytoplasmatisch lokalisiert. Zwischen der 5. und 6. Transmembrandomaene formt sich ein *Loop* aus, der die Porenregion bildet (Abb. 5). Die Untereinheiten der TRP-Kanäle assoziieren entweder zu Homo- oder Heterotetrameren. Grundsätzlich sind TRP-Kanäle durchlässig für monovalente Kationen und für Ca^{2+} - und Magnesium (Mg^{2+})-Ionen. Ausnahmen bilden TRPM4 und TRPM5, die ausschließlich monovalente sowie TRPV5 und TRPV6, die ausschließlich divalenten Kationen selektieren (Clampham, 2003). Den TRP-Kanälen werden eine wichtige Rolle u.a. bei der Wahrnehmung von Geschmack,

Pheromonen, Temperatur und Schmerz sowie bei der Zellvolumenregulation zugeschrieben (Venkatachalam, 2007). In der Zellvolumenregulation können TRP-Kanäle an RVD und RVI beteiligt sein, höchstwahrscheinlich als Effektor, sensorische Wahrnehmungs- oder auch als Teil der Signal-Transduktionsmaschinerie. Einige Inhibitoren, die für TRP-Kanäle eingesetzt werden sind Gadolinium und Ruthenium Rot (Minke, 2002; Becker, 2005).

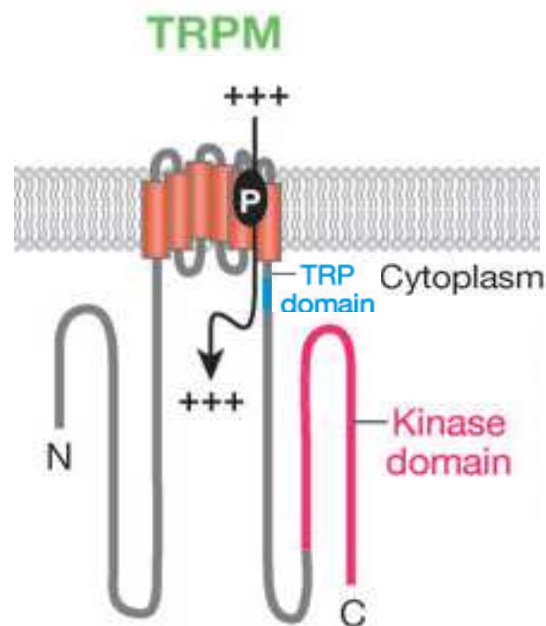


Abb. 5: Schematische Struktur eines transienten Rezeptor Potential Kanals (TRP). Als exemplarisches Beispiel wird die Subfamilie TRPM (-Melastatin) beschrieben. Es werden 6 Transmembrandomänen in die Zellmembran eingebettet. Zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne wird die Kanalpore durch den *Loop* (P) für Kation-Ionen gebildet. Neben der typischen TRP-Domäne, existiert am C-Terminus eine Protein-Kinase-Domäne zur Regulation des Kanals (Montell, 2005).

1.7.3 Der mechanosensitive Ionenkanal Piezo1

Der Mechanotransduktion wird in der Physiologie eine wichtige Rolle zugeschrieben. Piezo1 ist ein mechanosensitiver Ionenkanal, der an der Mechanotransduktion z.B. in Lunge, Haut und Harnblase beteiligt ist. Mit dem *Transmembrane Hidden Markov Model Prediction Program* (CBS, Lyngby, Denmark) wurden 24-36 Transmembrandomänen im Piezo1 identifiziert (Abb. 6). Eine Porenregion, die durch Ruthenium Rot und Gadolinium geblockt werden kann, ist durchlässig für monovalente Ionen sowie auch für Ca^{2+} -Ionen (Coste,

2012). Als mechanosensitive Ionenkanäle konnten Piezo1 und Piezo2 identifiziert werden (Coste, 2012). Sie lassen sich durch Dehnung der Lipiddoppelschicht öffnen und gehören zu den essentiellen *Strech-Activated Ion Channels* (SACs). Während Piezo1 in vielen Gewebetypen, nicht aber in Neuronen exprimiert wird, wird Piezo2 ausschließlich in Neuronen und Gliazellen der Spinalganglione exprimiert. Außerdem wird Piezo2 deutlich schneller aktiviert als Piezo1 (Coste, 2012). Die Funktion des Piezo2 besteht vermutlich in der Wahrnehmung von Berührung und Schmerz (Coste, 2010). Neben den beiden Piezo-Kanälen, konnten *TWIK-related K⁺-channels* (TREK) sowie *TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺-channel* (TRAAK) als weitere SACs identifiziert werden (Brohawn, 2012). Da in der Zellvolumenregulation die Lipiddoppelschicht unter dem Zellschwellen oder Zellschrumpfen unterschiedlichen Dehnungsgeraden und Drücken ausgesetzt ist, könnte auch Piezo1 an der Volumenregulation von Zellen beteiligt sein.

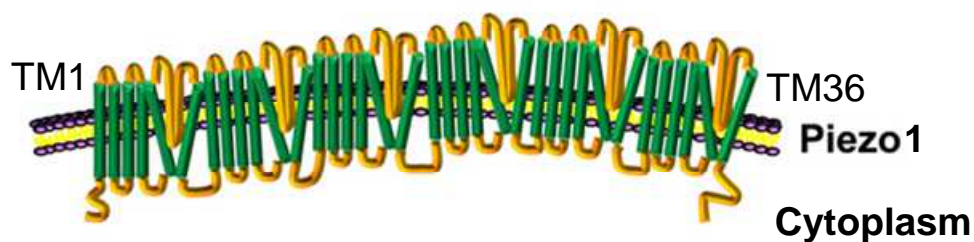


Abb. 6: Schematische Struktur des mechanosensitiven Piezo1. Die vollständige Topologie dieser mechanosensitiven Kanäle ist noch nicht geklärt. Mit dem *Transmembrane Hidden Markov Model Prediction Program* (CBS, Lyngby, Denmark) wurden bis zu 36 Transmembrandomänen (TM) im Piezo1 identifiziert. Eine noch nicht bekannte Porenregion ist durchlässig für monovalente Ionen wie auch für Ca^{2+} -Ionen. Bisher konnten Piezo1 und Piezo2 identifiziert werden, die sich durch Dehnung der Lipiddoppelschicht öffnen lassen und somit zu den *Strech-Activated Ion Channels* (SACs) gehören (Xiao, 2011, Coste, 2012).

1.7 Aquaporine

Anders als Ionenkanäle sind Aquaporine passiv an der Zellvolumenregulation beteiligt. Sie ermöglichen den Transport von hauptsächlich Wassermolekülen über die hydrophobe Lipiddoppelschicht, die ansonsten eine sehr geringe

Permeabilität für Wasser besitzt. Die Arbeitsgruppe Blank et al (2003) konnte zeigen, dass Aquaporine auch als Gaskanäle fungieren, indem sie CO₂ Permeabilität nachwies. Insgesamt wurden bisher 13 Aquaporine (AQP 0-12) entdeckt, die in unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert werden und in sehr unterschiedliche Prozesse involviert sind (s. unten Tabelle 1) (Verkman, 2005; Carbrey and Agre, 2009). Neben den gewöhnlichen Aquaporinen (AQP 0, 1, 2, 4, 5 und 8) existieren die Aquaglyceroporine (AQP 3, 7, 9 und 10). Letztere sind zusätzlich permeabel für kleine organische Moleküle wie Lactat, Harnstoff oder Glycerol (Verkman, 2005; Jensen, 2002; Carbrey and Agre, 2009). Ein Gewebetyp kann verschiedene Aquaporine exprimieren, so z.B. Aquaporin 8, 9 und 11 in Hepatozyten. Laborintern konnte zusätzlich Aquaporin 1 und 4 in HepG2 nachgewiesen werden. Die Funktion eines Aquaporins besteht darin, Wassermoleküle in Gegenrichtung zum osmotischen Gradienten diffundieren zu lassen, um das thermodynamische Gleichgewicht für Wasser z.B. in der Zellvolumenregulation, Proliferation oder auch Zellmigration (Kida, 2005; Verkman, 2005; La Porta 2010) aufrecht zu erhalten.

Tab. 1: Funktion und Expression von Aquaporinen (Verkman, 2005)

AQP	Permeabilität	Gewebeexpression
AQP0	?	Faserzellen des Auges
AQP1	Wasser	Nierentubulus, Endothelzellen, Erythrozyten, Choroid Plexus, Ziliar-Epithelium, Lymphatische Zellen des Darms, Kornea-Endothelium
AQP2	Wasser	Sammelrohre der Niere
AQP3	Wasser, Glycerol	Sammelrohre der Niere, Epidermis, Epithelium der Lungenwege, Bindehaut, Urinblase
AQP4	Wasser	Astrogliazellen des Gehirns und Spinalcords, Sammelrohre der Niere, Drüsen-Epithelium, Lungenwege, Skelettmuskulatur, Magen, Retina
AQP5	Wasser	Drüsen-Epithelium, Kornea-

		Epithelium, Alveolar Epithelium, Gastrointestinaltrakt
AQP6	Chlorid?	Sammelrohre der Niere
AQP7	Wasser, Glycerol	Fettgewebe, Testis, proximaler Nierentubulus
AQP8	Wasser	Leber, Pankreas, Darmzellen, Speicheldrüsen, Testis, Herz
AQP9	Wasser, Urea, kleine gelöste Stoffe	Leber, weiße Blutkörperchen, Testis, Gehirn
AQP10	Wasser, Glycerol	Dünndarmzellen
AQP11	?	Niere, Leber
AQP12	?	Azinösen Pankreaszellen

Die Struktur eines Aquaporin-Moleküls besteht aus 6 membrandurchspannenden α -Helices. Diese sind mit 3 extrazellulären und 2 intrazellulären *Loops* miteinander verbunden. Eines der intrazellulären *Loops* (*Loop 2*) und extrazellulären *Loops* (*Loop 6*) bildet jeweils eine kurze α -Helix aus, die teilweise in die Zellmembran reicht. Zusammen bilden die 2 kurzen α -Helices eine Pore für Wassermoleküle. Die Selektivität der Wassermoleküle entsteht durch ein spezifisches Strukturmotiv aus den Aminosäuren Asparagin-Prolin-Alanin, das in den porenbildenden *Loops 2* und *6* lokalisiert ist (Abb. 7). Aquaporine kommen in biologischen Systemen als Homotetramere vor. Die Translokation des Aquaporins 1 erfolgt nach osmotischem Stress und dem darauf folgenden Ca^{2+} -Einstrom durch TRP-Kanäle. Calcium ist ein pluripotenter und ubiquitärer *second messenger* in biologischen Systemen und auch an der Regulation von Aquaporinen verantwortlich (Blank, 2003). Hierbei scheint der C-Terminus involviert zu sein. Im C-Terminus konnten Ca^{2+} -Bindungsstellen nachgewiesen werden, die in der Translokation von Aquaporinen an die Zellmembran eine bedeutende Rolle spielen (Fotiadis, 2002).

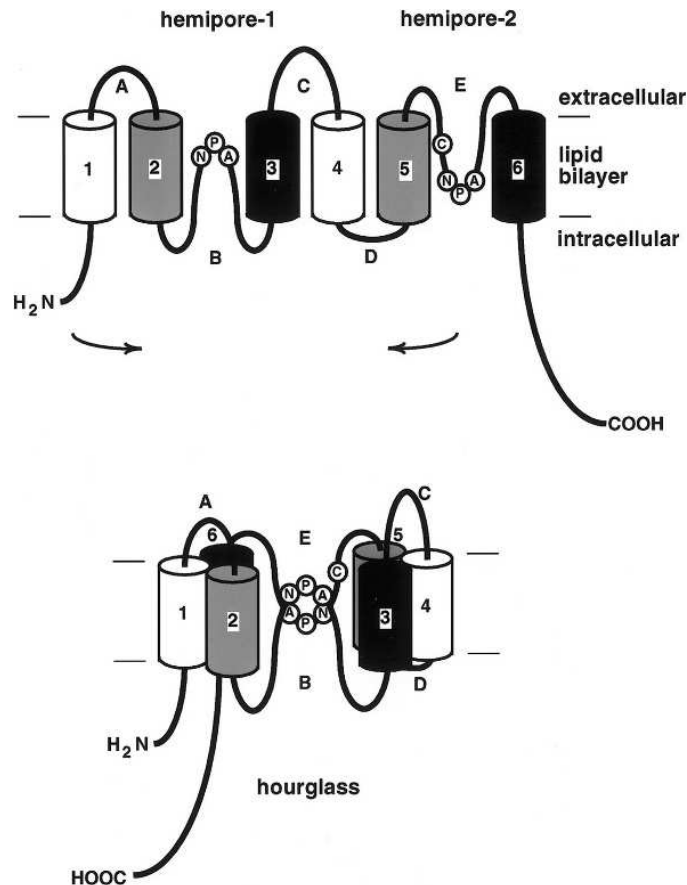


Abb. 7: Schematische Struktur des Aquaporin 1. Die obige Abbildung zeigt das Aquaporin als Monomer mit 6 Transmembrandomänen. Die N- und C-Termini liegen zur Regulation des Wasserkanals im Zytoplasma. Loop B und E interagieren über Helices mit der Membran und bilden zusammen über das spezifische Strukturmotiv aus Asparagin-Prolin-Alanin eine selektive Wasserpore. Diese Struktur des Aquaporin-Monomers wird auch als *hourglass* bezeichnet. Aquaporine kommen in biologischen Systemen als Homotetramere vor (modifiziert nach Jung, 1994).

Aquaporine sind offene Kanalproteine. Somit kann der Transportprozess passiv über Diffusion erfolgen. Die Diffusion der Wassermoleküle über die Aquaporine kann mit Quecksilber-, Silber- und Gold-Ionen inhibiert werden, die kovalent an eine Cystein-Seitenkette in der Pore binden und diese „verstopfen“. Diese Ionen binden an sämtliche Schwefelatome und spalten Schwefelbrücken, die für die Struktur und Funktion von Proteinen und damit für biologische Systeme unverzichtbar sind. Ein Aquaporin 1 und Aquaporin 4 spezifischer, jedoch nicht toxischer Inhibitor ist das synthetisch hergestellte AqB013 (Migliati, 2009). Zusätzlich wird Wasser nicht nur über Aquaporine, sondern auch über Ionen-Transporter, wenn auch nur in geringen Mengen, transportiert (Agre, 2004).

1.8 Hormon-basierte Regulierung der reversiblen Kryoarretierung

Schon während der Kühlung zu Beginn einer Kryoarretierung, nehmen biologische Systeme offenbar die Veränderung der Temperatur wahr. Unsere Arbeitshypothese war, dass biologische Systeme spezifisch auf diese Temperaturabweichung nämlich mit der Regulierung des Wasserhaushaltes reagieren, um sich bestmöglich vor der nicht-physiologischen Bedingung zu schützen. Dabei strukturiert sich auch das Zytoskelett um, Membranen rearrangieren sich, enzymatische Reaktionen, Diffusion von Proteinen und Ionen sowie der Membrantransport sind verlangsamt und Makromoleküle destabilisieren sich (Al-Fageeh, 2006; Hazel, 1995). Die Veränderung, die eine Zelle weiterhin betrifft, ist die Aktivierung von z.B. Kälte-induzierten RNA-Bindeproteinen, die das Expressionsmuster von Proteinen innerhalb einer Zelle zur Stabilisierung ändern. Solche RNA-Bindeproteine sind Cirp und RBM3 (Derry, 1995; Nishiyama, 1997). Die Translation der mRNA scheint ein wichtiger Schlüssel in der Kälteschock-Antwort zu sein. Jedoch kann die Transkription und Translation von Proteinen mehrere Stunden dauern, Zeiten die der Zelle beim Einfrieren nicht zur Verfügung stehen. Das Expressionsmuster wichtiger Proteine, die zur Stabilisierung der Zelle während oder nach Kühlung und Kryoarretierung beitragen, könnte stattdessen durch eine Proteintranslokation aus vesikulären Speichern an die Zellmembran transportiert werden. Die Proteintranslokation erfolgt im Gegensatz zur Translation und Transkription innerhalb weniger Minuten. Aber auch die Endozytose von spezifischen Proteinen könnte verhindert werden, um das Zellüberleben nach einer Kryoarretierung deutlich zu erleichtern. Solch eine Regulierung der Endozytose und die Stabilisierung von Proteinen an der Zellmembran könnten mittels einer Hormon-basierten Steuerung erfolgen, die eine reversible Kryoarretierung gezielt unterstützt.

1.8.1 Regulierung der reversiblen Kryoarretierung mit Vasopressin

Das Vasopressin, auch als Arginin-Vasopressin (AVP) bezeichnet, ist ein antidiuretisches Hormon. Wegen der geringen Größe von 9 Aminosäuren (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly), ist das Vasopressin ein Nanopeptid

(Kwiatkowska, 2013). Ein synthetisches Analogon des Vasopressins, ist das Desmopressin (1-desamino-8-D-Arginine-Vasopressin), welches in der Medizin Verwendung zur Behandlung von Nykturie und Diabetes insipidus erlangt (Oiso, 2013). Vasopressin wird im Hypothalamus gebildet und im Hypophysenhinterlappen gespeichert, von wo es bei Bedarf ins Blut ausgeschüttet werden kann. Neben Vasopressin ist auch Aldosteron ein antidiuretisches Hormon. Beide sind an der Steuerung des Wasserhaushaltes bei Wassermangel im Blutplasma des Organismus verantwortlich. Dieser Wassermangel wird mittels Osmorezeptoren im Hypothalamus wahrgenommen und dann die antidiuretischen Hormone aus dem Hypophysenhinterlappen ins Blut ausgeschüttet. Gelangen die antidiuretischen Hormone an die Epithelzellen des Sammelrohrs der Niere, binden sie an V2-Rezeptoren (Inoue, 2001). Die Translation und Translokation von Aquaporin 2 wird nun eingeleitet, so dass es zu einer Wasserpermeabilität dieser Zellen kommt und Wasser osmotisch aus dem Harn in die Sammelrohre reabsorbiert wird (Wang, 2004). Schließlich gelangt das Wasser ins Blut. Auch der Na^+ -Transport wird durch Vasopressin moduliert. Darüber hinaus wirken antidiuretische Hormone gefäßverengend und regeln somit den Blutdruck (Schrier, 2005). Über weitere Rezeptoren hat das Vasopressin auch zusätzliche Funktionen. So wird über V1A-Rezeptoren in Hepatozyten Glukoneogenese und Signalkaskaden zur Regulation der Ionenkanäle aktiviert.

Die Regulation der Ionenkanäle könnte eine entscheidende Schlüsselfunktion für die Reversibilität der Kryoarretierung darstellen (Abb. 9). Durch das Binden des Vasopressins an dessen Rezeptor, wird über cAMP-Akkumulation die Proteinkinase A aktiviert, die wiederum WW-Domänen des Nedd4-2 phosphoryliert. WW-Domänen sind Bindestellen für PY-Motive des ENaC (Rotin, 2011). Kommt es zur Interaktion des Nedd4-2 mit ENaC, wird ENaC ubiquitiniert und von der E3-Ligase gespalten. Anschließend erfolgt die Endozytose des Natrium-Kanals. Durch Inhibierung des Nedd4-2 über Phosphorylierung, bindet das Ubiquitinierungsprotein an das Protein 14-3-3 (Rotin, 2011). Über diesen Mechanismus wird die Interaktion des 14-3-3 mit ENaC unterbunden und der Natrium-Transport aufrechterhalten (Abb. 8).

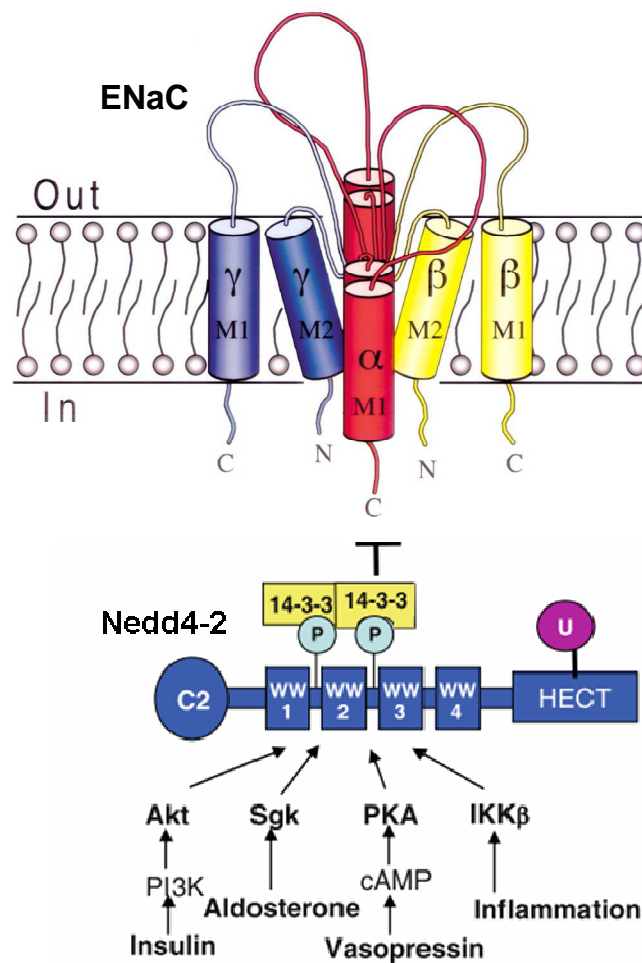


Abb. 8: Regulierung des ENaC. Die WW-Domänen des Nedd4-2 können nicht an die PY-Motive des ENaC binden und diesen ubiquitinieren, wenn Hormone wie Insulin, Aldosteron und Vasopressin sowie inflammatorische Faktoren (z.B. TNF α) über Kinasen (Sgk1, Akt, Proteinkinase A or IKK β) die Bindestellen des Nedd4-2 phosphorylieren. Die phosphorylierten Bindestellen des Nedd4-2 interagieren mit 14-3-3 Proteinen und verhindern somit die Interaktion des ENaC zur Ligase. Die Endozytose des ENaC wird dadurch unterbunden und der Na⁺-Transport wird weiterhin aufrechterhalten (modifiziert nach Rossier, 2002 und Rotin, 2011).

In HepG2 Zellen ist ein durch Vasopressin regulierbarer Na⁺-Transporter ENaC, der unter hypertonen Bedingungen - bei Schrumpfung einer Zelle - Na⁺-Ionen aktiv in die Zelle transportiert und somit am RVI beteiligt ist. Da es bei der Kühlung von Zellen zum Verlust des Zellvolumens und bei der Kryoarretierung zur Kryodehydratation kommt, erleiden viele Zelltypen bei der Rückführung von tiefen Temperaturen den Zelltod. Eine gesteigerte Rehydratation der Zelle könnte mittels vermehrtem Na⁺-Influx erreicht werden - also durch Stimulation

des ENaC mittels Vasopressin - wobei Wassermoleküle passiv den Na^+ -Ionen folgen. Dieser Mechanismus könnte dazu beitragen, die Zellschäden, die durch die Kryopreservation entstehen, zu umgehen und die reversible Kryoarretierung bestmöglich mittels eines hormonellen, nicht-toxischen Kryoprotektivums zu erleichtern (Abb. 9).

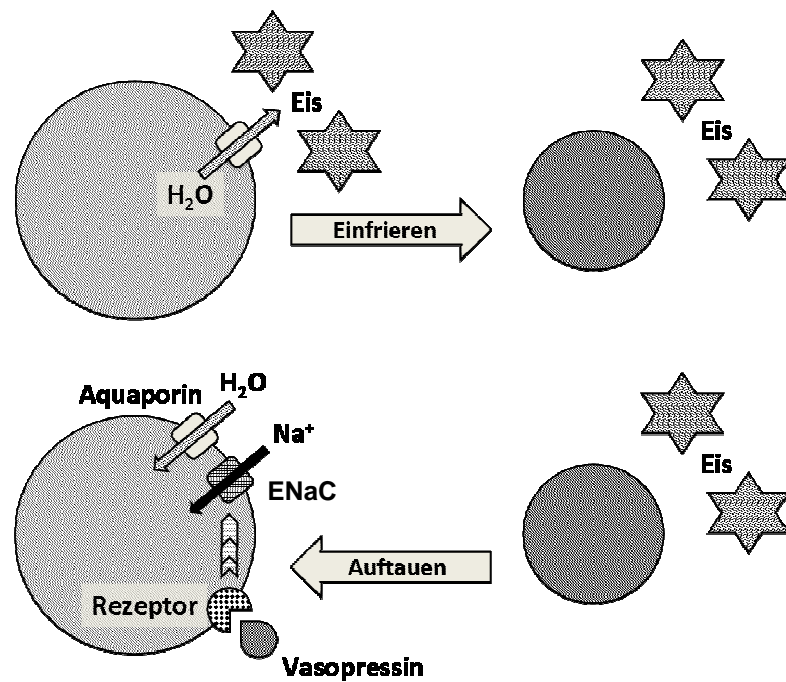


Abb. 9: Vasopressin als Hormon-basierte Regulierung der reversiblen Kryoarretierung. Durch die Bildung von extrazellulärem Eis wird der Zelle Wasser entzogen. Es kommt zur Kryodehydratation und Zellschrumpfung. Nach dem Auftauen führt die ENaC-Stimulierung durch Vasopressin zu einem erhöhten Na^+ -Influx und dem anschließenden passiven Einstrom von Wasser über Aquaporine. Somit könnte die Zelle der schädigenden Kryodehydratation durch den kryoprotektiven Effekt des Hormons Vasopressin entgegenwirken (Wehner, unveröffentlicht).

2 Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der langsamen und reversiblen Kryoarretierung von Zellen unter Mitwirkung der zellulären Prozesse des *Regulatory Volume Increase* (RVI) und Aquaporinen die Methodik der zeitaufgelösten akustischen Mikroskopie angewandt. Bezüglich der Analyse der HICC Aktivität vor und nach Kryokonservierung wurden *Whole-Cell Patch-Clamp* Messungen durchgeführt. Außerdem wurde ein Standard-Kryoprotokoll etabliert, bei dem ein diuretisches Hormon als neuartiges Kryoprotektivum eingesetzt wurde. Die Durchführung aller Versuche wurde stets mit einer Karbogen-gepufferten Lösung ausgeführt, um die Zellkultur-Bedingungen physiologisch zu halten.

2.1 Zellkultur-Methoden

2.1.1 HepG2 Zellen

2.1.2 Kultivierung von HepG2 Zellen

Die humane Leberkarzinom HepG2 Zelllinie (ATCC, Virginia, USA) wurde in DMEM mit zugesetztem FKS (10%), Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 µg/ml), 5 ml L-Glutamin (200 mM) und NEAA (1%) in 75 cm² Kulturflaschen (BD, New Jersey, USA) bei 37°C und 5% CO₂ im Wasserdampf-gesättigtem Incubator (Excella Eco 170, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) kultiviert. Die leicht erhöhte Osmolarität des DMEMs wurde auf 300 mosM eingestellt und mit einem Osmometer überprüft (*Osmometer Automatic*, Knauer, Berlin, Deutschland). Bei einer Konfluenz von 80% wurden HepG2 Zellen zweimal wöchentlich subkultiviert. Dazu wurden die Zellen einmal mit einem halben Mediumvolumen PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA versetzt. Es folgte eine 3 minütige Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen in DMEM resuspendiert, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach erneuter Resuspension im frischen Zellkulturmedium wurde die Zellzahl und Vitalität mittels eines automatisierten Zellzählers (Vi CellTM XR, Kalifornien, USA) ermittelt. Zur Subkultivierung wurden 1,5 bis 2 x 10⁶ Zellen in 75 cm² Kulturflaschen wieder ausgesät. HepG2 Zellen

wurden in den Passagen 10 bis 30 in die Versuche aufgenommen. Die in Versuchen verwendeten Glas- und Plastikschaalen wurden stets mit Kollagen R (Serva, Heidelberg, Deutschland) beschichtet.

2.1.3 Vektor-Transfektion der HepG2 Zellen mit Lipofectamin™ 2000

Zur transienten Vektor-Transfektion der niedrig passagierten HepG2 Zellen wurde Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Kalifornien, USA) verwendet, welches bei dieser Zelllinie die höchste Transfektionsrate erzielte. Eine Kollagenbeschichtete 10 cm² Schale (BD, New Jersey, USA) wurde mit 2×10^6 Zellen besät und am nächsten Tag laut Herstellerangaben mit Plasmid-DNA transfiziert.

2.1.4 Stabile Transfektion der HepG2 mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Mit Plasmid-DNA transfizierte HepG2 Zellen wurden 24 bis 48 Std nach Lipofectation wie oben bereits beschrieben abgelöst und durch kurzes anzentrifugieren im Filtrerröhrchen von groben Zellklustern getrennt und in PBS aufgenommen. Im Durchflusszytometer BD FACSAria™ II (BD, New Jersey, USA) wurden die Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität in 96-Lochplatten sortiert. Dabei wurde in jedes der 96 Löcher 10 bzw. 50 Zellen mit ähnlicher Fluoreszenzintensität und Zellgröße sortiert, da Einzelzellen aufgrund mangelnder Wachstumsfaktoren von Nachbarzellen keine Subklone bildeten. Zur Zellsortierung wurden Zellen mittels Überdruck in die Messküvette eingeführt und durch eine Trägerflüssigkeit beschleunigt, wodurch eine Bildung von Aggregaten verhindert wird und Einzelzellen an einem fokussierten Lichtstrahl der Wellenlänge 488 nm vorbeigeleitet und in die 96-Lochplatte sortiert werden. In der 96-Lochplatte wurden die HepG2 Zellen mehrere Tage unter Zugabe von 700 µg/ml Geneticin (G418 Sulfat) kultiviert. Zellen mit entsprechendem Antibiotikumresistenzgen wurden auf diese Weise selektiert. Die Plasmid-DNA stabil in das Genom integrierte HepG2 Zellen bildeten Kolonien, die schließlich zur Vermehrung in Mehrlochplatten und anschließend in eine 75 cm² Kulturflasche überführt wurden. Die Kultivierung und Subkultivierung der stabil transfizierten HepG2 Zellen erfolgte wie unter 2.1.2 bereits beschrieben, lediglich mit dem Unterschied der Zugabe von G418 zur Erhaltung der Selektion.

2.1.5 siRNA-Transfektion der HepG2 Zellen mit DharmaFect 1

HepG2 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 30 - 50 % 9 Std nach dem Aussähen in eine 12-Lochplatte mittels DharmaFect 1 (ThermoFisher, Massachusetts, USA) mit fluoreszierender Ziel-siRNA (s. Anhang Tabelle 5) oder negativ siRNA (s. Anhang Tabelle 5) als Kontrolle gemäß den Herstellerangaben lipotransfiziert. Nach 15 Std wurde das Transfektionsreagenz gegen frisches Zellkulturmedium ersetzt und 40 - 48 Std nach Transfektion wurden *Whole-Cell Patch-Clamp* Analysen vor und nach Kryopreservation durchgeführt. Das Ablösen der Zellen aus der 12-Lochplatte erfolgte mittels einer Einmal-Pipette.

2.2 HeLa Zellen

2.2.1 Kultivierung von HeLa Zellen

Die humane Cervix Karzinom HeLa Zelllinie wurde in MEM mit zugesetztem FKS (10%), 100 µg/ml Streptomycin and 40 IU/ml Penicillin wie bereits für HepG2 Zellen unter 2.1.2 beschrieben kultiviert und mittels Trypsin/EDTA passagiert.

2.3 HDMEC Zellen

2.3.1 Kultivierung von HDMEC Zellen

Die primären *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells* (HDMEC) wurden von PromoCell erworben, sofort in Kultur genommen und bis zur 3. Passage expandiert. Für die HDMEC Zellen wurde ein Endothelzellwachstumsmedium von PromoCell mit dem entsprechenden Supplement-Mix verwendet. Nach Zugabe des Supplement-Mixes, betragen die Konzentrationen für ECGS/H 0,4%, FKS 5%, EGF 0,1 ng/ml, Hydrokortison 1 µg/ml und bFGF 1 ng/ml. Die Kultivierung sowie die Subkultivierung der HDMEC Zellen erfolgten wie unter 2.1.2 beschrieben. Da primäre Zellen sich nicht beliebig lang passagieren lassen, wurden für Versuche die Passagen 4 bis 7 verwendet. Die in den Versuchen eingesetzten Glas- und Plastikschalen wurden stets mit Kollagen R beschichtet.

2.4 Zellgröße- und Vitalitätsbestimmung von HepG2 mit dem Countess™ Automated Cell Counter

Aufgrund der optimalen Größe des Countess™ Automated Cell Counters (Invitrogen, Kalifornien, USA) mit 27 x 20 x 19 cm und der gewünschten Betriebstemperatur, konnte der Zellzähler in 35 oder 5°C Räume platziert, in Betrieb genommen und verwendet werden. Außerdem erlaubte die kurze Messdauer von 20 Sekunden und die Möglichkeit der Nachbearbeitung der Daten mittels der Countess™ Software 2.05 eine präzise Bestimmung von Zellgröße und Vitalität nach der Trypan Blau Ausschlussfärbung.

Um den Einfluss der Temperatur auf Zellgröße und Vitalität zu untersuchen, wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in eine 10 cm^2 Schale ausgesät und 2 bis 3 Tage bis zu einer 80%igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit warmem PBS gewaschen, 3 min mit EDTA (0,5% in PBS) bei 37°C inkubiert und anschließend vereinzelt. Nach einer 3 minütigen Zentrifugation bei 37°C und 1000 rpm, wurden die Zellen in 5 ml 37°C warmem DMEM oder in 5°C kaltem DMEM resuspendiert. Unmittelbar darauf wurden die Zellen laut Herstellerangaben mit Trypan Blau (300 mosM) versetzt, Zellgröße sowie Vitalität bestimmt und dieses als Zeitpunkt 0 definiert. Die Messreihe verlief weiterhin als Doppelbestimmung über 10, 30, 60, 120 und 180 Minuten unter langsamen Rühren bei 37°C und 5% CO₂ oder 5°C und 1,9% CO₂.

2.5 Bestimmung des osmotisch inaktiven und aktiven Volumens von HepG2 und HeLa Zellen mit dem Countess™ Automated Cell Counter

HepG2 und HeLa Zellen wurden in einer Zellkonzentration von $1,5 \times 10^6$ in eine 10 cm^2 Schale ausgesät und 2 Tage kultiviert. Diese wurden nach Standard-Zellkulturtechniken vereinzelt und für 2 Minuten folgenden Osmolaritäten ausgesetzt: 526, 450, 400, 360, 300 und 220 mosM. Die PBS-Osmolarität wurde entweder mit D-Mannitol (Serva, Heidelberg, Deutschland) erhöht oder mit *A. dest* erniedrigt und mittels eines Osmometers überprüft. Anschließend wurden die osmotisch gestressten Zellen 1:1 mit Trypan Blau versetzt, welches entsprechende Osmolarität besaß und das Zellvolumen mittels Countess™ Automated Cell Counters als Doppelmesswerte bestimmt. Jedes der verwendeten Materialien und Lösungen sowie jeder Messvorgang wurden bei

37°C durchgeführt. Die Daten wurden mit der *Countess™ Software 2.05* nachbearbeitet, so dass große Zellgruppen und Trypan Blau positive Zellen von der Auswertung ausgeschlossen waren.

2.6 Bestimmung von Aktivierungsenergien

In der Grundlagenforschung der Kryobiologie ist die Quantifizierung der Aktivierungsenergie eine weit verbreitete Herangehensweise zur Analyse der Membranpermeabilität für Wasser (Hunter, 1992; Chaveiro, 2006). Die Membranpermeabilität für Ionen durch Transporter wurde ebenfalls anhand der Bestimmung von Aktivierungsenergien charakterisiert (Sesti, 1996; Schmitt, 2005). Der Zusammenhang von Geschwindigkeitskonstante (k), Aktivierungsenergie (E_a), Temperatur (T) und der Gaskonstante ($R = 8,314 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$) wird durch die von S. Arrhenius aufgestellten Arrhenius-Gleichung beschrieben:

$$k = A * e^{(-E_a/RT)}$$

Durch die Messung der Reaktionsraten bei unterschiedlichen Temperaturen, kann die logarithmierte Geschwindigkeitskonstante gegen die reziproke Temperatur aufgetragen (Arrhenius-Graph) und die Aktivierungsenergie aus der Steigung der linearen Regression bestimmt werden (*The Physics of Proteins*, Chan 2010). Die Bestimmung der Aktivierungsenergien eignet sich gut zur Charakterisierung der Transportgeschwindigkeiten von Wasser und Ionen kryoarretierter und nicht-kryoarretierter Zellen.

2.7 Proliferationsanalysen

HepG2 und HDMEC Zellen wurden nach Standard-Zellkulturtechniken vereinzelt und wie unter 2.7.2 beschrieben kryokonserviert. Nach dem Auftauprozess wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in jedes „E-Loch“ der „E-Platte“ (Roche, Rotkreuz, Schweiz) ausplattiert und die Proliferation mit Hilfe des *xCelligence Real Time Cell Analyzers* (Roche, Rotkreuz, Schweiz) analysiert. Für 72 Stunden wurde im 15 Sekunden Takt die Änderung der elektrischen Impedanz bei Zellkontakt über Mikroelektroden im Boden der „E-Platte“ aufgezeichnet.

2.8 Kryokonservierung

2.8.1 Standard Kryokonservierung von Zellen in Suspension zur Langzeitlagerung

Zellen wurden wie bereits unter 2.1.2 beschrieben vereinzelt und in kaltem Zellkulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert. In einem Volumen vom 0,5 ml wurden 1×10^6 Zellen in Kryoröhrchen befüllt und in vorgekühlten Kryoboxen (Thermofisher, Massachusetts, USA) mit $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ erst bis -80°C gefroren, in -196°C transferiert und gelagert.

2.8.2 Kryokonservierung von adhärennten Zellen auf Deckgläsern

Kollagen-beschichtete Deckgläser (\varnothing 17 mm) wurden in 6-Lochplatten platziert, mit $0,5 \times 10^6$ Zellen besäht und 3 Tage bis zur Bildung eines Zellmonolayer kultiviert. Im Gegensatz zu abgelösten Zellen stellte sich das Einfrieren von adhärennten Zellen als besonders kritisch dar. Mit der einhergehenden schlechten Zellvitalität konnte die Vitalität und Proliferation nach Kryokonservierung besser untersucht werden. Außerdem bot das Einfrieren von adhärennten Zellen auf Deckgläsern die mehrfache Verwendung des Präparats in unterschiedlichen Versuchen.

Die Deckgläser mit dem Zellmonolayer wurden in 4°C kaltes Medium mit 10% DMSO transferiert und 3 min zum Equilibrieren inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser in Kryoboxen überführt, mit 100 μl 4°C kaltem Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 10% DMSO) überschichtet und mit $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ bis -50°C oder -80°C gefroren. Die Lagerzeit der adhärennten Zellen auf Deckgläsern betrug 2, 10 oder 50 Tage. Das Auftauen der adhärennten Zellen erfolgte in 4°C kaltem Zellkulturmedium mit einer Auftaurate von $100^\circ\text{C}/\text{min}$. Während des Auftauens wurde zeitgleich das DMSO durch Zugabe frischen Mediums ausgewaschen (Abb. 10). Erfolgte ein langsames Einfrieren ($-1^\circ\text{C}/\text{min}$) sowie ein schnelles Auftauen ($100^\circ\text{C}/\text{min}$), blieben die Zellen adhärennt und eine 30 minütige Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 zur Volumenwiedergewinnung wurde durchgeführt.

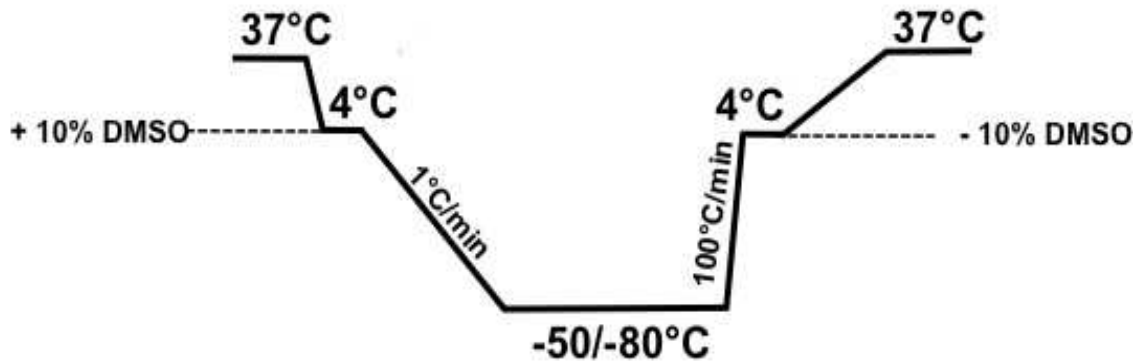


Abb. 10: Schematisches Protokoll zur Standard-Kryopreservation, bei dem DMSO als Kryoprotektivum bei 4°C hinzugefügt oder ausgewaschen wird. Das Frieren erfolgte langsam, wohingegen das Auftauen einen schnellen Prozess erforderte.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die adhärennten Zellen wie unter 2.1.2 geschildert vom Deckglas abgelöst und im automatisierten Zellzähler (Vi Cell™ XR, Kalifornien, USA) die Vitalität nach der Trypan Blau Ausschlussfärbung überprüft.

2.8.3 Hormone als Kryoprotektiva: Optimierung der Kryokonservierung von adhärennten Zellen auf Deckgläsern

Zur Optimierung der Vitalität von kryokonservierten Zellen wurden die einzufrierenden adhärennten Zellen 1 Std mit 100 nM Vasopressin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) im Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Danach wurde ein Wasch-Schritt mit PBS durchgeführt. Anschließend erfolgte das Protokoll zur Standard Kryopräservation wie unter 2.7.2 beschrieben (Abb. 10) sowie die Bestimmung der Vitalität nach der Trypan Blau Ausschlussfärbung.

2.8.4 Kryokonservierung mit Hilfe der Linkam-Stage

Eine Alternative zum Einfrieren der adhärennten Zellen in Kryoboxen bietet die Linkam-Stage (Linkam, Tadworth, England). Diese temperaturkontrollierte Mikroskopie Stage zum Einfrieren und Auftauen von adhärennten Zellen auf dem Deckglas bietet eine Temperaturstabilität von 0,1°C an. Die adhärennten Zellen

befinden sich dabei auf einem gekühlten Silberblock, der mit flüssigen Stickstoff (-196°C) umspült wird und auf die jeweilige Versuchstemperatur temperiert werden kann.

Das Protokoll zur Standard-Kryopreservation wurde ebenfalls an der Linkam-*Stage* angewendet. Der Vorteil dieser Methodik ist, dass mit konstant gehaltener Kühlrate von -1°C/min gefroren werden konnte. Weiterhin konnte der Auftauprozess auf derselben *Stage* durchgeführt werden, ebenfalls mit konstant gehaltener Wärmerate und zwar 100°C/min. Aufgrund des zum Kühlen notwendigen flüssigen Stickstoffes, kann keine Langzeitlagerung erfolgen und immer nur eine Probe kryokonserviert werden.

2.9 Mikroskopie-Techniken

2.9.1 Scannende zeitaufgelöste akustische Mikroskopie

Die scannende zeitaufgelöste akustische Mikroskopie (*Scanning Acoustic Microscopy* SAM) ist ein nicht-invasives Verfahren, bei dem mittels der Laufzeitmessung des hochfrequenten Ultraschalls mechanische Eigenschaften wie die akustische Impedanz von Zellen untersucht werden können. Die akustische Impedanz verhält sich invers zum Zellvolumen, wodurch sich Volumenveränderungen als Reaktion verschiedene Bedingungen untersuchen lassen. Im Gegensatz zu vielen anderen Mikroskopie-Techniken ist das biochemische Färben des Zellmaterials zur optischen Abbildung hier nicht notwendig. Außerdem bietet diese Technik das Scannen multipler Zellflächen während einer Messung an und ist somit mit einer hohen experimentellen Ausbeute verbunden.

2.9.2 Aufbau und Funktionsweise der SAM

Das akustische Mikroskop besteht aus der Kombination eines inversen Mikroskops (IX81 Olympus) zur optischen Abbildung der Zellen und einer akustischen Linse (Abb. 11). Die akustische Linse dient der Erzeugung, Fokussierung und dem Empfang des Ultraschalls, der im Frequenzbereich von 1 GHz liegt. Eine mechanische Einheit an der akustischen Linse dient dem Antrieb in x-, y- und z-Richtung. Ein Pulsgenerator, zu Beginn des Systems, generiert 1 ns lang einen elektrischen Sendepuls, der über einen Hochfrequenzumschalter

an die akustische Linse geleitet wird. Die akustische Linse setzt sich aus einem piezoelektrischem Dünnschicht (*Transducer*), der als Schallwandler dient, und einem Saphirzylinder zusammen, der den hochfrequenten Ultraschall leitet und an der eingeschliffenen Halbkugel, 60 μm über den Zellen, fokussiert abgestrahlt. Der Ultraschall wird zum einen an der Zelloberfläche (1. Zellecho E_1) und zum anderen an der Glasoberfläche (2. Referenzecho E_2) reflektiert. Es entstehen zwei Schallwellen die zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einer Differenz von ca. 50 ns, also zeitaufgelöst von der Linse erfasst werden. Der *Transducer* wandelt die akustischen Signale in elektrische Signale um, die vom Empfangsumschalter an einen Transientenrekorder geleitet, dort digitalisiert und gespeichert werden (Abb. 12).

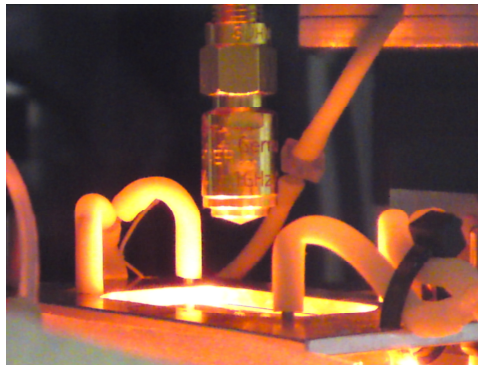


Abb. 11: Abbildung der akustischen Linse (1GHz) über der Messkammer.

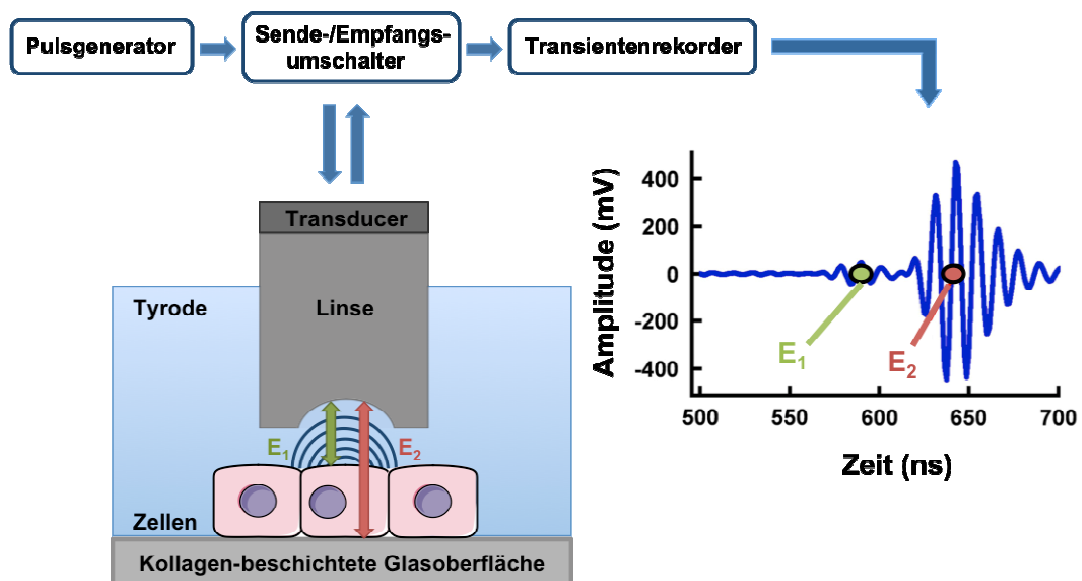


Abb. 12: Modifizierte und vereinfachte Abbildung der Funktionsweise des *Scanning Acoustic Microscopy* (SAM) (Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT).

Der zu detektierende Parameter, die akustische Impedanz Z_a lässt sich dann aus den Werten der Zelldichte ρ sowie aus der Schallgeschwindigkeit c berechnen:

$$Z_a = \rho \times c$$

Wobei die Schallgeschwindigkeit c sich wie folgt zusammensetzt:

$$c = c_1 \times (t - t_1) / (t_2 - t_1)$$

Das System des akustischen Mikroskops wird von einer Inkubationskammer umgeben (hergestellt von der hauseigenen Werkstatt des MPI) und mit einem Inkubator (EMBL Incubator GP 168) kombiniert, um die für den Versuch notwendige Temperatur konstant zu halten. Die Inkubationskammer wurde mit einem Umwälzkühler (Huber, Schaffhausen, Schweiz) und einer Kühlflüssigkeit kombiniert, damit eine Kühlung der Kammer erzielt werden konnte. Um Wärme- bzw. Kälteverlust zu vermeiden wurde die Inkubationskammer sowie Teile des schwingungsgedämpften Tisches zusätzlich mit Isolationsmaterialien umhüllt, da schon geringe Temperaturschwankungen sich in der Datenaufzeichnung bemerkbar machten. Auch die Perfusionslösung wurde mit Hilfe von Peltier-Elementen temperiert. Mit einer Mikropumpe (mp6, Bartels Mikrotechnik GmbH) und zugehörigen Steuereinheit mp-x (Bartels Mikrotechnik GmbH) wurde die Perfusionslösung angetrieben und die Zellen mit 5 ml/min mit der jeweiligen Lösung überströmt. Für den Wechsel der unterschiedlichen osmotischen Lösungen wurde ein Software-gesteuertes Mehr-Kanal-Ventil verwendet.

Für die Steuerung der Datenaufnahme der akustischen Informationen wurde das Programm *SASAM Acoustic Investigator*, für die Steuerung des Mehr-Kanal-Ventils und Kreuztisches *SASAM Experimental Control* verwendet. Die Datenprozessierungen wurden mit *SASAM Acoustic Researcher* und *ImageJ 1.34s* sowie *OriginLab 7.0* durchgeführt. *SASAM Acoustic Investigator*, *SASAM Experimental Control* und *SASAM Acoustic Researcher* wurden am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in der Arbeitsgruppe für Biomedizinische Ultraschall-Forschung (St. Ingbert) entwickelt und von der Firma Kibero GmbH (Saarbrücken) weiterentwickelt.

2.9.3 Messung der Temperatur- und Osmolaritätsabhängigkeit von RVI und Zellschrumpfen sowie die Bestimmung von Aktivierungsenergien vor und nach Kryokonservierung

Für die Messung der akustischen Impedanz von Zellen wurden stets Zellmonolayer verwendet. Dabei sollte beachtet werden, dass eine geringe Zellzahl eine geringe Zellhöhe zu Folge hatte, die mit einem Verlust der Impedanz-Detektion einherging oder eine zu hohe Zellzahl zu mehreren Zellschichten führte, die die Wahrnehmung der Impedanzveränderung erschwerte. Die Aussaat der Zellen betrug daher je nach Proliferationsrate zwischen $0,8$ bis $1,2 \times 10^6$ in eine *LabTek-Kammer 1.0 Borosilicate* (Nunc) oder *MatTek-Kammer P35G-1.0-20C* (MatTek Corporation), die 3 Tage kultiviert wurde. Messungen bei physiologischen Bedingungen (35°C , 5% CO_2) und kalten Temperaturen (30 bis 10°C) wurden durchgeführt, letztere wurden wie in der folgenden Tabelle angegeben bei einem entsprechendem CO_2 Gehalt im gekühlten Inkubator zur Temperaturequilibration inkubiert.

Tab. 2: Temperatur mit CO_2 -Gehalt zur Kälteequilibration der Zellen

Temperatur ($^\circ\text{C}$)	CO_2 (%)	Inkubationsdauer (Std)
35	5	0
30	4,1	1
25	3,6	1
20	3,1	1
15	2,7	1
10	2,3	1

Die verwendete Karbogen-gepufferte Lösung zur Perfusion der Zellen setzte sich aus den Substanzen 124mM NaCl , $2,68\text{mM KCl}$, $1,05\text{mM MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $1,8\text{mM CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 25mM HCO_3^- , $0,42\text{mM NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $5,55\text{mM Glucose} \times \text{H}_2\text{O}$ zusammen. Die Osmolarität der Lösung wurde mit zugesetztem D-Mannitol auf 300 mosM (isoton) oder 360 bis 526 mosM (hyperton) erhöht und der pH-Wert nach Temperatureinstellung unter CO_2 - und Karbogen-Begasung

auf 7,4 eingestellt. Für die Begasung der Lösung wurden Gasdurchflussregler (Vogt, Hamburg, Deutschland) verwendet, die eine präzise pH-Wert Einstellung erlaubten.

Die Inkubationskammer, in der die Messung vollzogen wurde, war über Nacht temperiert und mit dem entsprechenden CO₂-Gehalt durchströmt worden. Kurz vor Messbeginn wurde die Versuchskammer auf dem Kreuztisch befestigt, die akustische Linse in den optimalen Arbeitsabstand heruntergefahren und die Messung gestartet. Dabei wurde 5 Minuten eine isotone Basalmessung, 20 Minuten eine hypertone und anschließend 10 Minuten eine erneute isotone Messung durchgeführt. Pro Messung wurden 4 Zellflächen in einem Abstand von ca. 200 µm gescannt und erfasst. Das Scannen einer einzelnen Zellfläche dauerte 7 Sekunden. Die x- und y-Schrittweite betrug 4 µm x 4 µm in einer Scannfläche von 60 µm x 60 µm (225 Pixel) und resultierte somit in einer Mittelung aus 225 Messungen pro Scannfläche innerhalb von 7 Sekunden. Demnach wurde jede halbe Minute ein Messpunkt jeder 4 Zellflächen aufgenommen.

2.10 Elektrophysiologische Messungen

2.10.1 *Whole-Cell Patch-Clamp* Technik

Die *Patch-Clamp* Technik ist ein Verfahren, bei dem über eine als Mikroelektrode fungierende Glaskapillare der zu untersuchende Zelle ein Potential vorgegeben und der von der Zellmembran generierte Strom abgeleitet wird. Somit stellt sich dieses Verfahren bei der Untersuchung von Ionenkanälen auf ein spezifisches Millieu oder spezifische Substanzen als besonders geeignet dar.

2.10.2 Aufbau und Grundlage der *Whole-Cell Patch-Clamp* Technik

Um Membrankanalströme im pA-Bereich messen zu können, muss die mit intrazellulärer Lösung befüllte Glaskapillare auf die Membranoberfläche der Zelle aufgesetzt und dieser Teil der Membran elektrisch von der Umgebung isoliert werden. Dazu muss ein enger Kontakt zwischen der Zellmembran und der

Glaskapillare erzeugt werden, indem ein leichter Unterdruck in der Glaskapillare generiert wird. Ist der Kontakt der Zellmembran und der Glaskapillare entstanden, steigt der Widerstand der Kapillarenöffnung vom Megaohm (MΩ)- in den Gigaohm (GΩ)-Bereich an (*GigaSeal*). Die Spannung der Membran kann nun über den Verstärker auf einen definierten Wert geklemmt werden (*Voltage-Clamp*) mit dem auch gleichzeitig der Strom der Membran gemessen wird, um den vorgegebenen Strom aufrechtzuerhalten. Durch die Wahl eines geeigneten Haltepotentials kann der Beitrag bestimmter Ionen zum Membranpotential ausgeschaltet werden. Das Haltepotential sollte Nahe dem Umkehrpotential des betreffenden Ions liegen (-30 mV). Hier lag das Gleichgewichtspotential von Cl⁻. Der Rampenverlauf von -80 mV bis +20 mV zeigte daher bei -30 mV eine Veränderung, die abgelesen werden konnte.

Mittels eines zweiten Unterdruckes lässt sich das Membranstück unter der Glaskapillare herausreißen. In folge des Aufbrechens der Membran bildet sich ein Zugang zum Zytoplasma und der Strom durch die ganze Zellmembran kann gemessen werden. Diese Messkonfiguration wird als *Whole-Cell* Konfiguration bezeichnet. Vorteile dieser Konfiguration sind, dass die gesamte Zellmembran abgeleitet wird und auch Inhalte der intrazellulären Lösung z.B. Fluoreszenzmoleküle oder Polysaccharide in das Zytoplasma diffundieren und die Zelle von innen experimentell verändert werden kann. Die isotone intrazelluläre Lösung bestand aus 25 mM NaCl, 4,74 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 2 mM TEACl, 0,5 mM Na₂GTP, 2mM Na₂ATP, 1 mM EGTA und 65,26 mM Na-Glukonat. Der pH Wert wurde mit einer Karbogen-Begasung auf 7,3 eingestellt. Die verwendete isotone Badlösung bestand aus 85 mM NaCl, 15 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 2 mM TEACl. Der pH Wert wurde mit einer Karbogen-Begasung auf 7,5 eingestellt.

Die Glaskapillaren (1,5 mm OD, 1,17 mm ID, Borosilikat-Glas Kapillaren, Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge, UK) wurden mit einem Kapillarenpuller (DMZ-Universal Puller, Zeitz Instrumente) in zwei Stufen mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 1 µm ausgezogen, so dass der Widerstand der Kapillare 3 - 5 MΩ betrug. Die Enden der Kapillaren wurden zusätzlich feuerpoliert. Die präparierten Kapillaren wurden luftblasenfrei mit der isotonen

intrazellulärer Lösung befüllt und in die Halterung vor dem Vorverstärker eingesetzt. Die Halterung war mit einer Schlauchverbindung kombiniert, wo durch ein Unter- oder Überdruck in der Glaskapillare erzeugt werden konnte. Mit einem Mikromanipulator (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) wurde die Kapillare positioniert. Das *Offsetpotential* (auch als *Liquid Junction Potential* bezeichnet), das an den Übergängen von der Badlösung zu der Kapillarlösung als Messartefakt entsteht, kapazitive Ströme des Gigaseals und Serien Widerstände wurden mit dem Verstärker (Axopatch 200A, Molecular Devices) manuell bzw. mit der Software (*pClamp 8.2*, Molecular Devices) kompensiert (s. unten Tabelle 3).

Tab. 3: Verwendete *Liquid Junction* Potentiale bei unterschiedlichen Temperaturen. Berechnet mit dem Programm *pClamp 8.2*, Molecular Devices

Temperatur °C	LJP mV
35	8,6
25	8
15	7

Die elektrische Verbindung der Glaskapillare und dem Vorverstärker erfolgte über einen Silber/Silberchlorid-Draht. Ebenfalls bestand die in die Badlösung tauchende Referenzelektrode aus Silber/Silberchlorid. Der gemessene Strom wurde vom Vorverstärker gefiltert, zum Hauptverstärker, von dort aus zum A/D-Wandler (DigiData 1200B, Molecular Devices) übertragen. Anschließend konnte aus dem Spannungspuls und dem daraus resultierenden Strom der Eingangswiderstand der Glaskapillare mit Hilfe des Ohmschen-Gesetzes berechnet werden. Die Sealbildung und das Aufbrechen der Zellmembran wurden an der Software beobachtet. Nach Durchbrechen der Membran änderte sich der Strom, die kapazitiven Ströme nahmen zu und der Widerstand unter der

Glaskapillare verringerte sich. Anschließend wurde der Stromfluss aufgezeichnet und Softwareanalysen durchgeführt.

Mechanische und elektrische Störungen konnten durch einen Faradaykäfig um den Messstand herum ausgeschlossen werden. Die Datenaufzeichnung und Datenanalyse wurden mit der Software pClamp 8.2 (Molecular Devices) durchgeführt. Mit einem Umwelzkühler und Piezo-Elementen in der Badkammer konnten Temperaturen von 35°C bis 5°C gemessen und Versuche durchgeführt werden.

Die Spannungsrampen wurden von -80 mV bis +20 mV innerhalb einer Sekunde und alle 10 Sekunden ausgeführt. Die Leitfähigkeiten aus der Verschiebung des Umkehrpotentials (Schnittpunkt der Kurve mit der Spannungsachse), bei dem sich nach einem elektrochemischen Ionen-Gradienten ein Diffusions-*Steady-State* einstellt, wurden mit der Nernst-Gleichung wie folgt berechnet:

$$E = R T / Z F * \ln ([\text{Ion}]_a / [\text{Ion}]_i)$$

E = Umkehrpotential (V), **R** = Gaskonstante (8,3143 J/K*^{mol})

T = Temperatur (K), **Z** = Ladungswertigkeit des betreffenden Ions

F = Faraday-Konstante (96478 C*^{mol}/l)

[]_a / []_i = Ion-Konzentration extra- bzw. Intrazellulär in mol/l

2.10.3 Messung der Temperatur- und Osmolaritätsabhängigkeit von HICCs und Bestimmung der Aktivierungsenergien vor und nach Kryokonservierung

HepG2 Zellen wurden am Vortag mit 1×10^6 in 6-Lochplatten ausgesät und 24 h kultiviert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Zellen mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig vom Plastikboden gelöst und mit Hilfe einer Pipette im Zellkulturmedium resuspendiert und in einen 5 ml-Glasbehälter überführt. Kryokonservierte Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80% in einer T75-Kulturflasche kultiviert, einmal mit warmen PBS gewaschen, ein weiteres mal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit ebenfalls 5 ml eiskaltem Einfriermedium

(DMEM mit 10% DMSO) mit einem Zellschaber vom Plastikboden abgelöst. In Kryoröhrchen überführt, wurde die in 1 ml aliquotierte Suspension im Kryobehälter mit $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -50°C eingefroren und bis zu 14 Tage gelagert. Sollten kryokonservierte Zellen gemessen werden, wurden die Kryoröhrchen im 37°C Wasserbad aufgetaut, 2 ml frisches DMEM zugegeben und 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das DMSO befand, wurde verworfen, die Zellen in 2 ml frisches DMEM resuspendiert und in ein 5 ml-Glasbehälter überführt. Unter sehr leichtem Rühren wurden die Zellen weiterhin bei 37°C und 5% CO_2 10 - 20 min vereinzelt. Von der Zellsuspension wurden 300 - 500 μl entnommen und in die temperierte Badkammer pipettiert. Je nach Temperatur ($35, 25, 15^{\circ}\text{C}$) adhärten HepG2 nach 5 - 30 Minuten auf den Glasboden. Kryokonservierte Zellen adhärten erst nach 30 min auf dem Glasboden der Badkammer. Anschließend wurde nach Adhärenz der Zellen das Zellkulturmedium ausgewaschen, indem dreimal mit extrazellulärer Lösung gespült worden ist. Ist die Zelle im *Whole-Cell-Mode*, wird nach wenigen Aufnahmen in isotoner Lösung auf eine hypertone Lösung (360, 400, 450, 526 mosM) gewechselt und die Stromdichte aufgezeichnet. Nachdem eine stabile maximale Stromdichte verzeichnet wurde, wurde auf die Inaktivierung der Membrankanäle geprüft, indem die vorhergehende isotone Lösung die Zellen überströmte. Die Geschwindigkeit der überströmenden Lösung betrug 4 ml/min und wurde mittels eines offenen Perfusionssystems über die Gravitationskraft bewerkstelligt.

2.11 Erhöhung der intrazellulären Viskosität, Messung der HICC-Aktivierung und Bestimmung der Aktivierungsenergie

Mittels des VibroViskosimeters SV-10 (A&D Instruments, Tokyo, Japan) konnte die Viskosität einer 8%igen Dextran F 70-Lösung in PBS bei 35°C gemessen werden, die einer Osmolarität von 450 mosM entspricht. Der Wert lag bei 2,5 cP. Unter isotonen Bedingungen (300 mosM) und 35°C beträgt die zytoplasmatische Viskosität 1,8 cP. Die Viskosität des Zytoplasmas wurde laborintern mit der *Fluorescence correlation spectroscopy* (FCS) ermittelt. Mit dieser Technik war es möglich die Viskosität über Diffusionsgeschwindigkeiten fluoreszierender

Moleküle innerhalb eines kleinen Volumens im Zytoplasma zu bestimmen. Die Erhöhung der Viskosität um 0,7 cP entspricht einer Erhöhung der Osmolarität von ca. 150 mosM. Die intrazelluläre *Patch-Clamp*-Lösung wurde mit 8% Dextran F 70 angesetzt, auf 300 mosM und pH 7,3 eingestellt und die Zelle mit dieser Lösung per *Patch*-Kapillare beladen. Die *Whole-Cell Patch-Clamp* Messungen wurden bei 35 und 25°C durchgeführt. Bei einer Temperatur von 15°C konnte keine Erhöhung der Stromdichte detektiert werden, da vermutlich die intrazelluläre *Patch-Clamp*-Lösung nicht in das Zytoplasma diffundierte.

2.12 Molekularbiologische Methoden

Die Isolierung der gesamten RNA aus den kultivierten Zellen erfolgte nach dem Protokoll des *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche, Rotkreuz, Schweiz). Die RNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt, die RNA bei -80°C gelagert oder sofort für die reverse Transkription zu cDNA verwendet. Diese erfolgte nach dem Protokoll des *1st Strand cDNA Synthesis Kit* für RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerasenketten Reaktion) (Roche, Rotkreuz, Schweiz). Die cDNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und bei -20°C gelagert oder umgehend in einer PCR mit spezifischen *Primern* eingesetzt. Die Produkte der PCR wurden anschließend mit einem Probenpuffer zum Beschweren der Probe gemischt und in einem 1,5%igem Agarose-Gel bei 100 mV aufgetrennt. Zur optischen Analyse wurde die DNA mit *Red-Safe* gefärbt, welches in die DNA interkaliert.

3 Ergebnisse

Bezüglich der Bedeutung und Funktion der Mechanismen der Volumenregulation sowie der Zellhydratisierung während der reversiblen thermischen Arretierung von Zellen wurden verschiedene hypertone Bedingungen verwendet, um das lebende System aus dem osmotischen Gleichgewicht zu bringen und somit passive als auch aktive Zellvolumenregulationsprozesse zu charakterisieren. Hierzu wurden Aktivierungsenergien berechnet und vor sowie nach Kryokonservierung miteinander verglichen. Auf der Basis der erzielten Resultate konnte dann das Standard-Kryoprotokoll optimiert werden, um die thermische und reversible Arretierung der Zellen zu verbessern.

3.1 Das osmotisch aktive Zellvolumen und die Kälte induzierte adaptative Zellhydratationsreduktion

Mittels Coulter-Experimenten konnte das osmotisch aktive Zellvolumen, das frei diffundierbare Wasser definiert werden. Die Zelllinien HepG2 und HeLa wurden verwendet und miteinander verglichen. Außerdem wurde das osmotisch inaktive Volumen der HepG2 verwendet, um SAM-Daten zu kalibrieren und das osmotisch aktive Volumen bei nicht-physiologischen Temperaturen (30 bis 10°C) definieren zu können.

Über einen Bereich von hypotoner (220 mosM), isotoner (300 mosM = isotoner Referenzpunkt) bis hypertoner (526 mosM) Lösungen wurde das osmotisch aktive Volumen bei 35°C nach Bolye-van`t-Hoff definiert (Abb. 13). Der Schnittpunkt der linearen Regression mit der y-Achse markiert die Grenze zwischen osmotisch inaktivem und aktivem Volumen. In HepG2 Zellen betrug letzterer 69%, während dieser in HeLa Zellen mit 28% deutlich niedriger war (Abb. 13). Dem entsprechend ergaben für das osmotisch inaktive Volumen der HepG2 Zellen bzw. HeLa Zellen 31% bzw. 72%.

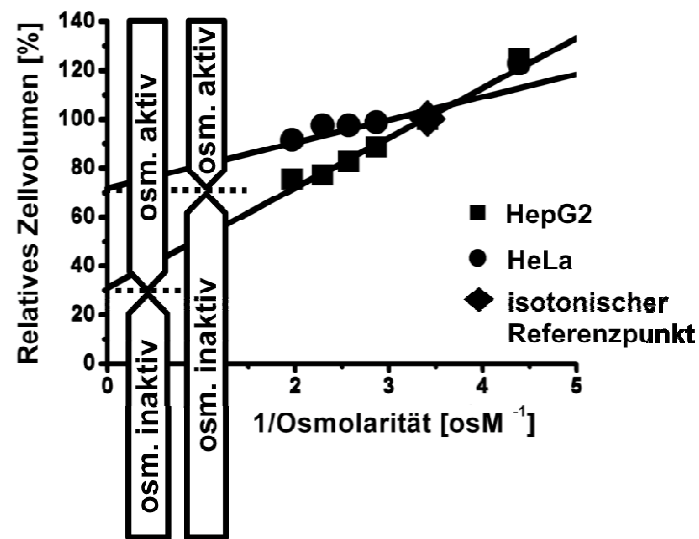


Abb. 13: Boyle-van't-Hoff-Plot zur Bestimmung des osmotisch aktiven und inaktiven Volumens der HepG2 und HeLa Zellen gemessen bei 35°C mittels Coulter-Messungen. Der Schnittpunkt der linearen Regression mit der y-Achse markiert die Grenze zwischen dem osmotisch aktiven und inaktiven Volumen. Während HepG2 ein osmotisch aktives Volumen von 69% aufweisen, haben HeLa Zellen ein deutlich kleineres osmotisch aktives Volumen von 28%.

Das osmotisch inaktive Volumen der HepG2 Zellen diente als Maßstab für das Zellschrumpfen aus den SAM-Daten. Anhand der Abb. 14 konnte die Temperaturabhängigkeit der Zellhydratation der HepG2 Zellen bestimmt werden. Es wurde deutlich, dass der osmotisch aktive Bereich von 69% (bei 35°C) auf 18% (bei 10°C) erheblich abnahm und damit die Zellhydratation mit der Abkühlung der Zellen reduziert wurde. In der Tabelle 4 sind alle quantifizierten Zellhydratationen zusammengefasst.

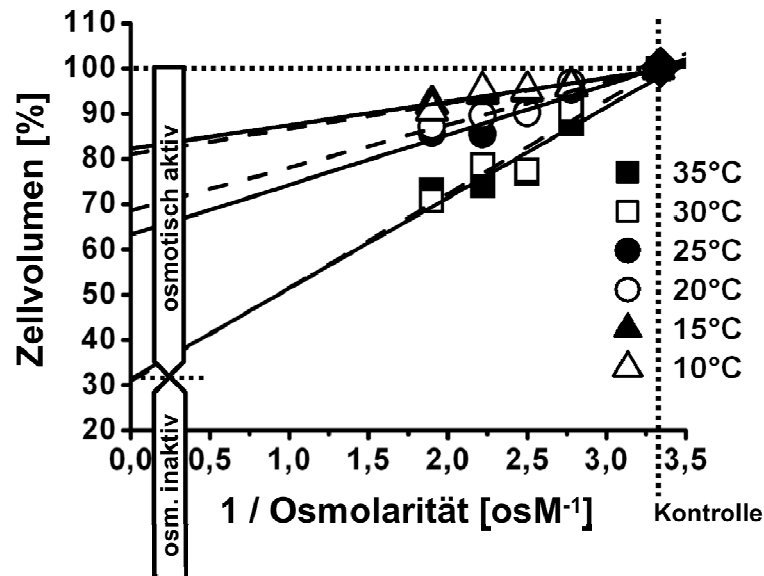


Abb. 14: Boyle-van't-Hoff-Plot zur Bestimmung des osmotisch inaktiven bzw. aktiven Zellvolumens bei physiologisch (35°C) und nicht-physiologischen Temperaturen (30 bis 10°C). Der zelluläre Wasseranteil nimmt mit sinkender Temperatur deutlich ab, wodurch sich das osmotisch aktive Volumen erheblich verkleinert, d.h. es kommt zu einer extremen Reduzierung der Zellhydratation.

Tab. 4: Quantifizierung der Zellhydratationen nach Kühlung (35 bis 10°C) der HepG2-Zellen.

Temperatur	osm. aktives Volumen (%)
flüssige Phase	
35°C	69
30°C	69
25°C	37
20°C	32
15°C	19
10°C	18

Mittels weiterer Coulter-Messungen (Abb. 15) konnten absolute Zellvolumina nach Abkühlung der HepG2-Zellen bei 5°C über 3 Stunden ermittelt werden. Dabei konnte bereits nach 30 Minuten Inkubation bei 5°C eine signifikante Abnahme in der absoluten Zellgröße im Vergleich zur Kontrolle (37°C)

beobachtet werden. Die Zellvitalität veränderte sich bis zu 2 Stunden nicht signifikant zur Kontrolle. Erst nach 3 Stunden Inkubation bei 5°C wiesen HepG2 Zellen eine signifikant schlechtere Zellvitalität auf ($93,1 \pm 2,0\%$ zu $74,8 \pm 8,0\%$, $n = 5-8$, * $p < 0,05$).

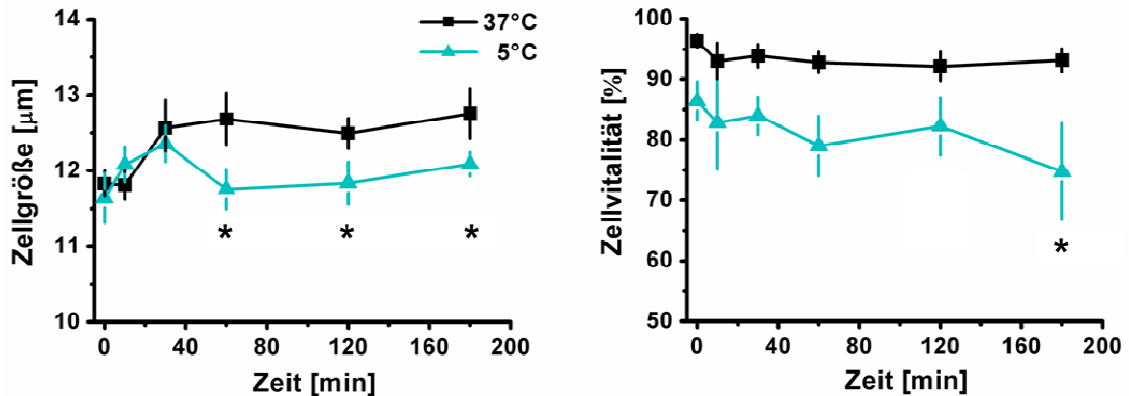


Abb. 15: Effekt des Kühlens der Zellen auf das absolute Zellvolumen (Zellhydratation) in HepG2 Zellen. Auch die Messung des absoluten Zellvolumens über 3 Stunden zeigt eine signifikante Volumenreduktion bei 5°C im Vergleich zur Kontrolle (37°C). HepG2 Zellen hielten über einen längeren Zeitraum ihre Vitalität aufrecht, wobei erst nach 3 Stunden die Zellvitalität abnahm ($n = 5-8$, * $p < 0,05$, Mittelwert \pm SEM).

3.2 Messung der Zellvolumenveränderungen und des Na^+ -Transports an HepG2 Zellen bei Hypertonizität

3.2.1 Messung des Zellschrumpfens, Zellschwellens und des RVI unter hypertoner Bedingung mittels SAM

HepG2 Zellen wurden zunächst mit einer auf 35°C temperierten isotonen (300 mosM) Lösung überströmt. Unter diesen Bedingungen konnte das Zellvolumen als akustische Impedanz (Z_a) gemessen werden. Nach dieser Vorperiode wurde die Osmolarität für 20 Minuten auf 450 mosM erhöht, um das osmotische Gleichgewicht zu stören. Die Zellen reagierten als typische Antwort zunächst mit einem 1 bis 2 minütigen passiven Zellschrumpfen und anschließend mit einer aktiven Volumenzunahme, dem RVI ($65,5 \pm 9,0\%$, bezogen auf das initiale Zellschrumpfen, $n = 12$). Hierbei wurden durch HICC vermittelte

Transportprozesse aktiv Osmolyte (Na^+) aufgenommen (Wehner, 2000). In der Nachperiode (isotone Lösung) war ein Zellschwellen mit einem geringen Unterschuss an initialer Zellgröße zu beobachten, das sich anschließend auf die ursprüngliche Zellgröße einstellte. Es konnte beobachtet werden, dass das Zellschwellen deutlich langsamer vollzog als das Zellschrumpfen. Eine Lösung, in der $150 \mu\text{M}$ Amilorid zugesetzt war, welches ein αENaC -Blocker ist, hemmte den RVI signifikant ($7,8 \pm 1,7\%$, $p < 0,001$). Der Wechsel der Lösung von Hypertonie zur Isotonie führte zu einem Zellschwellen, mit dem direkt das ursprüngliche Zellvolumen erreicht wurde (Abb. 16).

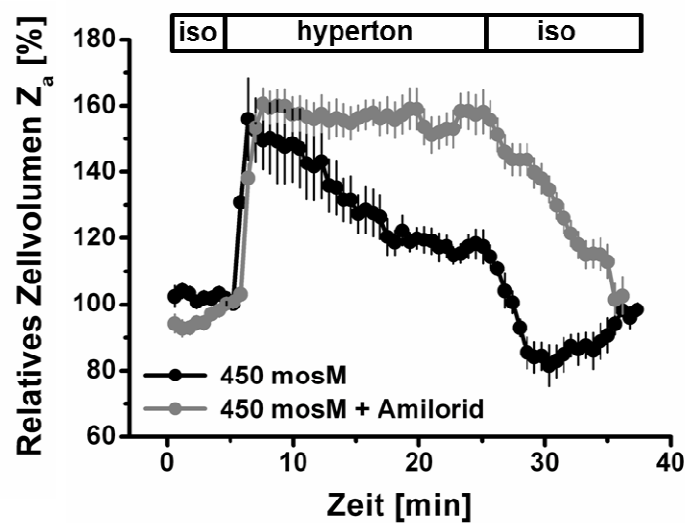


Abb. 16: *Scanning Acoustic Microscopy*-Messung. Nach der isotonen Kontroll-Messung (300 mosM), folgte ein extrazellulärer hypertoner Stress (450 mosM). Als Antwort reagieren HepG2 Zellen mit einem passiven Zellschrumpfen, worauf anschließend ein aktiver nach innen-gerichtetem Kationentransport aktiviert wurde. Dieser aktive Prozess wird als, *Regulatory Volume Increase* (RVI) bezeichnet und von den HICCs vermittelt ($65,5 \pm 9,0\%$, bezogen auf das initiale Zellschrumpfen). Die Rückkehr zur isotonen Lösung führte zum passiven Zellschwellen ($n = 12$). Eine $150 \mu\text{M}$ Amilorid Lösung hemmte den RVI nahezu vollständig ($n = 10$, $7,8 \pm 1,7\%$, $p < 0,001$, Mittelwert \pm SEM).

Die Messung des Zellschrumpfens, RVI sowie die des Zellschwellens wurden wie in Abb. 16 geschildert für milde (360 und 400 mosM) und hohe (450 und 526 mosM) Osmolaritäten ausgetestet. Jede dieser Messungen wurde in 5°C -Stufung von 35 bis 10°C durchgeführt. Die Raten des Wassertransports (Zellschrumpfen $\Delta Z_{a\text{Schr}}$ und Zellschwellen $\Delta Z_{a\text{Schw}}$) bzw. des RVI ($t\Delta Z_{a\text{RVI}}$)

wurden mit der linearen Regression bzw. nach einem monoexponentiellem Abfall kalkuliert. Anhand der Aktivitätsprofile lässt sich erkennen, dass mit zunehmender Hypertonizität die Transportraten aller Volumenregulationsprozesse zunehmen und mit sinkender Temperatur verlangsamen. Bezüglich der Zeitkonstante τ sollte beachtet werden, dass die Transportrate umso höher ausfällt, je kleiner der Wert ist (Abb. 17; $n = 3-12$).

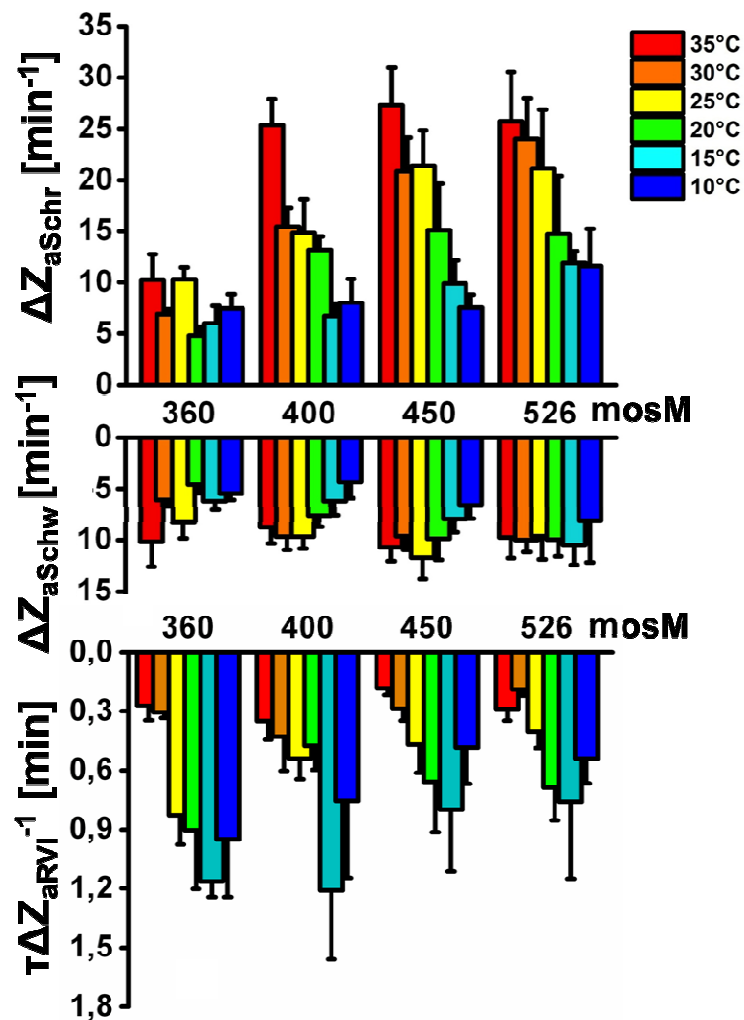


Abb. 17: Die Wassertransportraten (Zellschrumpfen ΔZ_{aSchw} und Zellschwellen ΔZ_{aSchr}) sowie die Zeitkonstante τ des RVI ($\tau \Delta Z_{aRVI}$) aus den SAM-Messungen gemessen bei verschiedenen Temperaturen und Osmolaritäten. Alle Transportraten zeigen temperatur- und osmolaritätsabhängige Aktivitätsprofile ($n = 3-12$, Mittelwert \pm SEM).

3.2.2 Messung des Na⁺-Transports nach hypertoner Bedingung mittels *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen

Zur elektrophysiologischen Untersuchung des Kanal-vermittelten Na⁺-Transports wurden *Whole-Cell Patch-Clamp* Experimente herangezogen. Die erhöhten Na⁺-Stromdichten nach hypertonem Schock sowie die Verschiebung des Umkehrpotentials in den positiven Bereich spiegeln die Aktivierung der HICCs wieder (Abb. 18, links). Da ein Membranstrom als $I = dQ/dt$ definiert wird, kann die Transportaktivität der HICCs als Transportrate betrachtet werden. Messungen bei Temperaturen von 35 bis 15°C unter verschieden hohen Hypertonizitäten (360-526 mosM) wurden durchgeführt. Verglichen mit der Zeitkonstante τ des RVI aus den SAM-Messungen wies die HICC-Stromdichte erstaunlich ähnliche Osmolaritäts- und Temperaturabhängigkeitsprofile auf (Abb. 18, rechts, n = 3-4).

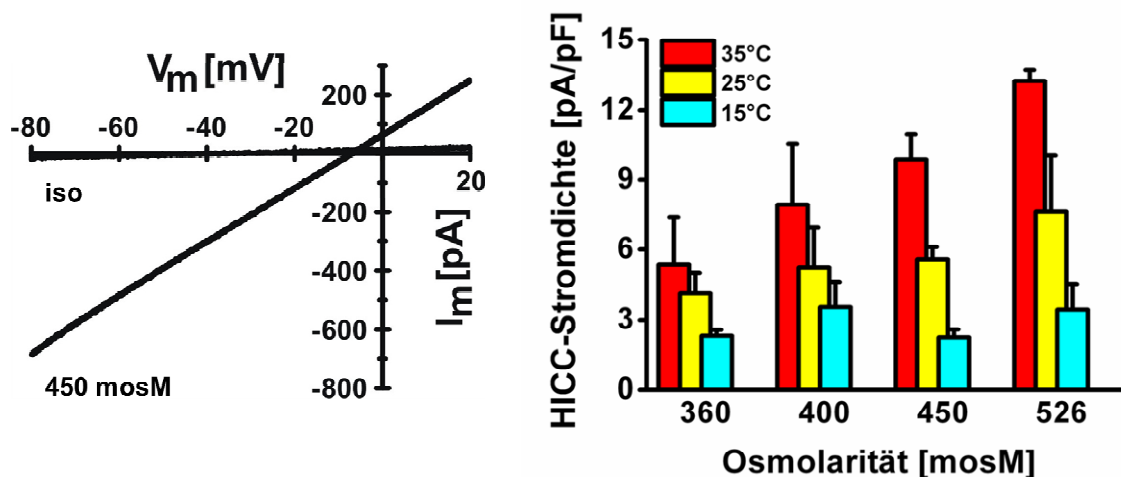


Abb. 18: Repräsentative *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitung, bei der sich die Na⁺-Stromdichte nach hypertonem Schock (450 mosM, 35°C) erhöht und das Umkehrpotential verschiebt. Diese deuten auf die Aktivierung von HICCs (links). Die Na⁺-Stromdichte wies eine deutliche Osmolaritäts- und Temperaturabhängigkeit auf (rechts) (n = 3-4, Mittelwert \pm SEM).

3.2.3 RVI und Wassertransport nach Kühlung und Kryokonservierung – Verlangsamter Wassertransport und Aktivierung des RVI

Wie bereits beschrieben führte ein Absenken der Temperatur zur Dehydratation der HepG2 Zellen und zwar bereits ab 25°C. Die Antwort des RVI nach

Vorinkubationen ober- und unterhalb des Gefrierpunktes wurde bisher nicht untersucht. Daher wurden HepG2 Zellen zunächst bei kalten Temperaturen über dem Gefrierpunkt (4°C und -10°C) sowie beim Einfrieren (-20°C und -50°C) in Anwesenheit von 10% DMSO für 1 Stunde auf der Kryostage (Linkam-Stage) inkubiert. Anschließend wurden HepG2 Zellen auf 37°C gebracht und die akustische Impedanz bei isotoner und hypertoner Bedingung (400 mosM) gemessen. Im Vergleich zur Kontroll-Messung, konnte nach tiefen Temperaturen ein signifikant schnellerer RVI beobachtet werden. Das absolute Zellschrumpfen war jedoch nahezu unbeeinträchtigt. Allerdings war die Geschwindigkeit des Zellschrumpfens signifikant verzögert (n = 3-12, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Abb. 19).

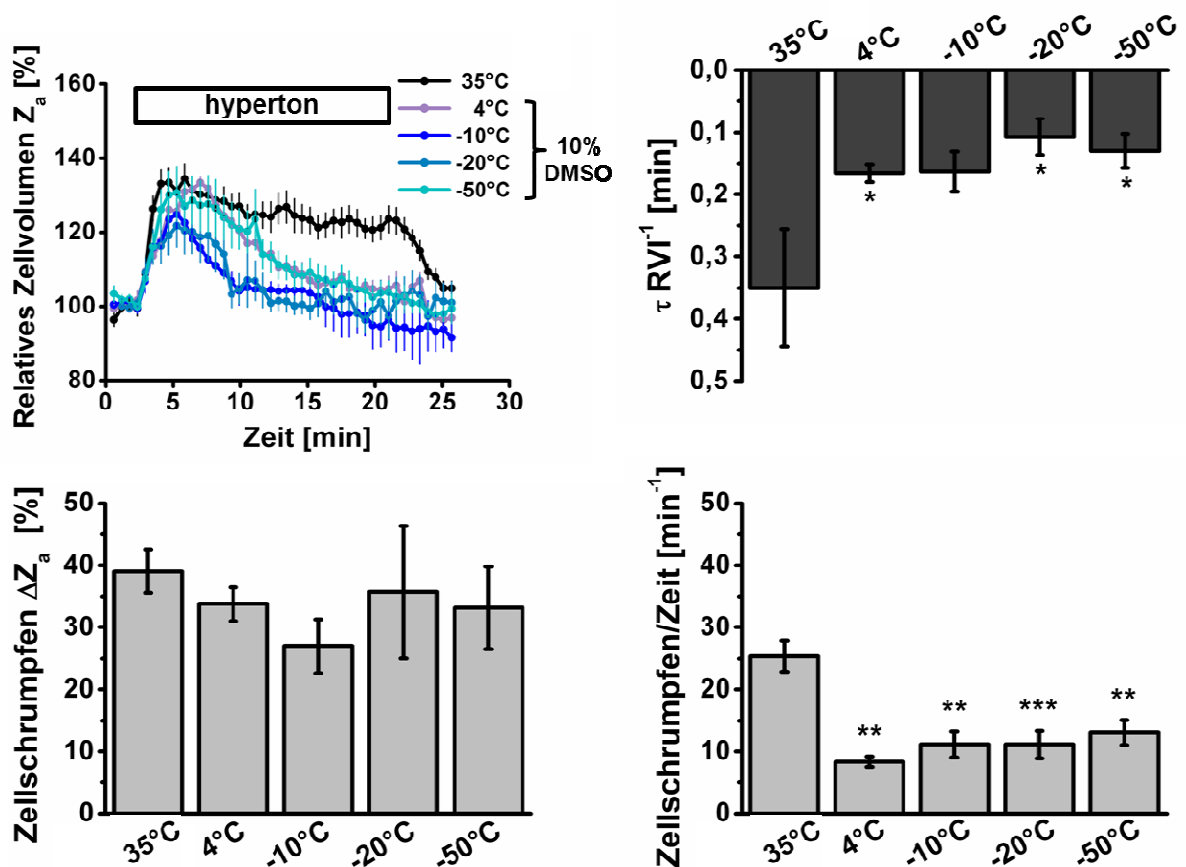


Abb. 19: Quantifizierung des RVI und Wassertransports nach 1-stündiger Lagerung bei 35°C (Kontrolle), Kälte (4°C sowie -10°C) und Kryokonservierung (Eisbildung bei -20°C und -50°C). Die Raten des RVI (oben rechts), Zellschrumpfens (unten links) zeigen deutliche Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten HepG2 Zellen, nicht aber das absolute Zellschrumpfen (unten links) (n = 3-12, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Mittelwert \pm SEM).

Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass eine Kühlung der HepG2 Zellen mit einer Dehydratation einherging (Abb. 14 und 15). Außerdem war bereits bei 4°C eine reduzierte Aquaporin-Aktivität zu beobachten (Abb. 19). Weiterhin konnte eine schnellere RVI-Transportrate festgestellt werden, die sowohl nach Temperaturen ober- als auch unterhalb des Gefrierpunktes auftrat. Somit konnte der RVI als ein potentieller Schlüsselmechanismus in der Volumenregulation nach tiefen Temperaturen identifiziert werden.

3.3 Bestimmung der Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor und nach Kryokonservierung

3.3.1 Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor Kryokonservierung

Aktivierungsenergien beschreiben die Temperaturabhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von Kanälen und Transportern. Unter Modifizierung der Versuchstemperatur im Bereich von 35 bis 10°C und Erstellen von Arrhenius-Graphen, konnten die Aktivierungsenergien zu verschiedenen Hypertonizitäten (360 bis 526 mosM) definiert werden. Exemplarisch wurden die Arrhenius-Graphen für die Osmolarität 400 mosM aus denen die Aktivierungsenergien ermittelt und in Abb. 20 dargestellt. Das Zellschrumpfen pro Zeit wies eine Aktivierungsenergie von $38,6 \pm 6,4$ kJ/mol auf, während das Zellschwellen pro Zeit mit $14,0 \pm 7,7$ kJ/mol signifikant niedriger war. Die Aktivierungsenergie der RVI-Rate lag bei $20,7 \pm 10,7$ kJ/mol (Mittelwert \pm SD). Weitere Arrhenius-Graphen befinden sich im Anhang (Abb. 33).

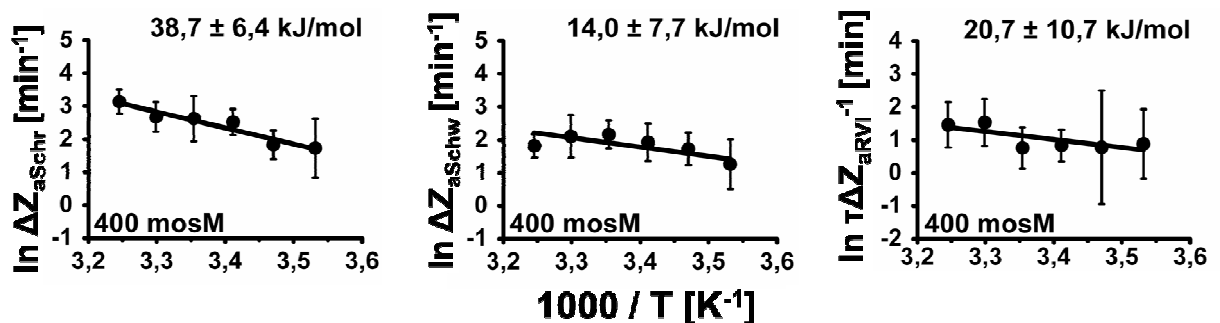


Abb. 20: Repräsentative Arrhenius-Graphen der zellulären Raten für Zellschrumpfen, Zellschwellen und RVI gemessen bei 400 mosM.

Aus der linearen Regression lässt sich die Aktivierungsenergie in kJ/mol definieren. Das Zellschrumpfen pro Zeit wies eine hohe Aktivierungsenergie auf, während das Zellschwellen pro Zeit signifikant niedriger war. Die Aktivierungsenergie der RVI-Rate lag bei $20,7 \pm 10,7$ kJ/mol ($n = 34-57$, $** p < 0,01$, Mittelwert \pm SD).

Eine Zusammenfassung aller Aktivierungsenergien ist in Abb. 21 dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass das Zellschrumpfen und Zellschwellen bei allen gemessenen Osmolaritäten gleich bleibende Aktivierungsenergien aufwiesen und somit keine Funktion der Osmolarität waren. Interessanterweise wies das Zellschwellen, das 20 Minuten nach hypertonem Stress gemessen wurde, deutlich niedrigere Aktivierungsenergien auf als das Zellschrumpfen. Der RVI hingegen wies bei einer Osmolarität bis 400 mosM eine niedrige ($20,7 \pm 10,7$ kJ/mol) und ab 450 mosM signifikant höhere Aktivierungsenergien ($39,8 \pm 13,4$ kJ/mol) auf ($n = 34-57$, $p < 0,01$, Mittelwert \pm SD). Daraus lässt sich schließen, dass nach lang anhaltendem hypertonem Stress unabhängig von der Stärke der Osmolarität die Aquaporin-Aktivität, wahrscheinlich durch Proteintranslokation an die Zellmembran, erhöht ist. Der RVI hingegen wird erst ab höheren Osmolaritäten (450 mosM) deutlich stimuliert, womit die Bedeutung des RVI besonders unter starken hypertonen Bedingungen hervorgehoben wird.

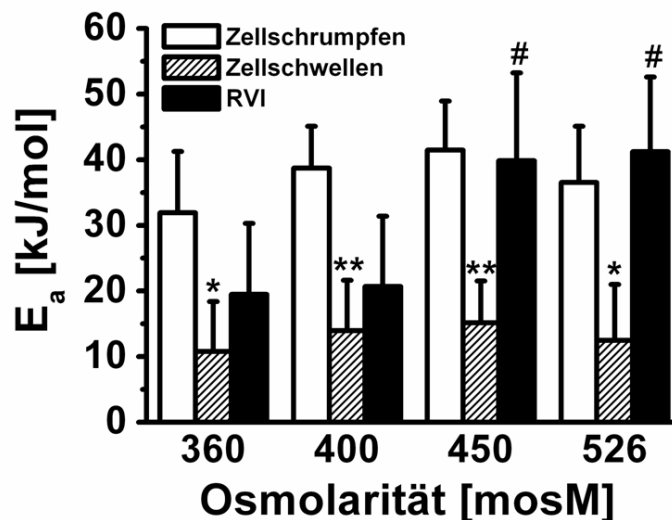


Abb. 21: Zusammenfassung der Aktivierungsenergien der zellulären Raten für Zellschrumpfen, Zellschwellen und RVI gemessen bei milden (360 und 400 mosM) und starken (450 und 526 mosM) Osmolaritäten. Zu beachten ist der markante Unterschied zwischen dem Zellschrumpfen und dem Zellschwellen nach hypertonem Schock. Das Aktivitätsprofil des RVI ist zwischen 400 und 450 mosM deutlich erhöht ($n = 34-57$, $* p < 0,05$, $** p < 0,01$, angegeben ist der Mittelwert \pm SD).

Zusätzlich unterstützen elektrophysiologische Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der HICCs (s. Arrhenius Graphen im Anhang Abb. 34) die Osmolaritätsabhängigkeit des RVI ($n = 34-42$), die im SAM gemessen wurden. Auch die Messungen in *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen zeigten die deutliche Aktivierung der HICC-Aktivität ab 450 mosM (Abb.22). Mit unterschiedlichen Methoden konnte nachgewiesen werden, dass der RVI, der von den HICCs vermittelt wird, durch hohe Osmolaritäten aktiviert wurde. Diese Messungen machen außerdem die Bedeutung der HICCs für den RVI klar.

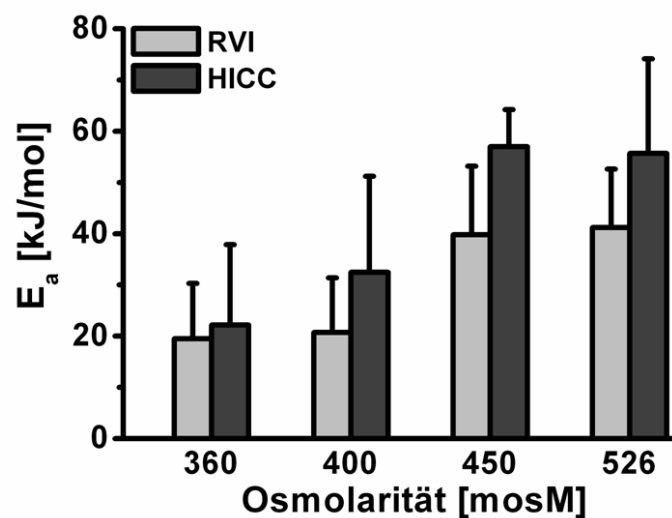


Abb. 22: Bestimmung und Vergleich der Aktivierungsenergien des RVI und des HICC (gemessen mit SAM bzw. *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen). Somit konnte mit unterschiedlichen Methoden ein sehr ähnliches Aktivitätsprofil vom RVI und HICC nachgewiesen werden ($n = 11-42$, Mittelwert \pm SD).

3.3.2 Aktivierungsenergien der Wildtyp und Aquaporin 1 überexprimierenden HepG2 Zellen

Um die Aktivierungsenergien des Wassertransports bestimmen zu können, wurde über die Modulierung der Temperatur von 35 bis 10°C und die hypertone Bedingung 400 mosM Arrhenius-Graphen erstellt. Die Aktivierungsenergien der Wildtyp HepG2 Zellen wurden mit AQP1 überexprimierenden HepG2 Zellen verglichen (Abb. 23). AQP1 überexprimierende HepG2 Zellen wiesen für das Zellschrumpfen pro Zeit ($\Delta Z_{aSchr} (\text{min}^{-1})$) eine hohe Aktivierungsenergie von $46,0 \pm 6,8$ kJ/mol auf, die der des Wildtyps ($38,7 \pm 6,4$ kJ/mol) sehr ähnlich war. Nach

hypertonem Stresses verringerte sich die Aktivierungsenergie für das Zellschwellen pro Zeit (ΔZ_{aSchw} (min^{-1})) merklich. Weitere Messungen zeigten, dass nach einem hypertonen Stress die Aktivierungsenergie der Wildtyp HepG2 Zellen ($14,0 \pm 7,7$ kJ/mol) signifikant verringerte. Überexprimierten HepG2 Zellen AQP1, sank die Aktivierungsenergie signifikant weiter auf $4,6 \pm 10,8$ kJ/mol ($n = 41-54$, *** $p < 0,001$, Mittelwert \pm SD). Somit wurde nach einem hypertonen Stress und Überexpression des AQP1 in HepG2 Zellen die Aquaporin-Aktivität während des Zellschwellens durch Erhöhung der AQP-Anzahl in der Zellmembran zusätzlich gesteigert.

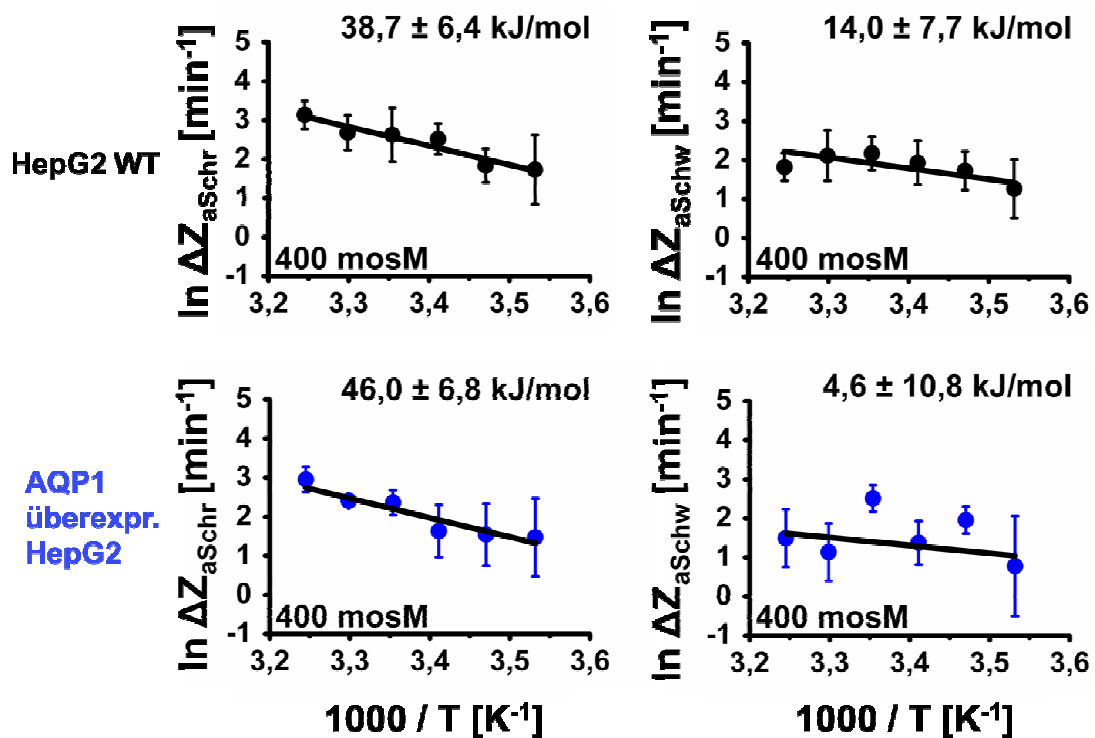


Abb. 23: Arrhenius-Graphen und Aktivierungsenergien der Raten des Zellschrumpfens (ΔZ_{aSchr} (min^{-1})) und des Zellschwellens (ΔZ_{aSchw} (min^{-1})) gemessen bei 400 mosM. Wildtyp HepG2 Zellen wurden dabei mit den AQP1 überexprimierenden HepG2 Zellen verglichen. Auffällig war, dass die Aktivierungsenergie des Zellschwellens sich deutlich nach einem hypertonen Stress verringerte. Die Aktivierungsenergie des Zellschwellens sank weiterhin, nachdem HepG2 Zellen AQP1 überexprimierten ($n = 41-54$, *** $p < 0,001$, Mittelwert \pm SD).

3.3.3 Aktivierungsenergien der Zellvolumenregulation nach Kryokonservierung – Kryokonservierung stimuliert den RVI

Die Erstellung der Arrhenius-Graphen, um Aktivierungsenergien bestimmen zu können, wurde auch zur Untersuchung der Zellhydratation und der Reversibilität der Arretierung nach Kryotemperaturen verwendet. Dazu wurden HepG2 Zellen nach dem Standard-Kryoprotokoll mit der Kryostage bei -50°C kryopräserviert und anschließend akustische Daten in den Temperaturbereichen 35°C bis 10°C für die Bestimmung von Aktivierungsenergien aufgenommen (Abb. 24). Dabei wurde das osmotische Gleichgewicht mit 400 mosM gestört. Der passive Mechanismus der Aquaporine, der für das Zellschrumpfen und Zellschwellen verantwortlich ist, zeigte nach der Kryokonservierung nur geringe Änderungen in der Aktivierungsenergie ohne Signifikanz. Während die Aktivierungsenergien des Zellschrumpfens und des Zellschwellens unveränderlich blieben, zeigte die Aktivierungsenergie des RVI eine deutliche Verringerung nach Kryokonservierung (von $20,7 \pm 10,7$ auf $1,9 \pm 13,6$, $n = 22-54$, $*** p < 0,001$, Mittelwert \pm SD). Dies zeigt, dass sich der RVI nach Kryokonservierung deutlich aktivieren lässt und die Aquaporine dagegen nicht den limitierenden Faktor darstellen. Die Aktivierung des RVI nach der Kryoarretierung der HepG2 Zellen ist somit als „*limiting-step*“ der entscheidende Mechanismus für die Reversibilität nach der thermischen Arretierung.

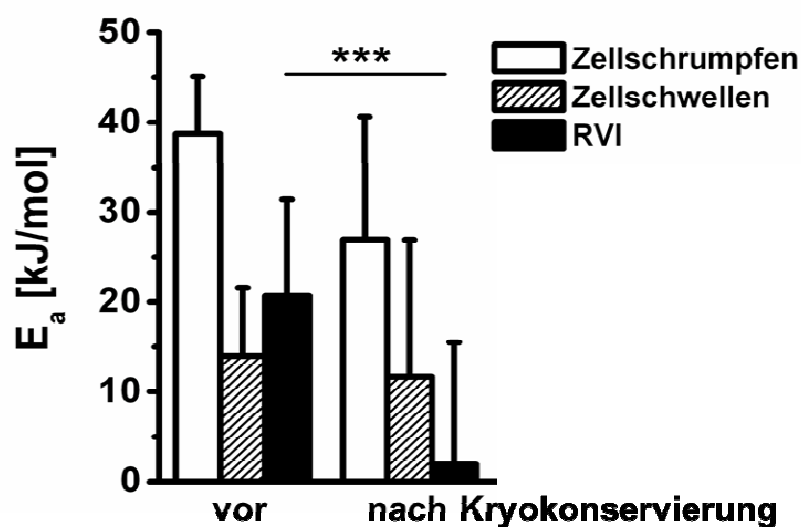


Abb. 24: Bestimmung der Aktivierungsenergien der Transportraten des Zellschrumpfens, des Zellschwellens und des RVI gemessen bei 400 mosM vor und nach Kryokonservierung. Deutlich wurde die

extreme Verringerung der Aktivierungsenergie und damit die Aktivierung des RVI nach Kryokonservierung. Die Aquaporin-Aktivität während des Zellschrumpfens und des Zellschwellens zeigte keine relevante Änderung nach Kryokonservierung ($n = 22-54$, $*** p < 0,001$, Mittelwert \pm SD).

3.4 Die erhöhte Zellviskosität beeinflusst die HICC-Aktivierung

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte bei Kühlung und Kryoarretierung der HepG2 Zellen eine Erhöhung der zytoplasmatischen Viskosität mit der *Fluorescence correlation spectroscopy* (FCS) demonstriert werden. Dies ließ sich durch die Dehydratation der Zellen während der Kühlung und mit weiterer Dehydratation durch Bildung von Eiskristallen im extrazellulären Umfeld der Zelle erklären. Offen blieb allerdings, wodurch die HICCs, die nach Kryoarretierung aktiviert waren, sich stimulieren lassen. Zur Klärung dieser Frage wurden *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen durchgeführt, indem die Viskosität der isotonen Pipettenlösung mit Dextran von 1,8 cP (300 mosM) auf 2,5 cP (450 mosM) (s. Absatz 2.10) erhöht wurde. In diesem Konfigurationsmodus diffundierte die viskosere Pipettenlösung in die gepatchte Zelle. Nach Verteilung der viskoserer Lösung im Zytoplasma zeigte sich tatsächlich die Aktivierung von Strömen, die sich in keiner Weise von HICCs unterschieden. Die Messungen wurden bei 35 und 25°C durchgeführt, um die Aktivierungsenergie bestimmen zu können (Abb. 25). Bei der Temperatur von 15°C konnte keine Aktivierung der HICCs detektiert werden. Die Arrhenius Graphen dieser Versuche befinden sich im Anhang (Abb. 35).

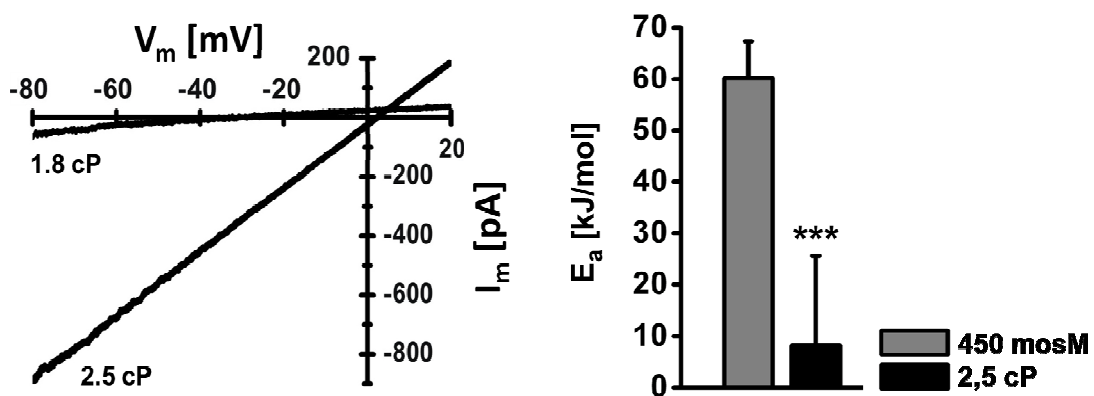


Abb. 25: Darstellung einer repräsentativen *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitung gemessen bei 35°C, bei der sich (isoton) mit Erhöhung der Viskosität (von 1,8 auf 2,5 cP) die HICC-Stromdichte erhöhte (links).

Der Vergleich von den Aktivierungsenergien der HICCs gemessen durch Erhöhung der extrazellulären Osmolarität (450 mosM) und Erhöhung der intrazellulären Viskosität auf 2,5 cP (rechts). Aus den Messungen geht hervor, dass sich mit der intrazellulären Erhöhung der Viskosität die HICCs sich deutlich aktivieren ließen, als durch eine hohe Hypertonizität ($n = 13$, $*** p < 0,001$, Mittelwert \pm SD).

Aus dem obigen dargestellten Versuch konnte durch die erhöhte Viskosität eine signifikant gesenkte Aktivierungsenergie der HICCs ($8,2 \pm 17,4$ kJ/mol) bestimmt werden, womit die verstärkte HICC-Stimulierung widerspiegelt wurde. Die gesenkte Aktivierungsenergie der HICCs schien in Verbindung mit dem Umgehen der Perzeptionsmaschinerie der HICCs und die direkte Aktivierung über die erhöhte Viskosität im Zytoplasma zu stehen. Die Aktivierungsenergie der HICCs durch Erhöhung der extrazellulären Osmolarität betrug dagegen $57,0 \pm 7,2$ kJ/mol ($n = 13$, $*** p < 0,001$, Mittelwert \pm SD). Dies erklärt, dass die Viskositätserhöhung wie sie während des Kühlens der Zelle und der Kryoarretierung auftrat, tatsächlich ein potentieller Auslöser der HICC-Aktivierung sein kann.

3.5 Weitere potentielle HICC-Komponenten in HepG2 Zellen

Als Haupt-HICC-Komponente in HepG2 Zellen wurde bisher α ENaC identifiziert. Jedoch wurde vermutet, dass auch weitere HICC-Komponenten an der Volumenregulation beteiligt sind. Um diese identifizieren zu können, wurden laborintern HepG2 Zellen mit unterschiedlichen siRNAs transfiziert und SAM-Messungen durchgeführt (Plettenberg, 2013). Einige siRNAs, die einen deutlich hemmenden Effekt auf den RVI ausübten, wurden dann in HepG2 Zellen transfiziert und *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen durchgeführt. Die HICC-Aktivierungen wurden unter hypertonem Stress (450 mosM) und 35°C untersucht. Darüber hinaus war es möglich, dass Ionentransporter mit dem Haupt-HICC-Komponenten α ENaC auf molekularer Ebene miteinander interagieren. Ein *double silencing* von Ionenkanälen innerhalb der HepG2 Zelle könnte über die funktionelle Interaktion von Kanaluntereinheiten Aufschluss geben. Die Annäherung dieser Fragestellung ist in Abb. 26 wiedergegeben. Die ausgetesteten siRNAs waren gegen folgende Kanäle gerichtet: α ENaC, TRPM2, TRPM5 und gegen den mechanosensitiven Kanal Piezo1 (genauere Angaben zu

den siRNA s. Tabelle 5). Jeder dieser Kanäle wurde zusammen mit α ENaC (1:1) im *double silencing* zur Überprüfung der additiven Funktion verwendet. Die Messungen mit siRNA transfizierten HepG2 Zellen konnten anhand von der fluoreszierenden siRNA selektiert werden. Die Identifizierung weiterer HICC-Komponenten könnte für zukünftige Kryoanwendungen Zielproteine bereit stellen.

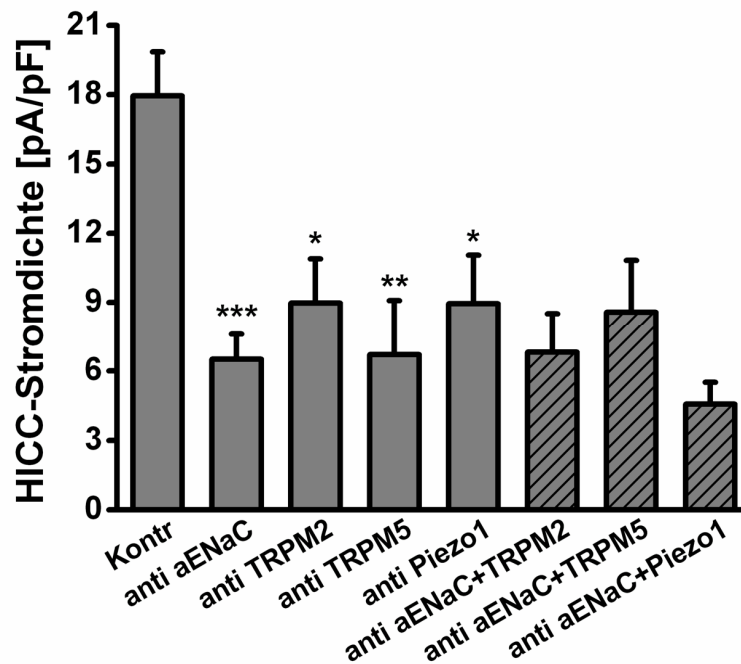


Abb. 26: HICC-Stromdichten nach Transfektion von Fluoreszenzmarkierter siRNA gegen verschiedene Ionenkanäle. Ebenfalls wurden Kombinationen aus siRNAs ausgetestet um die Additivität des Kationentransports zu untersuchen. Dabei wurde siRNA gegen α ENaC 1:1 mit siRNA gegen TRPM2, TRPM5 oder Piezo1 transfiziert. Jede der verwendeten siRNA führte zur signifikanten Reduktion der HICC-Aktivität. Das *double silencing* zeigte zusätzlichen die funktionelle Additivität der HICC-Aktivität (Messungen wurden bei 35°C und 450 mosM durchgeführt (n = 3-5, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Mittelwert \pm SEM).

Wie aus Abb. 26 hervorgeht, war die HICC-Stromdichte nach hypertonem Stress in α ENaC-, TRPM2-, TRPM5- und Piezo1-gehemmten Zellen signifikant niedrig. Diese Ionenkanäle waren somit an dem Kationentransport der Volumenregulation nach hypertonem Stress beteiligt. Eine Additivität des Kationentransports durch das *double silencing* konnte allerdings elektrophysiologisch nicht gezeigt werden.

Somit ist die Beteiligung der Ionenkanäle α ENaC, TRPM2, TRPM5 und Piezo1 an der Volumenregulation in HepG2 Zellen nachgewiesen. Diese konnten nicht mehr in Kryonanwendungen untersucht werden und sind daher die potentiellen Zielproteine in zukünftigen Kryoversuchen. Darüber hinaus zeigt die Nicht-Additivität, dass wahrscheinlich diese Komponenten tatsächlich an einem Kanal-Komplex beteiligt sind.

3.6 Stimulierung des RVI mit dem Peptid-Hormon Vasopressin - Etablierung des Standard-Kryoprotokolls

Da sich aus den vorherigen Versuchen dieses Projektes schlussfolgern ließ, dass der RVI bei erfolgter Kryopräservierung aktiviert wurde und dass dieser Prozess ein entscheidender Faktor zur Volumentrückgewinnung nach Kryokonservierung darstellt, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, um die Relevanz des RVI bei der Kryokonservierung zu untermauern. Dazu wurde das Peptid-Hormon Vasopressin, das α ENaC als Hauptkomponente des RVI in HepG2 Zellen aktiviert, auf dessen Auswirkung in zellvolumenregulatorischen Mechanismen getestet. Anschließend wurde mit dem Vasopressin, als Aktivator des α ENaC, Zellvitalitätstests sowie Proliferationsanalysen durchgeführt.

3.6.1 Stimulierung des RVI mit Vasopressin

Die bereits beschriebene Aktivierung des α ENaC durch Vasopressin (Rotin, 2011) und die potentielle Aktivierung des RVI in HepG2 Zellen, wurde hier zunächst in SAM-Messungen verifiziert. Eine 1-stündige Inkubation mit Vasopressin (100 nM) bei physiologischen Bedingungen wurde durchgeführt, bevor HepG2 Zellen osmotisch gestresst (400 mosM) wurden. Danach wurde die Transportrate des Zellschrumpfens, des Zellschwellens und des RVI quantifiziert worden (Abb. 27). Die Versuchsdurchführung wurde in DMEM vollzogen, da eventuell geringe Mengen Vasopressin im Serum des Zellkulturmediums enthalten sein und somit zusätzliche Effekte mit sich bringen könnte.

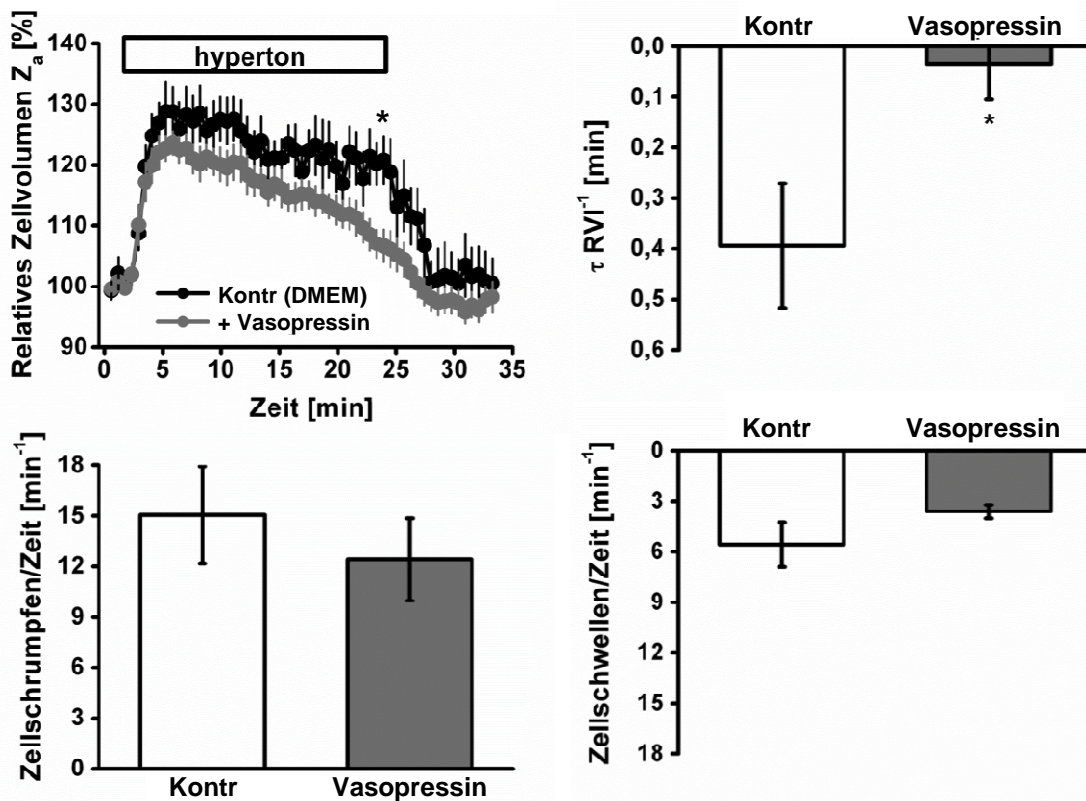


Abb. 27: Effekt des Vasopressins auf die Transportrate des RVI nach hypertonem Stress (400 mosM) im Vergleich zu unbehandelten HepG2 Zellen (Kontr). Das Vasopressin wirkte sich auf den aktiven Volumenregulationsprozess RVI aus, während die Transportraten des Zellschrumpfens und Zellschwellens unbeeinträchtigt blieben ($n = 6-10$, * $p < 0,05$, Mittelwert \pm SEM).

Wie Abbildung 27 zeigt, wurde durch die Behandlung der HepG2 Zellen mit Vasopressin der RVI signifikant größer (von $43,9 \pm 5,5\%$ auf $64,7 \pm 7,2\%$). Darüber hinaus war auch die Transportrate des RVI signifikant schneller als die Kontrolle. Die Transportraten des Zellschrumpfens und Zellschwellens waren unbeeinträchtigt von der Vasopressin-Behandlung. Damit konnte der stimulierende Effekt des Vasopressins auf den RVI bestätigt werden. Deshalb wurde im Folgenden Vasopressin mit dem Standard-Kryoprotokoll kombiniert.

3.6.2 Das Peptid-Hormon Vasopressin als biologisch aktives Kryoprotektivum

Da bereits innerhalb dieser Arbeit das adaptive Verhalten der HepG2 Zelllinie nach Kryopräservierung, nämlich eine erhöhte RVI-Aktivität, nachgewiesen

wurde, konnte als nächster Schritt das Peptid-Hormon Vasopressin in das Standard-Kryoprotokoll implementiert werden. Somit diene Vasopressin als erstes biologisch aktives Kryoprotektivum, welches dynamisch in die zellulären Signalkaskaden eingreift und die Reversibilität der Kryoarretierung unterstützt.

3.6.3 Vasopressin erhöht die Zellvitalität nach Kryokonservierung

Das Standard-Kryoprotokoll, welches ein langsames Einfrieren der Zellen mit 10% DMSO-Gehalt fordert, wurde an Deckgläsern adhärenen HepG2 Zellen angewendet und zunächst bis -50°C eingefroren. Auf Deckgläsern adhären gewachsene Zellen erwiesen sich als besonders sensibel sowie kritisch einzufrieren und zeigten aufgrund dessen nach Kryokonservierung eine geringe Zellvitalität. Daher konnte mit der vergleichsweise schlechten Zellvitalität der adhärenen Zellen die Kryokonservierung und der Effekt von Zellvitalitätssteigernden Komponenten besser untersucht werden. Außerdem bietet das Einfrieren von adhärenen Zellen auf Deckgläsern prinzipiell den Vorteil, dasselbe Präparat in unterschiedlichen Versuchen zu verwenden.

Die Zellvitalität wurde anhand von Coulter-Messungen nach Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Nicht Vasopressin-behandelte Zellen wiesen eine Zellvitalität von $79,6 \pm 4,1\%$ auf, welche signifikant schlechter als ungefrorene Zellen (Kontrolle; $94,0 \pm 0,9\%$) war. Wurden HepG2 Zellen zuvor 1 Stunde mit 100 nM Vasopressin stimuliert, konnte eine signifikant höhere Zellvitalität von $89,0 \pm 1,5\%$ erzielt werden (Abb. 28). Demnach hatte das Peptid-Hormon Vasopressin einen deutlich Zellvitalitätssteigernden Effekt nach Kryopräservation, der wahrscheinlich auf die Aktivierung des αENaC durch Vasopressin zurückzuführen war.

Die alleinige Überexpression des αENaC in HepG2 Zellen brachte keine Zellvitalitätssteigernden Effekt mit sich ($78,2 \pm 1,2\%$, s. Abb. 26). Lediglich die Vasopressin-Behandlung der αENaC überexprimierenden HepG2 Zellen führte zu einer signifikant erhöhten Zellvitalität ($82,8 \pm 1,4\%$), die jedoch auch weniger vital waren als Vasopressin-behandelte Wildtyp HepG2 Zellen (Abb. 28, $n = 6-9$, * $p < 0,05$).

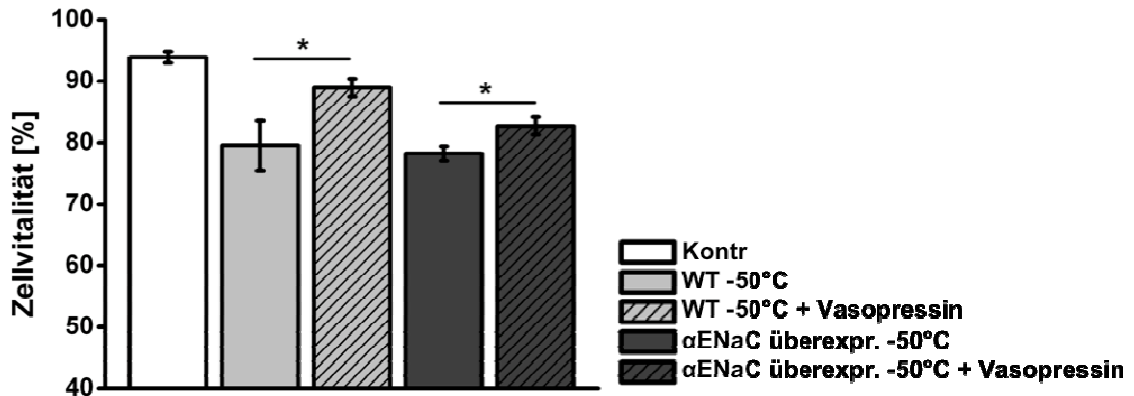


Abb. 28: Effekt des Vasopressins auf die Zellvitalität nach Kryopräservierung bei -50°C gemessen an HepG2 und αENaC überexprimierenden HepG2 Zellen im Vergleich. Mit der Vasopressin-Behandlung vor der Kryokonservierung überlebten HepG2 Zellen die Kryoarretierung deutlich besser. αENaC überexprimierende HepG2 Zellen hingegen zeigten keinen zusätzlichen Effekt des im Überschuss vorhandenen αENaC . Erst die Vasopressin-Inkubation der αENaC überexprimierenden HepG2 Zellen zeigten eine signifikant höhere Zellvitalität ($n = 6-9$, $* p < 0,05$, Mittelwert \pm SEM).

Weitere, standardgemäß verwendete Kryo-Bedingungen wie tiefere Temperaturen und Langzeitlagerung wurden ebenfalls untersucht (Abb. 29). Es stellte sich heraus, dass eine tiefere Temperatur (-80°C) per se eine schlechtere Zellvitalität mit sich brachte. Umso mehr wurde der Zellvitalität-steigernde Effekt des Vasopressins deutlich. Mit tiefer Temperatur (-80°C) wurde dieser Effekt merklich größer. Zusätzlich, konnte durch den Vasopressin-Effekt die Vitalität erhöht werden, je länger die HepG2 Zellen eingefroren waren. Es wurden 2, 10 und 50 Tage Kryo-Lagerung getestet. Bei allen Lagerzeit-Konservierungen zeigte Vasopressin einen Zellvitalität-erhöhenden Effekt. Zusätzlich erwies sich die Temperatur -50°C als besonders geeignet und vorteilhaft, um HepG2 Zellen für eine kurze Lagerzeit einzufrieren. Wurden HepG2 Zellen bis zu 10 Tagen bei -50°C eingefroren, zeigten Zellen höhere Zellvitalitäten als solche, die mit Vasopressin inkubiert und bei -80°C eingefroren waren ($n = 8-15$, $* p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$).

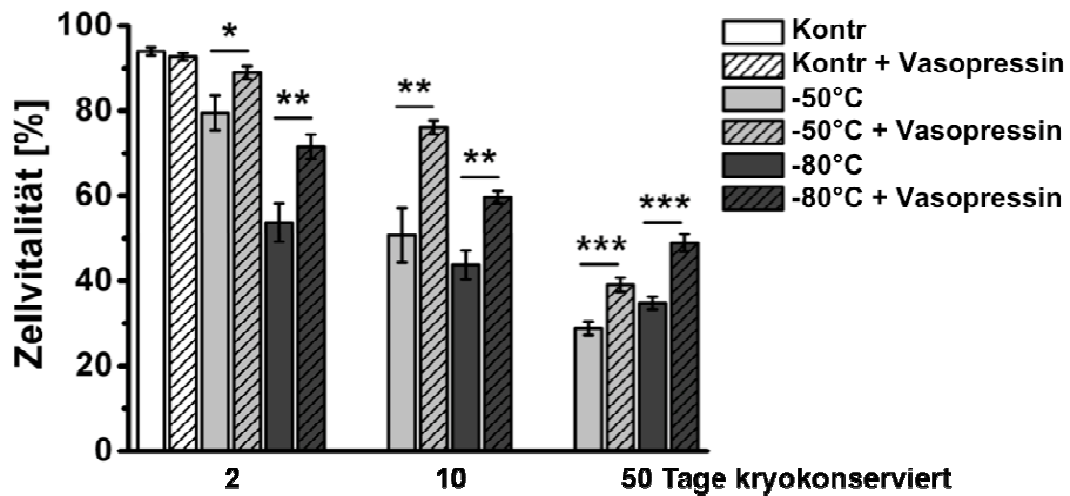


Abb. 29: Effekt des Vasopressins auf die Zellvitalität bei -50 und -80°eingefrorener HepG2 Zellen. Die Kryo-Lagerung betrug 2, 10 und 50 Tage. Mit tieferer Temperatur (-80°C) sowie mit einer längeren Langzeitlagerung der Zellen lässt sich der Vasopressin-Effekt verdeutlichen. (n = 8-15, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Mittelwert ± SEM).

3.6.4 Vasopressin erhöht die Zellvitalität und Proliferation nach Kryokonservierung nur in α ENaC exprimierenden Zellen

Die Volumenzunahme einer Zelle, die für eine Proliferation erforderlich ist, wird von der Aktivierung der Kation-Kanäle initiiert. Diese Kation-Kanäle sind die HICCs, die unter hypertonen Bedingungen den RVI vermitteln (Bondarava, 2009). Da nicht nur die Überlebensrate, sondern auch die Adhärenz und die anschließende Proliferation von Zellen nach Kryoarretierung bei der Kultivierung von Zellen von entscheidender Bedeutung ist, wurden simultan zu den Vitalitätstests die entsprechenden Proliferationen (Zell-Konfluenz) über die elektrische Impedanz der HepG2 Zellen und HDMEC Zellen quantifiziert (Abb. 30). HepG2 Zellen wurden nach Abb. 31 als α ENaC exprimierende Zellen definiert, ebenfalls nach Böhmer et al (2001) postuliert, wohingegen HDMEC Zellen kein α ENaC exprimierten (Abb. 31). Letztere Zelllinie diente daher als Negativ-Kontrolle für den Effekt des Vasopressins auf α ENaC.

Während das Peptid-Hormon Vasopressin die Überlebensrate der kryoarretierten HepG2 Zellen signifikant steigerte, konnte dieser Effekt nicht in

HDMEC Zellen beobachtet werden, vermutlich durch das Fehlen des α ENaC. Auch in der Proliferation machte dieses sich bemerkbar. Die Zellteilung kryopräservierter HepG2 Zellen konnte durch vorherige Inkubation mit Vasopressin merklich verbessert werden und erreichte schon nach eintägiger Messung eine Konfluenz ähnlich dem der Kontroll-Messung. An der Kontroll-Messung wurde nochmals deutlich, dass die Volumenregulation von Zellen Grundvoraussetzung der Proliferation ist. Nicht-Vasopressin-behandelte HepG2 Zellen dagegen wuchsen deutlich langsamer und erreichten erst nach dreitägiger Messung die Zelldichte der Kontroll-Messung. Zusätzlich ließ sich die Fähigkeit des Vasopressins beobachten, eine α ENaC-exprimierende Zelllinie wie HepG2 Zellen zur vermehrten Zellteilung anzuregen. Die Zelllinie der HDMEC Zellen zeigte keinerlei Antwort auf das Vasopressin. Kryoarretierte HDMEC Zellen wiesen keine Adhärenz und Proliferation auf ($n = 4-9$, * $p < 0,05$).

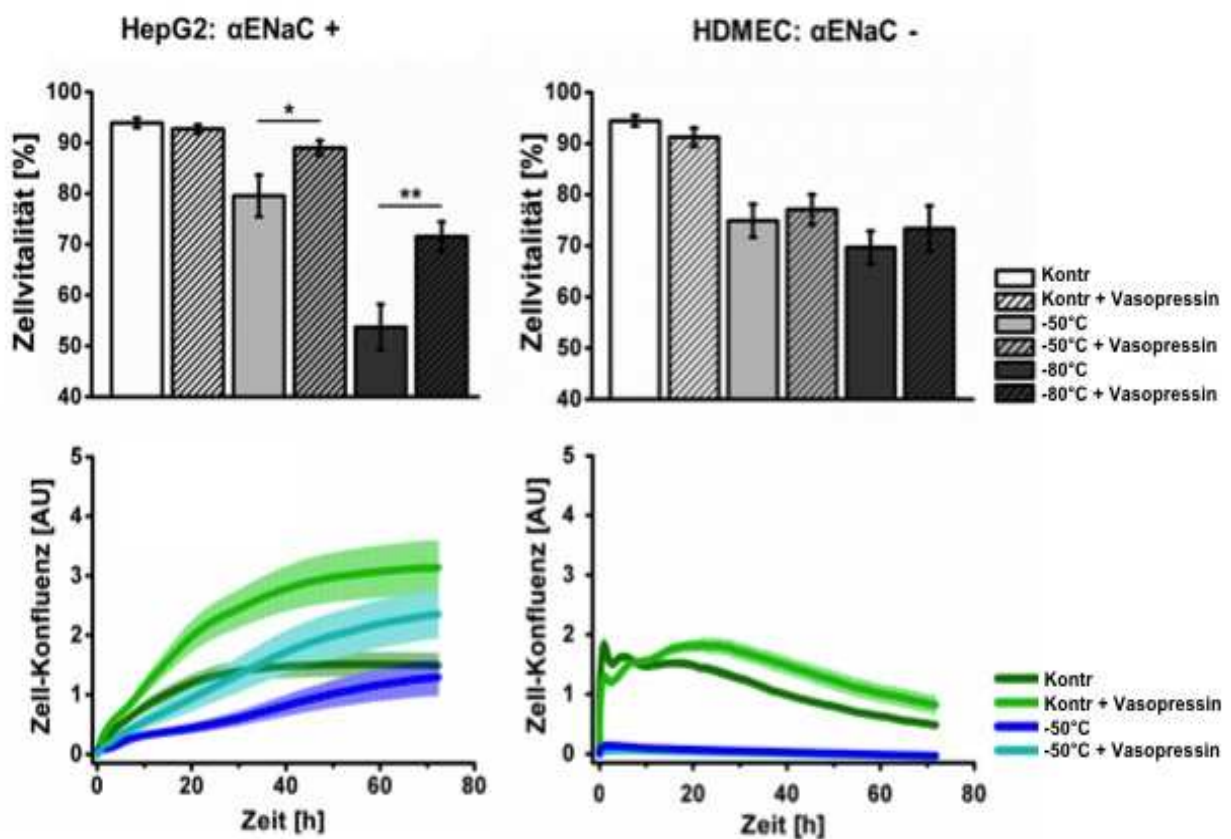


Abb. 30: Direkter Vergleich des Vasopressin-Effekts auf die Zellvitalität (oberes Panel) und die Proliferation (unteres Panel) in zuvor kryopräservierte (-50°C) HepG2 Zellen (α ENaC exprimierend) und HDMEC Zellen (nicht α ENaC exprimierend). Vasopressin erhöht die Überlebensrate und Proliferation ausschließlich in α ENaC

exprimierenden Zellen. Als Kontrolle dienten unbehandelte und Vasopressin-behandelte HepG2 Zellen, die nicht kryopräserviert waren ($n = 4-9$, $* p < 0,05$, Mittelwert \pm SEM).

Auf molekularbiologischer Ebene wurde die Expression der Ionenporter in den Zelllinien HepG2 und HDMEC Zellen untersucht (Abb. 31). Diese Untersuchung zeigte die Expression von α ENaC (195 Bp) in HepG2 Zellen (Spur 1), nicht aber die Expression von α ENaC in HDMEC Zellen (Spur 2). Die HepG2-Stimulierung mit Vasopressin führte zu einem Anstieg der RNA-Konzentration des α ENaC (Spur 3 und 4), die die α ENaC-Stimulation und -Aktivierung nach Kryoarretierung durch Vasopressin untermauert. Außerdem konnte RNA des TRPM2 in HDMEC Zellen nachgewiesen werden (Spur 7), der vermutlich in der Volumenregulation der HDMEC Zellen beteiligt sein könnte. TRPM2 (100 Bp) wurde nämlich ebenfalls in HeLa Zellen exprimiert (Spur 5) und ist nach Numata et al (2012) ein HICC in dieser Zelllinie. Auch in HepG2 Zellen war dieser Kanal exprimiert (Spur 6) und ist vermutlich auch hier als HICC an der Volumenregulation beteiligt.

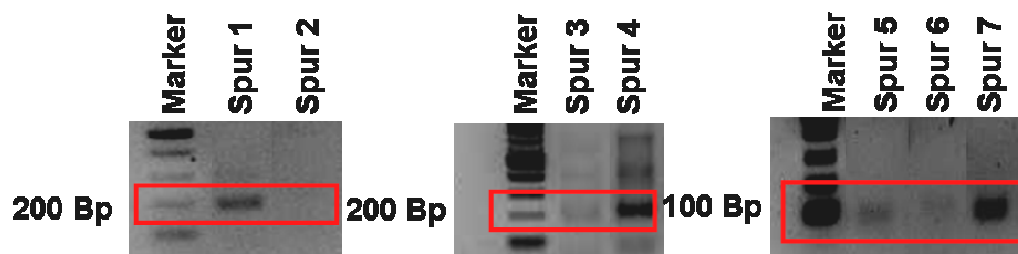


Abb. 31: Agarose-Gele der PCR. Produktbande des α ENaC (195 Bp) in HepG2 Zellen (Spur 1) und HDMEC Zellen (Spur 2). Produktbande des α ENaC in HepG2 (Spur 3) und Vasopressin-behandelten HepG2 (Spur 4). Produktbande des TRPM2 (100 Bp) in HeLa als Positiv-Kontrolle (Spur 5), HepG2 Zellen (Spur 6) und HDMEC Zellen (Spur 7). Jede der 3 PCR wurden auf jeweils ein Agarose-Gel geladen und nur die wichtigsten Produktbanden dargestellt.

Aus den molekularbiologischen Experimenten lässt sich schließen, dass ein spezifischer Effekt des Vasopressins auf α ENaC besteht und diese die Schlüsselfunktionen bei der Reversibilität von der Kryoarretierung darstellen könnte. Des Weiteren wird nochmals die Bedeutung des TRPM2 als zusätzliches Zielprotein in der Untersuchung der Volumenregulation und bei der Rückführung von tiefen Temperaturen bestätigt.

3.6.5 Erhöhte HICC-Stromdichte nach Vasopressin-Behandlung und Kryokonservierung

Die HICC-Stromdichten in HepG2 Zellen wurden unter Kontrollbedingungen sowie 0-2 Stunden und 2,5-6 Stunden nach Kryopräservierung gemessen (Anhang, Abb. 36). Zunächst konnte demonstriert werden, dass sich 0-2 Stunden nach Kryokonservierung die HICC-Stromdichte signifikant erhöhte und 6 Stunden nach Kryokonservierung allmählich verringerte ($n = 4-7$, $** p < 0,01$). Außerdem ließ eine vorherige Vasopressin-Inkubation der HepG2 Zellen vor Kryopräservierung bei -50°C die HICC-Stromdichte noch einmal deutlich steigen (Abb. 32, $n = 4$, $* p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$). Dies untermauert die HICC-Aktivierung als Zielobjekt für Vasopressin der Kryokonservierung.

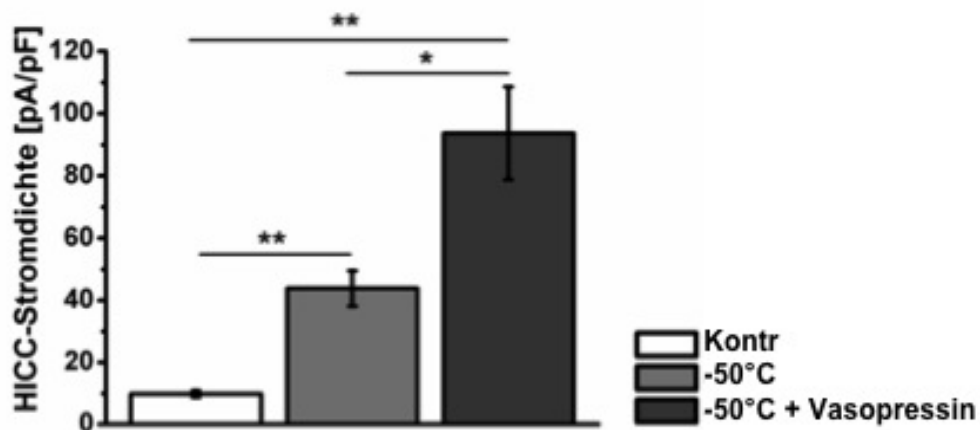


Abb. 32: HICC-Stromdichte unter Kontrollbedingung ($9,9 \pm 1,1$ pA/pF) und kurz nach Kryopräservierung ($43,8 \pm 5,7$ pA/pF) sowie mit Vasopressin-inkubierten kryopräservierten HepG2 Zellen ($93,7 \pm 14,9$ pA/pF). Die Messungen wurden bei 35°C unter Störung des osmotischen Gleichgewichtes bei 450 mosM durchgeführt ($n = 4$, $* p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$, Mittelwert \pm SEM).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktion und die Bedeutung der Zellvolumenregulation sowie der Zellhydratisierung für die reversible thermische Arretierung von Zellen untersucht. Hierzu wurden biophysikalische Anwendungen wie die Quantifizierung der Aktivierungsenergien verwendet, die vor und nach Kryokonservierung miteinander verglichen wurden. Ebenfalls wurde das Standard-Kryoprotokoll für das langsame Einfrieren mit dem Hormon Vasopressin optimiert und die thermische reversible Arretierung der Zellen somit erleichtert.

4.1 Das osmotisch inaktive Zellvolumen und die Kälte induzierte adaptative Reduktion der Zellhydratation

Ein Boyle van't Hoff Graph erlaubt die Bestimmung des osmotisch inaktiven und aktiven Zellvolumens. Der osmotisch inaktive Bereich besteht aus den festen Stoffen einer Zelle wie Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, Elektrolyte, Osmolyte und Hydrathüllen. Der osmotisch aktive Bereich hingegen ist das nicht gebundene, mit anderen Worten das frei diffundierbare Wasser einer Zelle, das unter physiologischen Bedingungen (37°C) in HepG2 Zellen bei 69% lag (s. Abb. 13 und Tab. 4). Anhand der Quantifizierung des osmotisch aktiven Volumens bei den Temperaturen 30-10°C konnte festgestellt werden, dass sich mit sinkender Temperatur das osmotisch aktive Volumen reduzierte. Bereits bei Raumtemperatur verringerte sich das osmotisch aktive Volumen auf die Hälfte. Das frei diffundierbare Wasservolumen nahm bei der kältesten gemessenen Temperatur (10°C) drastisch auf 18% ab (Abb. 14). Auch das absolute Zellvolumen nahm signifikant ab, wobei sich die Zellvitalität erst nach 3 Stunden Inkubation bei 5°C verschlechterte (Abb. 15). Somit zeigte sich, dass HepG2 Zellen auf das Kühlen der Temperatur oberhalb von 4°C mit einer Reduktion der Zellhydratation reagierten. Die Reduktion der Zellhydratation, die im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, könnte ein adaptiver Schutzmechanismus sein, den die Zellen benötigen, um überschüssiges Wasser aus dem Zytoplasma zu transportieren, damit bei Eintritt der Nukleation so wenig intrazelluläre

Eiskristalle entstehen wie möglich. Ohne eine Dehydratation bildet sich aus dem intrazellulären freien Wasser intrazellulär letale Eiskristalle (Mazur, 2005; Dong, 2010). Eine Studie (Willis, 1972) konnte zeigen, dass kühle Temperaturen (5°C) zu einer Verringerung der intrazellulären K^+ -Konzentration führen. So kommt es zu einem Verlust von Kationen (K^+) und Anionen (Cl^-). Demnach wäre anzunehmen, dass unter kalten Temperaturen osmotisch aktives Wasser aus der Zelle diffundieren muss, um den osmotischen Druck auszugleichen. Über diesen Prozess könnte die Reduktion der Zellhydratation einen adaptiven Schutzmechanismus darstellen.

4.2 Messung der Zellvolumenveränderungen und des Na^+ -Transports an HepG2 Zellen bei Hypertonizität

Das osmotische Gleichgewicht lebender Systeme wird aus der Balance gebracht, wenn sie anisotonen Bedingungen ausgesetzt werden. Hierauf wird die Maschinerie der Zellvolumenregulation aktiviert, um das gestörte Gleichgewicht über Wasser- und Ionentransport wieder herzustellen. Die *Scanning-Acoustic-Microscopy*-Messungen eigneten sich hierbei gut, um die Aktivitäten der gesamten Aquaporine, die in die Zellmembran integriert sind, so wie die des RVI - sowohl vor als auch nach Kryokonservierung - zu charakterisieren. Mittels *Whole-Cell Patch-Clamp* Aufzeichnungen konnte darüber hinaus die HICC-Aktivität und damit indirekt der Na^+ -Transport gemessen werden.

4.2.1 RVI und Wassertransport nach Kühlung und Kryokonservierung – Verlangsamter Wassertransport und Aktivierung des RVI

Um den Beitrag des RVI und des Wassertransports zum dehydrierten Zustand einer Zelle bei unterkühlten Temperaturen und Kryokonservierung zu analysieren, wurden HepG2 Zellen jeweils bei Temperaturen oberhalb des Gefrierens (4°C und -10°C) und Temperaturen bei denen Eisbildung eintraten (-20°C und -50°C) in Anwesenheit von 10% DMSO für 1 Stunde auf der Kryostage

gehalten. Anschließend wurde die akustische Impedanz bei 37°C gemessen und die Aktivität des RVI und des Wassertransports untersucht (Abb. 19). Die Transportraten des RVI von unterkühlten und kryokonservierten Zellen waren signifikant schneller als bei ungefrorenen Zellen. Das absolute Zellschrumpfen nach hypertonem Schock zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle, lediglich die Geschwindigkeit des Wassertransports war signifikant verlangsamt. Diese Effekte traten bereits bei Zellen nach 4°C auf und blieben bis -50°C konstant. Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass die Beteiligung der Ionentransporter beim RVI sowohl nach unterkühlten Zuständen als auch nach Kryokonservierung eine bedeutende Funktion haben. Demnach ist der RVI schon bei geringer Unterkühlung, z.B. bei Raumtemperatur, sobald eine Zelle an Volumen verliert, deutlich aktiviert. Ein erhöhter Ionentransport in die Zelle, würde an dieser Stelle die Diffusion von Wasser und damit die Volumenrückgewinnung herbeiführen. Welcher der *Hypertonicity Induced Cation Channels*, die den RVI vermitteln, bei Unterkühlung und Kryopräservierung von zentraler Bedeutung ist, ist noch nicht bekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden. Der Wassertransport, der durch Aquaporine vermittelt wird, scheint zunächst von basaler Bedeutung zu sein, sodass die Funktion der Aquaporine nach Kühlung und Kryokonservierung aufrecht gehalten wurde (Abb. 19). Sowohl die Überexpression der Aquaporin 3 mRNA, als auch die Erhöhung der Wasserpermeabilität nach Kryopreservation wurden bisher beschrieben (Muldrew, 2008; Kuzmany, 2011). Aber auch die Abwesenheit der Aquaporine und der Wassertransport über „sekundäre Wasserporen“ wie der Glucose-Transporter wurden diskutiert (Ebertz, 2002; Chaveiro, 2006). Neben dem Glucose-Uniporter transportieren auch der K^+/Cl^- und der $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Symporter Wasser in die Zelle (Zeuthen, 2009). Dass noch weitere Ionentransporter am Kotransport von Wasser mitwirken, ist deshalb nicht auszuschließen. Um so mehr ist den Ionentransportern, die an der Volumenrückgewinnung nach Dehydratation durch Kühlung und Kryopreservation beteiligt sind, eine besondere Bedeutung zuzuweisen.

4.3 Bestimmung der Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor und nach Kryokonservierung

4.3.1 Aktivierungsenergien der Volumenveränderung vor Kryokonservierung

Die Analyse der Temperaturabhängigkeit der Membranpermeabilität für Wasser sowie für Ionen durch Kanäle und Transporter erfolgte über die Quantifizierung der Aktivierungsenergien (Hunter, 1992; Chaveiro, 2006; Sesti, 1996; Schmitt, 2005). Dies ist eine biophysikalische Herangehensweise, die sich durch die Temperaturabhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von Kanäle und Transporter bestimmen lässt. Diese eignete sich gut zur Untersuchung der Transportgeschwindigkeiten von Wasser und Kationen nach Kryokonditionen. Verkman definierte hohe Aktivierungsenergien zwischen 32 und 40 kJ/mol als einen Wassertransport bei dem Wasser über die reine Lipidmembran diffundiert. Da nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen unter Wassermolekülen und zu Lipiden aufgebrochen werden müssen, sondern auch die Lipid-Dynamik verändert wird, entstehen hohe Aktivierungsenergien, um einen Protein-unabhängigen Wasserkanal zu formen (*solubility-diffusion model*). Synthetische Lipidmembranen, die keine Aquaporine exprimierten, zeigten ebenfalls für den Wassertransport Aktivierungsenergien, die in dem Bereich 47 bis 65 kJ/mol lagen (Solomon, 1972). Aktivierungsenergien zwischen 12 und 24 kJ/mol definierte Verkman als einen Aquaporin-vermittelnden Wassertransport. Aufgrund der „Selbst-Diffusion“ der Wassermoleküle durch Aquaporine und die daraus resultierende geringe Temperaturabhängigkeit, muss weniger physikalische Energie aufgebracht werden, um die Lipidmembran zu passieren (Worman, 1985; Verkman, 2000; Liu, 2002). Der Ionentransport über die Membran benötigt dagegen eine sehr hohe Aktivierungsenergie. Der typische Bereich der Aktivierungsenergien für Membran-Transporter liegt bei 50 – 60 kJ/mol (Naftalin, 1997; Elias, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wiesen das Zellschrumpfen bei allen gemessenen Osmolaritäten hohe Aktivierungsenergien auf ($31,9 \pm 9,3$ bis $41,5 \pm 7,5$ kJ/mol), während das Zellschwellen, das 20 Minuten nach hypertonem Stress detektiert

wurde, ebenso unabhängig von der Stärke der Osmolarität war, aber deutlich niedrigere Aktivierungsenergien aufwies ($10,8 \pm 7,6$ bis $15,2 \pm 6,4$ kJ/mol) (Abb. 21). Anhand der bisherigen Erkenntnisse über Aktivierungsenergien lies sich schließen, dass in HepG2 Zellen zu Beginn eines hypertonen Schockes das Zellschrumpfen hauptsächlich über die Diffusion des Wassers durch die Lipidmembran erfolgte (*solubility-diffusion model*). Erst nach anhaltendem hypertonem Stress wurden Aquaporine innerhalb weniger Minuten, wahrscheinlich aus vesikulären Speichern an die Lipidmembran transportiert, so dass der Wassertransport erst während des hypertonen Stresses über Aquaporine verlief. Dies wird anhand des Zellschwellens deutlich gemacht, indem sich die Aktivierungsenergie signifikant in den Bereich reduziert, der für einen Protein-abhängigen Wassertransport sprach. Die Translokation des Aquaporins aus intrazellulären Speichern ist in tierischen Zellen der Mechanismus, um den Wassertransport zu regulieren (Conner, 2012). Pflanzen und Bakterien dagegen haben ein Mechanismus entwickelt, der den Durchtritt des Wassers durch die Pore kontrolliert (Törnroth-Horsefield, 2006).

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass sowohl der Protein-unabhängige als auch der Protein-abhängige Wassertransport nicht von der Stärke der jeweiligen Osmolarität festgelegt wird (Abb. 21). Demnach wäre bereits ein geringer hypertoner Stimulus ausreichend um die maximale Translokation und Aktivierung der Aquaporine hervorzurufen. Die Translokation und Regulierung beispielsweise des Aquaporins 1 wird über den TRPC1 vermittelnden Ca^{2+} -Anstiegs in der Zelle initialisiert, so dass über Calmodulin-Aktivierung die Aquaporin-beladenen Vesikeln über Mikrotubuli zur Zellmembran translokalisiert und über Proteinkinase C aktiviert werden (Conner, 2012).

Der RVI hingegen wird erst ab höheren Osmolaritäten (ab 450 mosM) deutlich stimuliert. Denn nach einem niedrigen hypertonen Schock (400 mosM) wies der RVI eine recht niedrige ($20,7 \pm 10,7$ kJ/mol), ab 450 mosM dann aber eine signifikant höhere Aktivierungsenergie auf ($39,8 \pm 13,4$ kJ/mol) (Abb. 21). Demnach ist der RVI deutlich osmolaritätsabhängig. Auch elektrophysiologische Untersuchungen der HICCs in HepG2 Zellen, bestätigten die

Osmolaritätsabhängigkeit des RVI und zeigten klar die Bedeutung der HICCs sowie des Na^+ -Transports für den RVI (Abb. 22).

4.3.2 Aktivierungsenergien der Wildtyp und Aquaporin 1 überexprimierenden HepG2 Zellen

Die Aktivierungsenergien des Wassertransports in Aquaporin 1 überexprimierenden HepG2 Zellen und in Wildtyp Zellen sind in Abb. 23 dargestellt. Nach Quantifizierung der Aktivierungsenergien, konnte kein Unterschied im Wassertransport während des Zellschrumpfens festgestellt werden ($38,7 \pm 6,4$ kJ/mol und $46,0 \pm 6,8$ kJ/mol). Nach erfolgtem hypertonen Stress und Translokation des Aquaporins, war die Aktivierungsenergie der Wildtyp Zellen jedoch deutlich verringert ($14,0 \pm 7,7$ kJ/mol). Zusätzlich sank die Aktivierungsenergie deutlich noch einmal, wenn Aquaporin 1 überexprimiert wurde ($4,6 \pm 10,8$ kJ/mol). Folglich wurde nach Überexpression des Aquaporin 1 in HepG2 Zellen die Wasserkanal-Aktivität nachweisbar während des Zellschwellens erhöht. Mit einem erhöhten Repertoire an Aquaporinen in den intrazellulären vesikulären Speichern, konnte bei Hypertonizität die Protein-Translokation an die Zellmembran deutlich gesteigert, wodurch Wassermoleküle für das Passieren durch die Zellmembran weniger physikalische Energie zur Diffusion benötigen.

4.3.3 Aktivierungsenergien der Zellvolumenregulation nach Kryokonservierung – Kryokonservierung stimuliert den RVI

HepG2 Zellen, die zuvor eingefroren waren, zeigten nach Störung des osmotischen Gleichgewichtes kaum Änderung in der De- und Rehydratation (Abb. 24). Sowohl das Zellschrumpfen als auch das Zellschwellen behielten ähnliche Aktivierungsenergien bei. Lediglich die Aktivierungsenergie des Zellschrumpfens nach Kryoarretierung verringerte sich mit geringer Tendenz, da wohlmöglich durch Aufkonzentrierung der Osmolyte während des Kühlens und der Eisbildung ein osmotischer Schock herbeigerufen und Aquaporine an die Zellmembran transloziert wurden. Wie die De- und Rehydratation während des

Verlaufs in der Kryopreservation ändert ist bisher nicht bekannt und könnte mit entsprechender Technik erprobt werden. Dies wäre z.B. ein optisches Verfahren zur Quantifizierung der Translokation der Aquaporine an die Zellmembran während des Kühlens einer Zelle und der Eisknucleation (Kryodehydratation) sowie während der Erwärmung und Rehydratation der Zelle.

Die Aktivierungsenergie des RVI hingegen zeigte eine markante Verringerung nach Kryokonservierung (Abb. 24). Demnach lies sich der RVI nach Kryokonservierung in seiner Aktivität merklich verändern, jedoch nicht die der Aquaporine. Die Aktivierung des RVI nach thermischer Arretierung wurde zusätzlich durch SAM-Messungen (Abb. 19) und durch *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen (s. Anhang, Abb. 36) unterstützt. Die HICC-Stromdichten in HepG2 Zellen nach Kryokonservierung zeigten, dass sich die Na^+ -Stromdichte signifikant erhöhte. Nach der Rückkehrung von der Kryoarretierung wurden wahrscheinlich Ionentransporter aus intrazellulären vesikulären Speichern an die Zellmembran translokalisiert. Nur eine erhöhte Anzahl der Ionentransporter in der Zellmembran kann mit Effizienz ein osmotisches Gleichgewicht während des Auftauprozesses wieder herstellen. Die Regulation und Translokation der Na^+ -Transporter aus vesikulären Speicher erfolgte möglicher Weise über den verstärkten Na^+ -Influx in die Zelle: Die erhöhte Na^+ -Konzentration bewirkt dabei die Aktivierung der Phospholipase C, welche wiederum Proteinkinase C stimuliert und dadurch eine über Mikrotubuli entlang vesikuläre Translokation des ENaC zur Zellmembran stattfindet (Olsen, 2001 und Olsen, 2004). Diese Aktivierung der HICCs und dadurch des RVI nach Kryokonservierung könnte somit einen Schlüsselmechanismus für die Reversibilität von der thermischen Arretierung für Zellen darstellen. Durch eine weitere Stimulierung dieses Schlüsselmechanismus könnten viele Zelllinien, primäre Zellen oder sogar Stammzellen leichter kryokonserviert werden.

4.4 Die erhöhte Zellviskosität beeinflusst die HICC-Aktivierung

Die hypertone aktivierten Kation-Kanäle in HepG2 sind noch nicht vollständig identifiziert. Fest steht jedoch, dass der epitheliale Natriumkanal einer der Hauptkomponenten des HICC ist. Im Allgemeinen lassen sich Ionenkanäle durch

mehrere Faktoren regulieren. Diese sind für ENaC extra- und intrazelluläre Proteasen, die nach Spaltung einer spezifischen Region zur Aktivierung führen, extra- und intrazelluläre Ionenkonzentrationen, Kinasen, die direkt oder indirekt Ionenkanäle aktivieren sowie eine Reihe von Hormonen (Kellenberger, 2002; Loffing, 2009; Rotin, 2011; Dooley, 2012). Es konnte laborintern mittels FCS gemessen werden, dass mit Abkühlung und Kryoarretierung der HepG2 Zellen - bedingt durch die Dehydratation und Kryodehydratation - eine Erhöhung der zytoplasmatischen Viskosität eintrat. Ob aber ein physikalischer Parameter wie die Viskosität die HICC-Aktivierung, besonders nach Kryopräservierung, ebenfalls aktiviert, blieb offen. Eine mit Dextran erhöhte Viskosität des Zytoplasmas von 1,8 cP auf 2,5 cP zeigte jedoch in *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen tatsächlich eine HICC Aktivierung (Abb. 25). Durch die Diffusion der viskoserer Pipettenlösung in die *gepatchte* Zelle erreichte diese das Zytoplasma. Hier herrschen nun vermehrte Scherkräfte zwischen den im Zytoplasma befindlichen Strukturen, die äquivalent zum so genannten *macromolecular crowding* sind. Das *macromolecular crowding* entsteht aufgrund eines geringen Wassergehaltes im Zytoplasma und der sich dadurch aufkonzentrierender Makromoleküle, das z.B. auch während eines Zellschrumpfens auftritt. Durch die hohe Konzentration des Polysaccharids Dextran in der intrazellulären Pipettenlösung wurde solch ein *macromolecular crowding* simuliert. Dabei entsteht im Zytoplasma eine Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeiten der Substanzen. Nicht nur die Diffusionsgeschwindigkeiten, sondern auch die Proteinfaltung wird verändert. Konformationsveränderungen wiederum tragen zu der Aktivierung von Proteinen bei (van den Berg, 2000). Daher wird das *macromolecular crowding* auch als Zellvolumensensor postuliert (Burg, 2000; Baumgarten und Feher, 2001). Entsprechend könnte das *macromolecular crowding* einen Auslöser der HICC-Aktivierung darstellen.

Die Quantifizierung der Aktivierungsenergie der HICCs unter Erhöhung der intrazellulären Viskosität zeigte eine signifikante Senkung verglichen mit der Kontrolle (Abb. 25). Somit lies sich durch die Erhöhung der intrazellulären Viskosität die HICCs stärker stimulieren. Die Aktivierung der HICCs schien in Verbindung mit der direkten Aktivierung aus dem Zytoplasma zu stehen. Dies lies schließen, dass die Erhöhung der Viskosität, die während der Kühlung der

Zelle und der Kryoarretierung auftritt, möglicherweise den HICC aktiviert. Wie die erhöhte Viskosität den HICC aktiviert, lässt sich an dieser Stelle nicht genau sagen. Möglich wäre jedoch die Sensitivität von Enzymen auf geringe Konzentrationsveränderungen in Betracht zu ziehen. Solche Enzyme sind in der Signaltransduktion von Ionenkanälen Kinasen und Phosphatasen. Diese lassen sich vermutlich durch das *macromolecular crowding* aktivieren oder deaktivieren und sind auf diese Weise an der Beteiligung der Zellvolumenregulation involviert (Al-Habori, 2001).

4.5 Weitere potentielle HICC-Komponenten in HepG2

Da die HICCs in HepG2 Zellen bisher nicht vollständig charakterisiert worden sind, wurden zur Bestimmung weiterer HICC-Komponenten, die neben α ENaC zur Volumenregulation beitragen, siRNAs gegen verschiedene Ionentransportern (α ENaC, TRPM2, TRPM5 und Piezo1) transfiziert (Abb. 26). So konnte die Expression der Ziel-Proteine reduziert und der Beitrag zum Na^+ -Transport über die Zellmembran untersucht werden. Die HICC-Aktivierung war bei allen ausgetesteten siRNAs deutlich niedriger. Folglich könnten neben α ENaC als weitere HICC-Komponenten TRPM2, TRPM5 und Piezo1 an der Volumengewinnung nach hypertonem Stress tatsächlich beteiligt sein. Diese konnten nicht mehr weiterhin untersucht werden und sind daher die potentiellen Zielproteine in zukünftigen Kryoanwendungen.

Ob eine Interaktion dieser Ionentransporter zu α ENaC besteht, konnte anhand eines *double silencings* festgestellt werden. Die weitere Inaktivierung des Na^+ -Transports und somit die Additivität des Kationentransports mittels des *double silencings* konnte elektrophysiologisch nicht detektiert werden. Die Nicht-Additivität des Kationentransports zeigt, dass α ENaC, TRPM2, TRPM5 und Piezo1 tatsächlich an einem Kanal-Komplex beteiligt sind und die HICCs nur als ein Kanal-Komplex funktionieren. Dadurch lässt sich eine funktionelle und möglicherweise eine molekulare Additivität der HICCs schließen.

4.6 Stimulierung des RVI mit dem Peptid-Hormon Vasopressin - Etablierung des Standard-Kryoprotokolls

4.6.1 Stimulierung des RVI mit Vasopressin

Damit die Bedeutung der HICCs und des RVI in der Kryopräservierung gezeigt werden konnte, wurde das Peptid-Hormon Vasopressin zunächst auf dessen Wirkung auf passive (Wasserdiffusion) und aktive (RVI) Volumenregulationsprozesse getestet (Abb. 27). Nach 1-stündiger Inkubation des Vasopressins mit HepG2 Zellen, vergrößerte sich der RVI signifikant um 20%. Auch die Ionen-Transportrate des RVI war deutlich schneller. Die Wasserdiffusion dagegen wurde von Vasopressin nicht beeinträchtigt. Vasopressin ist bekannt, α ENaC zu stimulieren. Durch das Binden des Vasopressins an dessen V1A-Rezeptor wird das cAMP im Zytosol angereichert und die Proteinkinase A aktiviert. Letztere wiederum phosphoryliert das Nedd4-2 und die Interaktion zur Ubiquitinisierung wird unterbunden, wodurch es zur Stabilisierung des α ENaC in der Zellmembran und Aufrechterhaltung des Na⁺-Transports kommt. Somit wird der Natrium-Transport durch Vasopressin moduliert und aktiviert (Rotin, 2011). In den Sammelrohren der Nieren reguliert das Vasopressin auch die Wasserpermeabilität der Zellmembran durch Translation, Transkription und anschließende Translokation von Aquaporin 2 an die Zellmembran (Wang, 2004). Da Aquaporin 2 ausschließlich in Nieren-Zellen und Zellen der Sammelrohre exprimiert wird, nicht aber in HepG2 Zellen, hat das Vasopressin wahrscheinlich hier keinen Effekt auf die Wasserpermeabilität. Es konnte gezeigt werden, dass Vasopressin keinen Effekt auf die in HepG2 Zellen vorhandene Aquaporine (Aquaporin 1, 4, 8, 9 und 11) hat (Abb. 27).

Allerdings konnte der stimulierende Effekt des Vasopressins auf den RVI und damit auch auf α ENaC in HepG2 Zellen bestätigt werden. In Kombination des durch die Kryopräservierung aktivierten RVI mit dem Effekt des Vasopressins auf α ENaC könnte ein völlig neues Kryoprotokoll etabliert werden, in dem Vasopressin erstmals als biologisch aktives Kryoprotektivum dient.

4.6.2 Das Peptid-Hormon Vasopressin als biologisch aktives Kryoprotektivum

4.6.3 Vasopressin erhöht die Zellvitalität nach Kryokonservierung

Bis dato wurden in der Regel Kryoprotektiva benutzt, die den Gefrierpunkt der Lösung herabsetzen und stabilisierend auf Proteine und Lipide wirken. Ganz anders wirkt das Vasopressin, welches dynamisch in die zellulären Signalkaskaden eingreift und aktiv die Proteinbeschaffenheit der Zellmembran moduliert. Um den Effekt des Vasopressins auf eingefrorene Zellen zu untersuchen, wurde das Hormon in das Kryoprotokoll des langsamen Einfrierens implementiert. Die Kryopräservierung bei -50°C von HepG2 Zellen und die anschließende Zellvitalitätsmessung per Trypan-Blau-Färbung wies eine Zellvitalität von $79,6 \pm 4,1\%$ auf. Im Gegensatz dazu wiesen Vasopressin-behandelte Zellen eine deutlich höhere Zellvitalität von $89,0 \pm 1,5\%$ auf. Das Peptid-Hormon zeigte somit einen Zellvitalität-steigernden Effekt nach Kryopräservierung, der sehr wahrscheinlich auf die Wirkung des Vasopressins auf αENaC zurückzuführen ist, denn die Überexpression des αENaC in HepG2 Zellen brachte keinen zusätzlichen Effekt auf die Zellvitalität. Außerdem wurde ersichtlich, dass die alleinige Überexpression der Kanaluntereinheit αENaC nicht ausreicht, um die Zellvitalität zu steigern (Abb. 28). Um einen funktionellen Ionenkanal auszubilden, müssten weitere Untereinheiten ebenfalls überexprimiert anwesend sein. Letztlich lässt sich spekulieren, dass - wenn die αENaC Überexpression alleine nicht ausreichend ist - Vasopressin mehrere Kanaluntereinheiten hoch reguliert. Interessanterweise reguliert Vasopressin auch die mRNA der βENaC und γENaC Untereinheit, nicht aber die mRNA des αENaC (Ecelbarger, 2000).

Weitere Kryo-Bedingungen wie tiefere Temperaturen und Langzeitlagerung wurden ebenfalls erprobt (Abb. 29). Es stellte sich heraus, dass eine tiefere Temperatur (-80°C) eine schlechtere Zellvitalität bewirkte, jedoch der Vasopressin-Effekt sich umso mehr steigerte. HepG2 Zellen, die -80°C kryopräserviert wurden, wiesen eine schlechtere Zellvitalität auf, die wahrscheinlich einem starken Eiskristallwachstum zugrunde lag. Im Gegensatz

dazu eignete sich die Temperatur -50°C deutlich besser, um HepG2 Zellen für eine kurze Lagerzeit einzufrieren. Eine geringere Eisbildung wirkte sich vermutlich schonender auf Zellen aus. Darüber hinaus verbesserte sich durch den Vasopressin-Effekt die Zellvitalität von Zellen, die über längere Zeit (bis zu 50 Tagen) kryopräserviert wurden. Damit eignet sich die Verwendung des Vasopressins auch zur Langzeitlagerung von Zellen.

Des Weiteren erlaubt die mehrfache Verwendbarkeit von auf Deckgläsern angewachsenen adhärennten Zellen in unterschiedlichen Versuchen einen einfachen und einen schnellen Umgang mit dem zu untersuchendem Präparat. Das Verwenden von adhärennten Zellen ist daher ein sehr interessantes und nützliches „Tool“ in kryobiologischen Anwendungen.

4.6.4 Vasopressin erhöht die Zellvitalität und Proliferation nach Kryokonservierung nur in αENaC exprimierenden Zellen

Da die Volumenregulation von Zellen über die HICCs Grundvoraussetzung der Proliferation ist, wurden nicht nur die Überlebensrate, sondern auch die Adhärenz und Proliferation von Zellen nach Kryoarretierung gemessen. Die Proliferation der HepG2 Zellen und HDMEC Zellen, die ein Maßstab der Zell-Konfluenz ist, wurde über die elektrische Impedanz quantifiziert (Abb. 30).

Wie bereits erwähnt sind HepG2 Zellen eine αENaC exprimierende Zelllinie, in der diese Kanaluntereinheit durch Stimulation mit Vasopressin zur besseren Vitalität nach Kryopräservierung führt. Im Gegensatz dazu ist die primäre Zelllinie der HDMEC αENaC -nicht-exprimierend. Somit war sie als negative Kontrolle zur Untersuchung der Wirkung des Vasopressins auf αENaC sehr gut geeignet. Dies wurde mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen untermauert (Abb. 31). Durch die Vasopressin-Applikation stieg die cDNA-Konzentration des αENaC in HepG2 Zellen an. Während das Vasopressin in Zellvitalitätsmessungen die Überlebensrate der kryoarretierten HepG2 Zellen signifikant steigerte, konnte dieser Effekt nicht in HDMEC Zellen beobachtet werden (Abb. 30), sehr wahrscheinlich durch das Fehlen des αENaC . Auch in der Proliferation konnte dies deutlich gezeigt werden. Die Zellteilung

kryopräservierter HepG2 Zellen wurde durch die vorherige Inkubation mit Vasopressin merklich verbessert. Dagegen wuchsen nicht-Vasopressin-behandelte HepG2 Zellen deutlich langsamer. Außerdem konnte eine erhöhte TRPM2-cDNA-Konzentration in HDMEC Zellen identifiziert werden, welches dort eventuell eine HICC-Komponente darstellt und in der Volumenregulation der HDMEC Zellen beteiligt sein könnte (Abb. 31). TRPM2 wurde nämlich ebenfalls in HeLa Zellen exprimiert und bildet nach Numata et al die Hauptkomponente des HICC in HeLa Zellen (Numata, 2012). Auch in HepG2 Zellen war dieser Kanal exprimiert (Abb. 31) und ist als HICC in der Volumenregulation wahrscheinlich ebenfalls von Bedeutung. Zusätzlich ließ sich der Effekt des Vasopressins beobachten, HepG2 Zellen zur vermehrten Zellteilung anzuregen (Abb. 30). Da α ENaC in der Proliferation der HepG2 beteiligt ist (Bondarava, 2009), wurde mit der Vasopressin-Stimulation ebenfalls die Proliferation angeregt. Die Zelllinie der HDMEC Zellen zeigte keinerlei Veränderung der Proliferation durch das Vasopressin. Darüber hinaus wiesen kryoarretierte HDMEC Zellen keine Adhärenz nach Kryokonditionen auf. Folglich konnte keine nennenswerte Proliferation gemessen werden. Somit ist das Peptid-Hormon Vasopressin ein biologisch aktives nicht toxisches Kryoprotektivum, das die Reversibilität der Kryoarretierung von α ENaC exprimierenden Zellen unterstützt und verbessert.

4.6.5 Erhöhte HICC-Stromdichte nach Vasopressin-Behandlung und Kryokonservierung

Mittels der *Whole-Cell Patch-Clamp* Technik wurden Natrium- bzw. HICC-Stromdichten in HepG2 Zellen unter Kontrollbedingungen sowie 0-2 und 2,5-6 Stunden nach Kryokonservierung gemessen (Anhang, Abb. 36). Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich 0-2 Stunden nach Kryokonservierung die HICC-Stromdichte signifikant erhöhte und nach 6 Stunden Regenerationszeit die HICC-Stromdichte allmählich wieder reduzierte. Außerdem ließ eine vorherige Vasopressin-Inkubation der HepG2 Zellen und die zusätzliche Kryopräservierung die HICC-Stromdichte additiv steigern (Abb. 32). Demnach hat die Aktivierung des RVI nach Kryokonservierung wie die weitere Stimulierung des RVI durch

Vasopressin ihre Ursache in einer erhöhten α ENaC-Aktivität und dem damit gesteigerten Na^+ -Influx durch den HICC. Somit lies sich das Potential zur Volumenrückgewinnung durch eine verstärkte Na^+ -Aufnahme mit Hilfe des Vasopressins als zellulären Schutzmechanismus vor Kryo-Bedingungen verbessern. Mit der verstärkten Na^+ -Aufnahme konnte letztlich die Zellvitalität und die Zellproliferation nach Kryokonservierung erhöht werden, womit das Vasopressin als neuartiges Kryoprotektivum eingestuft werden kann.

Anhang

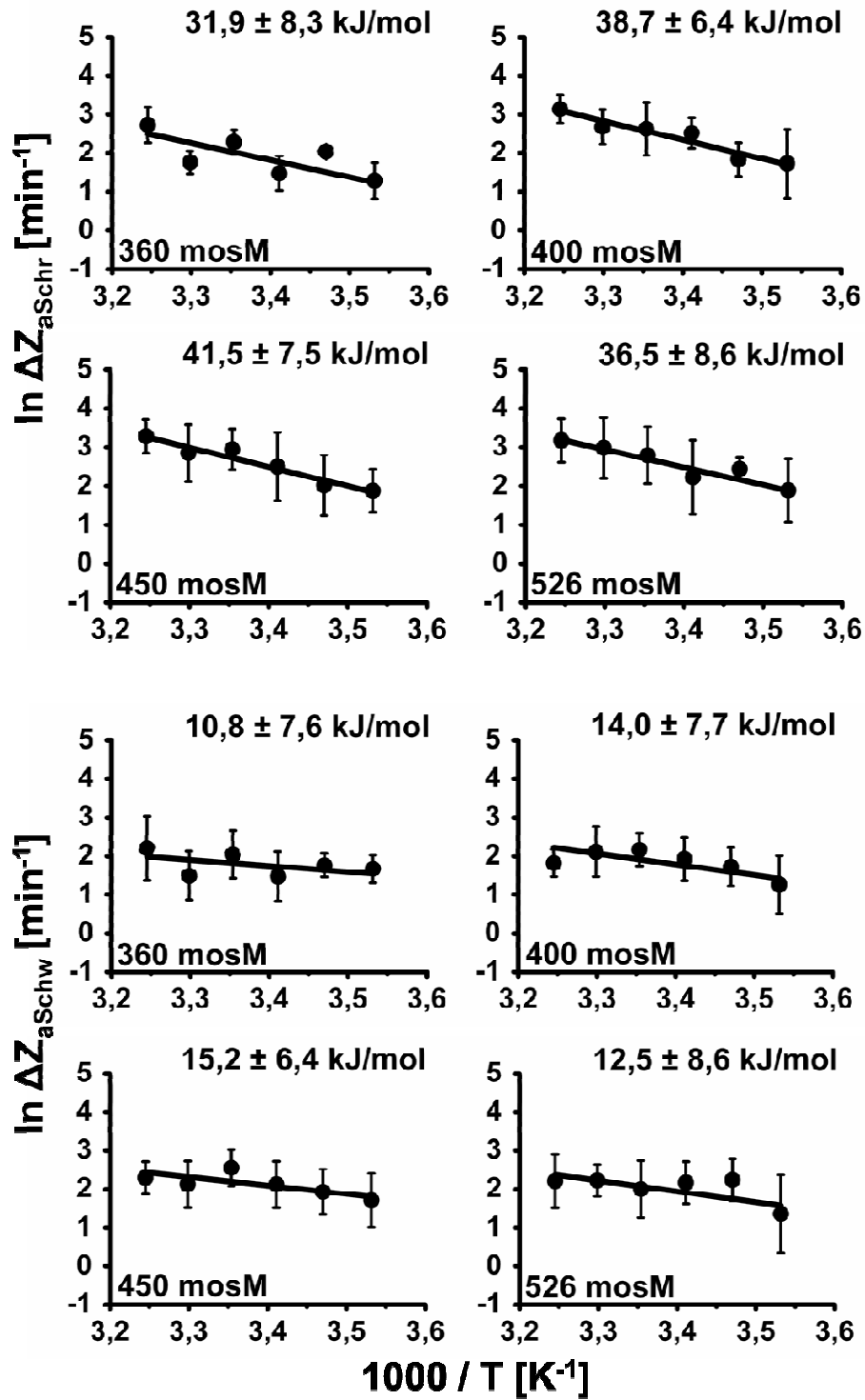


Abb. 33: Abbildungsbeschreibung siehe unten

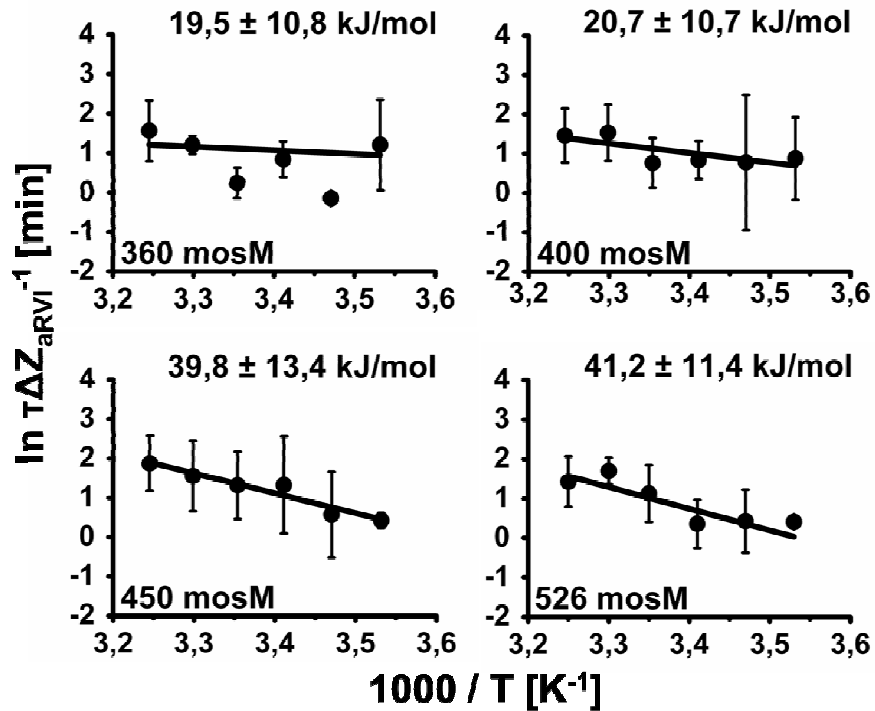


Abb. 33: Arrhenius Graphen der Wassertransportraten (Zellschrumpfen ΔZ_{aSchr} und Zellschwellen ΔZ_{aSchw}) sowie die Zeitkonstante τ des RVI ($\tau \Delta Z_{aRVI}$) aus den SAM-Messungen der Abbildung 19. Deutlich wurde, dass die Transportraten der Aquaporine nicht osmolaritätsabhängig waren, dagegen der RVI bis 400 mosM gering und ab 450 mosM stärker aktiviert wurde. Außerdem stellte sich heraus, dass die Transportraten des Zellschrumpfens und des Zellschwellens deutlich von einander unterschieden (Mittelwert \pm SD).

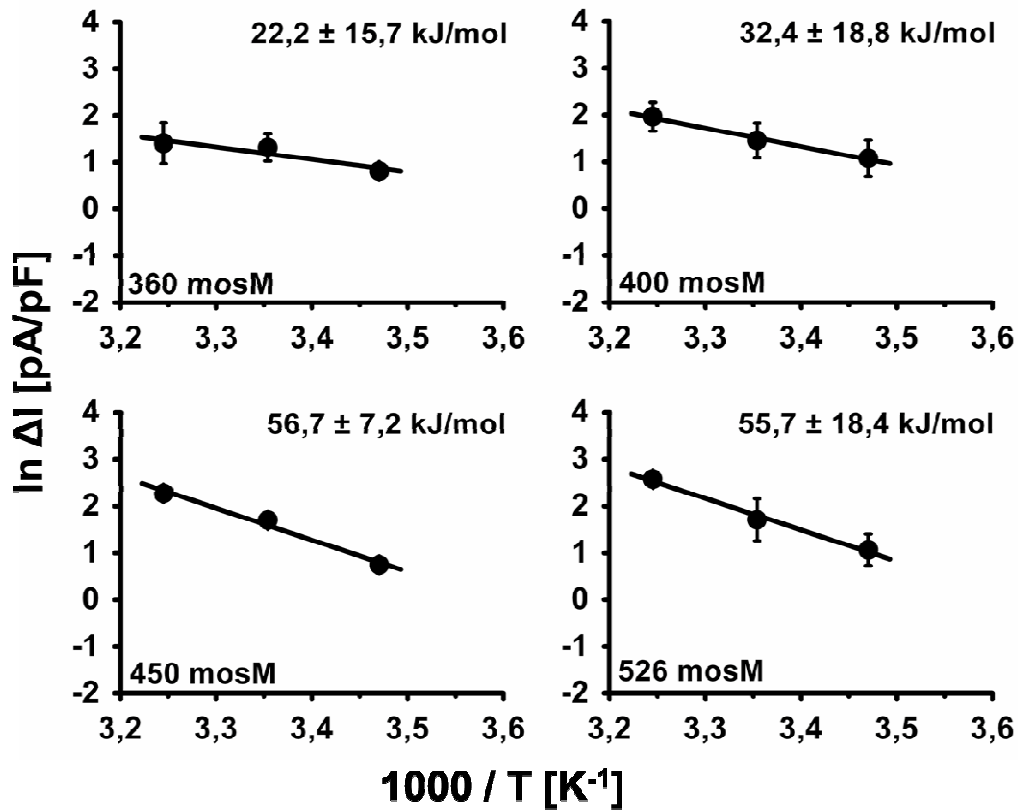


Abb. 34: Arrhenius Graphen der Na⁺-Stromdichten aus den *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitung der Abbildung 18. Deutlich wurde, dass der Na⁺-Transport der HICCs das Aktivitätsprofil des RVI widerspiegelt. Bis 400 mosM wurde eine geringe und ab 450 mosM eine stärkere Aktivierung des Na⁺-Transports detektiert (Mittelwert ± SD).

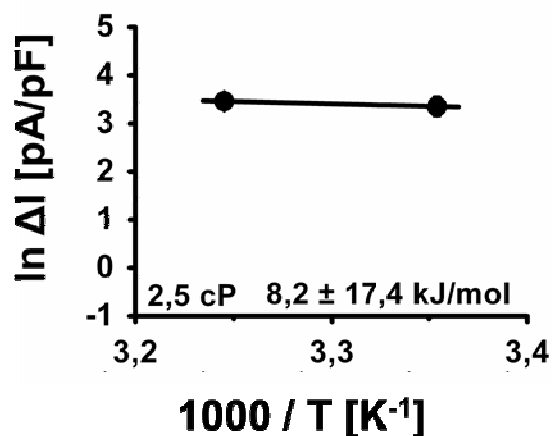


Abb. 35: Arrhenius Graph der Na⁺-Stromdichten aus den *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen gemessen bei einer intrazellulär erhöhten Viskosität von 2,5 cP (Mittelwert ± SD).

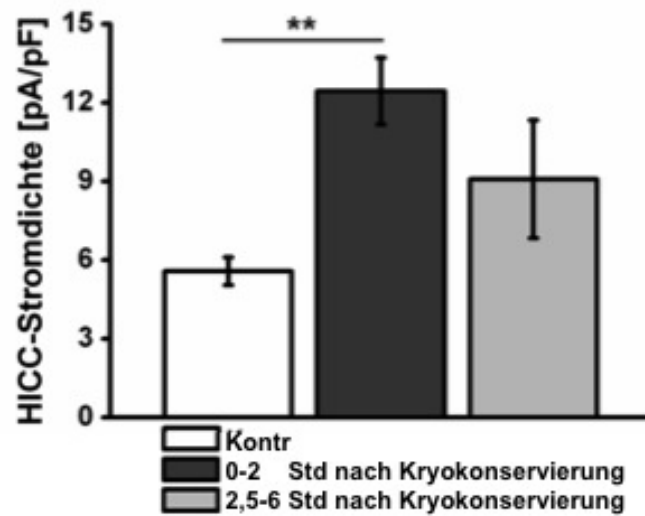


Abb. 36: HICC-Strömlichkeiten der HepG2 Zellen unter Kontrollbedingung (25°C, 400 mosM) und 0-2 Std und 2,5-6 Std nach Kryopräservation. Während sich 0-2 Std nach Kryopräservation die HICC-Strömlichkeiten signifikant erhöhte, ließ die HICC-Strömlichkeiten 6 Std später allmählich nach ($n = 4-7$, $** p < 0,01$, Mittelwert \pm SEM).

Tab. 5: Verwendete siRNA (Ziel-Sequenz s. Herstellerangaben)

Protein	Gen Symbol	Firma
neg. Kontrolle	<i>non-target</i>	Qiagen
α ENaC	Hs_SCNN1A_1	Thermo Scientific
TRPM2	Hs_TRPM2	Thermo Scientific
TRPM5	Hs_TRPM5_2	Thermo Scientific
Piezo1	Hs_Fam38A_2	Qiagen

Abkürzungsverzeichnis

A []a Extrazelluläre Ionen-Konzentration in mol/l

A. dest Aqua destillatum

E_a Aktivierungsenergie

Abb. Abbildung

A/D-Wandler Analog/Digital-Wandler

Akt Proteinkinase B

AQP Aquaporine

AVD *Apoptotic Volume Decrease*

AVP Arginin-Vasopressin

B bFGF *basic Fibroblast Growth Factor*

Bp Basenpaare

bzw. Beziehungsweise

C c Schallgeschwindigkeit

C-Terminus Karboxyl-Terminus

°C Celsius

°C/min Celsius pro Minute

Ca^{2+} Calcium-Ionen

cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat

cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

cm Zentimeter ($=10^{-2}m$)

cm^2 Zentimeter zum Quadrat

Cl^- Chlorid-Ionen

CO_2 Kohlenstoffdioxid

cP Zentipoise ($=10^{-2}P$)

D ρ Zelldichte

d.h. das heißt

DMEM *Dulbecco's modified eagle medium*

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

E E_a Aktivierungsenergie

E Umkehrpotential in Volt

ECGS/H *Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin*

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EGF *Endothelial Growth Factor*

$\alpha ENaC$ epithelialen Natriumkanals

ERK *Extracellular-Signal Regulated Kinases*

et al lat. und andere

-
- F** F Faraday-Konstante (=96478 C*mol/l)
FACS *Fluorescence Activated Cell Sorting*
FCS *Fluorescence correlation spectroscopy*
FKS Fetales Kalbsserum
FITC Fluoresceinisothiocyanat
- G** G418 Geneticin
Geschwindigkeitskonstante k
GHz Gigahertz (=10⁹Hz)
GΩ Gigaohm (=10⁹Ω)
- H** h Stunde
H⁺ Wasserstoff-Ionen
H₂O Wasser
HCO₃ Hydrogenkarbonat
HDMEC *Human Dermal Microvascular Endothelial Cell*
HeLa humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HepG2 Zelllinie der humanen hepatozellulären Tumorzelllinie
HICC *Hypertonicity Induced Cation Channel*
- I** []i Intrazelluläre Ionen-Konzentration in mol/l
I = dQ/dt Elektrischer Strom = delta Zeit
IKK IκB Kinase Komplex
IU/ml International Units pro Milliliter
- K** K⁺ Kalium-Ionen
kHz Kilohertz (=10³Hz)
kJ/mol Kilojoule pro mol
Ko Kontrolle
- L** l Liter
LJP *Liquid Junction Potential*
- M** M Mol/Liter
MEM *modified eagle medium*
Mg²⁺ Magnesium-Ionen
mg Milligram (=10⁻³g)
μg Mikrogramm (=10⁻⁶g)
μg/ml
min Minute
ml Milliliter (=10⁻³l)
μl Mikroliter (=10⁻⁶l)

mM Millimol/Liter ($=10^{-3}\text{M}$)

mm Millimeter ($=10^{-3}\text{m}$)

μm Mikrometer ($=10^{-6}\text{m}$)

mosM Milliosmolarität Mol/Liter ($=10^{-3}\text{osM}$)

M Ω Megaohm ($=10^6\Omega$)

mRNA *messenger* Ribonukleinsäure

ms Millisekunde ($=10^{-3}\text{sek}$)

mV Millivolt ($=10^{-3}\text{V}$)

N n Anzahl
 N-Terminus Amino-Terminus
 Na⁺ Natrium-Ionen
 NaH₂PO₄ Natriumhydrogenphosphat
 NEAA *Non-Essential Amino Acid*
 ng Nanogramm ($=10^{-9}\text{g}$)
 nm Nanometer ($=10^{-9}\text{m}$)
 ns Nasosekunde ($=10^{-9}\text{sek}$)

O OD optische Dichte
 osM Osmolarität Mol/Liter

P P *pocket*
 p Wahrscheinlichkeit
 pA Pikoampere ($=10^{-12}\text{A}$)
 pA/pF Pikoampere pro Pikofarad
 PBS *phosphate buffered saline*
 PCR Polymerasenketten Reaktion

R R Gaskonstante ($=8,314\text{J/mol}\cdot\text{K}$)
 RNA Ribonukleinsäure
 rpm *rounds per minute*
 RT Raumtemperatur
 RT-PCR Reverse Transkriptase Polymerasenketten Reaktion
 RVI *Regulatory Volume Increase*
 RVD *Regulatory Volume Decrease*

S SAC *Stretch-Activated Ion Channel*
 SAM *Scanning Acoustic Microscopy*
 SASAM *Saarländisches Scanning Acoustic Microscopy*
 sek, Std Sekunde, Stunde
 SEM *Standard Error of the Mean*
 SD Standardabweichung
 Sgk1 Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
 s. siehe
 siRNA *small interfering RNA*

s.o. siehe oben
s.u. siehe unten

T T thermodynamische Temperatur in Kelvin

τ Zeitkonstante tau
Tab. Tabelle
 T_N Eisnukleationstemperatur
TM Transmembrandomäne
TNF α Tumornekrosefaktor α
TRP transienter Rezeptor Potential Kanal
TRPA -ANKTM1
TRPC -klassischer Kanal
TRPM -Melastatin
TRPML -Mucolipin
TRPN -NOMPC
TRPP -Polycystin
TRPV -Vanilloid
TRAAK *TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺-channel*
TREK *TWIK-related K⁺-channel*

U u.a. unter anderem

V (v/v) Volumenanteil einer Komponente in einem Stoffgemisch
V1A-Rezeptor Vasopressin 1A-Rezeptor
V2-Rezeptor Vasopressin 2-Rezeptor

W WT Wildtyp

Z Z Ladungswertigkeit des betreffenden Ions
 Z_a Akustische Impedanz
z.B. zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- Agre, P., Nielsen, S., & Ottersen, O. P. (2004). Towards a molecular understanding of water homeostasis in the brain. *Neuroscience*, 129(4), 849–50. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.10.001
- Al-Fageeh, M. B., & Smales, C. M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *The Biochemical journal*, 397(2), 247–59. doi:10.1042/BJ20060166
- Al-Habori, M. (2001). Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 33(9), 844–64.
- Anchordoguy, T.J. et al. (1991), Insights into the Cryoprotective Mechanism of Dimethyl Sulfoxide for Phospholipid Bilayers. *CRYOBIOLOGY* 28, 467-473
- Baumgarten und Feher (2001). Osmosis and Regulation of Cell Volume. *Cell Physiology*
- Becker, D., Blase, C., Bereiter-Hahn, J., & Jendrach, M. (2005). TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *Journal of cell science*, 118(Pt 11), 2435–40. doi:10.1242/jcs.02372
- Blank, M. E., & Ehmke, H. (2003). Aquaporin-1 and HCO₃⁻-Cl⁻ transporter-mediated transport of CO₂ across the human erythrocyte membrane. *The Journal of physiology*, 550(Pt 2), 419–29. doi:10.1113/jphysiol.2003.040113
- Böhmer, C. et al. (2000), The shrinkage-activated Na⁽⁺⁾ conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. *Cell Physiol Biochem*. 10.4: 187-94
- Böhmer, C. and Wehner, F., (2001) The epithelial Na⁺ channel (ENaC) is related to the hypertonicity-induced Na⁺ conductance in rat hepatocytes. *FEBS Letters* 494 (2001) 125-128
- Bondarava, M., Li, T., Endl, E., & Wehner, F. (2009). alpha-ENaC is a functional element of the hypertonicity-induced cation channel in HepG2 cells and it mediates proliferation. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 458(4), 675–87. doi:10.1007/s00424-009-0649-z
- Burg, M.,(2000) Cellular Physiology and Biochemistry Macromolecular Crowding as a Cell Volume Sensor. *Cell Physiol Biochem* 251–256.
- Carbrey, J. M., & Agre, P. (2009). Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handbook of experimental pharmacology*, (190), 3–28. doi:10.1007/978-3-540-79885-9_1

- Chan, S. and Chan, W., 2010, *Physics of Proteins: An Introduction to Molecular Biophysics (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering)*, Springer
- Charron, J. B., Breton, G., Badawi, M., & Sarhan, F. (2002). Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis. *FEBS letters*, 517(1-3), 129–32.
- Charron J. B., Francois Ouellet, Mélanie Pelletier, Jean Danyluk, Cédric Chauve and Fathey Sarhan* De (2005) Identification, Expression, and Evolutionary Analyses of Plant Lipocalins. *Plant Physiology*, 139, 2017-2028
- Chaveiro, a, Liu, J., Engel, B., Critser, J. K., & Woelders, H. (2006). Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*, 53(3), 349–59. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.08.005
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517–24. doi:10.1038/nature02196
- Conner, M. T., Conner, A. C., Bland, C. E., Taylor, L. H. J., Brown, J. E. P., Parri, H. R., & Bill, R. M. (2012). Rapid aquaporin translocation regulates cellular water flow: mechanism of hypotonicity-induced subcellular localization of aquaporin 1 water channel. *The Journal of biological chemistry*, 287(14), 11516–25. doi:10.1074/jbc.M111.329219
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., ... Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 55–60. doi:10.1126/science.1193270
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J. S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K. S., Patapoutian, A. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*, 483(7388), 176–81. doi:10.1038/nature10812
- Derry, J. M., Kerns, J. a, & Francke, U. (1995). RBM3, a novel human gene in Xp11.23 with a putative RNA-binding domain. *Human molecular genetics*, 4(12), 2307–11.
- Dijkink, L. et al. (2002), The epithelial sodium channel (ENaC) is intracellularly located as a tetramer. *Pflugers Arch.* 444.4 549-55.
- Dong, J., Malsam, J., Bischof, J. C., Hubel, A., & Aksan, A. (2010). Spatial distribution of the state of water in frozen mammalian cells. *Biophysical journal*, 99(8), 2453–9. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.035
- Dooley, R., Harvey, B. J., & Thomas, W. (2012). Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. *Molecular*

and cellular endocrinology, 350(2), 223–34.
doi:10.1016/j.mce.2011.07.019

- Ebertz, S. L., & McGann, L. E. (2002). Osmotic parameters of cells from a bioengineered human corneal equivalent and consequences for cryopreservation. *Cryobiology*, 45(2), 109–17. Retrieved from
- Ecelbarger, C. a, Kim, G. H., Terris, J., Masilamani, S., Mitchell, C., Reyes, I. Knepper, M. a. (2000). Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*, 279(1), F46–53. Retrieved from
- Edashige, K., Ohta, S., Tanaka, M., Kuwano, T., Valdez, D. M., Hara, T., Kasai, M. (2007). The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biology of reproduction*, 77(2), 365–75. doi:10.1095/biolreprod.106.059261
- Elias, C. L., Xue, X. H., Marshall, C. R., Omelchenko, a, Hryshko, L. V, & Tibbits, G. F. (2001). Temperature dependence of cloned mammalian and salmonid cardiac Na(+)/Ca(2+) exchanger isoforms. *American journal of physiology. Cell physiology*, 281(3), C993–C1000.
- Fotiadis, D., Suda, K., Tittmann, P., Jenö, P., Philippsen, A., Müller, D. J., ... Engel, A. (2002). Identification and Structure of a Putative Ca²⁺-binding Domain at the C Terminus of AQP1. *Journal of Molecular Biology*, 318(5), 1381–1394. doi:10.1016/S0022-2836(02)00143-2
- Gilmore, J. a, McGann, L. E., Liu, J., Gao, D. Y., Peter, a T., Kleinhans, F. W., & Critser, J. K. (1995). Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 53(5), 985–95.
- Grondin, M., Hamel, F., Averill-Bates, D. a, & Sarhan, F. (2009). Wheat proteins enhance stability and function of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes. *Cell transplantation*, 18(1), 79–88.
- Hazel, J. R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual review of physiology*, 57(94), 19–42. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.000315
- Hunter, J., Bernard, a, Fuller, B., McGrath, J., & Shaw, R. W. (1992). Plasma membrane water permeabilities of human oocytes: the temperature dependence of water movement in individual cells. *Journal of cellular physiology*, 150(1), 175–9. doi:10.1002/jcp.1041500123
- Inoue, T., Nonoguchi, H., & Tomita, K. (2001). Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovascular research*, 51(3), 470–80.

- Jensen, M. Ø., Park, S., Tajkhorshid, E., & Schulten, K. (2002). Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 6731–6. doi:10.1073/pnas.102649299
- Jung, S.J et al. (1994), Molecular Structure of the Water Channel through Aquaporin CHIP. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol 269, No . 20, Issue of May 20, pp. 14648-14654*
- Kellenberger, S., & Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiological reviews*, 82(3), 735–67. doi:10.1152/physrev.00007.2002
- Kida, H, Miyoshi, T, Manabe, K, Takahashi, N, Konno, T, Ueda, S, Chiba, T, Shimizu, T, Okada, Y., Morishima, S (2005). Roles of aquaporin-3 water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line. *The Journal of membrane biology* 208 (1) 55-64
- Kuzmany, A., Havlicek, V., Wrenzycki, C., Wilkening, S., Brem, G., & Besenfelder, U. (2011). Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology*, 75(3), 482–94. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.016
- Kwiatkowska, A., Lewandowska, M., Borovičková, L., Slaninová, J., Lammek, B., & Prahl, A. (2013). Design, synthesis and structure-activity relationship of new arginine vasopressin analogues containing proline derivatives in position 2. *Chemical biology & drug design*, 81(3), 420–8. doi:10.1111/cbdd.12093
- Leibo S. P. and Mazur, P. (1971) The Role of Cooling Rates in Low-Temperature Preservation. *CHYCIBIOLOGY*, 8, 447-452
- Li, Y., Wang, H., Pan, T., (2013) Intracellular ice formation (IIF) during freeze–thaw repetitions <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2013.04.036>
- Li, T., ter Veld, F., Nürnberger, H. R., & Wehner, F. (2005). A novel hypertonicity-induced cation channel in primary cultures of human hepatocytes. *FEBS letters*, 579(10), 2087–91. doi:10.1016/j.febslet.2005.02.060
- Liu, J., Christian, J. a, & Critser, J. K. (2002). Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability. *Cryobiology*, 44(3), 258–68.
- Loffing, J., & Korbmacher, C. (2009). Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 458(1), 111–35. doi:10.1007/s00424-009-0656-0
- Lovelock, J. E., & Hill, M. (1953). HET MECHANISM OF THE P R O T E C T I V E ACTION OF GLYCEROL AGAINST HAEMOLYSIS, 11.

- Mazur, P. (1963), Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of General Physiology*
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology*, 247(3 Pt 1), C125–42.
- Mazur, P., et al. (2005), Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology* 51 (2005) 29–53
- Migliati, E., Meurice, N., Dubois, P., Fang, J. S., Somasekharan, S., Beckett, E. Yool, A. J. (2009). Inhibition of Aquaporin-1 and Aquaporin-4 Water Permeability by a Derivative of the Loop Diuretic Bumetanide Acting at an Internal Pore-occluding Binding Site, 76(1), 105–112.
doi:10.1124/mol.108.053744.brain-barrier
- Minke, B., & Cook, B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological reviews*, 82(2), 429–72. doi:10.1152/physrev.00001.2002
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(272), re3.
doi:10.1126/stke.2722005re3
- Muldrew, K. (2008) The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *journal Cryobiology*. 57/3 251-6
- Naftalin, R. J. (1997). Evidence from studies of temperature-dependent changes of D-glucose, D-mannose and L-sorbose permeability that different states of activation of the human erythrocyte hexose transporter exist for good and bad substrates. *Biochimica et biophysica acta*, 1328(1), 13–29.
- Newton, H. et al (1999), Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 27-33
- Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O., & Fujita, J. (1997). A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *The Journal of cell biology*, 137(4), 899–908.
- Numata, T., Sato, K., Christmann, J., Marx, R., Mori, Y., Okada, Y., & Wehner, F. (2012). The C splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation. *The Journal of physiology*, 590(Pt 5), 1121–38.
doi:10.1113/jphysiol.2011.220947
- Oiso, Y. et al. (2013), Treatment of Neurohypophyseal Diabetes Insipidus. *JCEM*, 98: 3958-3967

- Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., & Wang, J. (2001). Topical Review Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *Physiology*, *d*, 3–16.
- Okada, Y. and E. Maeno (2001). Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* 130.3, 377-83
- Olsen,H. (2001). Untersuchung der Signalkaskade der volumenaktivierten Na⁺-Leitfähigkeit von Ratten-Hepatozyten. Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität- Bochum.
- Olsen, H., (2004) Signalling Events Evoked by Hypertonic Stress: Restoration of Cell Volume and Cell Shape in Primary Rat Hepatocytes (Dissertation)
- Panayiotidis, M. I., Bortner, C. D., & Cidlowski, J. a. (2006). On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na⁺/K⁺-ATPase please stand up. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 187(1-2), 205–15. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01562.x
- Pegg, D. E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 368, 39–57. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_3
- Plettenberg, S. (2013) Zelluläre Volumenregulation als Qualitätsparameter der Kryokonservierung sowie zur Identifizierung der molekularen Bestandteile des hyperton aktivierten Kationen Kanals (Dissertation)
- Ragoonanan, V., Hubel, A., & Aksan, A. (2010). Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. *Cryobiology*, 61(3), 335–44. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.10.160
- Rossier (2002)
- Rotin, D., & Staub, O. (2011). Role of the ubiquitin system in regulating ion transport. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 461(1), 1–21. doi:10.1007/s00424-010-0893-2
- Schmitt, B. M., & Koepsell, H. (2005). Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2. *The Journal of biological chemistry*, 280(26), 24481–90. doi:10.1074/jbc.M414550200
- Schrier, R. W. und Wang, W. (2005). Krankheitsmechanismen: Akutes Niereversagen und Sepsis. *Journal Nephrology*
- Seki, S. and Mazur, P. (2012), Ultra-Rapid Warming Yields High Survival of Mouse Oocytes Cooled to -196°C in Dilutions of a Standard Vitrification Solution. *PLoS ONE* 7(4): e36058. doi:10.1371/journal.pone.0036058

- Sesti, F., Nizzari, M., & Torre, V. (1996). Effect of changing temperature on the ionic permeation through the cyclic GMP-gated channel from vertebrate photoreceptors. *Biophysical journal*, *70*(6), 2616–39. doi:10.1016/S0006-3495(96)79832-6
- Sidebottom, C., Buckley, S., Pudney, P., Twigg, S., Jarman, C., Holt, C., Telford, J., McArthur, A., Worrall*, D., Hubbard*, R., Lillford, P. (2000) Heat-stable antifreeze protein from grass. *Nature*, *406*
- Solomon, A.K., (1972) Properties of water in red cell and synthetic membranes. Plenum Press
- Spindler, R., Rosenhahn, B., Hofmann, N., & Glasmacher, B. (2012). Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology*, (February). doi:10.1016/j.cryobiol.2012.02.008
- Sutton, R. L. (1991). Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, *87*(1), 101. doi:10.1039/ft9918700101
- Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., and Kjellbom, P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* *439*, 688–694.
- van den Berg B, Wain R, Dobson CM, Ellis RJ (August 2000). Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. *EMBO J.* *19* (15): 3870–5. doi:10.1093/emboj/19.15.3870
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry*, *76*, 387417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
- Verkman, A S. et al. (2000), Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice. *Experimental Physiology*, *858*, 233S-241S.
- Verkman, A S. (2005), More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of cell science*, *118*(Pt15), 322532. doi:10.1242/j.cs.02519
- Wang, W., & Ben, R. N. (2004). Upregulation and protein trafficking of aquaporin-2 attenuate cold-induced osmotic damage during cryopreservation. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, *40*(3-4), 67–70. doi:10.1290/1543-706X(2004)040<0102:IOCRFU>2.0.CO;2
- Wang, Z. (2004). Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, *448*(3), 274–86. doi:10.1007/s00424-004-1258-5

- Wehner, F., Sauer, H., & Kinne, R. K. (1995). Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture. *The Journal of general physiology*, 105(4), 507–35.
- Wehner, F. (1998). Cell volume-regulated cation channels. *Contrib.Nephrol.* 123 8-20.
- Wehner, F. and Tinel H.. (2000), Osmolyte and Na⁺ transport balances of rat hepatocytes as a function of hypertonic stress. *Pflugers Arch.* 441.1 12-24
- Wehner, Frank, Shimizu, T., Sabirov, R., & Okada, Y. (2003). Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Letters*, 551(1-3), 20–24. doi:10.1016/S0014-5793(03)00868-8
- Wehner, Frank. (2006). Cell volume-regulated cation channels. *Contributions to nephrology*, 152, 25–53. doi:10.1159/000096315
- Wehner, F. et al. (2006) Hypertonicity- induced cation channels. *Acta Physiol.* 187 21-25
- Wehner, F., Bondarava, M., ter Veld, F., Endl, E., Nürnberger, H. R., & Li, T. (2006). Hypertonicity-induced cation channels. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 187(1-2), 21–5. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01561.x
- Willis, S. (1972). The Possible Role of Cellular K for Survival of Cells at low Temperature, *Cryobiology*, 366, 351–366.
- Worman, H. J., & Field, M. (1985). *Membrane Biology* 9, 239, 233–239.
- Wowk, B. (2010). Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 60(1), 11–22. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.05.007
- Xiao, R. and Shawn, X.Z. (2011) Mechanosensitive Channels : In Touch with Piezo, 20(21). doi:10.1016/j.cub.2010.09.053
- Zeuthen, T. (2010). Water-transporting proteins. *The Journal of membrane biology*, 234(2), 57–73. doi:10.1007/s00232-009-9216-y

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben:

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Frank Wehner für die Vergabe des spannenden Themas dieser Arbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund und die ausgezeichnete und intensive Betreuung sowie die jederzeit gewährte wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

Für die Übernahme des Koreferats und die finanzielle Unterstützung sowie die sehr hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Philippe Bastiaens.

Bei den Kooperationspartnern des „Kryo-Projektes“ danke ich Herrn Prof. Dr. Günter R. Fuhr und seinen Arbeitsgruppen des Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert. Die zahlreichen Zusammenkünfte halfen sehr, sich schnell in die Kryobiologie einzuarbeiten.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Jens Christmann und Dr. Jan Hübinger, die jederzeit für Problemlösungen und Hilfestellungen bereit waren.

Den technischen Mitarbeiterinnen des Instituts für molekulare Physiologie, ganz besonders Frau Gabriela Beetz danke ich für die stets hilfsbereite und angenehme Zusammenarbeit.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei allen Mitgliedern des Instituts für die schöne Zeit, die gute und freundliche Arbeitsatmosphäre und für die großzügige Unterstützung bedanken.

Meinen Freunden bin ich von Herzen dankbar, vor allem danke ich Nilgün Gedik für die Unterstützung im wissenschaftlichen und im nicht-wissenschaftlichen Alltag.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir während meines Studiums und bei der Vollendung dieser Arbeit stets zur Seite standen und mir viel Kraft gegeben haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um drei in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Referent: Prof. Dr. Frank Wehner, Max-Planck-Institut, Dortmund

Koreferent: Prof. Dr. Philippe Bastiaens, Max-Planck-Institut, Dortmund

Dortmund, den 21.01.2014

(Unterschrift)