

Dissertation

**vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Doktor rer. nat.
an der Fakultät Chemie der Technischen Universität Dortmund**

**Zelluläre Volumenregulation
als Qualitätsparameter der Kryokonservierung
sowie zur Identifizierung der
molekularen Bestandteile des
hyperton aktivierten Kationen Kanals**

von

Sandra Plettenberg-Halac

**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. Phillippe Bastiaens, Max-Planck-Institut, Dortmund

Dortmund 2012

Dissertation

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

Cell Volume Regulation as a Quality Parameter for Cryopreservation for the identification of the Molecular Correlates of Hypertonicity Induced Cation Channels

**submitted by
Sandra Plettenberg-Halac**

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

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

Second Supervisor: Prof. Dr. Phillipe Bastiaens, Max-Planck-Institut, Dortmund

Dortmund 2012



- für Benjamin

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung.....	1
1.1	Kryokonservierung.....	1
1.1.1	Gefrieren und Auftauen von Zellen.....	2
1.1.2	Kryoprotektiva.....	4
1.1.2.1	Membrangängige Kryoprotektiva.....	5
1.1.2.2	Nicht membrangängige Kryoprotektiva.....	6
1.1.3	Zell- Zell Adhäsion und Sphäroide.....	7
1.1.4	Zelluläre Volumenregulation als Parameter für erfolgreiche Kryokonservierung.....	8
1.2	Das Prinzip zellulärer Volumenregulation.....	9
1.2.1	Die physiologische Bedeutung des Zellvolumens und seiner Regulation in der Leber.....	9
1.2.2	Mechanismen der Volumenregulation.....	10
1.2.3	Mechanismen der zellulären Volumenregulation als Teil von Proliferation und Apoptose.....	13
1.3	Das hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	16
1.4	Der hyperten induzierte Kationen Kanal in humanen Hepatozyten.....	17
1.4.1	Der epitheliale Natriumkanal.....	18
1.4.2	TRP Kanäle.....	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	25
2.	Material und Methoden.....	27
2.1	Primäre humane Hepatozyten.....	27
2.1.1	Präparation der primären Hepatozyten.....	27
2.1.2	Kultivierung der primären Hepatozyten.....	29
2.1.3	Kryokonservierung der primären Hepatozyten mit DMSO....	30
2.1.3.1	Hanging droplet Sphäroide.....	32

2.1.3.2	Kryopkonservierung der primären Hepatozyten mit DMSO + Trehalose mit Hilfe der Elektroporation.....	33
2.1.4	Vitalitätsbestimmung nach der Kryokonservierung durch die Trypan Blau Ausschlussfärbung.....	34
2.1.5	Durchflusszytometrie.....	35
2.1.5.1	Versuchsdurchführung.....	35
2.1.5.2	Auswertung.....	35
2.1.6	<i>Patch Clamp</i> Technik.....	36
2.1.7	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.1.7.1	Präparation von cDNA.....	38
2.1.7.2	Quantitative <i>Real-time</i> PCR.....	38
2.2	HCC Zellen.....	39
2.2.1	Präparation von HCC Zellen.....	39
2.2.2	Kultivierung von HCC Zellen.....	40
2.3	HepG2 Zellen	40
2.3.1	Kultivierung von HepG2 Zellen.....	40
2.3.2	Reverse Transfektion von HepG2 Zellen.....	41
2.4	Zeitaufgelöste akustische Mikroskopie.....	44
2.4.1	Messung des Zellvolumens an primären humanen Hepatozyten und HCC Zellen.....	44
2.4.1.1	Versuchsaufbau.....	44
2.4.1.2	Versuchsdurchführung.....	48
2.4.2	SASAM Screening mit HepG2 Zellen.....	49
2.4.2.1	Kombination von SASAM und Cell ^M	49
2.4.2.2	Versuchsdurchführung des Screenings.....	52
2.4.3	Datenerfassung.....	55
2.5	Statistische Analyse.....	55
3.	Ergebnisse.....	56
3.1	Primäre Hepatozyten.....	56
3.1.1	Kryokonservierung der primären Hepatozyten.....	56
3.1.2	Zeitaufgelöste akustische Mikroskopie.....	58

3.1.2.1	Kryokonservierung mit DMSO.....	58
3.1.2.1.1	Kryokonservierung mit DMSO- Kryoröhrchen.....	61
3.1.2.1.2	Kryokonservierung mit DMSO- IBMT Multi-Well Substrat	64
3.1.2.2	Kryokonservierung mit DMSO + Trehalose.....	66
3.1.2.2.1	Kryoröhrchen.....	66
3.1.2.2.2	IBMT Multi-Well Substrat.....	70
3.1.2.2.3	Vergleich des RVI und der isotonen Nachperiode...	72
3.1.2.3	Sphäroide.....	75
3.1.3	<i>Whole Cell Patch-Clamp</i>	77
3.1.4	Durchflusszytometrie.....	78
3.1.5	Quantitative <i>Real-time</i> PCR.....	81
3.2	Zellen des hepatozellulären Karzinoms.....	83
3.2.1	Akustische Mikroskopie.....	83
3.3	HepG2 Zellen.....	85
3.3.1	SASAM Screening.....	85
4.	Diskussion.....	100
4.1	Kryokonservierung.....	100
4.1.1	Kryokonservierung von humanen Hepatozyten.....	101
4.1.2	Vitalität der primären humanen Hepatozyten nach der Kryokonservierung: das konventionelle Kryoröhrchen gegenüber dem IBMT Fraunhofer Multi- Well- Kryosubstrat..	101
4.1.3	HICC Aktivierung als Parameter für die Vitalität nach der Kryokonservierung.....	105
4.2	Mechanismen der zellulären Volumenregulation als Teil von Proliferation und Apoptose?.....	110
4.3	Molekulare Identifikation des HICC.....	112
4.3.1	SASAM Screening.....	112
4.3.1.1	Methodischer Ansatz.....	113
4.3.1.2	Auswertung der Daten.....	119

4.3.2	Mögliche molekulare Partner des HICC.....	120
4.3.2.1	NHE1 und NKCC1.....	120
4.3.2.2	ENaC.....	121
4.3.2.3	TRP Kanäle.....	123
4.3.2.3.1	TRPC Kanäle.....	123
4.3.2.3.2	TRPM Kanäle.....	124
4.3.2.3.3	TRPV Kanäle.....	126
4.3.2.3.4	TRPML Kanäle.....	127
4.3.2.3.5	TRPP1 (PKD1).....	128
4.3.2.3.6	Piezo1.....	129
4.3.3	Bewertung der Screening Ergebnisse.....	130
4.4	Ausblick.....	135
5.	Zusammenfassung.....	137
6.	Summary.....	141
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	144
8.	Tabellenverzeichnis.....	147
9.	Abbildungsverzeichnis.....	148
10.	Referenzen.....	153
11.	Anhang.....	177
	Danksagung	187
	Erklärung	189

1. Einleitung

1.1 Kryokonservierung

Kryos kommt aus dem Griechischen und bedeutet Kälte. Die dauerhafte Konservierung von biologischen Materialien durch die Lagerung bei sehr tiefen Temperaturen wird als Kryokonservierung bezeichnet. In großem Maßstab findet diese Methode Anwendung in der Biochemie. Der besondere Vorteil besteht darin, dass die Proben nahezu unbegrenzt haltbar sind und nach dem Auftauen wieder die volle Funktionalität erreicht werden kann, da durch die Kühlung auf kryogene Temperaturen von -130°C Stoffwechselprozesse und chemische Reaktionen nahezu eingestellt sind.

Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden erste Versuche der Kryokonservierung an Froschspermien (Lyet & Hodapp, 1938), später auch an humanen Spermien (Polge et al., 1949) durchgeführt. Heute ist die Kryokonservierung besonders in der Reproduktionsmedizin ein fest etabliertes, gut funktionierendes System, um Eizellen, Spermien oder Embryonen für lange Zeit ohne schädigende Einflüsse zu konservieren.

Insbesondere die Kryokonservierung von diploiden Einzelzellen ist mittlerweile recht gut etabliert, hingegen stellt die Kryokonservierung von Zellverbänden oder gar Geweben noch ein Problem dar. Gerade im Hinblick auf die sehr begrenzten Zeitfenster für eine Organtransplantation, wäre die Möglichkeit einer Lagerung ein enormer Fortschritt. Ein geeignetes Gewebe könnte, wenn gerade kein Empfänger bereit steht, gelagert und bei Bedarf transplantiert werden (Terry et al., 2006).

Durch die dreidimensionale Struktur verhalten sich Gewebe allerdings ganz anders als Einzelzellen. Die große Anzahl unterschiedlicher Zelltypen mit begrenzter Wärmeleitfähigkeit innerhalb des Gewebes führt zu Komplikationen (Acker et al., 1999). Für eine erfolgreiche Kryokonservierung stellt der Wasserfluss einen entscheidenden Faktor dar, dies ist aber in Zellen tief innerhalb eines Gewebes problematisch (Mazur et al., 1968). Zell-Zell-Kontakte und die Einzel-Zellen selbst, können durch die Entstehung von extra- und intrazellulären Eiskristallen zerstört werden, was dann zur Fragmentierung des Gewebes führt.

So genannte Sphäroide, welche entstehen, wenn die Anziehungskräfte zwischen Zellen größer sind als zur Substratoberfläche (Holtfreter, J. 1947), können bei der weiteren Entwicklung von Protokollen zur Kryokonservierung von Geweben helfen.

1.1.1 Gefrieren und Auftauen von Zellen -ohne Kryoprotektivum

Um die Vorgänge beim Gefrieren von Zellen zu beschreiben, ist das Verhalten von Wasser zu betrachten. Neben den mechanischen Schäden durch die Bildung von Eiskristallen können beim Einfrieren von Zellen osmotisch-bedingte Schäden entstehen.

Eine Erniedrigung der Temperatur unter 0°C löst im Wesentlichen drei Prozesse aus: die Bildung von Eiskristallen, die Dehydrierung der Zelle und der Konzentrationsanstieg der gelösten Stoffe (Der Experimentator Zellkultur, 2007).

Da das umgebende Medium ein größeres Volumen als der Intrazellulärraum hat, ist die Wahrscheinlichkeit einer Nukleation dort höher (Körber, 1991). Durch eine gestartete Eiskristallisation im extrazellulären Raum die extrazelluläre Osmolarität erhöht, beginnt Wasser aus der Zelle auszuströmen. Die Osmolarität kann in dieser

Abkühlungsphase in der Zelle so stark ansteigen, dass die Zelle bis auf ein inaktives Restvolumen nahezu vollständig dehydriert (Sputtek, 1996b). Dies kann (ohne die Verwendung eines Kryoprotektivums) zur Denaturierung von Proteinen führen, in dessen Folge die Zelle stirbt (Wolfe & Bryant, 2001). Versucht man die dramatischen und meist letalen Zellschäden aufgrund der Osmolaritätserhöhung beim langsamen Einfrieren durch ein schnelleres Abkühlen und somit eine schnellere Eisbildung zu verhindern, so wird man Schäden durch intrazellulär gebildete Eiskristalle beobachten (Mazur, 1968). Eine niedrige Kühlrate, kombiniert mit einem anschließenden schnellen Tauprozess, zeigte die höchste Überlebensrate der untersuchten Zellen. Zu niedrige, wie auch zu hohe Kühlraten verschlechtern das Ergebnis. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

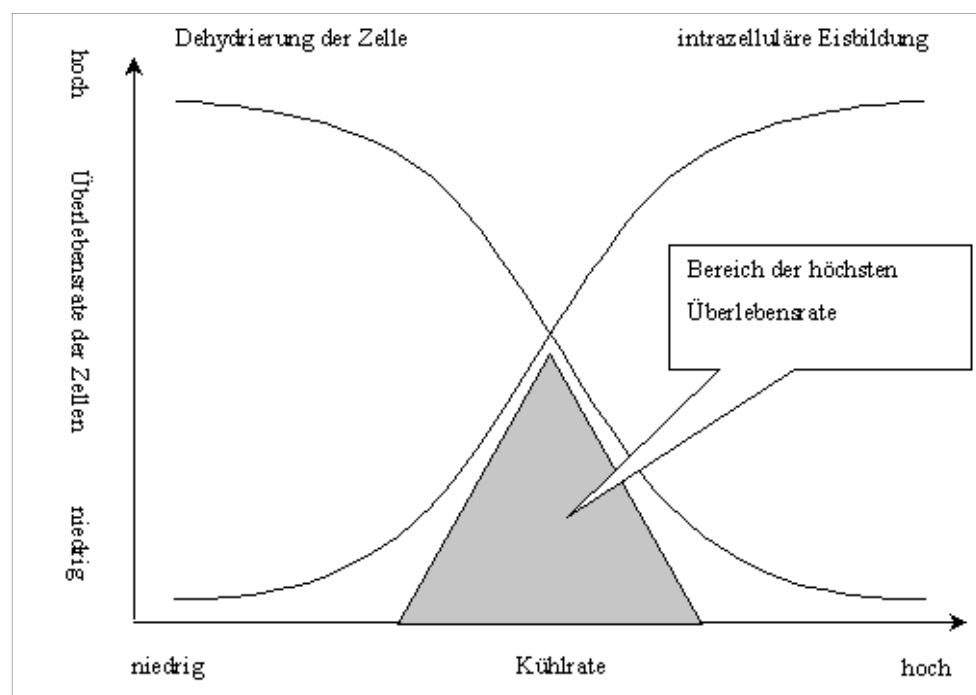


Abbildung 1.1

Vereinfachtes Schema der Zusammenhänge von Kühlrate und Überlebensraten der Zellen (nach Mazur, 1968)

Die Eisbildung beginnt auch bei raschem Abkühlen extrazellulär. Da jedoch die eutektische Temperatur schneller erreicht wird und die Zellmembran nicht unendlich schnell die Intrazellulärflüssigkeit diffundieren lassen kann, befindet sich zu diesem Zeitpunkt noch ausreichend Wasser in der Zelle. Die Folge wäre die Bildung von Eiskristallen im Inneren der Zelle und die Gefahr von mechanischen Schäden an den Zellorganellen. Es gilt also bei Einfriervorgängen von Zellen die Kühlrate zu finden, bei der es zu keiner übermäßigen Dehydrierung und damit Osmolaritätssteigerung im Inneren der Zelle kommt, bei der aber gleichzeitig keine gesteigerte intrazelluläre Eisbildung zu befürchten ist (Sputtek, 1997; Jetter, 1998).

1.1.2 Kryoprotektiva

Kryoprotektiva werden vor dem Einfrieren zu den Zellen gegeben, um die Vitalität der Zellen während der Kryokonservierung zu erhalten. Grundsätzlich wird zwischen membrangängigen und nichtmembrangängigen Kryoprotektiva unterschieden. Es wird vermutet, dass Kryoprotektiva die chemische Aktivität von intrazellulärem Wasser reduzieren, die zellulären Strukturen stabilisiert werden und die Viskosität des Zytoplasmas zunimmt und somit eine veränderte Einfrierkinetik aufweist (z.B. die Gefriertemperatur wird erniedrigt und die Größe von Eiskristallen reduziert) (Mazur, P., 1984; Dong, J. et al., 2010).

1.1.2.1 membrangängige Kryoprotektiva

- Kryoprotektion mit Dimethylsulfoxid

Einfrieren und Auftauen von lebenden Zellen ohne die Zugabe eines Gefrierschutzmittels ist aus den in Abschnitt 1.2.1 genannten Gründen kaum möglich. Die Zellen würden durch Eiskristalle zerstört werden oder osmotische Schädigungen davontragen. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein organisches Lösungsmittel, welches bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt, daher besteht die Notwendigkeit Alternativen zu DMSO zu finden. DMSO diffundiert aufgrund des geringen Molekulargewichts sehr schnell vom extrazellulären in den intrazellulären Raum und kann so den anfangs starken Gradienten zwischen intra- und extrazellulärer Osmolarität reduzieren (Gorlin, J., 1996). In der Folge kommt es zum Schrumpfen der Zelle durch den Ausstrom von Wasser und den Einstrom von DMSO. Wie stark eine Zelle bei diesem Vorgang schrumpft hängt von der Permeabilität der Membran gegenüber dem Gefrierschutzmittel ab. Je durchlässiger die Membran ist, desto geringer ausgeprägt ist der Vorgang des Schrumpfens. Die Schutzwirkung von DMSO besteht darin, dass DMSO durch die amphile Struktur wie Wasser an Makromoleküle binden kann und so hilft die Makromoleküle bei Wasserverlust zu stabilisieren. Zusätzlich wird der Gefrierpunkt des Zytoplasmas herabgesetzt. Dies ermöglicht eine größere Wasserabgabe in den extrazellulären Raum, daher wird das Risiko intrazellulärer Eisbildung herabgesetzt (Anchordoguy, T.J. et al., 1991; Mandumpal, J.B., Kreck, C.A. und Mancera, R.L., 2011).

1.1.2.2 nicht membrangängige Kryoprotektiva

Nicht membrangängigen Kryoprotektiva, wie Polysacchariden, wird die Eigenschaft zugeschrieben mit den hydrophilen Gruppen der Phospholipide in der Membran Wasserstoffbrücken auszubilden und diese dadurch zu stabilisieren und so als Kryoprotektivum zu wirken (Körber et al. 1985, Oetjen 1997).

Auch in der Natur finden sich einige Beispiele für natürliche Kryoprotektiva. Hier ist insbesondere Trehalose zu erwähnen. Es handelt sich um ein nicht-reduzierendes Disaccharid, welches aus zwei, über eine α -(1-1) glykosidische Bindung verbundenen Glukosemolekülen besteht. Trehalose ist in der Natur weit verbreitet in einigen Bakterien, Pilzen, Invertebraten und Pflanzen, welche die Fähigkeit haben über lange Zeiträume vollständig dehydriert ohne Wasser leben zu können (Anhydrobiose: Leben ohne Wasser)(Crowe, J.H. and Crowe, L.M., 1984; Iturriaga et al. 2009). Alle biologischen Makromoleküle sind normalerweise von Wasser umgeben, welche durch die Hydratationsschicht mit Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Auch Trehalose bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen der Membranen aus und stabilisiert diese so (Crowe, J.H. et al, 1988; Chen, T. et al., 2001). Eine besondere Eigenschaft der Trehalose besteht auch darin, dass sie die Eigenschaft besitzt während des Einfrierens von Zellen stabiles Glas zu bilden (Chen, T. et al., 2002). Es handelt sich dabei um eine Flüssigkeit mit sehr hoher Viskosität, was dazu führt, dass die Geschwindigkeiten von Diffusionsprozessen stark reduziert werden (Her, M.L. und Nail, S.L, 1994). Im Rahmen der Kryokonservierung führt das dazu, dass die Bildung von schädlichen intrazellulären Eiskristallen verhindert wird (Buchanan,S. et al, 2004).

1.1.3 Zell-Zell-Adhäsion und Sphäroide

Für die Entstehung von Sphäroiden ist es entscheidend, dass die Zell-Zell-Adhäsionskräfte größer sind, als die Adhäsionskräfte der Zellen zum Substrat. Nur dann können sich Einzelzellen zu multizellulären, dreidimensionalen Gebilden zusammenlagern. Für die interzellulären Adhäsionskräfte sind vor allem Integrine und auch Cadherine von großer Bedeutung. Integrine sind heterodimere Glykoproteine und zählen zu den Transmembranproteinen. Sie stellen Verbindungen von Zellen untereinander sowie direkte Verbindungen zur extrazellulären Matrix her. Integrine sorgen insbesondere in Sphäroiden für anti-apoptotische Signale (Bates, R. C., Edwards, N.S., Yates, J.D., 2000).

Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige transmembrane Glykoproteine und gehören zu der Gruppe der Adhäsionsproteine. Sie sind über eine zytoplasmatische Cadherindomäne an der Übertragung extrazellulärer Signale beteiligt. Sie sind also nicht nur für die Zell-Zell Adhäsion wichtig, sondern auch an der Differenzierung beteiligt (Takeichi, M., 1988).

Der Aufbau von Sphäroiden ist charakteristisch, im Innern eines Sphäroiden befindet sich ein nekrotischer Kern (wohl bedingt durch eine schlechte Verfügbarkeit von Nährstoffen), welcher nach außen hin von vitalen Zellen umgeben ist. Proliferierende Zelllinien weisen unter der relativ losen äußersten Schicht eine proliferierende Schicht auf (Sutherland, R.W., Durand, R.E., 1984). Bei Sphäroiden aus primären humanen Hepatozyten fehlt diese Schicht, da diese Zellen in Kultur nicht proliferieren. Die Dicke der lebenden Zellschicht liegt in der Regel zwischen 120-280 μm und zwischen den Zellen können „*gap-junctions*“ ausgebildet werden, welche die Regulationsleistungen der Zellen untereinander im in-vitro Modell simulieren können

(Brümmer, F., Hülser, F., 1982). Einige Zelltypen können auch „*tight-junctions*“ und Desmosomen ausbilden (Kunz-Schughart, L.A., 1999).

1.1.4 Zelluläre Volumenregulation als Parameter für erfolgreiche Kryokonservierung

Wie von Spindler, R. et al. (2012) gezeigt werden konnte, treten während der Kryokonservierung mit Kryoprotektiva wie DMSO starke Veränderungen des Zellvolumens auf.

Während des Einfrierens kommt es zu einer starken Abnahme des Zellvolumens, wohingegen beim Auftauen eine deutliche Zunahme sichtbar wurde. Zellen, die dieses Verhalten zeigten hatten eine gute Vitalität nach der Kryokonservierung.

Hingegen konnte gezeigt werden, dass ohne die Zugabe eines Kryoprotektivums ein durch das Einfrieren hervorgerufenen Schwellen sichtbar wurde, welches beim Auftauen noch verstärkt wurde. Die Vitalität dieser Zellen war deutlich reduziert.

Es scheint also für eine Zelle während der Kryokonservierung essentiell wichtig zu sein, nahezu vollständig zu dehydrieren, während gleichzeitig durch zugesetzte Kryoprotektiva Membranen stabilisiert und osmotische Schäden an Proteinen verhindert werden.

Es wird deutlich, dass den Mechanismen der zellulären Volumenregulation eine wichtige Rolle bei einer erfolgreichen Kryokonservierung zukommt. Somit ist die Fähigkeit einer Zelle zu zellulärer Volumenregulation, als Reaktion auf anisotone Bedingungen, ein exzellenter Parameter zur Bewertung einer erfolgreichen Kryokonservierung.

1.2 Das Prinzip zellulärer Volumenregulation

Fast alle tierischen Zellmembranen weisen durch eingelagerte Aquaporine eine hohe Permeabilität für Wasser auf (Macknight, 1988; Maunsbach et al., 1997). Daher rufen osmotische Gradienten bei anisotonen Bedingungen über der Zellmembran eine Änderung des Zellvolumens hervor. Da Zellen bestrebt sind ihr Volumen innerhalb eines gewissen Bereichs konstant zu halten, wirken die aktiven Prozesse der zellulären Volumenregulation den passiven Volumenveränderungen entgegen.

Zum einen verfügen viele zelluläre Strukturen nur über eine begrenzte mechanische Stabilität. Zum anderen werden über Veränderungen des Zellvolumens und über die Mechanismen seiner Regulation viele zellphysiologische Prozesse beeinflusst, wie z.B. die Lokomotion von Zellen, die Genexpression und einige anabole, wie auch katabole Prozesse des Metabolismus in der Leber. Eine entscheidende Rolle kommt dem Zellvolumen auch bei der Zellteilung, der Proliferation, zu (Lang et al., 1998), ebenso wie beim programmierten Zelltod, der Apoptose.

1.2.1 Die physiologische Bedeutung des Zellvolumens und seiner Regulation in der Leber

Bei der Leber handelt es sich um das wichtigste Stoffwechselorgan von Vertebraten. Ca. 80% der Zellen in der Leber sind Hepatozyten. Hepatozyten sind metabolisch sehr aktiv. Über die

intensiven anabolischen und katabolischen Prozesse ergeben sich für die Hepatozyten zum Teil deutlich anisotone Bedingungen. In Abhängigkeit von den osmotischen Schwankungen der venösen Blutversorgung, kann dies bei Hepatozyten zu deutlichen Änderungen des Volumens führen (Häussinger, D. und Lang, F., 1991).

Interessanter Weise nimmt bei Hepatozyten das Zellvolumen außerdem eine quasi „*second messenger*“ Funktion ein und vermittelt die hormon-gesteuerte Regulation des Metabolismus und der Genexpression. Zellschwellung ist ein anaboles Signal und führt dazu, dass stark osmotisch wirksame Substanzen in weniger osmotisch wirksame umgewandelt werden, die Protein- und Glykogen-Synthese werden angeregt. Die Wirkung von Insulin auf die Protein- und Glykogen-Synthese wird durch die Zunahme des Zellvolumens vermittelt. In Rattenhepatozyten führt, insulin-induziert, die Aktivierung des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporters, des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Symporters und der Na^+/K^+ -ATPase zur Volumenzunahme (Lang, F. et al., 1998).

Die katabolen Stoffwechselwege der Glycogenolyse und Proteolyse werden bei Zellschrumpfung durch den Antagonisten des Insulins, dem Glucagon, aufgrund der KCl Freisetzung angeregt (Agius, L. et al. 1994; Häussinger, D., 1996; Lang, F. et al. 1998).

1.2.2 Mechanismen der Volumenregulation

Beim RVD („*regulatory volume decrease*“) gibt die schwellende Zelle aktiv anorganische Osmolyte ab, um ihr Volumen wieder zu verringern. Es kommt zur Aktivierung von Kalium (K^+)-Kanälen, durch den Efflux von K^+ kommt es zur Hyperpolarisation des Membranpotentials und Chlorid (Cl^-) strömt mit dem elektrochemischen Gradienten ebenfalls aus der Zelle. Der Prozess ist somit quasi elektroneutral (Lang, F. et al., 1998b). Neben den K^+ - und Cl^- -Kanälen wird in anderen Geweben auch ein $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ -Symporter aktiviert

(Okada, Y. und Maeno, E., 2001). Bei der Volumenregulation in der Leber spielt dieser Symporter allerdings keine Rolle.

Durch die Aktivierung von K^+ - und Cl^- - Kanälen wird ein weiterer Wassereinstrom gestoppt, die zelluläre Osmolarität reduziert und somit das Zellvolumen wieder verringert. Dieser aktive Vorgang wird als RVD bezeichnet (Wehner, F. et al., 2003). Auch organische Osmolyte, wie Taurin und Myo-Inositol, werden unter hypotonen Bedingungen direkt durch spezielle Kanäle freigesetzt (Wehner et al., 2003).

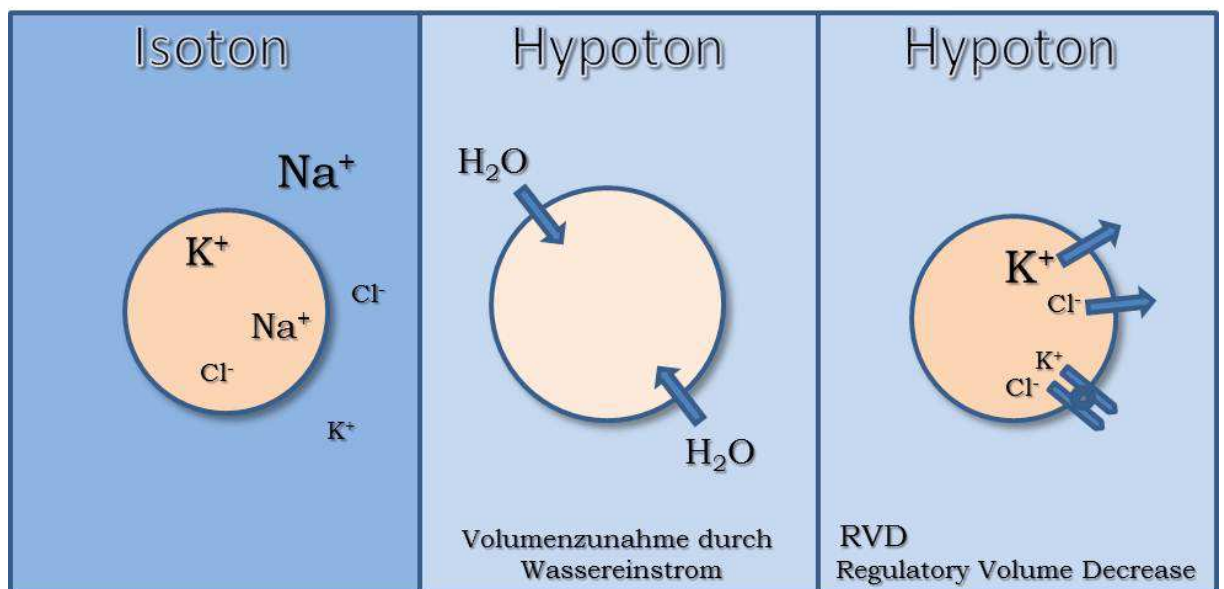


Abbildung 1.2:

Ist die extrazelluläre Umgebung hypoton gegenüber dem Zellinnern, kommt es zu einem passiven Wassereinstrom in die Zelle. Die Zelle schwillt an. Durch die Aktivierung des „regulatory volume decrease (RVD)“ verliert die Zelle aktiv Osmolyte und eingeströmtes Wasser folgt osmotisch nach.

Beim RVI („regulatory volume increase“) nimmt die Zelle aktiv Osmolyte auf, um den Wasserverlust zu begrenzen und das Volumen wieder zu vergrößern. Aufgrund des großen Konzentrationsgradienten werden hauptsächlich Natrium-Ionen aufgenommen. Die aus dem Einstrom von Natrium (Na^+) resultierende Depolarisation des

Membranpotentials führt zu einem passiven Einstrom von negativ geladenen Chlorid-Ionen (Cl^-) (Wehner, F. und Tinel, H., 2000).

Die Aktivierung der Na^+ -Leitfähigkeit durch hypertone aktivierte Kationen Kanäle (HICCs), ist der Haupt-Mechanismen des RVI. Dies wurde bereits 1978 für Ehrlich ascites Tumor Zellen (Hoffmann, E.K., 1978) und 1989 für die Darmzell-Linie 407 (Okada, Y. et al. 1989) postuliert und 1995 von Wehner et al. an primären Rattenhepatozyten gezeigt (Wehner, F. et al., 1995).

Zusätzlich werden der Na^+ - H^+ -Austauscher und der Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Symporter aktiviert (Kirschner, U. et al., 2003; Wehner, F. 1998; Wehner, F., et al., 2003; Wehner, F. Sauer, H. und Kinne, R. K., 1995). Diese drei Mechanismen tragen in einem Verhältnis von 4:1:1 (Wehner, F. und Tinel, H., 2000) zum RVI von Rattenhepatozyten bei.

Die resultierende erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration führt zur Aktivierung der Na^+ - K^+ -ATPase. Im Verhältnis von drei Na^+ -Ionen gegenüber zwei K^+ -Ionen wird Natrium gegen den chemischen Konzentrationsgradienten und den elektrischen Ladungsgradienten aus der Zelle transportiert und trägt so entscheidend zur Aufrechterhaltung der Gradienten über der Zellmembran bei.

Zusätzlich nimmt die K^+ -Leitfähigkeit unter hypertonem Schock ab, um einen weiteren Ionenverlust entlang des chemischen Konzentrationsgradienten zu verhindern (Wehner, F. und Tinel, H., 2000).

Letztlich führen die Mechanismen des RVI also in der Summe zu einer Aufnahme von K^+ - und Cl^- -Ionen und Wasser folgt osmotisch nach. Die hypertone Aktivierung von Kationen Kanälen (HICC) ist der Hauptmechanismus des RVI (Wehner F., 2006, Wehner F. et al., 2006).

Im Gegensatz zum RVD, kommt organischen Osmolyten beim RVI eine wichtige Rolle bei langanhaltenden anisotonen Bedingungen zu. Durch die Synthese oder Aufnahme von organischen Osmolyten kann, ohne die physiologischen Ionenverteilungen dauerhaft zu verändern, das

Zellvolumen aufrecht gehalten werden (Lang, F. et al. 1998b; Wehner, F. et al., 2003).

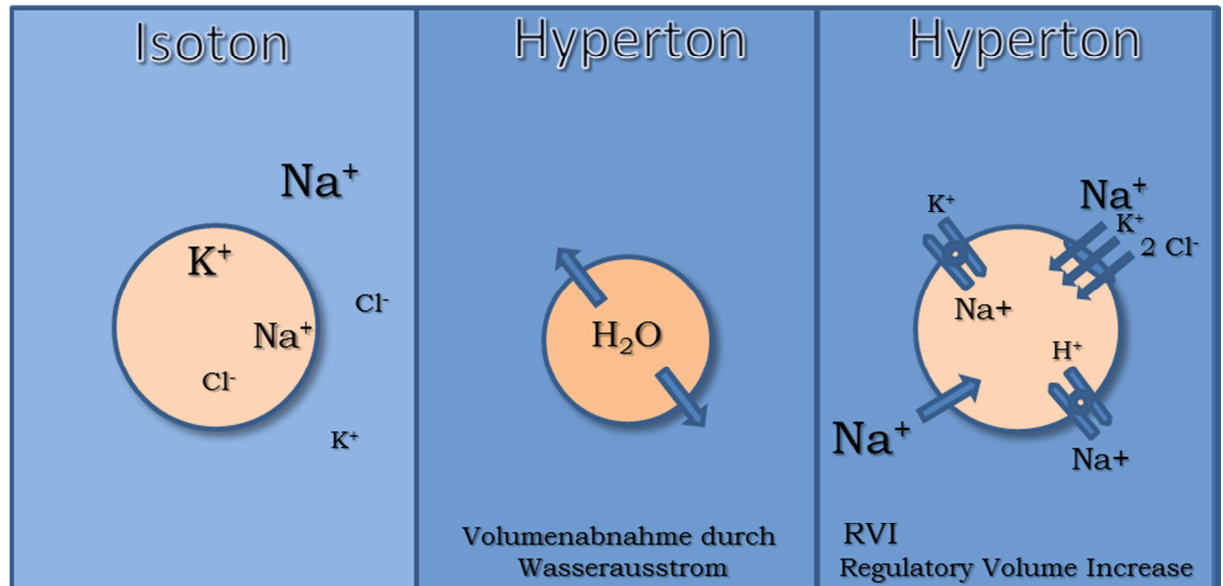


Abbildung 1.3 :

Ist die extrazelluläre Umgebung hyperton gegenüber dem Zellinnern, kommt es zu einem passiven Wasserausstrom aus der Zelle. Die Zelle schrumpft. Die aktiven Mechanismen des RVI führen zu einer Aufnahme von Kationen und Wasser folgt osmotisch nach.

1.2.3 Mechanismen der zellulären Volumenregulation als Teil von Proliferation und Apoptose?

Die Mechanismen der zellulären Volumenregulation unter anisotonen Bedingungen weisen große Ähnlichkeit zu physiologischen Vorgängen während der Apoptose und Proliferation auf. Zum einen kommt es zu Beginn der Apoptose neben der Cytochrom c-Freisetzung und der Caspase 3 Aktivierung, zu einer Abnahme des Zellvolumens,

dem sogenannten „Apoptotic Volume Decrease “(AVD) (Maeno, E. et al., 2000). Im Gegensatz geht der Proliferation eine Vergrößerung des Zellvolumens voraus (Bussolati, O. et al., 1996). Daher ist es von besonderem Interesse, in wie weit die zuvor beschriebenen Mechanismen oder Komponenten der zellulären Volumenregulation an den Prozessen der Apoptose und Proliferation beteiligt sind.

Wie bereits gezeigt werden konnte, wird die Volumenabnahme zu Beginn der Apoptose (AVD, „*apoptotic volume decrease*“) durch eine Aktivierung von K^+ -Kanälen induziert. Besonders interessant ist aber die Tatsache, dass es sich bei diesen unter isotonen Bedingungen aktivierten K^+ -Kanälen um dieselben Kanäle handelt, die schon bei der zellulären Volumenregulation nach Zellschwellung (RVD) unter hypotonen Bedingungen aktiviert werden (Okada, Y. et al., 2001; Okada, Y. und Maeno, E., 2001; Bortner, C.D. et al, 2004). Der Proliferation geht eine Zunahme des Zellvolumens voraus, damit nach der Zellteilung zwei Zellen gleicher Größe entstehen können. Unter hypertonen Bedingungen findet eine Zunahme des Zellvolumens während des RVI statt. Für die bestehende Arbeitshypothese, dass die Volumenzunahme zu Beginn der Proliferation unter isotonen Bedingungen durch dieselben Kationen-Kanäle verursacht wird, die während des RVI unter hypertonen Bedingungen für die Volumenzunahme verantwortlich sind, konnten bereits deutliche Hinweise bei humanen Hepatozyten (Bondarava, M. et al. 2009) und HeLa Zellen (Shimizu, T. et al. 2006) dokumentiert werden.

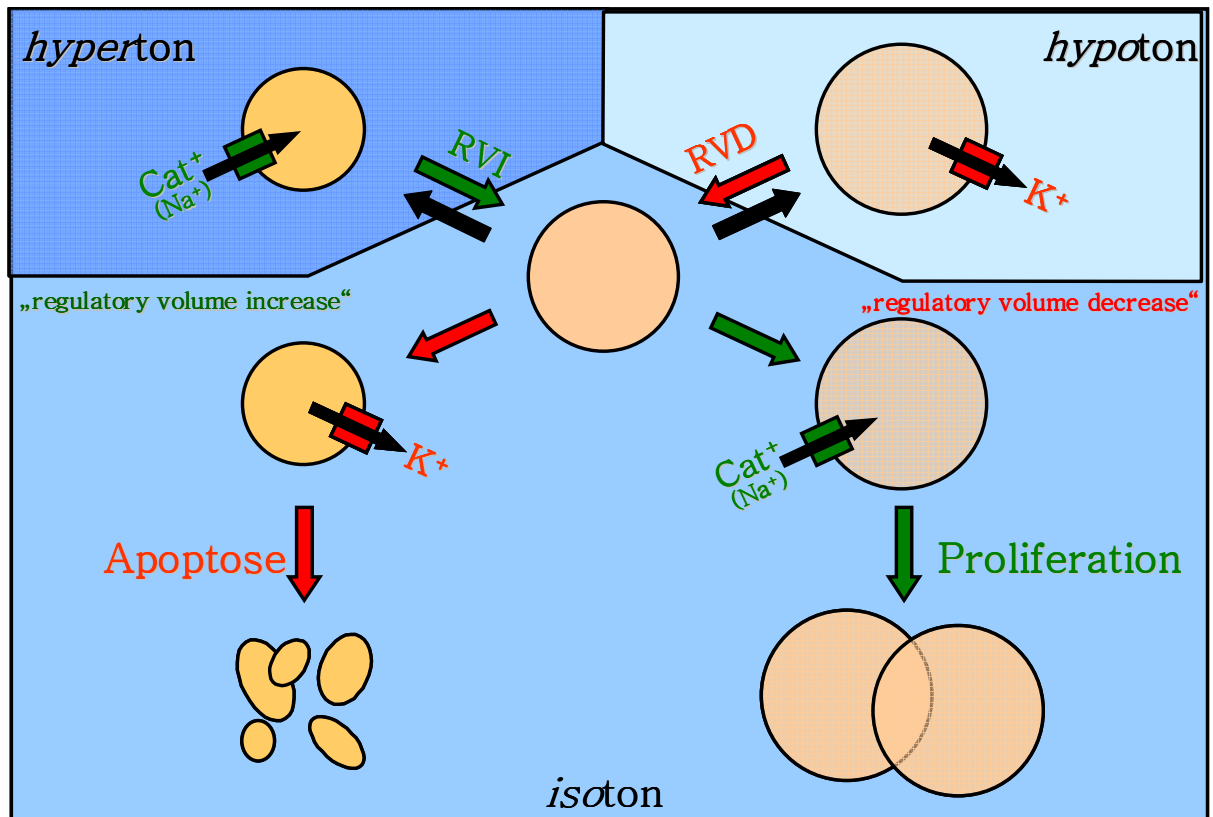


Abbildung 1.4:

Schematische Darstellung der wahrscheinlichen Zusammenhänge zwischen zellulärer Volumenregulation und Proliferation bzw. Apoptose. Die während des RVD unter hypotonen Bedingungen aktivierten K^+ -Kanäle werden auch unter isotonen Bedingungen während der Volumenabnahme zu Beginn der Apoptose aktiviert (Okada et al., 2001; Okada and Maeno, 2001). Es gibt deutliche Hinweise, dass bei der Volumenzunahme zu Beginn der Proliferation dieselben Kationen-Kanäle aktiviert werden, die während des RVI für die Volumenzunahme verantwortlich sind (Bondarava, M. et al. 2009; Shimizu, T. et al. 2006).

1.3 Das hepatozelluläre Karzinom

Ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) geht von Leberzellen (Hepatozyten) aus und ist weltweit einer der häufigsten bösartigen Tumoren. In den westlichen Industrienationen repräsentiert das HCC ca. 6 % aller menschlichen Tumore mit einer Inzidenz von etwa 6-7 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr und zeigt zudem eine deutlich steigende Inzidenz. Stärkster Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC ist die Leberzirrhose, vor allem bei viraler Genese, aber auch bei Stoffwechselerkrankungen (z.B. Hämochromatose) und bei nutritiv-toxischem Hintergrund (Alkohol) (Donato et al, 2006). Die höchste Inzidenz von HCC Erkrankungen liegt, verursacht durch die hohe Zahl der Hepatitis B- und C- Infektionen, im Bereich von 50-100/100 000 Einwohner in vielen Entwicklungsländern und in ganz Südostasien (Beasley, R.P. et al, 1988).

Da eine Diagnose oft erst in weit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung gestellt wird, sind die Überlebensraten sehr gering. Auch eine Operation, wenn überhaupt möglich, oder eine Lebertransplantation führt nur zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von gerade einmal 70%, nach 3 Jahren wird bei der Hälfte der Patienten ein Rückfall diagnostiziert (Llovet, J.M. et al, 2003).

Insbesondere die Dysregulation von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und den folgenden Signalkaskaden sind Ursachen für die Tumorentstehung in Hepatozyten. Insbesondere der IGF1 Rezeptor (Insulin-like Growth Factor), HGF/MET („Hepatocyte Growth Factor“), Wnt/ β -catenin/ FZD (Wingless), TGF α / EGFR (Transforming Growth Factor α /Epidermal Growth Factor Receptor), TGF β /T β R (Transforming Growth Factor β) leisten einen Beitrag zur Proliferation, antiapoptotischen Wirkungen und zum invasiven Verhalten der Tumorzellen (Breuhahn, K. et al, 2006).

Die Zellen des hepatozellulären Karzinoms waren für diese Arbeit interessant, da es sich um primäre Tumorzellen handelt, welche eine hohe Proliferationsrate aufweisen. Bevor eine Zelle proliferiert, kommt es zu einer Zunahme des Zellvolumens (Bussolati, O. et al., 1996). Da bereits deutliche Hinweise vorhanden sind, dass bei der Volumenzunahme zu Beginn der Proliferation dieselben Kationen Kanäle aktiviert werden, die während des RVI für die Volumenzunahme verantwortlich sind (Bondarava et al. 2009; Shimizu et al. 2006), sollte untersucht werden, ob bei HCC Zellen auch eine erhöhte RVI nach hypertonem Schock festgestellt werden kann.

1.4 Der hyperton induzierte Kationen Kanal in humanen Hepatozyten

Die Beteiligung der hyperton induzierten Kationen Kanäle (HICCs) am RVI wurde zunächst an Rattenhepatozyten detailliert untersucht (Wehner et al. 1995; Wehner and Tinel 1998 & 2000). Zusätzlich sind der Na^+/H^+ -Austauscher (NHE1) und der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symporter (NKCC1) am RVI beteiligt (Wehner, F. et al, 2003).

In humanen Hepatozyten wurde ein neuer Typ von hyperton induzierten Kationen Kanälen beschrieben (Li, T. et al, 2005). Es handelt sich um einen für kleine monovalente Ionen nicht selektiven Kationen-Kanal. Die Permeabilitäten für $\text{Na}^+:\text{Li}^+:\text{K}^+:\text{Cs}^+:\text{NMDG}^+$ liegen bei 1:1,2:1,3:1,2:0,6. [In der Elektrophysiologie wird NMDG (*N*-Methyl-D-glucamin) als Ersatz für Natriumionen eingesetzt, da die osmotische Aktivität ähnlich ist.] Die Selektivität von Kalzium über Natrium $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ liegt bei 0,7. Es liegt also eine klare Leitfähigkeit für Kalzium vor. Dies stellt einen ersten Hinweis dar, dass eine molekulare

Verbindung zwischen transienten Rezeptor Potential Kanälen (TRPs) und den HICCs bestehen könnte. Der Kanal ist höchstwahrscheinlich nicht permeabel für Cl⁻- Ionen aber die Aktivität hängt kritisch von der extrazellulären Cl⁻-Konzentration ab. Die Pharmakologie des HICCs in humanen Hepatozyten zeigt eine Blockade des Kanals um 64% unter 100µmol/L Amilorid und eine komplette Inhibierung unter 100µmol/L Flufenamat und Gadolinium. Dies deutet auf eine molekulare Verbindung zwischen den bisher bekannten Amilorid sensitiven und insensitiven Kanälen hin. Auch eine Verbindung zu DEG/ENaC und TRP Kanälen ist wahrscheinlich. Das Pharmakologie Profil für den HICC in der Zelllinie HepG2 (humane hepatozelluläre Tumorzelllinie) ist nahezu identisch zu dem in primären Hepatozyten (Wehner F., Lawonn P., Tinel H., 2002). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass in beiden Systemen der identische Typ von Kationen Kanälen expremiert wird.

Die genaue Architektur des HICC ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.4.1 Der epitheliale Natriumkanal

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist ein spannungsunabhängiger Kationen Kanal (Canessa, C.M. et al., 1994), welcher zum einen sehr selektiv durch nanomolare Konzentrationen des Diuretikums Amiloride gehemmt werden kann (Chen, X. et al., 2004; Kellenberger, S. Gautschi, I. und Schild, L., 2003; Kelly, O. et al., 2003) und eine hohe Selektivität von Na⁺ gegenüber K⁺ auf ($P_{Na}/P_K > 40$) aufweist (Fyfe, G.K., Quinn, A. und Canessa, C.M., 1998).

Der ENaC tritt größtenteils in Epithelien auf, deren Aufgabe es ist Natrium zu resorbieren. Bisher konnte der ENaC in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden, wie dem distalen Nephron der Niere, der Harnblase von Amphibien und Säugern, in der Lunge (Barker et

al., 1998), den Speicheldrüsen (Dinudom, Young, and Cook, 1993) der Zunge (Avenet und Lindemann, 1988), dem Herzen, dem Gehirn (Canessa, Horisberger, und Rossier, 1993), dem Pankreas und ebenfalls in der Leber der Ratte (Böhmer and Wehner, 2001).

Fehlfunktionen dieser Kanäle rufen einige schwere genetisch bedingte Krankheiten hervor, dazu gehört zum einen das Liddle Syndrom und Pseudohypoaldosteronismus Typ I (PHA-I). Auch das Zusammenwirken dieser Kanäle mit anderen Ionenkanälen, wie dem CFTR („*cystic fibrosis transmembran conductance regulator*“), ist von Bedeutung für die Entstehung von schweren Krankheiten, wie z.B. der Cystischen Fibrose (Schwiebert, E.M. et al., 1998; Schwiebert, E.M. et al., 1999).

Bei den Säugern sind drei verschiedene Unterfamilien der ENaC/Degenerin Genfamilie zu finden, der epitheliale Natriumkanal (ENaC), säure-empfindliche Ionenkanäle (acid-sensing ion channel, ASIC) und Gehirn, Leber und Darm-Natriumkanäle (brain-liver-intestine-sodium channel, BLINaC). Bei den Invertebraten sind vier Unterfamilien bekannt, die Degenerine von *C. elegans*, RPK/dGNaC 1 in *Drosophila melanogaster*, FMRFamid regulierte Natriumkanäle (FaNaC) in Mollusken und FLR-1 ebenfalls aus *C. elegans*, welche sich aber von den Degenerinen unterscheiden. Dies zeigt, dass es sich bei der ENaC/Degenerin Genfamilie um eine große und weit verbreitete Gruppe von amiloride-sensitiven Natriumkanälen handelt.

Der ENaC stellt ein heterooligomeres Protein dar, das aus drei homologen Untereinheiten, α , β und γ , aufgebaut ist. Eine vierte Untereinheit namens δ , mit hoher Homologie zur α -Untereinheit, wurde ebenfalls kloniert, wird aber nur in wenigen Geweben expremiert z.B. im Gehirn. Wenn die δ -Untereinheit anzutreffen ist, dann meist als Ersatz für die α -Untereinheit (Kellenberger, S. und Schild, L., 2002). Die genaue Stöchiometrie des ENaC wird zurzeit noch diskutiert, die meisten Autoren gehen aber von einem heterotetrameren Aufbau mit $2\alpha 1\beta 1\gamma$ aus (Dijkink, L. et al., 2002). Die α -, β -, γ -ENaC-Untereinheiten bestehen jeweils aus 698, 638 und 650 Aminosäuren.

Jede Untereinheit des ENaC hat zwei transmembrane Domänen M1 und M2. Der N- und C-Terminus liegen intrazellulär, extrazellulär befindet sich ein ca. 500 Aminosäuren langer hydrophiler Loop. Die N-terminale Domäne liegt nahe der ersten transmembranen Domäne M1, die C-terminale Domäne liegt benachbart zur zweiten transmembranen Domäne M2.

Zur Ausbildung eines Kanals mit maximaler Funktion sind alle drei Untereinheiten nötig (Canessa, C.M. et al., 1994; Fyfe, G.K., Quinn, A. und Canessa, C.M., 1998; McNicholas, C.M. und Canessa, C.M., 1997). Ein Kanal, welcher ausschließlich aus α -ENaC Untereinheiten besteht, wird nur in sehr geringer Anzahl an der Zelloberfläche expremiert und liefert nur ca. 1% der Leitfähigkeit, die ein Kanal aus allen drei α ,- β ,- γ - ENaC Untereinheiten liefern kann.

Kanäle, die nur aus β - oder γ -Untereinheiten bestehen werden gar nicht an der Zelloberfläche expremiert. (Firsov, D. et al., 1996).

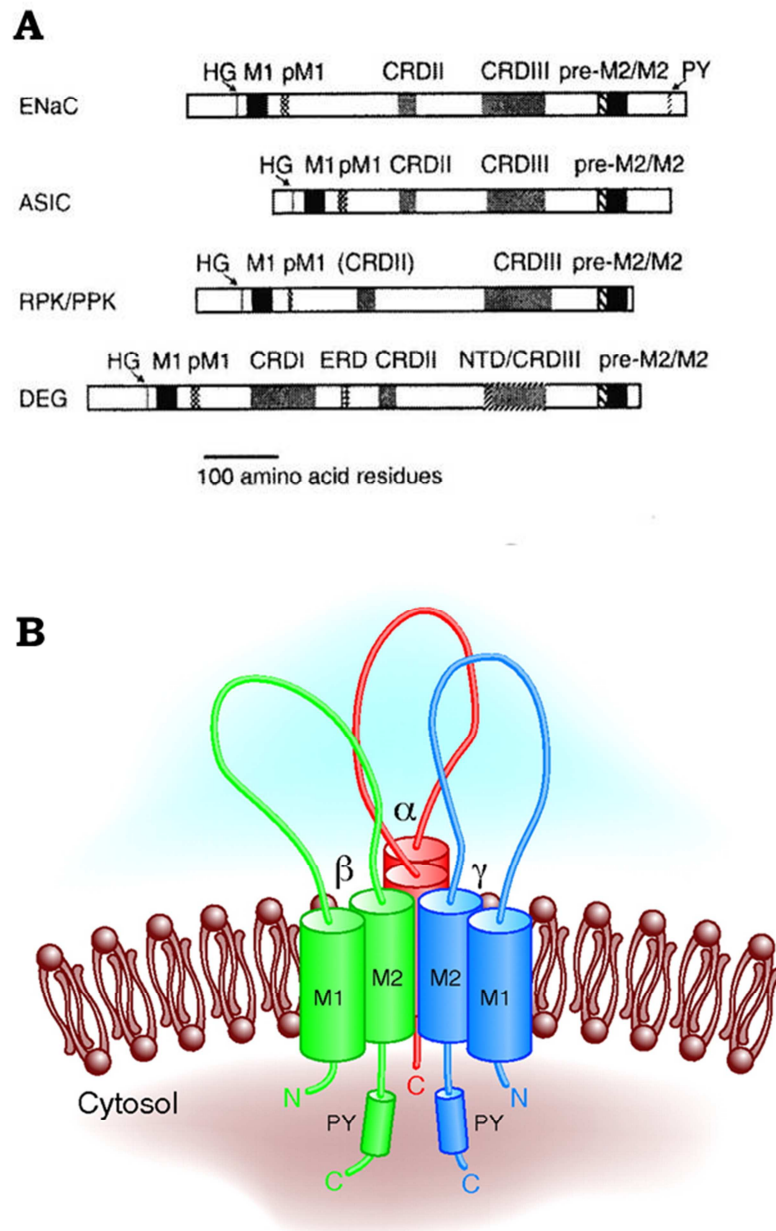


Abbildung 1.5:

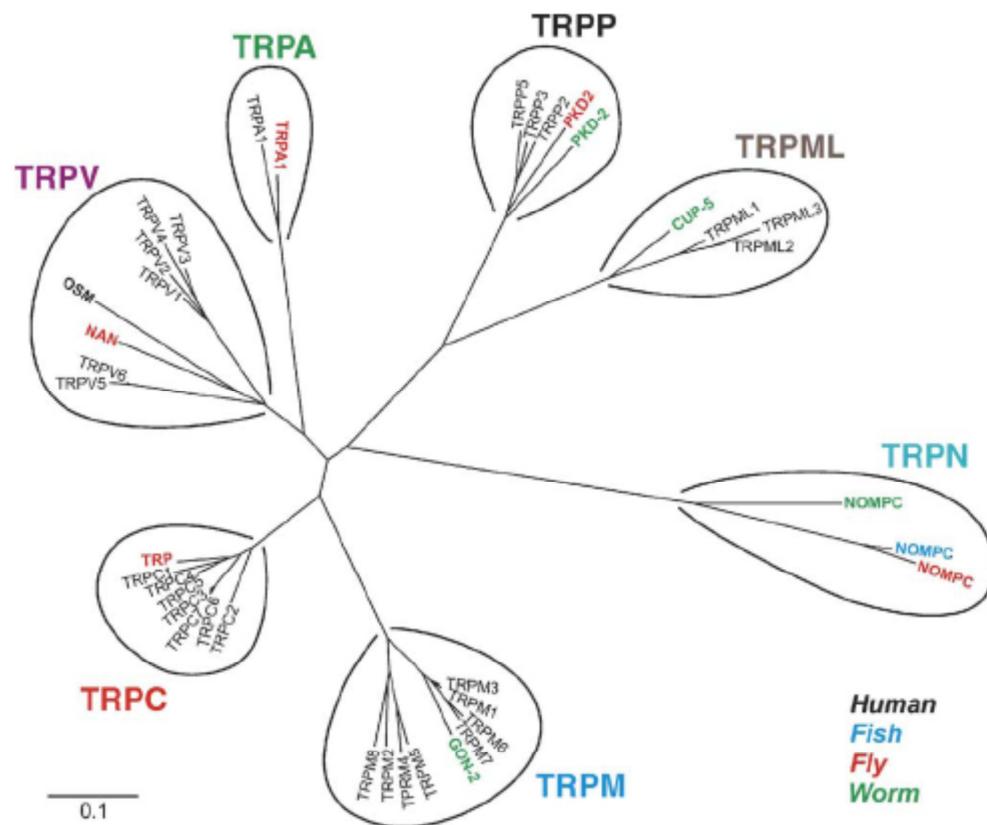
Funktionelle Domänen des epithelialen Natriumkanals (ENaC)

A: zeigt die hohe Konservierung funktioneller Bereiche unterhalb der verschiedenen Familien der Degenerin/ENaC Familie (Kellenberger und Schild 2002).

B: zeigt die intra- und extrazelluläre Anordnung der funktionellen Einheiten. Jede Untereinheit des ENaC hat zwei Transmembran-Domänen M1 und M2. Der N- und C-Terminus liegen intrazellulär, extrazellulär befindet sich ein ca. 500 Aminosäuren langer hydrophiler Loop. Die N-terminale Domäne liegt nahe der ersten transmembranen Domäne M1, die C-terminale Domäne liegt benachbart zur zweiten transmembranen Domäne M2. (Bhalla, V. und Hallows, K.R., 2008)

1.4.2 TRP Kanäle

In *Drosophila melanogaster* wurde der erste TRP-Kanal (*transient receptor potential channels*) identifiziert. Die Photorezeptoren der *Drosophila* (trp343) Mutante zeigten auf Lichtreize nur einen transienten, d.h. schnell inaktivierenden Membranstrom, wohingegen im Wildtyp die Aktivierung mit der Dauer des Reizes übereinstimmte (Cosens, D.J. und Manning, A., 1969). Im Anschluss wurde eine umfangreiche Familie von Ionenkanälen charakterisiert, die aus mehr als 30 Kationen Kanälen besteht. TRP-Kanäle sind entwicklungs-geschichtlich sehr alt und spielen eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung einer Reihe von physikalischen und chemischen Stimuli, wie Geschmack (süß, sauer, umami), Pheromonen, Temperatur (warm, heiß, kalt), Schmerz, Licht, Berührung und osmotischen Veränderungen (Owsianik, G. et al., 2006). Änderungen in der freien Ca^{2+} Konzentration im Zytosol einer Zelle ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) spielen eine zentrale Rolle in vielen fundamentalen zellulären Prozessen wie der Freisetzung von Transmittern, der Proliferation, der Transkription und dem Zelltod (Berridge, M.J. et al, 2000). Die Familie der TRP Kanäle beeinflusst durch die Bereitstellung von Eintrittswegen die intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen. Zum einen werden Gradienten für den Ca^{2+} Einstrom beeinflusst und zum anderen ist es sehr wahrscheinlich, dass intrazelluläre Signalwege für die Ca^{2+} Freisetzung aus Zellorganellen gebildet werden (Peterson et al, 2005). Auf der Basis von Sequenzhomologien wird die TRP Familie in 7 Unterfamilien eingeteilt: Die TRPC („Classical“ oder „Canonical“) Familie, die TRPV („Vanilloid“) Familie, die TRPM („Melastatin“) Familie, die TRPP („Polycystin“) Familie, die TRPML („Mucolipin“) Familie, die TRPA („Ankyrin“) Familie und die TRPN („NOMPC“ von „no mechanoreceptor potential- C“) Familie.

**Abbildung 1.6:***Phylogenetischer Stammbaum der TRP Superfamilie*

(TRPC classical oder canonical, TRPV vanilloid, TRPM melastatin, TRPN NOMP-C no mechanoreceptor potential-C, TRPP polycystin, TRPML mucolipin, TRPA ANKTM1 ankyrin-like mit Transmembran-Domäne1).

Zum einen werden Gradienten für den Ca^{2+} Einstrom beeinflusst und zum anderen ist es sehr wahrscheinlich, dass intrazelluläre Signalwege für die Ca^{2+} Freisetzung aus Zellorganellen gebildet werden (Peterson et al, 2005). Während alle TRP Kanäle eine Permeabilität für monovalente Ionen aufweisen, sind nur zwei TRP Kanäle impermeabel für Ca^{2+} Ionen (TRPM4 und TRPM5), wohingegen zwei TRP Kanäle hoch-permeabel für Ca^{2+} Ionen sind (TRPV5 und TRPV6) (Owsianik, 2005).

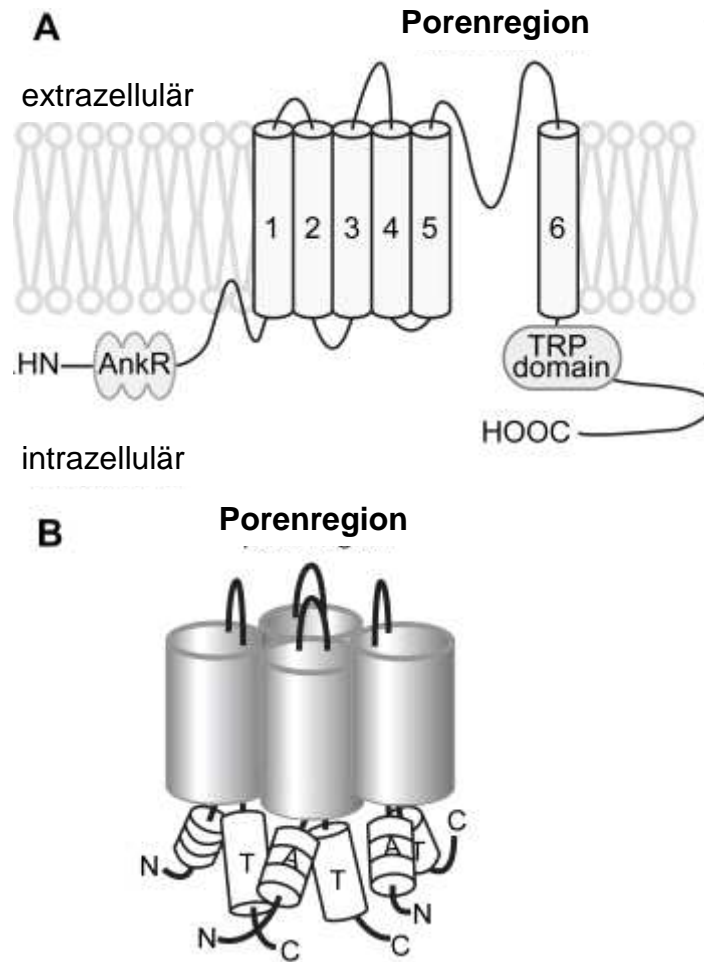


Abbildung 1.7:

Zusammenfassung wichtiger struktureller Eigenschaften und Protein-Protein-Interaktionsstellen der TRP Familie: **A:** Das TRP Protein hat sechs Transmembranregionen, eine Porenregion zwischen der fünften und sechsten Transmembran-Domäne und eine TRP Domäne befindet sich im C-terminalen Bereich. Einige TRP Unterfamilien besitzen mehrere Ankyrin Wiederholungen in der N-terminalen Domäne. **B:** Das TRP Protein ist in einem Kanal als Homotetrameren oder Heterotetrameren organisiert. (Abbildung verändert nach Yamamoto et al., 2010)

1.5 Zielsetzung

Der zentrale Bestandteil dieser Arbeit ist der hyperton induzierte Kationen-Kanal (HICC).

Zur Lagerung von humanen Hepatozyten bei sehr tiefen Temperaturen, sollte die Verwendung neuartiger miniaturisierter *Multi-Well* Kryosubstrate im Vergleich mit konventionellen 2ml Kryoröhrchen untersucht werden. Zusätzlich sollten die Auswirkungen verschiedener Kryoprotektiva sowie „*hanging droplet*“ Sphäroiden als Gewebemodell angewendet werden. Da es während der Kryokonservierung von Zellen zu starken Volumenänderungen kommt, sollte die Aktivierung des HICC hierbei als Qualitätsparameter zur Bewertung der Kryokonservierung dienen. Die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Auslösung von Apoptose oder Nekrose wurden mit einem Durchflusszytometer untersucht.

Die Mechanismen der zellulären Volumenregulation sind an den physiologischen Prozessen der Proliferation und Apoptose beteiligt. Als Hauptmechanismus der regulatorischen Volumenzunahme (RVI) nach hypertonem Schock sind hyperton aktivierte Kationen Kanäle (HICC) anzusehen. Die Beteiligung des HICC an der Proliferation von HepG2 Zellen konnte gezeigt werden (Bondarava, M. et al., 2009). Daher sollte die HICC Aktivierung in stark proliferierenden Tumorzellen untersucht werden. Primäre Zellen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) wurden einem hypertonem Schock unterzogen und die Aktivität des HICC mit dem akustischen Mikroskop untersucht.

Die molekulare Identität des HICC ist bisher weitestgehend unbekannt. Die α - Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC) ist als ein Bestandteil des HICC identifiziert worden (Böhmer, C. und Wehner, F., 2001, Bondarava, M. et al., 2009), allerdings kann es aufgrund der Charakteristika des HICC nicht α -ENaC allein den Kanal darstellen.

Durch ein Screening mit einer siRNA Bibliothek von Ionenkanälen und Transportern sowie Transmembranproteinen sollten mögliche weitere molekulare Bestandteile identifiziert werden. Die HICC Aktivierung wurde nach der siRNA Transfektion durch die Messung der akustischen Impedanz mit akustischer Mikroskopie dokumentiert.

Weder die Hardware noch die Software des akustischen Mikroskops war für die Durchführung eines solchen Screenings ausgerüstet und musste umfangreich weiterentwickelt werden. Eine übergreifende Steuerung musste erstellt werden, welche es ermöglichte die Funktionen des Epifluoreszenzmikroskops, ein Perfusionssystem und den motorisierten Kreuztisch mit der Systemsteuerung des akustischen Mikroskops zu kombinieren.

2. Material und Methoden

2.1 Primäre humane Hepatozyten

2.1.1 Präparation der primären Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden aus gesundem Lebergewebe gewonnen, welches während einer partiellen Hepatektomie im Rahmen einer Tumorentfernung gewonnen wird. Der Vorgang wurde durch die lokale Ethik-Kommission genehmigt. Die Patienten wurden darüber informiert, dass während der Operation kein zusätzliches Gewebe für Studienzwecke entnommen wird. Die Gewebeproben wurden nur verwendet, wenn die Patienten schriftlich in die Verwendung eingewilligt hatten. Die Gewebeproben wurden durch das Klinikum Dortmund, Klinikzentrum Mitte Chirurgische Klinik, Beurhausstr. 40, Dr. med. H. Nürnberger zur Verfügung gestellt.

Ca. 10g schwere Präparate humaner Leber wurde an 2-3 Venen kanülisiert und an den Schnittflächen mit HistoAcryl/methylacrylate verschlossen, um die anschließende Perfusion mit HBSS (Hank's buffert saline solution: NaCl 137mmol, KCl 5,36mmol, KH₂PO₄ 0,44mmol, Na₂HPO₄ x 2H₂O 0,34mmol, D-Glucose x H₂O 5,56mmol, Hepes 25mmol, Na-Hepes 25mmol, EGTA 0,5mmol) zu verbessern. Die Leberpräparate wurden für 30min bei 37°C mit 100ml HBSS perfundiert, um noch vorhandene Blutreste zu entfernen. Der Leberzellverband wurde durch eine 40-minütige Perfusion mit 50ml Williams Medium E (+L-Glutamine 5mmol, Glukose 0,06%, Hepes 11,5mmol, Na-Hepes 11,5mmol, Gentamycin 50µg/ml, Penicillin

50IU/ml, Streptomycin 50µg/ml, Inosine 37µmol, Hydrocortisone 4,8µg/ml, Insulin 1µg/ml, pH7,4, 300mOsm) mit 0,05% Collagenase Typ IV und 5mM CaCl₂ aufgelöst. Nach dem enzymatischen Verdau wurde das Präparat vorsichtig mit einem Skalpell eröffnet und das Gewebe entnommen. Bei 0°C wurde die Leberzellsuspension durch zwei Lagen Mullgaze filtriert, um grobe Gewebeteile abzutrennen. Die Hepatozyten wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 50g bei 4°C in 50ml WME Medium gewaschen und anschließend in ca. 8ml WME Medium aufgenommen. Über einen Gradienten von 50% und 25% Percoll (Pertoft, H. et al., 1977) wurden die Hepatozyten während einer 20minütigen Zentrifugation bei 650g und 4°C in lebende und tote Hepatozyten, sowie in Zelltrümmer aufgetrennt (siehe Abbildung 2.2). Die Bande mit lebenden Zellen wurde abgenommen und erneut bei 50g und 4°C in WME Medium gewaschen und anschließend in einem definierten Volumen WME Medium mit 10% FKS aufgenommen. Mit einer Thoma Zählkammer wurde durch Zugabe von Trypan Blau (20mg/ml) die Gesamtzahl der Hepatozyten und die Anzahl toter Zellen ermittelt.

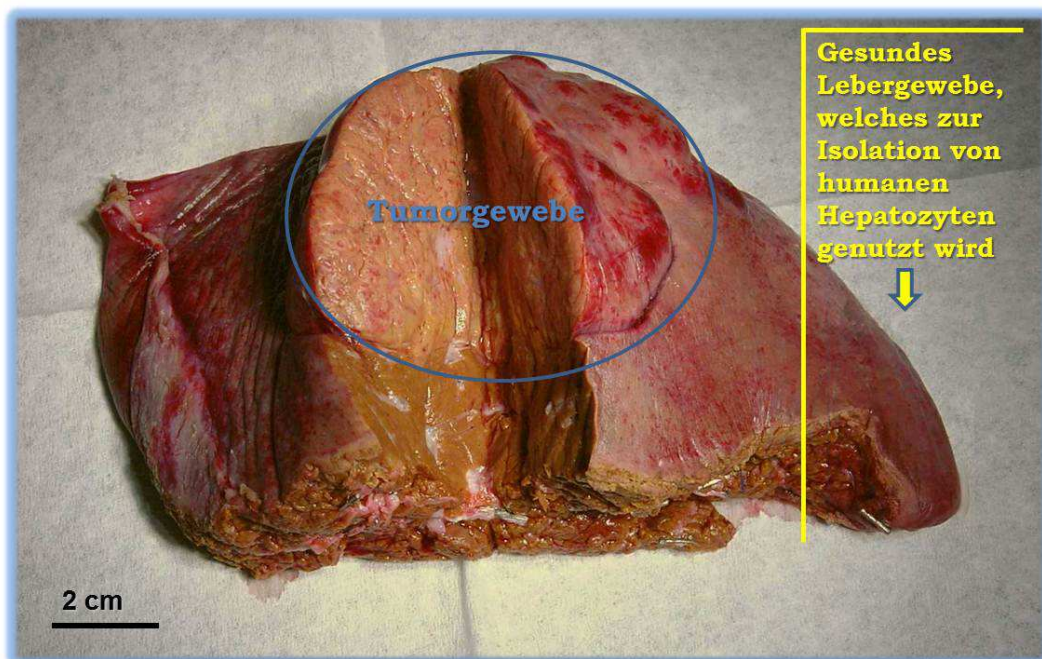


Abbildung 2.1:

Menschliches Lebergewebe mit Tumoranteil nach einer Leberresektion.

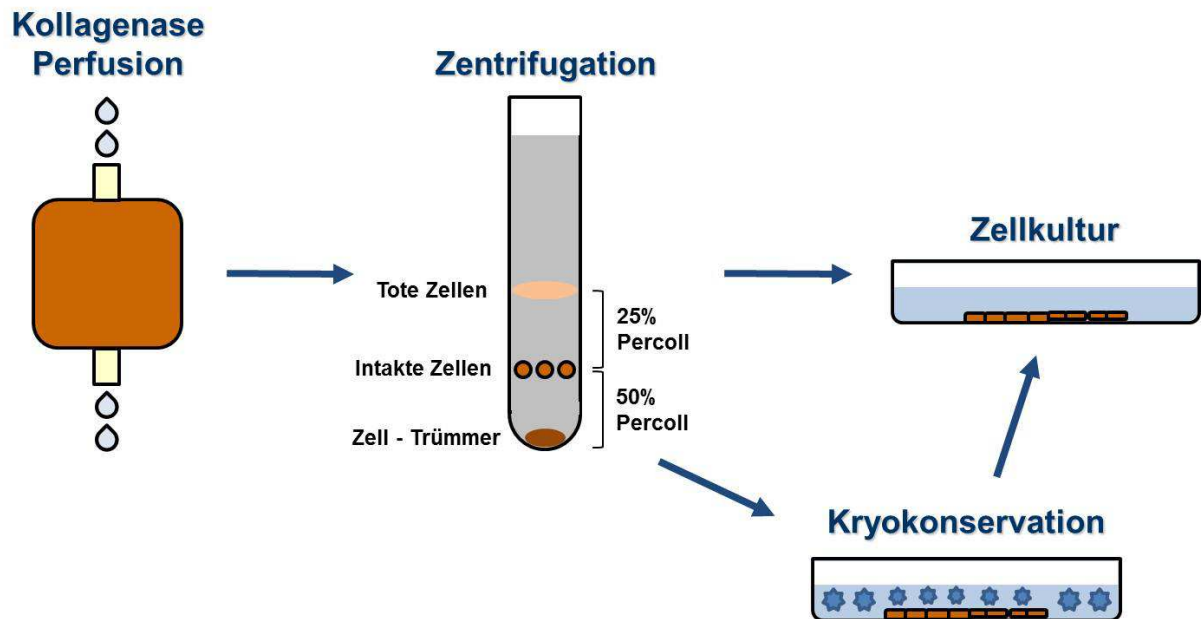


Abbildung 2.2:

Schematische Darstellung der Präparation von primären humanen Hepatozyten, sowie der weiteren Verwendung der isolierten Einzelzellen (nach Wehner, F. verändert).

2.1.2 Kultivierung der primären Hepatozyten

Die Zellen wurden entweder auf Petriperm™-Schalen (Vivascience, Hannover) oder Lab-Tek™ Glasbodenkammern (Nunc, Thermo Scientific) aufgebracht. Sowohl die Petriperm™-Schalen, als auch die Lab-Tek™ Glasbodenkammern wurden mit Kollagen R (2mg/ml, Serva, Heidelberg) beschichtet, um die Anhaftung der Zellen zu verbessern (Rubin, K. et al., 1978). Die Petriperm™-Schalen besaßen die Besonderheit, dass der Kulturschalenboden aus einer gaspermeablen Folie bestand, die einen Gasaustausch zwischen dem Kulturmedium und der Brutschrankatmosphäre (95% Luft; 5% CO₂) erlaubte.

2.1.3 Kryokonservierung der primären Hepatozyten mit DMSO

Die Kryokonservierung der primären Hepatozyten fand in zwei verschiedenen Substraten statt. Zum einen in den konventionellen 2ml Kryoröhrchen (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) und den am IBMT Fraunhofer Institut St. Ingbert entwickelten Multi-Well Kryosubstraten, welche 30 Wells mit einem Fassungsvermögen von 25µl enthalten. Durch die Miniaturisierung wird eine gleichmäßigere Wärmeableitung als bei den konventionellen Kryoröhrchen geleistet. Die Kryosubstrate bestehen aus high-density Polyethylen (HDPE) und konnten mit einem Deckel reversibel verschlossen werden. Die Kryosubstrate wurden vor der Verwendung dreimal für 15 Minuten in einem Ultraschallbad mit 70%igem Ethanol gereinigt und entfettet. Die Trocknung fand bei UV-Licht Einwirkung unter einer Sterilbank statt.

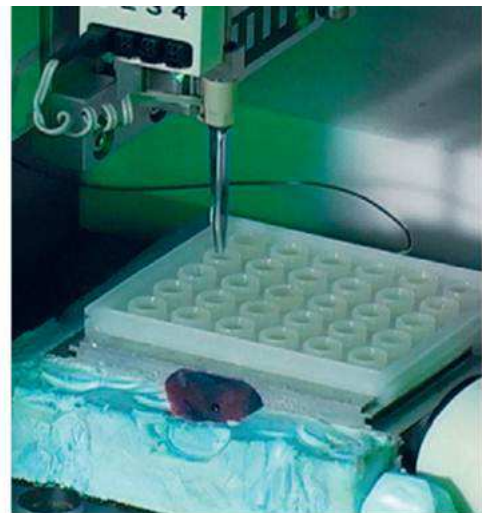


Abbildung 2.3:

links, konventionelles 2ml Kryoröhrchen; rechts, IBMT Fraunhofer Multi- Well Substrat mit GeSiM Nanoplotter (Foto: Dipl. Ing. Frank Ihmig)

Die Zellen wurden in beiden Substraten mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in WME Medium eingefroren. Als Kryoprotektivum wurde DMSO in Konzentrationen von 10%, 7% bzw. 5% zugegeben. Die Zugabe des Kryoprotektivums in die konventionellen Kryoröhrchen erfolgte manuell mit einer Pipette, wohingegen die IBMT Multi-Well Substrate mit Hilfe eines Nano-Plotters befüllt wurden. Dabei handelt es sich um einen Pipettierroboter vom Typ Nano-Plotter NP1.2 der Firma GeSiM mbH, Großerkmannsdorf. Der Nano-Plotter wurde unter einer Sterilbank (hera safe Hereus) betrieben. Durch piezoelektrische Mikropipetten (Nano-Tip, GeSiM mbH) kann das Kryoprotektivum reproduzierbar genau zugesetzt werden. Die Mikropipetten wurden vor und nach jeder Benutzung mit H_2O an einer Waschstation automatisch von innen und außen gereinigt. Aus einer 4-Well Platte erfolgte die Aufnahme des Kryoprotektivums in das System. Dafür wurde das sich im System befindliche H_2O automatisch einige Millimeter aus der Mikropipette zurückgezogen und dann in das Kryoprotektivum eingetaucht und aufgezogen. Der Tropfvorgang konnte über eine integrierte Kamera, mit Hilfe eines Stroboskops, überprüft werden, da selbst kleinste Mengen Luft im System den Dosiervorgang erheblich beeinflussen können. Das auf $4^\circ C$ vorgekühlte IBMT Multi-Well Kryosubstrat wurde manuell mit der Zellsuspension gefüllt (22,5 μl bei 10% DMSO Zugabe; 23,25 μl bei 7% DMSO Zugabe; 23,75 μl bei 5% DMSO Zugabe), auf eine Substrathalterung aufgeschoben und fixiert. Das System wurde über die Software NPC8 (Version 2.0, GeSiM mbH) gesteuert. Durch einen in x-, y- und z-Ebene beweglichen Pipettenkopf wurden die 30 Wells des Substrates genau angefahren und das Kryoprotektivum zugesetzt. Anschließend wurde das Substrat mit einem Deckel verschlossen und in einer MrFrosty® Isopropanol Box mit einem speziellen Einsatz für IBMT Multi-Well Kryosubstrate (Gefrierate von $1^\circ C$ pro Minute, Werkstatt IBMT Fraunhofer St. Ingbert) für 30 Minuten bei $4^\circ C$ vorinkubiert. Anschließend wurden die Boxen bei $-80^\circ C$ über Nacht und dann bei $-140^\circ C$ gelagert.

2.1.3.1 *Hanging droplet Sphäroide*

Mit der Technik der „*hanging droplet*“ Sphäroide (Ehrhart, F. et al., 2009) wurden aus primären humanen Hepatozyten multizelluläre 3-dimensionale Gebilde, so genannte Sphäroide erstellt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/ml für dieses Verfahren eingesetzt. In den Deckel einer unbeschichteten Petrischale (10cm Durchmesser) wurden ca. 50 sich nicht berührende Tropfen mit einem Volumen von $20 \mu\text{l}$ aufgebracht. Die Petrischale wurde mit ca. 10ml PBS gefüllt, um einer Verdunstung vorzubeugen. Anschließend wurde der Deckel zügig umgedreht und auf die Petrischale aufgesetzt. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2.4 zu sehen. Nach 3-5 Tagen wurden die Sphäroide bei einer Größe von ca. $100 \mu\text{m}$ geerntet. Die Tropfen wurden 3 mal 1ml Williams Medium abgewaschen und in einem 15ml Falcon Röhrchen gesammelt. Die schweren Sphäroide setzten sich am Boden des Falcon Röhrchen in 15 Minuten ab und konnten dann für weitere Experimente verwendet werden.

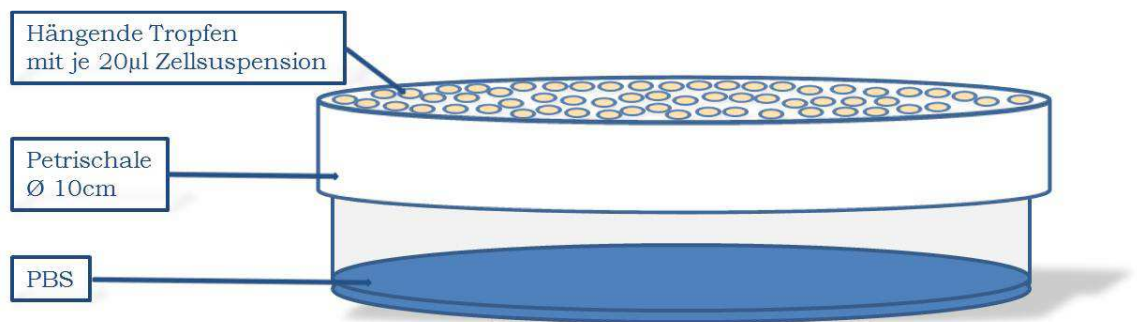


Abbildung 2.4

Schematische Darstellung einer Petrischale mit „*hanging droplet*“ Sphäroiden.

2.1.3.2 Kryokonservierung der primären Hepatozyten mit DMSO + Trehalose mit Hilfe der Elektroporation

Der Zucker Trehalose gehört zu den nicht-membrangängigen Kryoprotektiva, daher wurde hier die Methode der Elektroporation verwendet, um die Trehalose in die Zellen einzubringen.

Die primären Hepatozyten wurden nach der Präparation der Zellen gezählt und anschließend 2mal in Porationspuffer (7mM KCl + 286mM Trehalose + 1,2mM Puffermischung (19% KH_2PO_4 + 81% K_2HPO_4 bei pH 7,4)) gewaschen. Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml wurden in eine 800 μl Porationsküvette (4mm Gap Küvette, Eppendorf Hamburg) gegeben. In einem Multiporator[®] (Eppendorf, Hamburg) wurde die Zellmembran durch einen elektrischen Puls von definierter Dauer (75 μs) und Spannung (1200mV) eröffnet, um ein Eindringen der Trehalose in die Zelle zu ermöglichen. Direkt nach dem Vorgang der Elektroporation werden die Elektroporationsküvetten für 15 Minuten auf Eis gehalten, da sich die Zellmembran bei niedrigen Temperaturen langsamer wieder verschließt und somit mehr Trehalose in die Zelle eindringen kann. Anschließend wurden den Zellen 5%, 7% bzw. 10% DMSO zugesetzt und danach entweder in Kryoröhrchen oder in IBMT Multi-Well Kryosubstraten mit einer Gefrierate von $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ eingefroren, zunächst über Nacht bei -80°C und anschließend für die Lagerung über längere Zeiträume in flüssigen Stickstoff überführt.

2.1.4 Vitalitätsbestimmung nach der Kryokonservierung durch die Trypan Blau Ausschlussfärbung

Die primären humanen Hepatozyten wurden in 37°C warmen Wasser möglichst schnell aufgetaut, um Schäden der Zellen zu vermeiden. Findet der Vorgang des Auftauens zu langsam statt, kann es auch dann noch durch die Entstehung von Eiskristallen zu schwerwiegenden Zellschäden kommen. Ca. 10 Minuten nach dem Auftauen der Zellen wurde die Vitalität durch eine Trypan Blau Ausschlussfärbung bestimmt. Die 50µl Zellsuspension wurde mit 50µl Trypan Blau (20mg/ml) und 450µl Williams Medium vermischt. Mit einer Thoma Zählkammer wurde die Gesamtzahl der Zellen und die Anzahl toter Zellen ermittelt.

2.1.5 Durchflusszytometrie

2.1.5.1 Versuchsdurchführung

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde angewendet, um eine potentielle Erhöhung der Apoptose- und/oder Nekrose-Rate nach der Kryokonservierung festzustellen. Untersucht wurden primäre humane Hepatozyten nach der Kryokonservierung in Kryoröhrchen oder IBMT Multi-Well Substraten mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO als Kryoprotektivum. Als Kontrolle wurden frisch isolierte humane Hepatozyten eingesetzt. Zur positiven Kontrolle wurde mit 1% H₂O₂ Nekrose und 2µM Camptothecin Apoptose ausgelöst.

Sowohl aufgetaute sowie frische Hepatozyten wurden mit einer Dichte von 2x10⁶ Zellen/ml auf Petriperm® Schalen ausgesät. Die Überstände und die abgelösten Zellen wurden mit Annexin-Bindungspuffer gewaschen. Die Zellfärbung wurde nach dem Protokoll des „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I“ (BD Biosciences) durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte am *FACS LSR II Flow Cytometer* (BD Biosciences, Heidelberg) mit Hilfe der *BD FACSDiva* Software welche eine automatische Kompensation der Zellautofluoreszenz ermöglichte. Für jede Bedingung wurden 5000 bis 10 000 Zellen analysiert.

2.1.5.2 Auswertung

Die gewonnenen Rohdaten wurden durch die Software *BD FACSDiva* verarbeitet und anschließend mit Hilfe des Programms *FlowJo 7.5.4* analysiert und in *Pseudocolour Dotplots* aufgetragen.

2.1.6 Patch-Clamp Technik

Um die Aktivierung des HICC elektrophysiologisch zu messen, wurden *Patch-Clamp* Experimente in der *Whole-Cell Konfiguration* nach der zuvor beschriebenen Technik (Wehner, F. et al. 2003) durchgeführt. Neben Kontrollen an frisch isolierten humanen Hepatozyten wurden auch Experimente an humanen Hepatozyten durchgeführt, welche mit 10% DMSO in Kryoröhrchen kryokonserviert wurden. Sowohl frische, wie auch aufgetaute primäre Hepatozyten wurden auf mit Kollagen R beschichteten gaspermeablen Petriperm™ Schalen (Vivascience, Hannover) mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die Zellen wurden für einen Tag in Williams Medium E (+ L-Glutamine 5mmol, Glukose 0,06%, Hepes 11,5mmol, Na-Hepes 11,5mmol, Gentamycin 50µg/ml, Penicillin 50IU/ml, Streptomycin 50µg/ml, Inosine 37µmol, Hydrocortisone 4,8µg/ml, Insulin 1µg/ml, pH 7,4; 300mOsm) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Die Patch-Pipetten wurden aus 1,50mm OD und 1,17mm ID Borosilikat-Glas Kapillaren (Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge, UK) mit einem programmierbaren Pipettenpuller (DMZ-Universal Puller, Zeitz Instrumente, München) gezogen und wiesen Widerstände von 2,0–4,0 MΩ auf. Die Pipetten wurden mit Hilfe eines motorisierten Mikromanipulators (Luig und Neumann, Ratingen) positioniert. Ein Ag-AgCl Draht diente als Referenzelektrode. Das Offset der Pipette, der Reihenwiderstand und kapazitive Transienten wurden mit einem *Patch-Clamp Amplifier* (Axopatch 200A, Molecular Devices, Union City, USA) kompensiert. Die Datenaufzeichnung, Analyse, sowie die Kompensation von *Liquid junction* Potentialen wurde mit der Software pCLAMP 8.2 (Molecular Devices) durchgeführt. Die Ströme wurden bei 2kHz gefiltert und mit einem A-D Wandler (DigiData 1200B, Molecular

Devices) digitalisiert. Die Referenzspannung wurde bei -20mV gehalten, die Spannungsrampen wurden von -80mV bis +40mV mit einer Dauer von 1 Sekunde alle 10 Sekunden ausgelöst.

Die Patch Pipette wurde mit einer isotonen Hepes Lösung (26mM NaCl, 69mM Na-Gluconat, 1mM MgCl₂, 2mM TEA-Cl, 2mM Na₂ATP, 0,5mM Na₂GTP, 1mM EGTA, 10mM HEPES, pH Wert 7,3, 300mOsm mit Mannitol) befüllt. Die Badlösung (94mM NaCl, 6mM Na-Gluconat, 1mM CaCl₂* 2H₂O, 1mM MgCl₂, 2mM TEA-Cl, 10mM HEPES), welche die Zellen umspült, wurde unter isotonen Versuchsbedingungen durch den Zusatz von Mannitol auf 340mOsm eingestellt. Für den hypertonen Schock wurde eine Osmolarität von 450mOsm verwendet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit Hilfe der Goldman Gleichung (Goldman, D.E., 1943) konnten die relativen Leitfähigkeiten aus den Verschiebungen des Umkehrpotentials ermittelt werden.

$$U_M = \frac{RT}{FZ} \log \frac{P_{Na^+} \times [Na^+]_a + P_{K^+} \times [K^+]_a + P_{Cl^-} \times [Cl^-]_i}{P_{Na^+} \times [Na^+]_i + P_{K^+} \times [K^+]_i + P_{Cl^-} \times [Cl^-]_a}$$

R= universelle Gaskonstante, T= absolute Temperatur in Kelvin,
F= Faradaysche Konstante, P= Permeabilität

2.1.6 Molekularbiologische Methoden

2.1.7.1 Präparation von cDNA

Die Isolation der total RNA aus primären humanen Hepatozyten erfolgte nach dem Protokoll des *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche). Die RNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die reverse Transkription erfolgte nach dem Protokoll des *1st Strand cDNA Synthesis Kit* für RT-PCR (Roche). Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf 25°C gehalten, anschließend für eine Stunde auf 42°C erhitzt. Nach einem Erhitzen für 5 Minuten auf 99°C wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C eingefroren oder direkt für die real-time PCR eingesetzt.

2.1.7.2 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR wurde bei dem Verbundpartner des *μCryoLab* BMBF-Projektes *IPM Biotech GmbH*, Lademannbogen 61 in Hamburg durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es den Anstieg des PCR- Produktes, während der Amplifikationszyklen, durch einen Anstieg von Fluoreszenz, zu verfolgen. Der verwendete Marker, SYBR green, ein Cyaninfluoreszenzfarbstoff, bindet spezifisch an amplifizierte doppelsträngige cDNA. Anhand von Schmelzkurven wird die Produktspezifität überprüft.

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Standardprotokollen in einem LightCycler® System (Roche) mit einem LightCycler® SYBR green Master I Kit (Roche). Die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Computerprogramm.

2.2 HCC Zellen

2.2.1 Präparation von HCC Zellen

Die Gewebestücke eines hepatozellulären Karzinoms wurden von dem *µCryoLab* Verbundpartner *Indivumed-Zentrum für Krebsforschung am Israelitischen Krankenhaus Hamburg*, gewonnen und anschließend innerhalb weniger Stunden bei 4°C nach Dortmund überführt. Die Gewebestücke wurden zunächst mechanisch mit einer Schere zerkleinert und im Anschluss in 10ml RPMI Medium mit 1mg/ml Collagenase/Dispase (Roche Diagnostics) mit 5mM CaCl₂ für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem enzymatischen Verdau wurden die Gewebestücke durch einen 40mesch Filter (Cell dissociation sieve- Tissue Grinder Kit, Sigma) gegeben und übriges Gewebe aus dem Filter entfernt und mit Medium nachgespült. Anschließend wurde die Suspension durch einen 70µm Falcon-Filter (Cell Strainer, BD) gegeben und mit Medium nachgespült. Die HCC Zellen wurden durch zweimalige Zentrifugation für 5 Minuten bei 300g in 10 ml RPMI Medium gewaschen. Wenn das Pellet noch deutliche Blutanteile enthielt, wurde zusätzlich einmal bei 300g in 10ml PBS gewaschen. Danach wurde das Pellet in 100µl PBS aufgenommen und mit 2ml Erythrozyten-Lyse Reagenz (Easy Lyse, Dako) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in 2ml PBS für 5 Minuten bei 300g wurden die Zellen in einem definierten Volumen RPMI Medium mit 10% FKS aufgenommen. Mit einer Thoma Zählkammer wurde durch Zugabe von Trypan Blau (20mg/ml) die Gesamtzahl der HCC Zellen und die Anzahl toter Zellen ermittelt.

2.2.2 Kultivierung von HCC Zellen

Die primären HCC Zellen wurden nach der Isolation mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in Lab-Tek™ Kammern mit RPMI Medium 1640 (+) L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FKS und in Anwesenheit von Penicillin/Streptomycin (je 100µg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) ausgesät. Die HCC Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Experimente zur Volumenregulation durchgeführt.

2.3 HepG2 Zellen

2.3.1 Kultivierung von HepG2 Zellen

Die HepG2 Zellen (von Passage 5 bis 24) wurden in 10ml RPMI Medium 1640 (+) L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FKS und in Anwesenheit von Penicillin/Streptomycin (je 100µg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) in 75cm² Kulturflaschen (BD, Falcon, Heidelberg) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die HepG2 Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (PAN™ Biotech, Aidenbach) wurden die HepG2 Zellen mit 2ml Trypsin/EDTA (PAN™ Biotech, Aidenbach) nach 5-7 minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität erfolgte automatisch mit einem Zellzähler (Vi Cell™ XR). Die HepG2 Zellen mit einer Dichte von 1,5 bis 2×10^6 wurden wieder ausgesät und jeden 2. Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.3.2 Reverse Transfektion von HepG2 Zellen

Die verwendeten Lab-Tek™ Kammern (Nunc, Thermo Fisher Scientific) wurden zunächst mit Kollagen R (2mg/ml, Serva, Heidelberg) beschichtet. Die Kammern wurden mit 1,9ml PBS + 0,1ml Kollagen R für 20 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Lab-Tek™ Kammern zweimal mit PBS und zweimal mit H₂O gewaschen und anschließend unter der Sterilbank getrocknet.

Die siRNAs der Ionenkanäle und Transporter Bibliothek (Dharmacon, smartPool, Details siehe Anhang), wie auch die zusätzlich verwendeten siRNAs gegen die mechanosensitiven Transmembranproteine Piezo1 und Piezo2, wurden mit einer Konzentration von 20µM in siRNA Puffer (Dharmacon) gelöst und aliquotiert bei -20 bzw. Vorräte bei -80°C gelagert.

Die reverse Transfektion wurde nach dem Protokoll von Erfle, H. et al. 2007 durchgeführt. Für eine siRNA wurde zunächst ein Transfektionsansatz aus 3µl Optimem+GlutaMAX-I 0,4 Sucrose (O+G, Gibco), 3,5µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 2,8µl siRNA (20µM) erstellt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 7,5µl 0,2% Gelatine (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit 0,01% Fibronectin (Sigma-Aldrich) zugegeben.

Die verschiedenen siRNA Ansätze wurden in eine 384-Well Platte (Nunc, Thermo Fisher Scientific) pipettiert, kurz herunterzentrifugiert und in den vorgesehenen Halter des QArray² von Genetix eingelegt. Sowohl die 384-Well Platte als auch die Lab-Tek™ Kammern wurden mit einem angelegten Vakuum fixiert. Während es Aufdrückens der siRNA Spotts auf die Lab-Tek™ Kammern wurde eine Luftfeuchtigkeit von ca. 60% eingestellt. Der zum Drucken benutzte Pin hatte einen Durchmesser von 165µm, daher hatten auch die Spotts einen Durchmesser von ca. 165µm. Mit einer Eintauchtiefe von 180µm sowie

einer Eintauch- und Aufdruckdauer von 110ms sowie drei Wiederholung pro Spott, wurde das Probenraster auf die Lab-Tek™ Kammer aufgedruckt. Nach jedem Spott erfolgte ein Waschvorgang mit jeweils Wasser, Ethanol und abschließend Wasser. Wie in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt ist, wurde eine Lab-Tek™ Kammer mit 28 siRNA Spotts bedruckt, es konnten dann jeweils 7 verschiedene siRNAs mit 4 Parallelwerten vermessen werden. Die siRNAs wurden in variierenden Anordnungen aufgedruckt, um additive Effekte zu vermeiden. Zusätzlich wurden außerhalb der siRNA Spotts, drei Spotts mit Tinte (Stempelfarbe 29/7P-ST schwarz, Coloris) aufgedruckt, welche bei der späteren Durchführung des Screenings als Referenzpunkte im Mikroskop dienten. Da die einzelnen siRNAs der Bibliothek nicht fluoreszenzmarkiert waren, wurden auf jeder Lab-Tek™ Kammer vier Spotts mit Alexa 488 markierter negativer Kontroll-siRNA (AllStars negativ siRNA, Qiagen) aufgedruckt (vgl. Abbildung 2.5). Es wurden bis zu sechs Lab-Tek™ Kammern gleichzeitig bedruckt. Die Lab-Tek™ Kammer wurden dunkel, mit Silicat-Kugeln als Trockenmittel bei 4°C mindestens einen Tag zum vollständigen Trocknen gelagert. Eine Lagerung bis zu einer Woche war möglich.

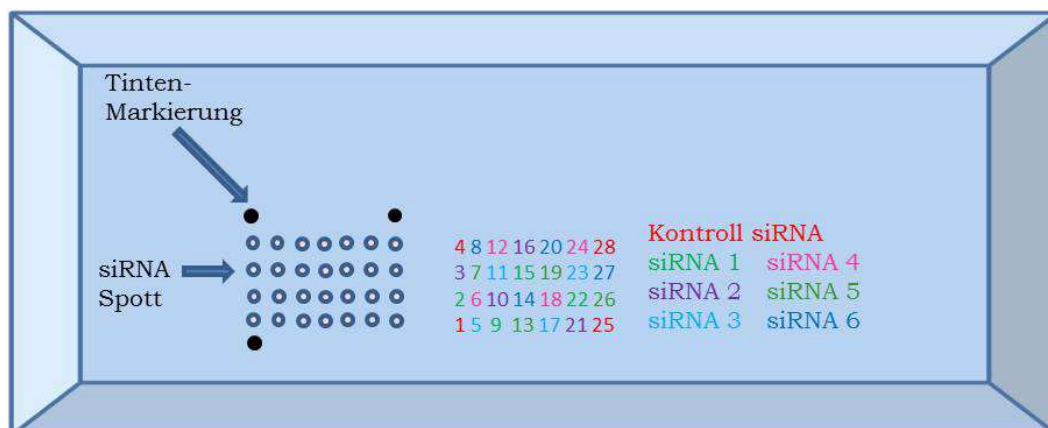


Abbildung 2.5:

Schematische Darstellung einer mit 7 verschiedenen siRNAs (je 4 Spotts) bedruckten Lab-Tek™ Glasbodenkammer.

Es wurden 2 ml HepG2 Zellen mit einer Dichte von $0,4$ bis $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI Medium 1640(+) L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) auf die bedruckten und vollständig trockenen Lab-Tek™ Kammern ausgesät. Nach einer Kultivierung von 3 Tagen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurden die weiteren Experimente durchgeführt.

2.4 Zeitaufgelöste akustische Mikroskopie

2.4.1 Messung des Zellvolumens an primären humanen Hepatozyten und HCC Zellen

Die Methode der zeitaufgelösten akustischen Mikroskopie ermöglicht es die Zellgeometrie zu erfassen und so das Zellvolumen und die akustische Impedanz von Zellen zu bestimmen.

2.4.1.1 Versuchsaufbau

Die Versuchskammer befand sich zunächst auf dem Kreuztisch eines inversen Mikroskops (Axiovert 10, Zeiss, D; siehe Abbildung 2.8 C), welches später durch ein ebenfalls inverses Mikroskop der Marke Olympus IX81 ersetzt wurde (siehe Abbildung 2.8, D & E). Das Mikroskop ist Bestandteil eines Cell^M Imaging Systems von Olympus. Die Versuchskammer bestand aus einer vorgefertigten Aussparung für ein Deckglas der Größe 3,2cm x 2,3cm, der Dicke 0,6 mm und einem Verschluss aus Plexiglas. Diese konnte über dem Präparat mit einer Gummidichtung fixiert werden. Die Versuchskammer hatte nach oben eine Öffnung mit einem Durchmesser von 10 mm, die sich nach oben hin in einem Winkel von 45° auf 19mm erweitert und verfügte über einen separaten Zu- und Ablauf für das Superfusat. Bei dem Perfusionssystem handelte es sich um ein geschlossenes System ohne Lösungsverlust. Circa 35ml des jeweiligen Superfusats befanden sich in Vorratsgefäßen. Die Temperierung der Lösungen wurde durch das

Durchfließen eines Peltier-Elements gewährleistet. Gerade die Temperatur stellte bei Lösungswechseln einen kritischen Punkt dar, da die Schallgeschwindigkeit auch von der Temperatur abhängt. Daher wurden das Mikroskop und der schwingungsgedämpfte Tisch (Newport) von einer Klimakammer (Kombination aus Werkstatt MPI Dortmund und EMBL Incubator GP 168, Heidelberg) umgeben, welche den Innenraum auf ca. $35 \pm 2^\circ\text{C}$ erwärmte. Gesteuert wurde der Lösungsfluss zunächst durch eine Perfusionspumpe mit 6-Wege Ventil (VICI M6), bevor mp6 Bartels Mikropumpen (Bartels Mikrotechnik GmbH, Dortmund) verwendet wurden. Da es sich bei diesem Perfusionssystem um ein geschlossenes System handelte, kam es beim Lösungswechsel zu einer Kontamination von 1%.

Die akustische Linse (Außen $\varnothing=7\text{mm}$) wurde mit Hilfe von Piezosteppern (High Power Amplifier Piezsystem, Jena, D), die auf Mikromanipulatoren befestigt waren, in die Versuchskammer eingesetzt. Eine digitale CCD Videokamera ORCA-ER der Firma Hamamatsu registrierte optische Bilder und übertrug diese an den PC (Fujitsu Siemens). Durch unter dem Kreuztisch angebrachte Leuchtdioden, konnte die Position der Linse auf dem Bildschirm (EIZO, Color Edge CD 19) verfolgt werden.

Ein elektrisch generierter Puls mit der Dauer von 1ns wurde durch eine piezoelektrische Schicht in ein akustisches Signal umgewandelt. Die akustische Welle wanderte durch die akustische Saphir-Linse und wurde auf die Zelloberfläche fokussiert. Das fokussierte akustische Signal wurde zum einen an der Oberseite der Zellen, zum anderen vom Substrat, dem Glas reflektiert. Die Signale wurden auf die Linse reflektiert und von einem piezoelektrischen Transducer wieder in ein elektrisches Signal gewandelt (Abbildung 2.6). Ein A/D-Wandler (Acqiris 10-bit Digitizer, Geneva, Schweiz) digitalisierte das empfangene Signal und übertrug es auf einen Computer (Transtec).

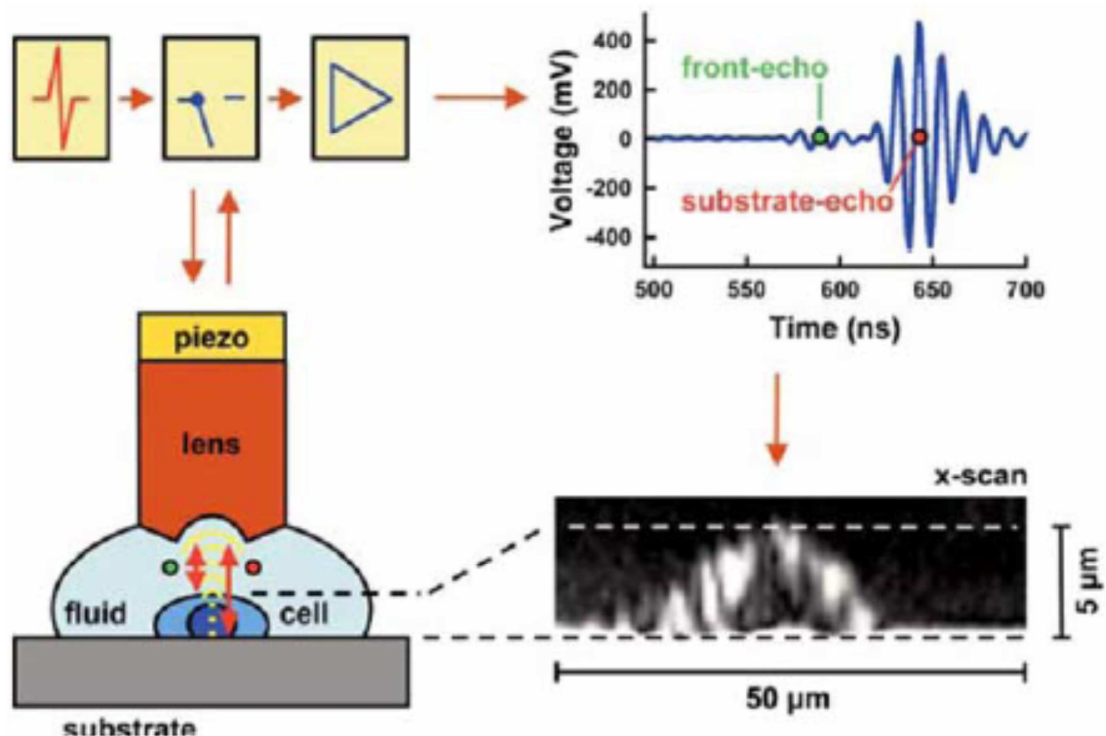


Abbildung 2.6:

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau für die zeitlich aufgelöste akustische Mikroskopie. Ein elektrisches Signal wird generiert, durch einen piezoelektrischen Film in eine akustische Welle konvertiert. An der akustischen Linse findet eine Fokussierung auf die Zelloberfläche statt. Das von der Zelloberfläche und dem Substrat reflektierte Signal wird durch die Linse zurück von einem piezoelektrischen Transducer in ein elektrisches Signal verwandelt und digitalisiert. (Eike C. Weiss, Frank Wehner, Robert M. Lemor, 2007)

Das mit dem Programm *SASAM Acoustic Investigator* (Fraunhofer Institut, St. Ingbert, D) verarbeitete Signal zeigte die zeitliche Auflösung der Signale. Das erste detektierte Signal E_1 stellte die Oberfläche der Zelle dar, das so genannte Frontecho. Dieses hat eine Ankunftszeit von $t_{\text{Frontecho}}$. Da die Entfernung zur Zelloberfläche geringer war als die Entfernung zum Substrat, wird das Substratecho

$E2$ mit der Ankunftszeit $t_{\text{Substratecho}}$ später detektiert (Abbildung 2.7). Die lokale Zelldicke d_{Zellen} ließ sich nach der Bestimmung der mittleren Schallgeschwindigkeit der Zellen von $c_{\text{Zellen}} = 1570 \text{ m/s}$ aus der Differenz der Ankunftszeiten berechnen.

$$d_{\text{Zellen}}(x,y) = c_{\text{Zellen}} (t_{\text{Substratecho}} - t_{\text{Frontecho}})$$

Das Zellvolumen V_{Zellen} ergibt sich durch die Integration über die Zelldicken.

$$V_{\text{Zellen}} = \sum_{x,y} d_{\text{Zellen}} \Delta x \Delta y ,$$

$\Delta x = \Delta y =$ Abstand der Messpunkte.

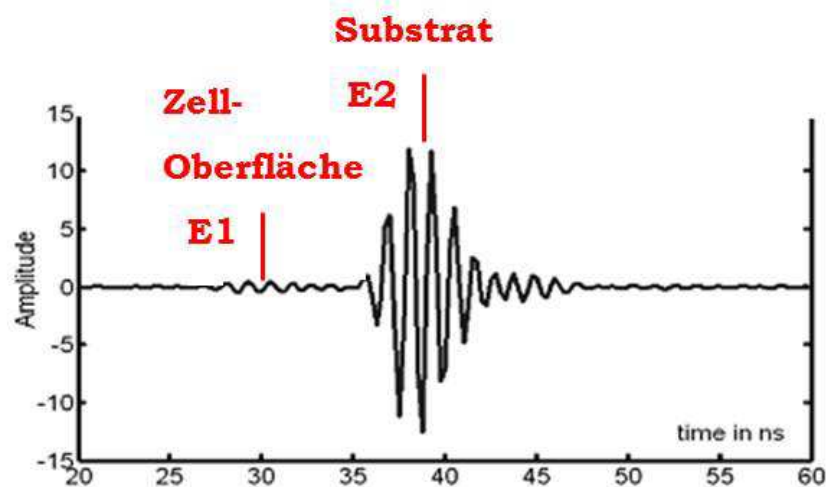


Abbildung 2.7:

Der große Ausschlag stellte das Echo des Substrates dar. Unmittelbar davor sind Ausschläge viel geringerer Amplitude sichtbar. Diese stellten das Echo der Zelloberfläche dar. (nach Eike C. Weiss, Frank Wehner, Robert M. Lemor, 2007, verändert)

Neben den bereits beschriebenen Signalen, wurden auch noch statische Signale registriert, die zum Beispiel aus internen Reflexionen der Linse stammten. Diese wurden durch den Menüpunkt „*Background-Substraction*“ mit dem Computerprogramm *SASAM Acoustic Researcher* subtrahiert, um die Reflexionen von Zelloberfläche und Substrat klar darstellen zu können.

2.4.1.2 Versuchsdurchführung mit primären humanen Hepatozyten und HCC Zellen

Zunächst wurden Kontrollmessungen mit frischen humanen Hepatozyten durchgeführt, die auf Glas subkonfluent angewachsen waren. Eine Perfusion fand mit 5mM HEPES gepufferter Tyrode (1,44mM NaCl, 2,68mM KCl, 1,05mM MgCl₂ x 6H₂O, 1,08mM CaCl₂ x 2H₂O, 2,5mM HEPES, 2,5mM Na-HEPES, 5,5mM NaH₂PO₄ x H₂O, 0,42mM Glucose x H₂O) statt. Von den Zellen wurde ein optisches Foto angefertigt, bevor die akustische Linse in die Versuchskammer eingesetzt wurde. Um die Linse zu erwärmen, wurde vor Messbeginn eine Perfusionszeit von mindestens 5 Minuten abgewartet. Alle 60 Sekunden wurde mit einer x-und y-Schrittweite von 2µm ein Scan mit einer Dauer von 27 Sekunden auf einer Fläche von 100 * 100µm durchgeführt, d.h. es wurden 2500 Messpunkte aufgenommen. Eine Versuchsdurchführung dauerte insgesamt 30 Minuten, davon entfielen 10 Minuten auf die Vorperiode mit einer Perfusion mit 5mM HEPES Tyrode 300mosmol, dann folgten 10 Minuten hypertonen Schocks mit 5mM HEPES Tyrode 400mosmol (+100mM Mannitol), gefolgt von einer Nachperiode mit erneut 5mM HEPES Tyrode 300mosmol.

2.4.2 SAM Screening mit HepG2 Zellen

2.4.2.1 Kombination von SASAM und Cell^M

Für die Durchführung eines Screenings mit einer siRNA Bibliothek waren umfangreiche Umbaumaßnahmen an dem System des akustischen Mikroskops notwendig. Es musste eine übergreifende Steuerung erstellt werden, welche es ermöglichte die Funktionen des Olympus Cell^M Mikroskops (Epifluoreszenzmikroskop) mit der Systemsteuerung des SASAM zu kombinieren. Dies machte die gleichzeitige Betrachtung sowohl optischer als auch mechanischer Eigenschaften der untersuchten Zell-Präparate möglich. Die Firma Kibero[®] hat dafür in enger Zusammenarbeit mit Olympus eine Software entwickelt. Zunächst die Olympus Cell^M Software Version gegen eine speziell angepasste Cell^P Software Version ausgetauscht, da nur diese für die nötigen Steuerung über RTS/CTS-Signale der seriellen Schnittstelle geöffnet werden konnte. Es musste eine Kommunikationsebene zwischen der SASAM Acoustic Investigator Software des akustischen Mikroskops und der Cell^P Software des Olympus Epifluoreszenzmikroskops hergestellt werden, damit es möglich wird die einzelnen Messungen zu starten und zu steuern. Die Einstellungen zur Erfassung von akustischen und optischen Daten werden jeweils in dem Steuerprogrammen SASAM Acoustic Investigator bzw. Olympus Cell^P vorgenommen. Die erzeugten Daten werden auf den jeweiligen Steuer-Computern gespeichert. Zusätzlich mussten die Corvus Steuerung des Mikroskoptisches, die Pumpe und das Ventil integriert werden. Dies wurde durch das Software Programm SASAM Experiment Control, von einem dritten Computer (Optiplex, DELL) aus, über serielle Schnittstellen geleistet (siehe schematische Darstellung Abbildung 2.8).

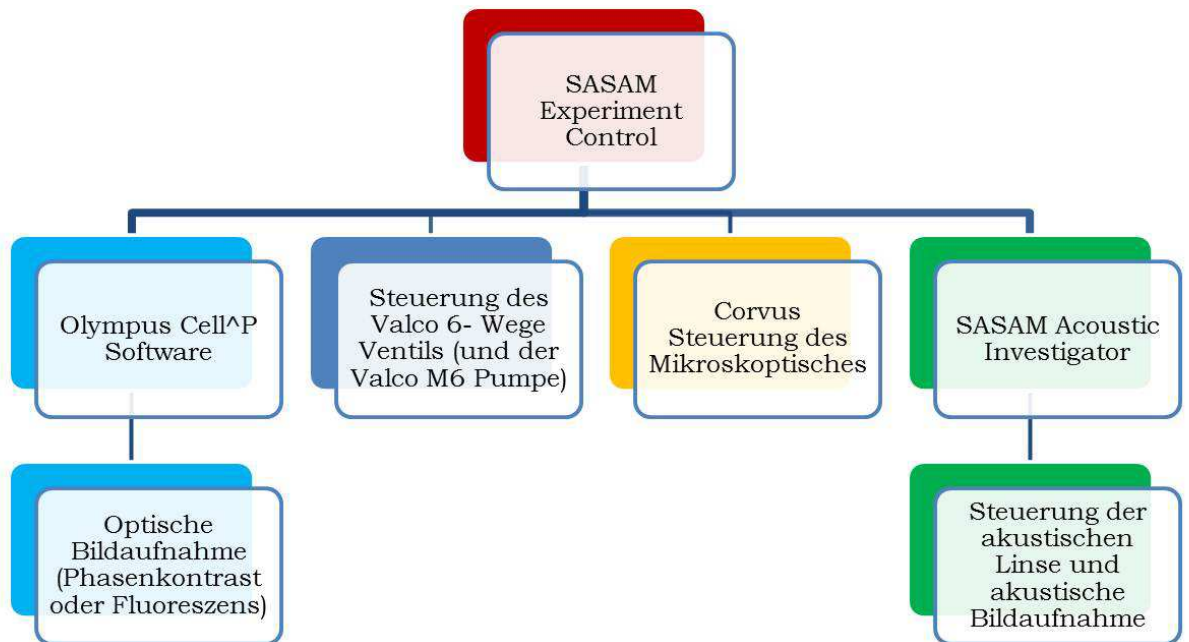


Abbildung 2.8:
Hierarchische Struktur zur Kombination aus Olympus Epifluoreszenzmikroskop und SASAM akustischem Mikroskop

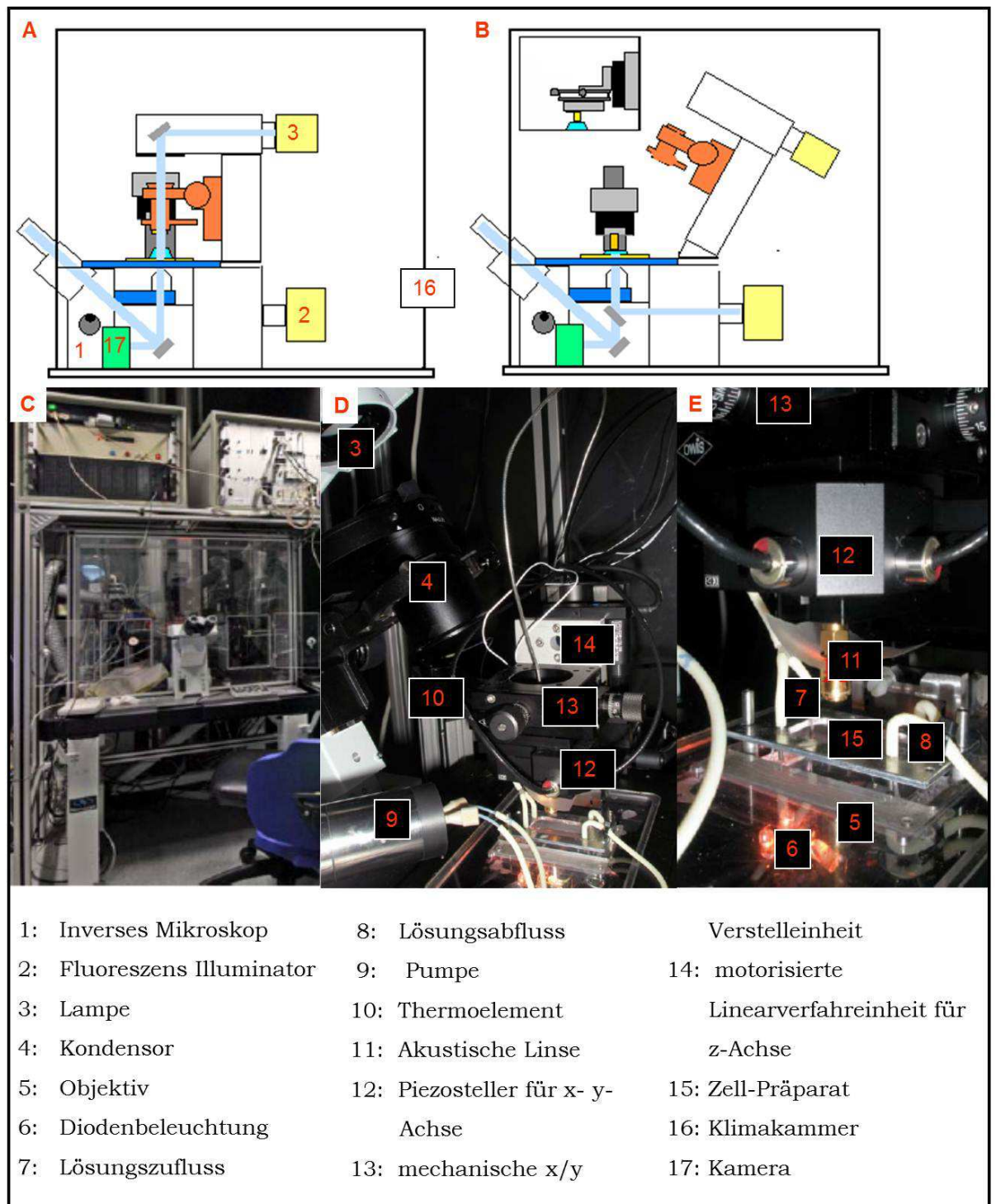


Abbildung 2.9

Aufbau des Akustischen Mikroskops

A: zeigt den Aufbau in Lichtmikroskopie-Konfiguration

B: hier wurde der Kondensator des Mikroskops nach hinten geklappt und die akustische Linse über die Probe gefahren

C: Aufbau des akustischen Mikroskops nach den umfangreichen Umbau- und Erweiterungsmaßnahmen

D+E: Detailaufnahmen des Objekthalters mit integriertem Perfusionssystem und der akustischen Linse

2.4.2.2 Versuchsdurchführung des Screening

Eine Lab-Tek™ Kammer mit transfizierten HepG2 Zellen wurde in die dafür vorgesehene Aussparung (5,8cm x 2,6cm) des Objekthalters eingesetzt und durch ein darin integriertes Zu- und Ablaufsystem mit Lösung gespült. Über die sich in der Klimakammer befindlichen Vorratsgefäße, wurde die Lösung bereits auf ca. 34°C vortemperiert, ehe sie das dem Objekthalter vorgeschaltete Peltier-Element durchfloss. Der Lösungsfluss wurde mit einer Pumpe (M6 VICI bzw. Bartels Mikrotechnik, Mikropumpe mp6) gesteuert. Die während des Druckens des siRNA Probenrasters aufgedruckten Tintenpunkte, dienten als Referenzpunkte in der Lab-Tek™ Kammer (siehe 2.3.2). Zusätzlich wurden immer 4 Spotts mit fluoreszenzmarkierter Kontroll-siRNA am Rand aufgedruckt. Diese dienten zum einen als Kontrollmessung, zum anderen konnten aber auch nur so die Positionen korrekt bestimmt werden. Aus drei am Rand des Probenrasters abgespeicherten Positionen wurden die weiteren 25 Positionen von dem Software Programm *SASAM Experiment Control* berechnet und während der Messung automatisch immer wieder angefahren. Nachdem die Positionen festgelegt waren, wurde die akustische Linse in die Versuchskammer eingesetzt und bis zu dem linsenabhängigen Arbeitsabstand (Linse 1: 40µm; Linse 2: 60µm; Linse 3: 30µm) über die Zellen gefahren. Um eine eventuelle Schiefelage des Substrates zu korrigieren wurden für drei am Rand des Probenrasters gelegene Positionen die optimale Fokussierung eingestellt und im Software Programm *SASAM Experiment Control* abgespeichert. Da schon Verkippen der Probe von weniger als 2µm messbare Amplitudenänderungen des akustischen Signals auslösen, wurde aus den Eckpunkten des Probenrasters unter der Annahme, dass die Probe eben ist, die Messpositionen für die optimale Fokussierung berechnet. Anschließend konnten in dem Software

Programm *SASAM Experiment Control* auch die Parameter der einzelnen Phasen einer Messung festgelegt werden, wie die Gesamtdauer einer Phase, die Flussgeschwindigkeit (nur bei VIVI M6 Pumpe, die Bartels Mikropumpe besitzt eine separate Steuereinheit), und die Dauer eines Messintervalls (z.B. bei 120sec Dauer eines Messintervalls und einer Gesamtdauer einer Phase von 20 Minuten, werden 10 Messintervalle durchlaufen).

Auf einer Fläche von $60\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$ pro Position (225 Pixel mit einer Kantenlänge von $3,978\mu\text{m} \times 3,978\mu\text{m}$) und einer Mittelung von 100x wurde die akustische Impedanz gemessen. Zunächst wurden unter isotonen Bedingungen (1,44mM NaCl, 2,68mM KCl, 1,05mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1,08mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5mM HEPES, 2,5mM Na-HEPES, 5,5mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,42mM Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$) für 15 Minuten alle 28 Positionen mit einer Dauer von je ca. 4,3 Sekunden gescannt. In der Summe dauert ein Messintervall für 28 Positionen 120 Sekunden. Somit konnten in 15 Minuten alle Positionen 7-8 mal gemessen werden. Nach 15 Minuten wurde das Superfusat ausgetauscht (+100mOsm), die Zellen schrumpften und der RVI wurde ausgelöst. Nach einer Zeitspanne von 20 Minuten und 10 Messungen pro Position, wurde erneut das Superfusat ausgetauscht, zurück zu isotonen 300mOsm. Auch in der isotonen Nachperiode wurden in 15 Minuten 7-8 Messungen pro Position durchgeführt. Eine Messung des Zellvolumens lieferte aufgrund der geringen Höhe von HepG2 Zellen keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

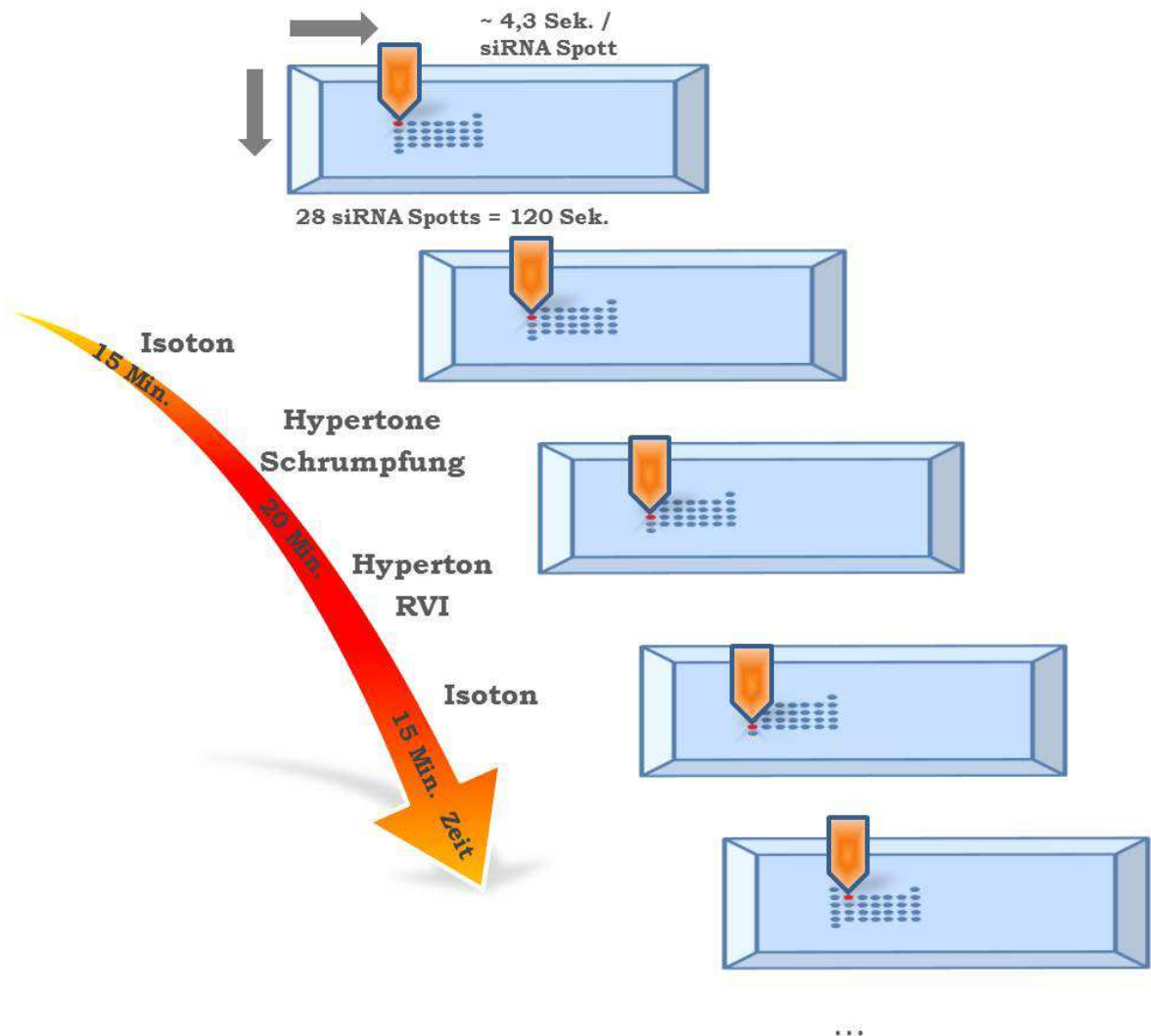


Abbildung 2.10:

Zeigt das Prinzip des siRNA Screenings.

Zuvor gespeicherte Positionen in einem Probenraster werden nacheinander mit einer zeitlichen Auflösung von 120 Sekunden vermessen. Nach definierten Zeiten werden Lösungswechsel durchgeführt und durch die zelluläre Volumenregulation die HICC Aktivierung initiiert. Die regulatorische Volumenzunahme (RVI) wurde quantifiziert um mögliche Interaktionspartner des HICC zu identifizieren.

2.4.3 Datenerfassung

Die Auswertung der Daten wurde mit der Software *SASAM Acoustic Researcher* durchgeführt. Diese wurde am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, Arbeitsgruppe Biomedizinische Ultraschall-forschung, St. Ingbert entwickelt und von der Firma Kibero GmbH, Saarbrücken, weiterentwickelt

2.5 Statistische Analysen

Es wurden Mittelwerte \pm SEM angegeben, die Anzahl der Einzelexperimente wurde mit n gekennzeichnet. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Student t-Test bei gepaarten und ungepaarten Bedingungen festgestellt. Signifikanzen wurden mit p-Werten $\leq 0,05$ gekennzeichnet: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Primäre Hepatozyten

3.1.1 Kryokonservierung der primären Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten, mit einer mittleren Vitalität von $71,30\% \pm 2,52\%$, wurden nach unterschiedlichen Protokollen kryokonserviert und anschließend die Vitalität mit einer Trypanblau Färbung (Abbildung 3.1) bestimmt.

Fraunhofer IBMT 30x25 μ l Multi-Well Substrate und konventionelle 2ml Kryoröhrchen dienten als Kryosubstrate. Neben den unterschiedlichen Kryosubstraten wurden auch 3 verschiedene DMSO Konzentrationen verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Absenkung der Konzentration des Kryoprotektivums DMSO von 10% DMSO zu 7% DMSO und 5% DMSO mit einer Verschlechterung der Vitalität nach dem Auftauen einhergeht (im Vergleich zu frischen humanen Hepatozyten $p < 0,001^{***}$). Zellen, die mit 10% DMSO in Kryoröhrchen eingefroren wurden, zeigten nach dem Auftauen eine absolute Vitalität von $47,88 \pm 1,79\%$ ($p < 0,001^{***}$), bei 7% DMSO wurde eine Vitalität von $23,75 \pm 3,17\%$ ($p > 0,001^{***}$) gemessen und mit 5% DMSO ($p < 0,001^{***}$) lag die Vitalität bei $15,50 \pm 2,10\%$.

Auch bei in IBMT Multi-Well Substraten eingefrorenen Zellen, konnte eine von der DMSO Konzentration abhängige Abnahme der Vitalität nach dem Auftauen gemessen werden. Bei 10% DMSO zeigten humane Hepatozyten eine Vitalität von $51,66 \pm 2,08\%$ ($p > 0,001^{***}$),

bei 7% DMSO lag die Vitalität bei $33,33 \pm 4,37\%$ ($p > 0,001^{***}$) und bei 5% DMSO wurde ein Wert von $21,33 \pm 1,86\%$ ($p > 0,001^{***}$) ermittelt.

In IBMT Multi-Well Substraten eingefrorene Zellen waren signifikant ($p > 0,01^{##}$) vitaler, als in konventionellen Kryoröhrchen eingefrorene Hepatozyten.

Auch die unterschiedliche Applikation des DMSO in die Zellsuspensionen könnte sich hier im Zusammenspiel mit den verschiedenen Substraten auswirken. Die Kryoröhrchen wurden per Hand mit einer Pipette befüllt, wohingegen in die IBMT Substrate das DMSO mit einem Nanoplotter dosiert wurde.

In beiden Fällen sank die Vitalität mit sinkender Konzentration des Gefrierschutzmittels DMSO ab.

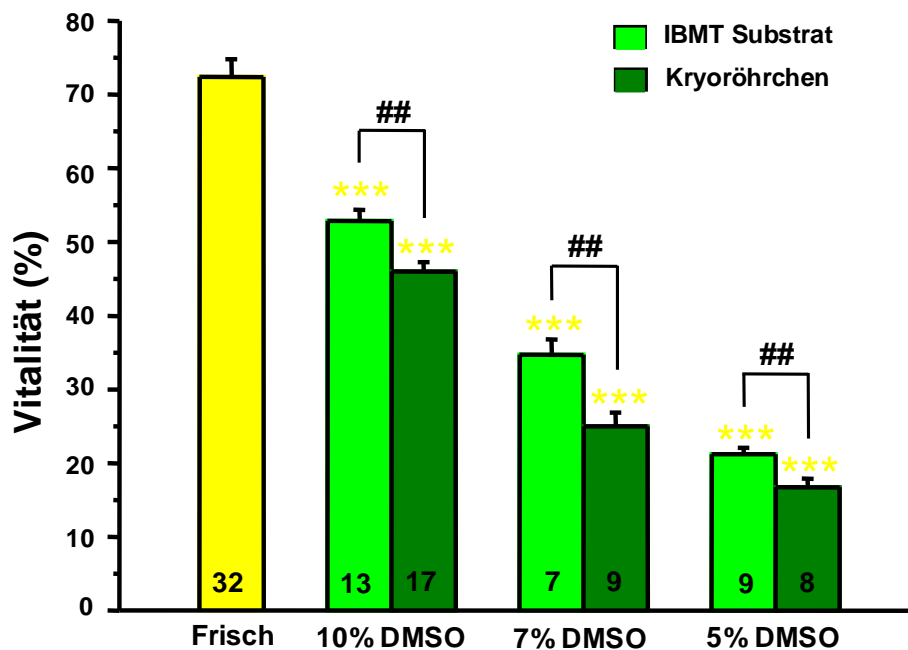


Abbildung 3.1:

Trypan Blau Färbung zur Bestimmung der Vitalität humaner Hepatozyten. Es wurden 3 verschiedene DMSO Konzentrationen (10%, 7%, 5%) sowie 2 Kryosubstrate (Kryoröhrchen, IBMT Multi-Well Substrat) verglichen. Signifikanzen: $p < 0,05^$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.*

3.1.2 Zeitaufgelöste akustische Mikroskopie

3.1.2.1 Kryokonservierung mit DMSO

Sowohl frische, wie auch aufgetaute primäre humane Hepatozyten wurden auf Glasobjektträgern kultiviert. Diese wurden in die Versuchskammer eingelegt und kontinuierlich mit Superfusat (5mM HEPES- Tyrode 300mosmol) umspült. Nachdem ein optisches Foto angefertigt und die akustische Linse in die Versuchskammer eingesetzt war, wurde für 30 Minuten, alle 60 Sekunden, eine akustische Messung durchgeführt. Eine Fläche von $100\mu\text{m} * 100\mu\text{m}$ wurde gescannt. Dabei entstanden 2500 Messpunkte mit einer Größe von $2\mu\text{m} * 2\mu\text{m}$. Aus den gemessenen Höhen wurde das Volumen berechnet.

Die ersten 10 Minuten fanden unter isotonen Bedingungen, die Messungen der Minuten 11- 20 unter hypertonen Bedingungen (5mM HEPES- Tyrode, 400mosmol) statt. Die Messungen der Minuten 21-30 der Nachperiode wurden erneut unter isotonen Bedingungen durchgeführt.

Das Zellvolumen unter isotonen Bedingungen wurde auf 100% gesetzt. Nach dem Wechsel auf hypertone Bedingungen machten die Zellen eine sehr schnelle, passive Zellschrumpfung (Wehner et al., 1995; Wehner and Tinel, 2000; Corasanti, Gleeson, and Boyer, 1990) auf $87,69 \pm 2,18\%$ ($p < 0,001^{***}$; $n = 13$) durch. (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.2).

Innerhalb von 10 Minuten hypertonen Schocks konnte durch die Aktivierung des RVI eine Rückregulation der Volumens auf $90,80 \pm 3,36\%$ absolut ($p < 0,05^*$) beobachtet werden. Der RVI betrug somit $31,71 \pm 16,26\%$. In der Nachperiode, bei erneut 300mOsmol, fand zunächst der umgekehrte Effekt, eine schnelle, passive Zellschwellung

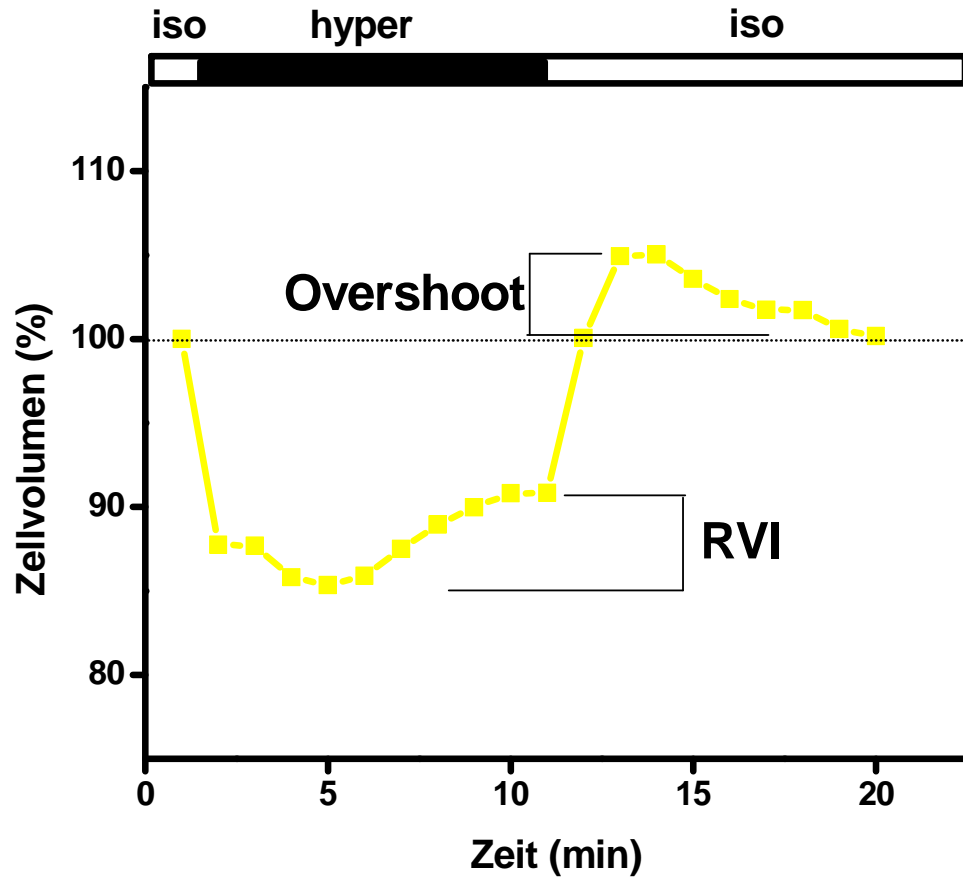
(Wehner and Tinel, 2000; Corasanti, Gleeson, and Boyer, 1990) statt. Durch die beim RVI aktivierten Leitfähigkeiten, wurden Osmolyte aufgenommen. Der schnelle Wechsel zu 300 mOsmol führte daher zu einem kurzzeitigen Schwellen der Zelle, da diese nun hyperten zum Außenmedium war. Dieser Effekt wurde „Overshoot“ genannt. Das Zellvolumen stieg bis auf $105,05 \pm 1,53$ %; ($p < 0,001^{***}$), um dann wieder auf $100,17 \pm 1,46$ %; ($p < 0,01^{**}$) abzusinken.

Tabelle 3.1

Die Tabelle zeigt die Veränderung des Zellvolumens bei Kontrollmessungen unter iso- und hypertonen Bedingungen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

Die Zellen wurden für 10 Minuten einer isotonen Umgebung ausgesetzt. Die gemittelten Messwerte der Minuten 8 bis 10 stellen die isotone Vorperiode dar. Die Messwerte 12 und 19 wurden unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die Werte 23 und 29 zeigen die isotone Nachperiode. Die Veränderungen des Zellvolumens unter hypertenem Schock wurden auf den Mittelwert der isotonen Vorperiode bezogen. ($n = 13$) Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

mOsm/l	Mess-Minute	Zellvolumen in %
300	MW 8-10	100
400	12	$87,69 \pm 2,18^{***}$
400	19	$90,80 \pm 3,36^*$
300	23	$105,05 \pm 1,53^{***}$
300	29	$100,17 \pm 1,46^{**}$

**Abbildung 3.2**

Die typische Veränderung des Zellvolumens unter Kontrollbedingungen nach hypertone Schock (+ 100 mOsm). Nach der passiven physikalischen Schrumpfung setzte eine aktive regulatorische Volumenzunahme unter hypertonen Bedingungen ein. Diese wird als RVI („regulatory volume increase“) bezeichnet und stellt einen funktionellen Nachweis für die Aktivierung der hypertone aktivierten Kationen Kanäle dar.

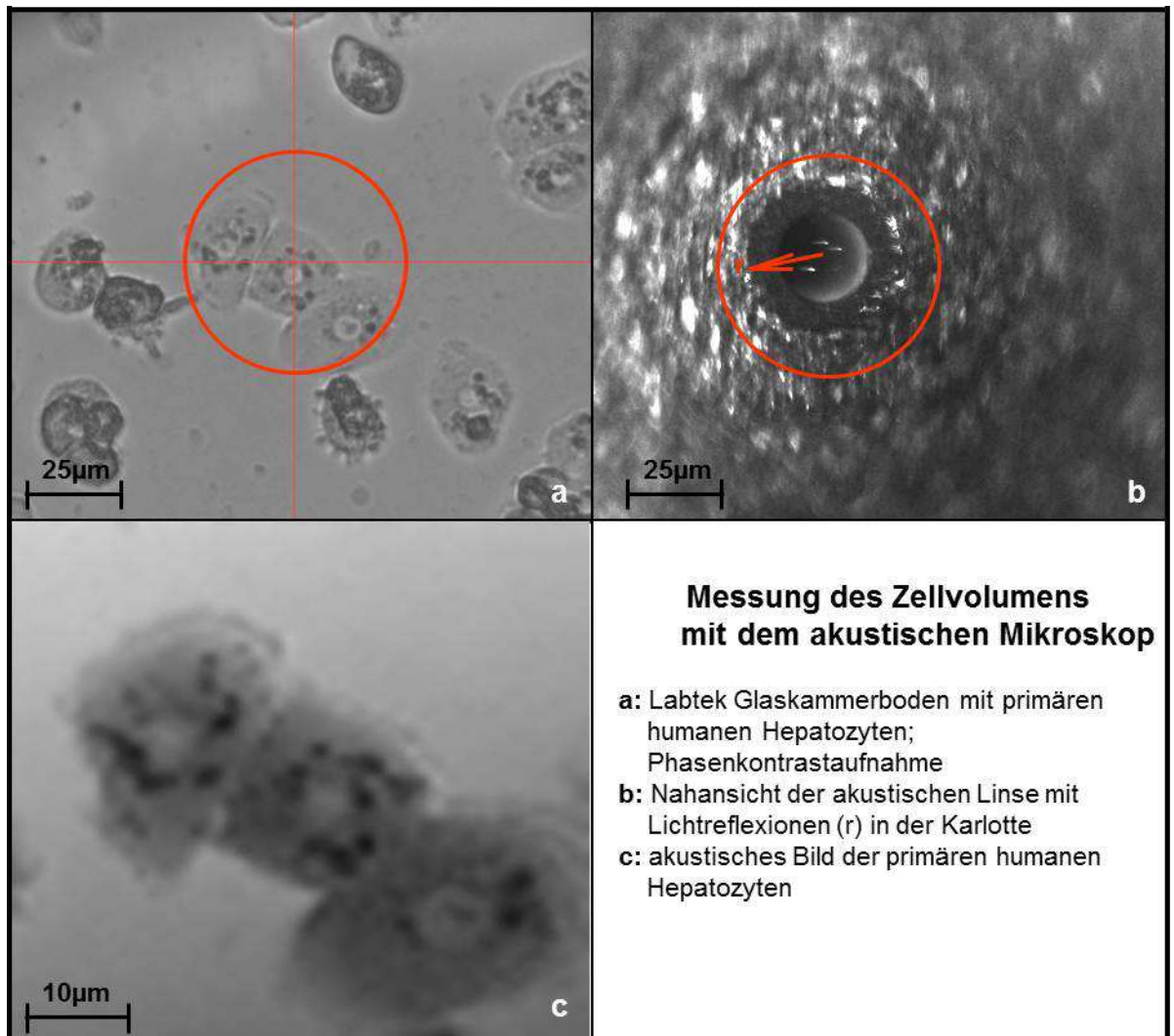


Abbildung 3.3:

Primäre humane Hepatozyten auf Glasbodenkammer.

3.1.2.1.1 Kryokonservierung mit DMSO

- Kryoröhrchen

Frisch präparierte, primäre humane Hepatozyten wurden nach der Zugabe von 5%, 7% oder 10% DMSO in konventionellen Kryoröhrchen bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml mit einer Gefriertrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ zunächst kryokonserviert, schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut und auf Kollagen R beschichteten Glasobjektträgern über Nacht kultiviert.

Mit der Methode der akustischen Mikroskopie sollte untersucht werden, ob eine sinkende Konzentration des Kryoprotektivums DMSO einen Einfluss auf die Vitalität (Liseth, K. et al., 2005) der überlebenden Zellen hat. Hypertoner Stress und die Fähigkeit der Zelle darauf mit den Mechanismen der Volumenregulation zu reagieren, wurde als Parameter für eine Beurteilung der Kryokonservierung eingesetzt.

Auf eine 10-minütige isotone Phase bei 300mOsm/l folgte ein 10-minütiger hypertoner Schock (+100mOsm/l). Einmal pro Minute wurde das Zellvolumen mit dem akustischen Mikroskop bestimmt. Die letzten 3 Messwerte vor dem Wechsel zu hypertonen Bedingungen (Mess-Minute 8 bis 10) wurden gemittelt und als 100% Wert des Zellvolumens festgelegt. Zunächst wurde unter hypertonen Bedingungen die starke Abnahme des Zellvolumens sichtbar. Innerhalb von 10 Minuten hypertonem Schock stieg das Volumen durch den RVI an. In Bezug auf die Schrumpfung wurde der RVI berechnet. Nach dem Wechsel zur isotonen Nachperiode stieg das Zellvolumen an und innerhalb von weiteren 10 Minuten sollte eine Rückregulation des Zellvolumens auf ca. 100% des Ausgangsvolumens stattfinden. Die Messwerte von mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO in konventionellen Kryoröhrchen eingefrorenen humanen Hepatozyten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2

*Die Tabelle zeigt die Veränderung des Zellvolumens von mit **5%, 7% und 10% DMSO im Kryoröhrchen** kryokonservierten humanen Hepatozyten sowie von Kontrollmessungen unter iso- und hypertonen Bedingungen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).*

Die Zellen wurden für 10 Minuten einer isotonen Umgebung ausgesetzt. Die gemittelten Messwerte der Minuten 8 bis 10 stellen die isotone Vorperiode dar. Die Messwerte 12 und 19 wurden unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die Werte 23 und 29 zeigen die isotone Nachperiode. Die Veränderungen des Zellvolumens unter hypertonem Schock wurden auf den Mittelwert der isotonen Vorperiode bezogen.

Signifikanzen: $p < 0,05^$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.*

mOsm /l	Mess - Min.	n=10 5% DMSO Kryoröhrchen Zellvolumen in %	n=6 7% DMSO Kryoröhrchen Zellvolumen in %	n=13 10% DMSO Kryoröhrchen Zellvolumen in %	n=13 Kontrolle Zellvolumen in %
300	MW 8-10	100	100	100	100
400	12	77,83 ± 4,79%**	72,20 ± 1,27%***	85,35 ± 1,51***	87,69 ± 2,18***
400	19	86,27 ± 4,37%***	87,97 ± 3,88% **	95,35 ± 1,50***	90,80 ± 3,36*
300	23	111,81 ± 3,61%***	121,63 ± 3,18% *	114,83 ± 3,28***	105,05 ± 1,53***
300	29	104,09 ± 7,58%	117,58 ± 6,08%	117,03 ± 4,66	100,17 ± 1,46**
RVI in %		44,35 ± 16,58%	47,15 ± 5,52%	53,88 ± 7,78%.	31,71 ± 16,26 %.

Bei allen durchgeführten Experimenten mit Kontrollzellen, als auch mit kryokonservierten Zellen (5%, 7% und 10% DMSO) sind die Antworten auf hypertonen Stress, der RVI nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings sind sowohl bei mit 5%, 7% und 10% DMSO kryokonservierten Zellen signifikante Unterschiede zur Kontrolle in der isotonen Nachperiode vorhanden (siehe Abbildung 3.4).

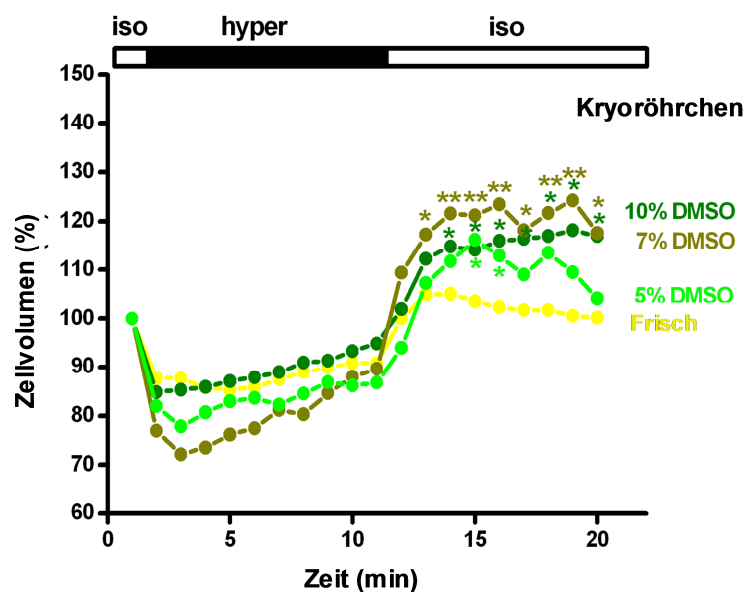


Abbildung 3.4 zeigt die mittlere Veränderung des Zellvolumens in % von in Kryoröhrchen mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO kryokonservierten humanen Hepatozyten im Vergleich zu frisch isolierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm). Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

3.1.2.1.2 Kryokonservierung mit DMSO - IBMT Multi-Well Substrat

Nach dem identischen Versuchsprotokoll wurden auch primäre humane Hepatozyten untersucht, die nach der Zugabe von 5%, 7% oder 10% DMSO in IBMT Multi-Well Substraten kryokonserviert wurden. Die Messwerte für das Zellvolumen unter isotonen und hypertonen Bedingungen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3

Die Tabelle zeigt die Veränderung des Zellvolumens von mit **5%, 7% und 10% DMSO im IBMT Multi-Well Kryosubstrat** kryokonservierten humanen Hepatozyten sowie von Kontrollmessungen unter iso- und hypertonen Bedingungen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

Die Zellen wurden für 10 Minuten einer isotonen Umgebung ausgesetzt. Die gemittelten Messwerte der Minuten 8 bis 10 stellen die isotone Vorperiode dar. Die Messwerte 12 und 19 wurden unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die Werte 23 und 29 zeigen die isotone Nachperiode. Die Veränderungen des Zellvolumens unter hypertone Schock wurden auf den Mittelwert der isotonen Vorperiode bezogen.

Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

mOsm /l	Mess - Min.	n=3 5% DMSO IBMT Multi-Well Substrat Zellvolumen in %	n=7 7% DMSO IBMT Multi-Well Substrat Zellvolumen in %	n=7 10% DMSO IBMT Multi-Well Substrat Zellvolumen in %	n=13 Kontrolle Zellvolumen in %
300	MW 8-10	100	100	100	100
400	12	78,48 ± 9,38%*	81,78 ± 3,07%**	82,14 ± 4,54% **	87,69 ± 2,18***
400	19	80,83 ± 9,68%*	88,08 ± 3,43% *	88,09 ± 2,99% *	90,80 ± 3,36*
300	23	126,95 ± 11,62%*	115,21 ± 6,80% **	104,04 ± 3,78%**	105,05 ± 1,53***
300	29	120,72 ± 2,85%	107,56 ± 8,09%	100,83 ± 2,55%	100,17 ± 1,46**
RVI in %		20,17 ± 11,37%.	44,98 ± 17,23%	33,71 ± 9,39%.	31,71 ± 16,26 %.

Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede beim RVI gemessen werden. Es zeigte sich, dass bei fallender DMSO Konzentration eine zunehmende Dysregulation in der isotonen Nachperiode auftrat (siehe Abbildung 3.5).

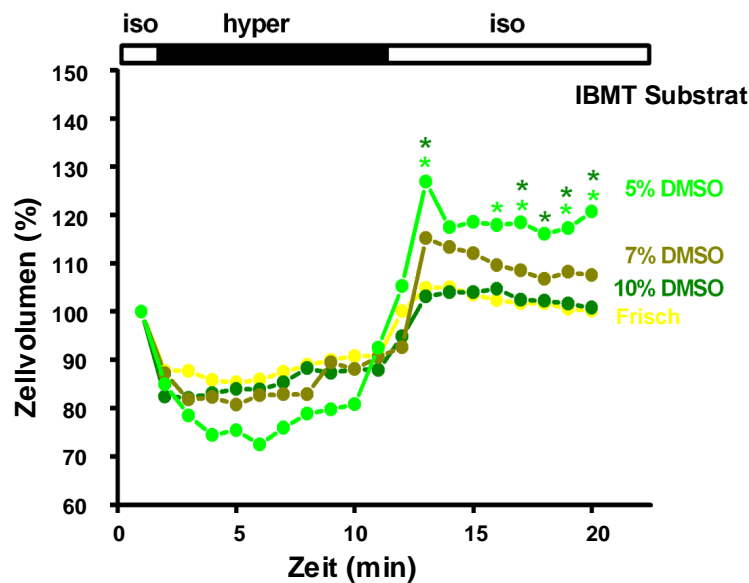


Abbildung 3.5 zeigt die mittlere Veränderung des Zellvolumens in % von in IBMT Multi-Well Kryosubstraten mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO kryokonservierten humanen Hepatozyten, im Vergleich zu frisch isolierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm). Signifikanzen: $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***.

Im direkten Vergleich zeigt sich jedoch klar der Unterschied zwischen den mit 10% DMSO in Kryoröhrchen und den mit 10% DMSO in IBMT Multi-Well Substraten kryokonservierten Zellen. Während die mit 10% DMSO in IBMT Multi-Well Substraten kryokonservierten Zellen einen nahezu identischen Kurvenverlauf wie die Kontrollzellen zeigen, wurde bei den mit 10% DMSO in Kryoröhrchen kryokonservierten Zellen eine signifikante Abweichung in der isotonen Nachperiode festgestellt (siehe Abbildung 3.6).

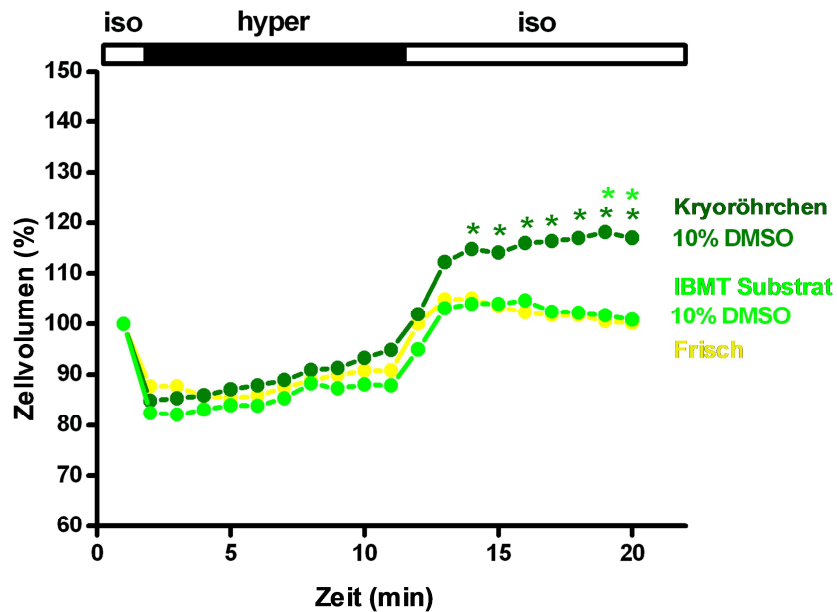


Abbildung 3.6 zeigt die mittlere Veränderung des Zellvolumens in % von in Kryoröhrchen und von in IBMT Multi-Well Kryosubstraten mit jeweils 10% DMSO kryokonservierten humanen Hepatozyten im Vergleich zu frisch isolierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm). Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

Diese Ergebnisse machen die Überlegenheit der Kryokonservierung in IBMT Multi-Well Kryosubstraten gegenüber den konventionellen Kryoröhrchen klar. Es sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden Verfahren erkennbar.

3.1.2.2 Kryokonservierung mit DMSO + Trehalose

3.1.2.2.1 Kryoröhrchen

Humane Hepatozyten wurden neben dem Kryoprotektivum DMSO mit dem natürlichen Kryoprotektivum Trehalose behandelt. Die nicht-membrangängige Trehalose wurde durch Elektroporation in die Zellen eingebracht. Es wurden auch hier Kryoröhrchen und IBMT

Multi-Well Substrate mit 5%, 7% und 10% DMSO eingesetzt. Die Messwerte des Zellvolumens unter isotonen sowie hypertonen Bedingungen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4

Die Tabelle zeigt die Veränderung des Zellvolumens von mit **5%, 7% und 10% DMSO im Kryoröhrchen + Trehalose** kryokonservierten humanen Hepatozyten sowie von Kontrollmessungen unter iso- und hypertonen Bedingungen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

Die Zellen wurden für 10 Minuten einer isotonen Umgebung ausgesetzt. Die gemittelten Messwerte der Minuten 8 bis 10 stellen die isotope Vorperiode dar. Die Messwerte 12 und 19 wurden unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die Werte 23 und 29 zeigen die isotope Nachperiode. Die Veränderungen des Zellvolumens unter hypertonem Schock wurden auf den Mittelwert der isotonen Vorperiode bezogen.

Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

mOsm /l	Mess - Min.	n=4 5% DMSO + Trehalose Kryoröhrchen Zellvolumen in %	n=4 7% DMSO+ Trehalose Kryoröhrchen Zellvolumen in %	n=7 10% DMSO+ Trehalose Kryoröhrchen Zellvolumen in %	n=13 Kontrolle Zellvolumen in %
300	MW 8-10	100	100	100	100
400	12	55,42 ± 16,90%	76,79 ± 22,50%	85,57 ± 5,11%	87,69 ± 2,18***
400	19	56,76 ± 2,96%	85,39 ± 30,01 %	86,21 ± 5,06%	90,80 ± 3,36*
300	23	83,38 ± 18,75%	119,15 ± 22,46%	111,01 ± 6,75%	105,05 ± 1,53***
300	29	91,33 ± 27,31 %	114,62 ± 26,97%	119,86 ± 8,90%	100,17 ± 1,46**
RVI in %		75,55 ± 59,08%.	19,48 ± 13,97%		31,71 ± 16,26 %.

Die Messwerte von mit 5%, 7% bzw. 10% (Abbildung 3.7) DMSO + Trehalose im Kryoröhrchen eingefrorenen Hepatozyten wurden im direkten Vergleich zu den zuvor beschriebenen Versuchen mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO (Abbildung 3.4) einzeln dargestellt.

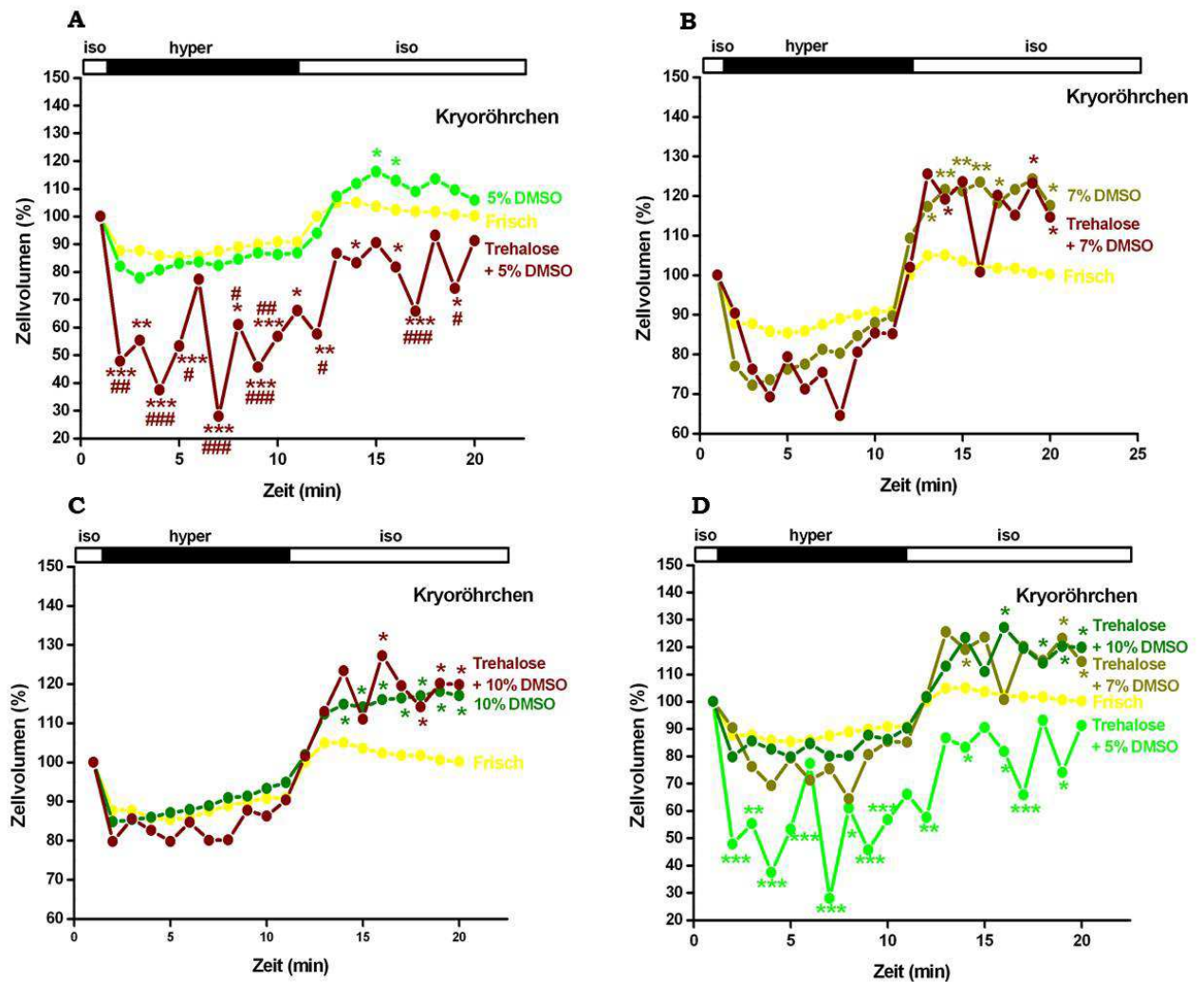


Abbildung 3.7 zeigt die mittlere Veränderung des Zellvolumens in %.. Dargestellt ist die Volumenregulation von kryokonservierten humanen Hepatozyten mit **A**: 5% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Änderung des Zellvolumens von frisch isolierten humanen Hepatozyten und mit 5% DMSO in Kryoröhrchen kryokonservierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) dargestellt. **B**: 7% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Änderung des Zellvolumens von frisch isolierten humanen Hepatozyten und mit 7% DMSO in Kryoröhrchen kryokonservierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) dargestellt. **C**: 10% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Änderung des Zellvolumens von frisch isolierten humanen Hepatozyten und mit 10% DMSO in Kryoröhrchen kryokonservierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) dargestellt. **D**: Dargestellt ist die Änderung des Zellvolumens von kryokonservierten humanen Hepatozyten mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Volumenregulation von frisch isolierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) gezeigt.

Zum direkten Vergleich mit frischen humanen Hepatozyten, wurden in Abbildung 3.7 D die zuvor beschriebenen Ergebnisse von 5%, 7% bzw. 10% DMSO + Trehalose gemeinsam dargestellt.

Es wird deutlich, dass neben DMSO die zusätzliche Verwendung von Trehalose als Kryoprotektivum im Kryoröhrchen, in keiner der getesteten Bedingungen, eine Verbesserung der Dysregulation in der isotonen Nachperiode bewirkte. Eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.10 A dargestellt.

3.1.2.2.2 IBMT Multi-Well Substrat

Es wurden auch hier IBMT Multi-Well Substrate mit 5%, 7% und 10% DMSO zur Kryokonservierung verwendet, welche neben dem Kryoprotektivum DMSO mit dem natürlichen Kryoprotektivum Trehalose behandelt. Die HICC Aktivierung nach hypertone Schok wurde funktionell durch die Messung des Zellvolumens bestimmt. Die Messwerte des Zellvolumens unter isotonen sowie hypertonen Bedingungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5

*Die Tabelle zeigt die Veränderung des Zellvolumens von mit **5%, 7% und 10% DMSO + Trehalose im IBMT Multi-Well Kryosubstrat** kryokonservierten humanen Hepatozyten sowie von Kontrollmessungen unter iso- und hypertonen Bedingungen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).*

Die Zellen wurden für 10 Minuten einer isotonen Umgebung ausgesetzt. Die gemittelten Messwerte der Minuten 8 bis 10 stellen die isotope Vorperiode dar. Die Messwerte 12 und 19 wurden unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die Werte 23 und 29 zeigen die isotope Nachperiode. Die Veränderungen des Zellvolumens unter hypertone Schok wurden auf den Mittelwert der isotonen Vorperiode bezogen. Signifikanzen: $p < 0,05^$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.*

mOsm /l	Mess - Min.	n=5 5% DMSO + Trehalose IBMT Multi-Well Substrat Zellvolumen in %	n=3 7% DMSO + Trehalose IBMT Multi-Well Substrat Zellvolumen in %	n=3 10% DMSO + Trehalose IBMT Multi-Well Substrat Zellvolumen in %	n=13 Kontrolle Zellvolumen in %
300	MW 8-10	100	100	100	100
400	12	90,12 ± 7,51%	59,37 ± 12,62%	68,94 ± 6,45 %	87,69 ± 2,18***
400	19	89,93 ± 7,19%	62,64 ± 9,35%	74,88 ± 23,54 %	90,80 ± 3,36*
300	23	114,92 ± 17,30%	98,09 ± 4,39%	112,64 ± 26,48 %	105,05 ± 1,53***
300	29	104,05 ± 5,20%	90,43 ± 3,74%	119,84 ± 25,43 %	100,17 ± 1,46**
RVI in %		137,41 ± 308,87%	83,02 ± 44,85%	53,20 ± 76,13 %	31,71 ± 16,26 %.

Die Messwerte von mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO + Trehalose im Kryoröhrchen eingefrorenen Hepatozyten wurden im direkten Vergleich zu den zuvor beschriebenen Versuchen mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO (Abbildung 3.5) einzeln in Abbildung 3.8 dargestellt.

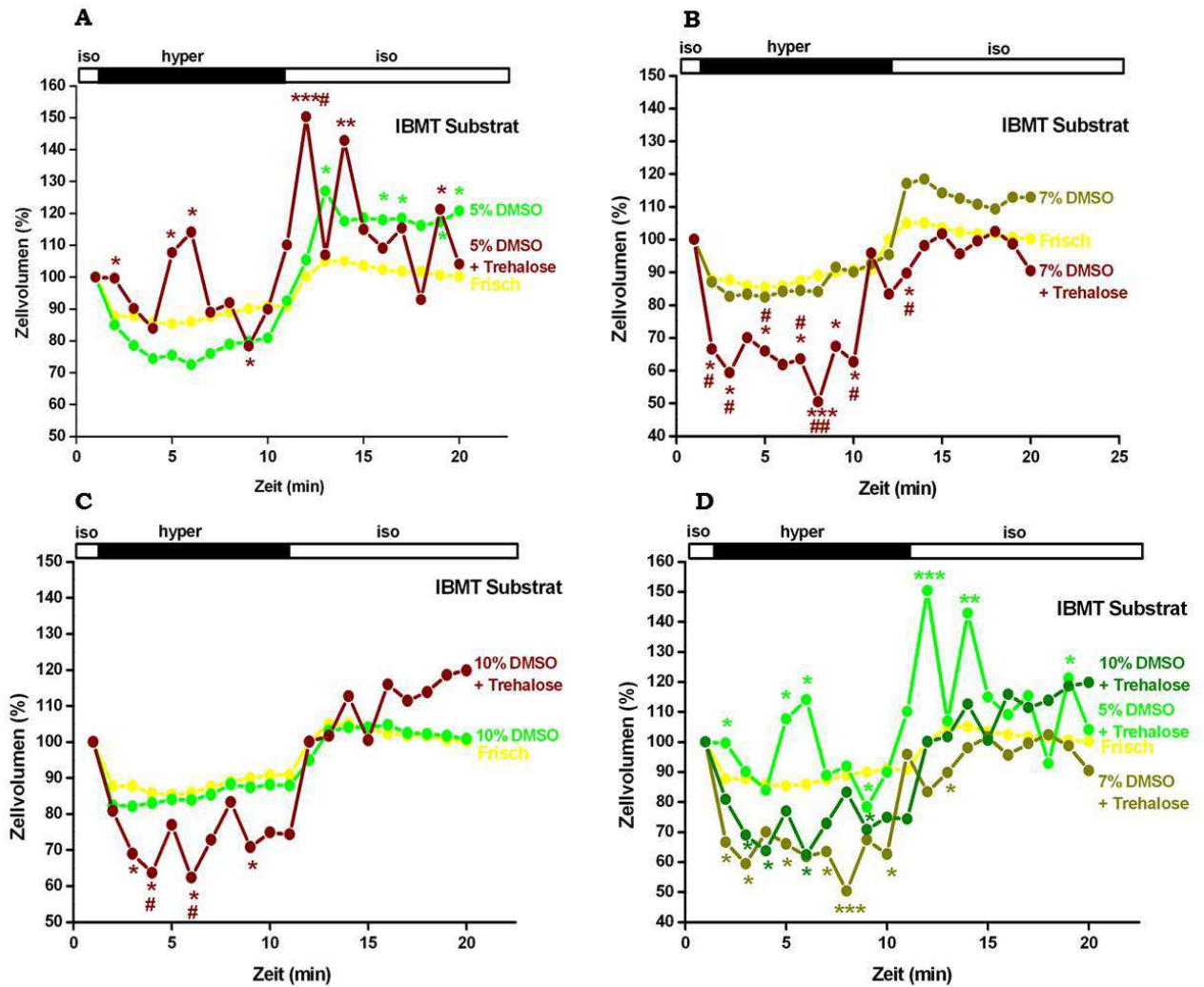


Abbildung 3.8 zeigt die mittlere Veränderung des Zellvolumens in %. Dargestellt ist die Volumenregulation von kryokonservierten humanen Hepatozyten mit **A:** 5% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Änderung des Zellvolumens von frisch isolierten humanen Hepatozyten und mit 5% DMSO im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) dargestellt. **B:** 7% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Änderung des Zellvolumens von frisch isolierten humanen Hepatozyten und mit 7% DMSO im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) dargestellt. 5% DMSO. **C:** 10% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Änderung des Zellvolumens von frisch isolierten humanen Hepatozyten und mit 10% DMSO im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) dargestellt. **D:** Dargestellt ist die Änderung des Zellvolumens von kryokonservierten humanen Hepatozyten mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose (nach Elektroporation). Im Vergleich ist die Volumenregulation von frisch isolierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm) gezeigt.

Zum direkten Vergleich wurde die mittleren Veränderungen des Zellvolumens der mit 5%, 7% und 10% + Trehalose in IBMT Multi-Well Substraten kryokonservierten humanen Hepatozyten gemeinsam in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3.8 D).

Es wird deutlich, dass die zusätzliche Verwendung von Trehalose als Kryoprotektivum, neben DMSO, im IBMT Multi-Well Substrat, in keiner der getesteten Bedingungen eine Verbesserung der bewirkte. Auch die zuvor deutliche Überlegenheit des IBMT Multi-Well Substrates mit 10% DMSO, kann bei zusätzlicher Verwendung von Trehalose nicht mehr gezeigt werden.

3.1.2.2.3 Vergleich des RVI und der isotonen Nachperiode

Es wird deutlich, dass die erfolgreiche Aktivierung des HICC nach hypertonem Schock nicht von der Verwendung des Kryosubstrates oder der DMSO Konzentration abhängig ist. Alle gemessenen RVI Werte sind nicht signifikant unterschiedlich voneinander. Die Messwerte sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6

Die Tabelle zeigt den RVI von mit 5%, 7% und 10% DMSO im IBMT und 5%, 7% und 10% DMSO + Trehalose im Kryoröhrchen und im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten sowie von Kontrollen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

Kryoröhrchen	RVI	IBMT Multi-Well	RVI
Kontrolle	31,71 ± 16,26 %	Kontrolle	31,71 ± 16,26 %
5% DMSO	44,35 ± 16,58%	5% DMSO	20,17 ± 11,37%.
7%DMSO	47,15 ± 5,52%	7%DMSO	44,98 ± 17,23%
10%DMSO	53,88 ± 7,78%.	10%DMSO	33,71 ± 9,39%.
5%DMSO + Trehalose	75,55 ± 59,08%.	5%DMSO + Trehalose	137,41 ± 308,87%
7%DMSO + Trehalose	19,48 ± 13,97%	7%DMSO + Trehalose	83,02 ± 44,85%
10%DMSO+ Trehalose		10%DMSO + Trehalose	53,20 ± 76,13 %

In Abbildung 3.9 sind die RVI Werte aller untersuchten Bedingungen in Balkendiagrammen dargestellt.

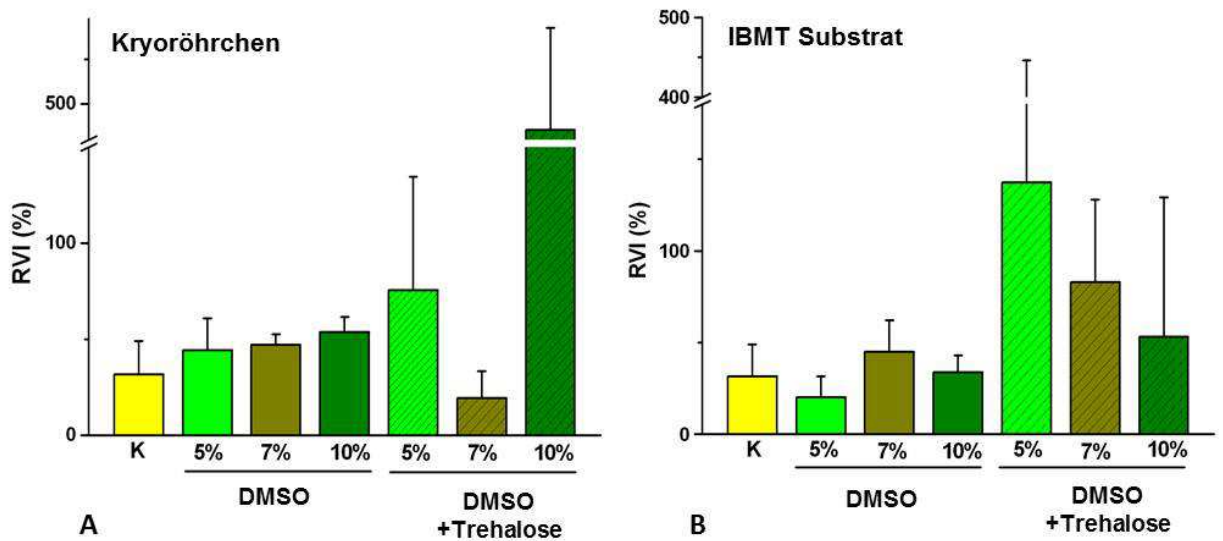


Abbildung 3.9 zeigt die mittleren RVI-Werte nach hypertonem Schock im Vergleich von mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO sowie mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose kryokonservierten humanen Hepatozyten. Als Kontrolle sind frisch isolierte humane Hepatozyten dargestellt. **A:** Kryoröhrchen; **B:** IBMT Multi-Well Substrat

Es konnten keine Unterschiede in der HICC Aktivierung durch die Bestimmung des RVI festgestellt werden. Allerdings in der isotonen Nachperiode nach dem hypertonen Schock, wurden Unterschiede in Abhängigkeit von der DMSO Konzentration und des verwendeten Kryosubstrat beobachtet. In Tabelle 3.7 sind die Zellvolumina aller untersuchten Bedingungen nach 10 minütiger isotoner Nachperiode zusammengefasst.

Tabelle 3.7

Die Tabelle zeigt das mittlere Zellvolumen nach 10 minütiger isotoner Nachperiode von mit 5%, 7% und 10% DMSO im IBMT und 5%, 7% und 10% DMSO + Trehalose im Kryoröhrchen und im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten sowie von Kontrollen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

Kryoröhrchen	Zellvolumen	IBMT Multi-Well	RVI
Kontrolle	100,17 ± 1,46**	Kontrolle	100,17 ± 1,46**
5% DMSO	104,09 ± 7,58%	5% DMSO	120,72 ± 2,85%
7%DMSO	117,58 ± 6,08%	7%DMSO	107,56 ± 8,09%
10%DMSO	117,03 ± 4,66	10%DMSO	100,83 ± 2,55%
5%DMSO + Trehalose	91,33 ± 27,31 %	5%DMSO + Trehalose	104,05 ± 5,20%
7%DMSO + Trehalose	114,62 ± 26,97%	7%DMSO + Trehalose	90,43 ± 3,74%
10%DMSO+ Trehalose	119,86 ± 8,90%	10%DMSO + Trehalose	119,84 ± 25,43 %

Wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist, haben die Kontrollzellen aus frisch isolierten humanen Hepatozyten nach 10 Minuten isotonen Bedingungen im Anschluss an den hypertonen Schock, das Zellvolumen auf den Ausgangswert zurück reguliert. Dieser Prozess ist bei den meisten anderen untersuchten Bedingungen gestört, einzig die Kryokonservierung mit 10% DMSO in IBMT Multi-Well Substraten führte zu mit Kontrollbedingungen vergleichbaren Ergebnissen in der isotonen Nachperiode.

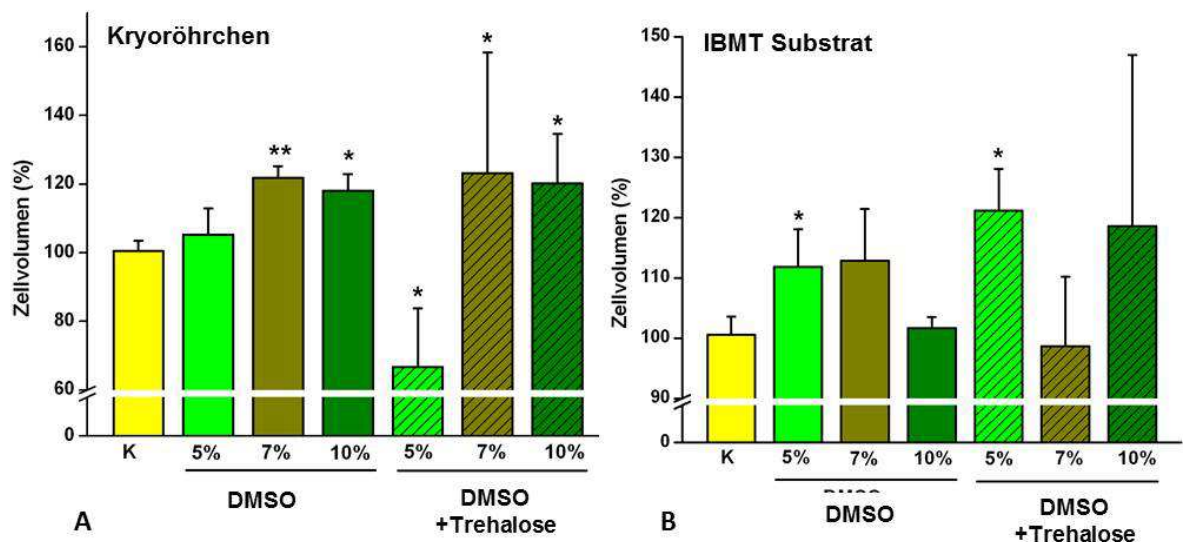


Abbildung 3.10 zeigt die mittleren Zellvolumina nach 10 Minuten isotonen Bedingungen in der Nachperiode im Vergleich von mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO sowie mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose kryokonservierten humanen Hepatozyten. Als Kontrolle sind frisch isolierte humane Hepatozyten dargestellt. **A:** Kryoröhrchen; **B:** IBMT Multi-Well Substrat Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$

3.1.2.3 Sphäroide

Sphäroide sind kugelförmige Zellaggregate, welche als Modellsystem für Tumore oder Organe benutzt werden. In diesem Fall wurden die frisch isolierten, humanen Hepatozyten als „*hanging drop-let*“ Sphäroide kultiviert, bevor die Sphäroide mit 10% DMSO in Kryoröhrchen kryokonserviert wurden. Anschließend wurden die Sphäroide aufgetaut und die überlebenden Zellen auf Glasobjektträgern kultiviert. Auch diese Zellen wurden nach identischem Versuchsprotokoll untersucht. Die Messwerte für mit 10% DMSO in Kryoröhrchen eingefrorenen Sphäroiden sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Tabelle 3.8

Die Tabelle zeigt die Veränderung des Zellvolumens von mit **10% DMSO im Kryoröhrchen** kryokonservierten **Sphäroiden** aus humanen Hepatozyten sowie von Kontrollmessungen unter iso- und hypertonen Bedingungen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

Die Zellen wurden für 10 Minuten einer isotonen Umgebung ausgesetzt. Die gemittelten Messwerte der Minuten 8 bis 10 stellen die isotope Vorperiode dar. Die Messwerte 12 und 19 wurden unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die Werte 23 und 29 zeigen die isotope Nachperiode. Die Veränderungen des Zellvolumens unter hypertonem Schock wurden auf den Mittelwert der isotonen Vorperiode bezogen. Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

mOsm /l	Mess - Min.	n=6 10% DMSO Kryoröhrchen Sphäroide Zellvolumen in %	n=13 10% DMSO Kryoröhrchen Zellvolumen in %	n=13 Kontrolle Zellvolumen in %
300	MW 8-10	100	100	100
400	12	86,69 ± 1,66%	85,35 ± 1,51***	87,69 ± 2,18***
400	19	90,76 ± 0,94%	95,35 ± 1,50***	90,80 ± 3,36*
300	23	112,26 ± 3,85%	114,83 ± 3,28***	105,05 ± 1,53***
300	29	115,38 ± 5,45 %	117,03 ± 4,66	100,17 ± 1,46**
RVI in %		27,62 ± 11,10%	53,88 ± 7,78%	31,71 ± 16,26 %.

Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, sind auch unter diesen Bedingungen keine Unterschiede beim RVI festgestellt worden. Aber erneut findet sich die Dysregulation in der isotonen Nachperiode. Zum Vergleich sind mit 10% DMSO in Kryoröhrchen eingefrorene Einzelzellen dargestellt.

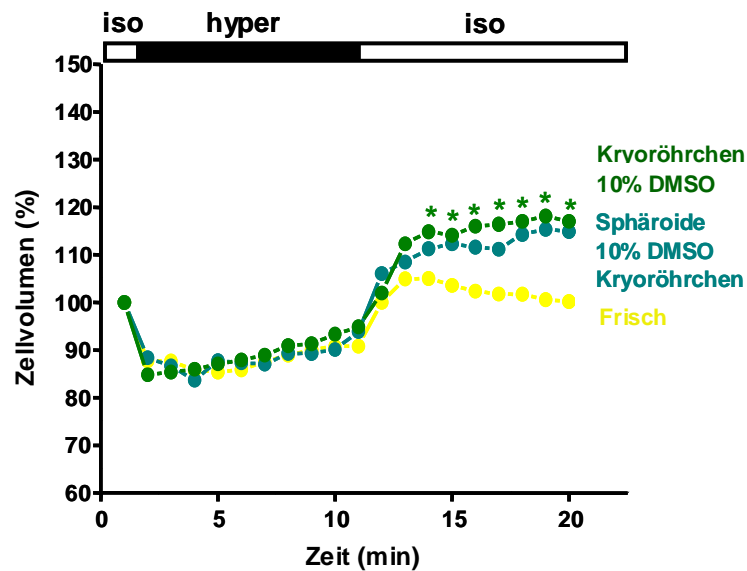


Abbildung 3.11 zeigt die mittlere Veränderung des Zellvolumens in % von den in Kryoröhrchen mit 10% DMSO kryokonservierten humanen Hepatozyten im Vergleich zu den frisch isolierten humanen Hepatozyten nach hypertonem Schock (+100mOsm). Zusätzlich ist die mittlere Veränderung der Zellvolumens in % von in Kryoröhrchen mit 10% DMSO kryokonservierten humanen Hepatozyten Sphäroiden dargestellt. Signifikanzen: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

Aus Zeitgründen war die Untersuchung von Zellen, welche in IBMT Multi-Well Substraten kryokonserviert wurden, nicht möglich.

In keinem der untersuchten Fälle, konnten die Auswirkungen einer Kryokonservierung auf die Volumenregulation durch die Verwendung eines zusätzlichen Kryoprotektivums oder durch die Anwendung von Sphäroiden verhindert werden. Einzig durch die Verwendung der IBMT Multi-Well Kryosubstrate konnte, bei gleichzeitiger Zugabe von 10%DMSO, ein zu Kontrollzellen identisches Verhalten der Volumenregulation nach hypertonem Schock erreicht werden.

3.1.3 „Whole-Cell Patch-Clamp“

Um die elektrophysiologischen Auswirkungen der Kryokonservierung zu untersuchen, wurden „Whole-Cell Patch-Clamp“-Experimente durchgeführt. Neben frisch isolierten wurden Hepatozyten untersucht, welche zuvor mit 10% DMSO in konventionellen Kryoröhrchen eingefroren waren. Weder unter isotonen, noch unter hypertonen Bedingungen konnte ein signifikanter Unterschied der Leitfähigkeiten festgestellt werden. Unter isotonen Bedingungen zeigten frische Hepatozyten eine Leitfähigkeit von $48,35 \pm 2,56$ pS/pF ($n= 14$), nach hypertonem Schock wurde eine Leitfähigkeit von $225,88 \pm 44,63$ pS/pF gemessen.

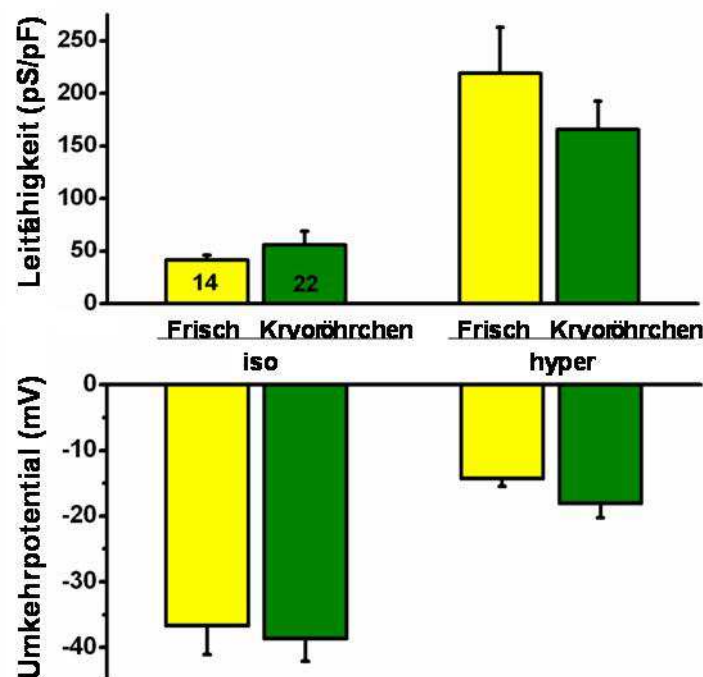


Abbildung 3.12:

Whole-Cell Patch-Clamp Experimente an primären humanen Hepatozyten. Die Leitfähigkeit (pS/pF) und das Umkehrpotential (mV) wurden dargestellt. (Versuchsdurchführung durch Dr. T. Li)

Primäre humane Hepatozyten zeigten nach der Kryokonservierung isoton eine Leitfähigkeit von $59,88 \pm 9,78 \text{ pS/pF}$ ($n= 22$) und nach hypertonem Schock eine Zunahme der Leitfähigkeit auf $162,30 \pm 37,85 \text{ pS/pF}$.

Neben der Leitfähigkeit wurde auch das Umkehrpotential registriert. Unter isotonen Bedingungen lag das Umkehrpotential bei frischen Hepatozyten bei $-37,15 \pm 4,32 \text{ mV}$, nach hypertonem Schock wurde ein Wert von $-14,98 \pm 1,34 \text{ mV}$ gemessen. Humane Hepatozyten zeigten nach der Kryokonservierung ein Umkehrpotential von $-38,87 \pm 2,89 \text{ mV}$ unter isotonen Bedingungen und eine Verschiebung auf $-17,58 \pm 3,21 \text{ mV}$ unter hypertonen Bedingungen. Es konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen frischen, primären humanen Hepatozyten und kryokonservierten, humanen Hepatozyten für das Umkehrpotential gemessen werden. Aus Zeitgründen war die Untersuchung von Zellen, welche in IBMT Multi-Well Substraten kryokonserviert wurden, nicht möglich.

3.1.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS „Fluoreszenz activated cell sorting“) wurde die Auslösung von Apoptose oder Nekrose durch Kryokonservierung in Bezug auf nicht-kryokonservierte primäre humane Hepatozyten untersucht.

Die verwendeten Fluorophore erlaubten eine Unterscheidung von gesunden, frühapoptotischen und spätapoptotischen/ nekrotischen Zellen. Dies beruht auf der Tatsache, dass sich das auf der Innenseite der Zellmembran befindende Phosphatidylserin (PS) bei apoptotischen Zellen auch auf der Außenseite der Membran befindet. Annexin-PE bindet mit hoher Affinität an PS, wobei der Farbstoff Phycoerythrin

(PE) mit PS konjugiert (Raynal & Pollard, 1994). Zusätzlich kam der Vitalfarbstoff 7-AAD zum Einsatz. Vitale Zellen mit intakter Plasmamembran werden nicht angefärbt, wohingegen sowohl nekrotische als auch spätapoptotischen Zellen mit 7-AAD und auch mit Annexin- PE gefärbt wurden. Frühapoptotische Zellen werden nur mit Annexin-PE nicht aber mit 7-AAD gefärbt.

Die Daten der FACS- Analysen sind in Abbildung 3.13 in Pseudocolor-Dotplots dargestellt. Die Intensität der 7-AAD Färbung wurde gegen die Intensität der Annexin-PE Färbung aufgetragen. Untersucht wurden primäre humane Hepatozyten, welche entweder in Kryoröhrchen oder in Fraunhofer IBMT Substraten kryokonserviert wurden. Die verwendeten Konzentrationen der Kryoprotektivums DMSO lagen bei 5%, 7% und 10%. Als Kontrolle wurden frisch isolierte humane Hepatozyten eingesetzt. Zur positiven Kontrolle wurde mit 1% H₂O₂ Nekrose und 2µM Camptothecin Apoptose ausgelöst.

Sowohl aufgetaute sowie frische Hepatozyten wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml auf Petriperm[®] Schalen ausgesät. Die Messung der Proben erfolgte am *FACS LSR II Flow Cytometer* (BD Biosciences, Heidelberg) mit Hilfe der *BD FACSDiva* Software welche eine automatische Kompensation der Zellautofluoreszenz ermöglichte. Für jede Bedingung wurden 5000 bis 10 000 Zellen analysiert und dem Programm BD FACS Diva Software wurden die Mittelwerte der Mediane bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass alle Zellen, die die Kryokonservierung überlebt haben, keine erhöhte Tendenz zu Apoptose oder Nekrose aufweisen, da keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle festgestellt wurden. Die Eine Zunahme von apoptotischen Zellen hätte sich darin gezeigt, dass eine Zunahme von PE-Annexin positiven Zellen vorhanden gewesen wäre. Mehr nekrotische Zellen hätten sich in einer Zunahme von 7-AAD positiven Zellen gezeigt.

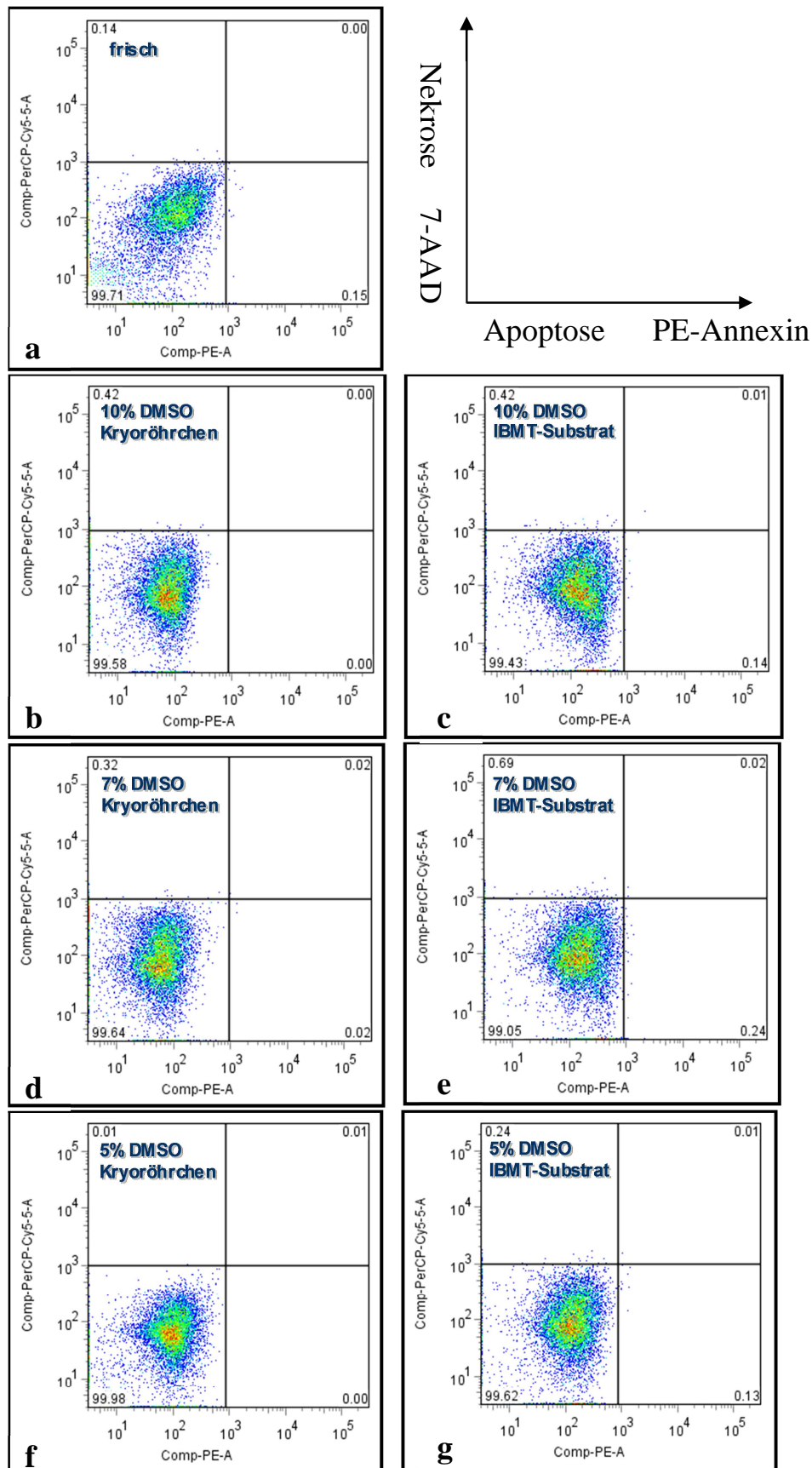
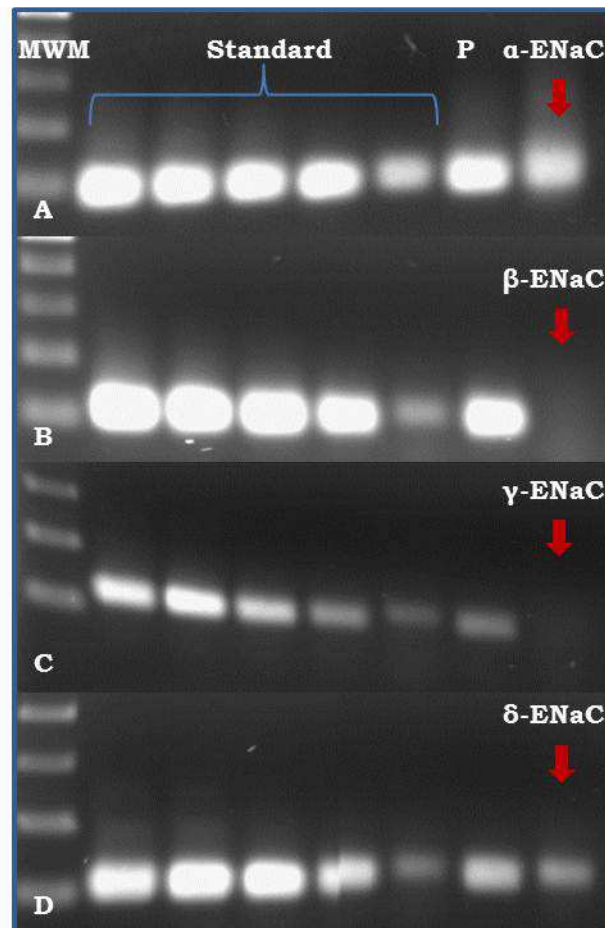


Abbildung 3.13:
FACS Analyse mit 7-AAD und PE- Annexin

3.1.5 Quantitative *real-time* PCR

Nach der Isolation der total-RNA aus frischen, primären humanen Hepatozyten und der anschließenden cDNA-Synthese, wurde eine *real-time* PCR Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass in humanen Hepatozyten die α - und δ -Untereinheiten des ENaC expremiert werden, wohingegen die Untereinheiten β - und γ -ENaC des ENaC nicht expremiert werden (Abbildung 3.14).

Die geplanten Experimente zur Untersuchung der möglichen Auswirkungen der Kryokonservierung in den verschiedenen Substraten und unter Einwirkung verschiedenen DMSO Konzentrationen auf die HICC Architektur, sowie auf die Expression des NHE1 oder NKCC1, konnten leider nicht zu Ende geführt werden. Da die Versuchsdurchführung am IPM in Hamburg stattfand, wurde das Zellmaterial oder auch cDNA versandt. Dabei kam es zu wiederholten Schwierigkeiten mit der Qualität der Proben, was dazu führte, dass das zu Verfügung stehende primäre humane Lebergewebe nicht ausreichte.

**Abbildung 3.14**

Ergebnisse der quantitativen real-time PCR.

MWM bezeichnet den „Molecular Weight Marker“, P ist eine Positivkontrolle, A zeigt in der letzten Spalte des Gels die Ergebnisse für die α Untereinheit des ENaC, B und C zeigen, dass die β - und γ -Untereinheiten des ENaC in primären humanen Hepatozyten nicht exprimiert werden. In D ist hingegen dargestellt, dass die Expression der δ Untereinheit des ENaC gezeigt werden konnte.

3.2 Zellen des hepatozellulären Karzinoms

3.2.1 Akustische Mikroskopie

Es konnte gezeigt werden, dass der hypertone induzierte Kationen Kanal (HICC) eine wesentliche Rolle bei der Proliferation verschiedener Tumor-Zelllinien, wie HepG2 und HeLa, darstellt (Bondarava et al, 2009; Shimizu et al., 2006). Die hier zugrunde liegende Arbeitshypothese besagt, dass identische Kationenkanäle einmal die hypertone aktivierte Kationenaufnahme steuern und auch für die Proliferation von großer Bedeutung sind. Daher ist es von großem Interesse, ob Tumorzellen, welche eine hohe Proliferationsrate aufweisen, nach hypertone Schock eine größere Aktivierbarkeit der hypertone aktivierten Kationen Kanäle aufweisen.

Dies wurde durch Volumenmessungen mit dem akustischen Mikroskop untersucht. Humane hepatozelluläre Tumorzellen (Hepatocellular carcinoma, HCC) wurden auf Glasobjektträgern kultiviert und für eine Dauer von 10 Minuten isotone Umgebung ausgesetzt. Nach einem hypertone Schock sank das Zellvolumen signifikant stärker von 100% auf $75,66 \pm 5,64$ ($n= 6$; $p< 0,01^{**}$). Innerhalb von 10 Minuten stieg das Volumen an auf $88,35 \pm 6,51\%$ ($p< 0,05^*$). Der RVI betrug in Bezug auf die Schrumpfung $92,66 \pm 45,58\%$. Bei der Rückkehr zu isotone Lösung stieg das Zellvolumen, ebenfalls signifikant unterschiedlich von der Kontrolle, auf $116,86 \pm 6,06\%$ ($p<0,001^{***}$) und sank innerhalb von 10 Minuten auf $100,03 \pm 7,55$ ($p<0,01^{**}$). HCC Zellen zeigten eine signifikant größere Schrumpfung und Volumenzunahme nach hypertone Schock im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten (Abbildung 3.15)

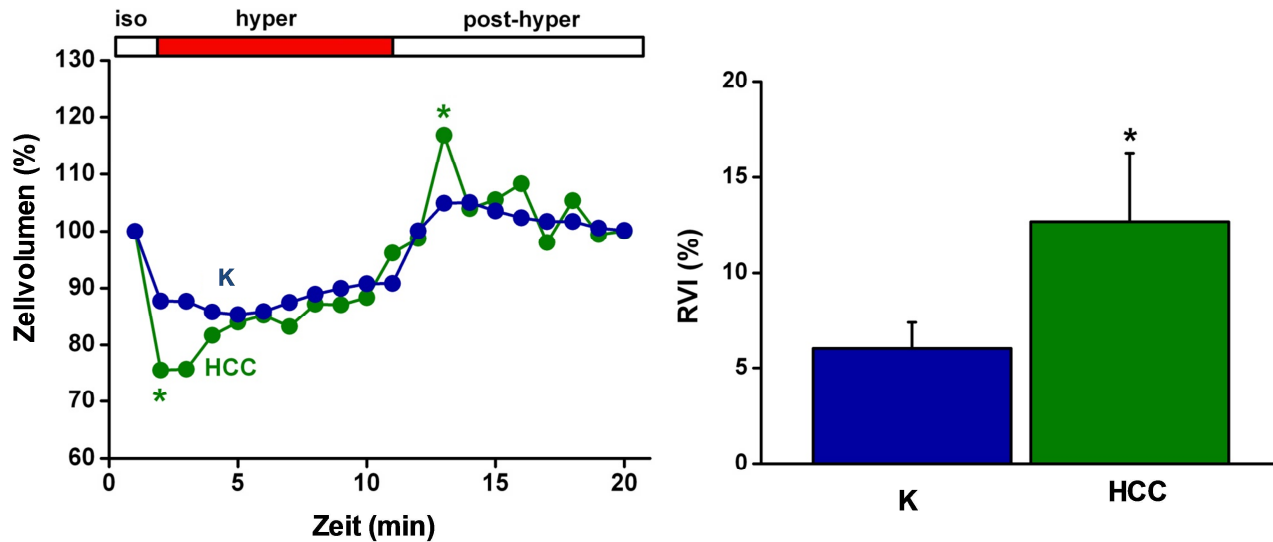


Abbildung 3.15:

Messung des Zellvolumens mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf des Zellvolumens während einer Versuchsdurchführung. $p < 0,05$ Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollzellen (humane Hepatozyten) mit HCC Zellen. $n=6$ $p < 0,05$. Signifikanzen wurden gekennzeichnet: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

Die passive Schrumpfung nach hypertonem Schock, wie auch die Volumenzunahme unter isotonen Bedingungen nach dem hypertonen Schock sind signifikant erhöht. Dies könnte durch eine höhere Anzahl oder Sensitivität von Aquaporinen in Tumorzellen bedingt sein. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des HICC bei HCC Zellen, signifikant größer ist als bei primären humanen Hepatozyten. Ob die stärkere Ausprägung des RVI allein durch eine erhöhte Anzahl von HICC Kanälen oder durch eine größere Aktivität des HICC versucht wird, ist unbekannt.

3.3 HepG2 Zellen

3.3.1 SASAM Screening

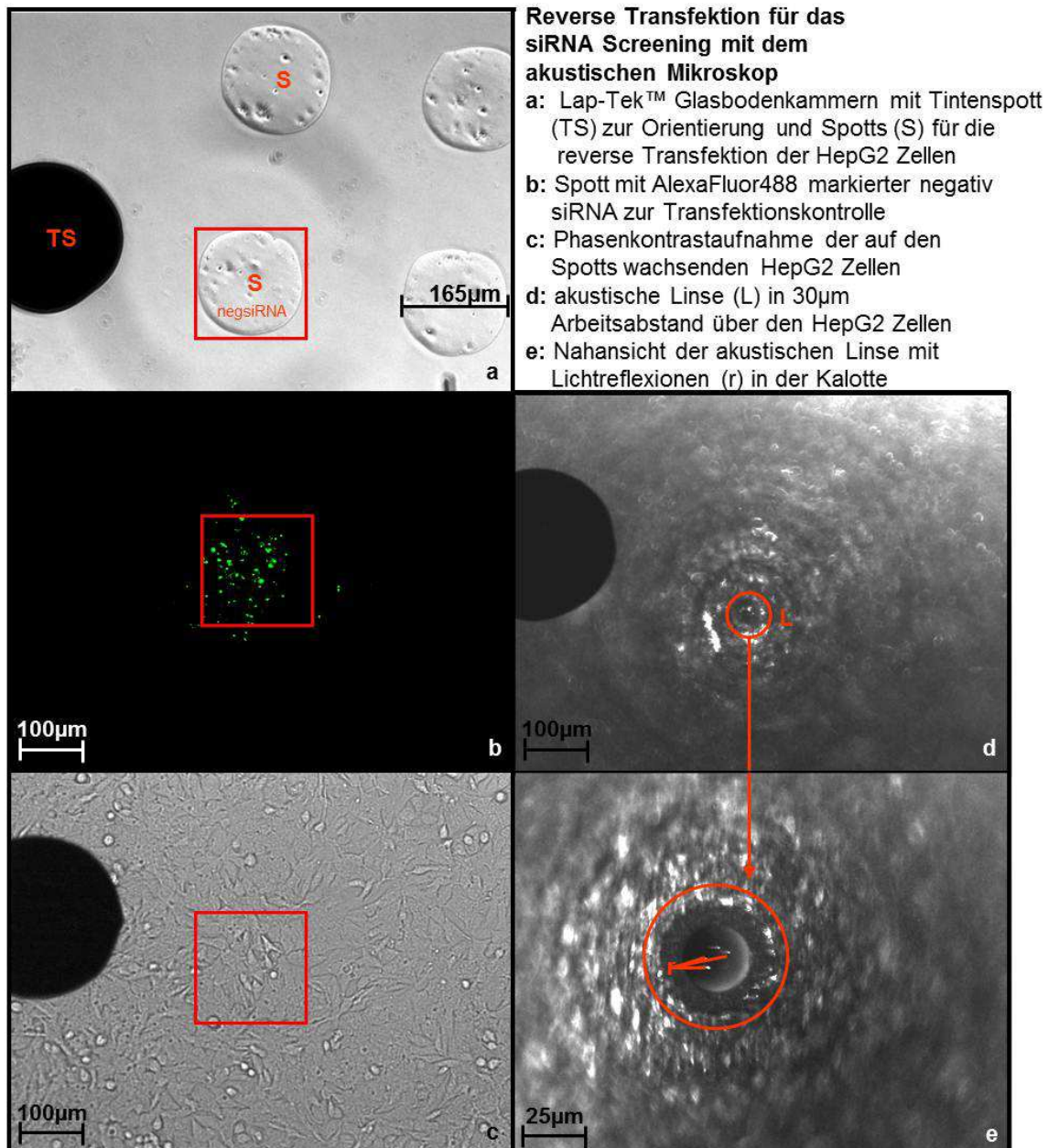


Abbildung 3.16:

Für das Screening einer siRNA Bibliothek wurden HepG2 Zellen auf Glasbodenkammern einer reversen Transfektion unterzogen und anschließend mit dem akustischen Mikroskop untersucht.

Eine siRNA Bibliothek aus 34 Ionenkanälen und Transportern sowie von Transmembranproteinen wurde auf Lap-Tek™ Glasbodenkammern aufgebracht. Anschließend wurden HepG2 Zellen auf die Lap-Tek™ Glasbodenkammern in einer Konzentration von 0,3 bis 1×10^6 Zellen pro Kammer ausgesät und anschließend für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am 3.Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in die Versuchsanordnung eingelegt und kontinuierlich mit Superfusat (5mM HEPES-Tyrode 300mosmol) umspült. Nachdem die Positionen der einzelnen siRNA Spotts bestimmt und abgespeichert waren, wurde die akustische Linse in die Versuchskammer eingesetzt und bis zum optimalen Messabstand von ca. 30µm, an die Zellen herangefahren.

Eine Fläche von 60µm * 60µm wurde gescannt. Dabei entstanden 225 Messpunkte mit einer Größe von 3,978µm * 3,978µm.

Die ersten 10 Minuten fanden unter isotonen Bedingungen, die Messungen der Minuten 16- 35 fanden unter hypertonen Bedingungen (5mM HEPES- Tyrode, 400mosmol) statt. Die Messungen der Minuten 36- 50 der Nachperiode wurden erneut unter isotonen Bedingungen durchgeführt.

Da die hier verwendeten HepG2 Zellen eine zu geringe Höhe für eine sichere Bestimmung des Zellvolumens mit akustischer Mikroskopie aufweisen, wurde hier die akustische Impedanz herangezogen, um die Aktivierung des HICC und somit den RVI zu bestimmen. Die akustische Impedanz verhält sich reziprok zum Zellvolumen, d.h. nimmt das Volumen einer Zelle ab, nimmt die akustische Impedanz zu. Die relative akustische Impedanz unter isotonen Bedingungen wurde auf 100% gesetzt. Nach dem Wechsel auf hypertone Bedingungen machten die Zellen eine sehr schnelle, passive Zellschrumpfung (Wehner et al., 1995; Wehner and Tinel, 2000; Corasanti, Gleeson, and Boyer, 1990) durch, was zu einer starken Zunahme der Impedanz führte.

Innerhalb von 20 Minuten hypertonen Schocks konnte durch die Aktivierung des RVI eine Abnahme der akustischen Impedanz beobachtet werden.

Der RVI betrug unter Kontrollbedingungen mit negativer siRNA $68,00 \pm 4,22 \%$ ($n=37$). Dieser RVI Wert wurde zum besseren Vergleich auf $100 \pm 6,20 \%$ festgelegt (siehe Abbildung 3.18) In der Nachperiode, bei erneut 300mosmol, fand eine schnelle, passive Zellschwellung (Wehner, F. und Tinel, H., 2000; Corasanti, J.G., Gleeson, D. und Boyer, J.L., 1990) statt, was durch eine Abnahme der akustischen Impedanz deutlich wurde.

Tabelle 3.9

Die Tabelle zeigt die Veränderung der akustischen Impedanz bei Kontrollmessungen unter iso- und hypertonen Bedingungen in relativen Werten mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

*Die Zellen wurden für 15 Minuten einer isotonen Umgebung ausgesetzt. Die gemittelten Messungen 4 bis 6 stellen die isotone Vorperiode dar. Die Messungen 8 und 14 wurden unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die Werte 16 und 20 zeigen die isotone Nachperiode. Die Veränderungen der akustischen Impedanz unter hypertonem Schock wurden auf den Mittelwert der isotonen Vorperiode bezogen. ($n= 37$)
Signifikanzen: $p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$; $p<0,001^{***}$.*

mOsm/l	Mess-Minute	Zellvolumen in %
300	MW 4-6	100
400	8	$116,90 \pm 3,97^{***}$
400	14	$105,34 \pm 2,64^{***}$
300	16	$94,46 \pm 2,23^{***}$
300	20	$101,52 \pm 2,66^{***}$

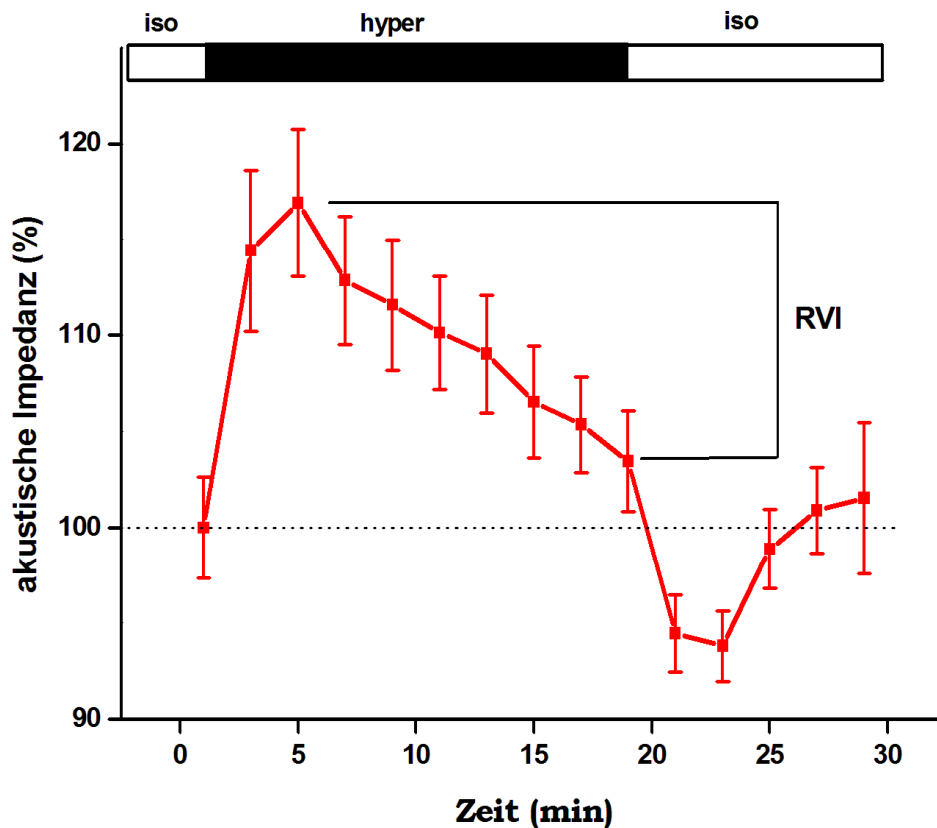


Abbildung 3.17

Die typische Veränderung der akustischen Impedanz unter Kontrollbedingungen nach hypertone Schock (+ 100 mOsm). Nach der passiven physikalischen Schrumpfung setzte eine aktive regulatorische Volumenzunahme unter hypertonen Bedingungen ein. Diese wird als RVI („regulatory volume increase“) bezeichnet und stellt einen funktionellen Nachweis für die Aktivierung der hypertone aktivierten Kationen Kanäle dar.

Insgesamt wurden HepG2 Zellen mit 34 verschiedenen siRNA Sequenzen transfiziert und die Auswirkungen auf den RVI untersucht. Nach der Transfektion mit siRNA gegen SLC9A1 (Na⁺/H⁺-Antiporter; NHE-1) wurde ein signifikant reduzierter RVI von $72,62 \pm 9,99\%$ (n=19; p<0,05*) gemessen (Abbildung 3.18).

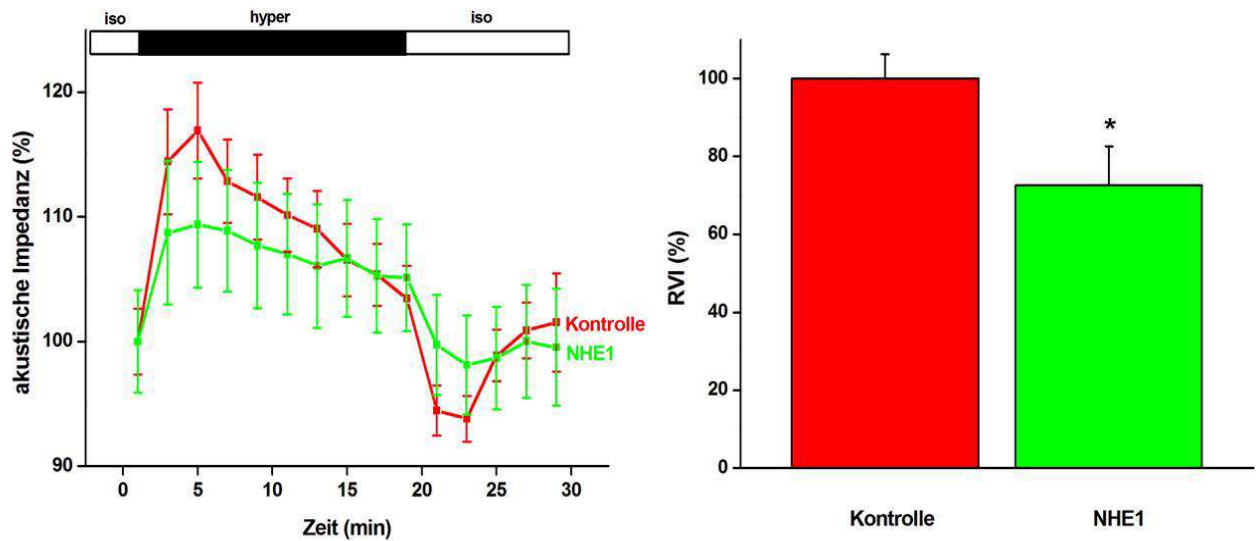


Abbildung 3.18:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n=37$) gegen mit siRNA gegen NHE1 transfizierten Zellen. $n=9$ $p<0,05$.

Auch die Transfektion mit siRNA gegen SLC12A2 ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporter; NKCC1) führte zu einem signifikant reduzierten RVI von $66,79 \pm 7,90\%$ ($n=9$; $p<0,05^*$) (Abbildung 3.19). Die durchgeführten Versuche zeigten eine relative Beteiligung von NHE1 (SLC9A1) und NKCC1 (SLC12A2) am RVI, welche mit früheren Ergebnissen übereinstimmen (Wehner, F. und Tinel, H., 2000). Demnach wird der Na^+ -Leitfähigkeit ein Beitrag zum RVI gegenüber NHE1 und NKCC1 von 4:1:1 zugeschrieben.

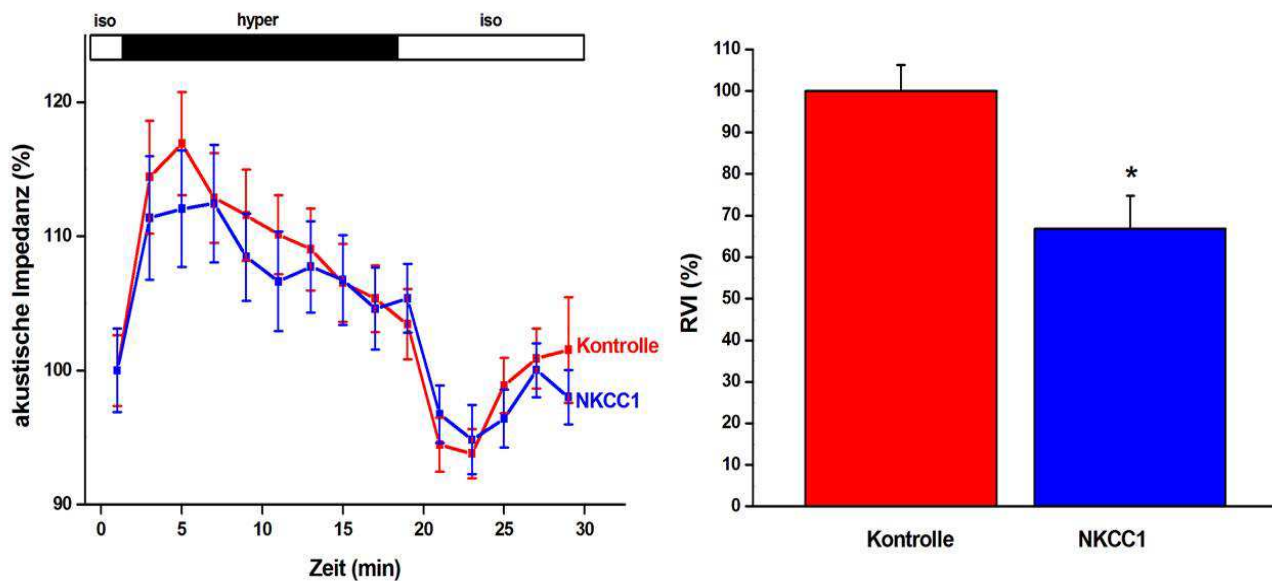


Abbildung 3.19:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen (n= 37) gegen mit siRNA gegen NKCC1 transfizierten Zellen. n=9 p<0,05.

Die reverse Transfektion von siRNA gegen die β - und γ -Untereinheit des ENaC (SCNN1B und SCNN1G) zeigten keine signifikante Reduktion des RVI mit Werten von $81,51 \pm 9,52\%$ (n= 7; n.s.) bzw. $77,29 \pm 6,12\%$ (n= 4; n.s.). Hingegen war der RVI sowohl nach der Transfektion mit siRNA gegen die α - Untereinheit (SCNN1A), als auch bei der δ - Untereinheit (SCNN1D) des ENaC signifikant reduziert, mit Werten von $61,29 \pm 8,75\%$ (n= 20; p<0,001***) bzw. $72,86 \pm 6,5\%$ (n= 19; p<0,05*) (Abbildung 3.20).

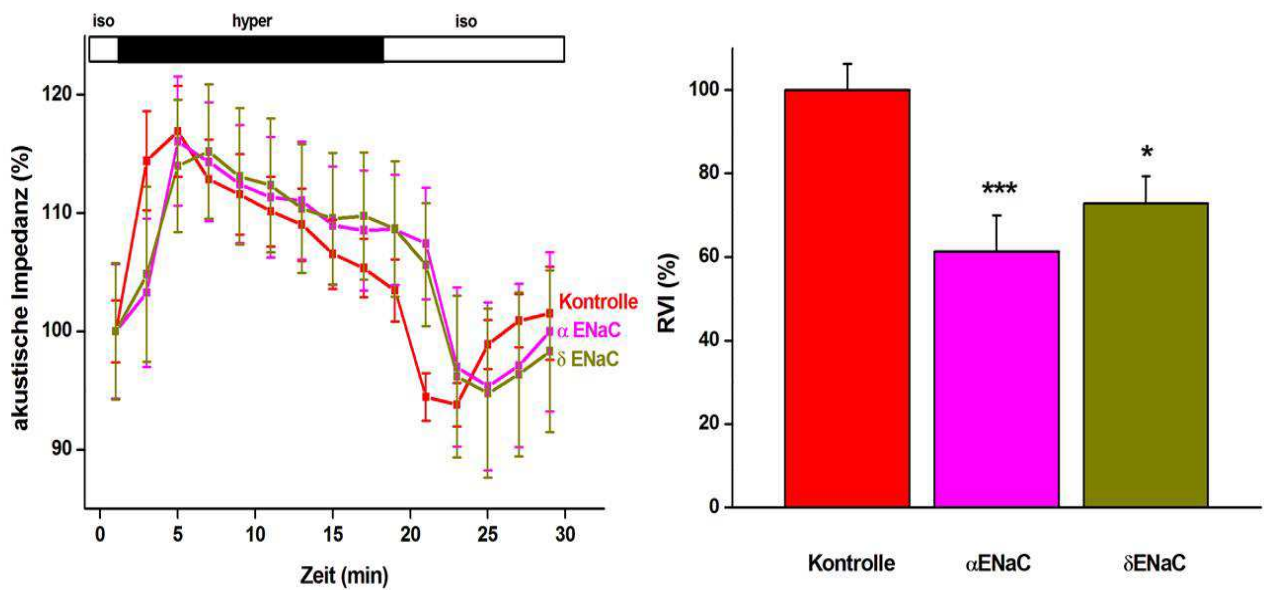


Abbildung 3.20:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n=37$) gegen mit siRNA gegen α -ENaC ($n=20$) und δ -ENaC ($n=19$) transfizierten Zellen. $p<0,05^*$, $p<0,001^{***}$.

Nach der Transfektion von siRNA gegen die Mitglieder 3 und 5 der TRPC Familie der TRP Kanäle konnte eine signifikante Reduktion des RVI mit $61,86 \pm 17,13\%$ ($n=7$; $p<0,05^*$) bzw. $70,72 \pm 9,57\%$ ($n=9$; $p<0,05^*$) gemessen werden (Abbildung 3.21). Ohne die Mitglieder TRPC1 ($94,78 \pm 12,57\%$; $n=4$; n.s.), TRPC4 ($86,53 \pm 10,46\%$; $n=7$; n.s.), TRPC6 ($87,65 \pm 10,53\%$; $n=6$; n.s.) und TRPC7 ($78,66 \pm 12,41\%$; $n=6$; n.s.) der TRPC Familie konnte keine signifikante Veränderung des RVI gemessen werden.

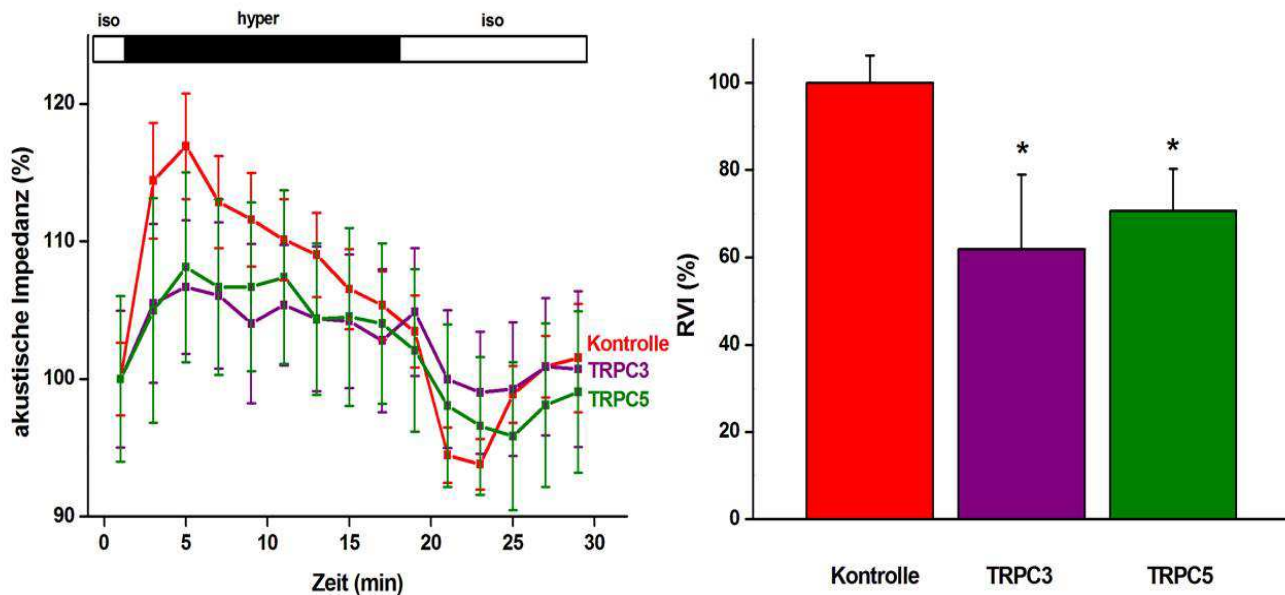


Abbildung 3.21:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n=37$) gegen mit siRNA gegen TRPC3 ($n=7$) und TRPC5 ($n=9$) transfizierten Zellen. $p<0,05$.

Innerhalb der TRPM Familie der TRP Kanäle konnte nach der Transfektion bei vier Mitgliedern eine signifikante Reduktion des RVI gemessen werden: TRPM2 ($71,28 \pm 10,34\%$; $n=25$; $p<0,05^*$), TRPM4 ($68,28 \pm 9,27\%$; $n=9$; $p<0,05^*$), TRPM5 ($52,24 \pm 11,41\%$; $n=28$; $p<0,001^{***}$) TRPM6 ($49,37 \pm 12,11\%$; $n=19$; $p<0,001^{***}$) (Abbildung 3.22).

Wohingegen nach der Transfektion von siRNA gegen die Mitglieder TRPM1 ($74,96 \pm 19,08\%$; $n=7$; n.s.), TRPM3 ($82,66 \pm 8,68\%$; $n=16$; n.s.), TRPM7 ($86,34 \pm 10,71\%$; $n=20$; n.s.) und TRPM8 ($79,20 \pm 3,98\%$; $n=5$; n.s.) keine signifikante Veränderung des RVI festgestellt wurde.

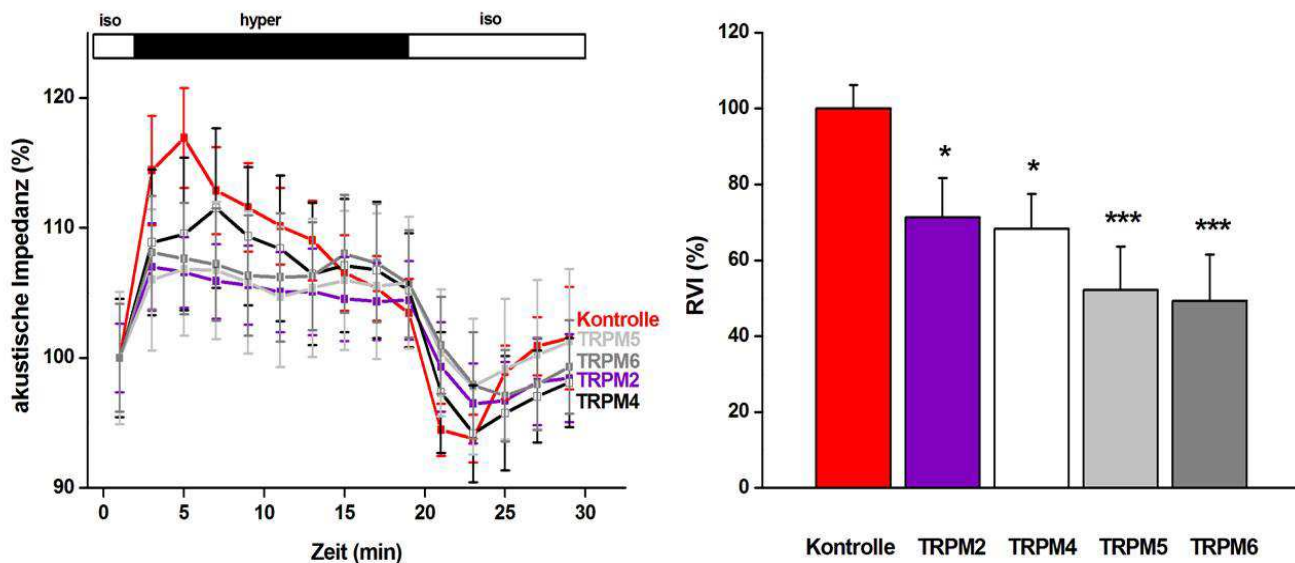


Abbildung 3.22:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n=37$) gegen mit siRNA gegen TRPM2 ($n=25$), TRPM4 ($n=9$), TRPM5 ($n=28$) und TRPM6 ($n=19$) transfizierten Zellen. $p < 0,05$; $p < 0,001$ ***.

Innerhalb der TRPV Familie konnte nach siRNA Transfektion gegen TRPV 2 mit einem Wert von $57,05 \pm 16,01\%$ ($n=10$; $p < 0,05$ *) eine signifikante Reduktion des RVI dokumentiert werden (Abbildung 3.23). Die Transfektion gegen die anderen Mitglieder der TRPV Familie, TRPV1 ($79,71 \pm 10,25\%$; $n=19$; n.s.), TRPV3 ($102,87 \pm 10,68\%$; $n=20$; n.s.), TRPV4 ($86,27 \pm 9,94\%$; $n=20$; n.s.), TRPV5 ($91,68 \pm 16,31\%$; $n=6$; n.s.) und TRPV6 ($85,05 \pm 15,29\%$; $n=9$; n.s.) zeigten keine signifikanten Veränderungen des RVI.

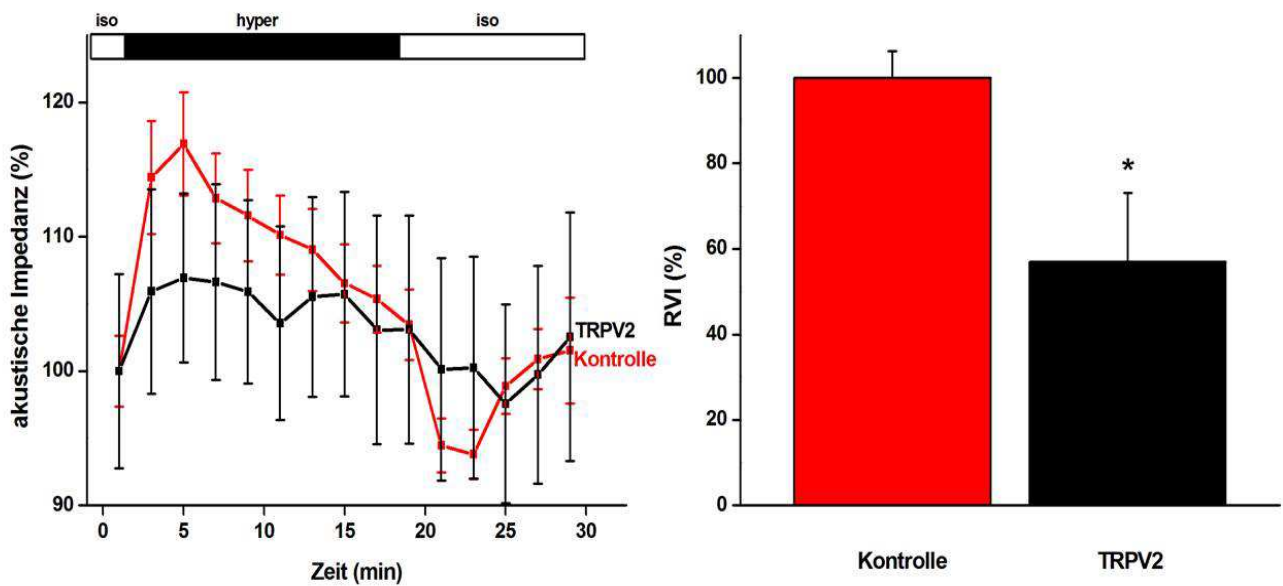


Abbildung 3.23:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n= 37$) gegen mit siRNA gegen TRPV2 transfizierten Zellen. $n=10$ $p<0,05$.

Die Transfektionen gegen Mucoilin 1 und 2 (MCOLN1 und MCOLN2) führten zu keiner signifikanten Änderung des RVI nach hypertonem Schock. Es wurden Werte von $74,26 \pm 12,62\%$ ($n= 4$; n.s.) für MCOLN1 bzw. $74,41 \pm 11,97\%$ ($n= 8$; n.s.) MCOLN2 gemessen.

Hingegen führte die Transfektion gegen Mucoilin 3 (MCOLN 3), auch bekannt als TRPML3, zu einem signifikant reduzierten RVI von $62,79 \pm 8,59\%$ ($n= 6$; $p<0,05^*$) (Abbildung 3.24).

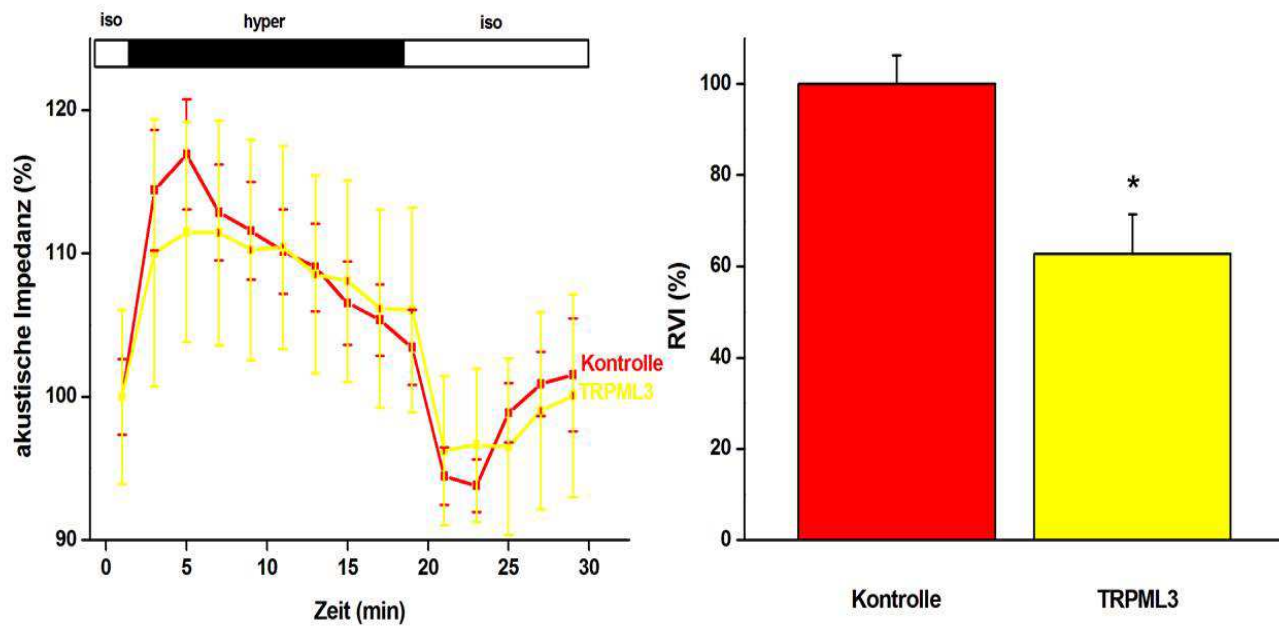


Abbildung 3.24:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n= 37$) gegen mit siRNA gegen TRPML3 transfizierten Zellen. $n=6$ $p<0,05$.

Die Transfektion gegen TRPA1 rief mit Werten von $92,89 \pm 10,68\%$ ($n= 6$; n.s.) keine signifikante Reduktion des RVI hervor.

Zusätzlich wurde ein signifikant reduzierter RVI bei Polycystein-1 (PKD1) mit $53,52 \pm 14,23\%$ ($n= 7$; $p<0,05^*$) gemessen (Abbildung 3.25), wohingegen die Transfektion gegen Polycystein-2 (PKD2) keine signifikante Reduktion hervorrief ($93,56 \pm 17,96\%$; $n= 8$; n.s.).

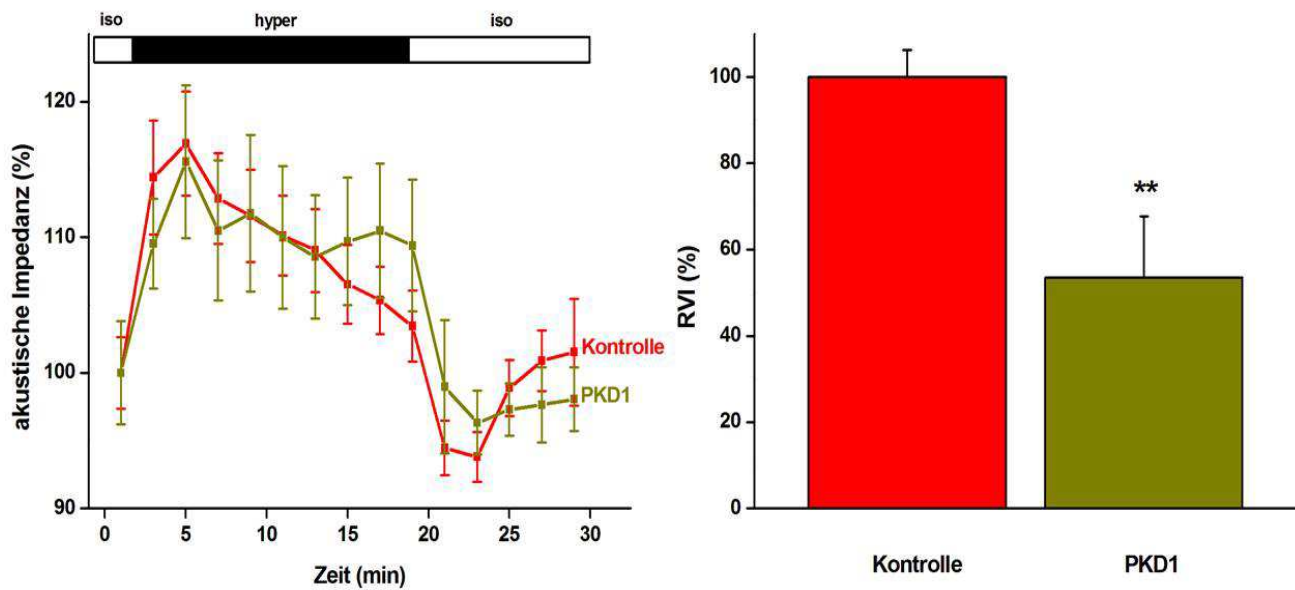


Abbildung 3.25:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n= 37$) gegen mit siRNA gegen NKCC1 transfizierten Zellen. $n=7$ $p<0,01^{**}$

Die Transfektion gegen die mechanisch aktivierten Kationen Kanäle Piezo1 (FAM38A) und Piezo2 (FAM38B), zeigte eine signifikante Reduktion des RVI bei Piezo1 auf $67,63 \pm 13,81\%$ ($n= 9$; $p<0,05^*$), wohingegen bei Piezo2 kein signifikanter Einfluss auf den RVI mit $85,24 \pm 10,84\%$ ($n= 6$; n.s.) festgestellt werden konnte.

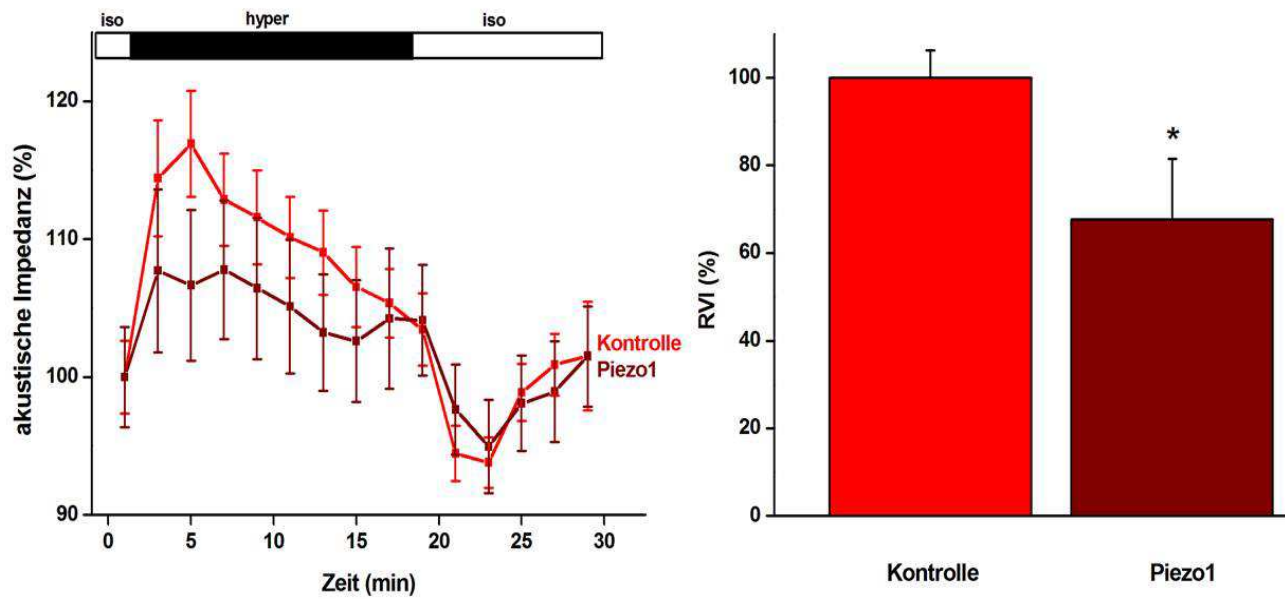


Abbildung 3.26:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Links: zeitlicher Verlauf der akustischen Impedanz während einer Versuchsdurchführung. Rechts: Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von Kontrollmessungen ($n= 37$) gegen mit siRNA gegen Piezo1 transfizierten Zellen. $n=9$ $p<0,05$.

Die Ergebnisse aller untersuchten siRNAs sind in Abbildung 3.27 zusammengefasst.

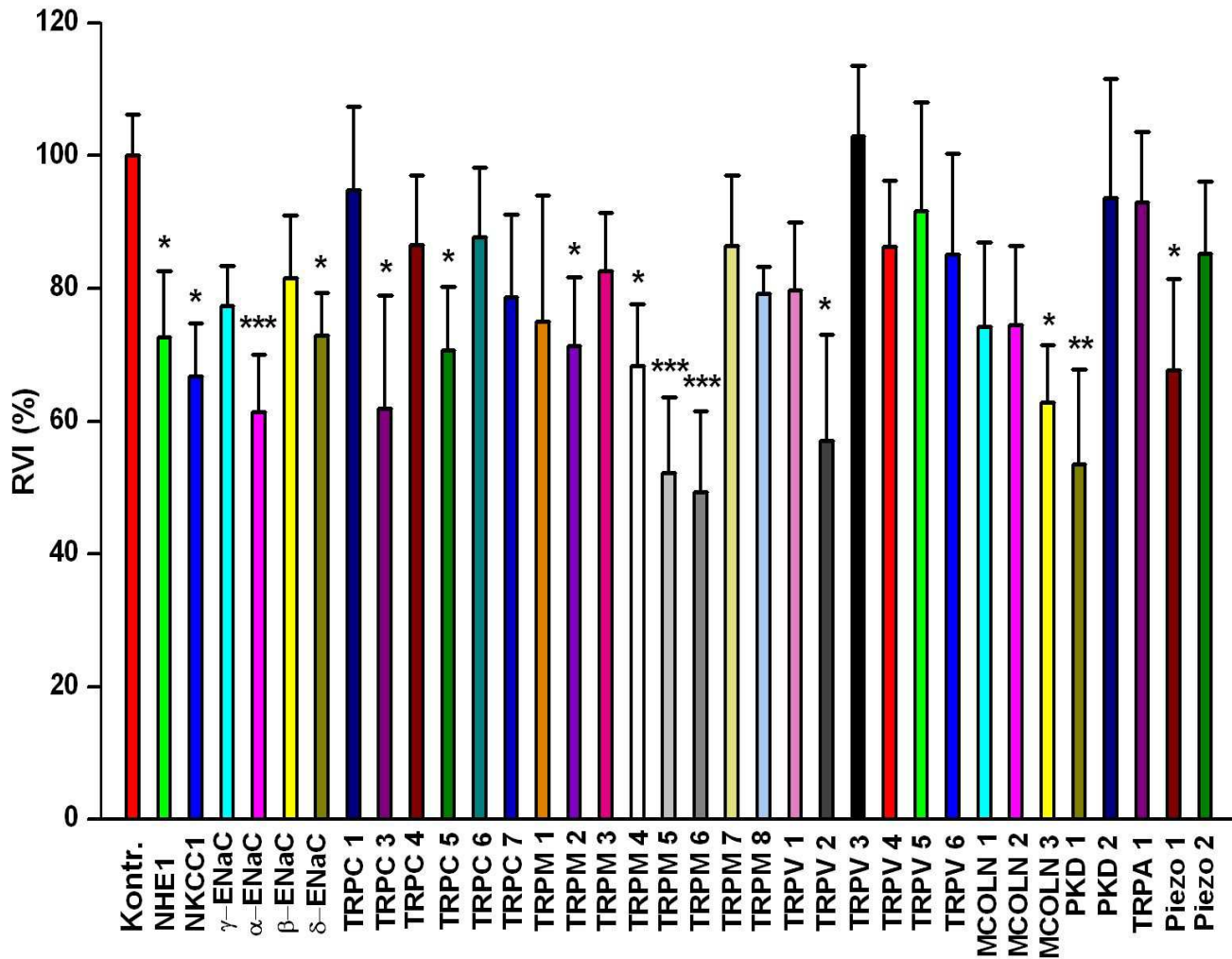


Abbildung 3.27:

Messung der akustischen Impedanz mit der Methode der „Scanning Acoustic Microscopy“ (SAM). Dargestellt ist die Quantifizierung des RVI nach hypertonem Schock. Vergleich von HepG2 Zellen, transfiziert mit negativer siRNA (AllStars Negative siRNA, Qiagen) gegenüber HepG2 Zellen, die mit einer siRNA Bibliothek aus Ionenkanälen und Transportern transfiziert wurden. Signifikanzen wurden gekennzeichnet: $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **;
 $p < 0,001$ ***.

Die durchgeführten Versuche zeigten eine relative Beteiligung von NHE1 (SLC9A1) und NKCC1 (SLC12A2) am RVI, welche mit früheren Ergebnissen übereinstimmen (Wehner, F. und Tinel, H., 2000). Auch die Reduktion des RVI nach der Transfektion gegen die α -ENaC Untereinheit (Bondarava, M. et al., 2009), konnte mit einem RVI-Wert von $61,29 \pm 8,75$ % (n= 20; $p < 0,001^{***}$) hochsignifikant bestätigt werden. Auch für die δ -ENaC Untereinheit konnte eine Beteiligung nachgewiesen werden. Der RVI war signifikant um $27,14 \pm 6,5$ % (n= 19; $p < 0,05^*$) reduziert.

Da es sich um nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierte siRNAs handelt und die Transfektionseffizienz nur anhand der mit Alexa 488 markierten negativ siRNA auf ca. 50% geschätzt werden konnte, sind die tatsächlichen Auswirkungen der siRNA Transfektionen wahrscheinlich noch um den Faktor 2 größer.

Werden alle Kanäle, welche bei dem durchgeführten siRNA Screening zu einem signifikant reduzierten RVI geführt haben, berücksichtigt, entsteht ein sehr großer Komplex aus vielen Einzelkomponenten, welche gemeinsam die molekulare Architektur des HICCs bilden können.

4. Diskussion

4.1 Kryokonservierung

Die Lagerung von biologischem Material bei sehr tiefen Temperaturen über lange Zeiträume wird als Kryokonservierung bezeichnet. Da Stoffwechselprozesse und chemische Reaktionen bei kryogenen Temperaturen nahezu eingestellt werden, sind kryokonservierte Zellen für sehr lange Zeit lagerbar. Auch nach Jahren der Kryokonservierung ist nach dem Auftauen wieder nahezu die volle Funktionalität erreichbar. Allerdings ist dies stark davon abhängig, welche Zelltypen kryokonserviert wurden. Heute ist die Kryokonservierung besonders in der Reproduktionsmedizin ein fest etabliertes, gut funktionierendes System, um Eizellen, Spermien oder Embryonen für lange Zeit ohne schädigende Einflüsse zu konservieren. Schwierigkeiten bestehen noch insbesondere bei der Kryokonservierung von Zellverbänden oder ganzen Geweben. Gerade dies wäre aber für den Bereich der Organtransplantationen ein großer Fortschritt. Eine Lagerung von Organen könnte das enge Zeitfenster für eine Transplantation erweitern und so auch die Bevorratung von Spenderorganen ermöglichen (Terry et al., 2006). Allerdings ist die Lagerung von Geweben und Organen durch die dreidimensionale Struktur sowie die Heterogenität eines Gewebes mit unterschiedlichen Gewebetypen und begrenzter Wärmeleitfähigkeit deutlich erschwert (Acker et al., 1999). Für eine erfolgreiche Kryokonservierung stellt der Wasserfluss einen entscheidenden Faktor dar, dies ist aber in Zellen, welche tief innerhalb eines Gewebes liegen, problematisch (Mazur et al., 1968). Zell-Zell-Kontakte können durch die Entstehung von extrazellulären Eiskristallen zerstört werden, was dann zur Fragmentierung des Gewebes führt.

4.1.1 Kryokonservierung von humanen

Hepatozyten

Bei passenden Gewebemerkmale können primäre humane Hepatozyten einem Patienten mit akutem Leberversagen gespritzt werden und können anschließend ihre Funktion in dem geschädigten Organ aufnehmen (Hughes et al., 2006; Horslen, S.P. und Fox, I.J., 2004; Bilir B.M. et al., 2006). Dies ist eine besonders schnelle und einfache Methode einen solch schwer erkrankten Patienten zu therapieren. Aber die Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten ist stark begrenzt. Daher ist es sehr erstrebenswert die Kryokonservierung von humanen Hepatozyten einer Weiterentwicklung zuzuführen, um jederzeit auf kryokonserviertes Material zurückgreifen zu können (Hengstler, J.G. et al. 2000; Katenz, E. et al, 2007).

4.1.2 Vitalität der primären humanen

Hepatozyten nach der Kryokonservierung: das konventionelle Kryoröhrchen gegen über dem IBMT Fraunhofer Multi- Well- Kryosubstrat

Die Kryokonservierung der primären humanen Hepatozyten wurde in konventionellen 2ml Kryoröhrchen und in IBMT Fraunhofer 30x25 μ l Multi-Well-Substraten durchgeführt. Den am IBMT Fraunhofer Institut entwickelten Multi-Well-Kryosubstraten werden einige Vorteile im Vergleich zu den konventionellen Kryoröhrchen zugeschrieben:

- Zum einen weisen die einzelnen Wells des Multi-Well-Kryosubstrates ein sehr kleines Volumen von nur 25µl auf. Dadurch wird die Entstehung von Temperaturgradienten minimiert. In einem konventionellen 2ml Kryoröhrchen dauert es viel länger, bis in der Mitte des Röhrchens identische Temperaturen herrschen wie am Rand und daher ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass schädigende Eiskristalle während des Einfriervorgangs entstehen können.
- Der bereits beschriebene Vorteil des kleinen Volumens gilt aber nicht nur für den Vorgang des Einfrierens, sondern auch für das Auftauen einer Probe. Dies ist eine kritische Phase, da es beim langsamen Auftauen zur Bildung großer Eiskristalle kommen kann. Dieser Schritt muss möglichst schnell ablaufen, damit eine hohe Vitalität erhalten bleibt. Idealerweise wäre ein Auftauvorgang in einer Mikrowelle. Da sich aber das Absorptionsspektrum von Wasser bei kryogenen Temperaturen verändert, können sich die Wasserdipole nicht ausrichten und es findet keine Erwärmung statt. Auch eine sehr schnelle Erwärmung durch Laserenergie wäre theoretisch denkbar, aber es stellt sich das Problem der Dosierung, um die Proben beim Auftauen nicht zu überhitzen und so Schäden zu verursachen.
- In der Theorie sollen die verbesserten Bedingungen durch geringere Temperaturgradienten beim Einfrieren und schnelleres Auftauen durch kleine Volumina dazu führen, dass die Konzentration des Gefrierschutzmittels verringert werden kann. Dies ist insofern von Bedeutung, da es sich bei dem meist verwendeten membrangängigen Kryoprotektivum DMSO um ein organisches Lösungsmittel handelt, welches zelltoxisch wirkt. Meist wird es in Konzentrationen zwischen 5% und 20% eingesetzt.
- Das Multi-Well-Kryosubstrat ermöglicht es, unterschiedliche Kryobedingungen, wie z.B. verschiedene DMSO Konzentrationen in einem Kryosubstrat zu untersuchen, wodurch die Vergleichbarkeit der Experimente erhöht wird. Auch ist es möglich Pro-

ben zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Multi-Well Kryosubstrat zu entnehmen. (Malpique, R. et al. 2007)

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den unterschiedlichen Kryosubstraten auch 3 verschiedene DMSO Konzentrationen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Absenkung der Konzentration des Kryoprotektivums DMSO von 10% DMSO zu 7% DMSO und 5% DMSO mit einer Verschlechterung der Vitalität nach dem Auftauen einhergeht (im Vergleich zu frischen humanen Hepatozyten $p > 0,001$). Zellen die mit 10% DMSO in Kryoröhrchen eingefroren wurden, zeigten nach dem Auftauen eine Vitalität von $47,88 \pm 1,79\%$ ($p < 0,001$), bei 7% DMSO wurde eine Vitalität von $23,75 \pm 3,17\%$ ($p < 0,001$) gemessen und mit 5% DMSO ($p > 0,001$) lag die Vitalität bei $15,50 \pm 2,10\%$.

Auch in IBMT Multi-Well Kryosubstraten eingefrorene Zellen zeigten eine von der DMSO Konzentration abhängige Abnahme der Vitalität nach dem Auftauen. Bei 10% DMSO zeigten humane Hepatozyten eine Vitalität von $51,66 \pm 2,08\%$ ($p < 0,001$), bei 7% DMSO lag die Vitalität bei $33,33 \pm 4,37\%$ ($p < 0,001$) und bei 5% DMSO wurde ein Wert von $21,33 \pm 1,86\%$ ($p < 0,001$) ermittelt.

Es konnte insgesamt durch eine Trypanblau Färbung gezeigt werden, dass humane Hepatozyten, welche in IBMT Multi-Well Kryosubstraten eingefroren waren, signifikant ($p < 0,01$) vitaler waren, als in konventionellen Kryoröhrchen eingefrorene Hepatozyten. In beiden Fällen sank die Vitalität mit sinkender Konzentration des Gefrierschutzmittels DMSO ab.

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde benutzt, um den Vitalitätszustand der primären humanen Hepatozyten nach dem Auftauen noch genauer zu analysieren. Mit Hilfe der ausgewählten Parameter könnte ein Anstieg von apoptotischen und nekrotischen Zellen nach der Kryokonservierung, im Vergleich zu frisch isolierten Hepato-

zyten, detektiert werden. Die verwendeten Fluorophore erlaubten eine Unterscheidung von gesunden, frühapoptotischen und spätapoptotischen/nekrotischen Zellen. Dies beruht auf der Tatsache, dass sich das auf der Innenseite der Zellmembran befindende Phosphatidylserin (PS) bei apoptotischen Zellen auch auf der Außenseite der Membran befindet. Annexin-PE bindet mit hoher Affinität an PS, wobei der Farbstoff Phycoerythrin (PE) mit PS konjugiert (Raynal & Pollard, 1994). Zusätzlich kam der Vitalfarbstoff 7-AAD zum Einsatz. Vitale Zellen mit intakter Plasmamembran werden nicht angefärbt, wohingegen sowohl nekrotische, als auch spätapoptotische Zellen mit 7-AAD und auch mit Annexin-PE gefärbt wurden. Frühapoptotische Zellen werden nur mit Annexin-PE, nicht aber mit 7-AAD gefärbt.

Die Intensität der 7-AAD Färbung wurde gegen die Intensität der Annexin-PE Färbung in *Pseudocolor-Dotplots* aufgetragen. Untersucht wurden primäre humane Hepatozyten, welche entweder in Kryoröhrchen oder in IBMT Multi-Well-Kryo-substraten kryokonserviert wurden. Die verwendeten Konzentrationen der Kryoprotektivums DMSO lagen wieder bei 5%, 7% und 10%. Hierbei zeigte sich, dass alle Zellen, die die Kryokonservierung überlebt hatten, keine erhöhte Tendenz zu Apoptose oder Nekrose zeigten. Eine Zunahme von apoptotischen Zellen hätte sich darin gezeigt, dass eine Zunahme von PE-Annexin positiven Zellen vorhanden gewesen wäre. Mehr nekrotische Zellen hätten sich in einer Zunahme von 7-AAD positiven Zellen gezeigt. Zellen, die unmittelbar nach dem Auftauen eine schlechte Vitalität zeigten sind entweder schon in einem sehr späten Stadium der Apoptose oder Nekrose und konnten so in den FACS- Analysen nicht mehr erfasst werden oder eventuelle Membranschäden konnten über Nacht regeneriert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die kryokonservierten humanen Hepatozyten, welche den Prozess der Kryokonservierung überlebt haben, eine gute Vitalität aufweisen und mit frisch isolierten humanen Hepatozyten vergleichbar sind.

4.1.3 HICC Aktivierung als Parameter für die Vitalität nach der Kryokonservierung

Werden Zellen einem osmotisch hypertonen Schock von 400mOsm ausgesetzt werden, kommt es zu einem durch Wasserefflux ausgelösten Schrumpfen der Zellen. Daraufhin reagieren die Hepatozyten mit einem RVI. Der Hauptmechanismus des RVI besteht in der Aktivierung von hypertone aktivierten Kationen Kanälen, kurz HICC. Sowohl für primäre humane Hepatozyten (Li, T. et al., 2005), wie auch für HepG2 Zellen (Wehner, F., Lawonn, P., Tinel, H. 2002) konnte gezeigt werden, dass es unter hypertonen Stress zu einem Na^+ -Einstrom kommt. Dies zeigen auch die „Patch-Clamp“ Experimente an frischen primären humanen Hepatozyten, wie auch kryokonservierte humane Hepatozyten (10% DMSO in konventionellen Kryoröhrchen). Die gemessenen Leitfähigkeiten unter isotonen und hypertonen Bedingungen sind nicht signifikant unterschiedlich voneinander. Auch die Umkehrpotentiale zeigen nahezu identische Werte und sind nicht signifikant unterschiedlich. Die Kryokonservierung bleibt offensichtlich ohne Einfluss auf die Dichte des HICC in der Zellmembran, wie „Patch clamp“-Versuche klar zeigten.

Mit der Methode der akustischen Mikroskopie sollte untersucht werden, ob eine sinkende Konzentration des Kryoprotektivums DMSO einen Einfluss auf die Vitalität der überlebenden Zellen hat. Hypertoner Stress und die Fähigkeit der Zelle darauf zu reagieren, wurde als Maß dafür eingesetzt. Sowohl humane Hepatozyten, die in Kryoröhrchen, als auch Hepatozyten, die in IBMT Multi-Well Substraten kryokonserviert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede des RVI nach hypertonen Schock. Auch die verschiedenen DMSO Konzentrationen 5%, 7% bzw. 10% hatten keine Auswirkungen auf den RVI. Signifikan-

te Unterschiede wurden nur in der isotonen Nachperiode gemessen. Einzig die Kryokonservierung mit 10% DMSO in IBMT Multi-Well Substraten führte zu mit Kontrollbedingungen vergleichbaren Ergebnissen in der isotonen Nachperiode. Die Vorteile des geringeren Volumens und dadurch die gleichmäßigeren Temperaturen beim Einfrieren und Auftauen sind zwar vorhanden, aber eine Reduktion des Gefrierschutzmittels DMSO konnte dadurch nicht aufgefangen werden. Bei reduzierten DMSO Konzentrationen, wie den getesteten 7% und 5% DMSO wurden auch Dysregulationen in der isotonen Nachperiode festgestellt. Auch die genauere und gleichmäßigere Dosierung des DMSO mit dem GeSiM® Nanoplotter in die IBMT Multi-Well Substrate scheint sich nicht auf die Volumenregulation auszuwirken.

Sehr wahrscheinlich erklären sich die Unterschiede in der Volumenregulation humaner Hepatozyten, wie sie in Abhängigkeit vom jeweiligen Verfahren der Kryokonservierung beobachtet wurden, über Veränderungen in der Architektur des HICC (welche bisher noch unbekannt ist) und/oder in der Regulation des HICC.

Die zusätzliche Verwendung von Trehalose als nichtmembrangängiges Kryoprotektivum konnte die Ergebnisse der Experimente mit alleiniger DMSO Zugabe nicht verbessern. Trehalose gehört zu den nichtmembrangängigen Kryoprotektiva und kann somit nicht von allein in die Zelle eindringen. Trehalose bildet mit den Hydroxylgruppen der Zellmembran Wasserstoffbrücken-Bindungen aus. Daher kann die Zellmembran auch in Wassermangel-Zuständen, wie es beim Einfrieren der Fall ist, ihre Fluidität behalten (Crowe, J.H. und Crowe, L.M., 1984). Da die natürlich vorkommenden Organismen, wie z.B. Hefen und Nematoden Trehalose als Schutz vor Kälte synthetisieren, wurde die Trehalose in das Zytoplasma der primären humanen Hepatozyten durch Elektroporation eingeschleust. Auch die Mikroinjektion ist eine mögliche Variante um die stabilisierende Wirkung von Trehalose intrazellulär zu nutzen. An Oozyten konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Trehalose nach Mikroinjektion die Entwicklung von Zygoten nicht

beeinträchtigt (Eroglu, A. 2003). In anderen Studien konnte durch die zusätzliche Zugabe von Trehalose in das Einfriermedium eine deutliche Verbesserung der Vitalität, der Anwachsrate, der Proliferation und metabolischer Prozesse gezeigt werden (Katenz, E., 2007). Die zusätzliche intra- und extrazelluläre Verwendung von Trehalose konnte die Ergebnisse der Experimente mit alleiniger DMSO Zugabe nicht verbessern. In den hier durchgeführten Experimenten scheinen die Zellen, durch den kombinierten Stress aus Kryokonservierung und Elektroporation, eher größeren Schaden erlitten zu haben. Dies könnte durch zusätzliche Membranschäden erklärt werden, die durch den Vorgang der Elektroporation entstanden sind. Gerade Primärkulturen sind oft zu empfindlich für diese Methode. Es kann, hervorgerufen durch den elektrischen Puls, zu irreversiblen Schädigungen der Zellmembran kommen, die in der Folge zu einem Absterben der Zellen führen (Benov, L.C., 1994 Ho S.Y. und Mittal G.S., 1996; Neumann, E. Kakorin, S. und Toensing, K. 1999). Eine Studie an primären Nervenzellen von Mäusen zeigte nach der Elektroporation eine Sterblichkeitsrate von 22-54%, je nach ausgewählten Elektroporations-Parametern (Mertz, K.D. et al., 2002).

Am Modellsystem der „*hanging droplet*“ Sphäroide wurde ein multizelluläres Aggregat aus primären humanen Hepatozyten erstellt, welches die Kryokonservierung eines Gewebes simuliert. Dies bringt *per se* große Probleme mit sich, verursacht durch die Heterogenität von Geweben und größeren Temperaturgradienten während der Kryokonservierung. Daher entwickelt sich die Forschung auf diesem Gebiet auch nur langsam. Auch kommt es während der Kryokonservierung oft zur Fragmentierung eines Gewebes. Ein möglicher Ansatz, um dies zu verhindern, wäre die Verkapselung von multizellulären Systemen mit Alginat (Wolf, R. et al., 2005; Zimmermann et al., 2003). Mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/ml wurden die primären humanen Hepatozyten direkt nach der Isolation zur Bildung der „*hanging droplet*“ Sphäroide eingesetzt. Bei der eingesetzten Zelldichte waren in jedem 20µl Tropfen ca. 400 Zellen. Nach 4 Tagen wurden die Sphäroide ge-

erntet und anschließend kryokonserviert. Da Präparate mit einer maximalen Höhe von ca. 10µm mit dem akustischen Mikroskop gemessen werden können, war die Messung die Volumenregulation frischer Sphäroide bedingt durch die Größe nicht möglich. Ein sehr großer Teil der angesetzten „*hanging droplet*“ Sphäroide war, bedingt durch die Insterilität von Primärkulturen, mit Mikroorganismen kontaminiert und musste verworfen werden. Durch nur sehr begrenzt zur Verfügung stehendes primäres humanes Lebergewebe, konnten nicht alle Bedingungen untersucht werden. Nur mit 10% DMSO in Kryoröhrchen kryokonserviert Sphäroiden wurden vermessen. Da die Sphäroide während oder nach der Kryokonservierung in Einzelzellen zerfallen sind, war nach dem Auftauen eine Messung der Volumenregulation möglich. Diese Zellen zeigten eine, zu in Kryoröhrchen mit 10% DMSO eingefrorenen Hepatozyten, identische Volumenregulation nach hypertonem Schock. Der RVI ist vergleichbar mit den Kontrollbedingungen, wohingegen auch hier eine weitere Volumenzunahme unter isotonen Bedingungen, nach dem hypertonen Schock dokumentiert wurde.

Die Funktion des HICC ist also grundsätzlich nach der Kryokonservierung nicht eingeschränkt. Das zeigt zum einen die HICC Aktivierung nach hypertonem Schock. Alle untersuchten Bedingungen zeigten RVI-Werte, welche mit Kontrollbedingungen nahezu identisch sind. Zum anderen zeigen auch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, dass es zu keiner Zunahme der Apoptose kam, weil die HICC Aktivität nicht gehemmt wurde.

Alle Experimente zeigten RVI-Werte, welche mit Kontrollbedingungen nahezu identisch waren. Sehr wahrscheinlich erklären sich die Unterschiede in der Volumenregulation humaner Hepatozyten, wie sie in Abhängigkeit vom jeweiligen Verfahren der Kryokonservierung beobachtet wurden, über Veränderungen in der Architektur und/oder in der Regulation des HICC. Es wird vermutet, dass die Hepatozyten den einmal aktivierten HICC nicht mehr effektiv deaktivieren können, so dass es zu der Dysregulation unter isotonen Bedingungen mit einer

weiteren Zunahme des Zellvolumens kommt. Um die molekulare Architektur des HICC zu untersuchen wurde im Weiteren, nach umfangreichen Modifikationen, das Screening einer siRNA Bibliothek mit dem akustischen Mikroskop möglich. Siehe Absatz 4.3. Auf diesem Wege sollte es möglich sein aufzuklären, ob es sich bei der veränderten isotonen Nachperiode um Effekte einer anderen HICC Architektur oder regulatorische Effekte handelt. Eine schematische Darstellung der möglichen Zusammenhänge der veränderten Volumenregulation ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

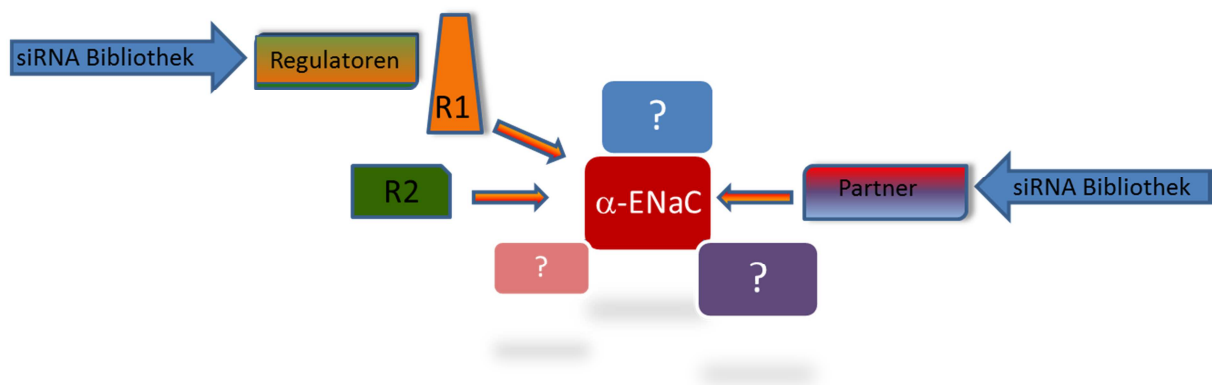


Abbildung 4.1:

Die schematische Darstellung zeigt mögliche Ursachen für eine veränderte Volumenregulation nach der Kryokonservierung von humanen Hepatozyten. Die rechte Seite zeigt, dass zum einen die molekulare Architektur verändert sein kann, welche durch ein Screening nach möglichen Partnern untersucht wird. Auf der linken Seite ist zum anderen eine Beteiligung von möglichen Regulationsfaktoren (beispielhaft R1, R2 genannt) dargestellt. Auch zur Klärung dieser Fragestellung ist ein Screening mit einer siRNA Bibliothek sinnvoll.

4.2 Mechanismen der zellulären Volumenregulation als Teil von Proliferation und Apoptose?

Es wird immer deutlicher, dass die Mechanismen der zellulären Volumenregulation entscheidend an der Regulation einer Reihe von physiologischen Prozessen beteiligt ist. Nicht nur die Lokomotion von Zellen, die Genexpression und einige anabole, wie auch katabole Prozesse des Metabolismus, sondern insbesondere auch die Proliferation und Apoptose. Unter hypertonen Bedingungen findet eine Zunahme des Zellvolumens während des RVI statt. Für die Richtigkeit der bestehenden Arbeitshypothese, welche besagt, dass die nach hypertonem Schock aktivierten HICC Kanäle identisch sind mit den bei der Proliferation unter isotonen Bedingungen aktivierten Kationen-Kanälen, konnten bereits deutliche Zusammenhänge von Bondarava, M. et al. 2009 für HepG2 Zellen und von Shimizu, T. et al. 2006. für HeLa Zellen gezeigt werden. Die Hemmung der HICC Aktivierung durch Amiloride, Flufenamat und Gadolinium korreliert direkt mit der Hemmung der Proliferation bei HepG2 Zellen. In Experimenten mit siRNA konnte gezeigt werden, dass es sich bei der α -Untereinheit des ENaC um eine funktionelle Komponente des HICC in HepG2 Zellen handelt. Eine deutliche Reduktion des RVI konnte unter dem Einsatz von siRNA gezeigt werden. Proliferationsassays und Zellzyklusanalysen legen dar, dass HepG2 Zellen die α -Untereinheit des ENaC benötigen, um von der G2 Phase in die M-Phase des Zellzyklus fortschreiten zu können (Bondarava, M. et al., 2009).

Auf Grundlage der Erkenntnisse, dass der HICC in kritischem Maße an der Proliferation beteiligt ist und eine Hemmung zu einer gehemmten Proliferation führt, wurde in dieser Arbeit stark proliferierende Zellen betrachtet. Primäre Zellen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) wurden einem hypertonen Schock unterzogen und die Aktivität des HICC mit dem akustischen Mikroskop untersucht. Die passive Schrumpfung nach hypertonem Schock, wie auch die Volumenzunahme unter isotonen Bedingungen nach dem hypertonen Schock („overshoot“) sind signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.2 und 3.15). Dies könnte durch eine höhere Anzahl oder Sensitivität von Aquaporinen in Tumorzellen bedingt sein. Für eine Vielzahl von Tumoren konnte eine Korrelation zwischen dem histologischen Grad der Tumorzellen und der Menge der Aquaporin-Expression gezeigt werden. In kolorektalen Tumorzellen wurde eine erhöhte Expression von AQP 1, 3 und 5 (Moon, C. et al., 2003), in menschlichen Gehirntumoren konnte eine erhöhte AQP 4 Expression nachgewiesen werden (Saadoun, S. et al. 2002). In B16F10 und 4T1 Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass durch eine Expression von AQP1 das Potential zur Bildung von Metastasen durch eine Erleichterung der Zellmigration auslöst wird (Hu, J. und Verkman, A.S., 2006). Durch einen erhöhten Wasserfluss könnte die Zellbewegung durch Wassereinstrom in die Lamellipodien erleichtert werden. Es konnte eine Beteiligung an der Proliferation von insbesondere sehr aggressiven Tumorzellen gezeigt werden, was vermuten lässt, dass den Aquaporinen eine Schlüsselrolle in der Tumorbilogie zukommt (Verkman, A.S. et al., 2007). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des HICC und damit des RVI bei HCC Zellen, signifikant größer ist als bei primären humanen Hepatozyten. Dies untermauert deutlich die äußerst wichtige Funktion des HICC bei der Proliferation und auch vielleicht im pathologischen Fall der Tumorentstehung bzw. bei der Tumorprogression. Ob die stärkere Ausprägung des RVI allein durch eine erhöhte Anzahl von HICC Kanälen oder durch eine größere Aktivität des HICC versucht wird,

möglicherweise ausgelöst durch die verstärkte Schrumpfung, ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Auch eine möglicherweise veränderte molekulare Architektur des HICC, welche noch größtenteils unbekannt ist, muss an dieser Stelle in Betracht gezogen werden.

4.3 Molekulare Identifikation des HICC

4.3.1 SASAM Screening

Hyperton aktivierte Kationen Kanäle, HICCs, sind die Hauptvermittler der hyperton aktivierten Na^+ -Leitfähigkeit des RVI. Dies konnte schon 1995 an primären Rattenhepatozyten gezeigt werden (Wehner, F. et al., 1995). Bei Rattenhepatozyten konnte eine Beteiligung des HICC am RVI in einem Verhältnis von 4:1:1, verglichen mit den Beiträgen des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE1) und dem $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symporter (NKCC1) gemessen werden (Wehner, F. und Tinel, H., 1998).

Anhand der Pharmakologie werden die HICCs in zwei Typen unterteilt: Zum einen Amilorid-sensitive und Flufenamat-unempfindliche HICCs, gegenüber Amilorid-insensitiven, aber dafür durch Flufenamat und Gadolinium hemmbare HICCs (Wehner, F., 2003). Zu der ersten Gruppe der Amilorid-sensitiven, aber Flufenamat-unempfindlichen HICCs gehören die primären Rattenhepatozyten. Zu der zweiten Gruppe der Amiloride-insensitiven, aber durch Flufenamat und Gadolinium hemmbaren HICCs, gehören zum Beispiel Neuro-2a Nervenzellen (Koch, J.P. und Korbmacher, C., 1999) und die Zellen der Zervix Karzinom-Zelllinie HeLa (Wehner, F. et al., 2003). Der HICC in primären humanen Hepatozyten gehört keiner der beiden Gruppen an, da er sowohl von Amiloride zu 64% gehemmt werden kann, wie auch durch Flufenamat und Gadolinium nahezu vollständig blockiert wird. Auf-

grund der Pharmakologie wird der HICC in primären humanen Hepatozyten als Mischtyp und mögliches Verbindungsglied zwischen Amilorid-sensitiven und Amilorid-insensitiven HICCs gesehen (Li, T. et al., 2005).

4.3.1.1 Methodischer Ansatz

Die bisher diskutierten Ergebnisse bezogen sich auf Experimente, welche allesamt an primären humanen Hepatozyten oder primären hepatozellulären Tumorzellen durchgeführt wurden. Da die Verfügbarkeit dieses primären Zell-Materials stark eingeschränkt ist, wurden für die Durchführung eines umfangreichen „Screenings“ mit einer siRNA Bibliothek als Alternative die humane Lebertumor-Zelllinie HepG2 eingesetzt.

Die Pharmakologie des HICC von primären humanen Hepatozyten (Li, T. et al. 2005) ist vergleichbar mit dem pharmakologischen Profil des HICC in HepG2 Zellen (Wehner, F. et al., 2002) (siehe Abbildung 4.2) Daher ist es wahrscheinlich, dass beide einen identischen molekularen Aufbau des HICC besitzen.

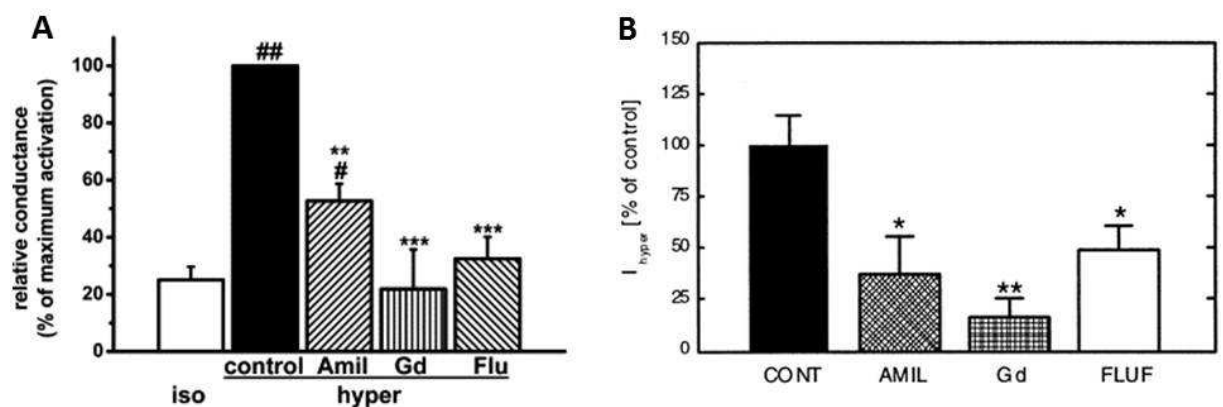


Abbildung 4.2

Pharmakologie des HICC in primären humanen Hepatozyten.

A: Nach der maximalen hypertonen Aktivierung in „whole-cell patch-clamp“ Experimenten wurden 100 μ M Amiloride, Gadolinium und Flufenamat zugesetzt (Li, T. et al., 2005). **B:** Einwärtsgerichtete

Ströme des HICC in HepG2 Zellen in Anwesenheit von 10 μ m Amiloride und Flufenamat, sowie 100 μ M Gadolinium (Wehner, F. et al. 2002).

Die experimentelle Erfassung von Zellvolumina erfolgte bisher über verschiedene Methoden, wie zum Beispiel der konfokalen Lasermikroskopie.

Die Vorteile der akustischen Mikroskopie gegenüber anderen bisher benutzten Methoden zur Volumenmessung bestehen darin, dass

- eine hohe zeitliche Auflösung möglich ist (Litniewski, J. und Breither- Hahn, J., 1990),
- keinerlei Färbungen der Zellen nötig sind und es so auch zu keinen Problemen durch Ausbleichen eines Markers kommen kann
- die Methode der akustischen Mikroskopie nicht invasiv ist (es kommt zu keiner Schädigung der Zellen, wie es zum Beispiel bei der konfokalen Lasermikroskopie durch hohe Strahlungsintensitäten vorkommen kann)(Briggs, G.A., Wang, J. und Gundle, R., 1993)
- Langzeitmessungen, in Hinblick auf die Untersuchung der Veränderungen des Zellvolumens während Proliferation und Apoptose, möglich werden.

Die Methode der zeitaufgelösten „*scanning acoustic microscopy*“ (SAM), ermöglicht es das Echo von der Oberseite der Zellen (Frontecho) klar von dem Echo der Unterseiten der Zellen bzw. des Glassubstrates (Substratecho) zu unterscheiden. Die Zellhöhe kann so aus dem jeweiligen Abstand zur akustischen Linse bestimmt werden (Weiss, E.C., Wehner, F. und Lemor, R., 2007).

Eine Messung des Zellvolumens liefert aufgrund der geringen Höhe von HepG2 Zellen keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Damit die Echotransienten der Frontechos und des Substratechos sicher voneinander getrennt werden können, dürfen die Zellen eine Mindesthöhe von ca. 3 μ m nicht unterschreiten. Dies ist bedingt durch die linsenab-

hängige Halbwertszeit des Echosignals. Nur, wenn die Ankunftszeiten der Echotransienten des Front- und des Substratechos mindestens 4ns voneinander getrennt sind, können die Signale bei einer mittleren Schallgeschwindigkeit von 1600m/s getrennt detektiert werden. Da aber HepG2 Zellen während des Schrumpfens nach dem hypertonen Schock diese Mindesthöhe unterschreiten, musste die Messmethode modifiziert werden. Es wurde nicht mehr die Höhe der Zellen aus der Differenz der Echotransienten bestimmt und daraus das Volumen berechnet, sondern es wurde nur noch die akustische Impedanz der Zellen betrachtet. Die akustische Impedanz ist das Produkt aus Schallgeschwindigkeit c und Dichte ρ . Da für diese Berechnungen nicht mehr die Differenz der Echotransienten des Frontechos und des Substratechos benötigt wurden, konnten auch HepG2 Zellen vermessen werden.

Die akustische Impedanz verhält sich reziprok zum Zellvolumen: Bei sinkendem Volumen der Zelle steigt, bei als konstant angenommener Schallgeschwindigkeit, die Dichte innerhalb der Zelle und die akustische Impedanz nimmt somit zu (siehe Abbildung 4.3). Die Berechnung des RVI kann sowohl nach der Bestimmung des Zellvolumens, als auch aus der akustischen Impedanz erfolgen.

Mit den einzelnen gemessenen Werten können nun folgende Parameter bestimmt werden:

Die Dicke der Zelle, $d, \frac{1}{2} (t_0 - t_1) c_0$

die Schallgeschwindigkeit in der Zelle c_1 ,

$$c_1 = c_0 \frac{t_0 - t_1}{t_2 - t_1}$$

Die akustische Impedanz der Zelle Z_1 ,

$$Z_1 = Z_0 \frac{A_0 + A_1}{A_0 - A_1}$$

die Dichte in der Zelle ρ_1 ,

$$\rho_1 = \frac{Z_1}{c_1}$$

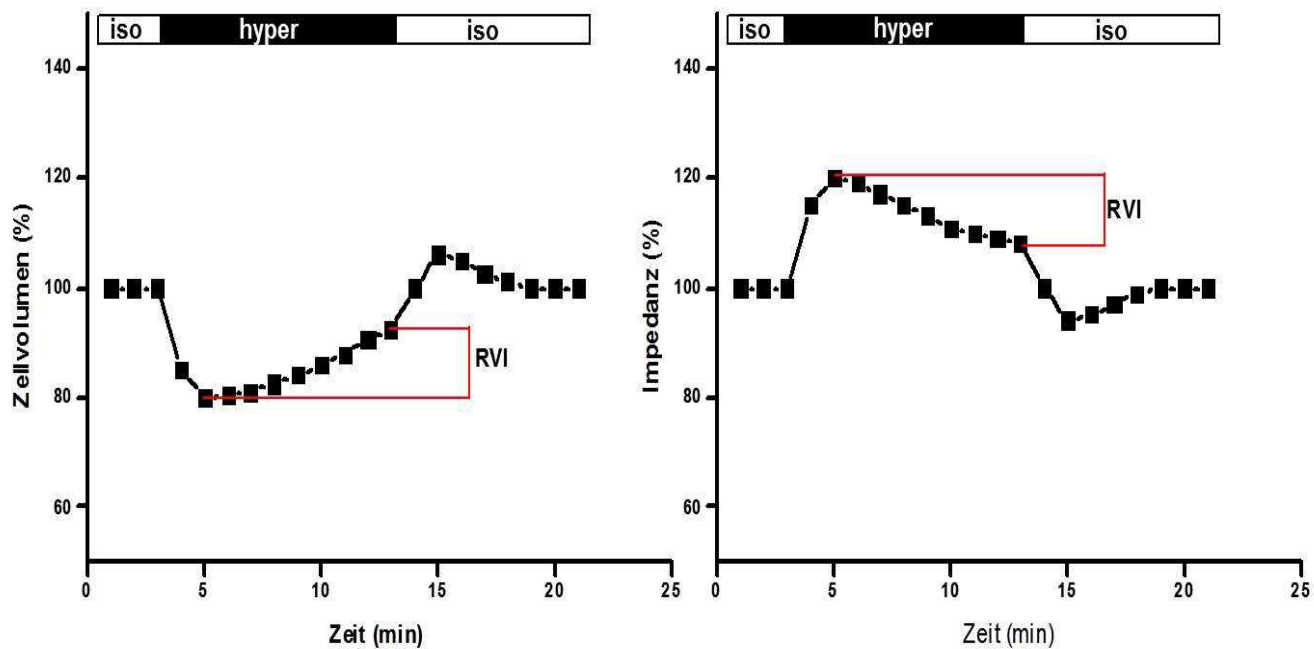


Abbildung 4.3:

Der Kurvenverlauf einer Impedanzmessung verläuft spiegelbildlich zu einer Messung des Zellvolumens. Bei beiden Messprinzipien ist die Information über den RVI gleichermaßen vorhanden.

Die genaue Architektur des HICC ist noch immer unbekannt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass die α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC) Bestandteil des HICC in HepG2 Zellen ist. Durch den Einsatz von siRNA-Technologie gegen die α -Untereinheit des ENaC, wird der mRNA Level für α -ENaC deutlich gesenkt. In der Folge konnte durch die elektrophysiologische Methode des „*patch-clamp*“ und durch akustische Mikroskopie gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Reduktion der HICC Aktivierung kommt. Zusätzlich konnte durch Proliferationsassays, Durchflusszytometrie und MTT Assays gezeigt werden, dass es in der Folge zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate führt (Bondarava, M. et al, 2009). Es konnte auch für HeLa Zellen gezeigt werden, dass eine blockierte HICC Aktivierung durch die pharmakologisch-wirksamen Substanzen Flufenamat und Gadolinium zu einer Reduktion der Proliferation und zur Stimulation von Apoptose kommt (Shimizu, T. et al., 2006). Auch für

Rattenhepatozyten konnte die Beteiligung von ENaC an der hyperton aktivierten Kationenleitfähigkeit gezeigt werden. Durch den Einsatz von antisense Oligonukleotiden gegen die α -rENaC Untereinheit (Böhmer, C. und Wehner, F., 2001), wie auch durch siRNA Experimente gegen die α -, β -und γ -rENaC Untereinheiten konnte eine verminderte HICC Aktivierung gezeigt werden (Plettenberg, S. et al., 2008). In Rattenhepatozyten werden alle vier Untereinheiten, α -, β -, γ - und δ -rENaC expremiert (Böhmer, C. und Wehner, F., 2001), wohingegen in humanen Hepatozyten nur die α - und δ -ENaC Untereinheiten expremiert werden, wie in „*real-time*“ PCR Experimenten gezeigt werden konnte. Die δ -ENaC Untereinheiten weist eine hohe Homologie zur α - ENaC Untereinheit auf und dient häufig, wenn sie vorhanden ist, als Ersatz für die α -ENaC Untereinheit (Kellenberger, S. und Schild, L., 2002). Über die Stöchiometrie des ENaC in humanen Hepatozyten ist bisher nichts bekannt. Gerade diese kann aber große Auswirkungen auf die Funktionalität des Kanals haben. So sollen für die maximale Funktion des epithelialen Natriumkanals alle drei Untereinheiten des Kanals benötigt werden (Canessa, C.M. et al., 1994; Fyfe, G.A., Quinn, A. und Canessa, C.M., 1998; McNicholas, C.M. und Canessa, C.M., 1997). Die meisten Autoren gehen von einem heterotetrameren Aufbau aus 2 α -, 1 β -, und 1 γ - Untereinheit aus (Dijkink, L. et al., 2002; Firsov, D. et al, 1998), welcher hier durch das Fehlen der β -, und γ -Untereinheit ausgeschlossen werden kann (Abbildung 3.14).

Um die molekulare Architektur des HICCs weiter zu untersuchen, wurde ein *Screening* mit einer siRNA Bibliothek durchgeführt. Diese beinhaltete 34 siRNA Sequenzen gegen Ionenkanäle und Transporter (siehe Anhang). Mit Hilfe der siRNA Technik verbindet sich ein zur mRNA des Proteins komplementäres 21-23 Basenpaare langes RNA-Stück mit der mRNA und führt zur post-transkriptionalen Degradation. Die Bildung des Proteins wird mit dieser Methode sequenzspezifisch verhindert (Chen, X. et al., 2004; Ichim, T.E. et al., 2004). Die HepG2 Zellen wurden einer reversen Transfektion unterzogen. Der je-

weilige Ansatz aus siRNA und Zusätzen (siehe Abschnitt 2 Material und Methoden) wurde kreisförmig mit einem Durchmesser von 165µm auf den Glasboden von Lap-Tek™ Kammern aufgedruckt. Die einzelnen siRNA Sequenzen der Bibliothek waren nicht fluorezenzmarkiert, wohingegen die Kontroll-siRNA mit Alexa 488 konjugiert war und so die Transfektionseffizienz von ca. 50% optisch bestimmt werden konnte. Am 3.Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in die Versuchsapparatur eingelegt und die akustische Impedanz auf einer Fläche von 60µm * 60µm bestimmt. Die x/y Auflösung wurde bei 100facher Mittelung auf 3,978µm * 3,978µm festgelegt. Es entstanden so 225 Messpunkte für jeden siRNA Spott. Bei den so gewählten Parametern wurden ca. 4,3 Sekunden pro siRNA Spott benötigt, innerhalb von 2 Minuten konnten 28 verschiedene siRNA Spotts gescannt werden. Die Messrohdaten wurden durch das Programm *SASAM Acoustic Researcher* verarbeitet und anschließend mit *ImageJ* und *Excel* analysiert.

Die ersten 10 Minuten fanden unter isotonen Bedingungen, die Messungen der Minuten 16-35 fanden unter hypertonen Bedingungen (5mM HEPES-Tyrode, 400mOsmol) statt. Die Messungen der 36-50 der Nachperiode wurden erneut unter isotonen Bedingungen durchgeführt.

Nach dem Wechsel auf hypertone Bedingungen machen die Zellen eine sehr schnelle, passive Zellschrumpfung durch (Wehner, F. et al., 1995; Wehner, F. und Tinel, H., 2000; Corasanti, J.G., Gleeson, D. und Boyer, J.L., 1990), welche sich durch einen Anstieg der akustischen Impedanz zeigte.

Innerhalb von 20 Minuten hypertonen Schocks konnte durch die Aktivierung des RVI eine Abnahme der akustischen Impedanz beobachtet werden. Der RVI betrug unter Kontrollbedingungen mit negativer siRNA $68,00 \pm 4,22\%$ (n=37). Dieser RVI Wert wurde zum besseren Vergleich auf $100 \pm 6,20\%$ festgelegt (siehe Abbildung 3.17) In der Nachperiode, bei erneut 300mOsmol zeigte sich eine schnelle, passive Zellschwellung (Wehner and Tinel, 2000; Corasanti, Gleeson, and Bo-

yer, 1990), welche sich in eine Zunahme der akustischen Impedanz äußerte.

4.3.1.2 Auswertung der Screening Daten

Die erhaltenen Rohdaten wurden zunächst durch das Software Programm *SASAM Acoustic Researcher* verarbeitet und anschließend mit den Programmen *ImageJ* und *Excel* weiter analysiert. Da die x/y Auflösung auf einer Fläche von 60x 60µm mit 3,978µm * 3,978µm festgelegt wurde, entstanden so 225 Messpunkte für jeden siRNA Spott. Diese wurden in der *ImageJ* Auswertung gemittelt. Für den Messwert der akustischen Impedanz unter isotonen Bedingungen wurde aus den letzten 3 gemittelten Messwerten, vor dem Wechsel zu hypertonem Medium, das arithmetische Mittel gebildet. Die Berechnung des RVI in Prozent bezieht sich auf die prozentuale Schrumpfung der Zellen bzw. die Zunahme der Impedanz nach dem Wechsel zu hypertonen Bedingungen. Von den relativen RVI Werten der Einzelversuche wurde das arithmetische Mittel gebildet. In die statistische Auswertung wurden nur Experimente einbezogen, welche die physikalisch bedingten Auswirkungen der veränderten Osmolaritäten zeigten, d.h. nach dem Wechsel von 300mOsm zu 400mOsm sollte eine Zunahme der Impedanz zu sehen sein und später bei der Rückkehr zu isotonen Bedingungen eine Abnahme der akustischen Impedanz. Dies wurde als Parameter für die Qualität des Experiments angesetzt.

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass auch nicht-transfizierte Zellen mit in die Ergebnisse eingeflossen sind. Da die verwendete siRNA Bibliothek keine Fluoreszenzmarkierung enthielt, war eine Unterscheidung von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen innerhalb eines siRNA-Spotts nicht möglich. Einzig die fluoreszenzmarkierte Kontroll-siRNA konnte zur Abschätzung der erfolgten Transfektion (~50%) herangezogen werden. Daher ist an-

zunehmen, dass die festgestellten Effekte einzelner siRNAs, bei sicher erfolgter Transfektion aller vermessenen Zellen, höchstwahrscheinlich noch deutlich stärker ausgeprägt gewesen wären. Bei der Selektion von α -ENaC transfizierten HepG2 Zellen konnte eine Reduktion des RVI auf $32,68 \pm 2,36\%$ gemessen werden (Bondarava, M., Dissertation). Zum Vergleich wurde hier ohne Selektion der transfizierten Zellen für α -ENaC ein RVI Wert von $61,29 \pm 8,75\%$ gemessen.

4.3.2 Mögliche molekulare Partner des HICC

4.3.2.1 NHE1 und NKCC1

Die durchgeführten Versuche zeigten eine relative Beteiligung von NHE1 (SLC9A1) und NKCC1 (SLC12A2) am RVI, welche mit früheren Ergebnissen übereinstimmen (Wehner, F. und Tinel, H., 2000). Demnach wird der Na^+ -Leitfähigkeit ein Beitrag zum RVI gegenüber NHE1 und NKCC1 von 4:1:1 zugeschrieben. Bei NHE1 handelt es sich um ein ubiquitär verbreiteten Na^+/H^+ -Antiporter, welcher an der Volumen- und pH-Regulation beteiligt ist. NHE1 wird unter hypertonen Bedingungen aktiviert (Orlowski, J. und Grinstein, S., 1997), durch einen sekundär-aktiven, elektroneutralen Transport werden H^+ -Ionen gegen Na^+ -Ionen ausgetauscht. Dieser Prozess ist kritisch für den normalen Zellmetabolismus und auch für die Proliferation (Ritter, M. et al., 1996; Bianchini, L. und Grinstein, S., 1993). Durch den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symporter, NKCC1 werden Na^+ , K^+ und 2Cl^- Ionen elektroneutral über die Zellmembran transportiert. NKCC1 ist im Gegensatz zu NKCC2 weit verbreitet in vielen Geweben und insbesondere in sekretorischen Epithelien. NKCC1 wird während des RVI aktiviert (Russell, J.M., 2000). Nach der Transfektion mit siRNA gegen NHE1 bzw.

NKCC1 wurde ein signifikant reduzierter RVI von $72,62 \pm 9,99$ % (n= 19; $p < 0,05^*$) bzw. $66,79 \pm 7,90$ % (n= 9; $p < 0,05^*$) gemessen. Diese Ergebnisse wurden erwartet, da es sich bei NHE1 und NKCC1 um bekannte Mechanismen des RVI handelt. Zusätzlich können diese Ergebnisse als Bestätigung für die Zuverlässigkeit der angewendeten Methode der akustischen Mikroskopie gesehen werden.

4.3.2.2 ENaC

Auch die Reduktion des RVI nach der Transfektion gegen die α -ENaC Untereinheit (Bondarava, M. et al., 2009), konnte mit einem RVI-Wert von $61,29 \pm 8,75$ % (n= 20; $p < 0,001^{***}$) hochsignifikant bestätigt werden. Auch für die δ -ENaC Untereinheit konnte eine Beteiligung nachgewiesen werden. Der RVI war signifikant um $27,14 \pm 6,5$ % (n= 19; $p < 0,05^*$) reduziert. Da die α - und δ - Untereinheiten des ENaC in HepG2 Zellen expremiert werden (Bachelorarbeit Gräßl, M., 2007), war eine Beteiligung der δ -Untereinheiten des ENaC am HICC als wahrscheinlich anzusehen. In der Literatur wird die δ -Untereinheit häufig als Ersatz für die α -Untereinheit beschrieben. Es wäre denkbar, dass die Inaktivierung einer der beiden Untereinheiten zu einem Ersatz durch die andere Untereinheit führt. Über eine mögliche Stöchiometrie in HepG2 Zellen ist allerdings nichts bekannt. Ob diese Theorie in HepG2 Zellen zutreffend ist, müsste durch eine gleichzeitige Inaktivierung beider Untereinheiten untersucht werden. Die β - und γ -Untereinheiten des ENaC sind in HepG2 Zellen zwar auf dem Genom codiert, werden aber nicht expremiert. Daher spielen diese hier keine Rolle beim RVI.

Besonders interessant ist, dass dem epithelialen Natriumkanal in einigen Systemen, wie in Zellen der glatten Gefäßwand-Muskulatur (VSMC), eine Rolle als mögliches mechanosensitives Protein zugeschrieben wird, welches mit Integrinen in Kontakt steht. Auch in C.

C. elegans ist die mechanosensitive Funktion von Kanälen der Degenerin/ENaC Familie bekannt. Über eine Interaktion mit Integrinen ist dann eine direkte Verbindung zu Proteinen der extrazellulären Matrix geknüpft. In Chondrocyten der Maus konnte durch Co-Immunoprecipitation eine Co-Lokalisation von ENaC und β_1 -Integrin gezeigt werden (siehe Abbildung 4.4, Shakibei, M und Mobasher, A., 2003). Integrine sind Transmembranproteine, welche als Mechanorezeptoren an vielen mechanosensitiven Zellprozessen beteiligt sind (Banse, A.J. et al., 1995; Porter, J.C. und Hogg, N., 1998). Über Integrine können Verbindungen über Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine) zum Cytoskelett hergestellt werden.

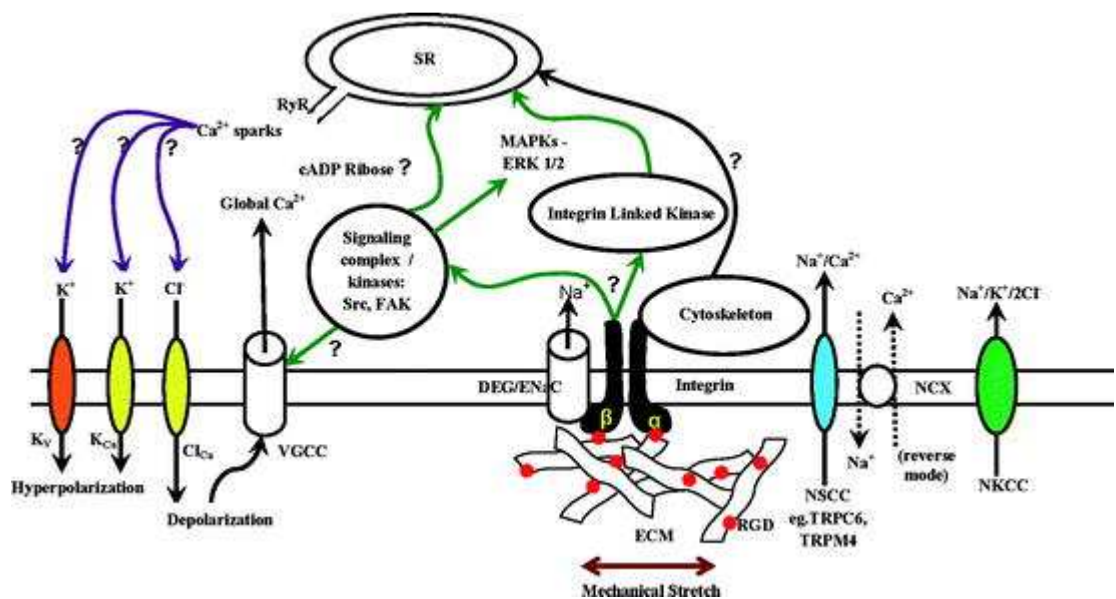


Abbildung 4.4

Mögliche Interaktion von ENaC mit Integrinen (Shakibei, M und Mobasher, A., 2003).

4.3.2.3 TRP Kanäle

4.3.2.3.1 TRPC Kanäle

Auf der Basis von Sequenzhomologien und funktionellen Ähnlichkeiten wird die Klasse der TRPC („Classical“) Kanäle in 4 Unterklassen geteilt: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7, TRPC4/5. Alle sieben TRPC Kanäle weisen eine sogenannte TRP Box am C-terminalen Ende auf, sowie 3-4 Ankyrin-Wiederholungen (Philipp, S. et al., 2000). TRPC Kanäle sind nicht selektive Ca^{2+} -permeable Kationen Kanäle, wobei der Selektivitäts-Quotient von $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ stark innerhalb der TRPC Familie variiert. TRPC Kanäle sind weit verbreitet, während ein Zelltyp zu meist gleich mehrere verschiedene TRPC Kanäle aufweist. Zusätzliche Komplexität entsteht durch die Ausbildung von Heterotetrameren. So kann TRPC1 Heterotetramere mit TRPC 4/5 bilden, während TRPC4/5 seinerseits Heterotetramere mit TRPC3/6/7 formen kann (Peterson et al, 2005). Nach der Transfektion von siRNA gegen die Mitglieder 3 und 5 der TRPC Familie konnte eine signifikante Reduktion des RVI mit $61,86 \pm 17,13 \%$ ($n= 7$; $p<0,05^*$) bzw. $70,72 \pm 9,57 \%$ ($n= 9$; $p<0,05^*$) gemessen werden. Es wäre also aufgrund der Ergebnisse denkbar, dass in HepG2 Zellen ein Heterotetramer aus TRPC3 und TRPC5 vorliegt und dieses im Zusammenspiel mit dem ENaC an der Aktivierung des HICC beteiligt ist. TRPC5 hat einen C-terminalen VTTRL Bereich zur Interaktion mit der 1. von 2 PDZ Domänen des NHERF (Obukhov, A.G. und Nowycky, M.C., 2004). NHERF geht Verbindungen zu Ezrin, Radixin und Moesin (ERM- Proteine) (Reczek, D. et al., 1997; Bretscher, A., 2000) ein. Somit können über eine Interaktion von TRPC5 und ENaC beide über die Bindung an ERM-Proteine mit Aktinfilamenten der Plasmamembran in Verbindung stehen, welche während hypertonem Schock in Rattenhepatozyten Stressfasern ausbilden (Olsen, H. et al., 2007). Die TRPC5 Aktivität wird durch EGF induzierte Stimulation von EGF-RTK gesteuert (Berrerides, V.J. et al., 2004).

4.3.2.3.2 TRPM Kanäle

Auf der Basis von Sequenzhomologien werden die Mitglieder der TRPM Familie in vier Gruppen unterteilt: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 und TRPM6/7. Die TRPM Unterfamilie weist eine hohe Variabilität für die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Permeabilität auf, von Ca^{2+} -impermeabel (TRPM4 und 5) bis hoch permeabel für Ca^{2+} und Mg^{2+} (TRPM6 und 7). Im Gegensatz zur TRPC- und TRPV Unterfamilie haben TRPM Sequenzen keine Ankyrin-Wiederholungen. Die Expression von TRPM1 ist in Melanomzellen reduziert, daher wird TRPM1 eine Tumor Suppressor Funktion zugeschrieben (Duncan, L.M. et al 1998 & 2001; Miller, A.J. et al. 2004). TRPM2 formt einen nicht selektiven Kationenkanal, welcher hauptsächlich für Na^+ und Ca^{2+} permeabel ist, aber auch für K^+ und Cs^+ . Es wurden zwei Spleiß Varianten von TRPM2 beschrieben, TRPM2-L (long) und TRPM2-S (short) (Zhang, W. et al, 2003). TRPM2 wird durch Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NAD) (Sano, J. et al., 2001) und durch cyclische ADP- Ribose (cADPr) aktiviert (Perraud, A.L., et al., 2001). ADP- Ribose kann aus β -NAD oder cADP- Ribose durch das Ekto-Enzym CD38 hergestellt werden (Fleig, A. und Penner, R., 2004). Ebenso führt H_2O_2 zur TRPM2 Aktivierung. Daher wird vermutet, dass TRPM2 eine Rolle als Sensor des Redoxstatus in der Zelle zukommt und involviert ist in durch ROS und TNF- α ausgelösten Ca^{2+} Einstrom und Zelltod Auslösung (Hara, Y. et al., 2002). Die ΔC Spleißvariante des TRPM2 konnte kürzlich als der HICC in HeLa Zellen identifiziert werden. Durch die siRNA Technik wurden sowohl die ΔC TRPM2 Spleißvariante, als auch das Ekto-Enzym CD38 inhibiert, was eine Inhibierung der HICC Aktivierung und damit auch des RVI zur Folge hatte (Numata, T. et al., 2012). Hier muss aber beachtet werden, dass der HICC in HeLa Zellen zu den Amilorid-insensitiven HICCs gehört. In humanen Krebszellen der Prostata konnte TRPM2 als Mediator der Zellproliferation identifiziert werden (Zeng, X. et al., 2010).

Neben TRPM2 ($71,28 \pm 10,34\%$; $n= 25$; $p<0,05^*$), konnten auch signifikante Hemmungen des RVI nach der Transfektion gegen TRPM4 ($68,28 \pm 9,27\%$; $n= 9$; $p<0,05^*$), TRPM5 ($52,24 \pm 11,41\%$; $n= 28$; $p<0,001^{***}$) und TRPM6 ($49,37 \pm 12,11\%$; $n= 19$; $p<0,001^{***}$) in HepG2 Zellen festgestellt werden. Im Unterschied zu allen anderen TRP Kanälen sind TRPM4 und TRPM5 impermeabel für Ca^{2+} . TRPM4 ist in vielen Geweben und Zelltypen anzutreffen, sowohl in Herz- und Muskelzellen, wie auch in Neuronen und Leberzellen. Es handelt sich um Ca^{2+} -aktivierte nicht selektive Kationen Kanäle, welche die Depolarisation der Plasmamembran vermitteln (Nilius, B. et al., 2003). Im Gegensatz zu TRPM5, wird die Ca^{2+} -Sensitivität von TRPM4 durch freies ATP, ADP und AMP gehemmt werden, wie auch durch die Substanz Decavanadate, welche die ATP-Bindungsstellen von ATP-abhängigen Transportproteinen stört (Nilius, B., 2004b). Die TRPM5 Aktivität wird durch langanhaltend hohe Ca^{2+} -Konzentrationen gemindert, wohingegen $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ diesen Effekt wieder umkehren kann (Liu, D. et al., 2003). Beide Kanäle weisen ähnliche Eigenschaften auf, wie Ca^{2+} abhängige Aktivierung, Selektivität, Einzelkanal-Leitfähigkeit und Spannungsabhängigkeit. Allerdings unterscheidet sich TRPM5 von TRPM4 durch eine schnellere Aktivierung und Inaktivierung. TRPM5 reagiert eher auf Ca^{2+} Freisetzung als auf langanhaltend hohe Ca^{2+} Konzentrationen wie TRPM4 (Fleig, A. und Penner, R., 2004). Da TRPM5 Kanäle auch als Geschmacksrezeptoren dienen (süß, umami und bitter), könnte dies als Trigger für die Auslösung von Aktionspotentialen und die Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanälen wirken (Zhang, Y. et al., 2003).

TRPM6 und TRPM7 Kanäle besitzen eine Serin/Threonin Proteinkinase an C-Terminus und tragen daher die Bezeichnung Kanal-Kinase oder auch „chanzymes“ als Kombination aus Kanal (*channel*) und Enzym (*enzym*) (Drennan, D. und Ryazanov, A.G., 2004; Chubonov, V. et al., 2005). Beide Kanäle haben funktionelle Charakteristika, die für die Mg^{2+} Homöostase von Bedeutung sind. TRPM7 reguliert die zelluläre Magnesium Homöostase, wohingegen TRPM6 eher die Regulation der

Magnesium Absorption im Darm und über die Nieren zugeschrieben wird (Konrad, M. et al., 2004). Allerdings ist auch in der Leber die physiologische Bildung von Glykogen und Glukose von Mg^{2+} Bewegungen abhängig (Torres, L.M. et al., 2005). EGF aktiviert TRPM6 über eine Src-Tyrosin Kinase und MAP-Kinase, auch die Expression in der Zellmembran wird durch EGF erhöht (Thebault, S. et al., 2009). In einigen Studien wird gezeigt, dass TRPM6 nur bei einer Co-Expression von TRPM7 zur Plasmamembran transportiert wird (Chubanov, V. et al., 2004). Für TRPM7 konnte gezeigt werden, dass durch die Kinase Funktion die Sensitivität des Kanals für eine Inhibierung durch Mg^{2+} reguliert wird, ebenso wie durch intrazelluläres cAMP. Für TRPM6 konnte eine solche Funktion nicht gezeigt werden. In Epithelzellen wird TRPM7 durch Membranspannung und hypotones Schwellen aktiviert (Numata, T. et al., 2007).

4.3.2.3.3 TRPV Kanäle

Die Familie der TRPV („vaniloid“) Kanäle besteht aus 4 Unterfamilien: TRPV1/2, TRPV3, TRPV4 und TRPV5/6. Die TRPV 1,2,3 und 4 sind permeabel für Ca^{2+} mit einem Permeabilitäts-Quotienten von P_{Ca}/P_{Na} zwischen ~ 1 und ~ 10 (Gunthorpe, M.P. et al., 2002). TRPV5 und TRPV6 sind die einzigen TRPV Kanäle, welche zum einen hochselektiv für Ca^{2+} Ionen sind und durch $[Ca^{2+}]_i$ streng reguliert werden. TRPV1-4 sind thermosensitive, nicht selektive Kationen- Kanäle. TRPV1, 2 und besonders TRPV3 können durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) aktiviert werden, wohingegen einige TRPC und TRPM Kanäle durch 2-APB blockiert werden (Hu, H.Z., 2004). Alle Mitglieder der TRPV Familie zeigen N-Terminal 3-5 Ankyrin Wiederholungen.

Die Transfektion gegen TRPV2 führte in dem Screening zu einem signifikant reduzierten RVI von $57,05 \pm 16,01\%$ ($n= 10$; $p<0,05^*$) nach

hypertone Schok. TRPV2 wird bei Temperaturen $> 53^{\circ}\text{C}$ aktiviert, durch Wachstumsfaktoren wie dem „insulin growth factor 1“ und dem Neuropeptid „head activator“ aktiviert. Interessanterweise wurde aber auch eine Aktivierung von TRPV2 durch die Dehnung der Membran („stretch-activated“) nach hypotonem Zellschwellen beschrieben (Muraki, K. et al., 2003), ebenso wie die durch Dehnung aktivierte Zunahme von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Christensen, O, 1987) in glatter Muskulatur (Beech, D.J. et al., 2004). TRPV2 ist direkt mit dem Rekombinase Genaktivator (RGA) verbunden. Diese Interaktion scheint eine wichtige Rolle bei der Expression des Kanals an der Zelloberfläche zu spielen (Barnhill, J.C. et al., 2004 und Stokes, A.J. et al. 2004). TRPV2 wird direkt von Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert (Stokes, A.J. et al., 2004). Auch TRPC5 steht über eine Interaktion mit NHERF, welcher eine wichtige Rolle bei der Bindung von PKA-Substraten an PKA über Ezrin spielt, in Verbindung (Shenolikar, S. et al., 2004). TRPV1 wird ebenfalls über PKA reguliert (De Petrocellis, L. et al., 2001). Vielleicht kommt der PKA eine weit verbreitete Rolle in der Regulation von TRP Kanälen zu (Pederson, S.F. et al., 2005).

4.3.2.3.4 TRPML Kanäle

Die TRPML („Mucolipin“) Familie besteht aus 3 Mitgliedern, TRPML1-3. Die TRPML Proteine sind relativ klein und haben wenige Homologien zu anderen TRP Kanälen. Die Transfektion gegen TRPML3, auch bekannt als Mucolipin 3, führte zu einem signifikant reduzierten RVI von $62,79 \pm 8,59\%$ ($n= 6$; $p<0,05^*$) nach hypertone Schok. TRPML3 hat ein sehr ähnliches Expressionsprofil wie TRPA1, welcher ein Kandidat für die mechanosensitive Weiterleitung in Haarzellen ist (Corey, D.P. et al., 2004).

4.3.2.3.5 TRPP1 (PKD1)

Auch die siRNA Transfektion gegen TRPP1, auch bekannt als PKD1, führte zu einem verringerten RVI von $53,52 \pm 14,23\%$ ($n= 7$; $p<0,05^*$). TRPP1 besitzt 11 Transmembrandomänen und hat eine sehr lange und komplexe extrazelluläre Domäne und eine intrazelluläre C-terminale Domäne, die mit dem C-Terminus von TRPP2 interagiert. Mutationen in TRPP1(PKD1) oder TRPP2 (PKD2) führen zu den schweren Erkrankung der zystischen Fibrose (PKD=*polycystic kidney disease*). Das Nierengewebe wird dabei von flüssigkeitsgefüllten Bläschen (Zysten) durchzogen und die Funktion des Organs empfindlich gestört. Die Zysten sind allerdings nicht auf Nierengewebe begrenzt, sie können auch in Lebergewebe, Gehirn oder im Pankreas auftreten (Nillius, B. et al., 2007). Wenn TRPP1 und TRPP2 in der Zellmembran vorhanden sind, verhindern Sie den Transfer des Helix-Loop-Helix Proteins (HLH) Id2, einem wichtigen Regulator der Proliferation und Differenzierung, in den Zellkern. Nach der Phosphorylierung des C-Terminus von TRPP1 kann Id2 gebunden werden. Liegt hier eine Mutation vor, wie es bei der polyzystischen Nierenerkrankung der Fall ist, gelangt Id2 in den Zellkern und erlaubt ein Fortschreiten des Zellzyklus von der G1 zur S Phase (Li, X. et al., 2005). Die verstärkte Proliferation führt schließlich zu der Bildung der Zysten. Id2 kann auch bei anderen Erkrankungen mit gesteigerter Proliferation eine Rolle spielen. Die Expression von TRPP1 in MDCK Zellen führt zu gehemmtem Wachstum und die Auslösung der Apoptose verhindert (Boletta, A., 2000).

4.3.2.3.6 Piezo1

Mechanische Stimuli können viele physiologische Prozesse auslösen, einschließlich der Berührung, dem Schmerzempfinden, dem Hören und der Blutdruckregulation. Mechanisch aktivierte Kationen Kanäle haben bereits in vielen Zellen gezeigt werden können, aber bisher konnten die molekularen Identitäten nicht geklärt werden. Eine Studie mit einer Neuroblastoma Zelllinie der Maus (N2A) zeigte, dass der mechanisch aktivierte Strom von der Expression von Piezo1 (Fam38A) abhängt (Coste, B. et al., 2010). Piezo1 und Piezo2 (Fam38B) sind Transmembranproteine, deren Gene evolutionär hochkonserviert sind. Piezo Gene kommen in eukaryotischen Organismen, Pflanzen, Nematoden, Insekten und Vertebraten vor, in Hefe aber scheinen sie zu fehlen. Mit 24-36 möglichen Transmembran-Domänen stellen Piezo1 und Piezo2 ganz klar eine neue Klasse von Membranproteinen dar (Xiao, R. and Shawn Xu, X.Z., 2010). In HepG2 Zellen konnte nach der Transfektion gegen Piezo1 ein signifikant reduzierter RVI von $67,63 \pm 13,81\%$ ($n= 9$; $p<0,05^*$) gemessen werden, nicht aber bei Piezo2.

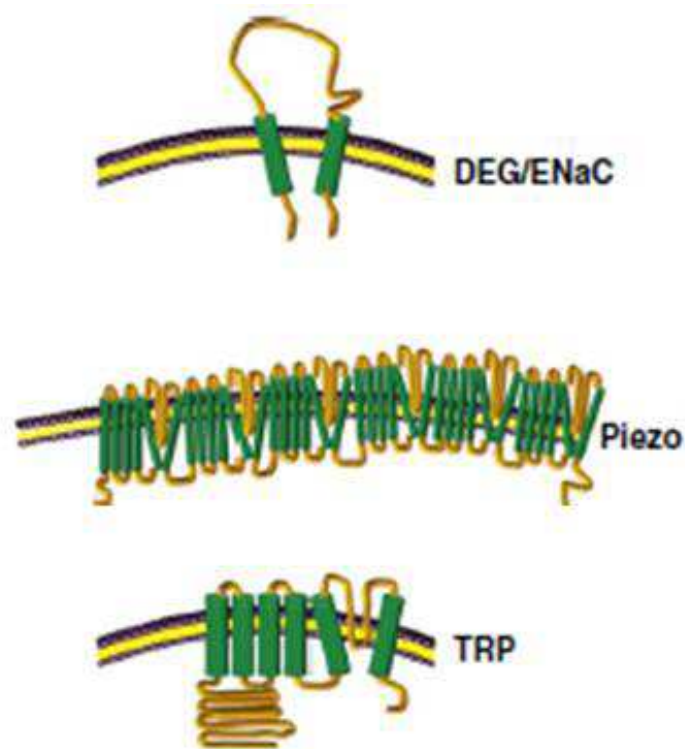


Abbildung 4.5

Schematische Darstellung der mechanosensitiven Kanäle in Eukaryoten. Ionenkanäle der DEG/ENaC Familie weisen 2 Transmembrandomänen auf, wohingegen TRP Kanäle 6 Transmembrandomänen haben. Die genaue Membrantopologie von Piezo ist unklar, eine mögliche Anordnung ist abgebildet. (Abbildung verändert nach Xiao, R. and Shawn Xu, X.Z., 2010)

4.3.3 Bewertung der Screening Ergebnisse

Werden alle Kanäle, welche bei dem durchgeführten siRNA Screening zu einem signifikant reduzierten RVI geführt haben, berücksichtigt, entsteht ein sehr großer Komplex aus vielen Einzelkomponenten, welche gemeinsam die molekulare Architektur des HICCs bilden können. Insgesamt entsteht ein Komplex aus 12 Ionenkanälen (siehe Abbildung 4.6). Es ist nicht wahrscheinlich, dass der HICC aus so vielen miteinander fest verbundenen Ionenkanälen besteht. Aber angesichts der großen osmotischen Schwankungen, denen insbeson-

dere Leberzellen ausgesetzt sind, kann durch eine mögliche Variabilität der molekularen Architektur auf wechselnde innere Bedingungen reagiert werden. Es wäre also möglich, dass der HICC sehr anpassungsfähig reagieren kann, um die wichtige Volumenregulation aufrechterhalten zu können, aber auch um den Prozess der Proliferation zu steuern. Die tatsächliche Zusammensetzung des HICC könnte also von den jeweils aktuellen Bedingungen durch eine posttranslationale Modifikation oder auch an anderen Stationen der Genregulation bestimmt werden. Über die Verbindung von ERM Proteinen mit Integrinen und CD98hc könnten Informationen über die äußeren Bedingungen an den HICC geleitet werden und über regulatorische Komponenten gesteuert werden. Wenn man die bisherigen Untersuchungen zu α -ENaC berücksichtigt, ist anzunehmen, dass es sich bei α -ENaC um eine konstante Komponente des HICC handelt, die von den anderen Komponenten ergänzt wird. Da TRPC3 und TRPC5 Heterotetramere bilden, ist zu erwarten, dass diese zusammen vorhanden. Gleiches gilt für TRPM4 und TRPM5 sowie für TRPM6 und TRPM7, auch wenn eine Transfektion gegen TRPM7 keine signifikante Reduktion des RVI zeigte. Zöge man nur hochsignifikante Ergebnisse ($p < 0,001^{***}$) des siRNA Screenings in Betracht, so wäre die Architektur auf die Komponenten α -ENaC, TRPM5 und TRPM6 beschränkt (siehe Abbildung 4.9 orange markiert).

In einem Screening mit dem „*Split-Ubiquitin Membrane Yeast two-hybrid System*“, welches es ermöglicht die Interaktion zwischen zwei Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae* nachzuweisen (Johnsson, N. und Varshavsky, A., 1994; Fetchko, M. und Stagljar, I., 2003), wurden Interaktionen zwischen α -ENaC und möglichen Partnern oder Regulatoren untersucht (Mayer- Wrangowski, S. und Koch, J., 2008). Auch, wenn die Möglichkeit falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse bei diesem System besteht, sind einige hochinteressante Interaktionen gezeigt worden. Zum einen wurde eine Interaktion von α -ENaC mit dem *Apoptosis-inducing factor 2* (AIFM2) gezeigt. Bei AIFM2 handelt es sich vermutlich um einen p53-*downstream* Effektor, dessen

Expression in Tumorzellen reduziert ist (Wu, M. et al., 2004). Wenn man die wichtige Rolle des HICC in Proliferation und Apoptose beachtet, ist ein regulatorischer Zusammenhang zwischen dem HICC und AIFM2 sehr wahrscheinlich. Auch Interaktionen mit spannungsabhängigen Anionen Kanälen (VDACs), welche ebenfalls, durch Cytochrom C Freisetzung nach der Aktivierung durch *Bak* und *Bax*, einen Beitrag bei der Auslösung von Apoptose leisten, (Shimizu, S. et al., 2000), wurden mit der α -ENaC Untereinheit in Verbindung gebracht. Aber auch für BCLx, welches anti-apoptotisch durch die Schließung von VDAC Kanälen wirkt, konnte eine Interaktion gezeigt werden.

Besonders interessant ist auch die Interaktion mit dem heterodimeren Transporter CD98, welcher über den $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt ist. Die Familie der TRP Kanäle spielt eine Rolle bei der Änderung von intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen durch die Bereitstellung von Ca^{2+} Eintrittswegen. Somit ist auch hier ein möglicher Zusammenhang wahrscheinlich. Zusätzlich assoziiert CD98hc mit Integrinen, worüber Integrin-abhängige Signale geleitet werden, welche die Tumorgnese vermitteln (Feral, C.C., 2005).

Die gezeigte Interaktion mit Rab7A, einer kleinen GTPase der Rab Familie, welche den endocytotischen Transport von frühen zu späten Endosomen reguliert, könnte ein wichtiger Hinweis auf einen Regulator des HICC Transportes zur Plasmamembran sein. Bei fehlenden Wachstumsfaktoren wird durch Rab7A der Abbau von Nährstofftransportern von Glukose und Aminosäuren vermittelt, was schließlich durch fehlende Nährstoffe zur Auslösung der Apoptose führt (Edinger, A.L. et al., 2003). Auch der Abbau des EGF- EGFR Komplexes wird von Rab7A vermittelt (Ceresa, B.P. und Bahr, S.J., 2006). In HT-29 Zellen wurden Amilorid-sensitive ENaC Ströme durch die Expression von Rab3 und Rab27 gehemmt und auch Rab4 greift in ENaC vermittelte Ströme ein, indem die Kanäle vermutlich nicht in die Plasma-

membran eingebaut werden und im Zytoplasma verbleiben (Saxena, S. et al., 2005). Dies legt nahe, dass die Proteine der *Rab* Familie durch den Transport zur Plasmamembran und Abbau an der Regulation des HICC beteiligt sind.

Zusammenfassend erscheint die molekulare Architektur des hyperton aktivierten Kationen Kanals um ein vielfaches Komplexer als zunächst angenommen. Der HICC scheint nicht nur aus einem Dimer von α -ENaC und einem bisher unbekanntem Partner zu bestehen, sondern aus einem riesigen variablen Komplex von Kanälen, welche es ermöglichen die HICC Aktivität wechselnden äußeren Bedingungen anzupassen. Es wäre also ein Stammaufbau (siehe Abbildung 4.6 Markierung in orange) aus den Komponenten α -ENaC, TRPM5 und TRPM6 denkbar, welche von TRPM4, TRPM2, einem Komplex aus TRPC5/TRPC3 sowie TRPV2, TRPML3 ergänzt werden können. Auch PKD1 und Piezo1 sind an der HICC Aktivierung beteiligt.

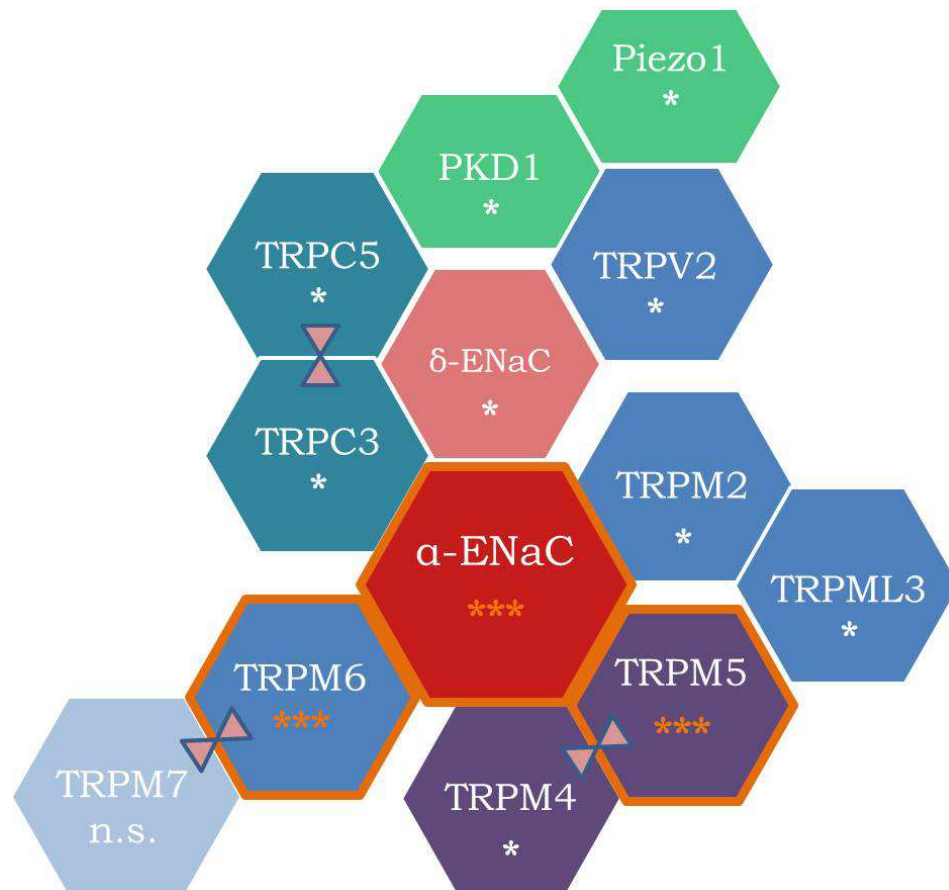


Abbildung 4.6 :

Schematische Darstellung der möglichen Interaktionspartner von α -ENaC in HepG2 Zellen. Details siehe Text.

Neben der großen Variabilität des molekularen Aufbaus, sind auch viele regulatorische Komponenten vorhanden, welche die Aktivität, den Zusammenbau, den Transport sowie den Abbau des HICC regulieren können. Insbesondere die Interaktion des HICC mit Integrinen und Integrin-abhängigen Signalen, Rab Proteinen, EGF Signalen und über NHERF Kontakt zu ERM Proteinen, zeigt die Verknüpfung der zellulären Volumenregulation mit den Mechanismen der Proliferation und Apoptose. Die möglichen Zusammenhänge sind in Abbildung 4.7 schematisch dargestellt.

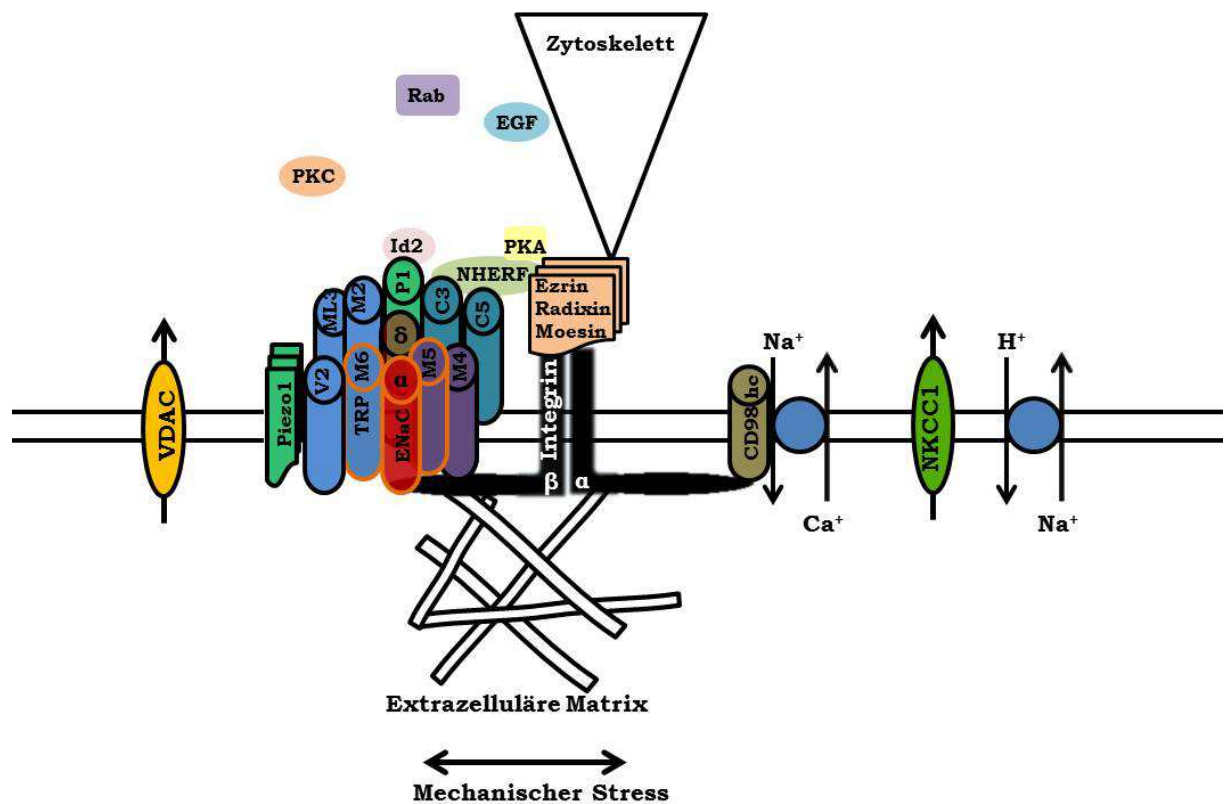


Abbildung 4.7

Der mögliche molekulare Aufbau und direkte Interaktionen des HICC in HepG2 Zellen. Details siehe Text.

4.4 Ausblick

Da an dieser Stelle nicht festgestellt werden kann, ob alle bisher identifizierten TRP Kanäle wirklich an dem molekularen Aufbau des HICC beteiligt sind oder, ob ihnen eine mehr regulatorische Rolle zukommt, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Um die direkte Interaktionen der Ionenkanäle in der Membran nachzuweisen, würde sich die Methode der Co-Immunopräzipitation anbieten. In der Membran interagierende Proteine würden miteinander ver-

netzt und anschließend in einem „pull-down Assay“ isoliert. Durch Massenspektrometrie und „Western Blot“ Analysen wäre eine Identifizierung möglich. Bisher konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass TRPM7, TRPP2, ASIC1 und CFTR höchstwahrscheinlich nicht mit α -ENaC in der Membran interagieren (Bondarava, M., Dissertation). Anhand dieser Methode könnte auch untersucht werden, ob TRPM4/TRPM5, TRPC3/TRPC5, TRPM6/TRPM7 in humanen Hepatozyten eine Dimerisierung zeigen.

Gleichzeitig wäre es mit Hilfe der „FRET“ („Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer“)-Technik möglich Proteininteraktionen *in vivo* nachzuweisen (Verveer, P. et al., 2005; Wouters und Bastiaens, P., 2006). Durch die große Anzahl der interagierenden Proteine und eine eingeschränkte Anzahl verfügbarer unterscheidbarer Fluorophore, wäre eine simultane Darstellung aller Komponenten jedoch eher nicht möglich. Über mehrere Teilschritte wäre aber eine Identifikation denkbar.

Des Weiteren wäre der Einsatz eines konfokalen Raman Mikroskops wünschenswert, um die reale chemische Zusammensetzung einer Zelle bei gleichzeitig hoher räumlicher Auflösung zu untersuchen. Die Darstellung der Wasserbewegung über Aquaporine, unter anisotonen Bedingungen, würde mit dieser Technik möglich.

5. Zusammenfassung

Die Lagerung von biologischem Material bei sehr tiefen Temperaturen über lange Zeiträume wird als Kryokonservierung bezeichnet. Da Stoffwechselprozesse und chemische Reaktionen bei kryogenen Temperaturen nahezu eingestellt werden, sind kryokonservierte Zellen für sehr lange Zeit lagerbar. Heute ist die Kryokonservierung besonders in der Reproduktionsmedizin ein fest etabliertes, gut funktionierendes System, um Eizellen, Spermien oder Embryonen für lange Zeit ohne schädigende Einflüsse zu konservieren. Primäre humane Hepatozyten können Patienten mit einem akuten Leberversagen gespritzt werden und können anschließend ihre Funktion in dem geschädigten Organ aufnehmen (Hughes et al., 2006; Horslen, S.P. und Fox, I.J., 2004; Bilir B.M. et al., 2006). Dies ist eine besonders schnelle und einfache Methode einem solch schwer erkrankten Patienten zu therapieren. Aber die Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten ist sehr begrenzt. Daher ist es sehr erstrebenswert die Kryokonservierung von humanen Hepatozyten einer Weiterentwicklung zuzuführen, um jederzeit auf kryokonserviertes Material zurückgreifen zu können (Hengstler, J.G. et al. 2000; Katenz, E. et al, 2007).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren zur Kryokonservierung verwendet. Die Auswirkungen von sinkenden Gefrierschutzmittel-Konzentrationen wurden untersucht und mit frisch isolierten humanen Hepatozyten verglichen. Die HICC Aktivierung nach hypertonem Schock wurde als Qualitätsparameter für die Kryokonservierung eingesetzt. Es zeigte sich, dass nur in den neuartigen, am IBMT Fraunhofer, St. Ingbert, entwickelten Multi- Well Substraten mit 10% DMSO kryokonservierte humane Hepatozyten eine absolut zu frischen Zellen vergleichbare HICC Aktivierung und

Regulation zeigten. Bei allen anderen getesteten Bedingungen, wie zusätzlicher Trehalose und *hanging-dropled* Sphäroiden als Gewebemodell, wurde eine veränderte Volumenregulation nach dem hypertonen Schock festgestellt, welche sich am ehesten durch eine veränderte Regulation oder Architektur des HICC erklären lässt. Zellen, welche den Vorgang der Kryokonservierung überlebt haben, zeigen keine erhöhte Bereitschaft zu Apoptose oder Nekrose, wie in durchflusszytometrischen Messungen gezeigt werden konnte.

In den vergangenen Jahren ist immer deutlicher geworden, dass die zelluläre Volumenregulation nicht nur für die Homöostase, Lokomotion und Genexpression von großer Bedeutung ist, sondern auch die physiologischen Prozesse der Proliferation und Apoptose eng mit den Mechanismen der Volumenregulation, RVD (*regulatory volume decrease*) und RVI (*regulatory volume increase*), verknüpft sind. Die Mechanismen des RVD finden sich in der apoptotischen Volumenabnahme (AVD) wieder (Okada, Y. und Maeno, E., 2001; Okada, Y. et al., 2006). Die Beweise dafür, dass es sich bei dem Hauptmechanismus des RVI, den hyperton aktivierten Kationen Kanälen (HICC), um identische Kanäle handelt, die während der Proliferation aktiviert werden, haben sich in den letzten Jahren verdichtet (Böhmer, C. und Wehner, F., 2001; Bondarava, M. et al., 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des HICC und damit der RVI bei primären humanen hepatozellulären Tumorzellen (HCC Zellen) signifikant größer ist als bei primären humanen Hepatozyten. Dies untermauert die wichtige Funktion des HICC bei der Proliferation und auch vielleicht im pathologischen Fall der Tumorentstehung bzw. bei der Tumorprogression. Auch die passive Schrumpfung nach hypertonem Schock, wie auch die Volumenzunahme unter isotonen Bedingungen nach dem hypertonen Schock sind signifikant erhöht. Dies könnte durch eine höhere Anzahl oder Sensitivität von Aquaporinen in Tumorzellen bedingt sein. Für eine Vielzahl von Tumoren konnte eine Korrelation zwischen dem

histologischen Grad der Tumorzellen und der Menge der Aquaporin-Expression gezeigt werden. (Moon, C. et al., 2003).

Ob die stärkere Ausprägung des RVI in HCC Zellen allein durch eine erhöhte Anzahl von HICC Kanälen oder durch eine größere Aktivität des HICC versucht wird, ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Allerdings bleibt die molekulare Struktur des HICC in HepG2 (humane Hepatozyten Tumorzelllinie) und primären humane Hepatozyten bisher unbekannt. In HeLa Zellen konnte die Identität des HICC als die ΔC Spleiß Variante eines transienten Rezeptorpotential Kanals (TRPM2) kürzlich aufgeklärt werden (Numata, T., 2012). Allerdings weist der HICC in HeLa Zellen eine deutlich andere Pharmakologie auf, als der HICC in humanen Hepatozyten. Während der HICC in HeLa Zellen insensitiv auf Amilorid reagiert, weisen humane Hepatozyten eine Amilorid Sensitivität auf, was auf eine Beteiligung des epithelialen Natriumkanals ENaC hinweist (Wehner, F. et al., 2003). Die Beteiligung der α - Untereinheit des ENaC an der hypertone aktivierten Leitfähigkeit, sowie der Volumenregulation (RVI) und der Proliferation konnte für HepG2 Zellen gezeigt werden (Bondarava, M., 2009). Allerdings ist der HICC in humanen Hepatozyten auch deutlich für Ca^{2+} permeabel, was auch hier eine Beteiligung von TRP Kanälen an der hypertone aktivierten Leitfähigkeit nahe legt (Li, T. et al, 2005).

Mit Hilfe einer siRNA Bibliothek gegen Ionenkanäle und Transporter wurde mit akustischer Mikroskopie nach möglichen molekularen Interaktionspartnern des HICC gesucht. Dabei konnten zunächst die bereits aus unserem Labor bekannten Beteiligungen von α -ENaC, NHE1 und NKCC1 am RVI selbst bestätigt werden. Es konnten zusätzlich zwei Ionenkanäle aus der TRPC Familie, sowie vier Ionenkanäle aus der TRPM Familie, sowie ein TRPV Ionenkanal identifiziert werden, deren „Silencing“ zu signifikant reduzierten RVI nach hypertone Schock führten. Auch siRNA Transfektionen gegen TRPML3, PKD1 und Piezo1 führten zu signifikant reduzierten RVI Werten. PKD1 und Piezo1 sind wahrscheinlich nicht direkt an der

Architektur des HICC beteiligt, aber vermutlich an der Regulation der HICC Aktivität.

6. Summary

The storage of biological materials at low temperatures over a long period of time is called cryopreservation. As physiological processes and chemical reactions are almost stopped at cryogenic temperatures, cryopreserved cells can be stored for long time. Today cryopreservation is a well-established method, to cryopreserve sperm, ovule and embryos in reproduction medicine without damaging influences. Also, primary human hepatocytes which are infused to patients with acute liver failure, can work in the damaged organ (Hughes et al., 2006; Horslen, S.P. and Fox, I.J., 2004; Bilir, B.M. et al., 2006). This is a very simple and fast method to cure such critically ill patients. But the availability of human hepatocytes is very limited. Therefore it is worthwhile to further investigate cryopreservation of human hepatocytes, to have cryopreserved material at any time point (Hengstler, J.G. et al. 2000; Katenz, E. et al, 2007).

In this work two different methods of cryopreservation were used as well as decreasing concentrations of cryoprotectant to be compared to fresh isolated human hepatocytes. The HICC activation after hypertonic shock was used as quality parameter of the cells after cryopreservation. It is shown, that cells that were cryopreserved in the new IBMT Fraunhofer, St. Ingbert, multi-well cryosubstrat with a DMSO concentration of 10% showed a HICC activation and regulation exactly comparable to fresh human hepatocytes. All other tested conditions, like additional Trehalose treatment or hanging-dropled spheroids, led to a changed cell volume regulation, which presumably can be explained by a changed HICC activity or architecture. Cells that survived the cryopreservation do not show a higher affinity to apoptosis or necrosis, as is was measured by flow cytometry.

In the last years it became more and more evident, that cell volume regulation is not only essential for cell homeostasis, locomotion and gene expression, but also that the physiological processes of apoptosis and proliferation are tightly connected to the cell volume regulation mechanisms of regulatory volume decrease (RVD) and regulatory volume increase (RVI). The functional mechanism of the RVD is present in the apoptotic volume decrease (AVD) (Okada, Y. and Maeno, E., 2001; Okada, Y. et al., 2006). There is more and more evidence for the main mechanisms of RVI, the hypertonicity activated cation channels (HICC), being identical to activated channels during proliferation (Böhmer, C. and Wehner, F., 2001; Bondarava, M. et al., 2009). In this work it is shown that the HICC activation and therefore the RVI is significantly increased in primary human hepatocellular carcinoma cells (HCC cell) as compared to primary human hepatocytes. These results confirm the important function of the HICC channels during proliferation and probably during tumor genesis or tumor progression. The passive shrinkage as well as the volume increase post-hypertonic is increased. This could be due to an increased number or sensitivity of aquaporins in tumor cells. For a multitude of tumors a correlation between histological grade and the amount of aquaporin-expression was shown (Moon, C. et al., 2003). If the stronger RVI results through a higher number of HICC channels or if the single channel activity is increased, remains unclear here. However the molecular structure of the HICC in HepG2 cells (human hepatoma cell line) and primary human hepatocytes is unknown. Just recently the ΔC splicing variant of a transient receptor potential channel (the TRPM2 channel) was identified as the HICC in HeLa cells (Numata, T., 2012). However the HICC pharmacology in HeLa cells is quite different from the HICC in humane hepatocytes. As the HICC in HeLa cells is insensitive to amiloride, is the HICC in human hepatocytes sensitive to amiloride treatment. This gives a link to the epithelial sodium channel ENaC (Wehner, F. et al., 2003). For HepG2 cells a contribution of the α -subunit of the ENaC is

proliferation and hypertonicity activated conductance was shown (Bondarava, M., 2009). Of note, the HICC in human hepatocytes is clearly permeable for Ca^{2+} permeable, which gives a link to a TRP channel contribution to the hypertonicity activated conductance (Li. T. et al., 2005). A screening for possible molecule interacting partners of the HICC was performed with an acoustic microscope by the use of a siRNA library directed against ion channel and transporters. Thereby the known contributions of α -ENaC, NHE1 und NKCC1 at the RVI were confirmed. In addition the silencing of two ion channels of the TRPC family, as well as four ion channel of the TRPM family and one TRPV ion channel was identified, which all caused a significantly reduced RVI after hypertonic shock. After transfection with anti-TRPML3, anti-PKD1 and anti-Piezo1 siRNA reduced RVI values were shown as well. PKD1 and Piezo1 are most probably not involved in the HICC architecture directly, but they may contribute to HICC regulation.

7. Abkürzungsverzeichnis

A/D Wandler	analog/ digital Wandler
ASIC	<i>Asic- sensing Ion Channel</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AVD	<i>Apoptotic volume decrease</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cADP	zyklisches Adenosin Diphosphat
Cl ⁻	Chlorid
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
C-terminal	Carboxy- terminal
DEG/ENaC	Degenerin/ Epithelialer Natrium Kanal
DMEM	“Dulbecco`s Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FKS	Fötales Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
Gd ³⁺	Gadolinium III

G- Protein	GTP bindendes Protein
HCC	<i>human hepatocellular carcinoma</i>
HEPES	4-(2- Hydroxyethyl)-piperazin -1-ethansulfonsäure
HepG2	<i>Human hepatoma cell line</i>
HICC	<i>Hypertonicity-induced cation channel</i>
Hz	Herz
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
K ⁺	Kalium
MG	Molekular Gewicht
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
n	Anzahl der Versuche
Na ⁺	Natrium
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher 1
NKCC1	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Symporter
n.s.	Nicht signifikant
N- terminal	Amino- terminal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pl	Pico Liter
PLC	Phospholipase C
R	Widerstand
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium</i>
RVD	<i>Regulatory Volume Decrease</i>

RVI	<i>Regulatory Volume Increase</i>
SAM	<i>scanning acoustic microscopy</i>
SASAM	<i>Saarland scanning acoustic microscopy</i>
SD	Streuung um den Mittelwert
Sec.	Sekunde
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwerts
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
TRP Kanäle	Transient Rezeptorkanäle
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Das relative Zellvolumen primärer humaner Hepatozyten nach hypertonem Schock.	Seite 59
Tabelle 3.2	Veränderung des Zellvolumens von mit 5%, 7% und 10% DMSO im Kryoröhrchen kryokonservierten humanen Hepatozyten.	Seite 62
Tabelle 3.3	Veränderung des Zellvolumens von mit 5%, 7% und 10% DMSO im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten.	Seite 64
Tabelle 3.4	Veränderung des Zellvolumens von mit 5%, 7% und 10% DMSO im Kryoröhrchen + Trehalose kryokonservierten humanen Hepatozyten.	Seite 67
Tabelle 3.5	Veränderung des Zellvolumens von mit 5%, 7% und 10% DMSO + Trehalose im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten.	Seite 70
Tabelle 3.6	RVI von mit 5%, 7% und 10% DMSO im IBMT und 5%, 7% und 10% DMSO + Trehalose im Kryoröhrchen und im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten.	Seite 72
Tabelle 3.7	Mittleres Zellvolumen nach 10 minütiger isotoner Nachperiode von mit 5%, 7% und 10% DMSO im IBMT und 5%, 7% und 10% DMSO + Trehalose im Kryoröhrchen und im IBMT Multi-Well Kryosubstrat kryokonservierten humanen Hepatozyten	Seite 73
Tabelle 3.8	Veränderung des Zellvolumens von mit 10% DMSO im Kryoröhrchen kryokonservierten Sphäroiden aus humanen Hepatozyten.	Seite 75
Tabelle 3.9	Die relative akustische Impedanz von HepG2 Zellen nach hypertonem Schock.	Seite 87

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	<i>Schematische Darstellung der wesentlichen Prozesse während des Einfrierens</i>	3
Abbildung 1.2	<i>„Regulatory Volume Decrease (RVD)“</i>	11
Abbildung 1.3	<i>„Regulatory Volume Increase (RVI)“</i>	13
Abbildung 1.4	<i>Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen zellulärer Volumenregulation und Proliferation bzw. Apoptose.</i>	15
Abbildung 1.5	<i>Funktionelle Domänen des epithelialen Natriumkanals (ENaC)</i>	21
Abbildung 1.6	<i>Phylogenetischer Stammbaum der TRP</i>	23
Abbildung 1.7	<i>Zusammenfassung wichtiger struktureller Eigenschaften und Protein- Protein Interaktionsstellen der TRP</i>	24
Abbildung 2.1	<i>Menschliches Lebergewebe mit Tumorgewebe</i>	28
Abbildung 2.2	<i>Schematische Darstellung der Präparation von primären humanen Hepatozyten</i>	29
Abbildung 2.3	<i>Kryoröhrchen und IMBT Multi-Well Substrat</i>	30
Abbildung 2.4	<i>Schematische Darstellung von Hanging dropletd Sphäroiden</i>	32

Abbildung 2.5	<i>Schematische Darstellung einer bedruckten Lab-Tek™ Kammer</i>	42
Abbildung 2.6	<i>Schematische Darstellung der akustischen Mikroskopie</i>	46
Abbildung 2.7	<i>Echos des akustischen Mikroskops</i>	47
Abbildung 2.8	<i>Hierarchische Struktur des SASAM Experiment Control</i>	50
Abbildung 2.9	<i>Aufbau des akustischen Mikroskops</i>	51
Abbildung 2.10	<i>Das Prinzip des siRNA Screenings</i>	54
Abbildung 3.1	<i>Vitalitätsbestimmung nach der Kryokonservierung</i>	57
Abbildung 3.2	<i>Veränderung des Zellvolumens unter Kontrollbedingungen nach hypertonem Schock (+ 100 mOsm)</i>	60
Abbildung 3.3	<i>Primäre humane Hepatozyten auf Glasbodenkammer</i>	61
Abbildung 3.4	<i>Die mittlere Veränderung des Zellvolumens in %: Kryoröhrchen mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO</i>	63
Abbildung 3.5	<i>Die mittlere Veränderung des Zellvolumens in %: IBMT Kryosubstrat mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO</i>	65

Abbildung 3.6	<i>Die mittlere Veränderung des Zellvolumens in %: Kryoröhrchen und IBMT Kryosubstraten mit 10% DMSO</i>	66
Abbildung 3.7	<i>Mittlere Veränderung des Zellvolumens in % A: 5% DMSO und Trehalose B: 7% DMSO und Trehalose C: 10% DMSO und Trehalose D: Änderung des Zellvolumens von kryokonservierten humanen Hepatozyten mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose in Kryoröhrchen.</i>	68
Abbildung 3.8	<i>Mittlere Veränderung des Zellvolumens in % A: 5% DMSO und Trehalose B: 7% DMSO und Trehalose C: 10% DMSO und Trehalose D: Änderung des Zellvolumens von kryokonservierten humanen Hepatozyten mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose in IBMT Multi-Well Kryosubstraten.</i>	71
Abbildung 3.9	<i>RVI-Werte nach hypertonem Schock im Vergleich von mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO sowie mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose kryokonservierten humanen Hepatozyten.</i>	73
Abbildung 3.10	<i>Zellvolumina nach 10 Minuten isotonen Bedingungen in der Nachperiode im Vergleich von mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO sowie mit 5%, 7% bzw. 10% DMSO und Trehalose kryokonservierten humanen Hepatozyten</i>	74
Abbildung 3.11	<i>Die mittlere Veränderung des Zellvolumens in %: Kryoröhrchen mit 10% DMSO im Vergleich zu hanging dropletd Sphäroiden mit 10% DMSO</i>	76
Abbildung 3.12	<i>Whole-Cell Patch- Clamp Experimente</i>	77

Abbildung 3.13	<i>FACS Analyse mit 7-AAD und PE- Annexin</i>	80
Abbildung 3.14	<i>Ergebnisse der quantitativen real-time PCR</i>	82
Abbildung 3.15	<i>Die mittlere Veränderung des Zellvolumens nach hypertonem Schock an HCC Zellen und die Quantifikation des RVI</i>	84
Abbildung 3.16	<i>Reverse Transfektion von HepG2 Zellen</i>	85
Abbildung 3.17	<i>Typische Veränderung der akustischen Impedanz unter Kontroll-bedingungen nach hypertonem Schock (+ 100 mOsm).</i>	88
Abbildung 3.18	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen NHE1 transfizierter HepG2 Zellen</i>	89
Abbildung 3.19	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen NKCC1 transfizierter HepG2 Zellen</i>	90
Abbildung 3.20	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen α-ENaC und δ-ENaC transfizierter HepG2 Zellen</i>	91
Abbildung 3.21	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen TRPC3 und TRPC5 transfizierter HepG2 Zellen</i>	92
Abbildung 3.22	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen TRPM2, 4,5 und 6 transfizierter HepG2 Zellen</i>	93
Abbildung 3.23	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen TRPV2 transfizierter HepG2 Zellen</i>	94
Abbildung 3.24	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen TRPML3 transfizierter HepG2 Zellen</i>	95

Abbildung 3.25	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen PKD1 transfizierter HepG2 Zellen</i>	96
Abbildung 3.26	<i>Akustische Impedanz und RVI gegen Piezo1 transfizierter HepG2 Zellen</i>	97
Abbildung 3.27	<i>Quantifikation des RVI aus der akustischen Impedanz nach dem Screening der siRNA Bibliothek von Ionenkanälen und Transportern</i>	98
Abbildung 4.1	<i>Die schematische Darstellung zeigt mögliche Ursachen für eine veränderte Volumenregulation nach der Kryokonservierung von humanen Hepatozyten</i>	109
Abbildung 4.2	<i>Pharmakologie des HICC in humanen Hepatozyten und HepG2 Zellen</i>	113
Abbildung 4.3	<i>Impedanzmessung im Vergleich zu einer Messung des Zellvolumens</i>	116
Abbildung 4.4	<i>Mögliche Interaktion von ENaC mit Integrinen</i>	122
Abbildung 4.5	<i>Schematische Darstellung der mechanosensitiven Kanäle in Eukaryoten</i>	130
Abbildung 4.6	<i>Schematische Darstellung der möglichen Interaktionspartner von α-ENaC in HepG2 Zellen.</i>	134
Abbildung 4.7	<i>Der mögliche molekulare Aufbau und direkte Interaktionen des HICC in HepG2 Zellen.</i>	135

10. Referenzen

Acker, J.P. et al. "Intracellular Ice Formation Is Affected by Cell Interactions."

Cryobiology 38 (1999) 363-371

Agius, L. et al. "The role of ion content and cell volume in insulin action."

Biochem.Soc.Trans. 22.2 (1994): 516-22.

Anchordoguy, T.J. et al. "Insights into the cryoprotective mechanism of

dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers." Cryobiology 28.5 (1991)

467-473

Armitage, W.J. und Juss, B.K. "Osmotic response of mammalian cells: effects

of permeating cryoprotectants on nonsolvent volume." J Cell Physiol.

168 (1996) 532-538

Banse, A.J. et al. "Mechanoreception at the cellular level: the detection,

interpretation, and diversity of responses to mechanical signals."

Biochem. Cell Biol. 73 (1995) 349-365

Barnhill, J.C. et al. " RGA protein associates with a TRPV ion channel during

biosynthesis and trafficking." J. Cell Biochem. 91 (2004) 808- 820

Bates, R. C., Edwards, N.S., Yates, J.D., "Spheroids and cell survival"

Critical Reviews in Oncology/Hematology 38 (2000) 61-74

Beasley, R.P. "Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular

carcinoma." Cancer 61 (1988) 1942-1956

- Beech, D.J., Muraki, K. , Flemming, R. “Non selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP.” J. Physiol. 559 (2004) 685- 706
- Benov, L.C., “Oxidative damage of the membrane lipids after electroporation.” Gen Physiol Biophys 13(2) 1994 85-97
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman , M.D. “The versatility and universality of calcium signalling.” Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 (2000) 11-21
- Bertran, J. et al. “ Stimulation of system y(+)-like amino acids transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in Xenopus laevis oocytes.” Proc. Natl Acad Sci USA 89 (1992) 5606-5610
- Bezzerrides, V.J. et al. “Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels.” Nat. Cell Biol. 6 (2004) 709-720
- Bhalla, V. and Hallows, K.R. “Mechanisms of ENaC Regulation and Clinical Implications.” J Am Soc of Nephrol 19 (2008) 1845-.1854
- Bianchini, L. und Grinstein, S. „Regulation of volume modulating ion transport systems by growth promoters.“ Adv. Comp. Env. Physiol. 14 (1993) 249-270
- Bilir, B.M. et al. “Hepatocyte transplantation in acute liver failure.” Liver Transplant 6 (2000) 32-40
- Bohmer, C. et al. "The shrinkage-activated Na(+) conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC." Cell Physiol Biochem. 10.4 (2000): 187-94.

- Bohmer, C. and F. Wehner. "The epithelial Na(+) channel (ENaC) is related to the hypertonicity-induced Na(+) conductance in rat hepatocytes." FEBS Lett. 494.1-2 (2001): 125-28.
- Bondarava, M. "Hyperton-aktivierte Kationen- Kanäle in HepG2- Zellen : Rolle in Proliferation und mögliche molekulare Bestandteile.
" Dissertation, MPI Dortmund, 2007
- Bondarava, M. et al. "α- ENaC is a functional element of the hypertonicity-induced cation channe in HepG2 cells and it mediates proliferation" Pflugers Arch. 458 (2009): 675-687
- Boletta, A. et al. "Polycystin-1, the Gene Product of PKD1, Induces Resistance to Apoptosis and Sponaneous Tubulogenesis in MDCK Cells." Molecular Cell 6 (2000) 1267-1273
- Bortner, C.D. et al. "The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis." Pflugers Arch. 448 (2004) 313-318
- Bretscher, A. et al. "ERM- Merlin and EBP50 Protein Families in Plasma Membrane Organization and Function." Annu Rev Cell Dev. 16 (2000) 113-143
- Breuhahn, K. et al. "The Insulin-Like Growth Factor (IGF) Signaling Pathway: Strategies for Successful Therapeutic Tasks in Cancer Treatment." Current Cancer Cell Therapy 2 (2006) 157-176
- Briggs, G. A., J. Wang, and R. Gundle. "Quantitative acoustic microscopy of individual living human cells." J.Microsc. 172 (Pt 1) (1993): 3-12.

- Brümmer, F. Hülser, D.F., "Gap Junctions in multicell spheroids" Magazine for electron microscopists 1 (1982) 34-38
- Buchanan, S. et al. "Cryopreservation of Stem Cells Using Trehalose: Evaluation of the Method Using a Human Hematopoietic Cell Line." Stem Cells and Development 13 (2004) 295-305
- Bussolati, O. et al. "The stimulation of Na,K,Cl cotransport and of system A for neutral amino acid transport is a mechanism for cell volume increase during the cell cycle" FASEB 10 (1996) 920-926
- Cahalan, M.D. "The ins and outs of polycystin-2 as a calcium release channel." Nat. Cell Biol. 4 (2002) E56-E57
- Canessa, C. M. et al. "Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits." Nature 367.6462 (1994): 463-67.
- Canessa, C. M., J. D. Horisberger, and B. C. Rossier. "Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration." Nature 361.6411 (1993): 467-70.
- Ceresa, B.P. and Bahr, S.J. "Rab7 activity affects epidermal growth factor: epidermal growth factor receptor degradation by regulating endocytic trafficking from the late endosome." J Biol Chem. 281 (2006) 1099-1106
- Chen, T et al. "Beneficial effect of intracellular Trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells." Cryobiology 43 (2001) 168-181.
- Chen, T et al. "The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch." Cryobiology 44 (2002) 301-306.

- Chen, X. et al. "Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development." Drug Discov.Today 10.8 (2005): 587-93.
- Chesne, C. et al. " Viability and Function in Primary Culture of Adult Hepatocytes from Various Animal Species and Human Beings after Cryopreservation." Hepatology 18 (2005) 406-414
- Christensen, O. " Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch activated channels." Nature 330 (6143) (1987) 66-8
- Chubanov, V. et al. "Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia." Proc. Natl. Acad. Sci. USA101 (2004) 2894-2899
- Chubanov, V. et al. "Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complex." Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 371 (2005) 334-341
- Corasanti, J. G., D. Gleeson, and J. L. Boyer. "Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes. I. Ionic mechanisms of cell volume regulation." Am.J.Physiol 258.2 Pt 1 (1990): G290-G298.
- Corey, D.P. et al." TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells." Nature 432 (2004) 723-730
- Cosens, D.J. and Manning, A. "Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant." Nature 224 (1969) 285-287

- Coste, B. et al. "Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels." Science 330 (2010) 55-60
- Crowe, J.H. and Crowe, L.M. "Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organism: The Role of Trehalose." Science 223 (1984) 701-703
- Delmas, P. et al. "Polycystins, calcium signaling, and human diseases." Biochem. Biophys. Res. Comm. 322 (2004) 1374-1383
- De Petrocellis, L. et al. „The activity of anandamide at vanilloid VRI receptors requires facilitated transport across the cell membran and is limited by intracellular metabolism." J. Biol. Chem. 276 (2001) 12856- 12863
- Dijkink, L. et al. "The epithelial sodium channel (ENaC) is intracellularly located as a tetramer." Pflugers Arch. 444.4 (2002): 549-55.
- Dinudom, A., J. A. Young, and D. I. Cook. "Amiloride-sensitive Na⁺ current in the granular duct cells of mouse mandibular glands." Pflugers Arch. 423.1-2 (1993): 164-66.
- Dong, J. et al. "Spatial Distributions of the State of Water in Frozen Mammalian Cells." Biophysical Journal 99 (2010) 2453-2459
- Drennan, D. and Ryazanov, A.G."Alpha-kinases: analysis of the family and comparison with conventional protein kinases." Prog. Biophys Mol Bio 85 (2004) 1-32
- Drummond, H.A. et al. "A New Trick for an Old Dogma: ENaC Proteins as Mechanotransducers in Vascular Smooth Muscle." Physiology, 23 (2008) 23-31

- Duncan L.M. et al. "Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma." J. Clin. Oncol. 19 (2001) 568-576
- Duncan L.M. et al. "Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis." Cancer Res. 58 (1998) 1515-1520
- Edinger, A.L. et al. "Rab7 Prevents Growth Factor Independent Survival by Inhibiting Cell- Autonomous Nutrient Transporter Expression." Cell Dev. 5 (2003) 571-582
- Erfle, H. et al. "Reverse transfection on cell arrays for high content screening microscopy" Nature Protocols 2.2 (2007) 392-99
- Erhart, F. et al. "A comparative study of freezing single cells and spheroids: Towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours." Cryobiology 58 (2009) 119-127
- Eroglu, A. et al. "Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development." Cryobiology 46 (2003) 121-134
- Feral, C.C. et al. "CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling." Proc Natl Acad Sci USA 102 (2005) 355-360
- Fetchko, M. and Stagljar, I. "Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions." Methods 32 (2004) 349-362

- Fire, A. et al. "Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle." Development 113.2 (1991): 503-14.
- Firsov, D. et al. "Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93.26 (1996): 15370-75.
- Fleig, A. und Penner, R. „The TRPM ion channel subfamily: molecular biophysical and functional features.” Trends in Pharm. Sciences 25 (2004) 633-640
- Fonfria, E. et al. “Tissue Distribution Profiles of the Human TRPM Cation Channel Family.” J. of Receptors and Sig. Transduc. 26 (2006) 159-178
- Fyfe, G. K. and C. M. Canessa. "Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel." J.Gen.Physiol 112.4 (1998): 423-32.
- Fyfe, G. K., A. Quinn, and C. M. Canessa. "Structure and function of the Mec-ENaC family of ion channels." Semin.Nephrol. 18.2 (1998): 138-51.
- Gehl, J. "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research." Acta Physiol Scand. 177.4 (2003): 437-47.
- Gorlin, J. et al. „Stem Cell Cryopreservation“ J. of Infusional Chemotherapy 6 (1996) 23-27

- Gräßl, M. "Welche Partner von α ENaC sind molecular an der Ausbildung hyperten-aktivierter Kation- Kanäle beteiligt?" Bachelorarbeit, MPI Dortmund, 2007
- Green, W. N. "Ion channel assembly: creating structures that function." J.Gen.Physiol 113.2 (1999): 163-70.
- Gunthorpe, M. P. "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels." Trends Pharmacol. Sci. 23 (2002) 183- 191
- Hara, Y. et al. " LTRPC2 Ca^{2+} - permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death." Mol. Cell 9 (2002) 163-173
- Häussinger, D. "The role of cellular hydration in the regulation of cell function." Biochem.J. 313 (Pt 3) (1996): 697-710.
- Häussinger, D. and Lang, F. "Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism of metabolic control" Biochim Biophys Acta. 1071 (1991) 331-350
- Heinzinger, H. et al. "In rat hepatocytes, the hypertonic activation of Na^{+} conductance and Na^{+} - K^{+} - 2Cl^{-} symport--but not Na^{+} - H^{+} antiport--is mediated by protein kinase C." J.Physiol 536.Pt 3 (2001): 703-15.
- Hengstler, J.G. et al. „Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction“ Drug metabolism reviews 32 (1) (2000) 81-118

- Her, M.L. and Nail, S.L. "Measurement of glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes by differential scanning calorimetry." Pharmaceut Res 11 (1994) 54-59.
- Ho, S.Y. and Mittal, G.S. "Electroporation of cell membranes: a review." Crit Rev Biotechnol 16 (1996) 349-362
- Hoebeeck, J. et al., "Real-Time PCR Quality Control for Gene Expression Profiling Using the LightCycler® 480 System." Biochemica 2 (2007) 7-9
- Hoffmann, E.K. "Regulation of cell volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. In: Osmotic and Volume Regulation." Alfred Benzon Symposium XI. Copenhagen. (1978) 397-418.
- Horisberger, J. D. "Amiloride-sensitive Na channels." Curr.Opin.Cell Biol. 10.4 (1998): 443-49.
- Horslen, S.P. und Fox, I.J. "Hepatocyte transplantation" Transplantation 77 (2004) 1481-1486
- Holtfreter, J. "Observations of the migration, aggregation and phagocytosis of embryonic cells" J. Morph. 80 (1947) 24-55
- Hu, H.Z. "2- aminoethoxydiphenylborate is a common activator of TRPV1, TRPV2 and TRPV3. Biol. Chem. 279 (2004) 35741- 35748
- Hu, J. und Verkman, A.S. "Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels." The FASEB J. 20 (2006) 1892-1894

- Hughes, R.D. et al. "Isolation of Hepatocytes from Livers from Non- Heart-Beating Donors for Cell Transplantation." Liver Transplantation 12 (2006) 713-717
- Ichim, T. E. et al. "RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics." Am.J.Transplant. 4.8 (2004): 1227-36.
- Iturriaga, G. et al. "Trehalose Metabolism : From Osmoprotection to Signaling" Int J Mol Sci 10.9 (2009) 3793-3810
- Johnsson, N. and Varshavsky, A. "Split Ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." Proc Acad Sci USA 91 (1994) 10340-10344
- Katzenz, E. "Cryopreservation of Primary Human Hepatocytes: The Benefit of Trehalose as an Additional Cryoprotective Agent." Liver Transplantation 13 (2007) 38-45
- Kelly, O. et al. "Characterization of an amiloride binding region in the alpha-subunit of ENaC." Am.J.Physiol Renal Physiol 285.6 (2003): F1279-F1290
- Kellenberger, S., I. Gautschi, and L. Schild. "Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate." Mol.Pharmacol. 64.4 (2003): 848-56
- Kellenberger, S. and L. Schild. "Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure." Physiol Rev. 82.3 (2002) 735-67.
- Kirschner, U. et al. "Hypertonic activation of phospholemman in solitary rat hepatocytes in primary culture." FEBS Lett. 537.1-3 (2003) 151-56.

- Koch, J.P. and Korbmacher, C. „Osmotic shrinkage activated nonselective cation (NSC) channels in various cell types.“ J Membr Biol. 168 (1999) 131-139
- Koch, J. “Identifizierung der molekularen Interaktionspartner von α -ENaC in HepG2-Zellen: Bibliothek B (cDNAs im Vektor pPR3-C/STE).“ Bachelorarbeit, MPI Dortmund, 2008
- Konrad, M. et al. “Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis.” Am J. Physiol. Renal Physiol 286 (2004) F599-F605
- Körber, C. et al. “Intracellular ice formation: cryomicroscopic observation and calorimetric measurement” J. Microsc. 161 (1991) 313–325
- Koulen, P. et al. “Polycystein-2 is an intracellular calcium release channel.” Nat. Cell Biol. 4 (2002) 191-197
- Kunz- Schughart, L.A., “Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and *in vivo* tumor.” Cell Biol. Int. 23 (1999) 157-161
- Lang, F. et al. "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms." Physiol Rev. 78.1 (1998) 247-306.
- Lindel, T., Bauer, J. “ Zell- und Gewebekultur” Gustav Fischer Verlag 2. Auflage (1989) 8.2 Hepatocyten 124- 128
- Lindel, T., Bauer, J. “ Zell- und Gewebekultur” Gustav Fischer Verlag 2. Auflage (1989) 8.5 Sphäroide 131- 134

- Liseth, K. et al. "The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft." Cytotherapy. 7 (2005) 328-33.
- Litniewski, J. and J. Bereiter-Hahn. "Measurements of cells in culture by scanning acoustic microscopy." J.Microsc. 158 (Pt 1) (1990) 95-107.
- Li, T. et al. "A novel hypertonicity-induced cation channel in primary culture of human hepatocytes." FEBS Letters 579 (2005) 2087-2091
- Li, X. et al. "Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell-cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2." Nat Cell Biol 7 (2005) 1102-1112
- Liu, D. et al. "Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 15160-15165
- Llovet, J.M. et al. "Hepatocellular carcinoma." Lancet 362 (2003) 1907-1917
- Luyet B.J. and Hodapp R. "Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air." Proc. Soc. Exp. Biol. NY 39 (1938) 433-434
- Macknight, A. D. "Principles of cell volume regulation." Ren Physiol Biochem. 11.3-5 (1988) 114-41.
- Maeno, E. et al. "Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation regulation is an early prerequisite to apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 9487-9492

- Malpique, R. et al. "Cryopreservation in Micro- Volumes: Impact Upon Caco-2 Colon Adenocarcinoma Cell Proliferation and Differentiation" Biotechnology and Bioengineering 98 (2007) 155-166
- Mandumpal, J.B., Kreck, C.A. and Mancera, R.L. „A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO“ Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 3839-3842
- Maroto, R. et al. "TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells." Nat.Cell Biol. 7.2 (2005) 179-85.
- Maunsbach, A. B. et al. "Aquaporin-1 water channel expression in human kidney." J.Am.Soc.Nephrol. 8.1 (1997) 1-14.
- May, R. C. and R. H. Plasterk. "RNA interference spreading in *C. elegans*." Methods Enzymol. 392 (2005) 308-15.
- Mayer-Wrangowski, S., "Identifizierung der molekularen Interaktionspartner von α -ENaC in HepG2-Zellen: Bibliothek A (cDNAs im Vektor pPR3-N)." Bachelorarbeit, MPI Dortmund, 2008
- Mazur, P. "Freezing of living cells: mechanisms and implications." Am. J. Physiol. 247 (1984) C125-C142
- Mazur, P. and Schmidt, J.J. "Interactions of cooling velocity temperature and warming velocity on survival of frozen and thawed yeast." Cryobiology 5 (1968) 1

- McNicholas, C. M. and C. M. Canessa. "Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits." J.Gen.Physiol 109.6 (1997) 681-92.
- Mertz, K.D. et al. „Electroporation of primary neural cultures: a simple method for directed gene transfer in vitro“ Histochem Cell Biol 118 (2002) 501-506
- Miller, A.J. et al. “Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma” Cancer Res. 64 (2004) 509-516
- Montell, C. “The TRP superfamily of cation channels.” Sci. STKE (2005)
- Montell, C. and Rubin, G.M. “Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction” Neuron 2 (1989) 1313-1323
- Moon, C. et al. “Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis.” Oncogene 22 (2003) 6699-6703
- Muraki, K. et al. “TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes.” Circ. Res. 93 (2003) 829-838
- Neumann, E. et al. “Membrane electroporation and electrochemical deformation of vesicles and cells.” Faraday Discuss 111 (1999) 111-125
- Nilius, B. et al. “Voltage dependence of the Ca²⁺ activated cation channel TRPM4.” J. Biol. Chem. 278 (2003) 30813-30820

- Nilius, B. et al. "Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca²⁺ activated cation channel TRPM4b." *Pflügers Arch* 448 (2004b) 70-75
- Nilius, B. et al. "Transient Receptor Potential Cation Channel in Disease." *Physiol. Rev.* 87 (2007) 165-217
- Numata, T. et al. "TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells." *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (2007) C460-C467
- Numata, T. et al. "Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis." *Apoptosis* 13 (2008) 895-903
- Numata, T. et al. "The ΔC splice-variant of the TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in HeLa cells and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation." *The J. of Physiol.* (2012, elektronische Publikation)
- Obukhov, A.G. und Nowycky, M.C. "TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50)." *J. Cell Physiol.* 201 (2004) 227-235
- Okada, Y. and E. Maeno. "Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels." *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 130.3 (2001) 377-83.
- Okada, Y. et al. "Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD)." *J. Physiol*
- Okada, Y. et al. "Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death." *J. Membr. Biol.* 209 (2006) 21-29

- Olsen, H. et al. "Differential Regulation of Cell Volume and Shape in Confluent Rat Hepatocytes Under Hypertonic Stress." Cell Physiol Biochem 19 (2007) 259-268
- Orlowski, J. Grinstein, S. "Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells" J Biol Chem 272 (1997) 22373-22376
- Owsianik, G. et al. "Permeation and Selectivity of TRP channels" Annu. Rev. Physiol. 68 (2005) 685-717
- Owsianik, G. et al. "Structure-function relationship of the TRP channel superfamily." Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. (2006) 61-90
- Perraud, A.L. et al. "ADP-ribose gating of the calcium- permeable LTRPC channel revealed by Nudix motif homology." Nature 411 (2001) 595-599
- Peterson, S.F., Owsianik, G., Nilius, B. "TRP channels: An overview" Cell Calcium 38 (2005) 233-252
- Pertoft, H. et al. "The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll™" Experimental Cell Research 110 (1977) 449-457
- Phillipp, S. et al. "Molecular Biology of Calcium Channels" Calcium Signaling (2000) 321-342
- Plettenberg, S. "Sind α -, β -, γ - rENaC Teil der hyperton aktivierten Kationen-Kanäle in Rattenhepatozyten? Eine Untersuchung mit siRNA" Diplomarbeit, MPI Dortmund, 2006

- Plettenberg, S. et al. "Subunits α , β and γ of the epithelial Na^+ channel (ENaC) are functionally related to the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in rat hepatocytes" Pflügers Arch 455 (2008) 1089-1095
- Polge, C. et al. "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures." Nature 164 (1949), 666.
- Porter, J.C. und Hogg, N. "Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors." Trends Cell Biol 8 (1998) 390-396
- Raynal, P. und Pollard, H.B." Annexins: the problem of assessing the biological role of a gene family" Biochim Biophys Acta. 1197 (1994) 63-93
- Reczek, D. et al." Identification of EBP50: A PDZ containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family." J. Cell Biol 139 (1997) 169-179
- Ritter, M. und Wöll, E. „Modification of cellular ion transport by the Ha-Ras oncogene: steps toward malignant transformation." Cell. Physiol. Biochem. 6 (1996) 245-270
- Rosker,C. et al."Ca²⁺ signaling by TRPC3 involves Na^+ entry and local coupling to the Na^+ Ca^+ exchanger." J. Biol. Chem. 279 (2004) 13696-13704
- Rubin, K.et al. "Adhesion of rat hepatocytes to collagen." Experimental Cell Research 117 (1978) 165-177

- Russel, J.M. "Sodium- Potassium- Chloride Cotransport" Physiol. Rev. 80 (2000) 211- 276
- Saadoun, S. et al. „Aquaporin 4 expression is increased in oedematous human brain tumours.“ J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 72 (2002) 262-265
- Sano, Y. et al. "Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2.“ Science 293 (2001) 1327-1330
- Saxena, S. et al. "Rab proteins regulate epithelial sodium channel activity in colonic epithelial HT-29 cells." Biochem Biophys Res Commun 337 (2005) 1219-1223
- Schimitzu, T. et al. "Inhibition of hypertonicity-induced cation channels sensitizes HeLa cells to shrinkage-induced apoptosis" Cell Physiol Biochem 18 (2006) 295-302
- Schmitz, S. "Der Experimentator Zellkultur" Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage (2007)
- Schwiebert, E. M. et al. "CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel." Physiol Rev. 79.1 Suppl (1999) S145-S166.
- Schwiebert, E. M. et al. "Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95.5 (1998) 2674-79.
- Shakibei, M. und Mobasheri, A. „Beta 1 Integrins co-localize with Na, K-ATPase, eprthelial sodium channel (ENaC) and voltage activated

- calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes." Histol Histopathol 18 (2003) 343-351
- Shenolikar, S. et al. "Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins." Physiology 19 (2004) 362-369
- Shimizu, S. et al. "Bax and Bcl-xL indepently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adennin nucleotide translocator." Oncogene 19 (2000) 4309-4318
- Shimkets, R. A., R. Lifton, and C. M. Canessa. "In vivo phosphorylation of the epithelial sodium channel." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95.6 (1998) 3301-05.
- Snyder, P.M. "A Pore Segment in DEG/ENaC Na⁺ Channels" J. of Biol. Chem. 274 (1999) 28484- 28490
- Sputtek, A. et al. "Zur Kryokonservierung von Blutstammzellen" . J. Lab. Med. 20 Nr.2 , 70-77 (1996 b)
- Stokes, A.J. et al., " Formation of a physiological complex between TRPV2 and RGA protein promotes cell surface expression of TRPV2." J. Cell Biochem. (2004)
- Stokes, A.J. et al. "A TRPV2-PKA signaling mode for transduction of physical stimuli in mast cells." J. Exp. Med. 200 (2004) 137-147
- Sutherland, R.M., Durand, R.E., "Growth and cellular characteristics of multicell sheroids." Recent Results in Cancer Research 95 (1984) 24-49

- Takeichi, M. "The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis." Development 102(4) (1988) 639-55.
- Terry, C. et al. "Pre-incubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function on thawing." Liver Transplantation 12 (2006) 165-177
- Thebault, S. et al. "EGF Increases TRPM6 Activity and Surface Expression." J. Amer. Soc. Neph. 20 (2009) 78-85
- Tinel, H., F. Wehner, and H. Sauer. "Intracellular Ca²⁺ release and Ca²⁺ influx during regulatory volume decrease in IMCD cells." Am.J.Physiol 267.1 Pt 2 (1994) F130-F138.
- Torres, L.M. et al. "Role of glucose in modulating Mg²⁺ homeostasis in liver cells from starved rats." Am J Phys. Gastr. Liver Phys. 288 (2005) G195-G206
- Tuschl, T. "RNA interference and small interfering RNAs." Chembiochem. 2.4 (2001) 239-45.
- Verkman, A.S. et al. „Aquaporins- new players in cancer biology“ J. Mol. Med. 86 (2007) 523-529
- Verveer, P. J. et al. „Imaging Protein Interactions by FRET Microscopy, in Protein-Protein Interactions.“ Cold Spring Harbor Laboratory Press (2005) 609-636
- Waldegger, S. et al. "Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during

anisotonic and isotonic alterations of cell volume."

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94.9 (1997) 4440-45.d

Wehner, F. "Cell volume-regulated cation channels." Contrib.Nephrol. 123 (1998) 8-20.

Wehner, F. "Cell volume-regulated cation channels." Contrib.Nephrol. 152 (2006) 25-53.

Wehner, F. et al. "Hypertonicity- induced cation channels" Acta Physiol. 187 (2006) 21-25.

Wehner, F. and D. Guth. "Electric properties of rat liver cell cultures on gas-permeable membranes." Am.J.Physiol 261.3 Pt 1 (1991) G407-G416.

Wehner, F. et al. „Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in Hela cells and ist contribution to cell volume regulation.“ FEBS Lett. 551 (2003) 20-24

Wehner, F. et al. "Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction." Rev.Physiol Biochem.Pharmacol. 148 (2003) 1-80.

Wehner, F., H. Sauer, and R. K. Kinne. "Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture." J.Gen.Physiol 105.4 (1995) 507-35.

Wehner, F. and H. Tinel. "Osmolyte and Na⁺ transport balances of rat hepatocytes as a function of hypertonic stress." Pflugers Arch. 441.1 (2000) 12-24.

- Wehner, F. and H. Tinel, Role of Na⁺ conductance, Na⁺-H⁺ exchange, and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ symport in the regulatory volume increase of rat hepatocytes, J. Physiol. (Lond.) 506 (1998) 127-142
- Weiß, E.C. "Zeitaufgelöste Mikroskopie an individuellen Zellen." Dissertation, Universität des Saarlandes, 2007
- Weiß, E.C., Wehner, F. und Lemor, R.M. „Measuring Cell Volume Regulation with Time Resolved Acoustic Microscopy” Acoustical Imaging (2007) 73-80
- Wolf, R. et al. "Real- time- 3-D dark-field microscopy for the validation of the cross-linking process of alginate microcapsules.” Biomaterials 26 (2005) 6386-6393
- Wolfe, J. & Bryant, G. "Cellular Cryobiology: Thermodynamic and Mechanical Effects.” International J. of Refrig. 24 (2001) 438-450
- Wouters, F.S. and Bastiaens, P.I. "Imaging protein-protein interactions by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy.” Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 5 (2006) Unit 5.22
- Wu, M. et al. "AMID is a p53-inducible gene downregulated in tumors.” Oncogene 19 (2004) 4309-4318
- Xiao, R. and Shawn Xu, X.Z. "Mechanosensitive Channels: In Touch with Piezo.” Current Biology 20 (2010) R936-R938
- Yamamoto S., Takahashi N., Mori Y. "Chemical physiology of oxidative stress-activated TRPM2 and TRPC5 channels” Progress in Biophys. and mol. Biol. 103 (2010) 18-27

Zeng, X. et al. "Novel role for the transient receptor potential channel TRPM2 in prostate cancer cell proliferation." Prostate Cancer and Prost Des 13 (2010) 195-201

Zhang, W. et al. "A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death." J. Biol. Biochem . 278 (2003) 16222-16229

Zhang, Y. et al. "Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways." Cell 112 (2003) 293-301

Zimmermann, H. et al. "Fabrication of homogeneously cross- linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-,CLSM- and AFM-imaging" Biomaterials 24 (2003) 2083-2096

11. Anhang

Sequenzen

solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1
NHE1

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-005277-09	SLC9A1	6548	NM_003047	27777631	UGAUCAAGGGUGUAGGCGA
J-005277-10	SLC9A1	6548	NM_003047	27777631	GCCUUCACCUCCCGAUUUA
J-005277-11	SLC9A1	6548	NM_003047	27777631	GGACAAGCUCAACCGGUUU
J-005277-12	SLC9A1	6548	NM_003047	27777631	GAGGAGGAGAUCCGCAAAA

solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporter)
NKCC1

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-007383-05	SLC12A2	6558	NM_001046	38569461	GAUGAACCAUGGCGAAUAA
J-007383-06	SLC12A2	6558	NM_001046	38569461	GGAUUAUCUCAUCUCAA
J-007383-07	SLC12A2	6558	NM_001046	38569461	GUAAAGGAGUCGUGAAGUU
J-007383-08	SLC12A2	6558	NM_001046	38569461	GGUAGUAAGUGUGGAAUUA

sodium channel, non-voltage gated 1, gamma
gamma-ENaC

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006507-06	SCNN1G	6340	NM_001039	42476332	CCAACUGGAUGUAUUGUUA
J-006507-07	SCNN1G	6340	NM_001039	42476332	CCAAGCAAGUGGUGGGAUU
J-006507-08	SCNN1G	6340	NM_001039	42476332	CAUCUGUGGUUCGGAGAA
J-006507-09	SCNN1G	6340	NM_001039	42476332	GCAAUGGUCACCUCUAUAG

sodium channel, non-voltage gated 1, alpha
alpha-ENaC

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006504-05	SCNN1A	6337	NM_001038	47834319	ACAGGUACCCGGAAAUUAA
J-006504-06	SCNN1A	6337	NM_001038	47834319	GCUAUACUUCAAUGACAA
J-006504-07	SCNN1A	6337	NM_001038	47834319	UAUCGCGACAGAACAAUUA
J-006504-08	SCNN1A	6337	NM_001038	47834319	GAUCAAGGAGUGUGGCUGU

sodium channel, non-voltage gated 1, beta
beta- ENaC

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006505-05	SCNN1B	6338	NM_000336	4506816	GAAUUUAACUAUCGCACCA
J-006505-06	SCNN1B	6338	NM_000336	4506816	GACCAAAGCACCAUAUCA
J-006505-07	SCNN1B	6338	NM_000336	4506816	GCAAUGACACCCAGUACAA
J-006505-08	SCNN1B	6338	NM_000336	4506816	AGACAACCACAAUGGCUUA

sodium channel, non-voltage gated 1, delta
delta-ENaC

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006506-05	SCNN1D	6339	NM_002978	34101281	GCAUCAGGGUCAUGGUUCA
J-006506-06	SCNN1D	6339	NM_002978	34101281	GCUACUACCUCCACCCUCU
J-006506-07	SCNN1D	6339	NM_002978	34101281	GAGAAUGGAAGCAGCCACA
J-006506-08	SCNN1D	6339	NM_002978	34101281	CUACACAACACCUCCUACA

transient receptor potential cation channel, subfamily C
TRPC 1

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-004191-06	TRPC1	7220	NM_003304	27545448	GGACUACGGUUGUCAGAAA
J-004191-07	TRPC1	7220	NM_003304	27545448	CGACAAGGGUGACUAUUUAU
J-004191-08	TRPC1	7220	NM_003304	27545448	GUAAGUGGAUUUGCUCUCA
J-004191-09	TRPC1	7220	NM_003304	27545448	GACGCAAGCCCACCUGUAA

transient receptor potential cation channel, subfamily C
TRPC 3

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006509-06	TRPC3	7222	NM_003305	4507686	GGAAGGACCUAGGGAAUAC
J-006509-07	TRPC3	7222	NM_003305	4507686	GGUCUGGGUUCUUGGAAUG
J-006509-08	TRPC3	7222	NM_003305	4507686	CGGAAGCUCUCCAUGCAAU
J-006509-09	TRPC3	7222	NM_003305	4507686	GAGCAGACCAUAGCUAUCA

transient receptor potential cation channel, subfamily C
TRPC 4

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006510-06	TRPC4	7223	NM_016179	7706746	GCCAUUAAGUACCGUCAA
J-006510-07	TRPC4	7223	NM_016179	7706746	GGACACGGUCCUAUAAUA
J-006510-08	TRPC4	7223	NM_016179	7706746	GCAGAGGCUUUAUUUGCUA
J-006510-09	TRPC4	7223	NM_016179	7706746	UGUUGGAGAUGCUCUAUUA

transient receptor potential cation channel, subfamily C
TRPC 5

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006511-07	TRPC5	7224	NM_012471	6912735	GAAACUGGGUCUCCUAUUC
J-006511-08	TRPC5	7224	NM_012471	6912735	GGACGCAUGCUGCUUGAUA
J-006511-09	TRPC5	7224	NM_012471	6912735	ACACGCAGUUCUCUGAAUU
J-006511-10	TRPC5	7224	NM_012471	6912735	CAACUCGCCUCUAAGUCAA

transient receptor potential cation channel, subfamily C
TRPC 6

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-004192-07	TRPC6	7225	NM_004621	19923256	GCAUACAUGUUUAGUGAUC
J-004192-08	TRPC6	7225	NM_004621	19923256	UGAACGGCCUCAUGAUUUAU
J-004192-09	TRPC6	7225	NM_004621	19923256	CAUCAUUCAUUGCGAGAUU
J-004192-10	TRPC6	7225	NM_004621	19923256	UAAAGGUUAUGUUCGGAUU

transient receptor potential cation channel, subfamily C
TRPC 7

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006512-07	TRPC7	57113	NM_020389	9966864	GGAAGGGCUCUACGCGAUA
J-006512-08	TRPC7	57113	NM_020389	9966864	GGAUCAAAACUCGCCAUUAA
J-006512-09	TRPC7	57113	NM_020389	9966864	GAAAUUGGGCAUGCUGAAUU
J-006512-10	TRPC7	57113	NM_020389	9966864	CGGCUUAUCUGAAGUAUC

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 1

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006513-06	TRPM1	4308	NM_002420	21450858	GGACAUGCCAGUAGUGUAA
J-006513-07	TRPM1	4308	NM_002420	21450858	GCUCAUGAGUUUCGGAGUA
J-006513-08	TRPM1	4308	NM_002420	21450858	GGAACGGGAUCGUGGAUUG
J-006513-09	TRPM1	4308	NM_002420	21450858	CGGCAAAGCAGCAUCAUA

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 2

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-004193-09	TRPM2	7226	NM_003307	67906812	AGACGGAGUUCCUGAUCUA
J-004193-10	TRPM2	7226	NM_003307	67906812	CGGCAACAAUGACAAGCAA
J-004193-11	TRPM2	7226	NM_003307	67906812	UCGAGGACAUCAGCAAUAA
J-004193-12	TRPM2	7226	NM_003307	67906812	GACAAUGCCUGGAUCGAGA

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 3

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006514-05	TRPM3	80036	NM_206948	55953094	GAGAUGUUGUCCGGCCAUA
J-006514-06	TRPM3	80036	NM_206948	55953094	GAAGGAUCAUGCCUCUAAG
J-006514-07	TRPM3	80036	NM_206948	55953094	GACCCAAUGUGAUCUCGAU
J-006514-08	TRPM3	80036	NM_206948	55953094	GAGCGUGGAUUAUCACUGG

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 4

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006515-09	TRPM4	54795	NM_017636	21314670	GCACGACGUUCAUAGUUGA
J-006515-10	TRPM4	54795	NM_017636	21314670	GAUGGGCGUUGACCUCUUU
J-006515-11	TRPM4	54795	NM_017636	21314670	GAGAUCGAAUCAGGCGUUU
J-006515-12	TRPM4	54795	NM_017636	21314670	UUACACAUUCGGCAAAGUA

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 5

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006516-05	TRPM5	29850	NM_014555	24475627	GAGCAGCCUUCGCCAUGA
J-006516-06	TRPM5	29850	NM_014555	24475627	CCACGCGCGAGGCGAAUA
J-006516-07	TRPM5	29850	NM_014555	24475627	GAGAAGAGCCCGCUGUAUG
J-006516-08	TRPM5	29850	NM_014555	24475627	GUACUUCGCCUUCUCUUC

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 6

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-005048-06	TRPM6	140803	NM_017662	18921092	GAGAGGAGGCCACGGUUA
J-005048-07	TRPM6	140803	NM_017662	18921092	CGAAUAACCUUGAUUGACA
J-005048-08	TRPM6	140803	NM_017662	18921092	CUAAUACACUCUUGCAUCA
J-005048-09	TRPM6	140803	NM_017662	18921092	GCUGAAGGGCACAAAUUA

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 7

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-005393-09	TRPM7	54822	NM_017672	29893551	GUUAAUACAUGGUCAAGUA
J-005393-10	TRPM7	54822	NM_017672	29893551	UCAGUUGGCCGUUGAAUUA
J-005393-11	TRPM7	54822	NM_017672	29893551	GACCAAAGAUUGAUACAGU
J-005393-12	TRPM7	54822	NM_017672	29893551	CCAUAUUGCUGUAGAGUA

transient receptor potential cation channel, subfamily M
TRPM 8

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006517-05	TRPM8	79054	NM_024080	21361690	GGAAGAAACCUGUCGACAA
J-006517-06	TRPM8	79054	NM_024080	21361690	GCAAUGGUAUGGAGAGAUU
J-006517-07	TRPM8	79054	NM_024080	21361690	GGAAACUGGUUGCGAACUU
J-006517-08	TRPM8	79054	NM_024080	21361690	AAGCAAAGCUCCGGAAUCA

transient receptor potential cation channel, subfamily V
TRPV 1

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006518-09	TRPV1	7442	NM_018727	74315349	GGAGACUAUUCCGAGUUA
J-006518-10	TRPV1	7442	NM_018727	74315349	UGACGAGCAUGUACAAUGA
J-006518-11	TRPV1	7442	NM_018727	74315349	CAUCUAUGCCGUCAUGAUA
J-006518-12	TRPV1	7442	NM_018727	74315349	CCCGAUAGCUCCUACAACA

transient receptor potential cation channel, subfamily V
TRPV 2

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-004194-07	TRPV2	51393	NM_016113	22547178	AGGCUGUGCUGAACCUUAA
J-004194-08	TRPV2	51393	NM_016113	22547178	GGCUGAACCGUCUUUACUA
J-004194-09	TRPV2	51393	NM_016113	22547178	GAUCAUUGCCUUUCAUUGC
J-004194-10	TRPV2	51393	NM_016113	22547178	GCGAGACCGUCAACAGUGU

transient receptor potential cation channel, subfamily V
TRPV 3

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-005263-06	TRPV3	162514	NM_145068	22027467	GAGGAUGAUUCCGACUGU
J-005263-07	TRPV3	162514	NM_145068	22027467	ACGCACGUCUCCUCCUUA
J-005263-08	TRPV3	162514	NM_145068	22027467	GAACAUCGCCAUCGAGCGG
J-005263-09	TRPV3	162514	NM_145068	22027467	UCAAUGAGGUGAAGUGGAC

transient receptor potential cation channel, subfamily V
TRPV 4

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-004195-05	TRPV4	59341	NM_147204	22547179	GAAUGAGACCUACCAGUAU
J-004195-06	TRPV4	59341	NM_147204	22547179	CAAGAAACGCCUAACUGAU
J-004195-07	TRPV4	59341	NM_147204	22547179	CAACCGGCCUAUCCUCUUU
J-004195-08	TRPV4	59341	NM_147204	22547179	CGACCAAUCUGCGCAUGA

transient receptor potential cation channel, subfamily V
TRPV 5

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-004196-10	TRPV5	56302	NM_019841	83722285	UGGGAGAUCUUCGUCAAA
J-004196-11	TRPV5	56302	NM_019841	83722285	GGUGCAGUGUCAUGUAUUU
J-004196-12	TRPV5	56302	NM_019841	83722285	UUGGAGACCUGAAUGCGUUU
J-004196-13	TRPV5	56302	NM_019841	83722285	GUUGGUGCCUCUCGCUAAU

transient receptor potential cation channel, subfamily V
TRPV 6

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-003607-09	TRPV6	55503	NM_018646	21314681	GGAAACAGCGCUACACAUA
J-003607-10	TRPV6	55503	NM_018646	21314681	CAUGCUGGGUGCCAUAUUAU
J-003607-11	TRPV6	55503	NM_018646	21314681	GGGCUAAUUCUCUGCCUAU
J-003607-12	TRPV6	55503	NM_018646	21314681	GGCAAGAUCUCAACCGGCA

mucolipin 1 (MCOLN1)

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006281-05	MCOLN1	57192	NM_020533	10092596	GACCUUCGCCGUCGUCUCA
J-006281-06	MCOLN1	57192	NM_020533	10092596	UGAUCACGUUUGACAACAA
J-006281-07	MCOLN1	57192	NM_020533	10092596	CAACGACACAUUUGACAUI
J-006281-08	MCOLN1	57192	NM_020533	10092596	GAUCUCACCCUCUUGGAAA

mucolipin 2 (MCOLN2)

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-021616-05	MCOLN2	255231	NM_153259	54792072	GCUCUAAGGUUACGGAAGA
J-021616-06	MCOLN2	255231	NM_153259	54792072	GACCAUACCAUGACAAGUU
J-021616-07	MCOLN2	255231	NM_153259	54792072	UCAGAUACCGGGUUAUUU
J-021616-08	MCOLN2	255231	NM_153259	54792072	UCAGUCGUCUGUAUUUAUA

mucolin 3 (MCOLN3)

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-015371-05	MCOLN3	55283	NM_018298	38570136	UGACGUGUAUGAUCAGUUA
J-015371-06	MCOLN3	55283	NM_018298	38570136	GCUAAGAGUCUAAUAGUU
J-015371-07	MCOLN3	55283	NM_018298	38570136	GGAUGGUACAUUAUGAUUA
J-015371-08	MCOLN3	55283	NM_018298	38570136	GAUAAAUGGAGAUGAUUG

polycystic kidney disease 1 autosomal dominant
PBP

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-007666-05	PKD1	5310	NM_000296	33359212	GCACGUACGUUCAGCAACA
J-007666-06	PKD1	5310	NM_000296	33359212	CGACAGCGGAUGUAAACUA
J-007666-07	PKD1	5310	NM_000296	33359212	CAUCUAAUGCCUUCGAGAA
J-007666-08	PKD1	5310	NM_000296	33359212	GAACCCAGCUGCCGUCAAC

polycystic kidney disease 2 autosomal dominant
TRPP 2

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006288-06	PKD2	5311	NM_000297	33286447	CCAGAUACAGUCAUGGUUUA
J-006288-07	PKD2	5311	NM_000297	33286447	GGAAUUGUCUGGAUGUUGU
J-006288-08	PKD2	5311	NM_000297	33286447	CAGAUACAGUUCAACAAUA
J-006288-09	PKD2	5311	NM_000297	33286447	GCUAGUACGUGAAGAGUUG

transient receptor potential cation channel, subfamily A
TRPA 1

Duplex Number	Gene Symbol	Gene Id	Accession Number	GI Number	Sequence
J-006109-05	TRPA1	8989	NM_007332	6601589	UCACAGAGCUUCAUUGUUU
J-006109-06	TRPA1	8989	NM_007332	6601589	GCAUAGAGCUUCUCAAUCA
J-006109-07	TRPA1	8989	NM_007332	6601589	GCACAGAU CGCUUGGAUGA
J-006109-08	TRPA1	8989	NM_007332	6601589	ACAGCAACCUUAUGGAUUA

Chemikalienliste

CaCl ₂	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Collagenase A	Biochrom GmbH & Co, Berlin
Collagen R	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Collagenase CLS	Biochrom AG
DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium)	PAN™ Biotech GmbH
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
dNTP Mix	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EasyLyse™ Erythrocyte Lysing Reagent	Dako
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Fibronectin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
FKS (Fötale- Kälber- Serum)	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Gelatine	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
HCl	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
HEPES (4-(2- Hydroxyethyl)- piperazin -1-ethansulfonsäure)	Gerba, Gaiberg

KCl	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
KH ₂ PO ₄	Riedel de Haën, Seelze
Lipofectamine 2000	
Mannitol	Riedel de Haën, Seelze
MgCl ₂	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Serva Electrophoresis GmbH
NaHCO ₃	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Na ⁺ - HEPES	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
OPTI-MEM® I+GultaMAX™-I	
PBS (ohne Mg und Ca)	PAN™ Biotech GmbH
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN™ Biotech GmbH
William's Medium E	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn **Prof. Dr. Frank Wehner** für die Vergabe dieses spannenden und immer wieder herausfordernden Themas danken. Ebenso danke ich Ihm für sein großes technisches und wissenschaftliches Engagement.

Bei Herrn **Prof. Dr. Phillipe Bastiaens** möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Ohne die technische Expertise, das Wissen und Improvisationstalent von **Dr. Eike Weiss** wäre diese Arbeit mit dem akustischen Mikroskop nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die vielen Arbeitsstunden, die endlosen Telefonate und die Flut von Emails.

Ein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. med. Hartwig Nürnberger** vom Klinikum Dortmund, durch die Präparation des humanen Lebergewebes und all den damit verbundenen Mühen sowie einem „Express-Lieferservice“ (auch schon mal selbst), wurden die durchgeführten Experimente erst möglich.

Dr. Tongju Li danke ich für die Durchführung der Patch-Clamp Experimente.

Prof. Dr. Heiko Zimmermann vom IBMT Fraunhofer St. Ingbert danke ich für das große Engagement im μ CryoLab Projekt und das immerwährende Interessen am Fortschritt der Arbeit. Auch den Mitarbeitern **Dr. Friederike Erhardt** und **Dr.-Ing. Frank Ihmig** danke ich für die freundliche Bereitschaft Ihre Laborerfahrung im Bereich der Kryokonservierung insbesondere in der Handhabung des Nanoplotters mit mir zu teilen.

Für die hilfreiche Einführung in die Technik der Elektroporation und die Bereitstellung des nötigen Equipments danke ich **PD Dr. Vladimir Soukhoroukov** und **Dr. Kiesel** vom

Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Julius-Maximilians- Universität Würzburg.

Frau **PD Dr. Kerstin David** von Indivumed Hamburg gilt als Verbundpartner des μ CryoLab Projektes des BMBF der Dank für die Bereitstellung von humanem HCC Gewebe, auch Herrn **PD Dr. Arno Kromminga** von IPM Biotech GmbH Hamburg danke ich für die Bereitstellung des Equipments und für die Durchführung von Testversuchen zur“ Real-time PCR“.

Bei **Frau Gabriela Beetz** möchte ich mich für die gute und freundliche Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre von Herzen bedanken. Danke für die vielen wertvollen Ratschläge und Hilfen.

Sabine Dongard, Anette Langerak, Petra Glitz, - Ihr seid Spitze, Danke für alles!

Jutta Luig, Kirsten Michel und Hendrike Schütz- Vielen Dank

Herrn **Sven Fengler** und **Dr. Pedro Roda-Navarro** danke für Ihre Erklärungen und Hilfestellungen.

Auch **Frau Lale Azer** und **Jens Christmann** danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der **Abteilung II** für die Hilfe, Diskussionen und die schöne Zeit.

Vor allem bedanken möchte ich mich bei **meinen Eltern** für die Ermöglichung meines Studiums und dafür, dass sie immer für mich da sind. Für eine ungeheuere Unterstützung in wirklich jeder Lebenslage bedanke ich mich bei meiner **Familie**.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe.

Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Dortmund, 01.06.2012
Sandra Plettenberg-Halac