

Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und chemische Biologie

**Die Bedeutung der zellulären Volumenregulation bei
der Kryo-Arretierung biologischer Systeme**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Jens Christmann

November 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank Wehner
2. Gutachter: Prof. Dr. Philippe I.H. Bastiaens

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung an der Technischen Universität Dortmund oder einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Dortmund, 19. November 2013

Zusammenfassung:

Während der Kryo-Konservierung von Zellen, die klassischerweise mit einem langsamen Einfrieren verbunden ist, verlieren Zellen massiv an Wasser. Teilweise sind bei tiefen Temperaturen nur noch 5% des osmotisch aktiven Volumens vorhanden. Dieses Verfahren stellt somit eine deutlich Dysbalance für den Wasserhaushalt von Zellen dar.

Volumenregulation ist für Zellen eine essentielle Funktion, um sich an Änderungen der intra-oder extrazellulären Osmolarität anzupassen. Sie dient der Regulation des Wasserhaushaltes und ist kritischer Bestandteil von Prozessen wie der Proliferation oder auch der Apoptose.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Volumenregulation von HeLa-Zellen eingehend charakterisiert. Dazu wurden mittels FCS-Messungen die Geschwindigkeiten, des Zell-Schrumpfens und Schwellen, sowie des RVI bestimmt. Neben den generellen Prozessen der Volumenregulation wurden noch zwei Hauptvermittler des RVI in HeLa-Zellen, der HICC und NHE1, ebenfalls in einer temperaturabhängigen Weise untersucht. Darüber hinaus wurde, in einer Kooperation, das molekulare Korrelat des HICCs in HeLa-Zellen identifiziert und ein Aktivierungsmechanismus untersucht.

Der Vergleich, insbesondere der Aktivierungsenergien zwischen ungefrorenen und gefrorenen Zellen brachte neue Erkenntnisse über die Notwendigkeit von Volumenregulation für eine erfolgreiche Kryo-Konservierung. Es stellte sich heraus, dass der RVI und die HICC-Aktivierung nach dem Frieren von Zellen eine deutlich niedrigere Aktivierungsenergie aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des HICCs bei der Volumenregulation von Zellen nach deren Frieren hin. Die Volumenregulation nach dem Frieren ist ein integraler Bestandteil einer Adaptation an den vorhergegangenen Wasserverlust. Darüber hinaus konnte ein Verfahren für die Kryo-Konservierung von adhären Zellen etabliert werden.

Als Konsequenz dieser Erkenntnisse wurde Vasopressin, ein Stimulanz von HICC-Kanälen, als neue Form der Kryo-Protektion etabliert. Eine Behandlung von Zellen vor dem Frieren mit diesem Hormon, führte zu höheren Überlebensraten und besserem Wachstum der Zellen nach dem Frieren. Dieser Effekt wurde durch eine Stimulation des RVI, insbesondere durch eine Stimulation des HICCs, vermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass Viskosität scheinbar ein wichtiger Parameter in der Wahrnehmung von Volumenänderungen der Zelle sein kann. Durch die artifizielle Änderungen der Viskosität kam es zu einer Aktivierung des HICCs in HeLa-Zellen. Ebenso zeigte sich nach dem Frieren von Zellen eine Hysterese in deren Viskosität, mit einer zweifachen Erhöhung nach der Rückkehr zu 35°C. Es kann angenommen werden, dass diese erhöhte Viskosität wenigstens ein Signal für die gesteigerte Volumenregulation nach dem Frieren ist.

Die erhaltenen Ergebnisse und Konzepte zum Frieren von Zellen führten zu der Entwicklung und Etablierung von zwei neuen Verfahren zur Fixierung von Zellen für die Mikroskopie. So wurde ein langsames Gefrierprotokoll für das adaptive Frieren von Zellen zur anschließenden *superresolutions*-Mikroskopie entwickelt, das einen reversiblen Arrest und ein zweite Mikroskopie nach Behandlung der Zellen erlaubte. Ein vom Fraunhofer Institut in St. Ingbert entwickeltes Gerät zum Schock-Frieren von Zellen wurde erfolgreich zur ultraschnellen Arretierung von Zellen mit anschließender Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Variante des Frierens weder die molekulare Interaktion noch die räumliche Lokalisation des EGF-Rezeptors beeinträchtigt.

Abkürzungsverzeichnis:

μ_w	chemische Potential von Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AVD	<i>Apoptotic volume decrease</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
cADP	zyklisches Adenosin Diphosphate
CAP-1	<i>channel activating protease 1</i>
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl^-	Chlorid
C-terminal	Carboxy-terminal
DEG/ ENaC	Degenerin/ Epithelialer Natrium Kanal
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
g	Erdbeschleunigung
Gd^{3+}	Gadolinium ³⁺
HepG2	<i>human hepatoma cell line</i>
HICC	<i>hypertonicity-induced cation channel</i>
K^+	Kalium
min	Minute
n	Anzahl der Versuche
Nedd4-2	<i>neuronal precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2</i>
NHE1	Na^+ / H^+ Austauscher 1
NKCC1	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Symporter
Ns	Nanosekunden
N-terminal	Amino-terminal
PKA	Proteinkinase A
pl	Picoliter

PLC	Phospholipase C
RVD	<i>regulatory volume decrease</i>
RVI	<i>regulatory volume increase</i>
SD	Streuung des Mittelwert
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwerts
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
TRP Kanäle	<i>transient receptor potential</i> Kanäle
VRAC	<i>volume-regulated anion channel</i>
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Kryobiologie	1
1.2	Kryokonservierung	2
1.2.1	Schnelles Einfrieren	2
1.2.2	Langsames Frieren	3
1.3	Grundlagen des zellulären Wasserhaushaltes	5
1.4	Zelluläre Volumenregulation	7
1.4.1	Wahrnehmung von zellulären Volumenänderungen	7
1.4.2	Regulatorische Volumenabnahme	8
1.4.3	Regulatorische Volumenzunahme	10
1.5	Hyperton-induzierte Kationen-Kanäle	12
1.5.1	Der epitheliale Natriumkanal	12
1.5.2	<i>Transient receptor potential</i> Kanäle	14
1.6	Volumenregulation in HeLa-Zellen - TRPM2 und NHE1	16
2	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Materiealien und Lösungen	22
3.2	Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
3.2.1.1	PCR zur Amplifikation von DNA	22
3.2.1.2	SOE (splicing by overlapping extensions)-PCR	22
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	23
3.2.3	DNA-Extraktion	23
3.2.4	Restriktion DNA-Fragmenten und Vektor	23
3.2.5	Ligation von DNA	24
3.2.6	Transformation von Bakterien	24
3.2.7	Plasmidisolierung aus Bakterien	25
3.2.7.1	Plasmidisolierung im kleinen Maßstab	25
3.2.7.2	Plasmidisolierung im mittleren Maßstab	25
3.2.8	Testrestriktionen und Sequenzierung	25
3.2.9	Verwendete Plasmid-DNA Konstrukte	25
3.3	Biochemische Methoden	26
3.3.1	cADP Ribose Messung	26
3.3.2	Zelllyse	27

3.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	28
3.3.4	Immunpräzipitation von TRPM2 und CD38	28
3.3.5	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.3.6	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blotting)	29
3.3.7	Immunoblotting	29
3.3.8	Messung des Zell-pH-Wertes mittels BCECF	30
3.4	Zellbiologische Methoden	31
3.4.1	Kultivierung von Okazaki-HeLa-Zellen	31
3.4.2	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	31
3.4.3	Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen	31
3.4.4	siRNA Transfektion mit Dharmafect I	32
3.4.5	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	32
3.4.5.1	Klassische Kryokonservierung in Suspension	32
3.4.5.2	Kryokonservierung von adherenten Zellen	32
3.4.6	Zellvitalitätsbestimmung nach Kryo-Lagerung	33
3.4.7	Echtzeit Zellwachstumsmessung mittels <i>Real-time Cell Analyzer (RTCA)</i>	33
3.4.8	Zellvolumenbestimmung von HeLa-Zellen bei osmotischem Stress	33
3.5	Mikroskopie Methoden	34
3.5.1	Kryo-Bedingungen für Mikroskopie	34
3.5.2	Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie	34
3.5.3	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	35
3.5.3.1	Ablauf der Messungen	35
3.5.3.2	Theorie zur Auswertung der FCS-Messungen	37
3.5.3.3	Auswertung der FCS-Daten zur Messung der Volumenregulation	39
3.5.4	Total-Interne Reflektions-Mikroskopie (TIRF) von Aquaporin 1 (AQP1)	40
3.5.5	Raman-Mikrospektroskopie	40
3.5.6	Kryo- <i>Superresolution</i> -Mikroskopie	41
3.5.7	FLIM nach Schock-Gefrieren	43
3.6	Patch-Clamp	44
3.7	Arrhenius Plots und Berechnung der Aktivierungsenergie (E_a)	46
3.8	Statistische Analysen	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Wasserhaushalt von Zellen beim Kühlen und Frieren	47
4.2	Volumenregulation in HeLa-Zellen	49
4.2.1	Osmolaritäts- und Temperaturabhängigkeit der Volumenregulation	50
4.2.2	Volumenregulation und Aquaporine	60

4.2.3	Der hyperton-induzierte Kationen-Kanal in HeLa-Zellen	63
4.2.3.1	Molekulare Charakterisierung der HICCs in HeLa-Zellen	63
4.2.3.2	Temperatur- und Osmolaritätsabhängigkeit des HICCs in HeLa-Zellen	69
4.2.4	Der NHE1 in HeLa - Zellen-Natrium-Aufnahme und pH-Wert-Änderung in Abhängigkeit von Temperatur und Osmolarität	71
4.3	Kryo-Präservation von Zellen	75
4.3.1	Entwicklung eines Kryo-Protokolls zum adhären Frieren unter Verbesserung der Volumenregulation	75
4.3.2	Volumenregulation nach Kryo-Konservierung	79
4.3.3	HICC-Ströme zuvor gefrorener HeLa-Zellen	84
4.3.4	Viskosität und HICC-Aktivierung	87
4.4	Kryo-Arrest für Mikroskopie-Verfahren	90
4.4.1	Kryo- <i>Superresolution</i> -Mikroskopie	90
4.4.2	Ultraschnelles Kühlen von Zellen zur Mikroskopie	95
5	Diskussion	99
5.1	Der Wasserhaushalt von Zellen beim Kühlen und Frieren	99
5.2	Volumenregulation in HeLa-Zellen	100
5.2.1	Charakterisierung der Volumenregulation in HeLa-Zellen	100
5.2.2	Die Hauptvermittler des RVI in HeLa-Zellen	105
5.2.2.1	Molekulare Charakterisierung des HICCs in HeLa-Zellen	105
5.2.2.2	Die Mediatoren des RVI in HeLa-Zellen in Abhängigkeit zur Temperatur und Osmolarität	109
5.3	Kryo-Konservierung und der zelluläre Wasserhaushalt	111
5.3.1	Zellvolumenregulation nach dem Frieren von HeLa-Zellen	111
5.3.2	HICC-Aktivierung durch Frieren	113
5.3.3	Vasopressin als biologisches Kryo-Protektivum	114
5.3.4	Volumenregulation und Viskosität	116
5.4	Thermischer Arrest in der Mikroskopie	118
5.4.1	Kryo- <i>Superresolution</i> -Mikroskopie	119
5.4.2	Schockgefrieren von Zellen zur Mikroskopie	120
6	Literaturverzeichnis	123
7	Anhang	134
7.1	Zusätzliche Abbildungen	134
7.2	Abbildungsverzeichnis	142

1 Einleitung

1.1 Kryobiologie

Die Frage nach der Auswirkung von Kälte und Eisbildung auf Zellen, Gewebe und Organismen wird in vielfältiger Weise untersucht. Es gibt Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere die längere Kälteperioden überleben können. Ein bekanntes Beispiel bei Vertebraten ist der Waldfrosch (*Rana sylvatica*), der mehrere Tage in einem gefrorenen Zustand bei bis zu -16°C überleben kann. Dies erreicht er durch massive Synthese der kryoprotektiven Substanzen Harnstoff und Glukose, die in kritischen Organen und Geweben angereichert werden und dort die Bildung von Eis verhindern (Costanzo *et al.*, 2013). Bei höheren Organismen, insbesondere Säugetieren, gibt es eine deutlich geringere Toleranz gegenüber Veränderungen der Körpertemperatur. So führen beim Menschen Änderungen der Körpertemperatur um mehr als 5°C schon nach kurzer Zeit zum Tod. Auch Organe und Gewebe, die in ihrer Gesamtheit durch verschiedene Zelltypen und extrazelluläre Strukturen bestimmt sind, können Änderungen in der Temperatur nicht lange standhalten.

Dennoch werden Verringerungen der Temperatur oberhalb des Gefrierpunktes für einige Stunden toleriert und zum Beispiel für den Transport von Organen genutzt (Sumida, 2006). Ebenso wird das Kühlen von Patienten während Operation für die Verringerung des Sauerstoffverbrauchs zum Schutz des Gehirns eingesetzt (Nussmeier, 2005). Das Kühlen von Geweben und Organen unter 0°C , dem Gefrierpunkt von Wasser, führt jedoch in den allermeisten Fällen zum Verlust der Gewebeintegrität und Organfunktionalität. Dies liegt an der dramatischen Veränderung, die mit dem Phasenübergang des Wassers von der flüssigen zur festen Form einhergeht. So wird zum einen die Viskosität deutlich erhöht, was zur Folge hat, dass biologische Prozesse nur noch sehr langsam, oder gar nicht mehr stattfinden. Zum anderen wird in der Literatur diskutiert, ob die Bildung von Eiskristallen zu einer Schädigung der Zellen bzw. des Gewebes führt. (Mazur, 1984; Pegg, 2007)

Unter bestimmten Voraussetzungen können insbesondere Zellen, die nicht in einem Gewebeverbund sind, tiefe Temperaturen überleben. Dies wird zur langandauernden Lagerung von biologischem Material genutzt (Mazur, 1984, 1988; Morris, 2007).

1.2 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung befasst sich mit dem reversiblen Arrest von Leben unter der Verwendung von tiefen Temperaturen. Insbesondere die dauerhafte Lagerung von medizinisch relevantem Material (Spermien, Eizellen, Stammzellen, Blutbestandteile) ist somit ein zentraler Punkt der Kryokonservierung. Diese Tatsache macht die Kryokonservierung zu einem zentralen Element in der Kryobiologie. Bereits in den 40er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die moderne Kryobiologie mit der erfolgreichen Kryokonservierung von Spermien und Pflanzenzellen begründet (Luyet & Thoennes, 1938; Polge *et al.*, 1949).

Heute ist die Kryokonservierung, neben dem Erhalt und der Lagerung medizinischer Proben, insbesondere in der Wissenschaft von großer Bedeutung. Die Verwendung immortalisierter Zelllinien ist essentiell damit verknüpft, einen Teil der Zellen durch Kryokonservierung lagern zu können und somit zu ermöglichen, auf den Ausgangszustand der Zellen zurück zugreifen (Morris, 2007; Pegg, 2002). Dadurch kann nach Veränderungen der Zelllinien, die z.B. durch Mutationen oder Selektion auf Grund bestimmter Kultivierungsmethoden auftreten, auf die ursprüngliche Zelllinie zurückgegriffen werden.

Entscheidend für den Durchbruch und das Gelingen der Kryokonservierung war der zufällige Befund von Polge, Smith und Parkes, dass die Zugabe von Glycerol die Überlebensrate von Spermien nach dem Frieren deutlich erhöht (Polge *et al.*, 1949). Als Kryoprotektivum wird heutzutage üblicherweise Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt. Darüber hinaus finden Glycerol, Ethylenglykol oder Propan-1,2-Diol, teilweise in Kombination mit nicht zell-permeable Substanzen wie Dextran oder Sucrose, Anwendung (Morris, 2007). Entscheidend für das Verständnis der Notwendigkeit von Kryoprotektiva beim Frieren von Zellen, ist die Betrachtung der Vorgänge die beim Frieren von Zellen ablaufen. Hierzu sind in der Literatur zwei Ansätze beschrieben.

1.2.1 Schnelles Einfrieren

Um die Dehydratation der Zellen zu verhindern und die damit verbundenen negativen Effekte zu verringern, ist ein Ansatz, Zellen so schnell zu frieren, dass keine Eiskristalle gebildet werden. Dieser Ansatz basiert auf der Tatsache, dass Wasser, wenn es schnell genug gekühlt wird ($> 100000^{\circ}\text{C} / \text{s}$), vom flüssigen direkt in einen

erstarrten, nicht kristallinen Zustand übergeht. Bei solch schnellen Abkühlraten fehlt den Wassermolekülen die Zeit sich in Kristallgittern anzuordnen.

Durchquert die Probe das sogenannte „*no man's land*“ im Phasendiagramm (zwischen ca. -50°C und -130°C) schnell genug, findet keine Kristallbildung statt (Dubochet *et al*, 1988). Der erreichte Zustand wird als vitrifiziertes Wasser bezeichnet. Dieses enthält keine Kristalle, ist aber extrem viskos. Eine andere Beschreibung ist deswegen auch die erstarrte Schmelze, ähnlich der Eigenschaften von Glas. Da dieser Zustand metastabil ist, führt das Erwärmen der Probe zu einer Kristallisation. Somit erfordert das Auftauen einer solchen Probe die gleichen Geschwindigkeiten wie das Frieren.

Solche Kühl- und Tau-Raten sind in der Praxis nicht erreichbar, weswegen gängige Methoden aus einer Kombination von hohen Kühlraten und Kryoprotektiva bestehen. So ist es möglich mit Kryoprotektiva-Konzentrationen von 20-30% und Kühlraten von einigen 1000 bis 10000 $^{\circ}\text{C}/\text{Sekunde}$ Proben erfolgreich zu vitrifizieren (Pegg, 2002).

Anhand der Ergebnisse der Doktorarbeit von Dr. Jan Hübinger (Bedeutung der Vitrifikation für die Kryokonservierung und Kryofixierung) lässt sich sagen, dass bis heute wenig bis keine Augenmerk darauf gelegt wurde, ob nur Teile der Probe oder auch tatsächlich das Zytoplasma der gefrorenen Zellen vitrifiziert sind.

Generell stellt das Verfahren des schnellen Frierens eine interessante Methode für die Kryo-Konservierung dar. Die schnellen Kühlraten rufen keine morphologischen Veränderungen der Zellen hervor. Dies ermöglicht, eventuell, dass Frieren und Lagern von Zellen bei tiefen Temperaturen, ohne deren Wasserhaushalt zu stören. Dies wäre ebenfalls für die Kryo-Arretierung von Proben für die Mikroskopie interessant. Ohne morphologische Änderungen durch Wasserverlust könnten die Zellen so im gefrorenen Zustand die gleiche Struktur aufweisen wie lebende Zellen.

1.2.2 Langsames Frieren

Langsames Frieren beruht auf Kühlraten von ein bis wenigen Grad Celsius pro Minute. Diese Art zur Kryokonservierung von Zellen wird auch Gleichgewichtsfrieren oder adaptives Frieren genannt, da die Kühlraten auf den Austritt von Wasser angepasst werden (Pegg, 2007). Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, werden die eingesetzten Kryoprotektiva und die Gefrierprotokolle auf die jeweiligen Zellen abgestimmt. Als Kryoprotektiva werden membrangängige Substanzen, wie z.B. DMSO,

eingesetzt. Entscheidend ist, dass diese in einer Konzentration verwendet werden, die für die Zellen nicht toxisch ist. Üblicherweise werden z.B. 5-20 % DMSO eingesetzt (Morris, 2007).

Die Idee bei dieser Form des Frierens ist, die Gefriergeschwindigkeit langsam zu wählen, damit Wasser zwischen intra- und extrazellulärem Raum so schnell diffundieren kann, dass es (wieder) im chemischen Gleichgewicht ist. Beim Frieren bilden sich extrazellulär Eiskristalle, die aus reinem Wasser bestehen. Durch deren Wachstum wird dem Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulär-Flüssigkeit immer mehr Wasser entzogen. Dabei findet eine Konzentrierung der Salze und Kryoprotektiva im ungefrorenen Anteil des Extrazellulärraums statt. Diese Konzentrationserhöhung führt, in Bezug auf das Zytoplasma der Zelle, zu einer Hyperosmolarität der umgebenden Lösung, so das Wasser dem osmotischen Gradienten folgt und aus der Zelle strömt (Mazur, 1963; Dong *et al*, 2010).

Je tiefer die Proben gefroren werden, desto mehr Eis bildet sich und desto mehr wird die verbleibende Lösung in den Zellen konzentriert (Mazur, 1963, 1970; Spindler *et al*, 2012). Dies führt zu einer massiven Dehydrierung der Zelle und zur Verhinderung von Eiskristall-Bildung in der Zelle. Das stark konzentrierte Zytoplasma erstarrt sehr wahrscheinlich in einer Art amorphem Zustand (Griffiths *et al*, 1979; Pegg, 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass schon bei -15°C lediglich 5% des ursprünglichen, osmotisch-aktiven Wasser, in der Zelle verbleiben (Akhoondi *et al*, 2012). Die eingesetzte Konzentration an Kryoprotektiva entscheidet dabei über das Restvolumen der Zelle. Je höher die eingesetzte Konzentration ist, desto größer ist das Volumen der Lösung, welches bei der Zieltemperatur nicht gefroren ist. Dadurch verbleibt auch im kalten Zustand mehr Lösung in der flüssigen Phase, in der sich auch die Zellen befinden (Mazur, 1984; Dong *et al*, 2010). Darüber hinaus wurde bei der Verwendung von DMSO beobachtet, dass es die hydraulische Leitfähigkeit der Membran bei tiefen Temperaturen erhöht und somit den Austritt von Wasser erleichtert (Akhoondi *et al*, 2012).

Einer der wichtigsten Parameter für ein erfolgreiches, langsames Frieren ist die Bestimmung der Geschwindigkeit mit der die Zellen gefroren werden. Zu hohe Kühlraten führen dazu, dass Wasser nicht vollständig aus den Zellen diffundieren kann, wodurch die Bildung von großen intrazellulären Eiskristallen begünstigt wird (Dong *et al*, 2010). Die optimale Kühlrate für eine Zelllinie muss entweder empirisch ermittelt, oder vorab durch Berechnungen abgeschätzt werden. Wichtige Parameter

für diese Berechnung sind das Volumen und der Wassergehalt von Zellen, sowie die Konzentration an Kryoprotektiva (Woelders & Chaveiro, 2004).

Die massiven Veränderungen des Zellvolumens machen aber auch deutlich, worin unter anderem die Schwierigkeiten bei der Kryokonservierung von Zellverbänden oder sogar Geweben liegen. Können vereinzelte Zellen das starke Schrumpfen noch gut kompensieren, führt dieses in Geweben unweigerlich zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte und der gesamten Struktur (Pegg, 2010). Für die Konservierung von Zellverbänden scheint es insbesondere interessant zu sein eine Methode zum Frieren zu verwenden, bei der keine Eisbildung hervorgerufen wird (Malpique *et al*, 2012). Dagegen ist das langsame Einfrieren von vereinzelt Zellen in vielen Fällen reversibel und führt zu hohen Überlebensraten. Im Verlauf dieser Arbeit sollten die Mechanismen untersucht werden, die für ein erfolgreiches, langsames Einfrieren verantwortlich sind. Der starke Wasserverlust soll, insbesondere unter Berücksichtigung der zellulären Volumenregulation, weitergehend untersucht werden.

1.3 Grundlagen des zellulären Wasserhaushaltes

Wasser bildet den Hauptbestandteil der meisten Zellen. Es ist der Lösungsvermittler vieler Substanzen und bildet die Hydrathülle von Salze, Proteinen sowie andere Makromolekülen. Die Fähigkeit der Zelle, Wasser aufzunehmen und abzugeben, ist essentiell für ihr Überleben. Um dies zu gewährleisten, ist die Plasmamembran der meisten tierischen Zellen hoch permeabel für Wasser. Diese Permeabilität wird durch sogenannte Aquaporine hervorgerufen, Proteine die, durch die Bildung spezieller Kanäle, eine hohe Durchlässigkeit für Wasser vermitteln (Verkman, 2011). Es wurde lange davon ausgegangen, dass biologische Membranen per se eine hohe Wasserpermeabilität hätten. Durch die Identifizierung des ersten Wasserkanals, dem Aquaporin 1, durch Preston und Kollegen, wurde diese Annahme 1992 widerlegt (Preston *et al*, 1992).

Die Membran einer Zelle ist für die meisten gelöste Substanzen nicht durchlässig. Während die hohe Leitfähigkeit für Wasser durch Aquaporine vermittelt wird, ist auch der Transport von Elektrolyte, Stoffwechselprodukte und Kohlenhydrate nur aufgrund spezifischer Transporter möglich. (Lucke, 1940). Dabei ist die Permeabilität der Membran für Wasser um den Faktor 10^5 bis 10^6 höher als die für Ionen (Borgnia *et al*, 1999). Aufgrund der geringen Permeabilität der Zellmembran für diese wasserlöslichen Substanzen erzeugen diese einen osmotischen Gradienten

über die Zellmembran. Dies passiert nur dann, wenn sie innerhalb und außerhalb der Zelle in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Sämtliche osmotisch aktiven Substanzen werden Osmolyte genannt. Entscheidend ist die Gesamtkonzentration aller Osmolyte innerhalb und außerhalb der Zelle. Die Summe aller osmotisch wirksamen Teilchen bestimmt die Osmolarität einer Lösung. Die Zelle verhält sich in moderaten Konzentrationsbereichen der Osmolyte wie ein perfektes Osmometer. Änderungen in der Konzentration der Osmolyte führt je nach Richtung des Ungleichgewichts zu einem Wasser Ein- oder Ausstrom (Armitage & Juss, 1996).

In diesem Zusammenhang wird häufig vom chemischen Potential des Wassers (μ_w) gesprochen. Wasser diffundiert entlang des Gradienten von Regionen mit hohem chemischem Potential zu Regionen mit niedrigem chemischem Potential. Dabei ist die Rate, mit der Wasser sich bewegt, proportional zur Differenz des chemischen Potentials ($\Delta\mu_w$). Gleichmaßen lässt sich so auch das chemische Potential von Wasser in Abhängigkeit des Dampfdrucks (p) von Wasser beschreiben.

$$\mu_w - \mu_w^0 = RT \ln p/p^0$$

Dabei steht die hochgestellte Null für die Bedingung in reinem Wasser. Definitionsgemäß ist die Konzentration von Wasser bei $\Delta\mu_w = 0$ ausgeglichen (Mazur, 2010). Eine Erhöhung der extrazellulären Osmolyte führt folglich zu einer Verringerung von μ_w außerhalb der Zelle. Der dadurch bedingte Ausstrom von Wasser entsprechend zu einem Zellschrumpfen.

Neben anorganischen Osmolyten enthalten Zellen eine Vielzahl von anionischen Kolloiden (Proteine und organische Phosphatverbindungen), die durch die Zellmembran in der Zelle gehalten werden. Die extrazelluläre Flüssigkeit hingegen enthält kaum Anionen, die nicht durch bestimmte Kanäle der Zellmembran ausgetauscht werden können. Der überwiegende Teil (70%) dieser Proteine ist bei einem physiologischen pH-Wert negativ geladen (Gianazza & Giorgio Righetti, 1980). Daraus entsteht ein starkes Potentialgefälle, aufgrund dessen vermehrt Wasser in die Zellen strömen müsste und diese durch die damit verbundene Volumenzunahme zum Platzen bringen würde. Dieses durch biologische Makromoleküle ausgebildete Gefälle wird Kolloid-Osmotischer Druck genannt. Um diesem Problem zu begegnen, verfügen Zellen über die Na^+ / K^+ -ATPase. Diese ermöglicht einen energieabhängigen, aktiven Transport von Natrium-Ionen aus und Kalium-Ionen in die Zelle. Die

zugrundeliegende Stöchiometrie von 3 Natrium zu 2 Kalium führt zu einem Netto-Ausstrom von Ionen aus der Zelle und bildet somit die Balance zum Kolloid-Osmotischen-Druck (Skou, 1957). Zusammen mit der relativen Impermeabilität der Zellmembran für Ionen führt dies zum Ausgleich des osmotischen Ungleichgewichts, welches durch Biomoleküle entsteht. In Kombination mit dem geringfügigen, aber stetigen Einstrom von Natrium und Ausstrom von Kalium-Ionen ist dieser Mechanismus als „*pump and leak*“ Mechanismus beschrieben worden, der über die Regulation des osmotischen Ungleichgewichts hinaus, auch für die Ausbildung des negativen Membranpotentials verantwortlich ist (Leaf, 1959; Tosteson & Hoffman, 1960).

Zur Regulation langanhaltender, anisotonischer Bedingungen werden von Zellen organische Osmolyte wie zum Beispiel Taurin gebildet oder aufgenommen, um die physiologische Ionenkonzentration wieder herzustellen und gleichzeitig die intrazelluläre Osmolyt-Konzentration zu erhöhen (Lang *et al*, 1998; Hoffmann *et al*, 2009).

Für die Funktion und das Überleben von Zellen ist es entscheidend, dass diese ihr Volumen in engen Rahmen regulieren. Auch wenn Zellen normalerweise in Geweben einer, sich kaum ändernden, extrazellulären Osmolarität ausgesetzt sind, führen verschiedene Prozesse zu osmotischen Ungleichgewichten. Viele Biomoleküle die im Verlauf des Metabolismus von der Zelle gebildet werden sind osmotisch aktiv und die Aufnahme und Abgabe von Nährstoffen und Metaboliten in und aus der Zelle führt zu einer Änderung des osmotischen Gradienten. Diese Änderung ist wiederum mit einer Volumenänderung verbunden.

Darüber hinaus spielen Volumenänderungen bei essentiellen Prozessen wie Zellteilung, Proliferation und Apoptose eine entscheidende Rolle (Lang *et al*, 1998; Wehner *et al*, 2003b; Bondarava *et al*, 2009; Numata *et al*, 2012).

1.4 Zelluläre Volumenregulation

1.4.1 Wahrnehmung von zellulären Volumenänderungen

Damit eine Zelle ihr verändertes Volumen korrigieren kann, muss diese Veränderung zunächst erkannt werden. Zurzeit werden in der Literatur drei Mechanismen diskutiert, über die Zellen eine Veränderung ihres Volumens detektieren können:

- 1) Die Wahrnehmung der zellulären Ionenstärke bzw. die Konzentration bestimmter Ionen: Es konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Konzentration bestimmter Ionen zu einer Aktivierung von regulatorischen Elementen (z.B. Ionenka-

näle oder Transporter) führt. Durch eine Reduzierung der intrazellulären Chlorid-Konzentration werden beispielsweise der Volumen-regulierte Anionenkanal (VRAC) (Nilius *et al.*, 1998) und der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter aktiviert (Matthews *et al.*, 1998).

2) Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Membran so wie die Veränderungen von Kräften, die unter anderem über das Zytoskelett auf Membranproteine wirken, sind weitere Faktoren in der Wahrnehmung von Volumenänderungen. Es wurde beschrieben, dass hypertoner Stress zu einer vermehrten Aktinpolymerisation führt (Hallows *et al.*, 1991). TRPM7, ein Mitglied der Familie der *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle (siehe auch 1.5.2) wird durch mechanischen Stress an der Plasmamembran aktiviert (Numata *et al.*, 2007a) und VRAC wird, neben seiner Chlorid-abhängigen Aktivierung, ebenfalls über die Cholesterolkonzentration der Membran reguliert. Die Verringerung der Cholesterolkonzentration, die mit einer Versteifung der Membran einhergeht, resultiert in einer Aktivierung des VRACs (Byfield *et al.*, 2006).

3) Ein sehr generelles Konzept der Volumenwahrnehmung von Zellen, ist der Einfluss der Konzentrationen von Biomolekülen, wie Proteinen, Nukleinsäuren und auch Polysacchariden auf die Reaktivität von Makromolekülen. Dieses Prinzip des *macromolecular crowdings* wurde erstmals 1987 von Zimmermann und Harrison beschrieben. Es beschreibt die Abnahme von Reaktionsgeschwindigkeiten und die damit einhergehenden Unterschiede in Bindungsaffinitäten von Biomolekülen, aufgrund der verlangsamten Diffusion in Zellen durch die erhöhte Konzentration an Biomolekülen (Zimmerman & Harrison, 1987). So wurde z.B. in entleerten Erythrozyten von Hunden gezeigt, dass die Konzentration von Biomolekülen, in diesem Fall Albumin, einen direkten Einfluss auf den Sollwert des Volumens hat. Zellen, die hypertone gestresst wurden, regulierten ihr Volumen unterschiedlich stark, abhängig von der vorher eingestellten Albuminkonzentration und nicht in Abhängigkeit des Zellvolumens vor dem Schrumpfen (Colclasure & Parker, 1991).

1.4.2 Regulatorische Volumenabnahme

Der *regulatory volume decrease* (RVD) stellt die Antwort einer osmotisch-geschwollenen Zelle dar, um ihr Volumen zu verringern. Dabei werden Kanäle aktiviert, durch die die Zelle Kalium abgibt. Dieser Kalium-Ausstrom führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle und die Änderung des Membranpotentials fördert so auch

einen Ausstrom von Chlorid (Lang *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2001). Bereits 1988 wurde von Hazama und Okada gezeigt, dass es darüber hinaus volumen-sensitive Chlorid-Kanäle gibt, die nach Zellschwellen aktivieren und zu einem erhöhten Chlorid-Ausstrom beitragen (Hazama & Okada, 1988). Später wurde der Kanal auch *volume-regulated anion channel* (VRAC) (Nilius *et al.*, 1997; Nilius & Droogmans, 2001) oder *volume-sensitiv outwardly rectifying anion channel* (VSOR) genannt (Okada, 1997). Zusätzlich zu Kalium- und Chlorid-Kanälen werden unter hypertonen Bedingungen auch K^+Cl^- -Symporter aktiviert (Okada *et al.*, 2001). Neben dem Ausstrom von anorganischen Ionen werden durch entsprechende Kanäle ebenfalls organische Osmolyte wie Myo-Inositol und Taurin freigesetzt (Wehner *et al.*, 2003a). Alle Mechanismen, die Abgabe von Ionen sowie von organischen Osmolyten führen zu einem osmotischen Wasserausstrom aus den Zellen und somit zur partiellen Wiederherstellung des Ausgangsvolumens.

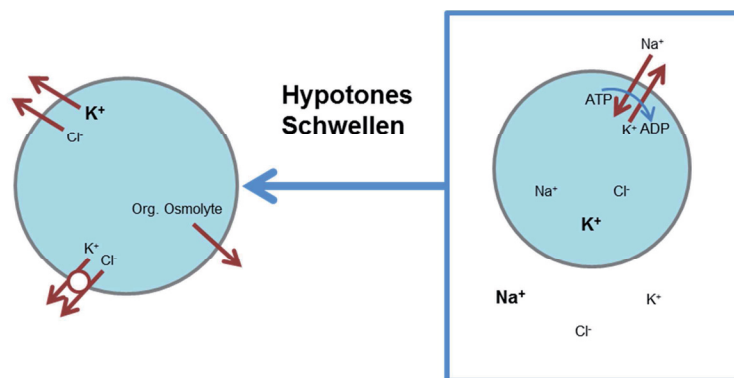


Abbildung 1.4-1: Schematische Darstellung der regulatorischen Volumenabnahme (RVD).

Extrazelluläre Hypoosmolarität führt zu einem Schwellen der Zellen. Dem wirkt die Zelle durch Abgabe von Kalium (K^+)- und Chlorid (Cl^-)- Ionen über entsprechende Kanäle und einen Kotransporter entgegen. Zusätzlich können über Anionenkanäle organische Osmolyte abgegeben werden. Durch die Abgabe von Ionen und organischen Osmolyten kommt es zu einem Ausstrom von Wasser aus der Zelle und zur Wiederherstellung des Ausgangsvolumens.

Eine besondere Form der Volumenabnahme ist der *apoptotic volume decrease* (AVP), der Verlust von Zellvolumen im Verlauf der Apoptose. Die Induktion des Volumenverlustes ist ein Eckpunkt der Apoptose und die Inhibierung von HICCs führt zu einer vermehrten Apoptose. Eine Aktivierung des HICCs durch hypertonen Stress schützt HeLa-Zellen dagegen vor einer Staurosporin-induzierten Apoptose (Shimizu *et al.*, 2006; Numata *et al.*, 2008).

Wie bei der Apoptose spielen auch im Verlauf einer Nekrose von Zellen Änderungen des Volumens eine wichtige Rolle. So könnte gezeigt werden, dass der

nekrotische Zelltot von einem Zellschwellen, dem *necrotic volume increase* (NVI) begleitet ist (Kroemer *et al*, 1998). Durch die Zellschädigung kommt es zu einer unkontrollierten Aufnahme von extrazellulärem Natrium, welches zu einem Zellschwellen führt. Darüber hinaus verliert die Zelle ATP was, dem Natrium-Einstrom, entgegenwirkende Funktion der Na^+ / K^+ -ATPase weiter reduziert und das Zellschwellen somit verstärkt (Lipton, 1999).

1.4.3 Regulatorische Volumenzunahme

In vielen zellulären Systemen wird eine akute, osmotisch-verursachte Verminderung des Zellvolumens durch einen Prozess korrigiert der *regulatory volume increase* (RVI) genannt wird. Im Verlauf dieses Prozesses werden hauptsächlich Na^+ und Cl^- - Ionen in die Zelle aufgenommen, wodurch eine Änderung der intrazellulären Osmolarität hervorgerufen wird, die wiederum zu einem passiven Wassereinstrom führt. Hauptvermittler der Aufnahme von Natrium- und Chlorid-Ionen sind der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC1), der Na^+ / H^+ -Antiporter (NHE1) und nicht-selektive Kationenkanäle (Lang *et al*, 1998; Wehner *et al*, 2003a). In Rattenhepatozyten wurde gezeigt, dass diese drei Transporter/ Kanäle im Verhältnis 4:1:1 (Kationenkanal:NKCC:NHE) zur Volumenregulation beitragen (Wehner & Tinel, 2000).

Der Einstrom von Natrium-Ionen führt zu einer Depolarisation der Membran, die wiederum den Einstrom von Chlorid-Ionen in die Zelle verstärkt. Es kommt zu einer quasi elektroneutralen Aufnahme von NaCl und Wasser, das dem veränderten osmotischen Gefälle folgt (Wehner & Tinel, 2000).

Den größten Beitrag zum Kationen-Einstrom leisten hypertone-aktivierte Kationen-Kanäle (HICCs). Diese nicht-selektiven Kationen Kanäle wurden bisher in einer Reihe von Zellen gefunden (Wehner *et al*, 2003b, 2006; Plettenberg *et al*, 2008) und können in Amilorid-sensitiv und Amilorid-insensitiv unterschiedenen werden.

Die Amilorid-sensitiven Kanäle dieser Gruppe beinhalten die Familie der epithelialen Natrium-Kanäle (ENaC) und werden nicht durch Flufenamat und Gadolinium (Gd^{3+}) gehemmt (Wehner *et al*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass ein funktioneller Kanal aus allen drei Untereinheiten, alpha, beta und gamma, besteht. Es sind jedoch auch Kanäle nur aus alpha- Untereinheiten beschrieben worden (Canessa *et al*, 1994; Fyfe & Canessa, 1998). Die hypertone Aktivierung dieses Kanals benötigt

die Aktivität von PLC, PKC, G-Proteinen und Tyrosinkinase (Heinzinger *et al.*, 2001; Wehner & Olsen, 2004).

Amilorid-insensitive Kanäle werden durch Flufenamat und Gd^{3+} gehemmt. Zu diesen Kanälen gehören unter anderem die *Transient receptor potential* (TRP) Kanäle, die auch in HeLa-Zellen exprimiert werden und dort in etwa gleichen Maße zur Volumenregulation beitragen wie der NHE1 (Wehner *et al.*, 2003b).

Darüber hinaus sind für einige Zellen, wie zum Beispiel bei Ehrlich-Lattre-*ascitis* Tumorzellen und humanen Hepatozyten, HICCs beschrieben worden, die sowohl partiell durch Amilorid als auch Flufenamat und Gd^{3+} inhibiert werden (Wehner *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005).

Neben der Aktivierung der genannten Mechanismen zur Aufnahme von Ionen, nimmt die Kalium-Leitfähigkeit nach hypertonem Stress ab, um einen Ionenverlust entlang des Ionengradientens zu verhindern (Wehner & Tinel, 2000).

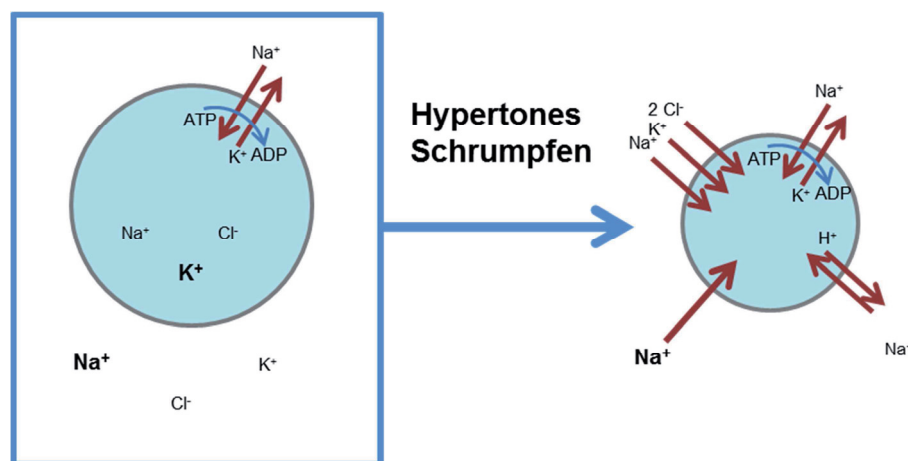


Abbildung 1.4-2: Schematische Darstellung der regulatorischen Volumenzunahme (RVI).

Sind Zellen hypertonem Stress und damit verbundenem Schrumpfen ausgesetzt, aktivieren sie Natrium (Na⁺)-, Kalium (K⁺), 2-Chlorid (Cl⁻)-Kotransporter (NKCC), Natrium (Na⁺)-, Protonen (H⁺)-Antiporter (NHE) und vor allem hypertone-induzierte Kationenkanäle, um Ionen und damit Wasser aufzunehmen. In einigen Zellen führt hypertone Stress zu einer Steigerung der Na⁺-K⁺-ATPase Aktivität um die ursprünglichen, physiologischen Ionengradienten wieder herzustellen.

Unter physiologischen Bedingungen spielt die Volumenzunahme eine wichtige Rolle bei der Proliferation. So konnte, beispielsweise in HepG2- und HeLa-Zellen gezeigt werden, dass HICCs wesentlich an der Volumenzunahme während der Zellteilung beteiligt sind (Shimizu *et al.*, 2006; Bondarava *et al.*, 2009; Numata *et al.*, 2012).

1.5 Hyperton-induzierte Kationen-Kanäle

1.5.1 Der epitheliale Natriumkanal

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) gehört zur Familie der ENaC/ Degenerine und wurde in den 1990er Jahren als eine neue Familie von Ionenkanälen entdeckt (Canessa *et al*, 1993, 1994). Der Name Degenerin stammt von dem zellulären Phänotyp der durch Mutationen im *deg-1* Gen entsteht (Kellenberger & Schild, 2002). ENaC ist ein durch submikromolare Konzentrationen von Amilorid hemmbarer, spannungsabhängiger Natriumkanal (Kelly *et al*, 2003), der eine hohe Selektivität von Na^+ gegenüber K^+ aufweist ($P_{\text{Na}} / P_{\text{K}} > 40$) (Fyfe & Canessa, 1998). Die Leitfähigkeit des einzelnen Kanals beträgt ~ 5 pS und die Selektivität wird als $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ \gg \text{K}^+$ angegeben (Garty & Palmer, 1997).

ENaC lokalisiert hauptsächlich in der apikalen Membran von Epithelien, (z.B. Lunge, Niere und Leber) und ist dort für die Resorption von Natrium aus dem Lumen verantwortlich. Dieser Transport ist ein zweistufiger Prozess, in dem als erstes Na^+ durch den ENaC entlang des elektrochemischen Gefälles der apikalen Membran in die Zellen aufgenommen wird und dann in einem zweiten Schritt durch die Na^+ - K^+ -ATPase der basolateralen Membran wieder abgegeben wird (Kellenberger & Schild, 2002). Der funktionelle Kanal ist in den meisten Geweben aus drei homologen alpha, beta und gamma-Untereinheiten aufgebaut. Einige Autoren beschreiben ein Heterotetramer mit einer Stöchiometrie von $2\alpha 1\beta 1\gamma$ -Untereinheiten (Firsov *et al*, 1998). Außerdem werden Kanäle mit neun Untereinheiten und gleicher Stöchiometrie beschrieben, also ein Kanal aus $3\alpha 3\beta 3\gamma$ -Untereinheiten (Snyder, 2002; Staruschenko *et al*, 2005).

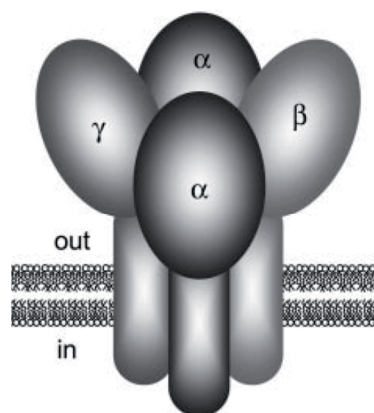


Abbildung 1.5-1: Modell eines ENaC in der Membran. (Entnommen aus (Kellenberger & Schild, 2002))

Aufbau des ENaC aus zwei alpha-, einer beta- und einer gamma-Untereinheit. Der überwiegende Teil des Kanals mit den einzelnen *Loops* der Untereinheiten ist extrazellulär lokalisiert.

Zusätzlich ist eine delta-Untereinheit bekannt, die der Struktur der alpha-Untereinheit am ähnlichsten ist und meistens als Ersatz der für diese dient (Haerteis *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2012). Alle Untereinheiten bestehen aus zwei Transmembrandomänen mit intrazellulärem N- und C-Terminus und einem fast 500 Aminosäure langen, extrazellulären *Loop*. Die extrazellulären *Loops* der vier Untereinheiten bilden den eigentlichen Kanal aus und enthält wichtige regulatorische Bereiche (Kellenberger & Schild, 2002).

Die hohe Relevanz der ENaC-Funktionalität spiegelt sich in einer Reihe von genetisch bedingten Krankheiten wider, die durch die Fehlfunktionen von ENaC miteinander verknüpft sind. Mutationen in den Genen, die für die beta oder gamma-Untereinheiten des Kanals kodieren, führen in der Niere zu einer deutlich erhöhten Rück-Resorption von Natrium aus dem Primärharn sowie zu einer Form der Hypertonie (Lifton, 1996). Diese, als Liddle's Syndrom bekannte Krankheit, beruht auf einer Mutation im C-terminalen PY Motiv, welches eine Bindungsstelle für das regulatorische Protein Nedd4-2 darstellt und eigentlich die Anzahl von ENaC durch die Einleitung der Proteolyse verringern soll (Kabra *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2007).

Pseudohyperaldosterionismus (PHA-I) ist eine genetische Erkrankung, bei der eine Mutation in der alpha-Untereinheit des Kanals zum Verlust der zweiten Transmembrandomäne und des intrazellulären Carboxy-Terminus führt. Die Krankheit zeichnet sich durch lebensgefährliche Hyperkaliämien, Dehydratation und Salzverlust aus (Hanukoglu, 1991). Dabei scheint weniger die Bildung eines funktionellen Kanals beeinträchtigt zu sein, als der Transport zur Plasmamembran und die Stabilität des funktionellen Kanals (Bonny *et al.*, 1999).

Bei der cystischen Fibrose oder auch Mukoviszidose handelt es sich um eine vererbte Erkrankung, bei der die Erkrankten unter einer erhöhten Viskosität von Sekreten, z.B. in der Bauchspeicheldrüse, aber auch dem Bronchialsekret in der Lunge leiden. Eine Mutation im *cftr*-Gen bedingt eine Veränderung des Genproduktes *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). Diese führt zur verringerten Abgabe von Chlorid aus den Zellen und einem, damit verbundenen, geringeren Transport von Wasser in das Lumen des Drüsengewebes und folglich zur Verdickung des Sekrets. Entscheidend ist dabei auch die regulatorische Funktion die CFTR auf den ENaC auswirkt. Dabei wirkt diese Interaktion, in gesunden Menschen, für eine Reduzierung der Membranlokalisation und eine verminderte Expression von ENaC. Diese Interaktion ist bei Menschen mit cystischer Fibrose gestört. Diese Stö-

ung führt zusätzlich zu einer Hyperabsorption von Natrium aus dem Lumen, wodurch eine zusätzliche Wasseraufnahme erfolgt und die Viskosität des Sekrets weiter erhöht wird (Berdiev *et al.*, 2009).

Die Aktivität des ENaCs wird auf vielfältige Weise kontrolliert. Beispielsweise führt das Hormon Aldosteron zur vermehrten Einlagerung von ENaC in die apikale Membran und darüber hinaus auch in eine verstärkte Neusynthese des Proteins (Kusche-Vihrog *et al.*, 2008; Butterworth *et al.*, 2009; Snyder, 2005). Vasopressin, ein weiteres Hormon, bewirkt ebenfalls eine vermehrte Einlagerung des ENaC in die Plasmamembran (Butterworth *et al.*, 2009).

An der Membran wird der Kanal durch proteolytische Abspaltung eines Teils des extrazellulären *Loops* aktiviert (Kleyman *et al.*, 2009; Rossier & Stutts, 2009). Die erste identifizierte Serin-Protease, die dafür verantwortlich ist, wurde 1997 beschrieben und als *Channel activating protease 1* (CAP-1) bezeichnet (Vallet *et al.*, 1997). Inzwischen sind noch weitere Schnittstellen für Proteasen in der alpha, beta und gamma-Untereinheit, wie zum Beispiel für die Protease Furin, beschrieben (Rossier & Stutts, 2009). Dabei scheint es eine Rückkopplung zwischen der intrazellulären Natriumkonzentration und der Kanalaktivierung zu geben (Knight *et al.*, 2008).

Die Endozytose, sowie ein darauf folgendes Recycling oder die Degradation des Kanals, dienen als Gegenspieler der vermehrten Einlagerung des Kanals in die Membran. Die Bindung des Proteins Nedd4-2 an das N-terminale PY-Motif führt zur Ubiquitinierung des ENaCs, wodurch dieser internalisiert und in Lysosomen abgebaut wird (Kabra *et al.*, 2008). Über Rab11-positive Vesikel findet wiederum ein Recycling und Transport von ENaC-enthaltenen Vesikeln zurück zur Membran statt (Karpushev *et al.*, 2008).

1.5.2 *Transient receptor potential* Kanäle

Transient receptor potential (TRP) Kanäle bilden mit mehr als 30 Mitgliedern eine große Familie von Na⁺- und Ca²⁺-permeablen Kanälen. Ihnen wird eine weitreichende Funktionalität in der Wahrnehmung von chemischen und physikalischen Stimuli, wie Geschmack, Temperatur, Pheromonen, osmotischen Veränderungen oder auch Änderungen in der Membrandehnung einer Zelle zugeschrieben (Owsianik *et al.*, 2006). TRP-Kanäle sind in vielen Fällen an der Änderung der zellulären Calciumkonzentration beteiligt, indem sie als Kanäle in der Plasmamembran die Durchlässig-

keit für Ca^{2+} schaffen. Wahrscheinlich ist auch, dass durch die Bildung von Kanälen in intrazellulären Organellen, wie dem ER, Calcium in das Zytoplasma der Zellen freigesetzt wird (Pedersen *et al*, 2005).

Calcium-Ionen spielen eine zentrale Rolle in der Steuerung vielen zellulären Prozessen, wie z.B. der Muskelkontraktion, Neurotransmitterfreisetzung, Genexpression und auch der Apoptose (Berridge *et al*, 2000). TRP-Kanäle werden in einer Vielzahl von Spezies exprimiert und sind durch die Entdeckung des TRP-Kanal in *Drosophila* in ihrer Familie begründet: Eine Variante des Kanals bei Tieren mit einer Mutationen im *trp* Gen zeigte transiente Spannungsantworten auf Lichtreize, während Tiere die keine Mutation trugen einen Membranstrom aufwiesen, der in der Dauer mit dem Lichtreiz übereinstimmte (Minke, 1977). Der erste beschriebene, humane TRP-Kanal war TRPC1 (Wes *et al*, 1995).

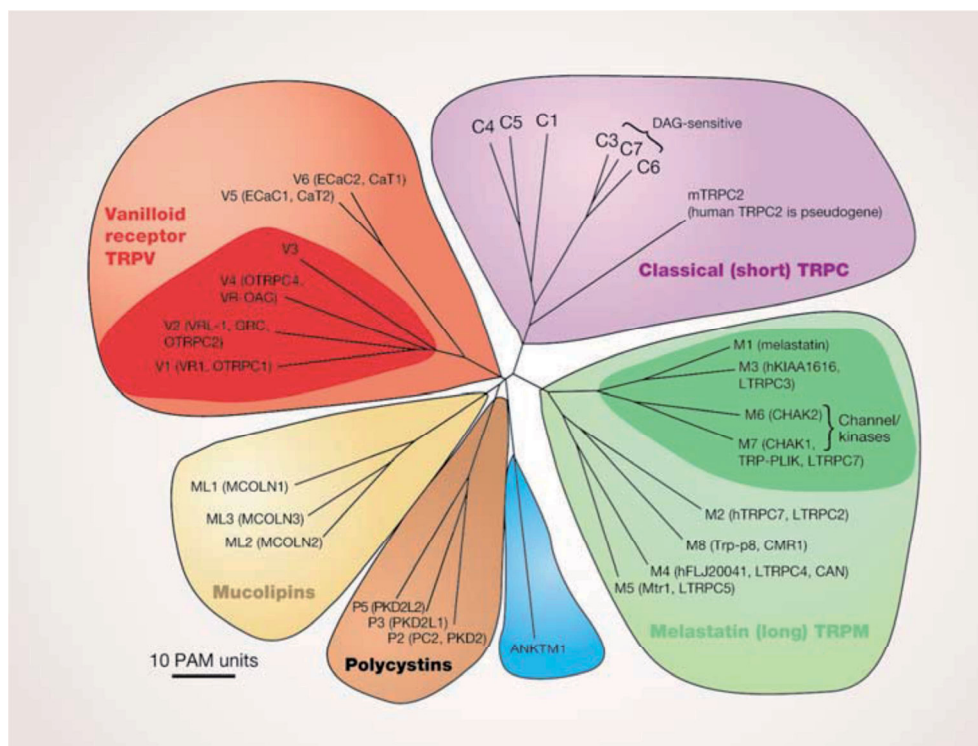


Abbildung 1.5-2: Phylogenetischer Baum der TRP-Familie. (Entnommen aus (Clapham, 2003)).

Darstellung der Verwandtschaft bekannter TRP-Kanäle anhand der Sequenzhomologie. Insgesamt werden sieben Familien unterschieden: TRPC: *classical* oder *canonical*, TRPM: *Melastatin*, TRPV, *Vanilloid*, TRPA: *Ankyrin*, TRPP: *Polycystin*, TRPML: *Mucolipin* und TRPN: *no mechanoreceptor potential C*.

Alle TRP-Kanäle enthalten sechs Transmembrandomänen und bilden als homo- oder heterotetramere einen Kationen-selektiven Kanal. Die im Menschen vorkommenden Kanäle werden auf Basis der Sequenzhomologie in sechs Familien eingeteilt: TRPC: *classical* oder *canonical*, TRPM: *Melastatin*, TRPV, *Vanilloid*, TRPA: *Ankyrin*,

TRPP: *Polycystin* und TRPML: *Mucolipin*. Dabei vermittelt TRPV1 z.B. die Schmerzwahrnehmung von Capsaicin während TRPA-Kanäle mechanischen Stress (z.B. Druck) wahrnehmen. (Montell *et al*, 2002a, 2002b; Clapham, 2003).

Die Pore der Kanäle wird jeweils durch die vier Transmembransegmente S5 und S6 (S5-Pore-loop-S6) aller Untereinheiten eines Homo- oder Heterotetramer ausgebildet. Das zytoplasmatische Ende der TM6 bildet das *Gate*, das den Kationeneinstrom in die Zelle reguliert. Bei allen Kanälen handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle mit $P_{Ca} / P_{Na} \leq 10$. Die Ausnahme bilden TRPM4 und TRPM5, die selektiv für monovalente Kationen sind und TRPV5 und TRPV6 die Calcium-selektiv sind (Clapham, 2003). TRP-Kanäle sind durch eine Vielzahl von Stimuli aktivierbar, wie zum Beispiel intra- und extrazelluläre Botenstoffe, sowie chemische, mechanische und auch osmotische Reize (Pedersen *et al*, 2005).

1.6 Volumenregulation in HeLa-Zellen - TRPM2 und NHE1

Bei der regulatorischen Volumenzunahme (RVI) in HeLa-Zellen sind bis dato zwei entscheidende Proteine, der *transient receptor potential channel, type melastatin 2* (TRPM2) als HICC und der *Na⁺ / H⁺ -Exchanger 1* (NHE1) bekannt. Ein Mitwirken des *Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻*-Symporters scheint dagegen eher unwahrscheinlich (Wehner *et al*, 2003b; Numata *et al*, 2012).

In HeLa-Zellen wird der HICC durch ein Verhältnis der Ionen-Selektivität von $P_{Na}: P_{Li}: P_{K}: P_{Cs}: P_{NMDG}: P_{Ca}: P_{Cl}$ von 1,00: 0,86: 0,84: 0,56: 0,10: 0,07: 0,15 charakterisiert. Diese nicht-selektiven Kationenströme sind durch Flufenamate und Gadolinium-Ionen hemmbar, aber nicht sensitiv für Amilorid. Darüber hinaus zeigen sie eine eingeschränkte Sensitivität gegenüber 100 μ M SKF-96365 (Wehner *et al*, 2003b), einem spezifischen Inhibitor von TRP-Kanälen, sowie dem unspezifischen Inhibitor 2-Aminoethoxydiphenyl Borat (2-APB) (Numata *et al*, 2007b). Die reversiblen, hyperten-induzierten Ströme (450 mosM) zeigen eine lineare Strom-Spannungskennlinie mit einer maximalen Aktivierung von $-4,24 \pm 0,63$ pA / pF bei -30 mV. Dabei sind die intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen der verwendeten Lösungen so gewählt, dass sich Chlorid bei -30 mV im Gleichgewicht befindet und nur Natrium-Ströme gemessen werden (Wehner *et al*, 2003b).

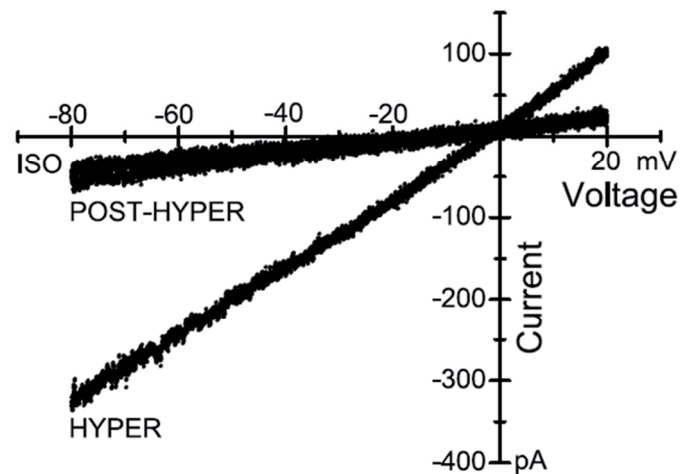


Abbildung 1.6-1: Lineare Strom-Spannungs-Kennlinie des HICC in HeLa-Zellen. (Entnommen aus (Wehner *et al*, 2003b))

Typische Strom-Spannungs-Beziehung des HICC in HeLa-Zellen bei -30 mV. Gezeigt sind der isotone Strom, die Aktivierung nach 5 min hypertonem Stress (450 mosM), sowie die Inaktivierung bei Wechsel zurück zu isotonen Bedingungen.

Die Aktivierung der HICC-Ströme und die Volumenregulation in HeLa-Zellen involviert eine Reihe von Signalkaskaden und sehr wahrscheinlich auch das Zytoskelett. So konnte mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren gezeigt werden, dass G-Proteine, Tyrosinkinasen, Phospholipase C, Proteinkinase C und die p38 MAP-Kinase an der Aktivierung der HICC-Ströme und der Volumenregulation (RVI) beteiligt sind. Darüber hinaus führte eine Störung der Aktinfilamente durch Latrunculin B zu einer Reduzierung der HICC-Ströme und des RVI (Wehner *et al*, 2007). Zusätzlich zu hypertonem Stress ist der HICC auch durch oxidativen Stress (z.B. H₂O₂), sowie ADP-Ribose und cyclische ADP-Ribose aktivierbar (Numata *et al*, 2012).

Neben der akuten Volumenregulation ist der HICC an der Proliferation und Apoptose in HeLa-Zellen beteiligt. Die Inhibierung des HICC durch 100 μ M Flufenamat reduziert die Proliferation auf ~80% (isoton), die durch hypertonen Stress weiter auf 50% sinkt. Gleichzeitig wurden eine zwei- bis vierfach erhöhte Caspase-3 Aktivität (isoton bis 600 mosM) und eine erhöhte DNA-Fragmentierung beobachtet (Shimizu *et al*, 2006). In Einklang mit diesen Ergebnissen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Stimulierung des HICCs eine Verringerung der Staurosporin aktivierten Apoptose hervorruft (Numata *et al*, 2008).

In kürzlich durchgeführten Arbeiten, deren Ergebnisse zum Teil in dieser Arbeit beschrieben sind, konnte gezeigt werden, dass eine ΔC -*Splice*-Variante des TRPM2 das molekulare Korrelat des HICCs in HeLa-Zellen ist (Numata *et al*, 2012). Diese *Splice*-Variante in HeLa-Zellen ist sowohl durch H₂O₂ als auch durch die

Nucleotide ADP-Ribose, cADP-Ribose und NAD^+ aktivierbar (Numata *et al.*, 2012). Die ΔC -Variante entsteht durch den Verlust von Exon 27, wodurch eine Insensitivität des Kanals gegenüber ADP-Ribose hervorgerufen wird (Wehage *et al.*, 2002). Dieser Befund steht im Widerspruch zur berichteten Aktivierbarkeit des TRPM2 in HeLa-Zellen durch ADP-Ribose (Numata *et al.*, 2012), die im Verlauf der vorliegenden Arbeit besprochen wird (vergleiche Kapitel 4.2.3.1).

TRPM2 ist ein spannungsunabhängiger Kationenkanal der als Homotetramer gebildet wird und eine Leitfähigkeit für Na^+ , Ca^{2+} und K^+ -Ionen hat (Jiang *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2011). Ein Merkmal, welches TRPM-Kanäle von allen anderen TRP-Kanälen unterscheidet, ist das C-Terminal gelegene NudT9-H Motiv. Diese Sequenz zeigt deutliche Homologie zu der ADP-Ribose Pyrophosphatase NUDT9 und weist eine katalytische Aktivität zur Spaltung von ADP-Ribose auf (Perraud *et al.*, 2001).

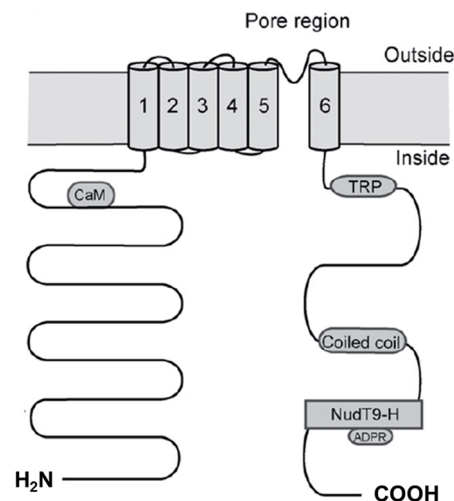


Abbildung 1.6-2: Schematische Darstellung von TRPM2. (Entnommen aus Takahashi *et al.*, 2011))

Topologie des TRPM2 mit der langen N-terminalen Region, den sechs Transmembrandomänen und der C-terminalen Region mit TRP-Homologie-Domäne, einer *Coiled-coil* Domäne und dem NudT9-H Motiv.

Während die Bindung von ADP-Ribose an das NudT9-H Motiv zu einer Aktivierung des Kanals führt (Perraud *et al.*, 2001), ist die *Coiled-coil* Region für die Interaktion der Untereinheit notwendig (Mei *et al.*, 2006).

NHE1 gehört, als eins von zehn Mitgliedern, zu der Familie der Natrium/ Protonen Austauscher. Er ist ubiquitär exprimiert und erfüllt wichtige Funktionen der zellulären pH-Homöostase und Volumenregulation (Alexander & Grinstein, 2006). Darüber

hinaus sind NHEs entscheidend in Zellwachstum, der Zellmigration, Vesikeltransport und Überleben sowie Apoptose involviert. NHE1 ist ein integrales Membranprotein und in polarisierten Zellen in der basalen Membran lokalisiert (Orlowski & Grinstein, 2004).

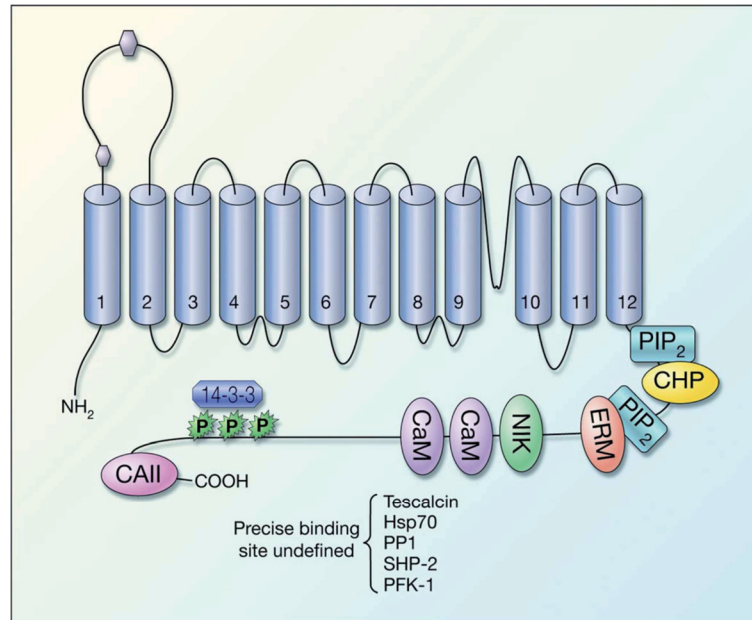


Abbildung 1.6-3: Membrantopologie und Bindungspartner von NHE1 (Entnommen aus (Hoffmann *et al*, 2009))

Dargestellt ist die angenommene Topologie von NHE1 in der Membran, sowie die Bindungsstellen von Interaktionsstellen direkter Bindungspartner. PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat, CHP: Calcineurin Homologie Protein, ERM: Ezrin/Radexin/Moesin, NIK: Nck-interagierende Kinase, CaM: Calmodulin, CAII: Carbonic Anhydrase, HSP70: *Heat shock* Protein 70, PP1: Protein Phosphatase 1, SHP-2: *Src homology 2 dominant-containing protein tyrosin phosphatase*, PFK-1: Phosphofruktokinase.

Die Aktivierung erfolgt durch eine Reihe von Mechanismen wie z.B. durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Interaktion mit Calmodulin oder auch die Reduzierung der Interaktion von extrazellulärem Natrium mit einer allosterischen Inhibitionsstelle (Alexander & Grinstein, 2006).

Darüber hinaus wird NHE1 durch Änderungen des Zellvolumens aktiviert, und trägt entscheidend zum RVI bei, ein Mechanismus der bei seiner Entdeckung durch Cala die bis dahin herrschende Meinung ablöste, dass lediglich Ionenkanäle und Kationen/ Anionen-Ko-Transporter dafür verantwortlich wären (Cala, 1980; Hoffmann *et al*, 2009). Allerdings ist die Aktivierung durch Änderungen des Zellvolumens nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass ein Schrumpfen der Zelle zu zwei zentralen Veränderungen führt, die eine Aktivierung von NHE1 bewirken. Während des Schrumpfens der Zellen wird die Wahrscheinlichkeit der Protonenbindung an eine intrazelluläre Bindungsstelle erhöht, was zu einer Aktivie-

rung des Austauschers bei normalem intrazellulärem pH-Wert führt (Grinstein *et al*, 1985). Darüber hinaus könnte eine, beim Schrumpfen reduzierte Na⁺-Affinität, an die extrazelluläre Inhibitionsstelle zu einer Aktivierung des Austauschers führen. Dieser Mechanismus ist bis jetzt nur in Erythrozyten von Hunden gezeigt (Dunham *et al*, 2004).

Zu einem gewissen Anteil wird der NHE1 durch die Interaktion mit Kinasen und seiner nachfolgenden Phosphorylierungen reguliert. In CHO-K1 Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Volumenänderung die Tyrosinkinase Jak2 aktiviert wird, die eine Phosphorylierung von Calmodulin hervorruft, welches im Anschluss mit NHE1 interagiert und eine mögliche Autoinhibierung auflöst (Bertrand *et al*, 1994; Garnovskaya *et al*, 2003). Ebenso wie für HICC in HeLa-Zellen diskutiert, wird NHE1 in einigen Zelllinien durch eine Beteiligung von Proteinkinase C und p38 MAP-Kinase aktiviert (Pedersen *et al*, 1996; Pederson *et al*, 2002).

2 Zielsetzung

Die Kryokonservierung von Zellen geht, insbesondere bei der Verwendung des klassischen, langsamen Frierens mit einer erheblichen Reduktion des Volumens einher (Mazur, 1984; Spindler *et al*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass dies aufgrund eines massiven Wasserverlustes der Zelle während der extrazellulären Eisbildung passiert (Mazur, 1963; Dong *et al*, 2010; Akhoondi *et al*, 2012). Zusätzlich werden die Salze in der verbleibenden, flüssigen Phase stark konzentriert, was zu einer hohen osmotischen Belastung der Zelle führt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wieweit die Mechanismen der zellulären Volumenregulation bei einer erfolgreichen Kryokonservierung eine Rolle spielen. Zentral war dabei die Frage, ob die De- und Re-Hydrierung der Zellen beim Frieren und Tauen eine aktive, adaptive Volumenregulation zur Grundlage haben.

Um diese Hypothese zu adressieren sollte die Volumenregulation in HeLa-Zellen im Ganzen und entscheidende Proteine, wie der HICC und NHE1 aber auch Aquaporine, die an diesen Prozess beteiligt sind, systematisch charakterisiert werden. Eventuell auftretende Änderung nach dem Frieren sollte durch den Vergleich der Volumenregulation vor und nach dem Frieren identifiziert werden. Dazu sollten die Aktivierungsenergien dieser Prozesse bestimmt werden. In weiteren Verkauf sollten diese Aktivierungsenergien mit den Aktivierungsenergien der gleichen Prozesse, in Zellen nach Kryopreservation verglichen werden.

Die gewonnenen Einblicke in einzelne Prozesse der Volumenregulation, bei der Rückkehr von Zellen aus Kryobedingungen, sollten für die Adaptation und Weiterentwicklung von Kryoprotokollen verwendet. Insbesondere sollte ein Frieren von Zellen als adhärenzte Kultur ermöglicht werden, um diese Zellen nach dem Frieren direkt unter quasi physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollten darüber hinaus verwendet werden, um neue Fixationsverfahren für die Mikroskopie zu entwickeln und zu etablieren. Hierbei wurde gleichermaßen ein Ansatz des langsamen, adaptiven als auch des schnellen Frierens verfolgt.

3 Material und Methoden

3.1 Materiealien und Lösungen

Alle Chemikalien wurden von gängigen Herstellern mindestens in Analysequalität bezogen. Die verwendeten Lösungen für Zellen waren, soweit nicht anders genannt, mit HCO_3^- gepuffert. Osmolaritäten wurden entweder mit ddH₂O verringert oder unter Verwendung von Mannitol (Serva Elektrophorese, Mannheim, Deutschland) erhöht.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.2.1.1 PCR zur Amplifikation von DNA

Zur Klonierung und Expression gewünschter Proteine wurde deren genetische Sequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Primern (siehe Anhang) aus cDNA oder schon vorhandenen Konstrukten amplifiziert. Die verwendeten Primer kodierten gleichzeitig für die benötigten Schnittstellen zur anschließenden Klonierung. Zur Amplifizierung wurde die Phusion Hot-Start IITM High-Fidelity DNA Polymerase eingesetzt, die über eine *proof-reading* Funktion verfügt. Das PCR-Programm wurde den Herstellerangaben für die verwendeten Polymerase und den optimalen *Annealing*-Temperaturen der Primer angepasst. Zunächst wurde ein 2-minütiger Hitzeaktivierungsschritt bei 98°C zur Aktivierung der Polymerase durchgeführt. Danach folgten drei Schritte zur DNA-Amplifikation: 1.) 20 sec bei 98°C zur Trennung der DNA-Doppelstränge, 2.) ein 20 sec Annealingschritt bei der optimalen Annealingtemperatur der Primer im Bereich von 50-65°C, und 3.) der Elongationsschritt bei 72°C. Dieser wurde je nach Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments für 30 sec bis 1 min durchgeführt. Diese drei Schritte wurden je nach *Template*-Konzentration 20-35-mal ausgeführt. Abschließend folgte ein so genannter „Auffüll-Elongationsschritt“ für 3 min bei 72°C, bei dem die Polymerase alle entstandenen Fragmente vervollständigte.

3.2.1.2 SOE (splicing by overlapping extensions)-PCR

Diese spezielle Methode der PCR wurde angewendet, um Punktmutationen in DNA einzubringen oder Deletionskonstrukte zu erstellen. Dabei wurden zunächst zwei individuelle Amplifikationen mit internen Primern durchgeführt, die entweder die

entsprechende Punktmutation einfügten oder zwei Fragmente erzeugten, die einen gewünschten Bereich nicht mehr enthielten. Wichtig war dabei, dass sich die Fragmente um 10 Bp überlappten. So konnten sie partiell dimerisieren, wenn sie in einer dritten PCR mit den jeweiligen äußeren Primern als *Template* dienten. In dieser abschließenden PCR wurde somit die DNA des gesamten Konstrukts mit der entsprechenden Mutation amplifiziert.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Trennung von DNA wurde eine Agaroselösung mit 1:20.000 *Red Safe* als DNA Farbstoff, in TBE-Puffer erstellt und aufgekocht. Die Agarosekonzentration wurde der DNA-Fragmentgröße entsprechend angepasst. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde der 2-log Marker von NEB mit aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 80-100 V. Die Gele wurden unter UV-Licht ausgewertet.

3.2.3 DNA-Extraktion

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Verhinderung von DNA Schäden wurde erst nach dem Ausschneiden des gewünschten Produktes ein Foto unter UV-Licht vom Gel angefertigt. Nach der Gewichtsbestimmung des Gelstückes erfolgte die DNA-Extraktion mit Hilfe des Machery-Nagel Gel-Extraktions-Kit nach Herstellerangaben.

3.2.4 Restriktion DNA-Fragmenten und Vektor

Mit Hilfe des Restriktionsverdau wurden bei Vektor und PCR-Fragment die entsprechenden Enzymschnittstellen geschnitten und so die *sticky ends* zur Ligation des PCR-Fragments in den gewünschten Vektor geschaffen. Der Verdau erfolgte mit Restriktionsenzymen nach den optimalen Herstellerangaben. Pro μg DNA wurden 2-3 *Units* Restriktionsenzym im entsprechenden Puffer eingesetzt und für 2 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Das PCR-Fragment wurde im Anschluss mit Hilfe des Machery-Nagel DNA Clean-Up-Kits aufgereinigt.

Der gewünschte Vektor wurde unter denselben Bedingungen wie das zu klonierende Fragment geschnitten und mit *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP) dephosphoryliert. Zur Kontrolle der Restriktion und zur Entfernung von herausgeschnittenen Fragmenten wurde der Vektor über ein Agarosegel und unter

Verwendung des Machery-Nagel Gel Extraktions Kit aufgereinigt. Die Dephosphorylierung verhindert weitestgehend eine Religation des „leeren“ Vektors, da für die Ligation die 5'-Phosphatgruppen des Konstruktes benötigt werden.

3.2.5 Ligation von DNA

Für die Ligation wurde die T4-Ligase der Firma Invitrogen (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Ein Ligationsansatz bestand aus geschnittenem und dephosphoryliertem Vektor, geschnittenem DNA-Fragment, sowie T4-Ligase und dem entsprechenden Ligationspuffer. Das molare Verhältnis von DNA-Fragment und Vektor lag bei 3:1. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 16°C für mindestens vier Stunden oder über Nacht.

3.2.6 Transformation von Bakterien

Pro Ansatz wurden 50 μ l Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 5 μ l Ligationsansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Hitzeschocktransformation. Dazu wurden die Proben für 45 sec auf 42°C erwärmt und im Anschluss 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 900 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien zur phäni-schen Expression für 30-90 min bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 2000 x g für 2 min pelletiert und nach der Abnahme von 800 μ l Überstand wieder resuspendiert. Abschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausplattiert. Diese Platten enthielten, abhängig vom jeweiligen Vektor, ein Antibiotikum: Ampicillin mit 100 μ g/ μ l oder Kanamycin mit 30 μ g/ ml. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transformation wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese war ein Ligationsansatz mit dephosphoryliertem Vektor ohne DNA-Fragment. Da der dephosphorylierte Vektor aufgrund der fehlenden Phosphatreste am 5'-Ende nur sehr schlecht von der T4-Ligase geschlossen werden kann, sollte dieser weitgehend linearisiert vorliegen. Dieser Zustand verringert die Transformationseffizienz erheblich. Durch den Vektor wird eine Antibiotika-Resistenz verliehen, wodurch nur erfolgreich transformierte Bakterien auf dem Festmedium mit Antibiotikum einen Selektionsvorteil besitzen. Somit lässt sich aus der Kombination von wenig bis keinem Wachstum der Bakterien mit „leerem“ Vektor und gutem Wachstum der Bakterien die mit dem Vektor, der ein Konstrukt enthält, eine erfolgreiche Ligation und Transformation erkennen.

3.2.7 Plasmidisolierung aus Bakterien

3.2.7.1 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab

Von erfolgreichen Transformationen wurden am nächsten Tag 3 ml-Kulturen angesetzt, um eine Plasmidisolierung in kleinem Maßstab (Minipreps) davon anzufertigen. Jeweils eine Kolonie der Bakterien wurde in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

1,5 ml der Übernachtskulturen wurden bei 14.000 rpm für 30 sec zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Roti-Prep Plasmid Mini Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die so erhaltenen Plasmide wurden zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.7.2 Plasmidisolierung im mittleren Maßstab

Um nach erfolgreicher Klonierung größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine Plasmidisolierung im mittleren Maßstab (Midipräparationen) durchgeführt. Hierzu wurden 100 ml Kulturen des entsprechenden Klons in LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Kulturen wurden am folgenden Tag mit Hilfe des Machery-Nagel Midi Prep Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.8 Testrestriktionen und Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob die aufgereinigten Plasmid-DNAs auch das gewünschte Insert enthielten, wurde eine Testrestriktion durchgeführt. Dazu wurde das vorhandene Konstrukt über die gleichen Schnittstellen, über die es in den Vektor kloniert wurde, wieder herausgeschnitten. Das Vorhandensein des Fragments im Vektor wurde mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Von den Proben, die das gewünschte Fragment enthielten, wurde abschließend noch eine Sequenzierung durchgeführt.

3.2.9 Verwendete Plasmid-DNA Konstrukte

TRPM2-eGFP wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Tomohiro Numata, Kyoto Universität, Japan zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um eine, C-terminals Fusionsprotein, des Volllängen-Proteins von TRPM2, Isoform 1.

CD38 wurde als Volllängen-Klon von OriGENE (OriGENE Technologies, Maryland, USA) bezogen und über eine mit Primern eingebrachte SacI und SalI

Schnittstelle in eine mKate2-C1 Expressionsvektor kloniert, so dass ein N-Terminal fusioniertes Konstrukt entstand.

AQP1 wurde ebenfalls als Vollängen-Klon von OriGENE bezogen und über eine mit Primern eingebrachte EcoRI und BamHI Schnittstelle in eine mCitrine-C1 Expressionsvektor kloniert, so dass ein N-Terminal fusioniertes Konstrukt entstand.

Sowohl ErbB1-mCitrine als auch ErbB1-mEos2 wurden aus ErbB1-mGFP (Wouters & Bastiaens, 1999) durch Austausch der Fluorophore generiert.

Die Phosphotyrosin-Bindedomäne aus dem humanen SHC-Protein wurde aus einem zuvor klonierten Konstrukt (Offterdinger *et al*, 2004) amplifiziert und über eine EcoRI und SalI-Schnittstelle in einen mCitrine-N1 Vektor von Clontech ligiert, um ein C-Terminal fusioniertes Konstrukt zu erhalten.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 cADP Ribose Messung

Zur Bestimmung von cADP-Ribose in HeLa-Zellen wurde der von Graeff und Lee beschriebene *cycling assay* verwendet. Dabei wurde die vorhandene cADP Ribose aus HeLa-Zelllysat durch ADP-Ribosyl-Zyklase, in Anwesenheit von hohen Konzentrationen Nicotinamid, in NAD^+ umgewandelt. Das entstandene NAD^+ wurde im Anschluss zusammen mit Ethanol durch Alkoholdehydrogenase in $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Acetaldehyd umgewandelt. Die eigentliche Nachweisreaktion erfolgte im Anschluss durch die Oxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ und die Reduktion von Resazurin zu dem farbigen Produkt Resofurin (Graeff & Lee, 2002). Die Farbstoffentwicklung wurde mit einem Fluoskan Ascent FL Plattenleser (Labsystems, Helsinki, Finnland) detektiert. Dadurch, dass die vorhandene cADP Ribose in NAD^+ umgewandelt wurde und diese im Anschluss in einer zyklischen Reaktion zur Bildung von Resofurin beitrug, konnte eine Nachweißgrenze im nanomolaren Bereich erreicht werden. Um den Einfluss von CD38 und TRPM2 auf die cADP-Ribose Level in HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden entweder Zellen, die mit Kontroll-siRNA oder mit anti-TRPM2 oder anti-CD38 siRNA transfizierten wurden, verwendet. Dazu wurden je eine 10 cm Petrischale mit HeLa-Zellen mit Hilfe von Dharmafect I (Dharmacon, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) und der einsprechenden Alexa488-makierten siRNA (Qiagen, Hilden, Deutschland) transfizierten und für 48h inkubiert. Um nur tranzfizierte Zellen für die cADP-Ribose Bestimmung zu verwenden, wurden die Zellen nach zwei Tagen mit einem Zellsortierer (FACS Aria, BD Biosciences, San

Jose, CA; USA) anhand der Fluoreszenz der Alexa 488-markierte siRNA sortiert. Es wurden zwischen 3 und 5 Millionen transfizierte Zellen für die anschließende Bestimmung eingesetzt. Die erhaltenen Zellen wurden sauer lysiert, neutralisiert und über Nacht mit 0,44 Einheiten/ ml Nucleotid-Pyrophosphatase, 12,5 Einheiten/ ml alkalischer Phosphatase und 0,0625 Einheiten/ ml NADase bei 37°C inkubiert. Diese Behandlung führte zur Degradierung aller anderen Substrate der ADP-Ribosyl-Zyklase außer cADP-Ribose. Die eingesetzten Enzyme wurden durch Filtration durch einen 10 kDa-Filter entfernt und je 100 μ l der Proben wurden als Triplikate im oben beschriebenen Verfahren gemessen. Zusätzlich wurden Proben mit bekannter Konzentration von cADP-Ribose als Kontrollen mitgeführt. Im ersten Schritt wurden die Proben mit 50 μ l Umwandlungs-Reagenz (0,3 μ g/ μ l ADPr-Zyklase, 30 mM Nicotinamid und 100 mM Natriumphosphat, pH 8.0) versehen. Im zweiten Schritt wurden 100 μ l Amplifikationsreagenz (2% Ethanol, 100 μ g/ ml Diaphorase, 10 μ M Flavinmononucleotid, 10 mM Nicotinamid, 100 μ g/ ml Rinderserum Albumin und 100 mM Natriumphosphat, pH 8.0) versehen und für 120 min inkubiert. Die entstandene Resorufin-Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Plattenlesers bei 544 nm angeregt und bei 590 nm gemessen. Anhand der Werte der gemessenen Kontrollen wurde eine Eichgerade erstellt und die Konzentration der gemessenen Proben bestimmt, als Negativkontrolle wurden Proben ohne cADP-Ribose oder ohne Zugabe von ADP-Ribosyl-Zyklase mitgeführt. Die ermittelten cADP-Ribose Konzentrationen wurden auf ein mittleres Zellvolumen von 3 pl normalisiert und in μ M pro Zelle angegeben.

3.3.2 Zellyse

Zur späteren Lyse wurden die Zellen in 10 cm-Schalen ausplattiert (Siehe 3.4.1). Am Tag der Lyse wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 500 μ l eiskaltem RIPA-Lysepuffer überschichtet. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen mechanisch gelöst und anschließend in ein gekühltes Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und dabei alle 2 min gevortext. Danach wurde das Lysat zum Aufschluss mittels Ultraschall homogenisiert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Lysat anschließend bei 4°C für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die so erhaltenen Lysate wurden entweder bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder bei -20° eingefroren.

3.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der gewonnenen Lysate wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Eine BSA-Verdünnungsreihe wurde zur Kalibration angesetzt und mitbestimmt. Sowohl die Probe als auch die BSA-Standards wurden als Doppelmessung bestimmt.

3.3.4 Immunpräzipitation von TRPM2 und CD38

Protein-Protein Interaktionen wurden mit Hilfe von Pull-Down Experimenten analysiert. Dazu wurden HeLa-Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ in 10 cm Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit der Plasmid-DNA für TRPM2-eGFP und CD38-mKate2 transfiziert (Siehe 3.4.2). Nach 48 h wurden die Zellen entweder für 10 min mit 450 mosM oder (Kontrolle) 300 mosM DMEM osmotisch gestresst und wie beschrieben (3.3.2) lysiert. Im Anschluss wurde, mit Hilfe des IP50 Immunpräzipitations-Kit (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), die Immunpräzipitation nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 500 μ l Lysat entweder mit 3 μ g anti-GFP (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) oder mit 3 μ g antiCD38 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) versehen und über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 50 μ l mit PBS gewaschene ProteinG AgaroseBeads zugegeben und die Ansätze für weitere 3 h bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine nach Zugabe von Laemmli-Puffer durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

3.3.5 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach *Laemmli* (Gallagher, 2012) Zur Herstellung der 1,5 mm starken Gele wurde eine Gießstation des Herstellers verwendet. Zunächst wurde ein Trenngel der entsprechenden Konzentration gegossen und mit Propanol überschichtet. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Propanol vollständig entfernt und das Sammelgel gegossen. In das noch nicht polymerisierte Sammelgel wurde die Schablone für die Probenaschen gegeben. Die zu untersuchenden Proben wurden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese wurde in einer Mini ProteanIII-Zelle der Firma Biorad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt.

Die Proben wurden bei 80 V in das Sammelgel einlaufen gelassen und bei 140 V getrennt.

3.3.6 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blotting)

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Der Transfer erfolgte im sogenannten Wet-Blot-Verfahren. In die Halterungen der Trans-Blot-Zelle (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden nacheinander ein puffergetränkter Schwamm, ein Whatman-Papier (3mm), das Gel, die Nitrozellulosemembran, ein weiteres Whatman-Papier und abschließend noch ein Schwamm eingebaut. Hierbei war insbesondere darauf zu achten, dass der Zusammenbau im Puffer geschieht und dass zwischen den einzelnen Komponenten keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Das Blotting erfolgte entweder über Nacht bei 25 V oder für 2 h bei 100 V in der Blotkammer, die mit Transferpuffer gefüllt war.

3.3.7 Immunoblotting

Die spezifische Detektion von Proteinen nach dem Transfer auf die Nitrocellulose-Membran (3.3.6) erfolgte indirekt mittels eines spezifischen Erstantikörpers und eines Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpers. Die Nitrocellulosemembran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde in Licor Blockpuffer (LICOR Biosciences, Lincoln, Nebraska USA) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Erstantikörper. Die Membran wurde mit einer Erstantikörperlösung in einer lichtgeschützten Kammer unter leichtem Schütteln für 2 Stunde bei RT inkubiert. Nachdem die Membran 3-mal für 10 min mit PBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper unter denselben Bedingungen. Abschließend wurde die Membran wiederum 3-mal für 10 min mit PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in eine LI-COR Odyssey Infrarot Scanner überführt in dem der Blot gescannt und die spezifische Fluoreszenz der markierten Zweitantikörper detektiert. So war es möglich zwei unterschiedliche Zweitantikörper bei 680 nm und 800 nm simultan einzusetzen und zu detektieren.

3.3.8 Messung des Zell-pH-Wertes mittels BCECF

Zur Bestimmung des pH-Wertes von HeLa-Zellen im Verlauf einer Volumenantwort nach hypertonem Stress wurden die Zellen mit einer Dichte von $2 \cdot 10^4$ pro Vertiefung in 96-Loch Platten ausgesät. Alle Lösungen für die Messungen waren mit HEPES gepuffert und frei von HCO_3^- . Am Folgetag wurden die Zellen mit $10 \mu\text{m}$ des pH-sensitiven Farbstoff 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF-AM) (Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) in PBS für 30 min im Dunkeln bei RT beladen. Nach zwei Waschschritten mit PBS für je 30 min im Dunkeln erfolgte die Messung in einem SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) Photometer. Hierbei wurden nacheinander die Fluoreszenzen von BCECF bei 530 nm nach Anregung mit 440 nm (isosbestischer Punkt) und 485 nm aufgenommen. Das Prinzip der Messung beruht auf einer Änderung der Fluoreszenzintensität von BCECF in Abhängigkeit der H^+ -Konzentration. Dabei wurde die gesamte Platte alle 30 sec gemessen. Nach einer Vorperiode von 5 min wurden jeweils eine Reihe mit acht Vertiefungen, mit Lösungen höherer Osmolarität (360, 400, 450 und 526 mosM) versehen und neben der Kontrollreihe (300 mosM) und einer Leerwertreihe ohne Zellen für 35 min gemessen. Im Anschluss wurden die Lösungen aller Reihen wieder gegen solche mit 300 mosM getauscht und die Fluoreszenz für weitere 30 min aufgenommen. Darüber hinaus wurden die Messungen bei 25°C, 20°C und 15°C durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz bei 485 nm auf die bei 440 nm normiert. Bei 440 nm ist der isosbestische Punkt von BCECF, an dem sich die Fluoreszenz nicht in Abhängigkeit der H^+ -Konzentration ändert. Somit konnte über diesen Wert auf Unterschiede in der Zellzahl und Farbstoffbeladung normiert werden. Das erhaltene Verhältnis wurde gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Steigung der intrazellulären pH-Erhöhung wurde die Rate der pH-Änderung mit der Zeit über lineare Regression bestimmt. Anhand der Pufferkapazität von HeLa-Zellen von 6,9 mM/pH konnte die Änderung der Protonenkonzentration berechnet werden (Wu *et al*, 2000).

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von Okazaki-HeLa-Zellen

In Versuchen mit humanen Cervix-Karzinom-Zellen (HeLa) wurden eine Linie aus dem Labor von Prof. Yazu Okada in Okasaki, Japan verwendet, da diese in Bezug auf Volumenregulation schon teilweise charakterisiert waren. Die Zellen wurden in *minimal essential Eagle's* Medium (MEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 10 µg ml⁻¹ Streptomycin und 40 IU ml⁻¹ Penicilin bis 70-80% Konfluenz kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit Trypsin überschichtet, das überschüssige Trypsin abgesaugt und die Zellen nach 5 min Inkubation bei 37°C mit 5 ml Kulturmedium abgelöst. Die neu ausgepflanzten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂/ 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.4.2 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde bei HeLa, HEK293 und Cos7 Zellen mit FuGENE 6 (Roche/später Promega, Madison, WI, USA), bei HepG2 Zellen mit Lipofectamin 2000 (Invitrogene, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die empfohlenen Mengen von DNA und Transfektionsreagenz bei allen durchgeführten Transfektionen verwendet.

3.4.3 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Generierung einer stabilen Zelllinie wurden die Zellen zuerst wie in 3.4.2 beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurde zur Selektion der transfizierten Zellen das entsprechende Antibiotikum zugegebenen, für welches das transfizierte Plasmid den Zellen eine Resistenz vermittelt. Nach zwei Wochen Selektion wurden die verbliebenden Zellen mit Hilfe eines Zellsortierers (FACS Aria, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) erst nach Fluoreszenz-Intensität getrennt und einzeln in eine Vertiefung einer 96-Loch Platte gegeben. Die einzelnen Zellen wurden weiter mit Selektionsantibiotikum kultiviert und mikroskopisch auf die Expression und Lokalisation des exprimierten Proteins untersucht. Für die folgenden Versuche wurden Zelllinien mit moderater Expression und funktioneller Lokalisation des Proteins verwendet.

3.4.4 siRNA Transfektion mit Dharmafect I

Die zu transfizierenden Zellen wurden 12 h nach der Aussaat in 12-Lochplatten bei einer Konfluenz von 30-50% transfiziert. Dazu wurden Dharmafect I und die jeweilige siRNA in einer finalen Konzentration von 25 nM in Serum- und Antibiotikafreiem Medium eingesetzt. 12-15 h nach Transfektion wurden die Zellen mit frischem Medium versehen und bis zur Messung weitere 48 h inkubiert.

3.4.5 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

3.4.5.1 Klassische Kryokonservierung in Suspension

Zur dauerhaften Lagerung von Zellen bei -150°C oder auch zur Untersuchung des Einflusses von Kryo-Temperaturen auf Zellen bei $-50/ -80^{\circ}\text{C}$, wurden Zellen wie in 3.4.1 beschrieben trypsinisiert, pelletiert und in Vollmedium mit 10% DMSO als Kryoprotektivum aufgenommen. Je $500\ \mu\text{l}$ Medium wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen resuspendiert und in Cryo-Röhrchen (NUNC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) eingefroren. Um eine konstante Kühlrate von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ zu erreichen, wurden die Röhrchen in eine mit Isopropanol gefüllte Gefrierbox (Mr Frosty, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), welche auf 4°C vorgekühlt war, überführt und dann in einem Tiefkühlschrank gelagert. Für Versuche mit einer Endtemperatur von -50°C oder -80°C wurden die Zellen bei entsprechender Temperatur gelagert. Zur Lagerung wurden die Zellen nach dem Einfriervorgang über Nacht in eine -150°C Tiefkühltruhe überführt.

3.4.5.2 Kryokonservierung von adherenten Zellen

Im Rahmen des Kryoprojektes wurde ein Verfahren zum Frieren von adherenten Zellen etabliert. Die Zellen wurden dazu auf Collagen-beschichteten, 22 mm Deckgläsern ausgesät und 48 h anwachsen gelassen. Danach wurden die Deckgläser mit den Zellen in 4°C kaltes Kulturmedium mit 10% DMSO überführt und für ca. 30 sec inkubiert. Nach Überschichten mit $100\ \mu\text{l}$ 4°C kaltem Kulturmedium mit 10% DMSO wurden die Deckgläser auf den Stegen der Einsätze der „Mr. Frosty“ Gefriercontainer platziert und mit 1°C pro Minute bis zu -50°C oder -80°C gefroren. Nach einer Lagerung von 2, 10 oder 50 Tagen wurden die Deckgläser mit den Zellen zum Auftauen direkt in 4°C kaltes Kulturmedium überführt. Durch den Überschuss an Kulturmedium wurde gleichzeitig vorhandenes DMSO auf ein unkritisches Niveau

verdünnt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen z.B. zur Vitalitätsanalyse verwendet.

3.4.6 Zellvitalitätsbestimmung nach Kryo-Lagerung

Um den Erfolg einer adhärennten Kryokonservierung zu beurteilen, wurden die Zellen nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ mit einem ViCell XR Zellanalysator (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) auf Zellzahl und Vitalität untersucht. Neben der elektronischen Zellzählung konnte mit Hilfe von Trypanblau-Färbung die Vitalität bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen durch einen leichten Mediumstrom von den Deckgläsern gelöst und die Zellsuspension in Zählröhrchen überführt. Bis zur Analyse wurden alle Proben bei 37°C und 5% CO₂ gelagert

3.4.7 Echtzeit Zellwachstumsmessung mittels *Real-time Cell Analyzer (RTCA)*

Neben der Vitalitätsbestimmung wurden Echtzeit-Wachstumskurven von proliferierenden Zellen nach Kryo-Lagerung aufgezeichnet. Dazu wurden die Zellen wie in 3.4.1 und 3.4.5.2 beschrieben aufgetaut, abgelöst und jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen in jede Vertiefung einer RTCA-Platte überführt. Für jedes gefrorene Deckglas wurden jeweils drei Messungen auf einer RTCA-Platte durchgeführt. Das Zellwachstum wurde mittels Impedanzmessung in einem *real-time cell analyzer* (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) untersucht. Dazu wurden die Zellen für 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und alle 15 min die Impedanz des sich, durch die proliferierenden Zellen ausbildenden *Monolayers* gemessen.

3.4.8 Zellvolumenbestimmung von HeLa-Zellen bei osmotischem Stress

Die Zellen wurden mit einer Anzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 6-Loch Platten ausgesät und zwei Tage kultiviert. Zum Ablösen wurde PBS mit 2mM EDTA verwendet und jeweils ein Teil der Suspension mit einem Überschuss PBS inkubiert. Die Osmolarität von PBS wurde mit Manitol oder ddH₂O auf 220, 300, 360, 400, 450 und 526 mosM eingestellt. Nach exakt zweiminütiger Inkubation wurde die Zellsuspension im gleichen Verhältnis mit einer 0,4% igen Trypanblaulösung, der jeweils gleichen Osmolarität, gemischt und das Zellvolumen mittels *Countess Automated Cell Counter* als Doppelmesswerte gemessen. Alle verwendeten Lösungen, Materialien und das Messgerät wurden temperiert und die Messungen bei 37°C durchgeführt. Die erhalte-

nen Messergebnisse wurden im Abschluss durch die Countess Software ausgewertet. Dabei wurden Trypanblau-positive Zellen und Zellhaufen von der Messung ausgeschlossen.

3.5 Mikroskopie Methoden

3.5.1 Kryo-Bedingungen für Mikroskopie

Zum Kühlen, Frieren und Erwärmen von Proben vor oder während der Mikroskopie wurde ein Linkam MDS600 Probenkühler (Linkam Scientific Instruments, Surrey, UK) eingesetzt. Dieser wird eigentlich für aufrechte Mikroskopie verwendet, konnte aber durch die Entwicklung entsprechenden Einsätzen für die Mikroskoptische auch für inverse Mikroskopie eingesetzt werden. Der Einsatz dieses Probenkühlers erlaubte die präzise Temperierung der zu messenden Proben unter Verwendung von flüssigem Stickstoff als Kühlmittel und einer elektrischen Heizung zum Erwärmen.

3.5.2 Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie

Bei der Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) wird, im Gegensatz zu klassischen Förster-Resonanzenergietransfer Mikroskopie (FRET Mikroskopie), nicht die Anregung der Akzeptor-Fluoreszenz gemessen, sondern die Verkürzung der Lebenszeit des *Donor*-Fluorophors. Der Prozess basiert aber auf dem von Theodor Förster beschriebenen strahlungslosen Energietransfer (FRET) (Förster, 1948). Das Akzeptor-Fluorophor wird mit Hilfe von Laser-Licht entsprechender Wellenlänge bestrahlt und in den angeregten Zustand versetzt. Dabei absorbiert die chromophore Gruppe des Fluorophors das Licht und ein Elektron wird vom Grundzustand in den angeregten Zustand versetzt. Dieses Elektron relaxiert in den Grundzustand, wobei im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenz, nur ein *virtuelles* Photon entsteht, welches sofort vom Akzeptor-Fluorophor absorbiert wird. Infolge dessen wird ein Elektron des Akzeptor-Fluorophors in einen angeregten Zustand versetzt. Relaxiert auch das angeregte Elektron im Akzeptor-Fluorophor, wird ein Photon mit niedrigerer Energie emittiert. Hierbei ist entscheidend, dass die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe sind (1-10 nm), da die Effizienz der Energieübertragung mit der sechsten Potenz des Radius abfällt. Bei FLIM-Messungen wird nicht die Fluoreszenz des Akzeptor-Fluorophores gemessen, sondern die Verkürzung der Lebenszeit des *Donor*-Fluorophors auf Grund des Energietransfers zwischen *Donor* und Akzeptor.

Für die Mikroskopie wurden HEK293 Zellen mit einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 35 mm MatTek Schalen (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) ausgesät und 24 h später mit Plasmiden, die für TRPM2-eGFP und CD38-mKate2 kodieren, transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Mikroskopie zur Lebenszeitbestimmung der Proben durchgeführt. Dazu wurde ein Fluoview FV 1000 konfokales Mikroskop (Olympus Life Science Europe, Hamburg, Deutschland) verwendet, das mit einer PicoQuant Detektionseinheit und Software (PicoQuant, Berlin, Deutschland) zur Einzelphotonenmessung ausgestattet ist. Alle Aufnahmen wurden bei 37°C und 5% CO_2 mit einem 60x/1,2 W UplanSApo Objektiv erstellt. EGFP als *Donor*-Fluorophor wurde mittels einer 470 nm, gepulsten, PDL828 Sepia II Treiber-gesteuerten Laser-Diode (PicoTA; TOPTICA Photonics, Gräflingen, Deutschland) angeregt. Die auftretende Fluoreszenz wurde durch ein 500/40 nm Emissionsfilter vom Anregungslicht und Hintergrundfluoreszenz getrennt und detektiert. Dabei wurden einzelne Photonen mit Hilfe einer Einzel-Photonen Avalanche-Diode (*single-photon avalanche diode*, SPAD, Micro Photon Devices, Bolzano, Italien) zeitabhängig detektiert und mit Hilfe des Pico-Harp 300 TCSPC Modul (PicoQuant) aufgezeichnet. Die Aufnahme der FLIM-Bilder wurde mit Hilfe der SymPho Time Software (PicoQuant) gesteuert. Es wurden Bilder mit 512x512 Pixeln ($88 \mu\text{m} \times 88 \mu\text{m}$) bei einer Scangeschwindigkeit von $2 \mu\text{s}$ pro Pixel aufgenommen. Die erhaltenen .pt3 Dateien wurden im Anschluss mit Hilfe der pFLIM-Erweiterung (Walther *et al.*, 2011) für IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) analysiert. Dazu wurde ein Einzel-Pixel-basierte Maximum-Genauigkeits-Fit für die Fluoreszenzlebenszeit durchgeführt. Die erhaltenen Werte konnten als intensitätsgewichtete Bilder der durchschnittlichen Lebenszeit (*average* τ) oder als Anteil der energie-übertragenden Fluorophore angezeigt werden.

3.5.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

3.5.3.1 Ablauf der Messungen

Alle FCS Messungen wurden an HeLa-Zellen durchgeführt, die wie in 3.4.3 beschrieben, stabil mit eGFP transfiziert wurden. Für die Messungen wurden diese 48 h vor dem Experiment in einer Dichte von $2 \cdot 10^4$ in 4-Loch Glass-Boden Kammern (Lab-Tek, Nunc, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) ausgesät. Die Messungen wurden an einem Zeiss LSM 510 Meta Konfokal Mikroskop inklusive ConfoCor

3 Einheit (Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem C-Apochromat 40x/1,2 NA Corr M27 Wasser Objektiv ausgestattet war. Die GFP Fluoreszenz wurde mit Hilfe der 488 nm Linie des Argon Lasers angeregt. Dabei wurde die Laser-Energie auf 25% eingestellt und das eingesetzte Laser-Licht jeweils noch mal auf je 10% durch den AOTF und den Transmissionsfilter reduziert. Somit wurden 0,25% der Ausgangsleistung zur Messung verwendet. Die angeregte Fluoreszenz wurde durch einen 505-540 nm Bandpassfilter vom Laserlicht und Hintergrund abgetrennt und im konfokalen Modus bei einer Lochblendenweite (Pinhole) von 70 μm mit Hilfe einer Avalanche-Photodiode detektiert. Vor jeder Messung wurde die optimale Pinhole-Position sowie die Einstellung der Glasstärke am Objektiv mit einer Referenzprobe von Alexa 488 in Wasser eingestellt. Danach wurde diese Probe gemessen, um die Funktionalität des Mikroskops zu testen, außerdem wurde aus den Mittelwerten der gemessenen Diffusionszeiten aus vielen Messungen das konfokale Volumen nach der Formel

$$r_0 = \sqrt{\frac{\tau_D}{4D}} \quad (3.1)$$

berechnet, mit r_0 =Radius des konfokalen Volumens, τ_D = Mittlere Diffusionszeit im konfokalen Volumen und D =Diffusionskonstante der beobachteten Spezies. Unter Berücksichtigung der Diffusionskonstanten des Farbstoffes Alexa 488 von $543 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) bei 37°C konnte der Radius des konfokale Volumens auf 199 ± 4 nm bestimmt werden. Um eine gleichbleibend stabile Temperatur während der Messungen zu gewährleisten und im Weiteren die Möglichkeit zu haben die Zellen auf eine Temperatur bis zu 5°C zu kühlen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein System aus Peltier-Elementen mit Kontrolleinheit und einer Peristaltik Pumpe (Ismatec, DES Health & Science GmbH, Deutschland) entwickelt, das diese Anforderungen erfüllte. Damit war es möglich die Zellen während der gesamten Messung mit HEPES-gepuffertem (30 mM) DMEM ohne Phenolrot, pH7,4, mit einer Flussrate von 1 ml/min zu überströmen. Es wurden Messungen bei 35°C , 25°C , 15°C und 5°C durchgeführt. Neben der Temperierung konnte während der Messung die Lösung gewechselt werden, um die Zellen einer höheren Osmolarität auszusetzen. Hier wurden für die Messungen 360, 400, 450 und 526 mosM eingesetzt. Für eine Messung wurden vier zusammenliegende Zellen mit ähnlicher, mäßiger Expression von eGFP ausgewählt. Als Kriterium wurde eine Intensität von 100 bis 200 kHz für die detektieren Photonen gewählt. Diese vier Zellen wurden parallel

gemessen, und zwar alle 30 sec, wobei in jeder Zelle die GFP Fluktuation für 5 sec aufgenommen wurde. Die gesamte Messung bestand aus einer Vorperiode von 5 min bei 300 mosM (isoton), 40 min hypertone Stress (Osmolaritäten siehe oben) und einer isotonen Nachperiode von 20 min. Die erhaltenen Intensitätsfluktuationen wurden direkt mit Hilfe der Zeiss Software autokorreliert und gefittet.

3.5.3.2 Theorie zur Auswertung der FCS-Messungen

Ziel der FCS Messungen ist es die Intensitätsfluktuationen einer fluoreszenten Spezies in einem möglichst kleinen Volumen innerhalb der Zelle zu messen. Hierbei handelt es sich um statistisch auftretende Fluktuationen, die spontan auftreten und nicht durch einen externen Stimulus hervorgerufen werden. Um ein möglichst kleines Messvolumen zu erhalten, wurden Objektive mit einer hohen NA verwendet und zusätzlich auf konfokale Optiken zurückgegriffen (Elson & Magde, 1974; Krichevsky & Bonnet, 2002; Levin & Carson, 2004). Somit konnte ein konfokales Volumen von ca. 0,6 fl erreicht werden.

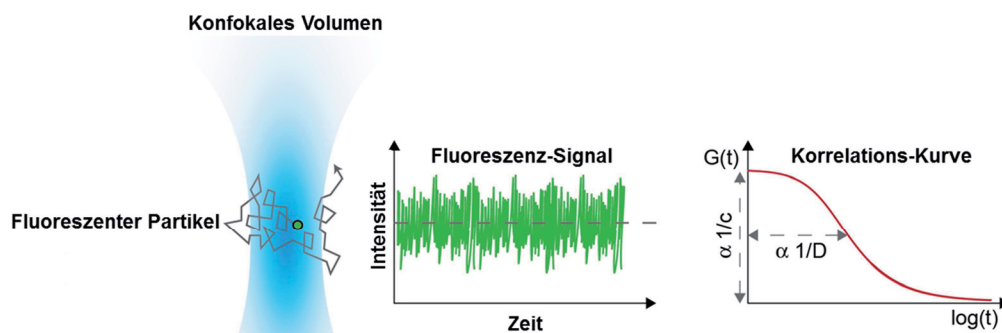


Abbildung 3.5-1: Prinzip der FCS Messung

Dargestellt ist das konfokale Volumen und die stochastische Bewegung eines fluoreszenten Partikels durch dieses hindurch. Diese Bewegung erzeugt das gezeigte Intensitätssignal mit den typischen Intensitätsfluktuationen mit der Zeit. Durch Autokorrelation erhält man, wie dargestellt, eine Autokorrelationskurve deren Höhe ($G(0)$) proportional zu $1/c$, die Konzentration fluoreszenter Partikel ist und deren Weite zum Wendepunkt der Kurve proportional zur $1/D$, der Diffusionszeit ist. Modifiziert nach einer Abbildung vom Bioquant am DKFZ. (<http://malone.bioquant.uni-heidelberg.de/methods/mobility/mobility.html#figure1>).

Die erhaltenen Intensitätsfluktuationen wurden unter Verwendung der folgenden Autokorrelationsfunktion quantifiziert:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.2)$$

Dabei wird berechnet, inwieweit das zeitabhängige Fluoreszenz-Signal $F(t)$ zu einem Zeitpunkt t mit dem Signal zum Zeitpunkt $t+\tau$ zusammenhängt. Diese Information wird über die Zeitpunkte gemittelt und ergibt die Autokorrelation $G(\tau)$. Die Intensität

der Fluktuationen im konfokalen Volumen ist proportional zur Anzahl der fluoreszenten Moleküle und die Amplitude der Autokorrelationsfunktion enthält die Information über die durchschnittliche Anzahl an fluoreszenten Molekülen im konfokalen Volumen. Es wird davon ausgegangen, dass die Verteilung der fluoreszenten Moleküle zu jedem Zeitpunkt einer Poisson-Verteilung gehorcht (Krichevsky & Bonnet, 2002) und sich daraus $\sigma^2 = \langle \delta N^2 \rangle = N$ ergibt. Die Kombinierung dieser Aussage mit Gleichung (3.2) ergibt

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F \rangle^2} = \frac{\langle \delta N(t)^2 \rangle}{N^2} = \frac{1}{N} \quad (3.3)$$

Es zeigt sich, dass die Autokorrelationsfunktion zum Zeitpunkt $t=0$ die Anzahl der fluoreszenten Moleküle im konfokalen Volumen ergibt. Darüber hinaus lassen sich weitere Information erst nach fitten der Autokorrelationsfunktion mit einem geeigneten Modell erhalten. Für die durchgeführten Versuche wurde eine freie, dreidimensionale Diffusion von GFP im konfokalen Volumen angenommen und die Autokorrelationsfunktion mit folgendem Modell gefittet (Krichevsky & Bonnet, 2002).

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \frac{1}{1+\tau/\tau_D} \sqrt{\frac{1}{1+\tau/(S^2\tau_D)}} \quad (3.4)$$

S steht hier für den Strukturellen Parameter und beschreibt das konfokale Volumen durch das Verhältnis $S = z_0/r_0$ wobei z_0 die Höhe und r_0 der Radius des konfokalen Volumens ist. Die Durchführung der Fit-Operation erfolgte mit Hilfe der Zeiss Software und es wurden automatisch gerätespezifische Parameter wie die Anregungs- und Detektions-Effizienz mit berücksichtigt. Der Fit der vorgegebenen Modell-Gleichung (3.4) erfolgte anhand nicht-linearer Kurvenanpassung mit der Methode der kleinsten Quadrate. Dabei wurden die Autokorrelationskurven ab $10 \mu s$ gefittet. Werte kleiner als $10 \mu s$ spiegeln hauptsächlich Blinken von Triplet-Zuständen wieder, die für die Berechnung der Diffusion störend wären. Die erhaltenen Daten wurden exportiert und im Weiteren für die Auswertung verwendet.

3.5.3.3 Auswertung der FCS-Daten zur Messung der Volumenregulation

Die erhaltenen 140 Werte für Diffusionszeit und Partikelanzahl aus einer typischen Messung nach osmotischem Stress (wie in 3.5.3.1 beschrieben) wurden zur Auswertung der Regulation der Zelle weiter prozessiert. Die Werte für die Partikelzahl wurden als erstes um mögliches Bleichen korrigiert. Dazu wurden die Werte vor und nach hypertone Stress mittels linearer Regression gefittet und die daraus resultierende, negative Steigung zur Korrektur der Werte benutzt. Darüber hinaus ergab sich aus dem Fit der annähernd exakte Wert für die anfängliche Konzentration an fluoreszenten Partikeln, die im Anschluss genutzt wurde, um die Messung zu normalisieren. Das war notwendig, um Messungen untereinander vergleichen zu können, da jede Zelle unterschiedliche Mengen GFP exprimiert und somit auch eine unterschiedliche Anzahl von fluoreszenten Molekülen im konfokalen Volumen gemessen wurde. So korrigiert und normalisiert, wurde der Verlauf der Partikelkonzentration als Invers der Volumenänderung der Zelle angesehen und ausgewertet. Es ist wichtig zu erwähnen, dass es sich nur um relative Änderungen handelt und nicht das absolute Zellvolumen bestimmt werden konnte. Die erhaltenen Diffusionszeiten von GFP im konfokalen Volumen wurden in einem ersten Schritt, unter Verwendung von Gleichung 3.1 und dem gemessenen konfokalen Volumen von 199 nm in Diffusionskonstanten umgerechnet. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung für freie Diffusion in Flüssigkeiten

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0} \quad (3.5)$$

bei der k_B die Boltzmann Konstante, T die absolute Temperatur, R_0 der hydrodynamische Radius und η die dynamische Viskosität ist, wurde die Viskosität des Zytoplasmas berechnet. Der hydrodynamische Radius von GFP wurde dabei durch Messungen der Diffusion von GFP in Lösungen bekannter Viskosität (siehe bestimmt und betrug $2,23 \pm 0,09$ nm. Dies war in Einklang mit der Literatur, so berichten Hink und Kollegen z.B. einen hydrodynamischen Radius von $2,3 \pm 0,05$ nm (Hink *et al*, 2000). Somit konnte für jede Messung ein Zeitverlauf der relativen Änderung des Zellvolumens und der Viskosität der Zelle angefertigt werden. So wurden für das Schrumpfen und Schwellen der Zellen, nach Änderung der Osmolarität, die Raten der Änderung von Partikelzahl und Viskosität durch lineare Regression erhalten. Darüber hinaus wurden die Änderungen in Partikelkonzentration und Viskosität im Ver-

lauf der aktiven Volumenzunahme der Zelle unter hypertone Stress mit Hilfe eines exponentiellen Abfalls gefittet. Die erhaltenen τ -Werte, die Zeitkonstante dieses Prozesses, wurde abschließend noch auf die Amplitude des Schrumpfens normiert und konnte so zwischen mehreren Messungen verglichen und gemittelt werden.

3.5.4 Total-Interne Reflektions-Mikroskopie (TIRF) von Aquaporin 1 (AQP1)

TIRF-Mikroskopie wurde an einem inversen Olympus IX81 Mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) mit einer TIRF-Einheit zur Einkopplung der Laser und zum Einstellen des entsprechenden Winkels zur Totalreflektion und einem 60x/1.49 NA TIRF Öl-Objektives durchgeführt. Zur Messung wurden HeLa- und HepG2-Zellen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ in MatTek Schalen ausgesät und am Folgetag mit tkRAS-GFP und AQP1-mKate2 kodierenden Konstrukten im Verhältnis 1:3 transfiziert (vergleiche 3.4.2). Die mikroskopische Analyse erfolgte 48 h nach Transfektion. Dafür wurden die Zellen mit HEPES-gepuffertem DMEM ohne Phenolrot versehen und bei 37°C gehalten. Über einen Zeitraum von 40 Minuten wurden Bilder von Zellen aufgenommen, die beide Konstrukte exprimierten. Dabei diente das tkRAS-Konstrukt zur Markierung der Membran, um eventuell auftretende Änderungen aufgrund der Membrangeometrie oder durch hypertonen Stress auszuschließen. Die Intensität der AQP1-Fluoreszenz in der Membran wurde zuerst bei isotonen Bedingungen gemessen und nach Erhöhung der Osmolarität auf 450 mosM für weiter 40 min verfolgt. Zum Abschluss wurde die Osmolarität wieder auf 300 mosM geändert und die Fluoreszenz für zusätzliche 20 min aufgenommen. Die erhaltenen Bilder für die Fluoreszenz der AQP1-Konstrukte wurden bei der Auswertung mit dem korrespondierenden tkRAS-GFP Bild normalisiert und das Verhältnis der beiden Bilder wurde wiederum auf den Ausgangswert bezogen und für die einzelnen Zeitpunkte aufgetragen.

3.5.5 Raman-Mikrospektroskopie

Im Rahmen der Kooperation in dem gemeinsamen Kryo-Projekt zwischen dem Fraunhofer Institut in St. Ingbert und der Abteilung für systemische Zellbiologie am Max-Planck-Institut Dortmund, war es möglich, am Fraunhofer-Institut, Raman-Mikrospektroskopie an einem Eigenaufbau durchzuführen. Diese bestand aus einem Nikon-Stativ, einem Zeiss 60x/1,3 NA Oil Objektiv (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) einem 532 nm Nd:YAG Laser (Compass 315M; Coherent, Dieburg, Deutschland) ei-

nem Gittermonochromator mit 600 Linien und einer Andor CCD Kamera (Andor, Belfast, UK) zur Detektion der Raman-Spektren. Die Bildaufnahme wurde durch eine selbst-programmierte LabView Software gesteuert. Die Bilder wurden einer Größe von 32x32 Pixeln, mit einer Pixelgröße von $0,5 \mu\text{m}^2$, und einer Integrationszeit von 200 ms aufgenommen. Für jedes Pixel wurde ein vollständiges Spektrum von 520 bis 850 nm aufgenommen. Diese Information konnte anschließend durch die Auswahl bestimmter Peak-Höhen oder Flächen wieder als zwei-dimensionales Bild mit der Intensitätsinformation bestimmter Peaks dargestellt werden.

3.5.6 Kryo-Superresolution-Mikroskopie

Die im Rahmen des Kryo-Projektes gesammelten Erfahrungen zum Frieren von adhärenen Zellen sollte im Folgenden genutzt werden, um Zellen für die Mikroskopie zu fixieren. Im Gegensatz zur klassischen, chemischen Fixierung ergab die Fixierung über Kühlen die Möglichkeit, die Zellen im Anschluss wieder zu erwärmen und ins Leben zurück zu bringen. In Zusammenarbeit mit Dr. Martin Masip (Abteilung systemische Zellbiologie, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund), der insbesondere das Mikroskop konstruierte und die Software zur Kontrolle des selbigen schrieb, wurde ein System realisiert, dass es erlaubte Zellen durch Kühlen zu arretieren und im Anschluss zu mikroskopieren. Im Nachfolgenden sind die einzelnen Aspekte dieses Prozesses besprochen.

Der eigentliche Mikroskopaufbau bestand aus eine inversen Olympus IX81 Mikroskop (Olympus Life Science Europe, Hamburg, Deutschland) mit einem 100x / 1,49NA Objektiv (Olympus) ausgestattet war. Zur Anregung der Fluoreszenz dienten drei Freistrahl-eingekoppelte Festkörper-Laser mit Wellenlängen von 405, 488 und 561 nm. Auf Seiten der Detektion wurden je nach Wellenlänge ein Bright-Line 525/50 Bandpass-Filter von Semrock (IDEX Corporation, Illinois, USA) für Anregungen bei 488 nm oder ein ET 605/52 Bandpass-Filter von Chroma (Chroma Technology Corporation, Vermont, USA) für die Detektion der Fluoreszenz nach Anregung bei 561 nm verwendet. In beiden Fällen wurde ein 50 / 50 Strahlteiler für die Trennung von Anregungslicht und Fluoreszenz benutzt. Zur Detektion wurde eine EM-CCD Kamera (ImageM C9100-13, Hamamatsu, Japan) verwendet. Die Steuerung der Instrumente und die Bildaufnahme erfolgten durch eine selbst programmierte Software.

Zur Arretierung der Zellen bei tiefen Temperaturen wurde eine Linkam Kryo-*Stage* adaptiert, so dass nur noch der innere Kühlblock mit den Anschlüssen für Flüssigstickstoff und der elektrischen Heizung genutzt wurde. Darüber hinaus wurden Channel-Slides (Ibidi, Martinsried, Deutschland) verwendet, in denen die Zellen in einem Kanal kultiviert wurden, was einen Austausch von Medium ermöglichte. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe (NeMESYS, Cetoni GmbH, Korbußen, Deutschland) konnte während des Frierens Medium ausgetauscht werden.

Die *Superresolution*-Mikroskopie ist eine Technik um aus einem lichtmikroskopischen Bild Information unterhalb der Auflösungsgrenze zu bekommen. Dazu werden einzelne fluoreszenten Moleküle angeregt und detektiert. Das detektierte Intensitätsprofil des Moleküls wird durch den Fit einer Gaussfunktion, unter Verwendung der Methode des kleinsten Quadrates in seiner Position weiter bestimmt. Mit folgender Gleichung

$$I(x, y) = B + I_0 e^{-2[(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2]/r_0^2} \quad (3.6)$$

in der B die Hintergrundfluoreszenz, I_0 der Pixelwert, x_0 und y_0 die Pixelkoordinaten des Mittelpunktes des fluoreszenten Moleküls und r_0 der $1/e^2$ Radius der Punktspreizfunktion (PSF) ist, wurde der Mittelpunkt des fluoreszenten Moleküls berechnet (nach Hess *et al*, 2006). So wurden Auflösungen im Bereich von ca. 20 nm erreicht.

Für diese Art der Mikroskopie sind fluoreszente Moleküle notwendig, die schaltbar sind. Das bedeutet, dass die Möglichkeit bestehen muss, die Menge an fluoreszenten Molekülen so zu kontrollieren, dass immer nur einige tatsächlich fluoreszieren, damit jedes einzelne Molekül lokalisiert werden kann. So kommt es zu keiner Überlappung der PSF der Moleküle und keine Moleküle werden mehrfach detektiert werden. In dieser Arbeit wurde dazu das genetisch-kodierte Fluoreszenz-Molekül mEOS2 verwendet (McKinney *et al*, 2009). Dieses kann durch kurzwelliges Laserlicht, das eine Elektronenumlagerung herbeiführt (405 nm), von seiner grünen Form (Absorption 506 nm / Emission 519 nm) in eine rote Form (Absorption 573 nm / Emission 584 nm) umgewandelt werden. Für die Mikroskopie wurde ein geringer Anteil der Fluorophore in die rote Form konvertiert und beim anschließenden Belichten auch gleichzeitig gebleicht, so dass diese nachfolgend nicht wieder aktiviert werden können.

Für die Mikroskopie wurden HeLa-Zellen verwendet, die in einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen in Schalen ausgesät wurden und am nächsten Tag mit einem EGFR-mEOS2 Konstrukt transfiziert wurden. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS-EDTA abgelöst und in die Ibidi *Channel-Slides* ausgesät. Nach weiteren 24 h wurden den Zellen über Nacht das Serum im Medium entzogen und diese dann am nächsten Tag für die Mikroskopie verwendet.

3.5.7 FLIM nach Schock-Gefrieren

Innerhalb des Kryo-Projektes wurde von den Kooperationspartnern in St. Ingbert ein Gerät entwickelt, um Zellen unter mikroskopischer Beobachtung, innerhalb von Millisekunden auf -190°C zu gefrieren. Um die Effekte des Schock-Gefrierens auf Zellen und Proteininteraktion zu testen und somit auch die Möglichkeit des Schock-Gefrierens als Fixierung für die Mikroskopie zu validieren, wurden FLIM-Messungen an tiefgefrorenen Zellen durchgeführt. Dazu wurden Cos-7-Zellen auf 5 mm Deckgläsern ausgesät und mit dem bekannten FRET-Paar, bestehend aus *epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR)-mCitrine und der Protein-Tyrosin-Bindedomäne (PTB) des Proteins SHC (PTB-mCherry) transfiziert (Offterdinger *et al*, 2004). Als Kontrolle dienten Zellen, die lediglich mit EGFR-mCitrine transfiziert wurden. Nach Expression der Proteine über 24 h wurden die Zellen für die Gefrier-Experimente genutzt. Ein Deckglas mit Zellen wurde mit der Zellseite auf dem Diamanten des Schock-Kühlers angebracht und die Zellen gefroren. Um eine Interaktion zwischen dem EGF-Rezeptor und der PTB zu induzieren, wurden die Zellen vor dem Frieren für 5 min mit 100 ng / ml EGF stimuliert.

Um die sehr hohen Kühlraten von bis zu $6000\text{ C}^\circ/\text{sec}$ zu erreichen, wurde Stickstoffgas unter hohem Druck (100 bar) komprimiert und durch die Kühlung der Schläuche, in denen sich das Gas befand, mit flüssigem Stickstoff auf ca. -196°C gekühlt. Dieses Gas wurde schlagartig durch ein Reduzierventil auf die Probe entspannt. Bedingt durch den Joule-Thomson-Effekt wurde durch die starke Expansion des komprimierten, tiefkalten Gases eine noch höhere Kühlleistung erzielt. Um die eigentlich Probe zu schützen, wurde ein Diamantfenster als Wärmetauscher eingesetzt, auf dem sich auf einer Seite die Probe befand und von der anderen Seite gekühlt wurde. Durch die sehr hohe Wärmeleitfähigkeit und die hohe Stabilität eignete sich Diamant für diese Anforderung besonders. Die so gefrorenen Proben wurden durch konstanten Fluss von tiefkaltem Stickstoff-Gas unter normalem Druck weiter gekühlt und die Proben

konnten mikroskopiert werden. Zur Detektion der Protein-Interaktion wurde ein FRET-Ansatz gewählt. Mit Hilfe des LIFA-Systems (Lambert Instruments, Roden, Niederlande) konnten FLIM-Bilder auf Basis der Modulation des Anregungslaserlichts aufgenommen werden. Hierbei wird das Anregungslicht der Laser in Form einer Sinusfunktion moduliert und die resultierende Fluoreszenz der Probe jeweils in Bezug auf die Modulation des Lasers detektiert. Nach Auswertung der Phasenverschiebungen der emittierten Fluoreszenz in Bezug auf die Anregung und möglicher Demodulation kann die Lebenszeit des Fluorophors bestimmt werden.

3.6 Patch-Clamp

Zur Bestimmung der Membranströme von HeLa-Zellen wurde die Zellen in Suspension, mittels der *Whole-cell* Konfiguration in *Patch-Clamp* Experimenten gemessen. Dabei wurden HeLa-Zellen durch leichten Mediumstrom von ihrem Substrat abgelöst und in die Messkammer überführt. Die Messung erfolgte über Patch-Pipetten, die mit Hilfe eines programmierbaren Pipettenpullers (DMZ-Universal Puller, Zeitz Instrumente, München) aus 1,5 mm OD und 1,17 mm ID Borsilikat-Glas Kapillaren gezogen wurden. Zur Messung wurden 2-4 M Ω Pipetten verwendet, die durch einen motorisierten Mikromanipulators (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) auf die Zellen positioniert wurden. Unter Zuhilfenahme einer Spritze wurde ein leichter Unterdruck aufgebaut, der erst zum Ansaugen der Zelle und zur *Giga-Seal* Bildung führte und im Weiteren genutzt wurde, um die Zellmembran zu öffnen und die *Whole-Cell* Konfiguration zu erreichen. Eine Silber-Silberchlorid Elektrode im Bad diente als Referenz. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Axopatch 200B Verstärkers aufgezeichnet und durch die pClamp Software gesteuert (beides Molecular Devices, Union City, CA, USA). Mit Hilfe der pClamp Software wurden außerdem die *liquid junction* Potentiale berechnet. Diese Potentiale entstehen durch die unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit der verwendeten Ionen in Bad- und Pipettenlösung. Aufgrund der sehr großen, organischen Anionen in der Pipette resultiert das Potential in einem negativen Wert. Da das Potential von der Diffusionsgeschwindigkeit der Ionen und somit auch von der Temperatur abhängig ist, wurde für jede Messtemperatur eine Berechnung und Korrektur durchgeführt. Die erhaltenen Werte waren:

Tabelle 3.6-1: liquid junction Potential bei verschiedenen Temperaturen.

Temperature	<i>liquid junction</i> Potential
35°C	8,6
25°C	8,4
15°C	8,1
5°C	7,8

Auftretende Serienwiderstände wurden kompensiert und bei Messungen wurden Rampen von -80 mV bis +20 mV generiert, während zwischen den Rampen ein Haltepotential von -30 mV herrschte. Die genannten Rampen dauerten 1 sec und wurde alle 10 sec wiederholt. Gleichzeitig wurde der resultierende Ströme über die Membran der Zelle in Abhängigkeit der Spannung gemessen und aufgezeichnet. Die erhaltenen Ströme wurden bei 1kHz gefiltert und mittels eines AD Konverters (Digi-Data 1200B, Molecular Devices) mit 5kHz digitalisiert. Die Pipettenlösung wurde auf 300 mosM und pH 7,3 eingestellt und enthielt: NaCl 25 mM, Na-HCO₃⁻ 4,74 mM, Na-Gluconat 65,3 mM, MgCl₂ 1 mM, TAE-Cl 2 mM, Na₂-ATP 2 mM, Na₂-GTP 0,5 mM und EGTA 1 mM. Die verwendete Badlösung wurde auf einen pH von 7,5 eingestellt und enthielt: NaCl 85 mM, NaHCO₃⁻ 15 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM und TAE-Cl 2 mM. Mit diesen Ionenkonzentrationen ergab sich nach Nernst

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i} \quad (3.6)$$

mit E = Umkehrpotential [V], R = Gaskonstante, Z = Ladung des entsprechenden Ions, F = Faraday-Konstante und C_o und C_i die innere und äußere Ionenkonzentration, ein Chlorid-Gleichgewichtspotential von -30 mV. Das ergab die Möglichkeit die Natrium-Ströme von Chlorid-Strömen zu trennen und nur Erstere auszuwerten. Unter Verwendung des Ohm'schen Gesetzes wurden so die Natrium-Ströme über die Membran der Zelle berechnet. Die erhaltenen Ströme wurden auf die Kapazität der Zellen, als Maß der Membranoberfläche, normiert. So wurde die Stromdichte erhalten.

Bei allen verwendeten Lösungen wurde die Osmolarität mit Mannitol eingestellt und mittels Osmometer (OM802, Vogel, Gießen, Deutschland) überprüft. Isotone Lösung wurde auf 320 mosM die hypertonen Lösungen auf 360, 400, 450 und 526 mosM

eingestellt. Die Lösungen wurden mit Hilfe eines Thermostaten (Intelligent Chiller, Huber, Offenburg, Deutschland) und einer temperierbaren Badkammer (Bath-controller V, Luigs und Neumann) temperiert. Es wurde bei 35, 25, 15 und 5°C gemessen. Die Pufferung des korrekten pH-Wertes bei den jeweiligen Temperaturen wurde durch die Verwendung der entsprechenden O₂/CO₂-Gaszusammensetzung gewährleistet. Dazu wurden die Temperaturen vor und während der Messung eingestellt und die Lösungen mit der entsprechenden O₂/CO₂-Konzentration begast.

3.7 Arrhenius Plots und Berechnung der Aktivierungsenergie (E_a)

Im Laufe der Charakterisierung der Volumenregulation wurden viele Prozesse in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen, um im Folgenden anhand graphischer Darstellung und Fitten der Werte die Aktivierungsenergie der Prozesse zu ermitteln. Dies erfolgte auf der Basis der von Svante Arrhenius beschriebenen Abhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeiten von der Temperatur,

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (3.7)$$

wobei k die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, A ein präexponentieller Faktor, E_a die Aktivierungsenergie [$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$] R die universelle Gaskonstante und T die absolute Temperatur ist. Wird der natürliche Logarithmus der Messgröße gegen die inverse Temperatur aufgetragen, ergibt sich aus der Steigung der Geraden $-E_a/R$ nach Multiplikation mit dem Wert der Gaskonstante die Aktivierungsenergie in [$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$]. Da diese meistens in [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$] angegeben wird wurden die Werte der Messungen gegen $1000/T$ aufgetragen, sodass die Multiplikation der Steigung mit dem Wert der Gaskonstante die Aktivierungsenergie in [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$] ergab.

3.8 Statistische Analysen

Für Messwerte wurde jeweils der Mittelwert über n Experimente angegeben. Soweit nicht anders beschrieben wurde der Fehler als Standard-Fehler des Mittelwertes angegeben. Statistische Signifikanzen wurden bei einzelnen Vergleichen mit dem Student t-Test berechnet, bei multiplen Vergleichen wurde ANOVA verwendet. Signifikanzen mit Werten $\leq 0,05$ wurden wie folgt gekennzeichnet: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Wasserhaushalt von Zellen beim Kühlen und Frieren

Klassischer Weise wird die Änderung des Volumens von Zellen und das Verhältnis von osmotisch inaktiven und aktiven Zellvolumen mittels Boyle-van't-Hoff-Plots dargestellt. Dabei werden Zellen verschiedenen osmotischen Bedingungen ausgesetzt und die Änderung ihres Zellvolumens gemessen. Wird diese Änderung in Prozent zur Kontrolle gegen die reziproke Osmolarität aufgetragen, ergibt dies einen Boyle-van't-Hoff-Plot. Diese Art von Plots sind für HeLa-Zellen vorhanden, allerdings sollte die Frage geklärt werden, inwieweit sich tiefe Temperaturen auf das Volumen der Zellen auswirken.

Mittels FCS Messungen aus 4.2.1 konnte die relative Änderung des Zellvolumens nach osmotischem Stress (Schrumpfen) bei verschiedenen Temperaturen ermittelt werden. Um einen Bezug zum absoluten Zellvolumen zu erhalten, wurde als erstes ein Boyle-van't-Hoff-Plot von HeLa-Zellen bei 35°C aufgenommen (Siehe Abbildung 7.1-10) So konnten die Messpunkte der FCS Messung bei 35°C mit denen der Zellvolumenmessung überlagert werden und die gemessenen, rein relativen Änderungen des Zellvolumens aus den FCS Messungen in einem Plot dargestellt werden.

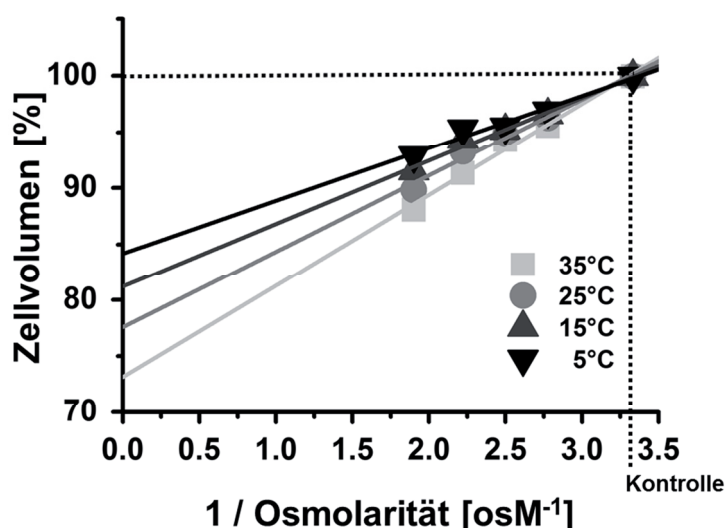


Abbildung 4.1-1: Boyle-van't-Hoff-Plot von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Dargestellt ist die Änderung des HeLa-Zellvolumens mit zunehmendem osmotischem Stress. Diese Messungen wurden bei 35, 25, 15 und 5°C durchgeführt. Der Schnittpunkt der jeweiligen linearen Regressionen mit der y-Achse ergibt das osmotisch aktive (oberhalb) bzw. inaktive (unterhalb) Volumen der Zellen bei der jeweiligen Temperatur.

Die Auswertung der Messungen ergab, dass Zellen durch Kühlen von 35°C auf 5°C einen erheblichen Teil ihres osmotisch aktiven Volumens verlieren. Während dieses bei 35°C noch 27% des Zellvolumens ausmachte, schrumpfte das osmotisch aktive Volumen bei 5°C auf 16% des Gesamtvolumens. Dies entspricht einer Verringerung des osmotisch aktiven Volumens um 40%. Unter Zuhilfenahme der Raman-Mikrospektroskopie sollte analysiert werden, ob das verminderte osmotisch aktive Volumen durch einen Verlust von Wasser hervorgerufen wird, oder aber durch eine Änderung der Zellgeometrie aufgrund des Kühlens bedingt ist. Dazu wurden Ramanspektren von HeLa-Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen und der Wassergehalt der Zellen anhand der Intensität der OH-Schwingung (642 nm) des Wassers ermittelt. Die Spektren wurden über eine Fläche von 64 x 64 Pixeln, bei einer Auflösung von 0,5 μm^2 aufgenommen und wurden wiederum in ein Intensitätsbild umgewandelt. Nachfolgend ist beispielhaft ein Bild der Intensität des Wasserpeaks in HeLa-Zellen dargestellt.

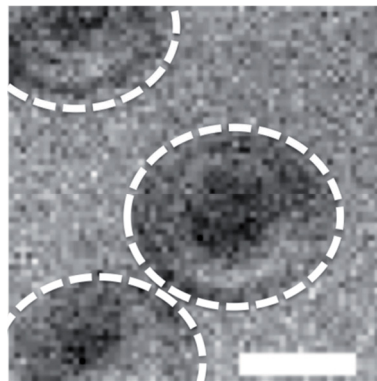


Abbildung 4.1-2: Wasserverteilung in HeLa-Zellen gemessen mit Raman-Mikrospektroskopie.

Darstellung von HeLa-Zellen bei 35°C anhand der Intensität des Wasserpeaks. Zellemembran und Zellkern der Zellen sind als dunklere Bereiche zu erkennen. Die weißen Markierungen stellen die Flächen der späteren Auswertung dar. Die Größenmarkierung entspricht 10 μm .

In Abbildung 4.1-2 sind deutlich die Zellen mit ihrer Membran zu erkennen. Die gestrichelten, weißen Linien deuten die Flächen an die nachfolgend für die Ermittlung der Intensität des Wassersignals ausgewertet wurden. Diese ermittelten Intensitäten wurden auf die Intensitäten der Messung bei 35°C normiert und als prozentuale Änderung dargestellt.

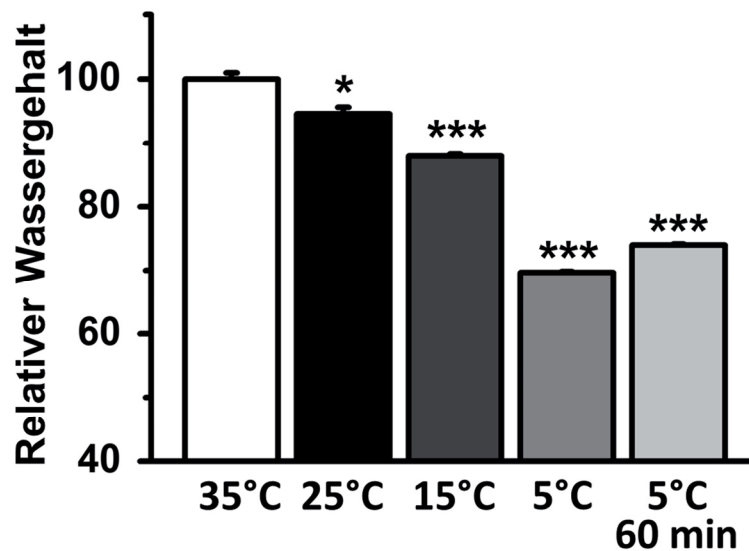


Abbildung 4.1-3: Relativer Wassergehalt in HeLa-Zellen beim Kühlen gemessen mit Raman-Mikrospektroskopie.

Dargestellt ist der Wasserverlust von HeLa-Zellen ausgelöst durch Kühlen. Schon bei 25°C ist der Wassergehalt signifikant kleiner als bei 35°C und fällt bei 5°C auf einen Wert 30% unterhalb der Kontrolle. Signifikanzen beziehen sich auf den 35°C Wert. Dargestellt sind Mittelwerte aus fünf Messungen \pm SEM.

Die Raman-Messungen zeigten, dass die Volumenänderung der Zellen tatsächlich einem Verlust an Wasser zugrunde liegen. Die Änderung des osmotisch aktiven Volumens wurde im Boyle-van't-Hoff-Plot zwischen 35°C und 5°C auf 40% berechnet. In den gezeigten Raman-Messungen wurde jedoch lediglich eine Reduktion des Zellwassers um 30% gemessen. Dies könnte die Differenz zwischen freiem Wasser und Hydratations-Wasser darstellen. Freies Wasser wurde durch die Bestimmung der Boyle-van't-Hoff-Plot in HeLa-Zellen bestimmt, während die Raman-Messungen auch das freie Wasser darstellen konnten.

Die durchgeführten Messungen zeigen, dass Kühlen und Frieren von HeLa-Zellen zu einem deutlichen Wasserverlust führt. Es stellte sich die Frage, inwieweit dieser Wasserverlust einen protektiven Effekt für die Zellen beim Frieren hat. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob und in welchem Maße die De- und Re-Hydrierung der Zellen von den Mechanismen der Volumenregulation abhing. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Volumenregulation in HeLa-Zellen charakterisiert (4.2) um sie danach mit der Situation nach dem Frieren der Zellen zu vergleichen (4.3).

4.2 Volumenregulation in HeLa-Zellen

Im Rahmen des Kryo-Projektes, einer Kooperation zwischen dem Fraunhofer Institut für Biomedizintechnik (IBMT) in St. Ingbert und der Abteilung für systemische Zellbiologie am Max-Planck-Institut in Dortmund, in dessen Verlauf diese Arbeit

entstanden ist, sollte die Frage beantwortet werden, ob Kryo-Präservation, also das Frieren und Lagern von Zellen, über die bis dato bekannten Methoden und Verfahren verbessert werden konnte. Ein Ansatz, der im Folgenden präsentiert wird, war die Volumenregulation von HeLa-Zellen im Detail zu charakterisieren und diese Daten zu verwenden um Veränderung der Zellen nach dem Frieren zu untersuchen. Dabei wurden insbesondere Aktivierungsenergien (E_a) von diversen Prozessen der Volumenregulation vor und nach Kryobedingungen verglichen.

4.2.1 Osmolaritäts- und Temperaturabhängigkeit der Volumenregulation

Volumenregulation von Zellen kann auf verschiedene Weise gemessen werden. So werden häufig Zellzähler verwendet, die das Volumen der Zellen mit optischen oder elektronischen Methoden messen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) verwendet, um die Volumenänderungen der Zellen im Verlauf von hypertone Stress zu messen. So konnte simultan die Veränderung der Viskosität der Zelle gemessen und über die Konzentrationsänderung des exprimierten eGFP die Volumenänderungen der Zelle beobachtet werden. Nachfolgend sind beispielhaft eine Auto-Korrelationskurve und die daraus entstandenen Messungen bei 37°C und mit 450 mosM Lösung als hypertone Stress dargestellt.

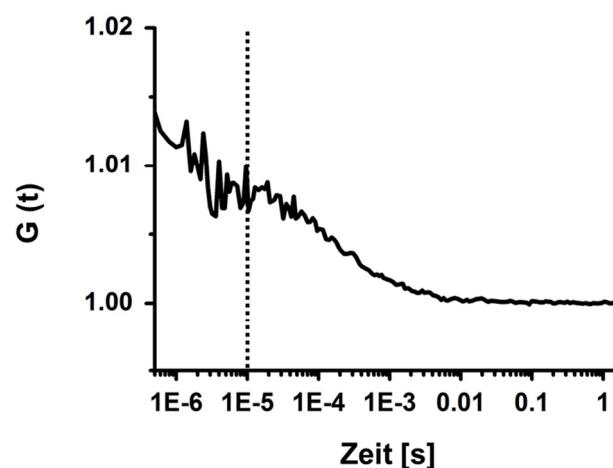


Abbildung 4.2-1: Typische Auto-Korrelationskurve für die Messung von eGFP in HeLa-Zellen.

Darstellung einer typischen Auto-Korrelationskurve für die freie Diffusion von eGFP in HeLa-Zellen. Dargestellt ist eine Messung bei 35°C und isotonen Bedingungen. Die gestrichelte Linie entspricht $10 \mu\text{s}$, ab diesem Zeitpunkt wurden die Kurven gefittet.

Für jeden einzelnen Messpunkt einer Messreihe von 140 Zeitpunkten mit je einem Messpunkt alle 30 Sekunden wurde eine Auto-Korrelationskurve berechnet, wie beispielhaft in Abbildung 4.2-1 gezeigt. Die Auswertung dieser Kurven führte zur Ermittlung der Werte für den Volumenverlauf und die Viskosität der Zellen.

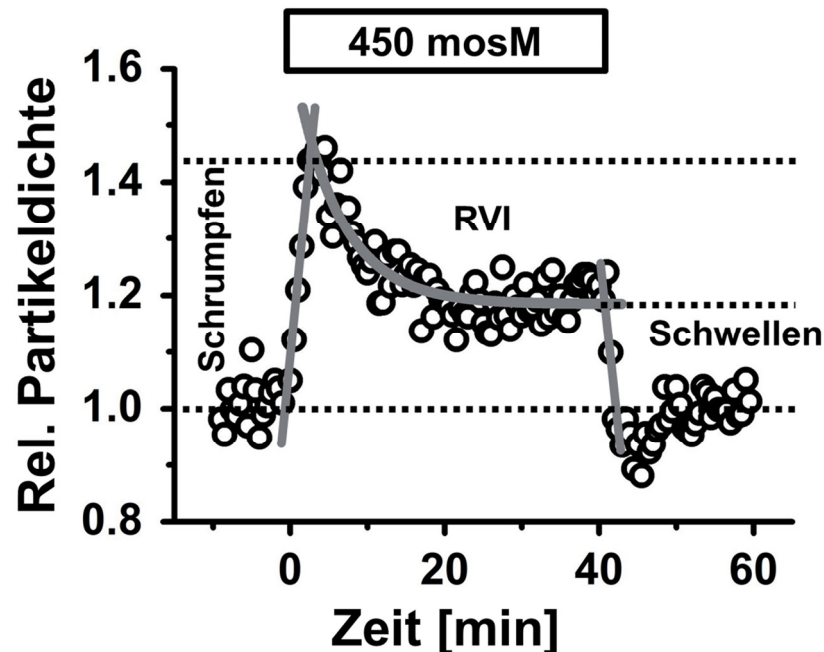


Abbildung 4.2-2: FCS-Messung der Volumenänderung einer Zelle bei 35°C.

Verlauf der Partikeldichte einer Messung. Das Schrumpfen der Zelle induziert, aufgrund der Volumenreduktion der Zelle, eine Erhöhung von eGFP auf das 1,45-fache des Ausgangswertes. Im Verlauf des sich ausbildenden RVI gewinnt die Zelle Volumen zurück, wodurch die Partikeldichte wieder auf das 1,2-fache des Ausgangswertes sinkt. Beim Wechsel zurück zu isotoner Lösung schwillt die Zelle erst leicht über ihr Ausgangsvolumen welches sich dann wieder bei 1 einpendelt. Die Zeitauflösung entsprach 30 sec zwischen jedem Punkt. In Grau sind die Verläufe der einzelnen Fits eingezeichnet, mit denen die Messung weiter ausgewertet wurde.

Abbildung 4.2-2 zeigt den typischen Verlauf einer Messung der Volumenänderungen in HeLa-Zellen während hypertone Stress. Um einzelne Messungen untereinander zu vergleichen, wurde die Anzahl der eGFP-Moleküle auf den Anfangswert normiert. So lassen sich auch die Änderungen während der Messung im Vergleich zum Ausgangswert leichter erkennen. Nach dem Wechsel zu hypertoner Lösung, im gezeigten Fall 450 mosM, erfolgte das Schrumpfen innerhalb von 2-2,5 min. Der einsetzende aktive Prozess der Volumenregulation (RVI) wurde über 40 min beobachtet. Ein Zeitraum indem der Prozess sein Maximum erreicht hatte und sich ein neuer *steady-state* beim Zellvolumen eingestellt hatte. Nach Ablauf der 40 min wurde wieder zu einer Lösung mit 300 mosM gewechselt, wodurch ein leichtes Schwellen der Zellen, zum Teil leicht über das ursprüngliche Volumen hinaus, ausgelöst wurde.

Dieses ist ein Ausdruck der erfolgten Osmolyt-Bewegung im Laufe des RVI. Der Ausgangswert des Volumens war nach ca. 10 min wieder erreicht.

Diese Messungen wurden im Weiteren durch die Ermittlung der Raten der Volumenänderungen beim Schrumpfen, dem RVI und dem abschließenden Schwellen ausgewertet. In Abbildung 4.2-2 sind in grau die Fits für die einzelnen Prozesse gezeigt, aus denen die Raten der Volumenänderung ermittelt wurden. Dabei wurden die Änderungen beim Schrumpfen und Schwellen mittels linearer Regression ermittelt, während die Zeitkonstante (τ -Wert) des RVI über einen einfachen exponentiellen Abfall bestimmt wurde. Die gemessenen τ -Werte hänge unter anderem von der Amplitude des vorhergegangenen Schrumpfens ab. Um eine Vergleichbarkeit zwischen mehreren Messungen zu ermöglichen wurden die τ -Werte deswegen auf das anfängliche Schrumpfen normiert.

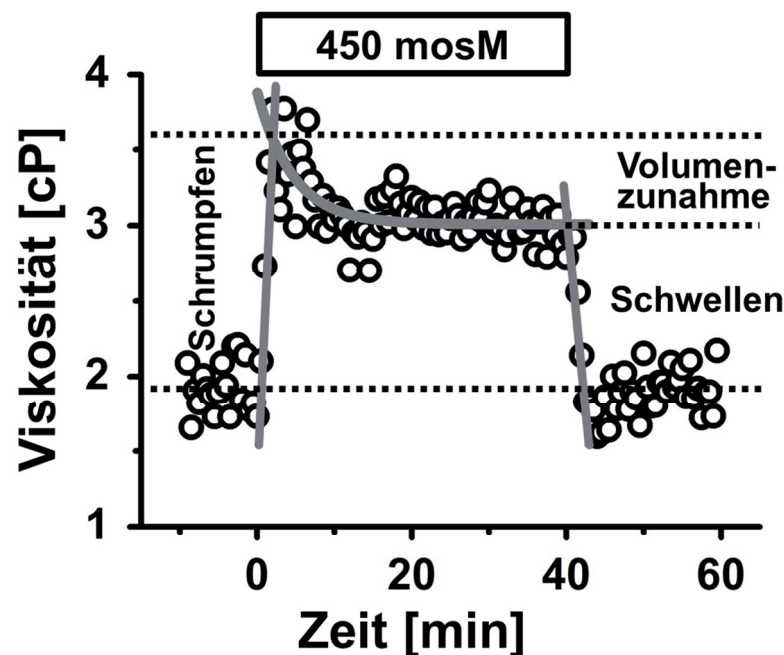


Abbildung 4.2-3: Verlauf der Viskosität während einer FCS-Messung bei 35°C.

Parallel zur Messung der Partikeldichte wurde über die Diffusionsgeschwindigkeit von eGFP die Viskosität der Zelle bestimmt. Diese zeigt ein dem Volumen-Verlauf ähnliches Profil. Ein Schrumpfen der Zelle resultierte in einem deutlichen Anstieg der Viskosität, die im Verlauf des RVI zum Teil wieder sinkt. Beim Rück-Schwellen der Zelle fällt die Viskosität wieder auf ihr ursprüngliches Niveau ab. In grau sind die Fits der einzelnen Prozesse eingezeichnet. [cP] steht für Centipoise.

Zeitgleich zur Änderung des Volumens über die Partikeldichte konnte direkt die Viskosität der Zelle über die Diffusionsgeschwindigkeit von eGFP bestimmt werden. Die erhaltenen Diffusionsgeschwindigkeiten wurden wie in 3.5.3.3 beschrieben ausgewertet. Unter Verwendung des konfokalen Volumens wurde die Diffusionskonstante von eGFP berechnet und diese dann, mit Hilfe der Stokes-Einstein-Glei-

chung (3.5) für freie Diffusion in Flüssigkeiten und dem hydrodynamischen Radius von eGFP, zur Berechnung der Zytoplasma-Viskosität benutzt. Die Viskosität weist einen ähnlichen Verlauf wie das zuvor betrachtete Zellvolumen auf. Es kommt zu einer Erhöhung der Viskosität durch das Schrumpfen der Zelle um den Faktor zwei. Im Verlauf des RVI sinkt diese dann leicht auf einen Wert um 3 cP. Während des Schwellens der Zelle fällt die Viskosität wieder auf den ursprünglichen Wert. Wie schon bei der Volumenmessung, wurden auch für die Viskosität die Raten der Änderung beim Schrumpfen, dem RVI und beim Schwellen bestimmt. Die Fits sind in der Abbildung grau eingezeichnet.

Wie am Anfang des Kapitels erwähnt, war die Bestimmung der Aktivierungsenergien der drei Prozesse Schrumpfen, RVI und Schwellen das Ziel dieser Messung. Um diese zu erhalten, mussten die oben beschriebenen Messungen bei mehreren Temperaturen durchgeführt werden. Es wurden 35°C, 25°C, 15°C und 5°C gewählt. Um darüber hinaus einen Einblick in die Abhängigkeit dieser Prozesse von der verwendeten Osmolarität zu bekommen, wurden diese Prozesse außerdem bei vier verschiedene Osmolaritäten und den jeweiligen Temperaturen gemessen. Für die Messungen bei den unterschiedlichen Temperaturen und Osmolaritäten ergaben sich Messverläufe, die denen in Abbildung 4.2-2 und Abbildung 4.2-3 ähnelten. Allerdings wird im Folgenden deutlich, dass sich die Geschwindigkeiten dieser Prozesse merklich unterschieden. Im Folgenden sind die ermittelten Raten der drei untersuchten Prozesse bei den einzelnen Bedingungen zusammengefasst.

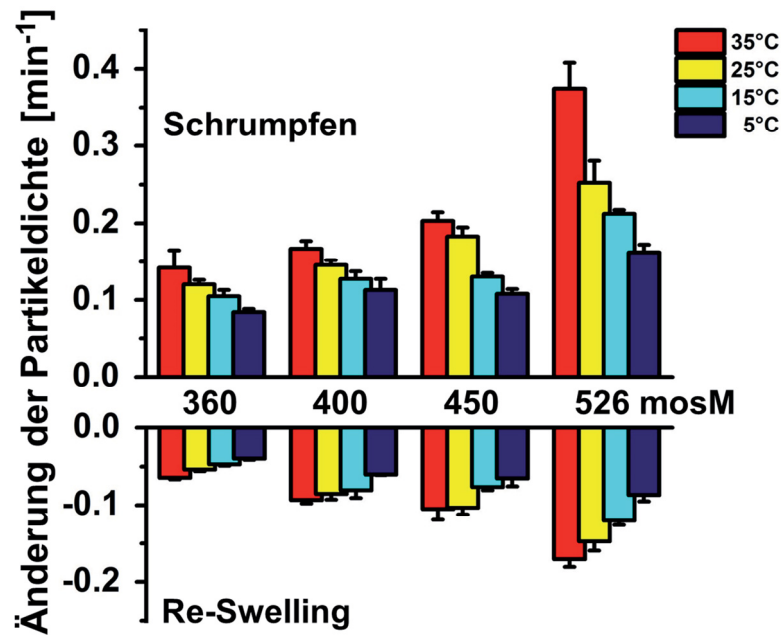


Abbildung 4.2-4: Raten für Schrumpfen und Schwellen der Zellen bei vier Temperaturen und Osmolaritäten.

Raten der Änderung der Partikeldichte beim Schrumpfen und Schwellen der Zellen angegeben in min^{-1} . Bei höheren Temperaturen und mit steigender Osmolarität ist sowohl die Geschwindigkeit des Schrumpfens als auch des Schwellens in HeLa Zellen erhöht. Im Mittel ist das korrespondierende Schrumpfen um den Faktor zwei langsamer als das vorangegangene Schwellen. $n=5-8$ pro Bedingung.

Es zeigt sich, dass die Änderung des Zellvolumens beim Schrumpfen wie beim Schwellen sowohl von der Osmolarität als auch von der Temperatur abhängt. Je tiefer die Temperatur ist, desto kleiner sind die Raten für die Volumenänderung bei beiden Prozessen. Gleiches gilt auch für den Einfluss der Osmolarität. Höhere Osmolaritäten führen zu schnelleren Änderungen des Volumens der Zellen.

Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich bei der Betrachtung der τ -Werte des RVI der HeLa-Zellen (Abbildung 4.2-5). Aus dem Fit der Werte des RVI mittels exponentiellen Abfalls ergibt sich τ als Zeitkonstante für diesen Abfall. Bei $t = \tau$ ist der Wert auf $1/e = 0,36$ abgefallen. Das bedeutet für die Betrachtung der ermittelten τ -Werte, je größer der Wert für τ , desto langsamer der Prozess des RVI und die damit verbundene Volumenzunahme. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Temperatur der Prozess des RVI jeweils schneller wird (kleinerer τ -Wert), unabhängig bei welcher Osmolarität gemessen wurde. Darüber hinaus wird deutlich, dass der Prozess des RVI auch jeweils schneller wird, je höher der osmotische Stress war, dem die Zelle ausgesetzt wurde. Da der τ -Wert von der Amplitude der gefitteten Funktion abhängt, wurden alle τ -Werte auf die Differenz des Volumens einer Messung zu Beginn und am Ende des hypertonen Stresses normiert.

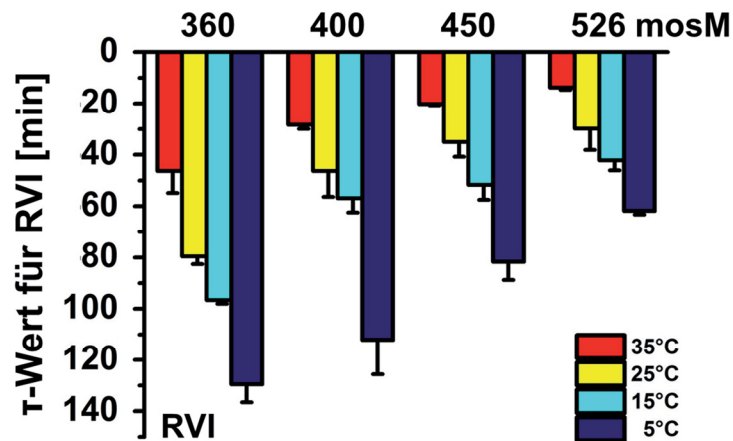


Abbildung 4.2-5: Zeitkonstante des RVI bei HeLa-Zellen.

Zeitkonstanten des RVI von HeLa-Zellen bei vier Temperaturen und vier Osmolaritäten. Je kleiner der Wert für τ , desto schneller die Volumenzunahme. Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit des Prozesses von Temperatur und Osmolarität. Sowohl eine Erhöhung der Temperatur als auch die Verwendung einer höheren Osmolarität führte zur Ausbildung eines schnelleren RVIs. τ -Werte wurden zur Vergleichbarkeit auf das anfängliche Zellschrumpfen normiert. $n = 5-8$.

Wie bereits erwähnt, wurde neben der Änderung des Zellvolumens auch die Änderung der Viskosität im Verlauf der Zell-Volumenänderung detektiert. Im Vergleich zur Volumenänderung zeigt die Änderung der Viskosität ebenfalls eine Abhängigkeit von Temperatur und Osmolarität. Allerdings ist diese zum Teil invers zu denen der Volumenänderung. So ist beim Schrumpfen der Zelle eine Erhöhung der Raten bei unterschiedlichen Osmolaritäten innerhalb einer Temperatur zu erkennen. Innerhalb einer Osmolarität zeigt sich aber ein inverses Verhalten der Raten mit der Temperatur. Die Geschwindigkeit mit der die Viskosität bei osmotischem Stress steigt, fällt mit sinkender Temperatur. An dieser Stelle sei erwähnt, dass es sich, vermutlich nicht um einen Effekt der Temperaturabhängigkeit der Viskosität handelt, da keine absoluten Viskositäten dargestellt sind sondern die Änderung dieser mit der Zeit. Die jeweiligen Viskositäten der Zellen zu Beginn der Messung waren mit sinkenden Temperaturen höher, zeigten aber wie beschrieben auch eine schneller Änderung bei osmotischem Stress.

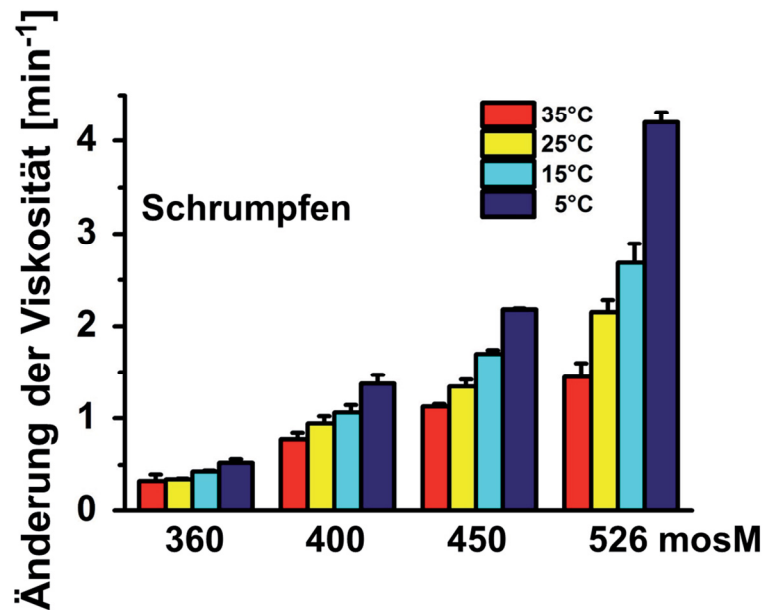


Abbildung 4.2-6: Raten der Viskositätsänderung beim Schrumpfen der HeLa-Zellen.

Dargestellt sind die Raten der Viskositätsänderung bei Zugabe von höher-osmotischem Medium. Mit steigender Osmolarität die Viskosität in den Zellen immer schneller zu. Diese Zunahme war bei tiefen Temperaturen jeweils nochmals verstärkt. n = 5-8.

In Übereinstimmung mit den Änderungen der Viskosität beim Schrumpfen der Zellen (Abbildung 4.2-6) zeigt sich auch beim späteren Schwellen eine ähnliche Abhängigkeit von Temperatur und Osmolarität. So führte eine Verringerung von beiden Parametern beim Schwellen der Zellen zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit mit der die Viskosität sich änderte (Vergleiche Abbildung 4.2-7). Und mit Erhöhung der Osmolarität stiegen auch die Raten, mit denen die Viskosität zunahm. Während die Raten der Volumenänderung beim Schrumpfen und Schwellen, gemessen bei derselben Temperatur, stark unterschiedlich waren, konnte für die Viskositätsänderung kein solch ausgeprägter Unterschied festgestellt werden. Dieser betrug im Mittel ca. 1 cP/ min.

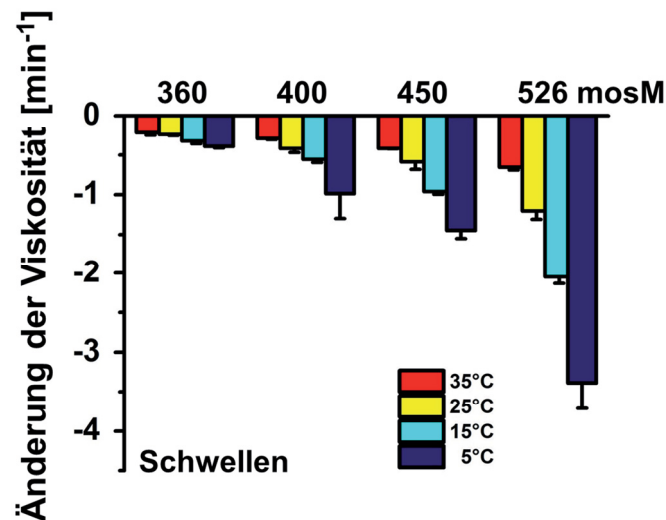


Abbildung 4.2-7: Viskositätsänderung beim Schwellen der HeLa-Zellen.

Raten der Viskositätsänderung bei verschiedenen Temperaturen und Osmolaritäten. Mit sinkender Temperatur steigt die Geschwindigkeit der Viskositätsänderung. Denselben Effekt hat die Erhöhung der Osmolarität. $n = 5-8$.

Zuletzt wurde die Viskositätsänderung während des sich ausbildenden RVI quantifiziert. Dies war jedoch nur für die Messungen bei 35°C und 25°C möglich, da bei Messungen bei 15°C und 5°C kein exponentieller Abfall der Viskosität im Laufe des RVI sichtbar war. Dennoch konnten im Vergleich mit den τ -Werten für die Volumenänderung, ähnliche Zusammenhänge und Unterschiede wie zuvor schon bei den Vergleichen der beiden Größen beim Schrumpfen und Schwellen der Zellen ermittelt werden.

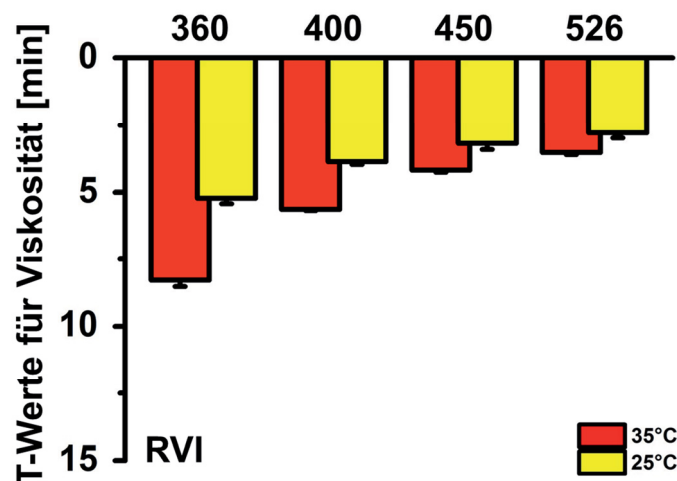


Abbildung 4.2-8: τ -Werte der Viskositätsänderung während des RVI.

Viskositätsänderung mit der Zeit im Verlauf des RVI. Gezeigt sind die τ -Werte des exponentiellen Abfalls der Viskosität im Laufe dieses Prozesses. Die berechneten τ -Werte wurden auf die Differenz der Viskosität im Laufe des RVI normiert. Je niedriger der τ -Wert ist, desto schneller ist der zugrunde liegende Prozess. Es wurde deutlich, dass bei 25°C die Abnahme der Viskosität schneller ist als bei 35°C. Des Weiteren sinkt die Viskosität schneller, wenn die Zellen zuvor mit einer höheren Osmolarität gestresst wurden. $n = 4-7$

Die in Abbildung 4.2-8 dargestellte Änderung der Viskosität zeigt sowohl eine Abhängigkeit von der Osmolarität als auch der Temperatur. Je höher die Osmolarität war, mit der die Zellen gestresst wurden, desto schneller nahm die anfängliche Viskosität im Verlauf des RVI ab. Im Gegensatz zur Volumenänderung erfolgte die Abnahme der Viskosität mit der Zeit bei 25°C schneller als bei 35°C.

Um eine Möglichkeit zu haben, die einzelnen Prozesse, wie Schrumpfen und Schwellen miteinander zu vergleichen und sie in einen breiteren Kontext einzuordnen, wurde aus den Messwerten, die in Abhängigkeit der Temperatur ermittelt wurden, die jeweilige Aktivierungsenergie (E_a) ermittelt. Dazu wurden die Messwerte der Prozesse als natürliche Logarithmen der Werte gegen $1000/T$ aufgetragen und aus der Steigung der linearen Regression die Aktivierungsenergien berechnet (Siehe auch 3.7). Dies wurde für alle sechs oben beschriebenen Prozesse bei allen verwendeten Osmolaritäten ausgewertet. Nachfolgend ist dies an den Werten für 450 mosM beispielhaft dargestellt. Alle einzelnen Fits sind im Anhang unter Abbildung 7.1-2 bis Abbildung 7.1-7 gezeigt.

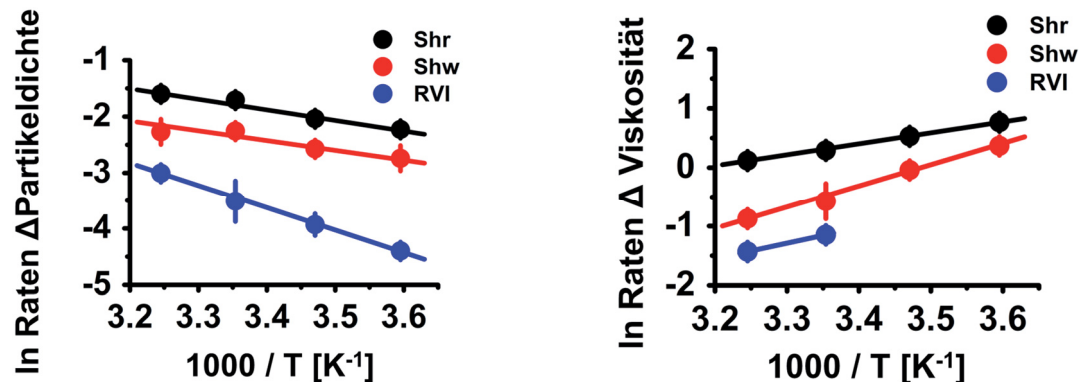


Abbildung 4.2-9: Ermittlung der E_a s für 450 mosM

Fits der Einzelnen Aktivierungsenergien für die Prozesse des Schrumpfens (Shr), Schwellens (Shw) und des RVI. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler. Im Fall von Schrumpfen und Schwellen wurde der \ln des Messwerts aufgetragen, im Fall der τ -Werte von Volumen und Viskosität wurde der \ln von $1/\tau$ aufgetragen. Links: Alle drei Prozesse haben negative Steigungen die in positiven Aktivierungsenergien resultierte. Anhand der Steigung ist zu erkennen, dass der RVI eine höhere Aktivierungsenergie hat als die Prozesse des Schrumpfen und Schwellens. Rechts: Schrumpfen, Schwellen und der RVI haben im Fall der Viskosität eine positive Steigungen und somit negative Aktivierungsenergien. Auch in diesem Fall ist zu erkennen, dass die unterschiedlichen Steigungen in verschieden großen Aktivierungsenergien resultieren. $n = 4-8$ für jeden Messpunkt.

Zwischen Volumenänderung und der Änderung der Viskosität ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die positiven Steigungen der Viskositätsänderungen während des Schrumpfen, des Schwellens bzw. des RVI führen zu negativen Aktivierungsenergien. Im Gegensatz dazu zeigen die Prozesse der Volumenänderung

negative Steigungen und somit positive Aktivierungsenergien. Dies bedeutet, dass für Änderungen des Zellvolumens Energie aufgewendet wurde, die Viskositätsänderungen allerdings ohne Energieverbrauch stattfanden. Anhand der Steigung ist zu erkennen, dass Schrumpfen und Schwellen ähnliche Aktivierungsenergien haben ($16,1 \pm 2,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $12,5 \pm 3,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), während die Aktivierungsenergie des RVIs mit $32,8 \pm 4,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ deutlich höher liegt. Im Fall der Viskosität ist der Unterschied zwischen Schrumpfen und Schwellen mit $-15,8 \pm 1,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $-30,5 \pm 3,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ deutlich größer. Beim Prozess des RVI ergibt sich für die Viskositätsänderung eine E_a von $-21,7 \pm 6,9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Aktivierungsenergien aller Prozesse sind nachfolgend als Balkendiagramm zusammengefasst.

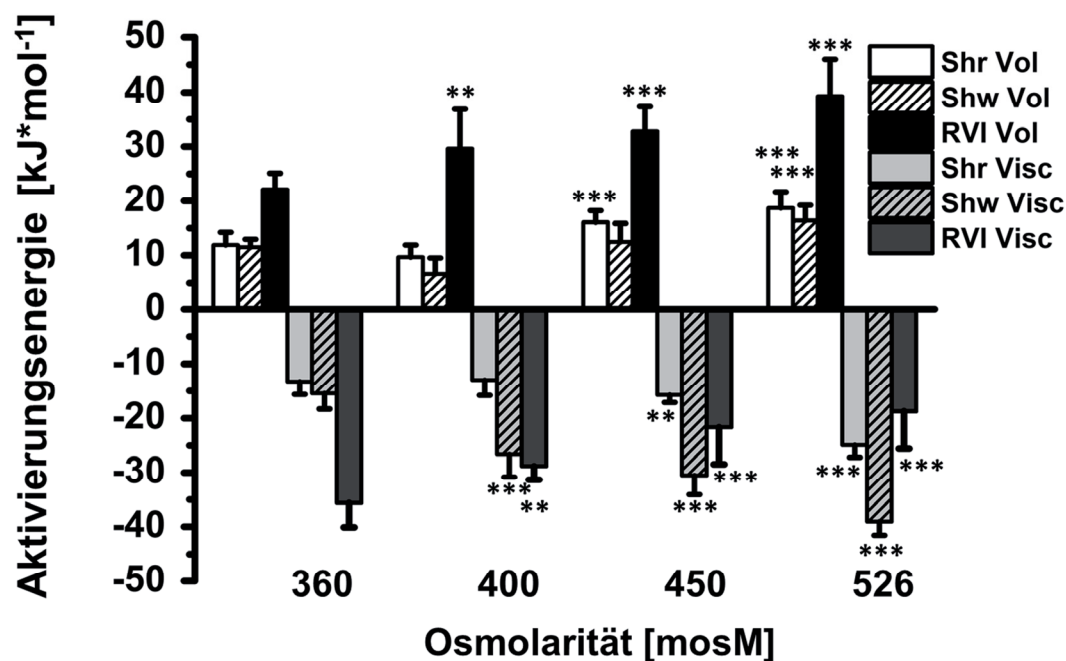


Abbildung 4.2-10: Zusammenfassung der Aktivierungsenergien der FCS Messungen.

Übersicht aller ermittelten Aktivierungsenergien der FCS Messungen durch Auswertung mittels Arrhenius-Plots. Volumenänderungen zeigen generell eine positive Aktivierungsenergie während Änderungen der Viskosität eine negative Aktivierungsenergie aufweisen. Mit steigender Osmolarität kommt es zu einem fortlaufenden Anstieg der E_a des RVI. Die E_a s von Schrumpfen und Schwellen steigen leicht, aber signifikant im Vergleich zur Messung bei 360 mosM. Die Viskositätsänderungen beim Schrumpfen und Schwellen sind ab 400 bzw. 450 mosM signifikant kleiner als bei 360. Mit steigender Osmolarität sinkt die Aktivierungsenergie der Viskositätsänderung. Die Werte ab 400 mosM sind signifikant kleiner als bei 360 mosM. Angegeben sind die Werte aus den Fits mit ihren Standardfehlern (SDs). Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige Messung bei 360 mosM. $n = 4-8$

Es wird deutlich, dass die Änderungen der Viskosität und des Volumens gegenläufige Aktivierungsenergien haben. Während die Volumenänderungen positive Aktivierungsenergien aufweisen, haben die Viskositätsänderungen bei den drei beobachteten Prozessen negative Aktivierungsenergien. Bei der Betrachtung der

Volumenänderungen fällt auf, dass mit steigender Osmolarität die Aktivierungsenergie des RVIs signifikant größer ist als bei 360mosM. Mit jeder Erhöhung der Osmolarität geht eine höhere E_a des RVIs einher. Ähnliches gilt für das Schrumpfen und Schwellen. Allerdings zeigt sich eine deutliche Änderung zwischen 400 und 450 mosM. Erst dann sind die Aktivierungsenergien signifikant unterschiedlich zur Messung bei 360 mosM. Während der RVI eine schrittweise Erhöhung der Aktivierungsenergie aufweist, ist beim Schrumpfen und Schwellen eine abrupte Änderung zwischen 400 und 450 mosM zu beobachten. Bei der Änderung der Viskosität sinkt die Aktivierungsenergie für die Änderung beim RVI mit höherer Osmolarität, während die Aktivierungsenergien für die Viskositätsänderung beim Schrumpf und Schwellen der Zelle mit steigender Osmolarität immer größer werden. Die beiden Aktivierungsenergien von Volumen- und Viskositätsänderung für den Prozess des RVI scheinen zueinander invers zu verlaufen. Das heißt, je positiver die E_a für die Änderung des Volumens wird, desto kleiner wird die E_a für die Änderung der Viskosität, während die beiden E_a s in der Summe immer zwischen 54,5 und 58,4 kJ \cdot mol $^{-1}$ liegen. Negative Aktivierungsenergien werden als ein Hinweis auf eine selbständig ablaufende Reaktion angesehen. Es ist denkbar, dass die Volumenänderung, mit den positiven Aktivierungsenergien somit auch die treibende Kraft für die Änderung der Viskosität darstellt.

4.2.2 Volumenregulation und Aquaporine

Im Verlauf der Messungen der Volumenregulation bei HeLa-Zellen mittels FCS war aufgefallen, dass es zwischen den Aktivierungsenergien des Schwellens und Schrumpfens innerhalb einer Osmolarität keine deutlichen Unterscheide gab (Vergleiche Abbildung 4.2-10). Das ist insofern interessant, da davon auszugehen ist, dass beide Prozesse hauptsächlich auf der Präsenz von Aquaporinen beruht. Aquaporine stellen in Zellmembranen eine hohe Permeabilität für Wasser dar und so entstand die Frage, ob Zellen im Verlauf des hypertonen Stress vermehrt Aquaporine in die Membran einlagern, um mehr Wasser aufzunehmen. Insbesondere durch die, im Rahmen des Kryo-Projekts gewonnenen, Ergebnisse von Frau Dipl.-Biologin Lale Azer, die die Volumenregulation an HepG2 Zellen charakterisierte, ergab sich die Frage, ob es Unterschiede bei verschiedenen Zellentypen gibt. In ihren Messungen konnte Frau Azer zeigen, dass bei HepG2 Zellen sehr wohl eine niedrigere Aktivierungsenergie

des Schwellens nach hypertonem Stress gegenüber der nach Schrumpfen zu erkennen war. Es sollte somit geklärt werden, ob diese verringerte Aktivierungsenergie mit einer vermehrten Einlagerung von Aquaporinen in die Zellmembran einhergeht. Dazu wurden HeLa- und HepG2-Zellen mit einem Aquaporin 1-mCitrine Konstrukt transfiziert und die Änderung der Lokalisation dieses Konstrukts in der basalen Membran der Zellen während und nach hypertonem Stress mittels TIRF-Mikroskopie verfolgt. Zusätzlich wurde ein Konstrukt aus dem Membrananker von K-Ras (tail of K-Ras, tK-Ras) mit mKate2 als Fluorophor transfiziert. Dieses war unabhängig von hypertonem Stress und diente als Membranmarker zur Normalisierung der Messung. So konnten auch um eventuelle Einflüsse aufgrund von morphologischen Veränderungen der Zelle korrigiert werden. Unter Berücksichtigung der abweichenden Ergebnisse wurden sowohl HeLa- als auch HepG2-Zellen untersucht.

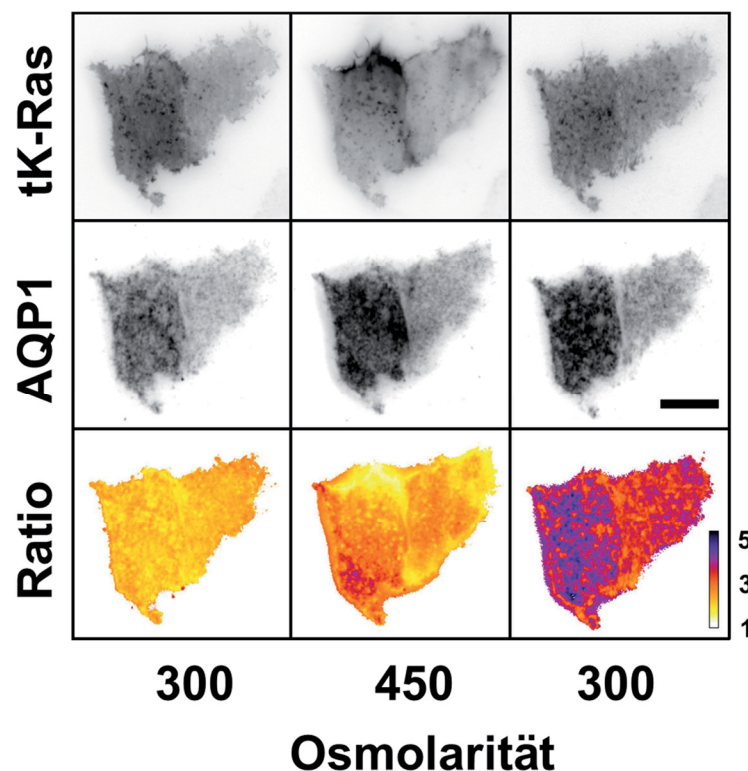


Abbildung 4.2-11: TIRF-Mikroskopie von Aquaporin 1 exprimierenden HepG2-Zellen.

Darstellung der Aquaporin-1 Lokalisation mittels TIRF-Mikroskopie an HepG2 Zellen. In der oberen Reihe sind die Intensitäten der tK-Ras Fluoreszenz an der Membran isoton, 20 min hypertone und 10 min nach hypertone Stress dargestellt. In der mittleren Reihe sind die Intensitäten für Aquaporin 1 an den gleichen Zeitpunkten dargestellt und die untere Reihe zeigt das Verhältnis beider Intensitäten als intensitätskodierte Falschfarbenbild. In den ersten beiden Reihen wurden die erhaltenen Bilder invers dargestellt. Größenmarkierung = 20 μ m.

Die in Abbildung 4.2-11 dargestellten Messungen ergaben einen deutlichen Unterschied zwischen HeLa- und HepG2-Zellen. In HeLa-Zellen wurden kaum Änderun-

gen in der Membranintensität von Aquaporin 1 (AQP1) festgestellt. In HepG2-Zellen konnte eine deutliche Erhöhung von AQP1 während und insbesondere nach hypertonem Stress gemessen werden. In der Darstellung der AQP1-Intensität an der Membran (Abbildung 4.2-11) ist deutlich die vermehrte Einlagerung von Aquaporinen zu erkennen. Durch die Bildung des Verhältnisses zwischen AQP1 und tK-Ras wurde das Signal normiert und dann als Intensitäts-skaliertes Bild dargestellt. Es wird deutlich, dass in beiden Zellen eine Erhöhung der AQP 1-Fluoreszenz und damit der Konzentration in der Membran stattfindet, wobei es Bereiche bzw. Strukturen zu geben scheint, in denen es vermehrt (bis zu 5-fach erhöht) zur Einlagerung von AQP1 kommt. Um die Messungen zu quantifizieren wurden die Intensitäten der beiden Konstrukte über die Fläche einer Zelle gemittelt. Aus diesen Werten wurde ein Verhältnis von AQP1-Intensität zu tK-Ras Intensität berechnet und über mehrere Messungen gemittelt. Diese Mittelwerte wurden auf den Mittelwert zum Zeitpunkt 0 min bezogen, um eine vergleichende Darstellung zu ermöglichen.

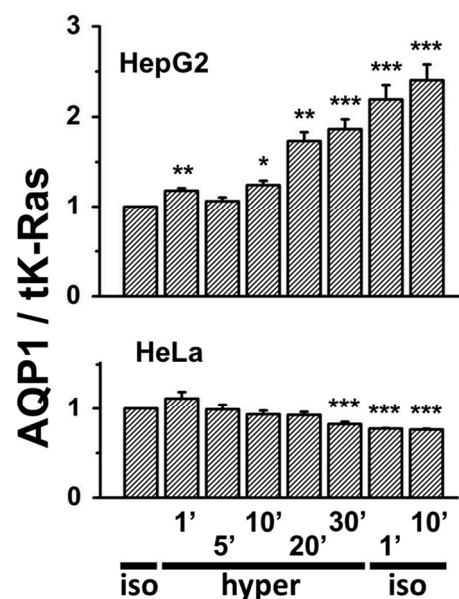


Abbildung 4.2-12: Veränderung der Aquaporin 1 Intensität in der Membran.

Bei HepG2 Zellen kam es zu einer deutlichen Erhöhung des AQP1 / tK-Ras Verhältnisses im Laufe des hypertonen Stress, die auch nach Rückkehr zu isotonen Bedingungen weiter ansteigt. Bei HeLa-Zellen kommt es zu keiner merklichen Erhöhung, lediglich zum Ende zu einer leichten, aber signifikanten Erniedrigung des AQP1 / tK-Ras Verhältnisses im Vergleich zum Beginn der Messung. Signifikanzen beziehen sich auf den isotonen Wert, n = 5.

Wie in Abbildung 4.2-12 erkennbar, liefert die Quantifizierung der HepG2-Zellen einen deutlichen Anstieg des AQP1/ tK-Ras Verhältnisses nach 10 min hypertonen Stress. Dieser Anstieg bleibt auch nach dem Wechsel zu isotoner Lösung weiter erkennbar. Im Mittel ist eine 2,5-fache Erhöhung erreicht worden und somit eine

deutlich vermehrte Einlagerung von Aquaporin 1 in die Membran. Im Gegensatz dazu wurde bei den Messungen an HeLa-Zellen lediglich eine geringfügige Abnahme des AQP1/ tK-Ras Verhältnisses festgestellt.

4.2.3 Der hyperton-induzierte Kationen-Kanal in HeLa-Zellen

Neben der Charakterisierung der einzelnen Prozesse während der Volumenregulation, sollten zusätzlich zentrale Vermittler der Volumenregulation näher untersucht werden. Der HICC spielt eine entscheidende Rolle bei der Natrium-Aufnahme im Rahmen des RVI und trägt maßgeblich zur Volumenzunahme nach hypertonem Stress bei. Teile der Arbeit beinhalten die molekulare Identifikation des Kanals sowie im Anschluss die biophysikalische Charakterisierung.

4.2.3.1 Molekulare Charakterisierung der HICCs in HeLa-Zellen

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Labor von Prof. Okada (Japan) wurde der hyperton-induzierte Kationenkanal (HICC) in HeLa-Zellen charakterisiert (Numata *et al.*, 2012). In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass der HICC in HeLa-Zellen bei *Patch-Clamp* Messungen die gleiche, lineare Strom-Spannungs-Kennlinie ausbildet, wenn die Zellen anstatt mit hypertoner Lösung mit ADP-Ribose oder cADP-Ribose in der Pipettenlösung stimuliert wurden. Durch Verminderung der Expression von TRPM2 mit siRNA konnte darüber hinaus belegt werden, dass der *transient-receptor potential* Kanal, Typ Melastatin 2 (TRPM2) das molekulare Korrelat des HICC in HeLa-Zellen ist.

Durch den *knock-down* des Gens für TRPM2 wurde nicht nur der Strom nach hypertoner Aktivierung auf ein basales Niveau reduziert, darüber hinaus war auch keine Aktivierung des Kanals durch ADP-Ribose oder cADP-Ribose mehr möglich. Ebenso war die Volumenregulation der Zellen nach hypertonem Schock durch die Verminderung von TRPM2 gestört. Es war zu dem Zeitpunkt bekannt, dass das Protein *cluster of differentiation 38* (CD38) zu der Umwandlung/ Bildung von ADP-Ribose und cADP-Ribose aus NAD^+ fähig ist und, dass der HICC in HeLa-Zellen durch intrazelluläre Stimulation mit ADP-Ribose aktivierbar war. Es zeigte sich, dass nach *knock-down* von CD38 ebenfalls die Ströme des TRPM2, sowohl nach hypertoner Aktivierung als auch nach Stimulation mit ADP-Ribose und cADP-Ribose deutlich reduziert waren. Darüber hinaus führte verminderte Expression von TRPM2 sowie CD38 nach siRNA Behandlung, unabhängig von einander, zu einer reduzierten

Zellproliferation in HeLa-Zellen. Die im Folgenden dargestellten Abbildung 4.2-13 bis Abbildung 4.2-17 sind im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden.

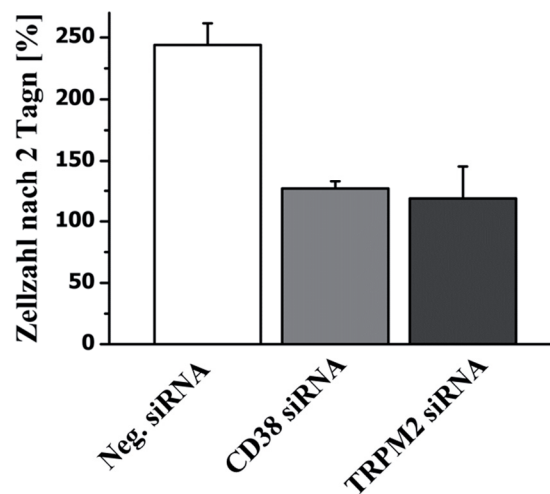


Abbildung 4.2-13: HeLa-Zellproliferation nach siRNA Behandlung.

HeLa Zellen wurden entweder mit negativer (Kontrolle), anti-CD38 oder anti-TRPM2 siRNA transfiziert. Nach zwei Tagen wurde das Wachstum der transfizierten Zellen bestimmt und im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt. Sowohl die Reduzierung von CD38 als auch die von TRPM2 führt zu einem signifikant vermindertem Wachstum der Zellen. (Entnommen aus (Numata *et al.*, 2012))

Aus diesen Befunden ergab sich die Frage in wieweit sich der intrazelluläre Level von cADP-Ribose in HeLa-Zellen durch hypertonen Stress und/ oder *knock-down* von TRPM2 oder CD38 ändert. Um dies zu messen wurden HeLa-Zellen mit entsprechender, fluoreszenz-markierter siRNA transfiziert und nach 24 h, auf Basis der Fluoreszenz der siRNA, mit Hilfe eines Zellsortierers angereichert. Somit wurden nur transfizierte Zellen für die Messung verwendet. Nach weiteren 48 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und der cADP-Ribosegehalt bestimmt. Neben der basalen (isotonen) Konzentration für cADP-Ribose sollte auch der Einfluss von hypertonem Stress auf die Konzentration von cADP-Ribose untersucht werden. Dafür wurde jeweils Zellen der verschiedenen siRNA-Gruppe für 10 min mit 450 mosM PBS behandelt und anschließend (wie die isotonen Zellen) lysiert und der cADP-Ribosegehalt bestimmt.

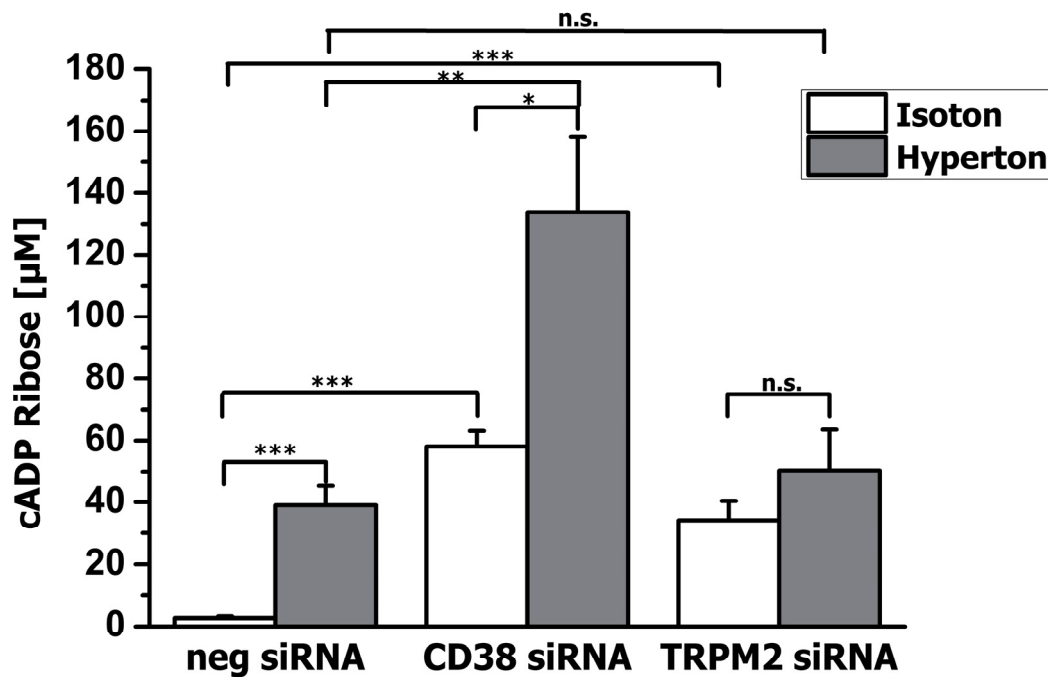


Abbildung 4.2-14: cADP-Ribose Konzentration von HeLa-Zellen.

Dargestellt sind die jeweiligen cADP-Ribose Konzentrationen in HeLa-Zellen in μmol pro Zelle. Zur Berechnung wurde ein mittleres Volumen der Zellen von 3 pl angenommen. Nach hypertone Stress steigt der cADP-Ribose Gehalt in den HeLa-Zellen unter Kontrollbedingungen deutlich an. Der *knock-down* von CD38 führt bei isoton Bedingungen zu stark erhöhten cADP-Ribose Konzentrationen die nach hypertone Stress nochmals deutlich steigen. In TRPM2 *knock-down* Zellen ist die Konzentration von cADP-Ribose unter isotonen Bedingungen ebenfalls erhöht, steigt aber durch hypertone Stress nicht signifikant weiter an. $n=5$ (Entnommen aus (Numata *et al.*, 2012))

In Kontrollzellen (negativ siRNA) wurde nach hypertone Stress eine Erhöhung der cADP-Ribose Konzentrationen um das 14-fache, von $2,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$ auf $39,0 \pm 6,3 \mu\text{M}$ gemessen. Der *knock-down* von CD38 führte zu 22-fach erhöhten, basalen cADP-Ribose Konzentrationen, ($58,1 \pm 4,9 \mu\text{M}$). Hypertone Stress erhöhte den Wert auf $133,9 \pm 24,2 \mu\text{M}$. Eine Verringerung der TRPM2 Expression führte ebenfalls zu einer Erhöhung von cADP-Ribose auf $34,1 \pm 6,1 \mu\text{M}$, eine Konzentration die sich durch hypertone Stress nicht signifikant erhöhte.

Diese Ergebnisse waren unerwartet, da CD38 als Quelle für cADP-Ribose angesehen wurde und somit nicht zu erklären war weshalb eine Reduktion von CD38 zu einer Erhöhung von cADP-Ribose anstelle einer Verringerung zur Folge hatte. Im weiteren Verlauf wurde die Hypothese verfolgt, dass CD38 und TRPM2 direkt miteinander interagieren und der Ionenkanal hierdurch aktiviert wird (siehe unten). Ersteres Protein um die Konzentration von cADP-Ribose zu erkennen und folgend dieses Signal an TRPM2 weiterzugeben. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine mögliche Interaktion von TRPM2 mit CD38 untersucht. Dazu wurden in einem ersten Schritt Immunpräzipitations-Experimente an transfizierten HeLa-Zellen

durchgeführt. Da kein verwendbarer anti-TRPM2 Antikörper erhältlich war und um das Signal zu verbessern, wurden die Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für TRPM2-eGFP und CD38-mKate2 codierten. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Immunpräzipitation entweder mit einem anti-GFP oder einem anti-CD38 Antikörper durchgeführt. Nach der Auftrennung der präzipitierten Proteine über eine SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotting konnten die Proteine mit den oben genannten Antikörpern detektiert werden.

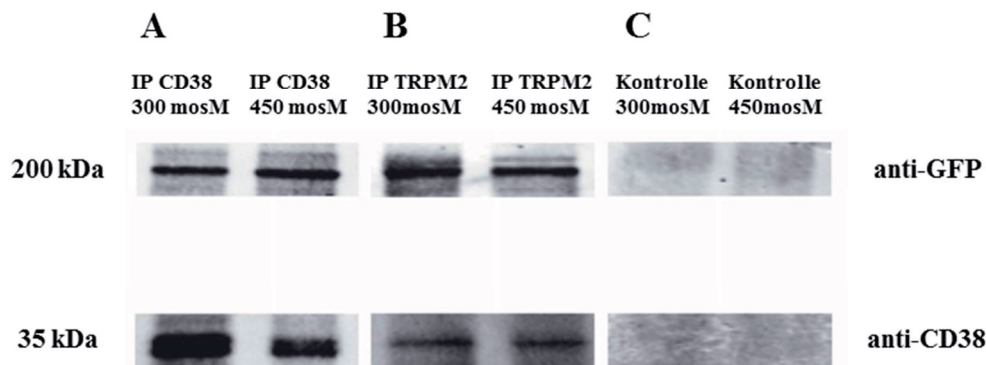


Abbildung 4.2-15: Immunpräzipitation von TRPM2 und CD38.

In (A) sind die Proben der Immunpräzipitation mit anti-CD38 Antikörper aufgetragen. Neben CD38 ist auch TRPM2 nachzuweisen, eine Behandlung der Zellen mit hypertone Medium ändert nichts an dieser Interaktion. Ähnliches zeigt sich wenn die Immunpräzipitation über anti-TRPM2 Antikörper durchgeführt wurde (B). Hier wurde zusätzlich auch CD38 in den Proben nachgewiesen. Auch in diesem Fall hat Hypertonizität keinen Einfluss auf die Interaktion. Die Immunpräzipitation ohne Antikörper zeigt keine Banden (C). Das gezeigte Experiment steht repräsentativ für fünf unabhängige Versuche. (Entnommen aus (Numata *et al.*, 2012))

Durch die Immunpräzipitation mit anschließendem Immunoblotting wurde ein erster Einblick in die Interaktion von TRPM2 und CD38 erlangt. Um diesen zu verifizieren und zusätzlich eine direkte Evidenz für die Interaktion *in vivo* zu bekommen, wurden FLIM-Experimente durchgeführt. Kommt es zu einer Interaktion beider Proteine, kann die räumliche Nähe über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) nachgewiesen werden. Der Abstand zwischen beiden Proteinen und den angehängten Fluorophoren wird so klein, dass dies zu einem strahlungslosen Energietransfer und somit zu einer Verringerung der Lebenszeit des *Donor*-Fluorophors führt (Siehe auch 3.5.2). Hierzu wurden HEK293 Zellen sowohl mit TRPM2-eGFP als auch CD38-mKate2 transfiziert und nach 48 h mikroskopiert.

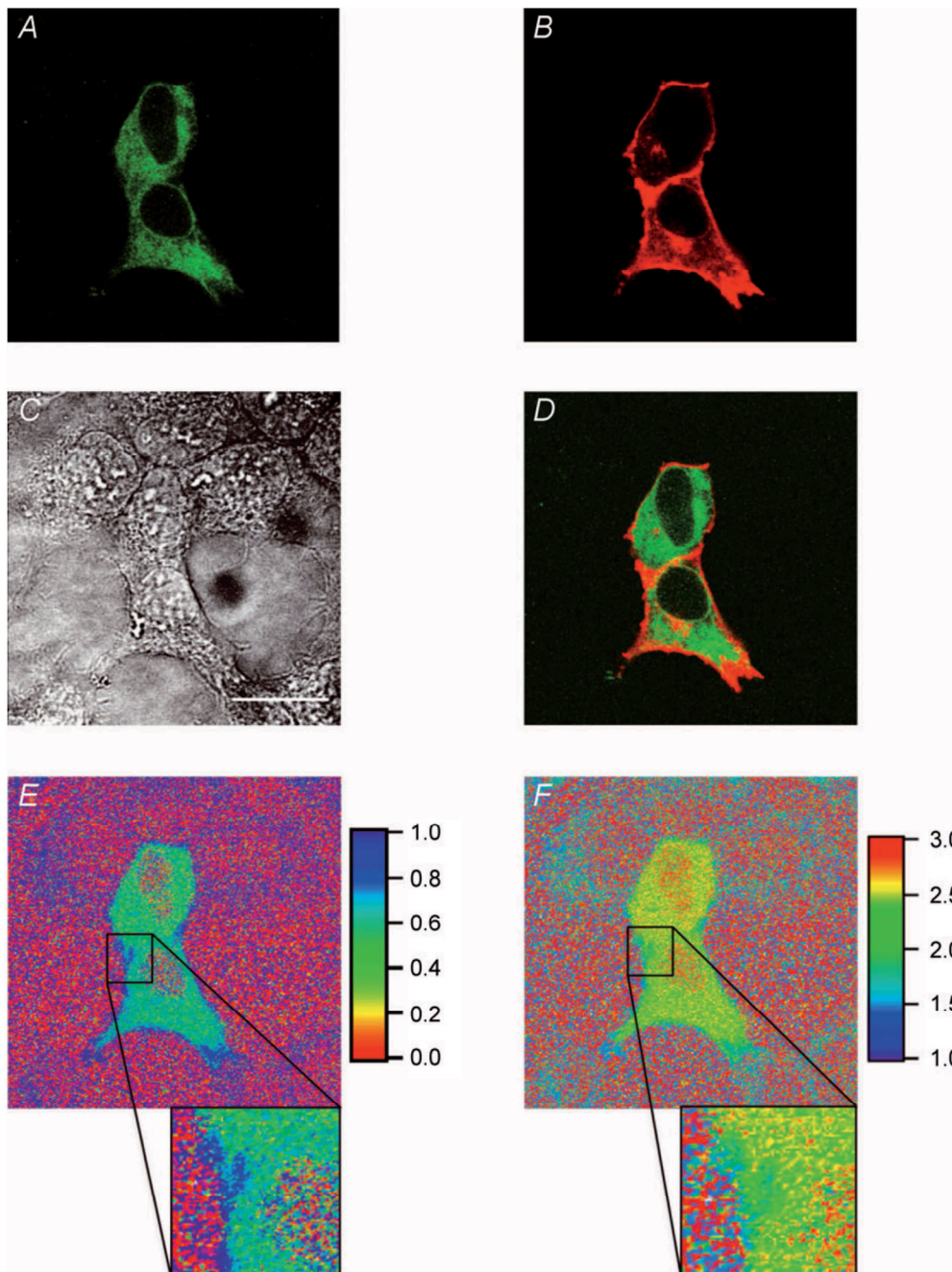


Abbildung 4.2-16: FLIM von HEK293 Zellen transfiziert mit TRPM2-eGFP und CD38-mKate2.

(A) und (B) zeigen repräsentative Fluoreszenzbilder für TRPM2-eGFP und CD38-mKate2. Während TRPM2 neben einer schwachen Membranlokalisation eher eine diffuse, perinukleäre Lokalisation zeigt, ist CD38 überwiegend an der Membran lokalisiert. (C) zeigt das Durchlichtbild der mikroskopierten Zellen und in (D) ist eine Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle dargestellt. In (E) und (F) ist die Interaktion beider Proteine anhand des auftretenden FRET sichtbar. In (E) ist der Anteil der interagierenden Proteine als α -Wert angegeben, wobei ein hoher Wert eine stärkere Interaktion bedeuten. In (F) sind die Lebenszeiten des *Donor*-Fluorophores (eGFP) in Nanosekunden angegeben. Je niedriger dieser Wert, desto größer ist der Energietransfer zwischen *Donor* und Akzeptor. Sowohl in (E) als auch in (F) sind die Regionen der Zellmembran deutlich unterschiedlich zum Rest der Zelle. Der Balken in (C) entspricht $20 \mu\text{m}$. (Entnommen aus (Numata *et al.*, 2012))

Es zeigte sich, dass TRPM2 neben einer geringfügigen Membranlokalisation eher diffus an Endomembranen lokalisiert war, während CD38 eine starke

Membranlokalisation aufweist, allerdings auch im inneren der Zelle vorkommt. In der Überlagerung beider Fluoreszenz-Kanäle (Abbildung 4.2-16 (C)) zeigten sich Bereiche an oder in der Nähe der Plasmamembran, die aufgrund der Überlagerung der Fluoreszenz gelb erscheinen. Dieser Hinweis auf räumliche Nähe der beiden Proteine wurde auch durch die Resultate der FLIM-Messung bestätigt. So zeigte sich in (E), dass ein großer Anteil, ca. 80%, der beiden Proteine in Nähe der Membran zu interagieren schien (α -Wert). Außerdem war die Lebenszeit von eGFP in diesem Bereich mit einem Durchschnitt von 2,0 ns deutlich kleiner als im Rest der Zelle, in dem diese im Schnitt 2,5 ns betrug. Diese Befunde deuteten, auf eine räumliche Nähe beider Proteine im Bereich der Plasmamembran hin. Um unspezifische Reduktion der Lebenszeiten von eGFP auszuschließen, wurden auch Zellen gemessen, die nur TRPM2-eGFP exprimierten.

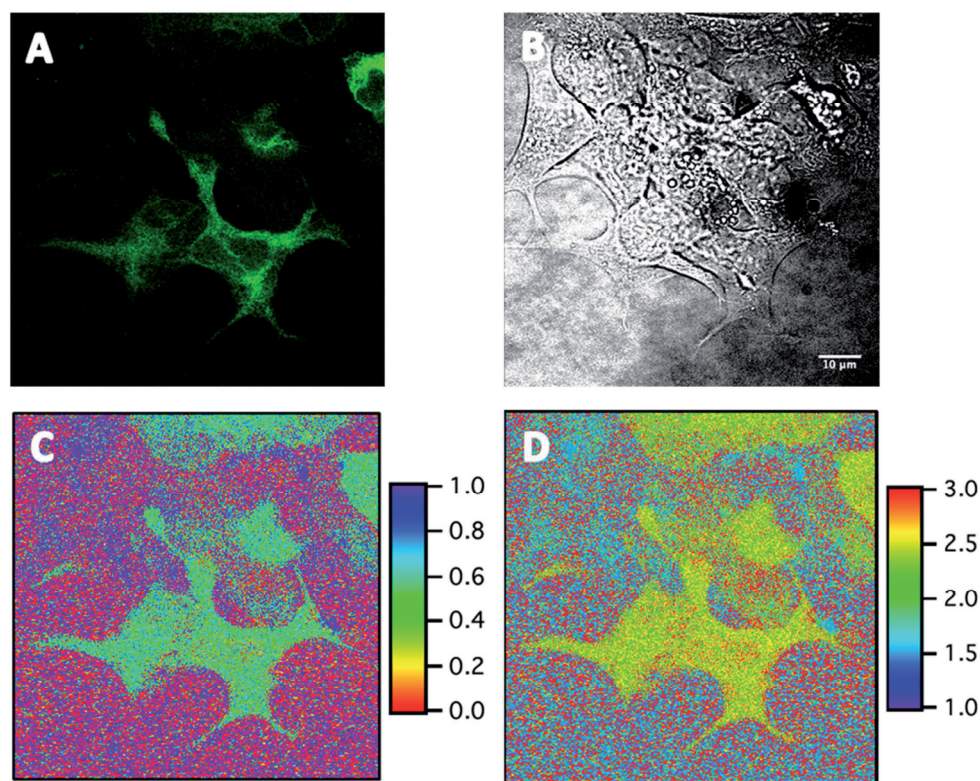


Abbildung 4.2-17: Donor-Kontrolle für TRPM2-eGFP

In (A) ist die Expression und Lokalisation von TRPM2-eGFP dargestellt. Auch in diesen Aufnahmen zeigt sich eine deutliche Lokalisation an Endomembranen. (B) zeigt das korrespondierende Durchlichtbild. In (C) und (D) sind die Werte pro Pixel, für die interagierende Fraktion (α -Wert) und die Lebenszeit des Fluorophores in Nanosekunden gezeigt. Die Markierung in (B) entspricht 10 μ m. (Entnommen aus (Numata *et al.*, 2012), Online Material)

Im Gegensatz zu den Zellen, in denen TRPM2-eGFP zusammen mit CD38-mKate2 exprimiert wurde, betrug die Lebenszeit von eGFP in diesem Versuch in der gesamten

Zelle ca. 2,5 ns (D). Zusätzlich zeigten sich keine Unterschiede in der interagierenden Fraktion in den Zellen (C). Die durchgeführten Messungen zeigen eine direkte Interaktion von TRPM2 und CD38. Hypertoner Stress führte bei den FLIM-Messungen, wie auch bei den *pull-down* Experimenten nicht zu einer Veränderung der Interaktion oder der Lebenszeiten.

4.2.3.2 Temperatur- und Osmolaritätsabhängigkeit des HICCs in HeLa-Zellen

TRPM2- Δ C ist für die Natrium-Ionenaufnahme in HeLa-Zellen im Laufe des RVIs und die damit verbundene Rückresorption von Wasser essentiell. Die Aktivität des HICCs stellt eine der Eckpfeiler der Volumenregulation in HeLa-Zellen da. Deshalb wurden, analog zum Vorgehen bei den FCS Messungen, auch die HICC-Ströme in HeLa-Zellen in Abhängigkeit von Temperatur und Osmolarität gemessen. Dabei wurden die Zellen für mindestens 20 Minuten bei der entsprechenden Messtemperatur in der Badkammer des Patch-Aufbaus inkubiert und anschließend gemessen. Für jede Messung wurden die erhaltenen Strom-Spannungs-Kennlinien ausgewertet. Wobei eine Messung bei isotoner Badlösung mit einer Messung bei voller Aktivierung des Kanals in hypertoner Badlösung verglichen wurde.

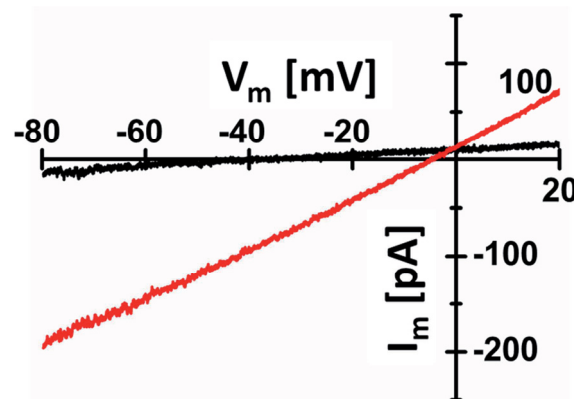


Abbildung 4.2-18: Whole-Cell Aufnahme in HeLa-Zellen.

Typische Messung der TRPM2-Ströme nach hypertoner Aktivierung. In schwarz ist der basale Strom gezeigt, während rot die maximale Aktivierung wiedergibt. Neben der Ausbildung von linearen Strömen kommt es nach Aktivierung zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials zu positiven Werten. Die gezeigte Messung wurde bei 25°C und mit 450 mosM Lösung aufgenommen.

Nach hypertoner Aktivierung bildeten sich lineare Ströme, die in Abhängigkeit von der Temperatur innerhalb von 5 bis 10 min ihr Maximum erreichten. Zusätzlich kam es zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials hin zu positiveren Werten. Im Beispiel ist eine Messung bei 25°C und 450 mosM gezeigt. Im Mittel ergab sich eine Stromdichte von $4,1 \pm 0,35$ pA/pF und ein Umkehrpotential von $-8,5 \pm 1,3$ mV.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Frank Wehner und Frau Dipl.-Biologin Lale Azer wurde der gleiche Temperatur- und Osmolaritätsbereich gemessen, der zuvor auch bei der Charakterisierung der Volumenregulation mittels FCS gewählt wurde. Von 35-5°C und von 360 bis 526 mosM.

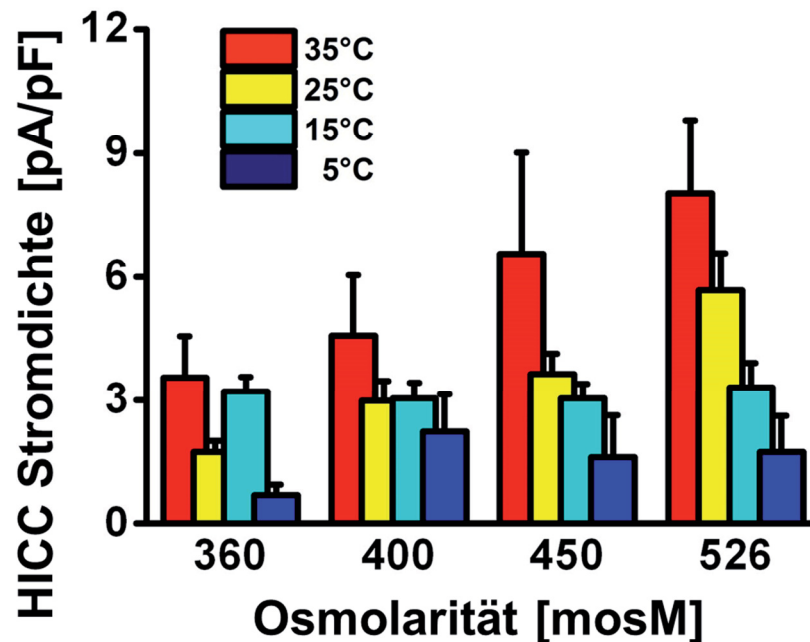


Abbildung 4.2-19: HICC-Ströme in Abhängigkeit von Temperatur und Osmolarität.

Dargestellt sind die Stromdichten bei den unterschiedlichen Temperaturen und Osmolaritäten. Mit steigender Osmolarität erhöhen sich bei 35°C und 25°C die Stromdichten während bei 15°C und 5°C kaum Unterschiede in den gemessenen Stromdichten zu erkennen sind. Ab 400 mosM ist die Stromdichte innerhalb einer verwendeten Osmolarität mit steigender Temperatur immer größer. n = 16-28 (35% eigene Messungen)

Die gemessenen Stromdichten zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der verwendeten Temperatur und Osmolarität für die Messungen bei 25°C und 35°C. Mit steigender Temperatur und mit steigender Osmolarität wurden die Stromdichten jeweils größer. Bei 15°C und bei 5°C war zwischen den einzelnen Osmolaritäten kaum ein Unterschied außerhalb des Messfehlers zu erkennen. Bei Betrachtung der einzelnen Osmolaritäten ergab sich ab 400 mosM mit Reduzierung der Temperatur eine Erniedrigung der entsprechenden Stromdichte. Die Abhängigkeit der Stromdichte von der Temperatur scheint insbesondere bei 450 und 526 mosM stärker ausgeprägt zu sein als bei den anderen beiden Osmolaritäten. Die temperaturabhängigen Messungen wurden zur Bestimmung von Aktivierungsenergien mittels Arrhenius-Plot ausgewertet (Abbildung 7.1-8 im Anhang). In der nachfolgenden Abbildung sind die ermittelten Aktivierungsenergien aufgetragen.

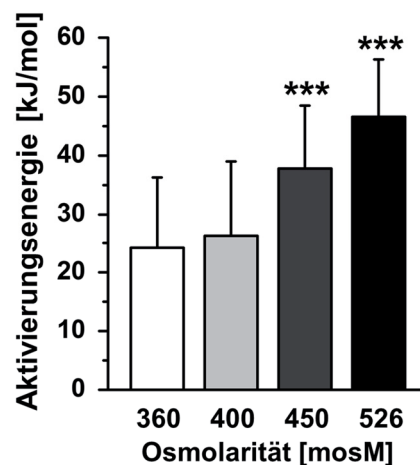


Abbildung 4.2-20: HICC Aktivierungsenergien

Auftragung der Aktivierungsenergien des HICCs in Abhängigkeit der verwendeten Osmolarität. Zwischen 400 und 450 mosM sind die Aktivierungsenergien signifikant erhöht, während die E_a s für 360 und 400 mosM annähernd gleich bleiben. Fehler sind dargestellt als Standardfehler des Mittelwertes, Signifikanzen beziehen sich auf den Wert bei 360 mosM.

Während die Aktivierungsenergien für 360 und 400 mosM noch sehr ähnlich sind, ist ab 450 mosM eine signifikante Erhöhung messbar. Es zeigt sich wiederum die gleiche Änderung zwischen 450 und 526 mosM, die auch bei den einzelnen Raten in Abbildung 4.2-19 zu erkennen ist. Der HICC zeigt somit ein ähnliches Aktivierungsmuster wie zuvor schon der RVI, jedoch mit durchweg höheren Aktivierungsenergien (vergleiche Abbildung 4.2-10).

4.2.4 Der NHE1 in HeLa - Zellen-Natrium-Aufnahme und pH-Wert-Änderung in Abhängigkeit von Temperatur und Osmolarität

Neben der Aktivierung des HICCs und der damit verbundenen Aufnahme von Kationen zur Rückgewinnung von Volumen regulieren HeLa-Zellen ihre Hydratation zum Teil durch die Aufnahme von Natrium-Ionen über Natrium-Protonen-Austauscher Klasse 1 (Na^+ - H^+ -Exchanger, NHE1). Um den Einfluss des NHE1 auf die Volumenregulation zu untersuchen, wurde die Änderung des zellulären pHs in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Dazu wurden Zellen mit dem pH-sensitiven Farbstoff 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF) beladen und die Veränderung des Zell-pHs bei hypertoner Stimulierung als Funktion der Zeit gemessen.

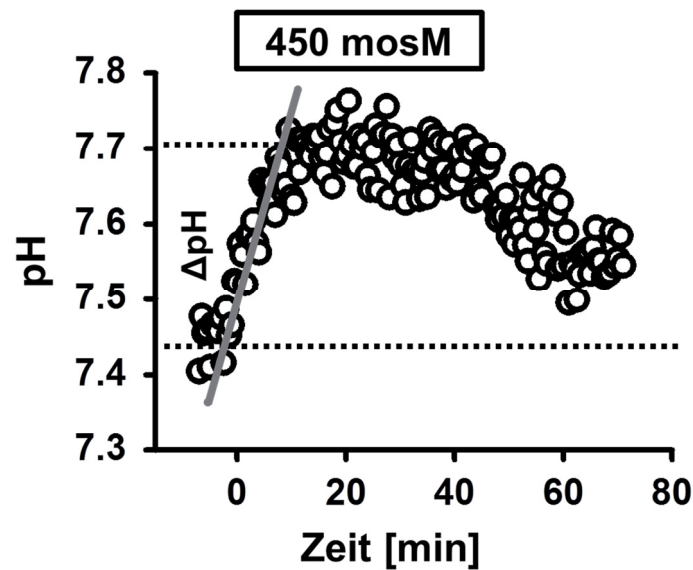


Abbildung 4.2-21: pH-Verlauf bei hypertonem Stress.

Repräsentative Messung der pH-Änderung mit der Zeit vor, während und nach hypertonem Stress bei 25°C. Direkt nach Zugabe der hypertonen Lösung kam es zu einem raschen Anstieg des Zell-pHs von 7,44 auf 7,7 mit anschließender Plateaubildung. Nach dem Wechsel zu isotoner Lösung sank der pH-Wert, allerdings deutlich langsamer als er angestiegen war. In Grau ist der Fit angedeutet, mit dem die Änderung des pHs mit der Zeit ermittelt wurde.

Beispielhaft ist in Abbildung 4.2-21 eine Messung bei 25°C und einem osmotischen Stress von 450 mosM gezeigt. Die Messungen wurden bei 15°C, 20°C und 25°C durchgeführt. Mit Beginn des hypertonen Stress kommt es zu einer Zunahme des zellulären pH-Werts von 7,45 auf 7,7. Diese Zunahme ist nicht durch das Schrumpfen der Zellen bedingt und wesentlich langsamer als dieses (vergleiche Abbildung 4.2-2). Vielmehr stellt die Zunahme des zellulären pH-Werts die Natrium-Aufnahme von HeLa-Zellen dar. Nach einem Wechsel zurück zu isotoner Lösung fiel der pH-Wert der Zellen wieder. Dies erfolgte allerdings sehr viel langsamer als der pH-Wert zuvor gestiegen war. Die graue Linie deutet den Fit an, mittels dessen die Rate der Zunahme des zellulären pHs ermittelt wurde. Nachdem die Änderung des pH-Wertes mit der Zeit bekannt war, konnte durch Multiplikation mit der Pufferkonstante von HeLa-Zellen (6,9 mM / pH; (Wu *et al.*, 2000)) die Rate des Protonenflusses berechnet werden. Diese Messungen wurden bei den genannten Temperaturen und bei 360, 400, 450 und 526 mosM durchgeführt.

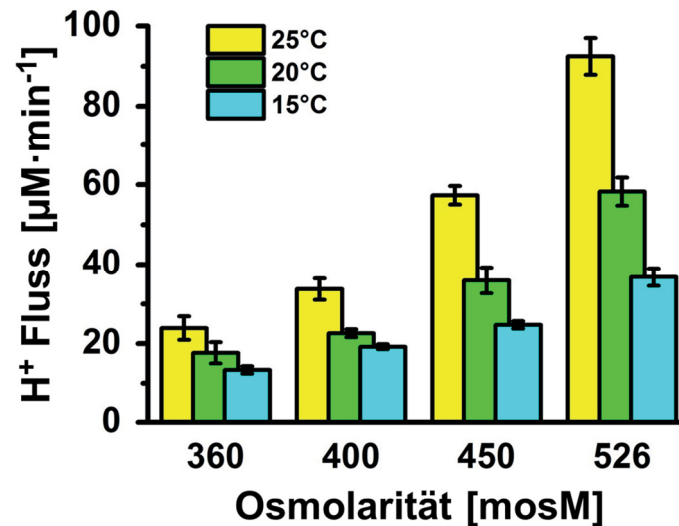


Abbildung 4.2-22: Protonenausstrom aus HeLa-Zellen bei hypertonem Stress.

Raten des Protonenflusses bei HeLa-Zellen mit verschiedenen osmotischen Stimuli. Mit steigender Temperatur und mit steigender Osmolarität strömen mehr Protonen aus den Zellen. Insbesondere bei 450 und 526 mosM erkennt man eine klare Abhängigkeit zwischen Temperatur und Protonenfluss. n = 8-12 für jede Bedingung.

Es wird eine Abhängigkeit des Protonenflusses von der verwendeten Osmolarität und der Messtemperatur sichtbar. So fällt dieser sowohl durch Verringerung der Temperatur als auch durch die Verwendung von niedrigeren Osmolaritäten. Zwischen 400 und 450 mosM kommt es zu einer Veränderung der Aktivierung und bei den höheren Osmolaritäten zu einer deutlicheren Aktivierung des NHE1 und zu einem stärkeren Protonentransport. Durch die bekannte Stöchiometrie des NHE1 von 1:1 (Na^+ zu H^+) war gleichzeitig klar, wie viel Natrium pro Zeit über den Austauscher in die Zellen aufgenommen wurde. Wie zuvor wurden auch für die temperaturabhängigen Transportraten von Protonen/ Natrium die Aktivierungsenergien bei den jeweiligen Osmolaritäten berechnet. Die entsprechenden Arrhenius-Plots sind im Anhang gezeigt (Abbildung 7.1-9) und die nachfolgende Abbildung fasst die erhaltenen Aktivierungsenergien zusammen.

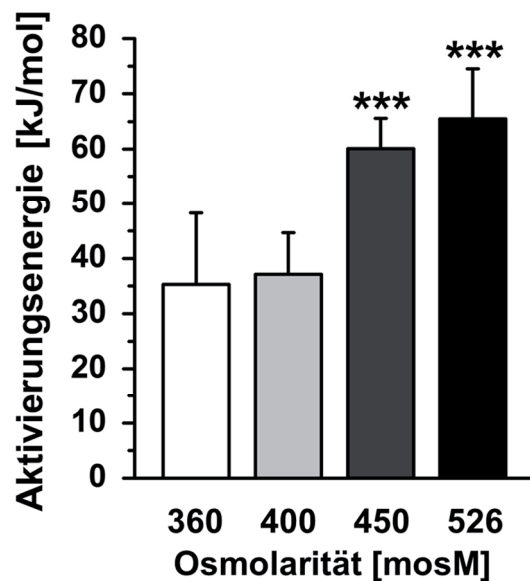


Abbildung 4.2-23: Aktivierungsenergien von NHE1 in HeLa-Zellen

Darstellung der Aktivierungsenergien von NHE1 in Abhängigkeit der Osmolarität. Während die Werte bei 360 und 400 mosM sehr ähnlich sind, sind bei 450 mosM und 526 mosM ein deutlicher Anstieg der Aktivierungsenergie des NHE1 zu beobachten. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Werte bei 360 mosM.

Wie bereits bei den Aktivierungsenergien des HICCs in HeLa-Zellen, zeigt auch der NHE1 eine deutliche Erhöhung der Aktivierungsenergie bei Stimulierung mit 450 oder 526 mosM während bei 360 und 400 mosM annähernd gleiche Aktivierungsenergien ermittelt wurden.

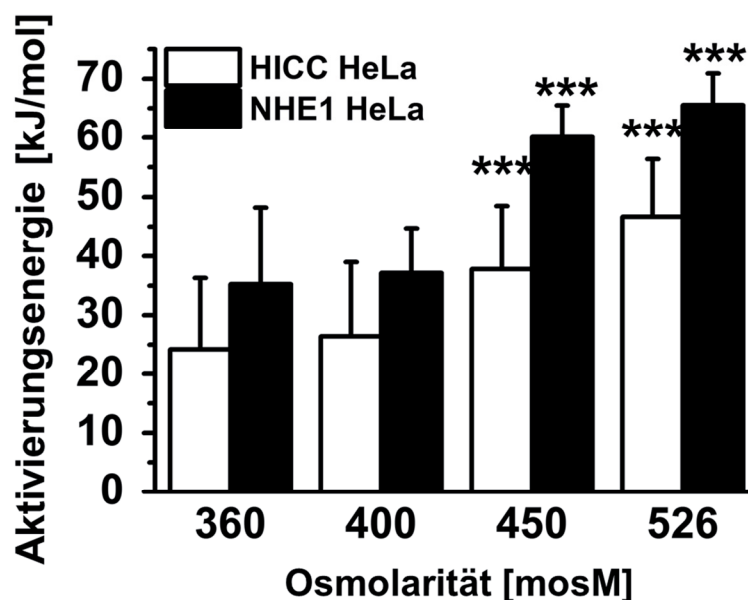


Abbildung 4.2-24: Vergleich der Aktivierungsenergien von HICC und NHE1.

Sowohl der HICC als auch der NHE1 zeigen kaum Unterschiede zwischen den Aktivierungsenergien bei 360 mosM und 400 mosM. Bei Verwendung von 450 mosM und 526 mosM kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivierungsenergie.

Der Vergleich zwischen HICC und NHE1 zeigt ein sehr ähnliches Aktivierungsprofil. Der Wechsel zwischen 400 und 450 mosM führt bei beiden zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivierungsenergie. Dabei sind die $E_{a,s}$ des NHE1 jeweils größer als die des HICCs. Die Differenz beträgt bei 360 und 400 mosM ~ 10 kJ/ mol und danach ~ 20 kJ/ mol. Diese Befunde machen deutlich, dass beide Transporter am RVI beteiligt sind. Die geringere Aktivierungsenergie des HICCs könnte sowohl für eine frühere Aktivierung als auch eine größere Beteiligung am RVI, gegenüber dem NHE1, sprechen.

4.3 Kryo-Präservation von Zellen

Die Kryo-Präservation ist eine lang etablierte Methode zur Langzeit-Lagerung von Zellen. Diese werden unter standardisierten Bedingungen mit Kryoprotektiva wie DMSO gefroren und dann bei ca. -150°C oder -196°C über Monate und Jahre gelagert. Es gibt jedoch einige Zellen die diese Prozedur nicht überleben, bei denen jedoch eine Lagerung, aufgrund ihrer Bedeutung für die Wissenschaft, von großem Interesse wäre. Hier sei als ein Beispiel die Lagerung von primären Zellen angeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob und in welchem Rahmen die Volumenregulation von Zellen einen Einfluss auf das Zellüberleben nach dem Frieren hat um so den Prozess der Kryo-Konservierung zu verbessern.

4.3.1 Entwicklung eines Kryo-Protokolls zum adhären Frieren unter Verbesserung der Volumenregulation

Um Messungen an gefrorenen Zellen direkt oder kurz nach deren Auftauen durchführen zu können, mussten die Zellen, nicht wie üblich in Suspension, sondern im adhären Zustand gefroren werden. Dazu wurde zusammen mit Frau Dipl.-Biologin Lale Azer ein Verfahren entwickelt, um Zellen auf Deckgläsern adhären zu frieren und mit hohen Überlebensraten wieder zu tauen. Die ergab die Möglichkeit Zellen als Verband zu frieren und direkt nach dem Auftauen zu messen. Die Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten Deckgläsern ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% wachsen gelassen. Zum Frieren wurden die Zellen mit dem Deckglas kurzfristig in 4°C Zellkulturmedium mit 10% DMSO überführt und im Anschluss auf die Stege von „Mr. Frosty“ Kryo-Containern platziert. Nachdem diese mit Zellkulturmedium komplementiert mit 10% DMSO überschichtet wurden, konnten die Zellen mit einer Geschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gefroren. Zum Auftauen wurden

die Deckgläser im gefrorenen Zustand aus den Kryo-Containern entnommen und sofort in 37°C warmes Zellkulturmedium überführt. So wurden die Zellen aufgetaut und gleichzeitig das toxische DMSO auf unkritische Mengen verdünnt.

Die Vermutung, dass die Volumenregulation beim Auftauen essentiell für das Überleben der Zellen ist, führte unter Anderem zu der Idee den HICC mittels Vasopressin zu stimulieren. Dieses Peptid-Hormon wirkt normalerweise in der Niere und bewirkt, neben dem vermehrten Einbau von AQP2 in die Membran von Zellen, eine Stimulation der alpha-Untereinheit des ephitelialen Natriumkanals (α -ENaC). Dieser Kanal ist, zusammen mit anderen Untereinheiten, der HICC in HepG2-Zellen (Bondarava *et al*, 2009). Durch die Ergebnisse der Patch-Clamp Messungen nach Kryo-Bedingungen, insbesondere mit Vasopressin, war deutlich geworden, dass neben dem Frieren von Zellen auch das Hormon Vasopressin einen Einfluss auf die ausgebildeten Ströme von Zellen hatte (Vergleiche 4.3.3). Aus diesem Grund sollte der Einfluss von Vasopressin auf die Vitalität nach dem Frieren von Zellen getestet werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Frieren 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und ihre Vitalität mittels Trypan-Blau Färbung getestet.

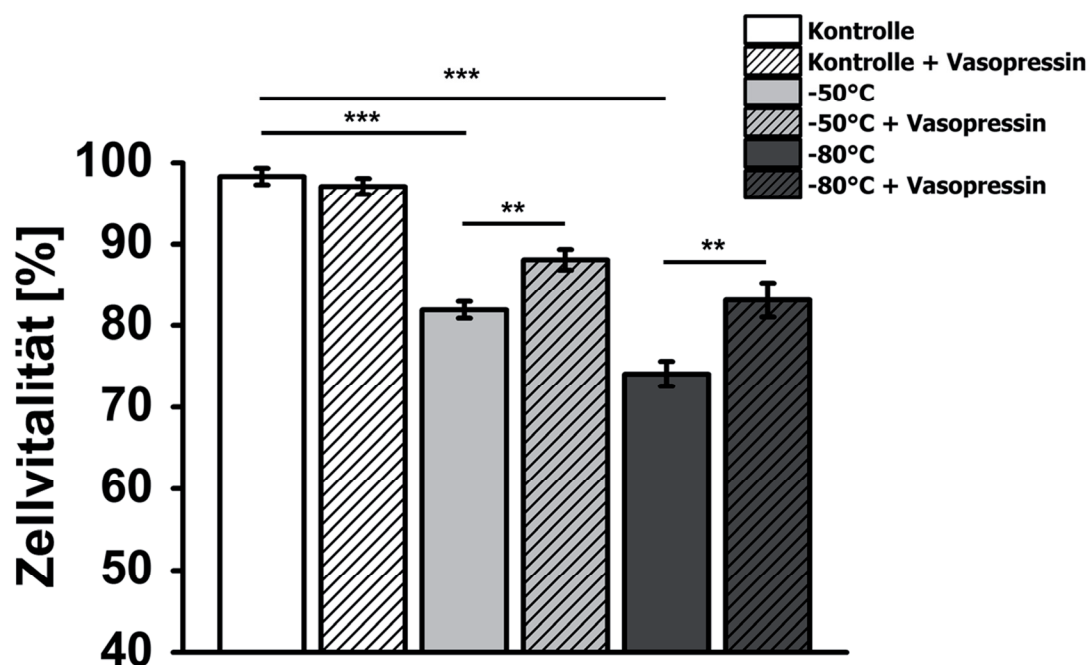


Abbildung 4.3-1: Überleben von HeLa-Zellen nach dem Frieren als adhärentem Kultur.

Vitalität von HeLa-Zellen bei Kontrollbedingungen und nach dem Frieren zu -50°C und -80°C. Bei beiden Temperaturen kam es zu einem signifikanten Verlust an vitalen Zellen. 100 nM Vasopressin führte sowohl bei Frieren zu -50°C als auch bei -80°C zu signifikant höheren Zellvitalitäten. n = 7

Die durchgeführten FCS-Messungen bedurften HeLa-Zellen in Form eines *Monolayers*, um die Volumenregulation zu messen. Aus diesem Grund sollten die Zellen für Messungen nach dem Frieren als *Monolayer* gefroren werden, damit sie direkt nach dem Auftauen für die Mikroskopie eingesetzt werden konnten. Das Frieren von Zellen als adhärenente Kulturen führte zu einer signifikanten Reduzierung an vitalen Zellen nach dem Auftauen. Die ermittelten Werte von ca. 80% nach -50°C und 75% nach -80°C liegen unter den Vitalitäten von in Suspension gefrorenen Zellen (ca. 90% Vitalität), sind aber noch gut geeignet, um weitere Messungen an diesen Zellen durchzuführen. Die Inkubation von Zellen vor dem Frieren für 1 h bei 37°C mit 100 nM Vasopressin, führte zu einer signifikant höheren Vitalität der Zellen nach dem Frieren bei beiden Temperaturen.

Die Vitalitätsmessungen in Abbildung 4.3-1 konnten jeweils nur einen einmaligen Zustand der Zellen direkt nach dem Auftauen widerspiegeln. Um darüber hinaus weitere Erkenntnisse des Frierens auf die Zellen und insbesondere der Wirkung von Vasopressin in diesem Zusammenhang zu gewinnen, wurde die Proliferationsgeschwindigkeit von gefrorenen Zellen nach dem Auftauen analysiert. Die Proliferation ist ein indirektes Maß für die Volumenzunahme und bedarf ähnlicher Mechanismen wie der RVI. Dazu wurden die Zellen nach dem Auftauen durch sanften Mediumstrom abgelöst und die Zelldichte anhand von Impedanzmessungen bestimmt (RTCA, *Real-Time Cell Analyzer*). Mittels RTCA-Messungen konnte die Zelldichte während dem Wachstum bei Standardbedingungen über die Impedanzänderung alle 15 min gemessen und so Wachstumskurven der Zellen erstellt werden.

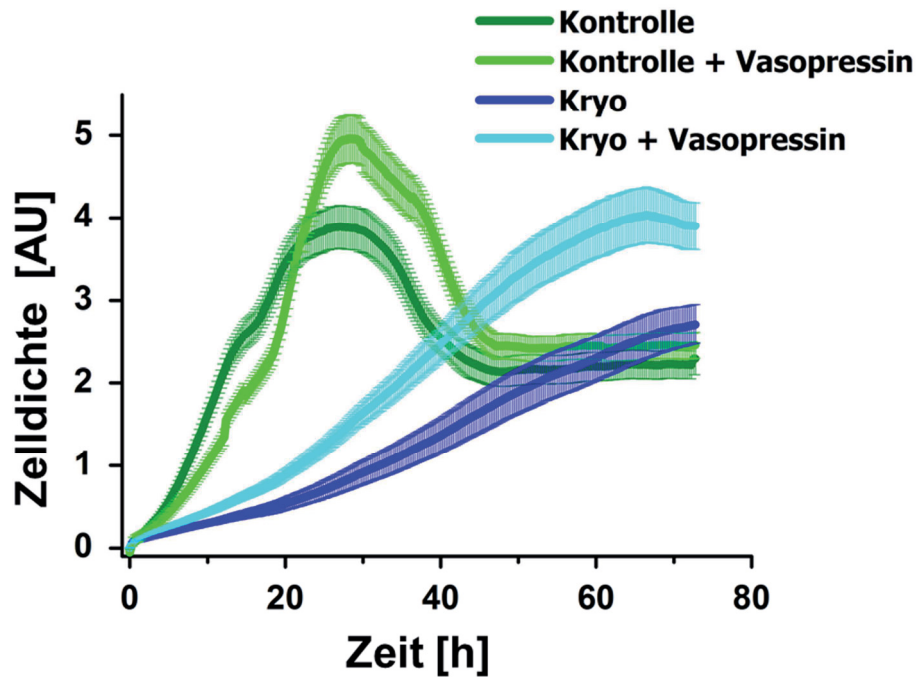


Abbildung 4.3-2: Zellproliferation von HeLa-Zellen.

Aufgetragen ist die Zelldichte von HeLa-Zellen gegen die Zeit. Unter Kontrollbedingung kam es zu einem normalen Zellwachstum welches durch die Zugabe von Vasopressin wenig geändert wird. Nach dem Frieren von Zellen ist der Wachstum deutlich langsamer kann aber durch die Inkubation mit 100 nM Vasopressin vor dem Frieren verbessert werden. Dargestellt sind Mittelwerte aus 5 Messung und der SEM.

Es zeigte sich, dass das Wachstum von HeLa-Zellen nach Frieren deutlich verlangsamt war. Die Zugabe von Vasopressin hatte auf die Proliferation von ungefrorenen Zellen kaum eine Wirkung, führt aber bei zuvor gefrorenen Zellen zu einer deutlich verstärkten Proliferation. Der Vergleich der Proliferationsraten erfolgte durch die Berechnung der 1. Ableitung der Funktion, die gegen die Zeit aufgetragen wurde. Da die Kurven der ungefrorenen Zellen jedoch zu viele Schwankungen aufwies konnte eine sinnvolle Darstellung nur für die Messungen nach dem Frieren erstellt werden (Abbildung 4.3-3).

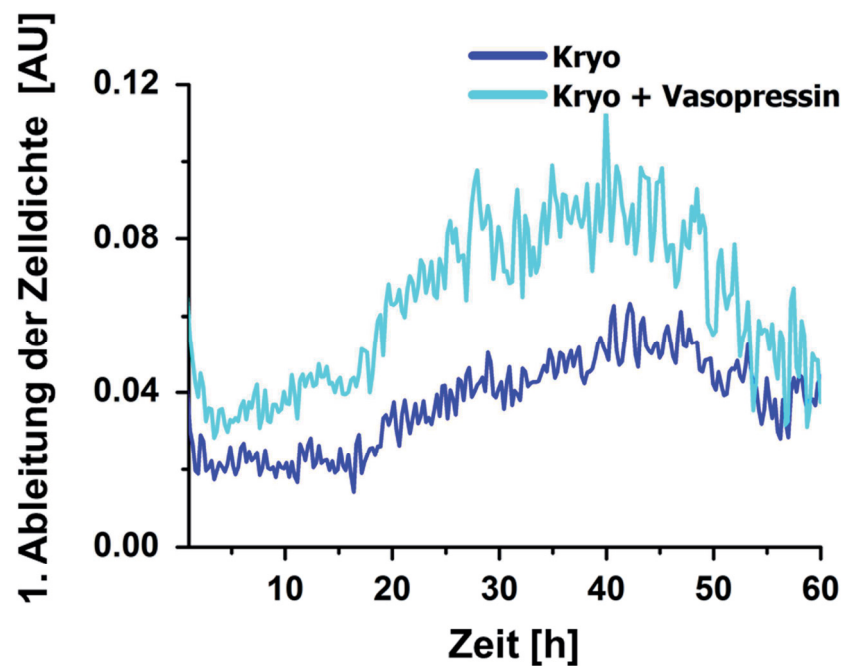


Abbildung 4.3-3: Geschwindigkeit der Zellproliferation nach Frieren.

Erste Ableitung der Werte aus Abbildung 4.3-2. Auch die tatsächlichen Raten der Zellproliferation von HeLa-Zellen zeigen den positiven Einfluss von Vasopressin auf die Proliferation von Zellen nach Frieren. Erkennbar ist auch, dass Proliferation erst nach ca. 20 Stunden beginnt.

Die Auftragung der Proliferationsgeschwindigkeit von aufgetauten Zellen untermauert denselben Trend wie zuvor die Wachstumskurven. Die Behandlung von HeLa-Zellen mit 100 nM Vasopressin vor dem Einfrieren resultiert in erhöhten Proliferationsgeschwindigkeiten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

4.3.2 Volumenregulation nach Kryo-Konservierung

Nachdem ein Protokoll für das Frieren von adhären Zellen gefunden und optimiert wurde, sollten die Volumenregulation der gefrorenen Zellen mittels FCS nach Kryo-Bedingungen analysiert werden. Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, gefroren, nach dem Tauen für 30 min vorinkubiert und unter der Verwendung der in 4.2.1 beschriebenen Protokolle gemessen. In diesem Fall wurden 450 mosM als repräsentative Osmolarität ausgewählt und die Messungen wiederum bei den vier Temperaturen 35°C, 25°C, 15°C und 5°C durchgeführt. Die Unterschiede zwischen Zellen vor und nach dem Frieren sind in Abbildung 4.3-4 beispielhaft dargestellt.

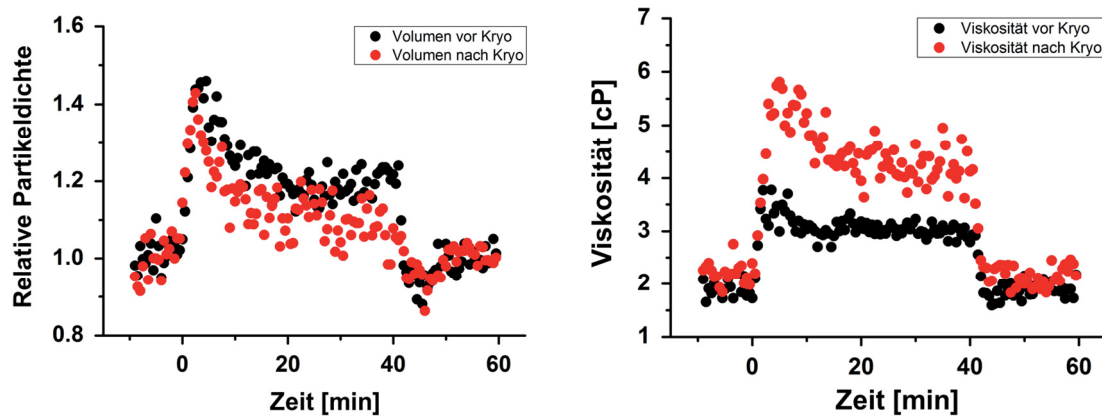


Abbildung 4.3-4: Vergleich von Volumen- und Viskositätsänderung vor und nach Frieren.

Zum Vergleich der Volumen- und Viskositätsverläufe wurden die Messungen von einer ungefrorenen und einer gefrorenen Zelle überlagert. Links, in der Darstellung für die Volumenänderungen ist zu erkennen, dass Schrumpfen und Schwellen bei beiden Bedingungen ähnlich ist, der RVI der gefrorenen Zellen (rot) dafür aber deutlich schneller. Bei der Betrachtung der Viskositätsverläufe (rechts) werden deutliche Unterschiede in der absoluten Änderung so wie in der Geschwindigkeit der Änderung der Viskosität sichtbar. (Beide Messungen sind bei 35°C und mit 450 mosM aufgenommen)

Die Überlagerung der Messungen von Zellen vor und nach dem Frieren macht die vorhandenen Unterschiede deutlich. Obwohl die Zellen auf ein annähernd gleiches Niveau schrumpfen, ist der RVI nach dem Frieren schneller als davor. Ebenfalls ist der Volumengewinn der gefrorenen Zellen während des RVI größer. Dagegen unterscheiden sich die Raten von Schrumpfen und Schwellen augenscheinlich nicht. Bei der Viskositätsmessung fällt insbesondere die deutlich höhere Viskosität der gefrorenen Zellen unter hypertone Stress auf. Der zeitliche Verlauf von Viskositätssteigerung bei Schrumpfen und der Viskositätsverminderung beim anschließenden Schwellen, zuvor gefrorener Zellen, ist etwa vergleichbar.

Um dies und die anderen Raten der Volumen- und Viskositätsänderungen zu bestimmen, wurden die erhaltenen Messwerte wie in Abschnitt 4.2.1 gefittet. Die erhaltenen Raten sind im Folgenden dargestellt. Um auch hier den Einfluss von Vasopressin auf die Volumenregulation zu testen, wurden Zellen vor dem Frieren für 1 h mit 100 nM Vasopressin inkubiert und dann gefroren. Diese Zellen wurden, wie zuvor die ungefrorenen Zellen, gemessen und die Daten ausgewertet. Zum Vergleich sind die Werte von gefrorenen Zellen ohne und mit Vasopressin im Nachfolgenden zusammen dargestellt.

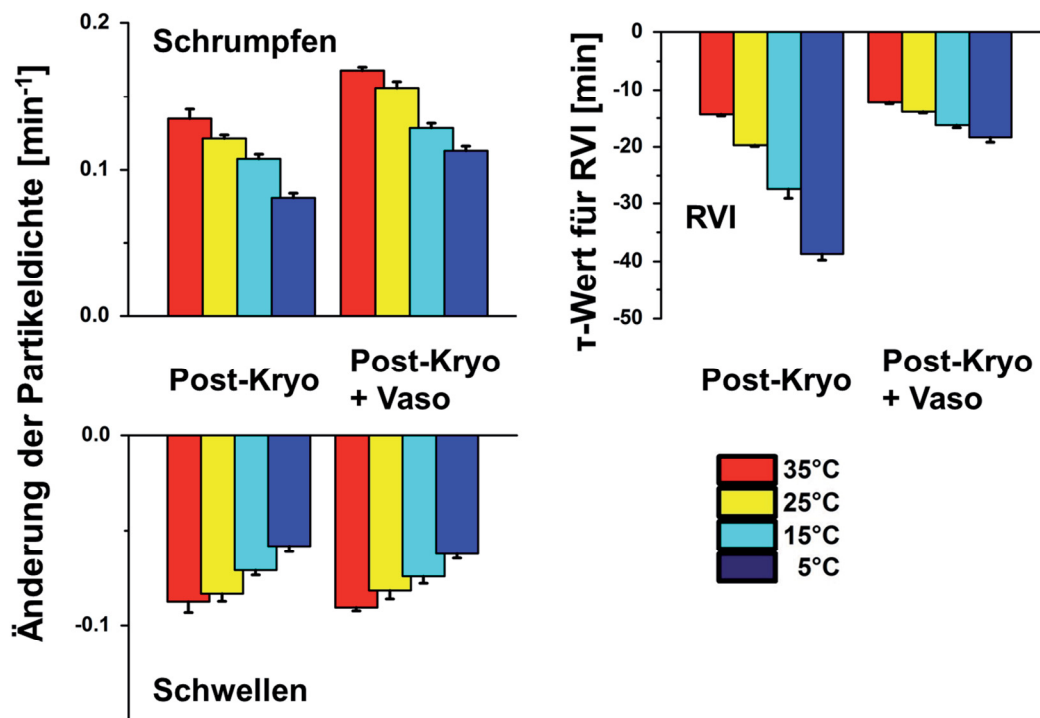


Abbildung 4.3-5: Raten der Volumenänderung von HeLa-Zellen bei 450 mosM nach Frieren ohne und mit Vasopressin.

Vergleich der Raten der Volumenänderung von gefrorenen HeLa-Zellen ohne und mit einstündiger Vasopressin-Inkubation vor dem Frieren. Das Zellschrumpfen ist bei den Zellen nach Vasopressin-Inkubation leicht erhöht und der RVI ist nach Vasopressin-Gabe, insbesondere bei den niedrigeren Temperaturen, deutlich schneller. Mittelwerte \pm SEM, $n = 5$

Wie bei den Messungen an ungefrorenen Zellen (Abbildung 4.2-4, Abbildung 4.2-5) zeigen alle drei Parameter eine Abhängigkeit von der Temperatur. Sowohl Schrumpfen und Schwellen als auch der RVI sind mit sinkender Temperatur langsamer. Ein Vergleich des RVI von zuvor gefrorenen mit den ungefrorenen Zellen (Abbildung 4.2-5) zeigt, dass bei allen Temperaturen der RVI nach dem Frieren der Zellen deutlich beschleunigt ist. Die Vasopressinbehandlung hatte zur Folge, dass die gefrorenen und wieder aufgetauten Zellen bei allen Temperaturen schneller Schrumpfen und gleichzeitig einen schnelleren RVI aufweisen (Abbildung 4.3-5). Dabei ist der Effekt auf den RVI deutlich ausgeprägter als auf Aquaporine.

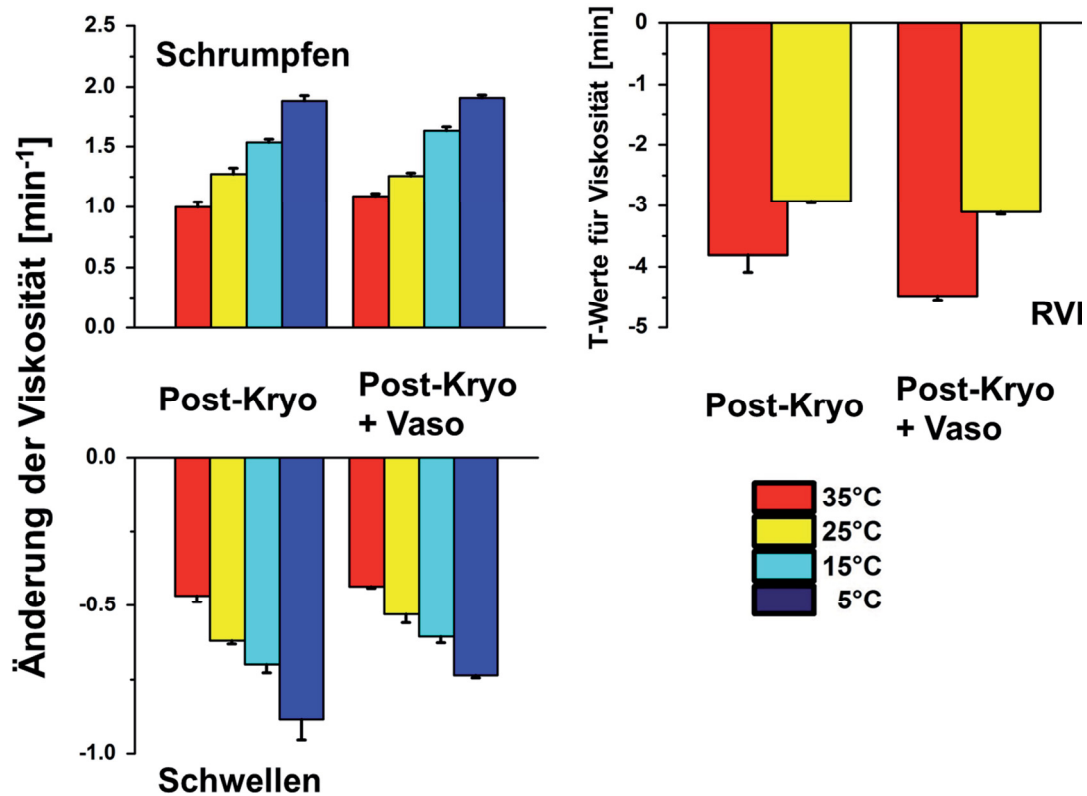


Abbildung 4.3-6: Raten der Viskositätsänderung von HeLa-Zellen bei 450 mosM nach Frieren ohne und mit Vasopressin.

Dargestellt sind die Änderungen der Viskosität beim Zell-Schrumpfen, Zell-Schwellen und dem RVI sowohl für Zellen ohne als auch mit vorhergegangener Vasopressin-Inkubation. Es gibt eine deutliche Abhängigkeit der Raten von der Temperatur. Vasopressin-Vorbehandlung hat keinen Einfluss auf die Raten der Viskositätsänderung beim Schrumpfen und Schwellen der Zellen hat. Die Änderungen der Viskosität im Verlauf des RVI sind nach Vasopressin-Behandlung bei 35°C höher. Mittelwerte \pm SEM, n = 5

Der Vergleich der Viskositätsänderungen an ungefrorenen Zellen (Abbildung 4.2-6) mit den Messungen an gefrorenen Zellen, zeigt eine umgekehrte Anhängigkeit der Viskosität von der Temperatur, im Vergleich zur Volumenänderung. Im Gegensatz zur Volumenänderung hat die Vorbehandlung mit Vasopressin keinen Einfluss auf die Raten der Viskositätsänderung. Aus den gewonnenen Daten wurden ebenfalls wieder die Aktivierungsenergien der einzelnen Prozesse bestimmt. Die entsprechenden Arrhenius-Plots sind im Anhang unter Abbildung 7.1-11 bis Abbildung 7.1-14 gezeigt. Die daraus erhaltenen Werte sind im nachfolgenden Diagramm (Abbildung 4.3-7) dargestellt.

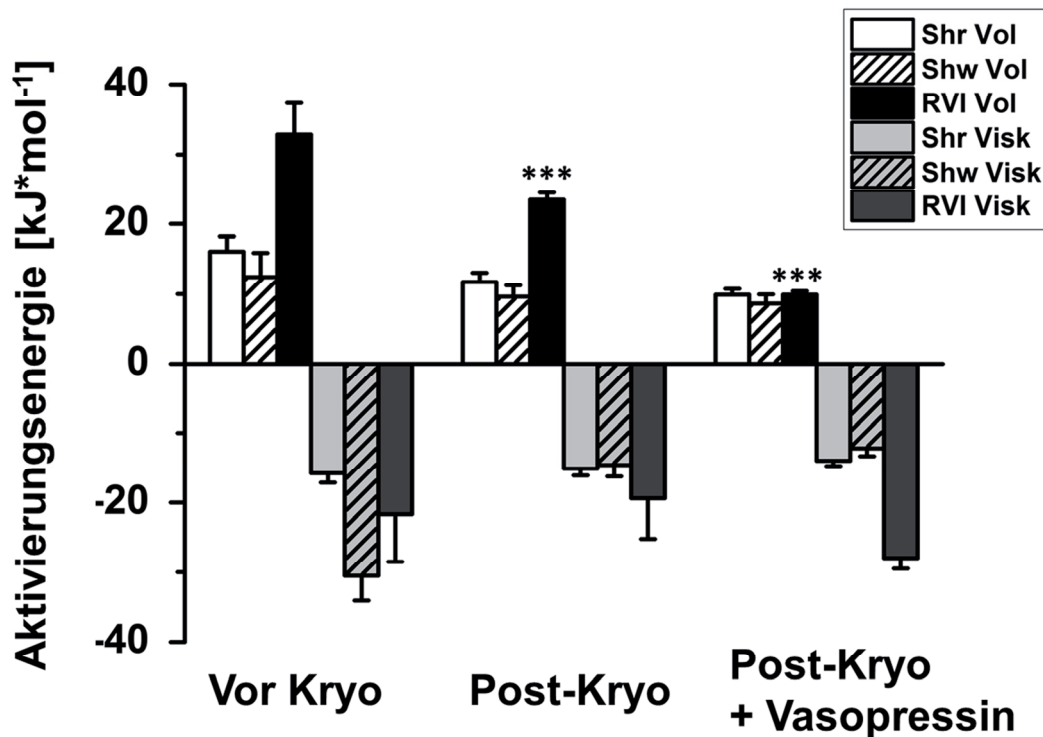


Abbildung 4.3-7: Aktivierungsenergien der Volumenregulation vor und nach dem Frieren von HeLa-Zellen.

Gezeigt sind die Werte für Zellen ohne und mit Vorbehandlung mit Vasopressin, sowie die Werte von ungefrorenen Zellen zum Vergleich. Während Schrumpfen und Schwellen lediglich eine leichte Reduktion in ihren Aktivierungsenergien zeigen, sind die Aktivierungsenergien für den RVI nach der Behandlung mit Vasopressin signifikant kleiner. Abgesehen von der Änderung der Aktivierungsenergie der Viskosität beim Zellschrumpfen zeigt sich kein klarer Einfluss des Frierens, als auch der Vasopressin-Behandlung auf die Änderungen der Viskosität. Gezeigt sind die Mittelwerte der Aktivierungsenergien mit Standardfehler.

Die Aktivierungsenergien der vorab gefrorenen Zellen sind, im Vergleich mit den Werten der ungefrorenen Zellen, nach dem Frieren jeweils kleiner. Insbesondere der RVI ist nach dem Frieren von Zellen signifikant kleiner, während die E_a s für die passiven Wassertransportprozesse beim Schrumpfen und Schwellen nur minimal verringert sind. Darüber hinaus führt Vasopressin, im Vergleich zu gefrorenen Zellen, zu einer weiteren, signifikanten Verringerung der Aktivierungsenergie des RVI, während das Schrumpfen und Schwellen kaum verändert sind. Bei der Betrachtung der Viskositätsänderungen fällt lediglich eine klare Änderung der Aktivierungsenergie beim Schwellen der Zelle auf. Diese nimmt nach dem Frieren der Zellen ab. Die Vasopressin-Behandlung der Zellen hat auf keinen Prozess der Viskositätsänderung einen signifikanten Einfluss. Es konnte ein deutlicher Einfluss des Frierens auf die Volumenregulation festgestellt werden. So ist insbesondere der RVI nach dem Frieren von Zellen erhöht. Durch Stimulation mit Vasopressin lässt sich dieser Effekt nochmals verstärken.

4.3.3 HICC-Ströme zuvor gefrorener HeLa-Zellen

Parallel zum Vergleich der Volumenregulation vor und nach Frieren von Zellen, sollten die HICC-Ströme von HeLa-Zellen auf ihre Veränderung nach dem Frieren untersucht werden. In diesem Fall wurden HeLa-Zellen nach dem klassischen Protokoll in Suspension mit 10% DMSO gefroren und nach dem Auftauen in frischem Medium resuspendiert und für 30 min vor der Messung bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen für Patch-Clamp Messungen verwendet. Es wurden zunächst Messungen bei 25°C und mit 450 mosM Lösung, als hypertoner Stimulus, durchgeführt.

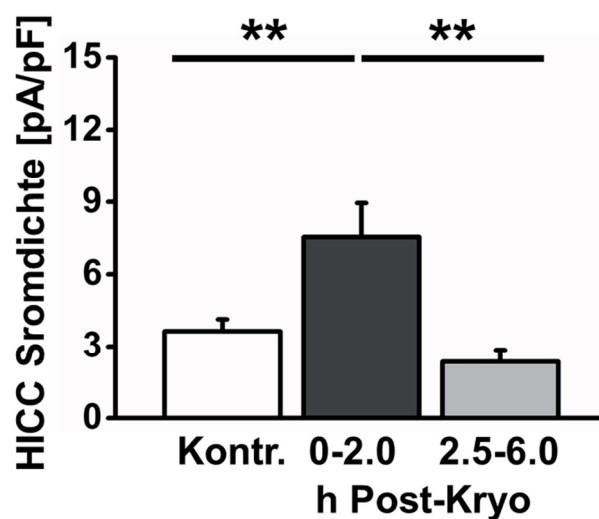


Abbildung 4.3-8: HICC-Stromdichte nach Frieren von HeLa-Zellen.

Vergleich der HICC Stromdichten von ungefrorenen und gefrorenen HeLa-Zellen. Bis zu zwei Stunden nach dem Auftauen zeigen die Zellen eine signifikant erhöhte Stromdichte, die zu einem späteren Zeitpunkt wieder auf Kontrollniveau sinkt.

Bei der Messung der HICC-Stromdichte fiel auf, dass die Zellen zwischen null und zwei Stunden nachdem sie wieder aufgetaut wurden, eine deutlich höhere Stromdichte aufwiesen als die Kontrollzellen. Diese Erhöhung war zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Diese akut auftretenden, erhöhten Ströme könnten eine Antwort der Zelle auf das Frieren sein und sollten im Folgenden genauer charakterisiert werden. Dazu wurden Messungen an, zuvor gefrorenen und wieder aufgetauten, Zellen nach null bis zweieinhalb Stunden durchgeführt. Als Messtemperaturen wurden 35°C, 25°C und 15°C, sowie einem osmotischen Stimulus von 450 mosM gewählt. Messungen bei 5°C waren auf Grund des vorab erfahrenen Stresses durch das Frieren der Zellen nicht möglich.

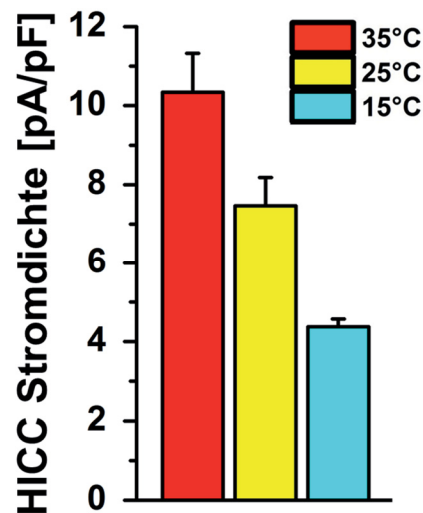


Abbildung 4.3-9: HICC-Stromdichten nach dem Frieren von HeLa-Zellen in Abhängigkeit der von Temperatur.

Darstellung der einzelnen Stromdichten in Abhängigkeit von der Temperatur. Alle Messungen wurden bei 450 mosM durchgeführt. Mit sinkender Temperatur kommt es zu einer Reduktion der gemessenen Stromdichte. n = 5-7

Über die temperaturabhängige Stromdichte hinaus, zeigten die zuvor gefrorenen Zellen eine um ca. 50% größere Stromdichte als ungefrorene Zellen. Das Frieren der Zellen bedingt somit eine deutliche Stimulation des HICCs. Aus den erhaltenen Daten konnte mit Hilfe eines Arrhenius-Plots die Aktivierungsenergie des HICCs in HeLa-Zellen nach dem Frieren der Zellen berechnet werden (Siehe Abbildung 7.1-15). Nachfolgend sind die Aktivierungsenergien vor und nach dem Frieren von HeLa-Zellen vergleichend dargestellt.

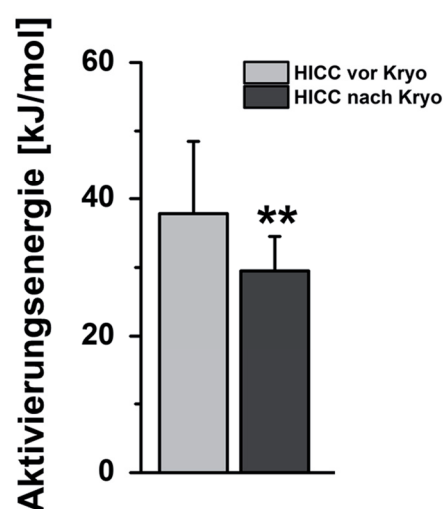


Abbildung 4.3-10: HICC Aktivierungsenergien bei 450 mosM vor und nach dem Frieren.

Darstellung der Aktivierungsenergien des HICC bei 450 mosM. Verglichen werden Zellen vor dem Frieren und 0-2,5 h nach dem Frieren. Es kommt zu einer signifikanten Erniedrigung der der Aktivierungsenergie bei zuvor gefrorenen Zellen.

Diese lag bei vergleichbaren Bedingungen mit $29,4 \pm 4,99$ kJ/ mol signifikant unter der Aktivierungsenergie von nicht gefrorenen Zellen mit $37,8 \pm 10,7$ kJ/ mol. Durch die Prozesse beim Frieren der Zelle kam es somit zu einer Aktivierung des HICCs, was sich in einer nachfolgenden, geringeren Aktivierungsenergie zeigte. Analog zu den vorangegangenen Messungen sollte der Einfluss von Vasopressin auf die HICC-Stromdichte der HeLa-Zellen getestet werden. Dazu wurden die Zellen vor dem Frieren für 1 h mit 100 nM Vasopressin inkubiert. Im Anschluss wurde die Stromdichte wieder aufgetauter Zellen innerhalb der ersten zwei Stunden gemessen.

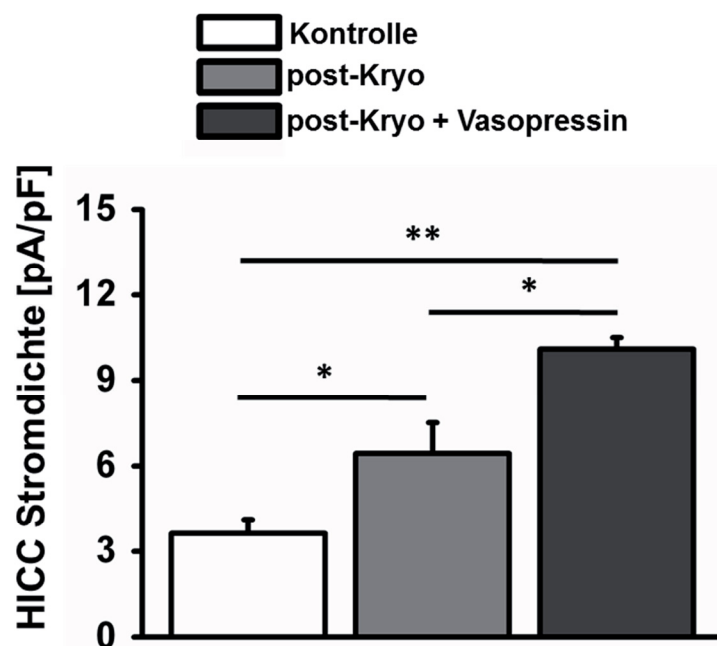


Abbildung 4.3-11: Vergleich von HICC-Strömen vor und nach Frieren mit und ohne Vasopressin-Behandlung.

Der Vergleich der einzelnen HICC-Ströme zeigt, dass HeLa-Zellen nach dem Frieren eine signifikant höhere Stromdichte haben, die durch Vasopressin-Vorbehandlung nochmals signifikant steigt. Somit führt sowohl das Frieren von HeLa-Zellen, als auch die Inkubation mit Vasopressin, zu einer deutlichen Aktivierung des HICCs.

Im Vergleich der Stromdichten ist noch einmal die Erhöhung der Ströme von HeLa-Zellen nach dem Frieren im Vergleich zu Kontrollzellen dargestellt. Die Inkubation der Zellen mit Vasopressin vor dem Frieren führte, im Vergleich zu den Strömen in Kontrollzellen und ebenfalls in gefrorenen Zellen, zu einer signifikanten Erhöhung der Ströme. Diese Ergebnisse spiegeln die Ergebnisse der FCS-Messungen wider, in denen für HeLa-Zellen ebenfalls erhöhte RVI Raten gefunden wurden. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den zuvor durchgeführten FCS-Messungen an gefrorenen HeLa-Zellen zeigt, dass sowohl der RVI schneller ist, als auch die HICC-Stromdichte erhöht. Ebenfalls ist der Effekt von Vasopressin auf beide Prozesse

gleichsam stimulierend. Somit lässt sich spekulieren, dass der HICC als Natrium-Import, ein entscheidenden Anteil am RVI der Zellen hat und über die Vasopressin-Behandlung noch stimuliert werden kann.

4.3.4 Viskosität und HICC-Aktivierung

Neben dem Einfluss des Kühlens auf das Zellvolumen, sollte zusätzlich auch die Änderung der Viskosität der Zellen betrachtet werden. Diese Messungen wurden mittels FCS durchgeführt und waren auch bei tieferen Temperaturen, bis zum Frieren der Probe möglich. Nach der Eisbildung in der Probe waren die Diffusionszeiten so langsam, dass diese nicht mehr mittels FCS gemessen werden konnten. Wie die nachfolgende Abbildung zeigt, war eine Messung bis -10°C jedoch möglich.

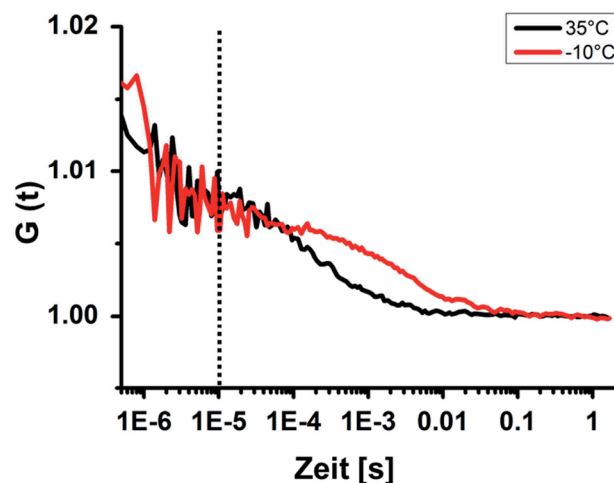


Abbildung 4.3-12: Vergleich von Auto-Korrelationskurven für eGFP in HeLa-Zellen bei $+35^{\circ}\text{C}$ und -10°C .

FCS-Messung an HeLa-Zellen waren bis zur einsetzenden Eisbildung bei -10°C möglich. Durch die Verschiebung der Auto-Korrelationskurven bei -10°C nach rechts ist qualitativ die deutlich höhere Diffusionszeit von eGFP zu erkennen.

Sowohl bei $+35^{\circ}\text{C}$ als auch bei -10°C war es möglich FCS-Messungen an eGFP exprimierenden HeLa-Zellen durchzuführen. Anhand der Rechts-Verschiebung der Kurve bei -10°C ist die Erhöhung der Diffusionszeiten zu erkennen. Die gemessenen Diffusionszeiten wurden, wie schon beschrieben, in Werte für die Viskosität des Zytoplasmas umgerechnet.

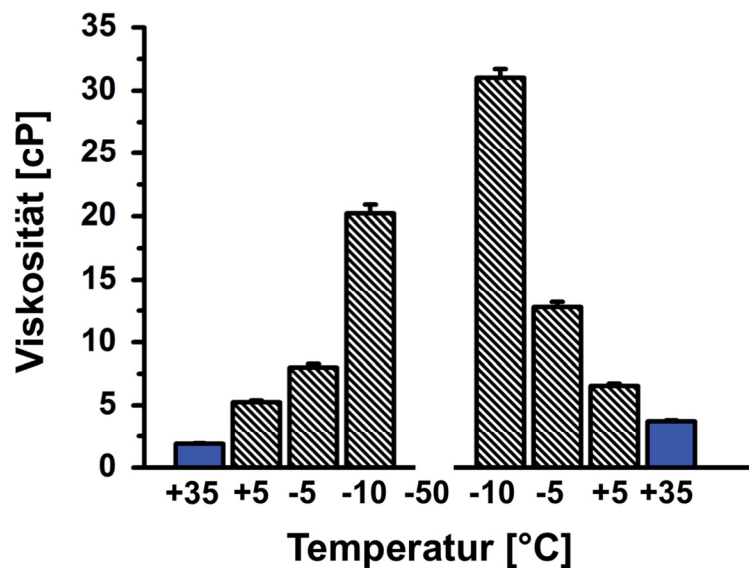


Abbildung 4.3-13: Viskosität von HeLa-Zellen beim Frieren und Auftauen.

Nach einer Messung bei 35°C als Ausgangswert wurde bei 5°C dem Medium 10% DMSO zugegeben und die Zellen zu -5°C und -10°C gekühlt und die Viskositäten bestimmt. Danach wurden die Zellen weiter zu -50°C gefroren nach 30 min wieder zu den angegebenen Temperaturen gebracht und die Viskosität bestimmt. Vor jeder Messung bei einer gegebenen Temperatur wurden die Zellen für 10 min inkubiert um sie der neuen Bedingung anzupassen. Nach dem Frieren sind die Viskositäten, verglichen zu den jeweiligen Temperaturen vor dem Frieren deutlich erhöht. Insbesondere die Hysterese bei 35°C (blau markiert) nach dem Frieren ist hier relevant. n = 5.

In Abbildung 4.3-13 wird deutlich, dass Kühlen der Zellen zu Temperaturen bis -10°C zu einer massiven Erhöhung der Viskosität führte. In Bezug auf die Messung bei 35°C ist diese bei -10°C um mehr als das 10-fache erhöht. Aufgrund der zugesetzten 10% DMSO kommt es erst unterhalb von 10°C zum Frieren der extrazellulären Lösung. Nach dem Tauen der Zellen zurück zu -10°C wird deutlich, dass das Frieren der Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der Viskosität führte. Nach dem Frieren waren die gemessenen Viskositäten bei jeder Temperatur höher als zuvor. Auch nach Rückkehr zu physiologischen Temperaturen (35°C) war die Viskosität doppelt so hoch wie zu Beginn der Messung.

Bei den durchgeführten FCS-Messungen (Vergleich 4.2.1) wurde ein Zusammenhang zwischen Volumen- und Viskositätsänderung deutlich. Darüber hinaus zeigte sich beim Kühlen und Frieren von HeLa-Zellen eine drastische Erhöhung der Viskosität. Gleichzeitig zeigen die Zellen nach dem Frieren, bei 35°C eine deutlich höhere HICC Stromdichte (Hysterese). Außerdem zeigte der Verlauf der Viskosität während einer Messung an vorher gefrorenen Zellen eine insgesamt erhöhte Viskosität, basal sowie nach hypertone Stress (Vergleiche Abbildung 4.3-4). Dadurch stellte sich die Frage, ob die Aktivierung des HICCs in HeLa-Zellen an eine Erhöhung der Viskosität gekoppelt ist. Es wurden deshalb *Patch-Clamp* Experimente

durchgeführt, bei denen die intrazelluläre Viskosität mit Hilfe der Pipettenlösung erhöht wurde. Hierbei hatte die Pipettenlösung erhöhte Viskosität. Diese entsprach der mittleren Viskosität des Zytoplasmas von HeLa-Zellen bei 37°C nach osmotischem Stress (450 mosM). Die basale Viskosität der Zellen entsprach bei 35°C 1,8 cP und wurde durch die Pipettenlösung mit 8% Dextran auf ca. 2,5 cP erhöht.

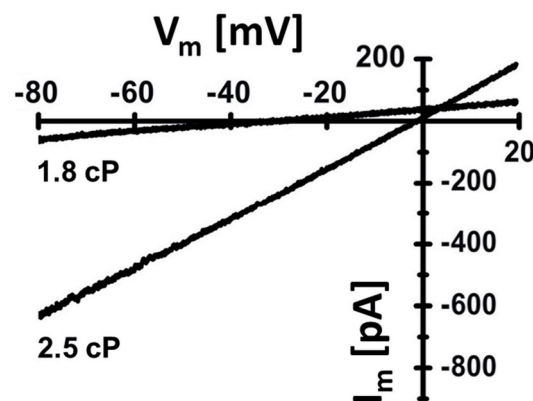


Abbildung 4.3-14: Intrazelluläre Viskositäts-erhöhung führt zu einer Aktivierung des HICC.

Eine Erhöhung der intrazellulären Viskosität von 1,8 cP auf 2,5 cP, durch 8% Dextran in der Pipettenlösung, führt zur Ausbildung von HICC-Strömen. Diese sind in ihrer Intensität und der linearen Strom-Spannungs-Kennlinie den hyperton-aktivierten Kationenströmen identisch. Darüber hinaus weisen sie die gleichen Umkehrpotentiale (V_{rev}) auf. Typische Messung bei 35°C

Abbildung 4.3-14 zeigt eine repräsentative Messung der ausgebildeten HICC-Ströme nach intrazellulärer Viskositäts-erhöhung. Die Ströme glichen in ihrer linearen Strom-Spannungs-Kennlinie den durch hypertonen Stress induzierten Strömen. Bei 35°C wurden nach hypertonem Stress Stromdichten von $7,3 \pm 2,1$ pA/pF gemessen die den Stromdichten nach intrazellulärer Viskositäts-erhöhung mit $7,6 \pm 1,4$ pA/pF glichen. Ebenfalls waren die Umkehrpotentiale von $-8,5 \pm 1,3$ mV und $-7,6 \pm 1,3$ mV innerhalb der Fehlertoleranz gleich. Um einen Eindruck über die Aktivierung der HICC Ströme durch Viskosität zu bekommen, wurden Messungen bei 35°C und 25°C durchgeführt und aus den Werten eine Aktivierungsenergie bestimmt.

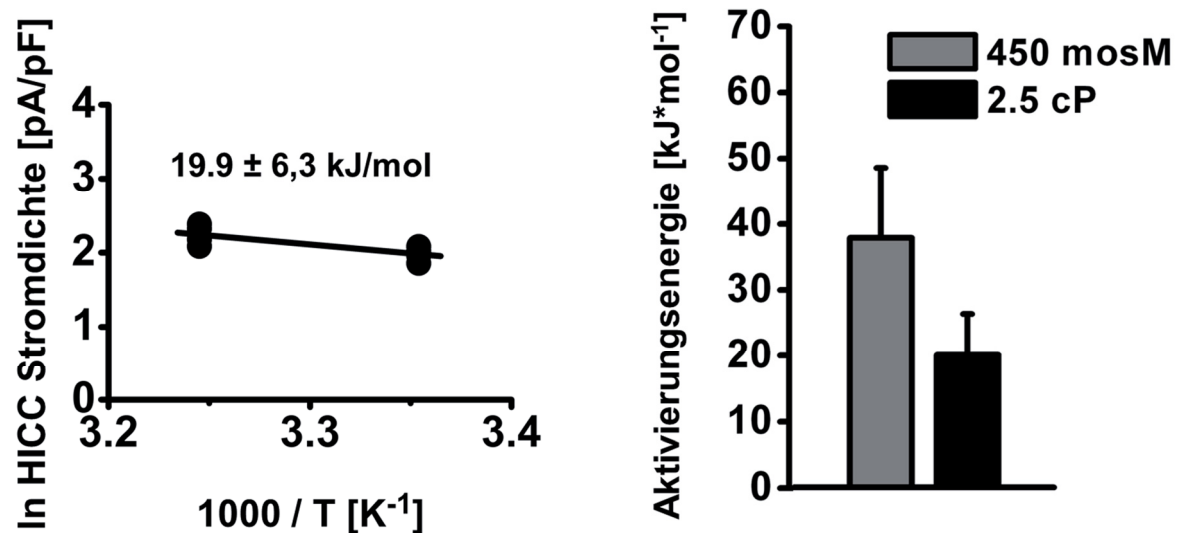


Abbildung 4.3-15: Aktivierungsenergie des HICCs nach Aktivierung durch eine Erhöhung der intrazellulären Viskosität.

Bestimmung der Aktivierungsenergie des HICCs durch eine intrazelluläre Viskositätserhöhung bei 35°C und 25°C. Die Aktivierungsenergie der HICC-Ströme ist deutlich geringer als die der Aktivierung des HICCs nach hypertonen Stress.

Mit $19,0 \pm 6,3 \text{ kJ/mol}$ liegt die Aktivierungsenergie des HICCs durch Erhöhung der Viskosität deutlich unter der durch osmotischen Stress mit $29,5 \pm 5 \text{ kJ/mol}$. Bis jetzt wurden jedoch lediglich Messungen bei zwei Temperaturen durchgeführt, während die Messung nach hypertonen Stress bei 35°C, 25°C, 15°C und 5°C durchgeführt wurden. Die durchgeführten Experimente zeigen eine Beteiligung der intrazellulären Viskosität an der HICC-Aktivierung. Dabei ist die gemessene Aktivierungsenergie für diesen Prozess niedriger als bei hypertoner Stimulierung, was für eine direktere Stimulierung durch die Viskosität sprechen könnte.

4.4 Kryo-Arrest für Mikroskopie-Verfahren

4.4.1 Kryo-Superresolution-Mikroskopie

Die gesammelten Erfahrungen zum adhären Frieren von Zellen ergaben die Möglichkeit, kryo-fixierte Zellen für die Mikroskopie zu verwenden. Dabei konnten sollte die Möglichkeit genutzt werden Zellen als *Monolayer* zu frieren und wieder aufzutauen, so dass diese weiter Leben. Dieses würde eine neue, reversible Form der Fixierung ermöglichen.

Fixierungen für die Mikroskopie erfolgten üblicherweise mit para-Formaldehyd welches zu einer irreversiblen Vernetzung von Proteinen führt und somit unweigerlich zum Sterben der Zelle. Für viele Mikroskopie-Verfahren ist eine Fixierung der Probe aber unumgänglich, da die beobachteten Prozesse deutlich schneller

sind als die Datenaufnahme. Dennoch wäre es wünschenswert, wenn solche Prozesse zu mehreren Zeitpunkten in derselben Zelle beobachtet werden könnten. Aus diesen Anforderungen entstand die Idee, Zellen durch Frieren für die Mikroskopie zu reversibel zu arretieren. Diese Verfahren sollte für eine hochauflösende Mikroskopie-Technik verwendet werden, bei der einzelne Fluorophore durch den Fit der Gauss-Verteilung ihrer Emission, unterhalb der optischen Auflösungsgrenze, lokalisiert werden können (siehe auch 3.5.6).

Das dazu eingesetzte Mikroskop wurde durch Dr. Martin Masip (Abteilung für systemische Zellbiologie, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) konzipiert und realisiert. Im Weiteren erfolgte in Zusammenarbeit die Adaption des Systems für die Mikroskopie bei Kryo-Bedingungen.

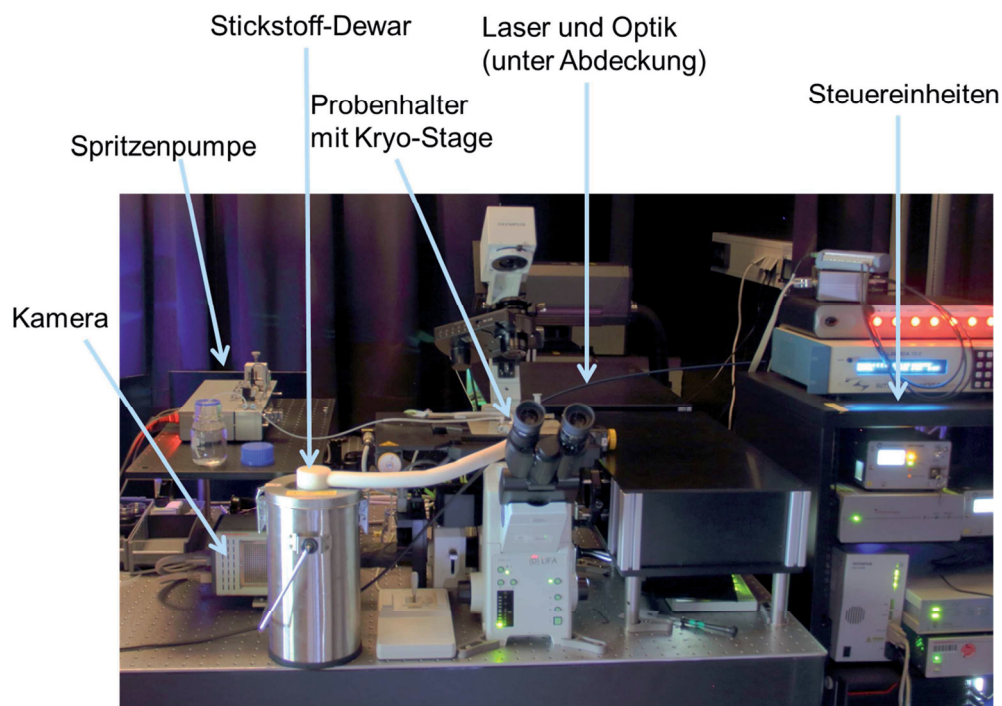


Abbildung 4.4-1: Übersicht des Kryo-Superresolution-Mikroskopie Aufbaus.

Übersichtsbild des Mikroskop-Aufbaus mit den zugehörigen Komponenten, der eingesetzten Spritzenpumpe und der Probenhalterung mit Kryo-Stage, die im nächsten Bild vergrößert dargestellt ist.

Die *Superresolution*-Mikroskopie bedarf sehr vieler Einzelbilder derselben Probe, die üblicherweise Aufnahmezeiten von fünf bis zehn Minuten erfordern. Zur Testung des Systems wurde der humane *epidermal growth factor receptor* (EGF-Rezeptor) gewählt, ein Protein dessen Lokalisation und Aktivierung in der Abteilung schon intensiv untersucht wurden. HeLa-Zellen wurden mit einem DNA-Konstrukt transfiziert, das für den EGF-Rezeptor mit C-terminalem mEos2 kodierte. Die Zellen

wurden in Ibidi *Channel-Slides* ausgesät, um diese mittels einer umgebauten Linkam Kryo-Stage einfrieren zu können und gleichzeitig über eine Spritzenpumpe die verwendeten Lösungen auszutauschen.

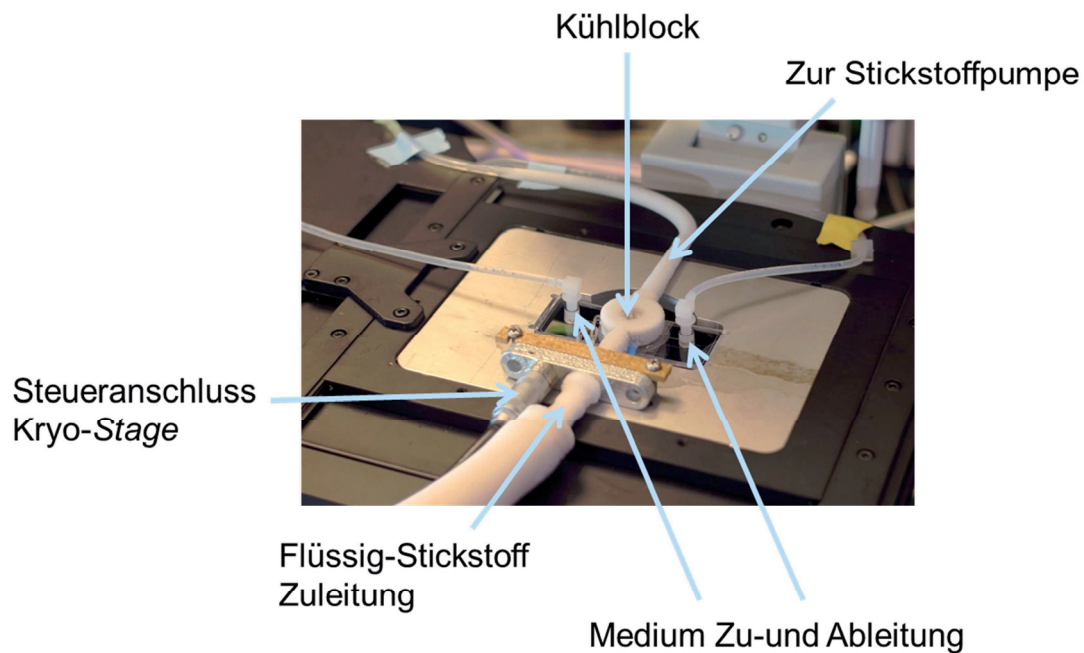


Abbildung 4.4-2: Probenhalterung mit Kühlung und Anschlüssen zum Medium-Austausch.

Die Lösung in der Kanal-Probenkammer konnte über die Zu- und Ableitung ausgetauscht werden. Mit Hilfe des Kühlblocks der Kryo-Stage wurde die Probe gekühlt. Durch die schrittweise Erhöhung der DMSO-Konzentration blieb die verwendete Lösung auch bei Temperaturen bis -50°C noch flüssig.

Die verwendete Spritzenpumpe wurde dazu benutzt, beim Kühlen Medium mit höherer DMSO Konzentration einströmen zu lassen. DMSO dient als Kryoprotektivum und sollte die Eisbildung verhindern. Üblicher Weise werden beim Einfrieren von Zellen 10% DMSO eingesetzt (Vergleiche 3.4.5.2), um die intrazelluläre Eisbildung zu verzögern und die Zellen beim langsamen Frieren zu dehydrieren. Bei der hier durchgeführten Mikroskopie führte die Eisbildung zu einer Verschlechterung der Bildqualität und zu einem deutlichen Schrumpfen der Zellen. Es wurde darum ein Protokoll verwendet, wodurch die Eisbildung bei der gewünschten Messtemperatur verhindert werden konnte. Die Zieltemperatur der Probe zum Mikroskopieren war -50°C . Dazu musste der Kühlblock auf -60°C eingestellt werden, da es zu einem Temperaturgradienten zwischen Kühlblock und Probe kam. Um bei diesen Temperaturen die Eisbildung zu unterdrücken, wurden final 40% DMSO eingesetzt. Solch hohe Konzentrationen von DMSO sind bei höheren Temperaturen stark toxisch für die Zellen, weswegen eine Schrittweise Erhöhung der DMSO-

Konzentration während des Kühlen notwendig wurde. Es wurde ein Protokoll entwickelt bei dem die Zellen mit $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ zu den jeweiligen Zieltemperaturen heruntergekühlt wurden und im Anschluss das Medium getauscht wurde. Dies erfolgte sowohl beim Kühlen als auch beim Erwärmen, dann wieder in umgekehrter Reihenfolge.

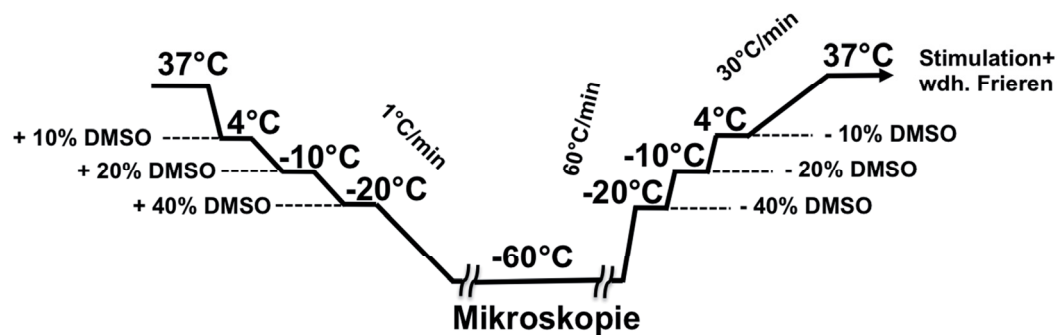
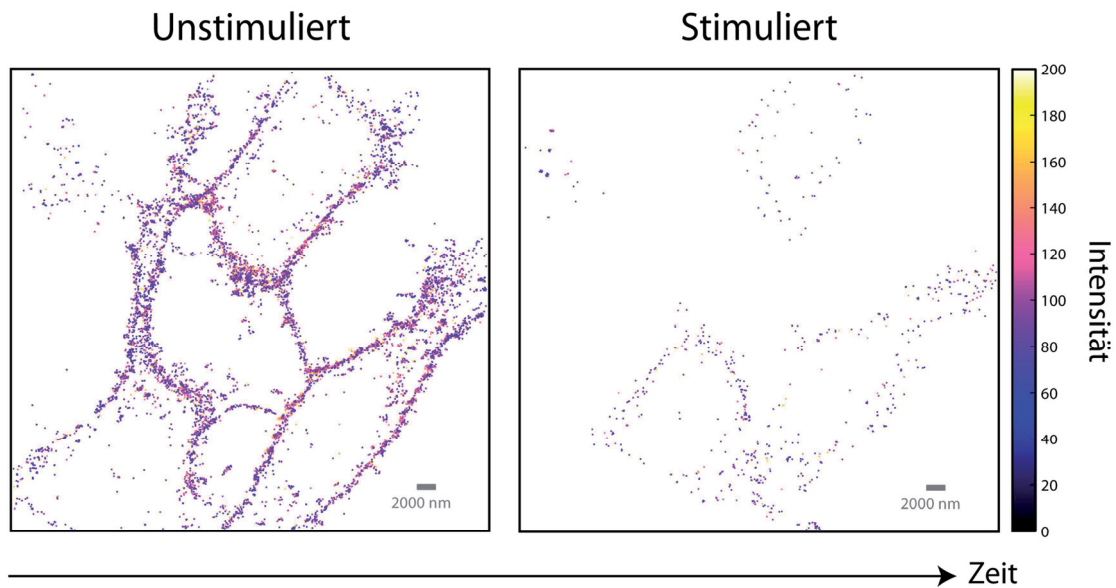


Abbildung 4.4-3: Temperatur und DMSO-Protokoll zum Kühlen und Wärmen für Superresolutions-Mikroskopie.

Darstellung der Kühl- und Wärmeraten, so wie dem Austausch von Medien mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen. Während die Zellen langsam, mit $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gekühlt wurden, erfolgte das Auftauen schnell, mit bis zu $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Die angegebenen Temperaturen entsprachen der des Kühlblocks. Zwischen Probe und Block herrschte eine Temperaturdifferenz. Um die Probe auf die gewünschte Temperatur zu kühlen, musste der Block ca. $5\text{-}10^{\circ}\text{C}$ kälter sein. Die Zeit für die Mikroskopie der Zellen ist variabel.

Nachdem die Zellen schnell zu 4°C gekühlt wurden und das Medium gegen Medium mit 10% DMSO ausgetauscht wurde, erfolgte ein langsames Kühlen mit $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ und eine Erhöhung der DMSO-Konzentration bei -10°C und -20°C . Nach Abschluss der Mikroskopie bei -50°C wurden die Zellen schnell zu den jeweiligen Temperaturen erwärmt, bei denen das Medium gegen solches mit einer niedrigeren DMSO-Konzentration ausgetauscht wurde. Nach der ersten Mikroskopie von unstimulierten Zellen wurde der EGF-Rezeptor durch 100 ng/ml EGF im Medium stimuliert. Diese Zellen wurden nach 10 min bei 37°C mit demselben Protokoll wieder gefroren und die Lokalisation des aktivierten Rezeptors untersucht. Um einen Vergleich zu konventionell fixierten Zellen zu ermöglichen, wurden ebenfalls Zellen nach para-Formaldehyd-Fixierung mikroskopiert. Die Intensitäts-abgestuften Bilder beider Methoden sind im nachfolgenden Abschnitt gegenübergestellt (Abbildung 4.4-4). Je heller die dargestellten Partikel, desto mehr (individuelle) EGFR-mEos2 Moleküle wurden dort detektiert.

Kryo-Fixierung bei -60°C



Chemische Fixierung

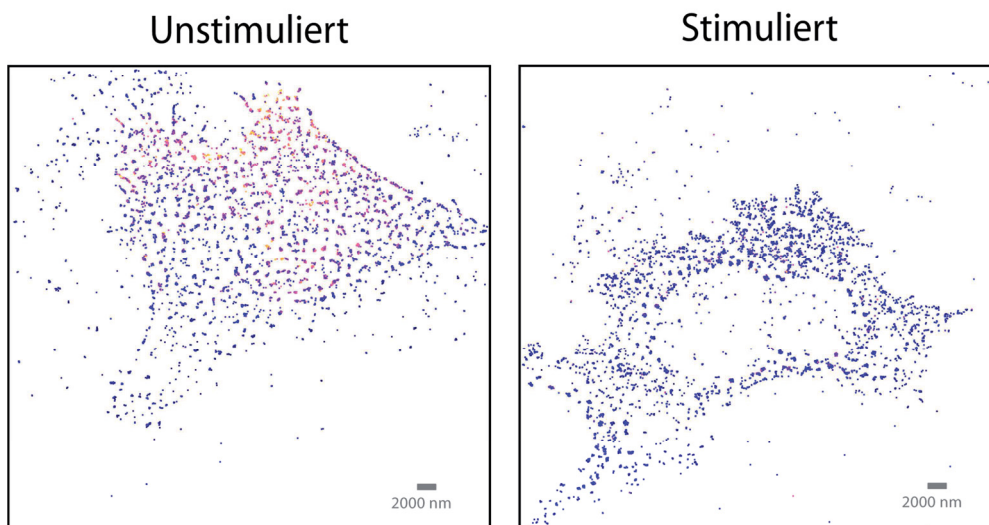


Abbildung 4.4-4: Superresolutions-Mikroskopie von EGFR-mEOS2 in HeLa-Zellen.

Dargestellt sind je ein Bild der Lokalisation von EGFR-mEos2 von stimulierten und un-stimulierten HeLa-Zellen, nach para-Formaldehyd- oder Kryo-Fixierung. Die oberen beiden Bilder zeigen dieselben Zellen bei -60°C, im ersten Bild unstimuliert und im zweiten Bild nach Stimulation bei 37°C und erneutem Frieren. Die unteren beiden Bilder zeigen jeweils ein Präparat von chemisch fixierten HeLa-Zellen, links unstimuliert und rechts nach 5 min. Stimulation mit EGF. In beiden Fällen ist eine Lokalisation des Rezeptors an der Plasmamembran von unstimulierten Zellen zu erkennen. Nach Stimulation mit EGF kam es zu einer Internalisierung des Rezeptors.

Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass zum einen die Mikroskopie bei -60°C möglich war und diese Temperatur zum anderen für eine ausreichende Fixierung der Zelle sorgte. In beiden Fällen zeigen die unstimulierten Zellen eine deutliche

Plasmamembran-Lokalisation von EGFR. Bei den gefrorenen Zellen ist diese deutlicher zu erkennen. Bei der chemisch fixierten Zelle wurde die basale Membran fokussiert was den Eindruck einer gleichmäßigen Verteilung gibt. Jedoch befinden sich die detektierten Rezeptoren alle in der Membran. Nach Stimulation des Rezeptors mit EGF wurde einer Aktivierung und Internalisierung des Rezeptors an Hand der vermehrt auftretenden Vesikeln erkennbar. Dies ist bei den chemisch-fixierten Zellen im unteren rechten Bild besser zu erkennen. Im oberen rechten Bild sind dieselben Zellen nach Stimulation und zweitem Frieren wie oben links dargestellt. Die Menge an lokalisierten EGF-Rezeptoren ist deutlich geringer als nach dem ersten Frieren und macht einen Vergleich der beiden Bedingungen schwer. Allerdings ist auch hier eine Internalisierung des Rezeptors nach Stimulation mit EGF erkennbar. Diese Reaktion der Zelle auf EGF-Stimulation zeigt, dass eine reversible Fixierung für die Kryo-Superresolution-Mikroskopie erreicht wurde.

4.4.2 Ultraschnelles Kühlen von Zellen zur Mikroskopie

Die Fähigkeit eine Probe innerhalb kürzester Zeit zu kühlen und somit zu arretieren, eröffnet die Möglichkeit zelluläre Prozesse zu beobachten, die bei physiologischen Temperaturen zu schnell ablaufen würden. Darüber hinaus ergibt sich die Chance Aufnahmetechniken anzuwenden, die eine lange Integrationszeit benötigen. Diese Integrationszeit ist häufig zu lang, um bestimmte Prozesse in der Zelle abzubilden. Diese sind innerhalb dieses Zeitraums schon fortgeschritten und entsprechen nicht mehr dem zu untersuchenden Zustand. Entscheidend ist dabei, dass das Frieren selber keine Artefakte in die Probe einträgt, welche die späteren Ergebnisse beeinflussen oder verändern. Am Fraunhofer Institut für Biomedizintechnik (IBMT) in St. Ingbert wurde unter diesen Gesichtspunkten ein Gerät gebaut, dass zum ultra-schnellen Gefrieren von Zellen direkt auf einem Mikroskop genutzt werden kann. Die so gefrorenen Proben können bei konstanter Kühlung bei Temperaturen um -190°C gehalten und mikroskopiert werden (Vergleiche Abbildung 4.4-6).

Um den Einfluss dieses Frierens auf Zellen und die dort stattfindenden Proteininteraktionen zu testen, wurden gemeinsam mit Asger Kreiner-Møller (IBMT) und Dr. Martin Masip (MPI) Experimente durchgeführt, bei denen Cos-7-Zellen erst Schock-gefroren und dann mikroskopiert wurden. Um den Einfluss des Frierens auf Protein-Ebene abschätzen zu können, wurde eine bekannte Interaktion zwischen dem aktivierten (phosphorylierten) EGF-Rezeptor und der Protein-Tyrosin-Bindedomäne

(PTB) des SHC-Proteins (Offterdinger *et al*, 2004) nach dem Frieren untersucht. Mit Hilfe eines FRET-Paars aus EGFR-mCitrine und PTB-mCherry wurde nach Stimulation der Zellen mit EGF die Interaktion der beiden Proteine bei -190°C nach dem Frieren mit Hilfe von Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie detektiert.

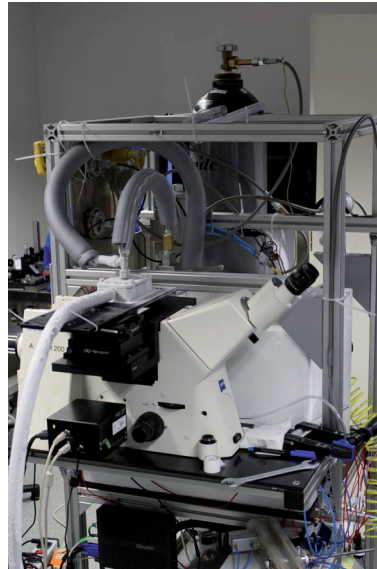


Abbildung 4.4-5: Aufbau zum Schock-Gefrieren mit Probenhalter und Zeiss Mikroskop zur Aufnahme von Floreszenz-Lebenszeit-Bilder.

Im Vordergrund ist das Zeiss-Mikroskop mit der Kamera des LIFA-Systems zu erkennen. Auf dem Mikroskop befindet sich die Vorrichtung zum Schock-Kühlen der Probe, eingefasst in ein Aluminiumgehäuse und auf Grund der extrem kalten Temperaturen stark vereist. Im Hintergrund sind die Zuleitungen für den komprimierten, tiefkalten Stickstoff (von oben) und den Stickstoff unter Normaldruck für die Dauerkühlung zu erkennen.

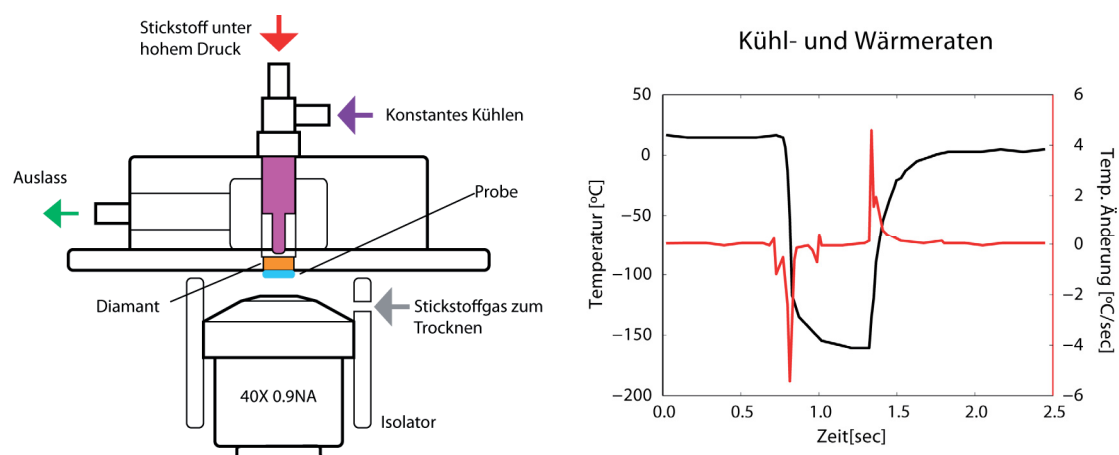


Abbildung 4.4-6: Schemazeichnung des Probenkühlers mit Proben und Mikroskop -Ankopplung, sowie die gemessenen Kühl- und Wärmeraten des Gerätes.

Im linken Bild ist das Reduzierventil (Lila) dargestellt, dass zur Erzeugung des Joule-Thomson-Effekts genutzt wird. Das Gas wird gegen das Diamantfenster expandiert und kühlt schlagartig die darüber angebrachte Probe. Über den Auslass wird das Stickstoffgas abgeführt. Nach dem Schock-Kühlen wird die Probe durch den Zustrom von tiefkaltem Stickstoff-Gas bei Konstant -190°C gehalten. Rechts ist der Temperaturverlauf beim Kühlen und Aufheizen (schwarz) und die Geschwindigkeit der Temperaturänderung (rot) Dargestellt (Abbildungen wurden erstellt von Dr. Martin Masip und Asger Kreiner-Møller)

Die Lebenszeit des EGFR-mCitrine Konstrukts wurde in den gefrorenen Proben mit Hilfe von Frequenzdomänen-Lebenszeit-Messungen bestimmt. Dazu wurde das LIFA-System von Lambert Instruments benutzt. Als Referenz wurde die Lebenszeit von Fluoreszin sowie gereinigtem mCitrine in PBS gemessen. Um einen Vergleich der Lebenszeiten von EGFR-mCitrine mit und ohne auftretendem FRET zu ermöglichen, wurden Zellen ohne und mit PTB-mCherry als FRET-Partner gemessen. Die Interaktion von EGFR mit PTB wurde durch Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml EGF für 5 min bei 37°C induziert. Dies führt zu einer Dimerisierung und Aktivierung des EGF-Rezeptors, in Folge dessen es zu einer Trans-Phosphorylierung von Tyrosin-Resten der beiden Rezeptoren führt. An diese Phosphotyrosine bindet unter anderem PTB-mCherry, wodurch eine Ausbildung von FRET zwischen den beiden Fluorophoren möglich ist.

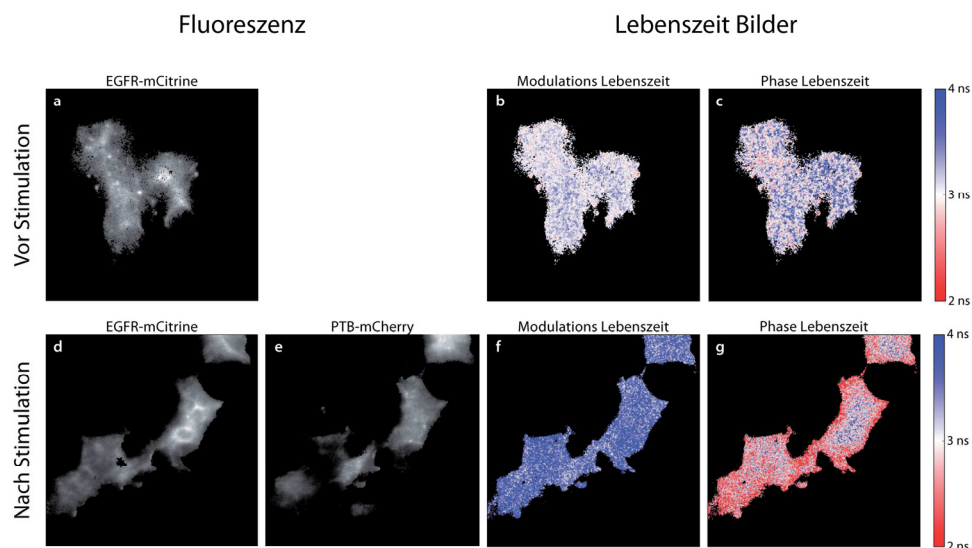


Abbildung 4.4-7: Mikroskopie bei -190°C, Darstellung der Interaktion von EGFR mit PTB nach Stimulierung mit EGF.

COS-7 Zellen wurden Schock-Gefroren und bei -190°C mikroskopiert. Links sind die Fluoreszenzsignale der einzelnen Konstrukte zu erkennen. In der oberen Reihe wurden Zellen nur mit dem EGFR-mCitrine Konstrukt zur Kontrolle transfiziert. Sowohl die Modulations- als auch die Phasen-Lebenszeit zeigt eine homogene Verteilung in der Zelle. Die Stimulation der Zellen mit EGF (untere Reihe) führt zu einer deutlichen Verringerung der Lebenszeit in Region der Zellmembran der Zellen, während die Lebenszeit in der Region um den Zellkern annähernd unverändert bleibt. Dieser Effekt ist nicht in der Modulationslebenszeit zu erkennen.

Die Zellen, die lediglich mit EGFR-mCitrine transfiziert wurden, zeigten eine mittlere Lebenszeit von $3,11 \pm 0,16$ ns für die Modulations-Lebenszeit und $3,18 \pm 0,30$ ns für die Phasen-Lebenszeit. Die Zellen, die ebenfalls PTB-mCherry als FRET-Akzeptor enthielten, zeigten in der Region unterhalb der Plasmamembran nach Stimulation mit EGF eine deutliche Reduktion der Phasen-Lebenszeit auf $2,58 \pm 0,47$ ns. In der Nähe

der Membran ist die Interaktion des aktiven Rezeptors mit der PTB zu erwarten, wodurch die beobachtete Reduktion der Lebenszeit zu erklären ist. Innerhalb der Zelle war die Phasen-Lebenszeit mit $3.08 \pm 0,42$ ns unverändert. Die Modulations-Lebenszeit zeigte in der gesamten Zelle eine homogene Erhöhung der Lebenszeit. Hierbei handelt es um ein gegenläufiges Ergebnis und eventuell auch ein Messartefakt.

Anhand der Phasen-Lebenszeit konnte eine Interaktion im Nanometer-Bereich der beiden Proteine gezeigt werden, die auch nach dem ultraschnellen Frieren zu -190°C noch erhalten blieb.

5 Diskussion

5.1 Der Wasserhaushalt von Zellen beim Kühlen und Frieren

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Wasserverlust von Zellen schon bei Temperaturen oberhalb von 0°C anfängt. Der mittels Zellzähler und FCS-Messungen ermittelte Boyle-van't-Hoff-Plot zeigt eine Reduktion des osmotisch-aktiven Volumens von HeLa-Zellen von 27% auf 16%, wenn die Zellen von 35°C auf 5°C gekühlt werden. Das entspricht einer Reduktion des freien Wassers um 40%. Diese Messungen werden von den durchgeführten Raman-Messungen unterstützt. Mit dieser Technik konnte das intrazelluläre Wasser direkt, über die spezifischen Schwingungen im gemessenen Spektrum, bestimmt werden. Ein Kühlen von HeLa-Zellen, von 35°C auf 5°C, führt zu einer Reduktion des Wassergehalts der Zellen um 30%. Die Differenz dieser beiden Messungen ist möglicherweise mit Hilfe von Hydratationswasser zu erklären.

Mit Hilfe eine Boyle-van't-Hoff-Plot lässt sich nur das freie Wasser einer Zelle bestimmen. Lediglich dieses kann unter osmotischem Stress die Zelle verlassen und somit zu der gemessenen Volumenänderung beitragen. In den durchgeführten Raman-Messungen wird sowohl freies, als auch gebundenes Wasser (Hydrathüllen von Proteinen und anderen Makromolekülen) gemessen. Die sich daraus ergebene Differenz von 10% entspricht den in der Literatur berichteten Werten für dieses, osmotisch nicht erreichbare Wasser (Du *et al*, 1994).

Dennoch wirft der beobachtet Effekt eine generelle Frage nach dem Mechanismus des Wasserverlustes auf. Es wurde zuerst vermutet, dass die Zellen bei sinkender Temperatur durch eine verminderte Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase schwellen würden (Willis *et al*, 1978; Thurston *et al*, 1978). Diese Überlegung basiert auf der diskutierten Funktion der Na⁺-K⁺-ATPase, dem onkotischen Druck in Zellen entgegen zu wirken. Das hier beobachtete Phänomen ließe sich durch einen vermehrten Kaliumionen-Ausstrom erklären. So sind in den meisten Zellen Kalium-Kanäle exprimiert, die für einen kontinuierlichen Kalium-Ausstrom verantwortlich sind. Diese sogenannten *leak channels* sorgen für einen konstanten Ausstrom von Kalium aus der Zelle, wodurch das Membranpotential gebildet wird (Enyedi & Czirják, 2010). Denkbar ist, dass das Kühlen von Zellen zu einem erhöhten Austrom von Kalium aus der Zelle führt, der mit einem gleichzeitigen Verlust von Wasser einherging.

Der Einfluss des onkotischen Drucks kann, bei kurzfristigem Kühlen, wahrscheinlich vernachlässigt werden, da mit sinkender Temperatur auch die Proteinsynthese geringer wird (Fujita, 1999).

Die beobachtete Volumenabnahme von Zellen beim Kühlen, warf die Frage auf, inwieweit Zellen durch die Änderung ihres Volumens auf Kryo-Bedingungen reagieren. Insbesondere ist interessant, ob diese Änderungen ein adaptives Verhalten der Zellen bei veränderter Temperatur darstellen. Ein solches adaptives Verhalten würde insbesondere für einen Volumengewinn nach dem Frieren förderlich sein. Sollte eine solche, aktive Reaktion der Zelle vorhanden sein, würde diese eine neue Herangehensweise an die Verbesserung von Kryo-Protokollen erlauben. Um diese Frage zu klären, wurde zunächst die Volumenregulation von HeLa-Zellen charakterisiert um diese mit der Situation in, zuvor gefrorenen Zellen zu vergleichen.

5.2 Volumenregulation in HeLa-Zellen

Die Volumenregulation ist ein zentraler Parameter in der Physiologie von Zellen. Sie ist entscheidend an Prozessen wie der Proliferation, Zellteilung, Zellmigration und auch der Apoptose beteiligt (Lang *et al*, 1998; Hoffmann *et al*, 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte die Volumenregulation von HeLa-Zellen im Allgemeinen, und bezüglich wichtiger Kanäle/ Transporter weitergehend charakterisiert werden. Dafür wurden die Temperaturabhängigkeit der Volumenregulation sowie der beteiligten Kanäle/ Transporter untersucht und Aktivierungsenergien bestimmt, um die einzelnen Prozesse untereinander aber insbesondere auch bei verschiedenen Bedingungen zu vergleichen. Hinsichtlich der Tatsache, dass Kryokonservierung von Zellen eine wichtige Rolle spielt und bekannt war, dass Zellen im Laufe des Frierens massiv Wasser verlieren (Pegg, 2002; Spindler *et al*, 2012), sollte die Volumenregulation der Zellen nach dem Frieren näher betrachtet werden. Dadurch sollten Prozesse identifiziert werden, die bei der Kryokonservierung eine wichtige Rolle spielen um nachfolgend über diese Prozesse Einfluss auf das Überleben von Zellen nach dem Frieren zu nehmen.

5.2.1 Charakterisierung der Volumenregulation in HeLa-Zellen

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) ist eine Methode, die üblicherweise zur Messung von Diffusionsgeschwindigkeiten und Assoziationen/ Dissoziationen verwendet wird. Sie liefert aber, neben der Diffusionszeit der beobachteten Moleküle,

auch eine Angabe über die Anzahl eben dieser. Daraus ergab sich die Möglichkeit, mittels FCS die relative Volumenänderung der Zellen zu messen und gleichzeitig die Änderung der Viskosität in den gemessenen Zellen zu ermitteln. In Abbildung 4.2-2 ist ein typischer Verlauf der Volumenregulation in HeLa-Zellen nach hypertonem Stress von 450 mosM dargestellt. Neben dem passiven Schrumpfen und Schwellen, wurde die aktive Regulation der Zelle zur Rückgewinnung ihres Volumens, der RVI, analysiert. Der Vergleich dieser Messung mit vorhergegangenen Messungen des RVI in der Literatur, zeigt eine gute Übereinstimmung. Für HeLa-Zellen ist nach hypertonem Stress von 450 mosM bei 25°C ein typischer RVI von 40% berichtet (Wehner *et al.*, 2003b). In der gezeigten Messung beträgt der RVI 50% und ist damit etwas höher. Dies kann durch die Messtemperatur von 35°C erklärt werden. Dieses Beispiel demonstriert bereits die Relevanz der Temperatur für diese Art von Messungen, ein Faktor, der im weiteren Verlauf der Arbeit noch eingehend untersucht wurde.

Ein weiterer, entscheidender Punkt bei diesen Messungen war die Entwicklung einer Mediumpumpe inklusive Peltier-Temperierung, die zum einen die Messung bei tiefen Temperaturen durch Kühlen der Lösung ermöglichte und zum anderen einen unterbrechungsfreien Wechsel zwischen Lösungen unterschiedlicher Osmolaritäten erlaubte. Dadurch und aufgrund der hohen Zeitauflösung der Messung von 1 pro 30 sec. war auch eine Messung des Schrumpfens und Schwellens der Zellen beim Wechsel zu hypertonem Medium und zurück zu isotonem Medium möglich. So konnten neben dem aktiven Prozess des RVIs zusätzlich die passiven Wasserbewegungen gemessen. Der RVI wurde als Maß für die Aktivität von HICC und NHE1 angesehen, während die Prozesse des Schrumpfens und Schwellens Aussagen über die, durch Aquaporine bestimmte, Wasserpermeabilität der Membran erlaubte. Mit Hilfe der erhaltenen Messungen wurden die Raten bestimmt, mit der sich das Volumen bei den drei genannten Prozessen änderte.

Neben der relativen Volumenänderung wurde auch der Verlauf der Viskosität gemessen (vergleiche Abbildung 4.2-3). Dies war möglich, da die gemessenen Diffusionszeiten von eGFP in den Zellen mit Hilfe der in 3.5.3.3 beschriebenen Formel in Werte für die Viskosität umgerechnet wurden. Im Verlauf einer Messung erhöhte hypertoner Stress, der zum Schrumpfen der Zellen führt, die Viskosität der Zelle, die dann im Verlauf des RVI wieder abnahm und beim Schwellen der Zellen das Ausgangsniveau erreichte. Dies ist insoweit zu erklären, als das die Änderung des

Zellvolumens durch den Verlust von Wasser die Konzentration aller gelösten Substanzen erhöht und damit eine Erhöhung der Viskosität zur Folge hat.

Die Raten für die Änderung des Volumens und der Viskosität bei Schrumpfen, Schwellen und dem RVI wurden in Abhängigkeit von der Temperatur und der Osmolarität ermittelt. Die Geschwindigkeit aller drei Prozesse der Volumenänderung nahm mit einer Erhöhung der Temperatur und/ oder dem osmotischen Stress jeweils zu. Die Zellen schrumpften bei 35°C nach hypertone Stress von 450 mosM etwa doppelt so schnell wie bei 5°C. Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls beim Schwellen gemacht, wobei dieser Prozess grundsätzlich deutlich langsamer verlief als das korrespondierende Schrumpfen vorher. Gleichzeitig zeigte sich auch eine erhöhte Geschwindigkeit der Prozesse bei der Verwendung von höheren Osmolaritäten, unabhängig bei welcher Temperatur gemessen wurde. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Geschwindigkeitsbestimmung des RVIs. Dieser wurde mit steigender Temperatur sowie mit steigender Osmolarität der verwendeten Lösung jeweils schneller. Der RVI war bei 35°C und einem osmotischen Stress von 526 mosM vier Mal schneller als bei 360 mosM.

Die gleichzeitig gemessenen Geschwindigkeiten der Viskositätsänderung ergaben zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. Dabei war die Änderungsgeschwindigkeit der Viskosität beim Schrumpfen, Schwellen und dem RVI, mit steigender Osmolarität, jeweils höher, vergleichbar mit den Ergebnissen der Volumenmessungen. Allerdings erhöhte sich die Geschwindigkeit der Viskositätsänderung auch innerhalb einer gemessenen Osmolarität mit sinkender Temperatur. Die Änderung der Viskosität im Verlauf des RVI konnte jedoch lediglich bei 35°C und 25°C gemessen werden, da danach keine exponentielle, bzw. gar keine Veränderung mehr erkennbar war. Dazu sei angemerkt, dass es sich sehr wahrscheinlich nicht um eine reine Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur handelt. Die dargestellten Werte sind jedoch die Raten der Änderung der Viskosität. Sowohl die gemessenen Viskositäten bei isotoner Lösung, z.B. 1,8 cP bei 35°C, als auch die Zunahme der Viskosität bei hypertone Stress, ist in Einklang mit berichteten Ergebnissen (Bicknese *et al*, 1993; Periasamy *et al*, 1992).

Aus den gemessenen Raten bei verschiedenen Temperaturen wurden, wie in Abbildung 4.2-9 gezeigt, Aktivierungsenergien der einzelnen Prozesse ermittelt. Es wurde gezeigt, dass für die Viskosität von Proteinlösungen (Monkos, 2000) als auch für den Wassertransport (Solenov *et al*, 2004; Verkman *et al*, 1996) und die Aktivität

von Iontentransportern (Zeuthen & Macaulay, 2012) Aktivierungsenergien bestimmt werden können und diese Aktivierungsenergien nützlich sind, um die untersuchten Prozesse einzuordnen. Die Höhe der Aktivierungsenergie erlaubt eine Abschätzung, wie leicht ein beobachteter Prozess abläuft und wie hoch eine eventuelle Aktivierungsbarriere ist. Die Betrachtung der Wasserpermeabilität der Zellmembran erlaubt anhand der zugrundeliegenden Aktivierungsenergie eine Abschätzung der Menge vorhandener Aquaporine. Es wird angenommen, dass Wassertransportprozesse mit einer Aktivierungsenergie von weniger als ~ 25 kJ/mol durch Aquaporine vermittelt sind, während bei Aktivierungsenergien über ~ 40 kJ/mol von Aquaporin-unabhängiger Diffusion ausgegangen wird (Verkman *et al.*, 1996).

Im Folgenden werden die Aktivierungsenergien der Volumenänderung betrachtet. Die Prozesse von Schrumpfen und Schwellen der Zellen sind in ihrer Geschwindigkeit abhängig von der Abgabe und Aufnahme von Wasser. Dieses Wasser folgt dem Gradienten der Osmolarität, um ein chemisches Potential zu erreichen, welches zwischen intra- und extrazellulärem Raum ausgeglichen ist. Wasser strömt bei Erhöhung der extrazellulären Osmolarität aus der Zelle (Schrumpfen) und strömt, bei der Rückkehr zu isotoner Lösung, wieder in die Zellen zurück (Schwellen). Die gemessenen Aktivierungsenergien für das Schrumpfen und Schwellen liegen bei allen vier Osmolaritäten zwischen ~ 12 kJ/mol und ~ 22 kJ/mol. Somit lässt sich zunächst festhalten, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine Aquaporin-vermittelte Diffusion von Wasser handelt. Die Verwendung von hypertoner Lösung mit 450 mosM und 526 mosM führt darüber hinaus zu einer signifikanten Erhöhung dieser Aktivierungsenergien im Vergleich mit den Werten bei 360 mosM. Diese Erhöhung der Aktivierungsenergien lässt auf eine Verringerung der Wasserleitfähigkeit der Membran schließen. Insbesondere auf die Abhängigkeit der Wasserpermeabilität der Membran von der Menge an Aquaporinen (Verkman, 1992) ist zu vermuten, dass hypertoner Stress eine Verringerung von Aquaporinen in der Membran verursacht. Diese Hypothese wird im späteren Verlauf nochmals aufgegriffen.

Bei der Betrachtung der Aktivierungsenergien des RVI fällt auf, dass diese mit steigender Osmolarität schrittweise ansteigen. So sind alle drei Aktivierungsenergien bei 400 - 526 mosM signifikant größer als bei 360 mosM. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um eine schrittweise Adaption der Zelle an den vermehrt auftretenden hypertonen Stress. Den dadurch entstandenen Wasserverlust versucht die Zelle durch Aktivierung von HICCs und die dadurch resultierende Ionenaufnahme zu kompensie-

ren. Die schrittweise Erhöhung kann zum Einen eine sukzessive Aktivierung von mehr Kanälen darstellen, aber auch ein Indiz für den vermehrten Transport von Kationenkanälen zur Membran und deren Einbau sein (Cayouette & Boulay, 2007). Mit ~ 25 kJ/mol bis ~ 45 kJ/mol sind die berechneten Aktivierungsenergien zum Teil deutlich höher als die des (passiven) Wassertransports. Das verdeutlicht den Verbrauch von Energie für diesen Prozess. Die Zelle muss z.B. ATP verbrauchen, um den Natrium-Gradienten aufrecht zu erhalten, aufgrund dessen Na^+ -Ionen nach Aktivierung des HICC in die Zelle fließen können. Ein eventueller Transport weiterer Kanäle/ Transporter an die Membran benötigt ebenso Energie.

Im deutlichen Gegensatz zur Volumenänderung stehen die Werte der Aktivierungsenergien der Viskositätsänderungen, die bei jedem der drei Prozesse negativ sind. Diese Tatsache legt nahe, dass die Änderung der Viskosität primär nicht energieabhängig ist. Es ist eher ist zu vermuten, dass sich die Viskosität durch die gleichzeitig ablaufenden Volumenänderungen verändert und der Energiebedarf der Volumenänderung zum Teil die Energie für die Änderung der Viskosität widerspiegelt. Die Betrachtung der jeweiligen Aktivierungsenergien für Volumen- und Viskositätsänderung verdeutlicht diesen Punkt. Wie bereits beschrieben, steigt die Aktivierungsenergie der Volumenänderung beim RVI mit steigender Osmolarität. Gleichzeitig verringert sich die negative Aktivierungsenergie der Viskositätsänderung beim RVI. Der Betrag dieser beiden Aktivierungsenergien ist, für jede Osmolarität, in dem engen Bereich von 54,5 bis 58,4 kJ/mol. Die Differenz verschiebt sich dabei mit steigender Osmolarität weiter zu positiven Werten. Mit anderen Worten, je höher der Aufwand für die Volumenkorrektur beim RVI, desto kleiner ist die negative Aktivierungsenergie der korrespondierenden Viskositätsänderung. Bei den Prozessen des Schrumpfens und Schwellens sind die Aktivierungsenergien sogar gegenläufig. So steigt die Aktivierungsenergie der Prozesse bei Betrachtung der Volumenänderung mit erhöhter Osmolarität an, während die Aktivierungsenergien der Viskositätsänderungen mit steigender Osmolarität jeweils kleiner sind.

Dies könnte dafür sprechen, dass die Viskosität ein geeigneter energieunabhängiger Parameter für die Wahrnehmung von Volumenänderung für die Zelle sein könnte. Dieser Punkt wird im Verlauf unter 5.3.4 tiefergehend diskutiert.

Die gezeigten Volumenmessungen in HeLa-Zellen weisen keine deutliche Veränderung der Aktivierungsenergien beim Schrumpfen und Schwellen auf. In parallelen Messungen an HepG2-Zellen durch Frau Dipl.-Biologin Lale Azer wurde

gezeigt, dass diese Zellen signifikant niedrigere Aktivierungsenergien beim Schwellen im Vergleich zum vorherigen Schrumpfen haben. Zusammen mit den zuvor in der Literatur beschriebenen Ergebnissen für den Zusammenhang zwischen der Höhe der Aktivierungsenergie und der Anzahl der Aquaporine in der Membran, sollte die Frage geklärt werden, ob HepG2-Zellen im Laufe von hypertonem Stress vermehrt Aquaporine in die Membran einlagern. Dies wäre eine Erklärung für die niedrigere Aktivierungsenergie bei Schwellen der Zellen im Vergleich zum Schrumpfen.

Mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie wurde die Plasmamembranintensität eines fluoreszierenden Aquaporin 1-Konstrukts vor, während und nach hypertonem Stress quantifiziert. In HepG2-Zellen, die eine verringerte Aktivierungsenergie des Schrumpfens aufwiesen, konnte im Verlauf des hypertonen Stresses eine vermehrte Einlagerung des fluoreszenz-markierten Aquaporin 1 in die Membran beobachtet werden. Dieser Befund spiegelt die, über die Aktivierungsenergien ermittelte, höhere Wasserpermeabilität von HepG2-Zellen wider. In anderen Zellen konnte nach hypertonem Stress ebenfalls eine erhöhte Membranlokalisation für weitere Aquaporine gezeigt werden (Umenishi & Schrier, 2003; Conner *et al.*, 2012).

In HeLa-Zellen wurde eine leicht verringerte Aquaporin 1-Konzentration in der Membran gemessen, ein Effekt der mit den steigenden Aktivierungsenergien für Schrumpfen und Schwellen erklärt werden könnten. Wie im vorhergegangenen Abschnitt diskutiert, führt hypertoner Stress (ab 450 mosM) zu einer Erhöhung der Aktivierungsenergie beim Schrumpfen und Schwellen und zu einer verminderten Aquaporin 1-Lokalisation in der Membran. Denkbar ist, dass es sich hierbei um einen Schutzmechanismus der Zellen vor zu hohem Wasserverlust handelt.

5.2.2 Die Hauptvermittler des RVI in HeLa-Zellen

5.2.2.1 Molekulare Charakterisierung des HICCs in HeLa-Zellen

Der HICC in HeLa-Zellen war bis dato als nicht-selektiver Kationenkanal mit einer Ionenselektivität von $\text{Na}^+ < \text{K}^+ \ll \text{Ca}^{2+}$ charakterisiert. Die durch hypertonen Stress induzierbaren Kationenströme werden durch Flufenamate und Gadolinium-Ionen (Gd^{3+}), nicht aber durch Amilorid gehemmt. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. Yasunobu Okada (National Institute for Physiological Sciences, Japan) und Prof. Dr. Tomohiro Numata (Universität Kyoto) sollte das molekulare Korrelat des HICCs in HeLa-Zellen und dessen Aktivierungsmechanismus identifiziert werden (Numata *et al.*, 2012). Teile der erwähnten Publikation sind im Rahmen dieser Arbeit

entstanden und sollen im Folgenden im Zusammenhang diskutiert werden. Frühere Studien beschreiben, dass der HICC in HeLa-Zellen eine Sensitivität gegenüber spezifischen TRP-Kanal-Inhibitoren aufweist. Diese und andere Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass der HICC durch den TRP-Kanal vom Typ Melastatin 2 (TRPM2) ausgebildet wird. In der Tat konnte gezeigt werden, dass eine siRNA vermittelte Reduktion der TRPM2-Expression zum Verlust des hyperten-induzierten Stromes führte (Numata *et al.*, 2012).

Nicht nur die Identifikation des molekularen Korrelats des HICCs in HeLa-Zellen war ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit, darüber hinaus sollten ebenfalls mögliche Aktivierungsmechanismen aufgeklärt werden. TRPM-Kanäle enthalten ein NudT9-H Motiv, welches eine Sequenzhomologie zur ADP-Ribose Pyrophosphatase NUDT9 aufweist. Der durch diese Sequenz kodierte Teil der TRPM-Proteine zeigt messbare Enzymaktivität für die Umwandlung von ADP-Ribose zu AMP (Perraud *et al.*, 2001). Da es sich bei ADP-Ribose um ein Zwischenprodukt der Bildung cyclischer ADP-Ribose (cADP-Ribose) aus NAD^+ handelt, wurde neben ADP-Ribose, ebenfalls NAD^+ und cADP-Ribose, bezüglich ihrer Fähigkeit den HICC in HeLa-Zellen zu aktivieren, untersucht. Alle drei Nucleotide waren in der Lage Ströme in HeLa-Zellen auszulösen, die vergleichbar waren mit Strömen nach hypertonen Stress (Numata *et al.*, 2012).

Die Tatsache, dass alle drei Nucleotide den HICC aktivierten, aber in der Literatur die Aktivierung des TRPM2 durch ADP-Ribose und cADP-Ribose beschrieben wurde, legte die Vermutung nah, dass ein zweites Enzym in der Umwandlung der Nucleotide in ADP-Ribose und/ oder cADP-Ribose, und damit an der Aktivierung des HICCs, beteiligt war. Ein solches Enzym ist das *cluster of differentiation 38* (CD38), welches die Umwandlung von NAD^+ in cADP-Ribose und ADP-Ribose, sowie deren Konversion katalysiert (Malavasi *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Expression von CD38 in HeLa-Zellen zu einem Verlust des hyperten-aktivierten Stroms führt. Gleichzeitig lösten ADP-Ribose und cADP-Ribose keinen solchen Strom mehr aus (Numata *et al.*, 2012). Dieser Befund widersprach der Arbeitshypothese, dass sowohl ADP-Ribose als auch cADP-Ribose direkt an TRPM2 binden und diesen aktivieren. Darüber hinaus führte die Reduktion der Protein-Level von TRPM2 als auch CD38 zu einer Verringerung der Proliferation der HeLa-Zellen um fast 100% (Vergleiche Abbildung 4.2-13), sowie zu einer Verlangsamung des

regulatory volume increase RVI in HeLa-Zellen nach hypertonem Stress, verglichen zur Kontroll-siRNA (Numata *et al.*, 2012).

Basierend auf diesen Befunden wurde in einem Folgeexperiment die intrazellulären Level von cADP-Ribose in HeLa-Zellen nach hypertonem Stress und in Abhängigkeit der Protein-Level von TRPM2 sowie CD38 bestimmt (Vergleiche Abbildung 4.2-14). Hypertoner Stress führte unter Kontrollbedingungen (negative siRNA) zu einer 14-fachen Erhöhung von cADP-Ribose in HeLa-Zellen. Die Reduktion von CD38 erzeugt unter isotonen Bedingungen einen 22-fach erhöhten Level von cADP-Ribose, welcher durch hypertonen Stress nochmals signifikant anstieg. Ebenso hatte die Verringerung der TRPM2-Expression eine signifikante Erhöhung der cADP-Ribose Konzentration unter isotonen Bedingungen zufolge, die nach hypertonem Stress leicht, aber nicht signifikant, anstieg. Diese Ergebnisse lassen sich nicht mit der Idee in Einklang bringen, dass CD38 essentiell für die Entstehung von cADP-Ribose in HeLa-Zellen ist. Außerdem lässt sich so auch nicht erklären, weshalb cADP-Ribose (und auch ADP-Ribose) bei einem *knock-down* von CD38 nicht mehr zu einer Aktivierung des HICCs in HeLa-Zellen führten. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass es sich bei CD38 um den Sensor für die cADP-Ribose, ADP-Ribose und NAD^+ -Konzentration handelt und durch Konformationsänderungen, bei der enzymatischen Umwandlung dieser Nucleotide, die Bewegung des Proteins in einer Aktivierung des HICCs resultiert.

Voraussetzung für eine solche Signalweiterleitung wäre eine direkte Interaktion der beiden Proteine. Diese mögliche Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit auf zwei verschiedene Weisen untersucht. Zum einen konnte mittels Immunopräzipitation die Interaktion zwischen TRPM2 und CD38 gezeigt werden (vergleiche Abbildung 4.2-15). Durch Bindung von TRPM2 an Agarose-*beads* konnte CD38 im Zelllysate nachgewiesen werden und die Bindung von CD38 an Agarose-*beads* führte zum Nachweis von TRPM2 in der Probe. Dieser bidirektionale Nachweis und die Tatsache, dass keine unspezifische Bindung stattfand, lässt eine Interaktion dieser Proteine vermuten. Darüber hinaus zeigte sich, dass hypertoner Stress diese Protein-Protein-Interaktion nicht beeinflusst, was grundlegend wäre, sofern CD38 als Sensor/ Aktivator von TRPM2 fungieren soll. Eine unmittelbare Aktivierung von TRPM2 durch CD38 ist deutlich besser möglich, wenn die Proteine miteinander interagieren, bevor ein Stimulus auftritt. Um weitere Evidenz für die Interaktion der Proteine zu erhalten, wurden Fluoreszenz-Lebenszeit Messungen

(FLIM) durchgeführt. Auf Basis des Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) kann mit dieser Methode die räumliche Nähe zweier Proteine gezeigt werden. In diesem Fall wurden dazu TRPM2-eGFP und CD38-mKate2 verwendet. Eine Interaktion der beiden Proteine führt zu FRET zwischen eGFP und mKate2 und somit zu einer Verringerung der Lebenszeit von eGFP. Eben dieser Effekt war nach Transfektion von HEK293-Zellen zu beobachten. An der Plasmamembran, wo die Expression von TRPM2-eGFP und CD38-mKate2 überlappte, konnte eine Reduktion der Lebenszeit detektiert werden. Intrazellulär lokalisiert hauptsächlich TRPM2-eGFP, dort betrug die Lebenszeit 2,5 ns und entsprach damit der Fluoreszenz-Lebenszeit von eGFP. Dies legte den Schluss nahe, dass CD38 und TRPM2 in der Nähe der Membran interagieren. Hypertoner Stress führte auch innerhalb dieser Messungen zu keiner nachweisbaren Veränderung der Interaktion.

Eine Interaktion von CD38 und TRPM2 und die Möglichkeit der Übertragung der katalytischen Aktivität von CD38 zur Aktivierung von TRPM2 werden durch zwei weitere Befunde der Arbeit von Numata und Kollegen unterstützt. So wurde zum einen gezeigt, dass die Aktivierung von HICC-Strömen durch die intrazelluläre Applikation der Nucleotide ADP-Ribose, cADP-Ribose und NAD^+ nur dann möglich ist, wenn extrazellulär keine ADP-Ribose vorhanden ist. Dieser Befund wurde so interpretiert, dass die enzymatische Umwandlung von cADP-Ribose und NAD^+ mit einem gleichzeitigen Export des Produktes einhergeht. Eine Eigenschaft, die für CD38 schon beschrieben wurde (Liu *et al.*, 2005). Liegen extrazellulär hohe Konzentrationen von ADP-Ribose vor, wird in allen Fällen der Transport von ADP-Ribose, cADP-Ribose und NAD^+ aus der Zelle und ebenso die damit verbundenen Aktivierung von TRPM2 gehemmt. Diese Befunde erklären möglicherweise die hohen cADP-Ribose Konzentrationen, die nach der reduzierten Expression von CD38 gemessen wurden. Fraglich bleibt aber weiterhin, welche Ursache die gestiegenen cADP-Ribose Level haben.

Der HICC in HeLa-Zellen ist eine Variante des TRPM2, dem das Exon27 fehlt. Gerade dieses Exon kodiert das NudT9-H Motive und der Verlust des Exons geht mit dem Verlust der ADP-Ribose Pyrophosphatase Aktivität einher (Wehage *et al.*, 2002). Diese Tatsache unterstützt zusätzlich die Hypothese das CD38 und TRPM2 der Sensor für Nucleotide in HeLa-Zellen ist, da die *Splice*-Variante des TRPM2 in HeLa-Zellen nicht mehr in der Lage ist, Nucleotide zu binden und so aktiviert zu werden.

In der Literatur wird CD38 eigentlich als Quelle für cADP-Ribose diskutiert (Lee, 1997). Im Hinblick auf die Beteiligung von cADP-Ribose an weiteren Prozessen, die intrazelluläre Ionenkonzentrationen regulieren, erscheint die Aufgabe als „Wirkungsvermittler“ für die HICC-Aktivierung vorstellbar. Zum einen ist cADP-Ribose ein wichtiger *second messenger* bei der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, wie dem *endoplasmatischen reticulum* (ER) (Lukyanenko *et al*, 2001) und darüber hinaus auch in Prozessen der beteiligt. Bis jetzt wurde jedoch lediglich die Beteiligung am *regulatory volume decrease* (RVD) beschrieben (McCarty & O’Neil, 1992), aber auch dieser hat ebenso wichtige Funktionen für die Volumenregulation der Zelle wie der RVI.

In Bezug auf die FLIM-Experimente ist zu erwähnen, dass diese bisher ausschließlich mit HEK293 und nicht mit HeLa-Zellen durchgeführt werden konnten, weil TRPM2-eGFP nach der Überexpression in HeLa-Zellen nicht an der Membran lokalisiert. Auch in den gezeigten Experimenten mit HEK293-Zellen ist der überwiegende Teil des TRPM2-eGFP Konstrukts intrazellulär, vermutlich im ER, lokalisiert. Es wäre denkbar, eine Optimierung des Konstrukts vorzunehmen, zum Beispiel durch Modifizierung der Aminosäuresequenz zwischen Kanal und Fluorophor oder dem Tausch des Fluorophors an den N-Terminus des Konstrukts.

5.2.2.2 Die Mediatoren des RVI in HeLa-Zellen in Abhängigkeit von Temperatur und Osmolarität

Für HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass der HICC und der NHE1 die Hauptvermittler des RVI sind (Wehner *et al*, 2003b). Neben der allgemeinen Quantifizierung des RVI in HeLa-Zellen mittels FCS, sollten darüber hinaus auch die beiden entscheidenden Vermittler des RVI direkt untersucht werden. Wie gezeigt wird der HICC in HeLa-Zellen durch eine *Splice*-Variante des TRPM2 (Numata *et al*, 2012) ausgebildet. In den durchgeführten Messungen konnten dieselben Strom-Spannungs-Beziehungen wie für den hyperton-aktivierten Kationenstrom beobachtet werden (Vergleiche Abbildung 4.2-18). Diese Ströme zeigten, wie zuvor auch der RVI, eine deutliche Abhängigkeit der Stromstärke von der Temperatur und Osmolarität. Mit steigender Temperatur, sowie mit steigender Osmolarität wurde die gemessene Stromdichte in HeLa-Zellen jeweils größer (vergleiche Abbildung 4.2-19).

Die gemessenen Ströme bei 15°C und 5°C bilden eine Ausnahme. Abgesehen von den Messungen bei 360°mosM, war innerhalb einer Osmolarität eine mit der

Temperatur stetige Zunahme der Ströme zu beobachten. Der Vergleich der Ströme, z.B. bei 15°C, zeigt, dass bei den vier unterschiedlichen Osmolaritäten, keine Zunahme der Stromdichte mit der Osmolarität mehr zu erkennen ist.

Die Regulation von TRP-Kanälen basiert zum Teil auf einem vermehrten Einbau des Kanals in die Zellmembran (Cayouette & Boulay, 2007). Ein solcher Einbau setzt den Transport des Kanals in Vesikeln voraus. Eben dieser Transport ist bei Temperaturen unter 20°C gestört (Mottet *et al*, 1986; Tartakoff, 1986). Somit könnten diese Ergebnisse ein Hinweis auf eine zusätzliche Regulation von TRPM2 in HeLa-Zellen sein. Neben einer Aktivierung der in der Membran vorhandenen Kanäle, würden bei erhöhtem Bedarf vermehrt Kanäle in die Membran eingebaut. Diese Hypothese wird durch die berechneten Aktivierungsenergien für die Aktivierung des HICC in HeLa-Zellen unterstützt. Diese weisen bei hypertone Stress von 360 mosM bzw. 400 mosM jeweils Werte um ~25 kJ/mol auf. Erhöhter hypertoner Stress von 450 mosM oder 526 mosM führt jedoch zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivierungsenergie auf ~40 kJ/mol bzw. ~45 kJ/mol. Diese Werte sind signifikant größer als bei 360 mosM. Die erhöhten Aktivierungsenergien könnten ein Indiz für einen zusätzlichen Transport und Einbau von Kanälen in die Membran sein. Für die Aktivierung einzelner NMDA-Rezeptorkanäle konnte gezeigt werden, dass sie Aktivierungsenergie von 26 ± 1 kJ/mol haben (Cais *et al*, 2008). Somit liegen die gemessenen Aktivierungsenergien für den HICC bei 360 und 400 mosM in einem sehr ähnlichen Bereich. Darüber hinaus lässt es auch den Schluss zu, dass eine vermehrte Aktivierung des HICCs, durch zusätzlichen Transport an die Membran, eine höhere Aktivierungsenergie aufweist.

Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich auch für die Entwicklung der Aktivierungsenergie bei der Betrachtung des NHE1 in HeLa-Zellen (vergleiche Abbildung 4.2-23). Auch dieser zeigt Temperatur- sowie Osmolarität-abhängige Transportraten. Allerdings steigen die gemessenen Transportraten bei 15°C mit erhöhter Osmolarität immer noch leicht an. Das könnte für eine Regulation von NHE1, unabhängig von einem vermehrten Transport zur Plasmamembran, sprechen. Möglich ist aber auch, dass ein deutlicher Effekt erst unterhalb von 15°C messbar wäre, eine Temperatur bei der, aufgrund technischer Gegebenheiten, nicht mehr gemessen werden konnte. Bei Betrachtung der Aktivierungsenergien für NHE1 fällt die gleiche, schrittweise Erhöhung der Werte zwischen 400 mosM und 450 mosM auf. Somit kann auch für NHE1 ein ähnliches, zweistufiges Aktivierungsmodell

angenommen werden. Je nach Stärke des hypertonen Stresses werden entweder nur die in der Membran vorhandenen Transporter aktiviert, oder zusätzlich mehr Transporter eingebaut.

Beim Vergleich der Aktivierungsenergien vom HICC und dem NHE1 (Abbildung 4.2-24) fällt auf, dass diese für jede der vier Osmolaritäten beim NHE1 deutlich höher sind. Diese Tatsache lässt sich mit den zugrundeliegenden Transportmechanismen verdeutlichen. Strömen bei HICC-Aktivierung die jeweiligen Kationen relativ ungehindert durch den Kanal, so ist der Transport durch den NHE1 jeweils mit der Bindung von einem Proton und eine Natrium-Ionen und einer Konformationsänderung des Proteins verbunden.

5.3 Kryo-Konservierung und der zelluläre Wasserhaushalt

Das langsame Frieren von Zellen geht mit einem massiven Verlust von Zellwasser einher. Extrazelluläre Eisbildung führt zu einer Entfernung von Wasser aus dem thermodynamischen Gleichgewicht und somit zu einer starken Konzentrierung von extrazellulären Salzen und Kryoprotektia, die so zur Dehydrierung beitragen (Mazur, 1984; Dong *et al*, 2010; Spindler *et al*, 2012; Akhoondi *et al*, 2012). Bis dato ist zwar die Volumenregulation nach Kryo-Konservierung als Qualitätsmerkmal diskutiert (Petrunkina *et al*, 2005), allerdings ist der direkte Einfluss von Volumenregulation auf eine erfolgreiche Rückkehr der Zellen aus dem gefrorenen Zustand nicht bekannt.

5.3.1 Zellvolumenregulation nach dem Frieren von HeLa-Zellen

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, inwieweit der Volumenverlust durch Kühlen und Frieren von Zellen für eine erfolgreiche Kryo-Konservierung notwendig ist und wie die Mechanismen der Volumenregulation zu einem erneuten Volumengewinn nach dem Frieren beitragen. Dazu wurden Zellen als adhärenente Kultur zu einer Temperatur von -50°C gefroren und nach dem Auftauen mit Hilfe von FCS untersucht. Es wurden die gleichen Parameter bestimmt, die vor dem Frieren gemessen wurden, also das Schrumpfen, der RVI und das Schwellen. Ebenso wurden Volumen- und Viskositätsänderungen betrachtet.

Die Messungen wurden bei den vier Temperaturen 35°C , 25°C , 15°C und 5°C mit 450 mosM (als repräsentative Osmolarität) durchgeführt. Bereits bei der Betrachtung einer Einzelmessung von einer ungefrorenen und gefrorenen Zelle (Abbildung 4.3-4) fallen deutliche Unterschiede auf. In Abbildung 4.3-5 und Abbildung 4.3-6

sind die Ergebnisse für alle Temperaturen zusammengefasst. Die Volumenmessung zeigt kaum Unterschiede beim Schrumpfen und Schwellen der Zellen, allerdings ist der RVI der Zellen die gefroren waren, dreimal schneller.

Die Messung der Viskosität zeigt ein ähnliches Bild. Sind die Raten der Viskositätsänderung beim Schrumpfen und Schwellen denen der Zellen vor dem Frieren sehr ähnlich, so ist die Rate der Viskositätsänderung beim RVI doppelt so schnell. Ebenso ist auffällig, dass die Viskosität der gefrorenen Zellen bei denselben Temperaturen unter hypertone Stress von 450 mosM fast doppelt so stark ansteigt. Die Volumenänderung beim Schrumpfen beträgt bei Zellen vor dem Frieren, ebenso wie nach dem Frieren rund 40%.

Zusätzlich zu den Messungen an gefrorenen Zellen wurden Zellen vor dem Frieren mit 100 nM Vasopressin behandelt. Dieses Hormon führt zu einer vermehrten Einlagerung und Aktivierung von α -ENaC und Aquaporin 2 in die Membran (Butterworth *et al*, 2009; Nedvetsky *et al*, 2009). Die Idee war, so die Volumenregulation zu verstärken, um eine bessere Regulation nach dem Frieren zu erreichen. Der Vergleich der Raten der Volumenänderung von Zellen, die ohne und mit Vasopressin-Vorbehandlung gefroren wurden, zeigen zwei Befunde auf. Zum einen sind die Raten des Schwellens nach Vasopressin-Behandlung leicht erhöht, was für eine erhöhte Aquaporin-Expression sprechen würde und zum anderen sind die Raten des RVI schneller geworden. Dieser Effekt ist insbesondere bei tieferen Temperaturen sichtbar. Bei 5°C ist der RVI nach Vasopressin-Behandlung doppelt so schnell. Bei der Änderung der Viskosität sind nur leichte Unterschiede zu erkennen. Die Änderung der Viskosität beim Schwellen der Zellen ist leicht reduziert und die Änderung der Viskosität beim RVI nach Vasopressin-Behandlung ist minimal erhöht. Diese Effekte sind jedoch wesentlich kleiner als die beobachteten Veränderungen bei der Volumenregulation.

Bei der Messung der Volumenänderungen ist insbesondere der RVI ein Parameter der durch Frieren eine Änderung der Aktivierungsenergie erfährt. Die Aktivierungsenergie ist bei vormals gefrorenen Zellen signifikant kleiner als bei ungefrorenen Zellen und nimmt durch Vorbehandlung mit Vasopressin weiter ab. Dagegen zeigen die Aktivierungsenergien für das Schrumpfen und Schwellen lediglich eine leichte Reduktion. Dennoch ist ein Effekt vom Frieren und der Vasopressin-Behandlung zu erkennen, die auf eine erhöhte Aquaporin Anzahl/ Aktivität hindeuten könnte. Bis auf eine Reduktion der Aktivierungsenergie für die Änderung der

Viskosität beim Schrumpfen der Zellen zwischen ungefrorenen und gefrorenen Zellen ist keine weitere, deutliche Änderung zu beobachten. Die Änderung der Aktivierungsenergie für den RVI ist nicht eindeutig und aufgrund eines hohen Fehlers nicht zu unterscheiden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Frieren von Zellen einen klaren Einfluss auf deren Volumenregulation hat. Die passiven Änderungen des Schrumpfen und Schwellens sind weniger betroffen, vielmehr ist die aktive Regulation des Volumens während des RVI erhöht. Es kommt zu einer erhöhten Aktivität der Ionenkanäle und/ oder Transporter, was zu einer schnelleren Volumenregulation nach dem Frieren führt. Da die Zellen 30 min nach dem Frieren gemessen wurden liegt es nahe, dass der schnellere RVI durch eine verstärkte Aktivierung oder den vermehrten Einbau von Kanälen in die Membran bedingt ist. In einem so kurzen Zeitraum scheint die Synthese von neuen Proteinen unwahrscheinlich.

Es ist bekannt, dass Zellen während des Frierens große Mengen Wasser verlieren (Spindler *et al*, 2012) und nach dem Auftauen dieses wieder zurück gewinnen müssen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse, lassen die Überlegung zu, dass Zellen durch den Mechanismus des RVI aktiv ihr Volumen nach dem Frieren auf das Ausgangsniveau zurück regulieren. Das wäre der erste Befund für einen aktiven zellulären Mechanismus, der an einer erfolgreichen Kryo-Konservierung von Zellen beteiligt ist.

5.3.2 HICC-Aktivierung durch Frieren

In HeLa-Zellen ist der HICC der Hauptvermittler des Volumengewinns während des RVI (Wehner *et al*, 2003b). Da schon gezeigt wurde, dass der HICC eine entscheidende Rolle beim RVI von Zellen vor dem Frieren spielte, sollte darüber hinaus auch geklärt werden, inwieweit der HICC an der Adaption der Zellen nach Kryo-Bedingungen beteiligt ist. Es zeigte sich, dass die Stromdichte von zuvor gefrorenen Zellen doppelt so groß war, wie die Stromdichte von Kontroll-Zellen (Vergleiche Abbildung 4.3-8). Diese Beobachtung ist eine mögliche Erklärung für den beobachteten, erhöhten RVI in HeLa-Zellen nach dem Frieren (vergleiche Abbildung 4.3-5). So konnte mittels FCS ein dreifach schnellerer RVI nach dem Frieren gemessen werden. Die Erhöhung der HICC Stromdichte legt nahe, dass diese einen entscheidenden Beitrag zu dem schnelleren RVI von HeLa-Zellen nach dem Frieren leistet. Diese erhöhte Stromdichte war nur innerhalb der erste zweieinhalb Stunden zu messen. Danach fiel die

Stromdichte wieder auf das Ausgangsniveau herab. Die beobachtete Erhöhung des HICC-Stroms scheint somit eine aktive, zeitlich begrenzte Reaktion der Zellen auf die Veränderungen während des Frierens zu sein. Ergänzend sei noch erwähnt, dass einige Zellen, die kurz nach dem Auftauen gemessen wurden, in isotoner Lösung Ströme ausbildeten, die denen nach hypertoner Aktivierung in Intensität und Strom-Spannungs-Kennlinie glichen.

Es kann angenommen werden, dass die erhöhte Aktivität des HICC, die nach dem Frieren gemessen wurde, Teil der aktiven Volumenregulation der Zellen nach dem Frieren ist. Diese Vermutung wird auch durch die Betrachtung der Aktivierungsenergien der HICC-Aktivierung vor und nach dem Frieren unterstützt (vergleiche Abbildung 4.3-10). Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der Aktivierungsenergie des HICC nachdem HeLa-Zellen gefroren wurden. Diese Verringerung beträgt 22% und ist somit der Verringerung der Aktivierungsenergie des RVI in HeLa-Zellen vor und nach dem Frieren mit 28,6% vergleichbar (siehe Abbildung 4.3-7).

Der Unterschied deutet auf eine Beteiligung eines weiteren Vermittlers der Volumenregulation hin. Der NHE1 konnte als einer der Vermittler des RVI in HeLa-Zellen vor dem Frieren charakterisiert werden. Diese Daten sollten zusätzlich auch für HeLa-Zellen nach dem Frieren erstellt werden. Erste Versuch dazu wurden bereits unternommen, es konnte jedoch noch kein zufriedenstellendes Protokoll für das Frieren der Zellen gefunden werden, was das nachträgliche Messen mit BCECF erlaubte.

Unterstützend zu den Befunden der FCS-Messungen zur Volumenregulation, zeigen auch die Messungen der HICC-Aktivität in HeLa-Zellen nach dem Frieren eine deutliche Erhöhung der Aktivität der beteiligten Kanäle. Abschließend kann festgehalten werden, dass die Volumenregulation als Gesamtheit, und der HICC als einer der Vermittler, durch das Frieren der Zellen aktiviert wird. Außerdem gibt es Anzeichen, dass es sich hier um einen aktiven Mechanismus der Zellen handelt, um die Volumenänderung, die durch das Frieren entsteht, zu korrigieren.

5.3.3 Vasopressin als biologisches Kryo-Protektivum

Vasopressin ist als antidiuretisches Hormon in der Lage die Rückgewinnung von Wasser aus dem Primärharn zu erhöhen. Über die Bindung an Typ-2 Vasopressin-Rezeptoren bewirkt es einen erhöhten Einbau von α -ENaC und Aquaporin 2 in die Membran von Zellen im Sammelrohr der Niere (Snyder, 2005; Birnbaumer, 2000;

Bankir *et al*, 2010). Vasopressin entfaltet seine Wirkung ebenfalls bei einer Vielzahl von Zelllinien, die den Vasopressin-Rezeptor und α -ENaC bzw. Aquaporin 2 exprimieren. Da α -ENaC zu mindestens in HepG2-Zellen ein integraler Bestandteil des HICC ist (Plettenberg *et al*, 2008) und die Aktivierung des HICCs nach Kryobedingungen scheinbar zum Überleben der Zellen beiträgt, wurde getestet, ob die Stimulierung der Expression von α -ENaC das Überleben von Zellen nach der Kryokonservierung positiv beeinflusst.

In Versuchen an adhärent gefrorenen Zellen zeigte sich durch die Vasopressin-Vorbehandlung eine signifikante Erhöhung der Zellvitalität nach dem Frieren zu -50°C oder -80° (Abbildung 4.3-1). Weiterhin zeigten zuvor gefrorene Zellen ein deutlich langsames Wachstum als ungefrorene Zellen (Abbildung 4.3-2), ein Effekt, welcher durch die Vorinkubation mit Vasopressin verbessert werden konnte (Abbildung 4.3-3). Dabei handelte es sich wahrscheinlich um eine doppelte Wirkung von Vasopressin. Zum einen wird durch Vasopressin eine verstärkte Volumenregulation hervorgerufen, die auf eine Aktivierung des HICCs zurückzuführen ist. Dies ist insbesondere interessant, weil HICC-Aktivierung eine zentrale Rolle in der Proliferation spielen (Wehner *et al*, 2003a; Bondarava *et al*, 2009; Numata *et al*, 2012). Die beobachtete Erhöhung des Zellwachstums zum einen und ein höheres Überleben der Zellen nach dem Frieren zum anderen könnte auf Grund der HICC Stimulation entstanden sein.

Unterstützt werden diese Überlegungen durch die Befunde der FCS- und HICC-Strom-Messungen an Zellen, die vorab mit Vasopressin behandelt und gefroren wurden. Vasopressin-behandelte HeLa-Zellen zeigten, insbesondere bei tieferen Temperaturen, einen deutlich erhöhten RVI. In Zusammenhang mit der in 5.2.2 diskutierten Regulation der Aktivität der Volumenregulation, über die vermehrte Einlagerung von Transportern/ Kanälen in die Membran, könnte dieser Befund ein weiteres Indiz sein. Die stark verkürzten Zeiten für den RVI bei 15°C oder 5°C sprechen für eine erhöhte Aktivität des HICC, der möglicherweise durch die vorausgegangene Inkubation mit Vasopressin schon vermehrt in die Membran eingelagert wurde. Bei tiefen Temperaturen kann die Zelle den RVI nicht durch eine verstärkte Einlagerung des HICC in die Membran erhöhen, da hier der vesikuläre Transport gehindert ist. Parallel zu einer verkürzten RVI-Zeit, sind nach dem Frieren in *Patch-Clamp* Messungen höhere Ströme nach vorhergegangener Vasopressin-Inkubation gemessen worden (Vergleiche Abbildung 4.3-11). Diese sind signifikant größer als

die Ströme nach dem Frieren der HeLa-Zellen ohne Vasopressin-Vorbehandlung. Somit konnte ein direkter Bezug zwischen der Vasopressin-Behandlung und der HICC-Aktivierung gezeigt werden.

Wie bereits erwähnt, wird der HICC in HeLa-Zellen durch eine ΔC -Variante von TRPM2 ausgebildet (Numata *et al.*, 2012). In der Literatur wird jedoch die Wirkung von Vasopressin auf α -ENaC beschrieben, der sehr wahrscheinlich kein Bestandteil des HICCs in HeLa-Zellen ist. Auf mRNA-Ebene konnte die Expression von α -ENaC in HeLa-Zellen bestätigt werden und durch erste siRNA-Experimente wurde begonnen, das Zusammenspiel der beiden Kanäle in HeLa-Zellen zu untersuchen. Die siRNA-bedingte, reduzierte Expression von α -ENaC in HeLa-Zellen führte nach hypertonem Stress nicht zu einer Verringerung des gemessenen Stroms. Allerdings konnte nach Vasopressin-Inkubation von HeLa-Zellen mit reduzierter Expression von α -ENaC keine Erhöhung des Stroms gemessen werden. Somit wäre α -ENaC ein Bestandteil der Vasopressin-vermittelten Stimulation des HICC-Stroms in HeLa-Zellen, ohne selbst ein Element des HICCs darzustellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Vasopressin eine neue Klasse von biologisch aktiven Kryo-Protectiva darstellt. Diese vermitteln ihre Wirkung nicht über die Veränderung von physikalischen Parametern, wie Gefrierpunktniedrigung und Verhinderung der Eis-Nukleation wie z.B. DMSO und Ethylenglykol. Vielmehr scheint es, schon vor dem Frieren, die Volumenregulations-Maschinerie zu stimulieren, wodurch die Zellen nach dem Auftauen eine verbesserte Regulation ihres veränderten Wasserhaushaltes aufweisen. Die hier gezeigten Ergebnisse bieten eine neue Herangehensweise an die Optimierung von Kryo-Konservierung. So wurden bis dato optimale Gefrierprotokolle für Zellen empirisch bestimmt, insofern als Gefriereschwindigkeiten und Konzentrationen von Kryo-Protectiva durch Testung optimiert wurden. Durch den Nachweis, dass die Volumenregulation von Zellen eine wichtige Rolle bei einer erfolgreichen Kryo-Konservierung spielt eröffnet sich ein neues Feld zur Untersuchung und Optimierung von Kryo-Protokollen.

5.3.4 Volumenregulation und Viskosität

Neben der direkten Veränderung des Wassergehalts hat Kühlen und insbesondere Frieren auch einen starken Effekt auf die zelluläre Viskosität. In Gegenwart von 10% DMSO resultiert das Kühlen von Zellen zu -10°C in einer 15-fachen Erhöhung der Viskosität (vergleiche Abbildung 4.3-13). Interessanterweise sinkt diese Viskosi-

tät beim Auftauen nicht direkt wieder auf das vorherige Niveau. So ist die Viskosität bei 35°C nach dem Frieren doppelt so hoch wie vor dem Frieren. Diese Hysterese könnte auch ein wichtiger Punkt für die Volumenregulation von Zellen nach Kryolagerung sein.

In der Literatur wird das Phänomen des *macromolecular crowdings*, also der Akkumulation von Makromolekülen, als ein Mechanismus diskutiert, der an der Volumenregulation von Zellen beteiligt ist. Von Zimmerman und Harrison wurde postuliert, dass die Konzentration von Makromolekülen einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeiten innerhalb der Zelle hat (Zimmerman & Harrison, 1987). Später wurde gezeigt, dass die Konzentration solcher Makromoleküle, in diesem Fall Albumin, in Erythrozyten den Sollwert für die Volumenregulation festsetzt. Nicht das tatsächliche Volumen, sondern die Albuminkonzentration war der entscheidende Faktor, der bestimmte wie stark die Zellen nach hypertone Stress ihr Volumen regulierten (Colclasure & Parker, 1991). Von Periasamy und Kollegen wurde gezeigt, dass neben der Volumenänderung die Akkumulation von organischen Osmolyten die Viskosität von osmotisch gestressten Zellen erhöht (Periasamy *et al*, 1992). Die Konzentration von Biomolekülen in einer Lösung, wie dem Zytoplasma, ist ein entscheidender Parameter, um die Viskosität des Zytoplasmas zu beschreiben. Eine Erhöhung der Konzentration dieser Moleküle führt zu einer erhöhten Viskosität.

Diesem Gedanken folgend, wurde getestet, ob eine artifizielle Erhöhung der intrazellulären Viskosität zu einer regulatorischen Antwort der Zelle führt. Dazu wurde, unter isotonen Bedingungen in *Patch-Clamp*-Versuchen die Viskosität von HeLa-Zellen mit Hilfe von Dextran erhöht und die entstehenden Ströme gemessen. Die hier durchgeführte Viskositätserhöhung spiegelte die, mit FCS gemessenen, Änderung in Zellen beim Schrumpfen durch eine hypertone Lösung mit 400 mosM wider. Durch die Viskositätserhöhung wurden in HeLa-Zellen Ströme hervorgerufen, die sowohl in ihrer Dichte und der Strom-Spannungs-Kennlinie mit den durch hypertonen Stress aktivierten HICC-Strömen vergleichbar waren. Es ist anzunehmen, dass es sich ebenfalls um eine Aktivierung von der HeLa-TRPM2 Variante handelt, die ebenso nach osmotischem Stress zu beobachten ist. Die Aktivierungsenergie der durch Viskosität hervorgerufenen Ströme lag mit ~ 18 kJ/mol unter der Aktivierungsenergie von Strömen nach hypertone Stress. Diese verringerte Aktivierungsenergie könnte eine direkte Aktivierung des HICCs widerspiegeln, die nicht auf die Aktivierung vorgelagerter Signalkaskaden beruht. Die jeweilige

Differenz der Viskositätsänderung scheint dabei eine entscheidendere Rolle zu spielen als die absolute Viskosität. Mit derselben Intrazellulär-Lösung wurden sowohl bei 35°C als auch bei 25°C HICC-Ströme aktiviert, obwohl die Viskosität der Lösung, sowie des Zytoplasmas der Zellen bei 25°C höher war.

Auch wenn noch kein Mechanismus für die Aktivierung des HICC durch Viskosität gezeigt werden konnte, ist trotzdem anzunehmen, dass diese Aktivierung ein weiteres Indiz für die Steuerung der Volumenregulation durch Viskosität/ *macromolecular crowding* ist. Dieser Zusammenhang würde auch eine Erklärung zulassen, bei der die beobachtete Hysterese in der Viskosität von gefrorenen Zellen (Vergleiche Abbildung 4.3-13) zumindest ein Auslöser für die einsetzende Volumenregulation und HICC-Aktivierung in HeLa-Zellen nach dem Frieren ist.

5.4 Thermischer Arrest in der Mikroskopie

Zur Untersuchung des Zustandes von gefrorenen Zellen wurden vielfach mikroskopische Methoden eingesetzt. Von Mazur wurde 1988 beispielsweise die Bildung von extrazellulären Eiskristallen und das Schrumpfen von Zellen mittels Mikroskopie gezeigt (Mazur, 1988). Und auch aktuelle Studien nutzen mikroskopische Verfahren, um die Vorgänge beim Frieren von Zellen zu untersuchen (Spindler *et al*, 2012), wobei auch aufwendigere Verfahren wie Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebenszeitmikroskopie verwendet werden (König *et al*, 2013). Allen diesen Ansätzen ist die Tatsache gemeinsam, dass sie die Einflüsse von Frieren auf Zellen untersuchen.

Im Rahmen des Kryo-Projekts entstand die Idee, das Frieren von Zellen als Fixierverfahren für die Mikroskopie einzusetzen. Moderne Mikroskopieverfahren beruhen zum Teil auf langen Integrationszeiten von vielen Minuten. So wird zum Beispiel bei FLIM eine Zelle über mehrere Minuten gemessen, um ausreichend Photonen für eine verlässliche Auswertung zu detektieren. In einem weiteren Beispiel, der *superresolution*-Mikroskopie, muss die Probe für ~10 min mikroskopiert werden, um genügend einzelne Moleküle für die anschließende Rekonstruktion eines hochauflösenden Bildes zu detektieren. Beide Methoden sind somit langsamer als bestimmte biologische Prozesse in Zellen, die beobachtet werden sollen.

Klassischerweise wird dieses Problem über die Fixierung von Zellen gelöst. Die Strukturen in Zellen werden z.B. mit *para*-Formaldehyd vernetzt oder die Zellen werden mit Hilfe von Methanol dehydriert und die Strukturen so fixiert. Diese Metho-

den haben gemeinsam, dass die zugrundeliegenden Prozesse zur Fixierung nicht reversibel sind. Somit kann eine Zelle nur zu einem bestimmten Zeitpunkt fixiert und betrachtet werden. Die Idee des thermischen Arrests von Zellen sollte genau dieses Problem adressieren. Es sollten Verfahren etabliert werden, bei denen die Zellen durch Kühlen/ Frieren arretiert werden, um sie zu mikroskopieren, aber der Prozess des Frierens anschließend wieder umgekehrt werden kann. Demzufolge könnten dieselben Zellen zu mehreren Zeitpunkten arretiert und betrachtet werden.

5.4.1 Kryo-Superresolution-Mikroskopie

Bei diesem Ansatz sollten die gewonnenen Erkenntnisse über das Frieren von Zellen als adhärenzte Kultur genutzt werden, um ein Verfahren zur reversiblen Fixierung von Zellen zur anschließenden Mikroskopie zu entwickeln. Entscheidend war dabei die Idee, dass die Zellen im Anschluss wieder aufgetaut werden sollten um weiter zu Leben und zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt untersucht zu werden. Zur Testung dieses Verfahrens wurde die Lokalisation und Aktivierung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) untersucht. Dieser war in der Abteilung eingehend studiert (Wouters & Bastiaens, 1999; Offterdinger *et al.*, 2004) worden und bot daher einen guten Ansatz, um das aktuelle Verfahren zu testen.

Nach ersten Messungen an gefrorenen Zellen unter Verwendung von 10% DMSO wurde deutlich, dass die einsetzende Eisbildung die optische Qualität der erhaltenen Bilder zu stark einschränkte. Deswegen wurde ein Verfahren entwickelt, in dem die DMSO-Konzentration der Gefrierlösung schrittweise erhöht wurde. Dazu wurden jeweils Temperaturen gewählt, bei denen die erhöhte Konzentration von DMSO keine Toxizität für die Zellen aufwies. Im Anschluss wurde die DMSO Konzentration beim Erwärmen der Zellen wieder reduziert (Vergleiche Abbildung 4.4-3). Somit konnten die Zellen bei -50°C ohne Eisbildung in der Probe fixiert werden. FCS-Messungen an eGFP-exprimierenden Zellen bei -50°C hatten gezeigt, dass die Diffusion bei dieser Temperatur so langsam war, dass die zellulären Strukturen für die Aufnahmen ausreichend fixiert waren.

In den so fixierten Zellen wurde die Lokalisation eines EGFR-mEOS2 Konstrukts untersucht und die Zellen anschließend wieder auf 37°C erwärmt. Nach Stimulation mit EGF wurde die Probe ein zweites Mal gekühlt und nochmals mikroskopiert. Erste Bilder der berechneten Lokalisation der EGFR-mEOS2 Moleküle zeigten, dass dieses Verfahren grundsätzlich geeignet ist, die Lokalisation des

Rezeptors bei -50°C zu detektieren. Unter anderem musste gezeigt werden, dass das verwendete Fluorophor (mEOS2) die zugrundeliegende spektrale Änderung von grün nach rot, auch bei diesen Temperaturen noch vollzieht. Dies ist der Fall und darüber hinaus waren bis dato keine Veränderungen der EGFR Lokalisation durch das Kühlen zu erkennen. Als Maß für die Reversibilität kann die Reaktion der Zellen auf EGF-Stimulation angeführt werden. Nach dem Kühlen und Erwärmen wurden die Zellen mit einer Konzentration von 100 ng/ml EGF stimuliert und im zweiten Schritt der Mikroskopie nach erneutem Kühlen die Internalisierung des Rezeptors beobachtet. Hierbei handelt es sich um eine schon beobachtete Reaktion auf die Stimulation des Rezeptors mit EGF. Dieser wird nach der Aktivierung endozytiert, um nachfolgend durch die, am endoplasmatischen Retikulum lokalisierten, Phosphatasen dephosphoryliert und inaktiviert zu werden (Haj *et al*, 2002; Offterdinger *et al*, 2004).

Es wurde allerdings deutlich, dass dieses Verfahren einiger Verbesserungen bedarf. Beispielsweise war das detektierte Signal für das EGFR-mEOS Konstrukt nach dem zweiten Kühlen deutlich schwächer. Es ist unklar, ob dies aufgrund des Kühlens der Probe passiert, oder durch ein übermäßiges Bleichen der Fluorophore bei der ersten Mikroskopie hervorgerufen wurde. Dennoch scheint der Ansatz grundsätzlich zu funktionieren und insbesondere die Reversibilität wird durch die Reaktion der Zellen auf EGF unterstützt. Darüber hinaus sollte die Vitalität der Zellen mit weiteren Verfahren, wie einer Färbung mit Propidium-Iodid, untersucht werden um zu zeigen, dass die Zellen das Frieren überleben. Ebenso muss bedacht werden, dass das Kühlen der Zellen und der damit einhergehende Wasserverlust einen Einfluss auf die Physiologie der Zelle haben und somit auch die angestrebten Untersuchungen beeinflussen könnten.

5.4.2 Schockgefrieren von Zellen zur Mikroskopie

Neben dem langsamen Frieren, bei dem die Zellen ihr Volumen bedingt durch die extrazelluläre Eisbildung verändern, gibt es den Ansatz des ultraschnellen Frierens. Dabei werden die Zellen mit so hohen Raten abgekühlt, dass keine, oder nur minimale Eisbildung stattfindet. Auf Basis dieser Idee wurde am Fraunhofer Institut in St. Ingbert ein Gerät entwickelt mit dem es möglich ist, Zellen direkt auf dem Mikroskop innerhalb von 5 ms auf -190°C zu kühlen. Zusätzlich bietet dieses Verfahren eventuell die Möglichkeit die Zellen ohne Kryo-Protektiva zu frieren, wodurch eine Veränderung der Zellen durch diese Substanzen vermieden werden kann.

In gemeinsamen Experimenten mit Dr. Martin Masip und Asger Kreiner-Møller wurde das vorhandene Gerät auf ein inverses Mikroskop gebaut und die technischen Voraussetzungen für Frequenzdomänen-FLIM geschaffen. Das Ziel war, die molekulare Integrität der Zelle nach dem Frieren über eine bekannte Protein-Protein-Interaktion zu testen. Dazu wurde wiederum der EGF-Rezeptor gewählt, der nach der Stimulation mit EGF trans-phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung kann mit Hilfe einer Phospho-Tyrosin-Bindedomäne (PTB) des Proteins SHC nachgewiesen werden (Offterdinger *et al.*, 2004). Diese beiden Proteine waren mit Fluorophoren versehen, wodurch bei Bindung der PTB an den phosphorylierten EGF-Rezeptor der sogenannte Fluoreszenz-Energie Transfer (FRET) stattfand. Dadurch konnte die räumliche Nähe der beiden Proteine nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurden Zellen mikroskopiert, die nur den EGF-Rezeptor exprimierten. Nach Stimulation wurden die Zellen zu -190°C gefroren und die Interaktion der beiden Proteine mit Hilfe von FLIM detektiert.

Das Auftreten eines FRET-Signals ist ein Beleg für mehrere Gegebenheiten. Bei tiefkalten Temperaturen wurden Struktur und Eigenschaften der Fluorophore nicht so stark verändert, dass diese immer noch fluoreszent waren. Außerdem wurde die Interaktion dieser Proteine nicht durch das Frieren beeinflusst. Abschließend ist festzuhalten, dass auch das räumlich abgegrenzte Auftreten dieser Interaktion, in der Nähe der Membran, dafür spricht, dass die Strukturen innerhalb der Zellen nicht beeinflusst wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Methode des Schock-Frierens geeignet ist, Zellen zu arretieren und zu mikroskopieren. Die Mikroskopie bei tiefen Temperaturen bietet darüber hinaus den Vorteil, dass die Quantenausbeute der verwendeten Fluorophore besser ist und deutlich weniger Bleichen zu beobachten war.

Mit dem neu entwickelten Gerät ist überdies das Frieren der Zellen direkt auf dem Mikroskop möglich, was z.B. Problematiken wie den Transfer tiefkalter Proben umgeht. Dieses Fixierverfahren ist bisher nicht reversibel, da beim Wärmen, insbesondere im kritischen Temperaturbereich zwischen -130°C und -50°C , nicht die erforderlichen Heizraten erreicht werden, um die Probe so schnell zu tauen, dass sich keine Eikristalle bilden. Somit kann auch noch nicht belegt werden, dass das Verfahren als reversible Kryo-Arretierung verwendbar ist.

Untersuchungen in Dr. Jan Hübingers Doktorarbeit legen den Schluss nahe, dass zumindest die erreichten Kühlraten ausreichen können, um die Zellen reversibel zu

arretieren. Insbesondere der Verzicht auf Kryo-Protectiva bei den hier gezeigten Messungen bedarf jedoch der Klärung, ob dies mit einem Überleben der Zellen vereinbar ist. So wurden alle Ansätze für das schnelle Frieren von Zellen bisher in Kombination mit solchen Substanzen durchgeführt (Pegg, 2007). Vor diesem Hintergrund sollte die Frage geklärt werden, ob tatsächlich keine Eisbildung in der Probe stattfindet oder, ob kleinste Eiskristalle entstehen, die die Struktur der Probe nicht merklich stören, aber beim Tauen der Probe zu Problemen führen. Diese Eiskristalle dienen als Nukleationskeime und führen zu einem schnellen Wachstum von Eiskristallen (Pegg, 2007). Denkbar wäre zum Beispiel eine Untersuchung der Proben mittels Röntgen-Beugung, auf der die Struktur des Wasser (amorph oder Eis) untersucht werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Akhoondi M, Oldenhof H, Sieme H & Wolkers WF (2012) Freezing-induced cellular and membrane dehydration in the presence of cryoprotective agents. *Mol. Membr. Biol.* **29**: 197–206
- Alexander RT & Grinstein S (2006) Na⁺/H⁺ exchangers and the regulation of volume. *Acta Physiol. (Oxf)*. **187**: 159–67
- Armitage WJ & Juss BK (1996) Osmotic response of mammalian cells: effects of permeating cryoprotectants on nonsolvent volume. *J. Cell. Physiol.* **168**: 532–38
- Bankir L, Bichet DG & Bouby N (2010) Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**: F917–28
- Berdiev BK, Qadri YJ & Benos DJ (2009) Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol. Biosyst.* **5**: 123–7
- Berridge MJ, Lipp P & Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 11–21
- Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouysségur J & Shigekawa M (1994) The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J. Biol. Chem.* **269**: 13703–9
- Bicknese S, Periasamy N, Shohet SB & Verkman AS (1993) Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: measurement by evanescent field frequency-domain microfluorimetry. *Biophys. J.* **65**: 1272–82
- Birnbaumer M (2000) Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**: 406–10
- Bondarava M, Li T, Endl E & Wehner F (2009) alpha-ENaC is a functional element of the hypertonicity-induced cation channel in HepG2 cells and it mediates proliferation. *Pflugers Arch.* **458**: 675–87
- Bonny O, Chraibi a, Loffing J, Jaeger NF, Gründer S, Horisberger JD & Rossier BC (1999) Functional expression of a pseudohypoaldosteronism type I mutated epithelial Na⁺ channel lacking the pore-forming region of its alpha subunit. *J. Clin. Invest.* **104**: 967–74
- Borgnia M, Nielsen S, Engel A & Agre P (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 425–58
- Butterworth MB, Edinger RS, Frizzell R a & Johnson JP (2009) Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**: F10–24

- Byfield FJ, Hoffman BD, Romanenko VG, Fang Y, Crocker JC & Levitan I (2006) Evidence for the role of cell stiffness in modulation of volume-regulated anion channels. *Acta Physiol. (Oxf)*. **187**: 285–94
- Cais O, Sedlacek M, Horak M, Dittert I & Vyklicky L (2008) Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptor channels. *Neuroscience* **151**: 428–38
- Cala PM (1980) Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. *J. Gen. Physiol.* **76**: 683–708
- Canessa CM, Horisberger JD & Rossier BC (1993) Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* **361**: 467–70
- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD & Rossier BC (1994) Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**: 463–7
- Cayouette S & Boulay G (2007) Intracellular trafficking of TRP channels. *Cell Calcium* **42**: 225–32
- Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517–24
- Colclasure GC & Parker JC (1991) Cytosolic protein concentration is the primary volume signal in dog red cells. *J. Gen. Physiol.* **98**: 881–92
- Conner MT, Conner AC, Bland CE, Taylor LHJ, Brown JEP, Parri HR & Bill RM (2012) Rapid Aquaporin Translocation Regulates Cellular Water Flow. *J. Biol. Chem.* **287**: 11516–25
- Costanzo JP, do Amaral MCF, Rosendale AJ & Lee RE (2013) Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. *J. Exp. Biol.* **216**: 3461–73
- Dong J, Malsam J, Bischof JC, Hubel A & Aksan A (2010) Spatial distribution of the state of water in frozen mammalian cells. *Biophys. J.* **99**: 2453–9
- Du J, Tao J, Kleinhans FW, Mazur P & Critser JK (1994) Water volume and osmotic behaviour of mouse spermatozoa determined by electron paramagnetic resonance. *J. Reprod. Fertil.* **101**: 37–42
- Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW & Schultz P (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* **21**: 129–228
- Dunham PB, Kelley SJ & Logue PJ (2004) Extracellular Na⁺ inhibits Na⁺/H⁺ exchange: cell shrinkage reduces the inhibition. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**: C336–44

- Elson EL & Magde D (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**: 1–27
- Enyedi P & Czirják G (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* **90**: 559–605
- Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC & Schild L (1998) The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J.* **17**: 344–52
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**: 55–75
- Fujita J (1999) Cold shock response in mammalian cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 243–55
- Fyfe GK & Canessa CM (1998) Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel. *J. Gen. Physiol.* **112**: 423–32
- Gallagher SR (2012) One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 10**: Unit 10.1.1–44
- Garnovskaya MN, Mukhin Y V, Vlasova TM & Raymond JR (2003) Hypertonicity activates Na⁺/H⁺ exchange through Janus kinase 2 and calmodulin. *J. Biol. Chem.* **278**: 16908–15
- Garty H & Palmer LG (1997) Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* **77**: 359–96
- Gianazza E & Giorgio Righetti P (1980) Size and charge distribution of macromolecules in living systems. *J. Chromatogr. A* **193**: 1–8
- Graeff R & Lee HC (2002) A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity. *Biochem. J.* **361**: 379–84
- Griffiths JB, Hunt CJ, Cox CS, Beadle DJ & Reid DS (1979) Changes in Cell Size During the Cooling , Warming Cycle Periods of the Freeze-Thaw Cycle. *Cryobiology* **151**: 141–151
- Grinstein S, Rothstein A & Cohen S (1985) Mechanism of osmotic activation of Na⁺/H⁺ exchange in rat thymic lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* **85**: 765–87
- Haerteis S, Krueger B, Korbmacher C & Rauh R (2009) The delta-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation. *J. Biol. Chem.* **284**: 29024–40
- Haj FG, Verveer PJ, Squire A, Neel BG & Bastiaens PIH (2002) Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* **295**: 1708–11

- Hallows KR, Packman CH & Knauf PA (1991) Acute cell volume changes in anisotonic media affect F-actin content of HL-60 cells. *Am. J. Physiol.* **261**: C1154–61
- Hanukoglu A (1991) Type I pseudohypoaldosteronism includes two clinically and genetically distinct entities with either renal or multiple target organ defects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**: 936–44
- Hazama A & Okada Y (1988) Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J. Physiol.* **402**: 687–702
- Heinzinger H, van den Boom F, Tinel H & Wehner F (2001) 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**: 703–15
- Hess ST, Girirajan TPK & Mason MD (2006) Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* **91**: 4258–72
- Hink M, Griep R, Borst J, van Hoek A, Eppink M, Schots A & Visser A (2000) Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 17556–60
- Hoffmann EK, Lambert IH & Pedersen SF (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* **89**: 193
- Ji H-L, Zhao R-Z, Chen Z-X, Shetty S, Idell S & Matalon S (2012) δ ENaC: a novel divergent amiloride-inhibitable sodium channel. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **303**: L1013–26
- Jiang L-H, Yang W, Zou J & Beech DJ (2010) TRPM2 channel properties, function and therapeutic potentials. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**: 973–988
- Kabra R, Knight KK, Zhou R & Snyder PM (2008) Nedd4-2 induces endocytosis and degradation of proteolytically cleaved epithelial Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **283**: 6033–9
- Karpushev A V, Levchenko V, Pavlov TS, Lam VY, Vinnakota KC, Vandewalle A, Wakatsuki T & Staruschenko A (2008) Regulation of ENaC expression at the cell surface by Rab11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**: 521–5
- Kellenberger S & Schild L (2002) Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* **82**: 735–67
- Kelly O, Lin C, Ramkumar M, Saxena NC, Kleyman TR & Eaton DC (2003) Characterization of an amiloride binding region in the alpha-subunit of ENaC. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**: F1279–90

- Kleyman TR, Carattino MD & Hughey RP (2009) ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J. Biol. Chem.* **284**: 20447–51
- Knight KK, Wentzlaff DM & Snyder PM (2008) Intracellular sodium regulates proteolytic activation of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* **283**: 27477–82
- König K, Uchugonova A & Breunig HG (2013) High-resolution multiphoton cryomicroscopy. *Methods*
- Krichevsky O & Bonnet G (2002) Fluorescence correlation spectroscopy : the technique and its applications. *Reports Prog. Phys.* **65**: 251–297
- Kroemer G, Dallaporta B & Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 619–42
- Kusche-Vihrog K, Sobczak K, Bangel N, Wilhelmi M, Nechyporuk-Zloy V, Schwab A, Schillers H & Oberleithner H (2008) Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Pflugers Arch.* **455**: 849–57
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E & Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**: 247–306
- Leaf A (1959) Maintenance of Concentration Gradients and Regulation of Cell Volume. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **72**: 396–404
- Lee HC (1997) Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev* **77**: 1133–1164
- Levin MK & Carson JH (2004) Fluorescence correlation spectroscopy and quantitative cell biology. *Differentiation* **72**: 1–10
- Li T, ter Veld F, Nürnberger HR & Wehner F (2005) A novel hypertonicity-induced cation channel in primary cultures of human hepatocytes. *FEBS Lett.* **579**: 2087–91
- Lifton RP (1996) Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* **272**: 676–80
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **79**: 1431–568
- Liu Q, Kriksunov I a, Graeff R, Munshi C, Lee HC & Hao Q (2005) Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure* **13**: 1331–9
- Lu C, Pribanic S, Debonneville A, Jiang C & Rotin D (2007) The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool. *Traffic* **8**: 1246–64

- Lucke B (1940) The Living Cell as an Osmometric System and its Permeability to Water: (Experiments with egg cells of marine invertebrates). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **8**: 123–132
- Lukyanenko V, Györke I, Wiesner TF & Györke S (2001) Potentiation of Ca(2+) release by cADP-ribose in the heart is mediated by enhanced SR Ca(2+) uptake into the sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* **89**: 614–22
- Luyet BJ & Thoennes G (1938) The Survival of Plant Cells Immersed in Liquid Air. *Science* **88**: 284–5
- Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T & Aydin S (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.* **88**: 841–86
- Malpique R, Tostões R, Beier AFJ, Serra M, Brito C, Schulz JC, Björquist P, Zimmermann H & Alves PM (2012) Surface-based cryopreservation strategies for human embryonic stem cells: A comparative study. *Biotechnol. Prog.* **32**: 1–9
- Matthews JB, Smith JA, Mun EC & Sicklick JK (1998) Osmotic regulation of intestinal epithelial Na(+)-K(+)-Cl- cotransport: role of Cl- and F-actin. *Am. J. Physiol.* **274**: C697–706
- Mazur P (1963) Kinetics of Water Loss From Cells At Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J. Gen. Physiol.* **47**: 347–69
- Mazur P (1970) Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* **168**: 939–49
- Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* **247**: C125–42
- Mazur P (1988) Stopping biological time. The freezing of living cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **541**: 514–31
- Mazur P (2010) A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology* **60**: 4–10
- McCarty NA & O'Neil RG (1992) Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol. Rev.* **72**: 1037–61
- McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW & Looger LL (2009) A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat. Methods* **6**: 131–133
- Mei Z-Z, Xia R, Beech DJ & Jiang L-H (2006) Intracellular coiled-coil domain engaged in subunit interaction and assembly of melastatin-related transient receptor potential channel 2. *J. Biol. Chem.* **281**: 38748–56
- Minke B (1977) Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys. Struct. Mech.* **3**: 59–64

- Monkos K (2000) Viscosity analysis of the temperature dependence of the solution conformation of ovalbumin. *Biophys. Chem.*: 7–16
- Montell C, Birnbaumer L & Flockerzi V (2002a) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**: 595–8
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N & Zhu MX (2002b) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* **9**: 229–31
- Morris CB (2007) Cryopreservation of animal and human cell lines.
- Mottet G, Tuffereau C & Roux L (1986) Reduced temperature can block different glycoproteins at different steps during transport to the plasma membrane. *J. Gen. Virol.* **67** (Pt 9): 2029–35
- Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W & Klussmann E (2009) Regulation of aquaporin-2 trafficking. *Handb. Exp. Pharmacol.*: 133–57
- Nilius B & Droogmans G (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**: 1415–59
- Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulos V & Droogmans G (1997) Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog. Biophys. ...* **68**: 69–119
- Nilius B, Prenen J, Voets T, Eggermont J & Droogmans G (1998) Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells. *J. Physiol.* **506** (Pt 2): 353–61
- Numata T, Sato K, Christmann J, Marx R, Mori Y, Okada Y & Wehner F (2012) The $[\delta]C$ splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation. *J. Physiol.* **590**: 1121–38
- Numata T, Sato K, Okada Y & Wehner F (2008) Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis. *Apoptosis* **13**: 895–903
- Numata T, Shimizu T & Okada Y (2007a) Direct mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel. *Cell. Physiol. Biochem.* **19**: 1–8
- Numata T, Wehner F & Okada Y (2007b) A novel inhibitor of hypertonicity-induced cation channels in HeLa cells. *J. Physiol. Sci.* **57**: 249–52
- Nussmeier NA (2005) Management of temperature during and after cardiac surgery. *Tex. Heart Inst. J.* **32**: 472–6

- Offterdinger M, Georget V, Girod A & Bastiaens PIH (2004) Imaging phosphorylation dynamics of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **279**: 36972–81
- Okada Y (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* **273**: C755–89
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J & Morishima S (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol.* **532**: 3–16
- Orlowski J & Grinstein S (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* **447**: 549–65
- Owsianik G, D'hoedt D, Voets T & Nilius B (2006) Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **156**: 61–90
- Pedersen SF, Kramhøft B, Jørgensen NK & Hoffmann EK (1996) Shrinkage-induced activation of the Na⁺/H⁺ exchanger in Ehrlich ascites tumor cells: mechanisms involved in the activation and a role for the exchanger in cell volume regulation. *J. Membr. Biol.* **149**: 141–59
- Pedersen SF, Owsianik G & Nilius B (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**: 233–52
- Pederson SF, Varming C, Christensen ST & Hoffmann EK (2002) Mechanisms of activation of NHE by cell shrinkage and by calyculin A in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* **189**: 67–81
- Pegg DE (2002) The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.* **20**: 5–13
- Pegg DE (2007) Principles of cryopreservation. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* pp 39–57.
- Pegg DE (2010) The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology* **60**: S36–44
- Periasamy N, Kao HP, Fushimi K & Verkman a S (1992) Organic osmolytes increase cytoplasmic viscosity in kidney cells. *Am. J. Physiol.* **263**: C901–7
- Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP & Scharenberg AM (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**: 595–9
- Petrunkina AM, Gröpper B, Töpfer-Petersen E & Günzel-Apel A-R (2005) Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* **63**: 1390–1406

- Plettenberg S, Weiss EC, Lemor R & Wehner F (2008) Subunits alpha, beta and gamma of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) are functionally related to the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in rat hepatocytes. *Pflugers Arch.* **455**: 1089–95
- Polge C, Smith AU & Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **164**: 666
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB & Agre P (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**: 385–7
- Rossier BC & Stutts MJ (2009) Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu. Rev. Physiol.* **71**: 361–79
- Shimizu T, Wehner F & Okada Y (2006) Inhibition of hypertonicity-induced cation channels sensitizes HeLa cells to shrinkage-induced apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* **18**: 295–302
- Skou JC (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **23**: 394–401
- Snyder PM (2002) The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr. Rev.* **23**: 258–75
- Snyder PM (2005) Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology* **146**: 5079–85
- Solenov E, Watanabe H, Manley GT & Verkman a S (2004) Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**: C426–32
- Spindler R, Rosenhahn B, Hofmann N & Glasmacher B (2012) Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology* **64**: 250–60
- Staruschenko A, Adams E, Booth RE & Stockand JD (2005) Epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry. *Biophys. J.* **88**: 3966–75
- Sumida S (2006) Transfusion and transplantation of cryopreserved cells and tissues. *Cell Tissue Bank.* **7**: 265–305
- Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M & Mori Y (2011) Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* **50**: 279–287
- Tartakoff a M (1986) Temperature and energy dependence of secretory protein transport in the exocrine pancreas. *EMBO J.* **5**: 1477–82
- Thurston JT, Burlington RF & Meininger GA (1978) Effect of Low Temperatures on Rat Myocardial and NaK-ATPase. *Cryobiology* **316**: 312–316

- Tosteson DC & Hoffman JF (1960) Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.* **44**: 169–94
- Umenishi F & Schrier RW (2003) Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-responsive element in the AQP1 gene. *J. Biol. Chem.* **278**: 15765–70
- Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD & Rossier BC (1997) An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* **389**: 607–10
- Verkman AS (1992) Water channels in cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 97–108
- Verkman AS (2011) Aquaporins at a glance. *J. Cell Sci.* **124**: 2107–12
- Verkman AS, van Hoek AN, Ma T, Frigeri A, Skach WR, Mitra A, Tamarappoo BK & Farinas J (1996) Water transport across mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.* **270**: C12–30
- Walther KA, Papke B, Sinn MB, Michel K & Kinkhabwala A (2011) Precise measurement of protein interacting fractions with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Mol. Biosyst.* **7**: 322–36
- Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C & Lückhoff A (2002) Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **277**: 23150–6
- Wehner F, Bondarava M, ter Veld F, Endl E, Nürnberger HR & Li T (2006) Hypertonicity-induced cation channels. *Acta Physiol. (Oxf)*. **187**: 21–5
- Wehner F, Lawonn P & Tinel H (2002) Ionic mechanisms of regulatory volume increase (RVI) in the human hepatoma cell-line HepG2. *Pflugers Arch.* **443**: 779–90
- Wehner F, Numata T, Subramanyan M & Okada Y (2007) Signalling Events Employed in the Hypertonic Activation of Cation Channels in HeLa Cells. *Cell. Physiol. Biochem.*: 75–82
- Wehner F & Olsen H (2004) Hypertonicity-induced cation channels in rat hepatocytes and their intracellular regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **559**: 253–61
- Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E & Kinne RKH (2003a) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **148**: 1–80
- Wehner F, Shimizu T, Sabirov R & Okada Y (2003b) Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Lett.* **551**: 20–24

- Wehner F & Tinel H (2000) Osmolyte and Na⁺ transport balances of rat hepatocytes as a function of hypertonic stress. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **441**: 12–24
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G & Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 9652–6
- Willis JS, Ellory JC & Becker JH (1978) Na-K pump and Na-K-ATPase: disparity of their temperature sensitivity. *Am. J. Physiol.* **235**: C159–67
- Woelders H & Chaveiro a (2004) Theoretical prediction of “optimal” freezing programmes. *Cryobiology* **49**: 258–71
- Wouters FS & Bastiaens PI (1999) Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr. Biol.* **9**: 1127–30
- Wu MM, Llopis J, Adams S, McCaffery JM, Kulomaa MS, Machen TE, Moore HP & Tsien RY (2000) Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem. Biol.* **7**: 197–209
- Zeuthen T & Macaulay N (2012) Cotransport of water by Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters expressed in *Xenopus* oocytes: NKCC1 versus NKCC2. *J. Physiol.* **5**: 1139–1154
- Zimmerman SB & Harrison B (1987) Macromolecular crowding increases binding of DNA polymerase to DNA: an adaptive effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 1871–5

7 Anhang

7.1 Zusätzliche Abbildungen

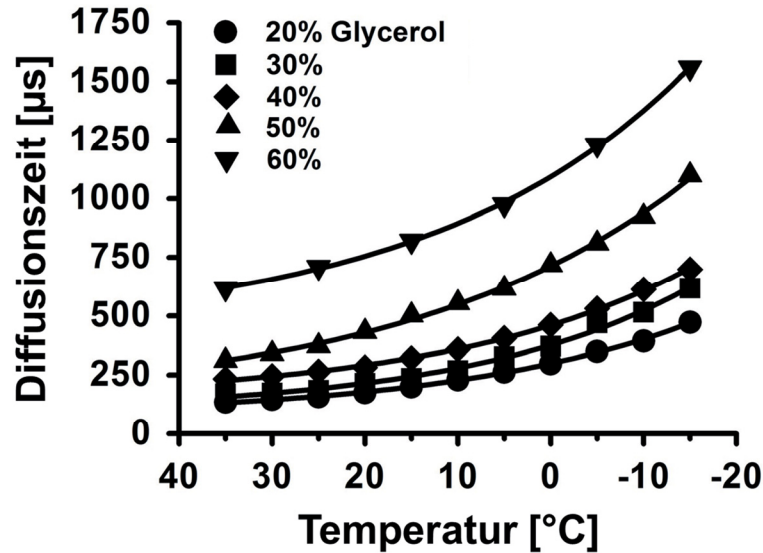


Abbildung 7.1-1: Messung der Diffusionszeiten von GFP bei verschiedenen Temperaturen und bekannten Viskositäten.

Gemessen wurde die Diffusion von eGFP in Wasser-Glycerol-Mischungen verschiedener Konzentrationen. Aus der bekannten Viskosität dieser Lösungen konnte später der hydrodynamische Radius von eGFP ermittelt werden. Gleichzeitig wurde die Eignung von FCS für die Messung von Diffusionsgeschwindigkeiten bei tiefen Temperaturen demonstriert.

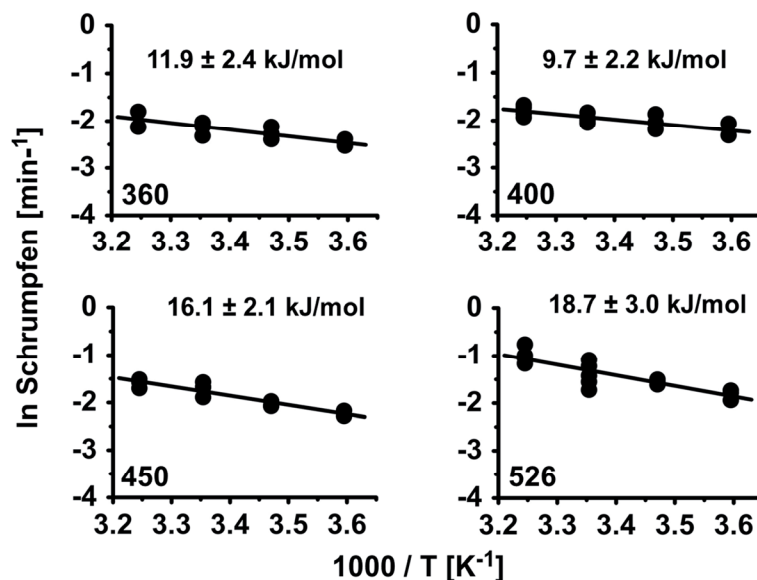


Abbildung 7.1-2: Arrhenius-Plots der Volumenänderung beim Schrumpfen gemessen mit FCS.

Einzelne Messungen wurden als natürlicher Logarithmus gegen 1000 / T in Kelvin aufgetragen. Eingezeichnet sind die linearen Regressionen, so wie die aus der Steigung resultierenden Aktivierungsenergien.

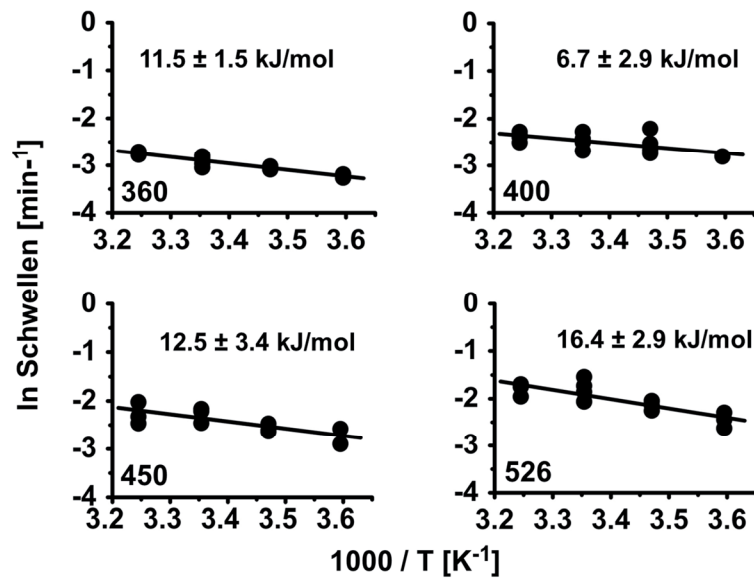


Abbildung 7.1-3: Arrhenius-Plots der Volumenänderung beim Schwellen gemessen mit FCS.

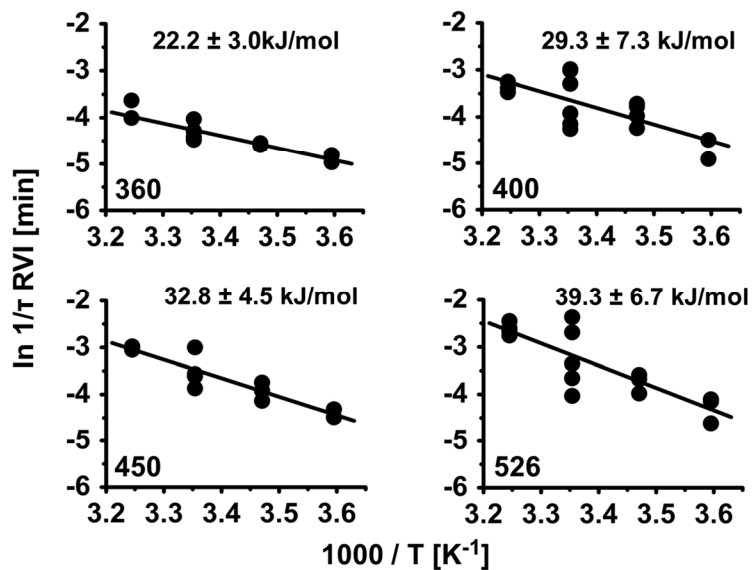


Abbildung 7.1-4: Arrhenius-Plots der Volumenänderung beim RVI gemessen mit FCS.

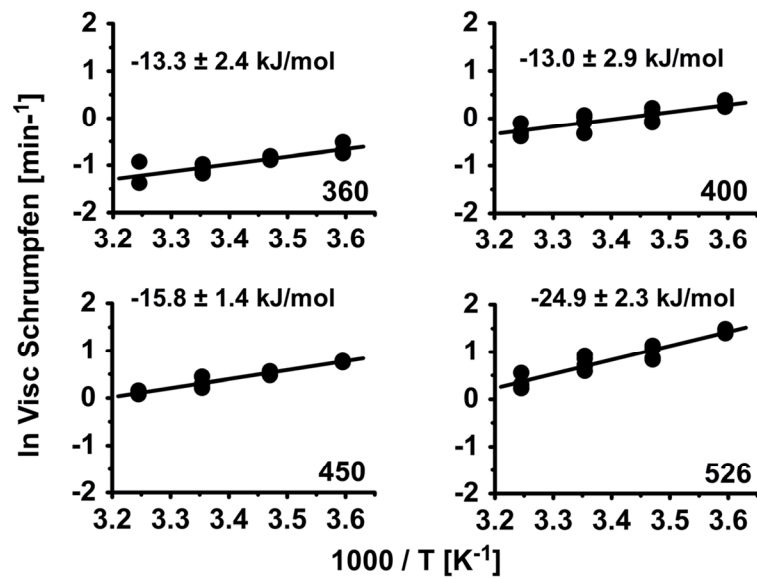


Abbildung 7.1-5: Arrhenius-Plots der Viskositätsänderung beim Schrumpfen gemessen mit FCS.

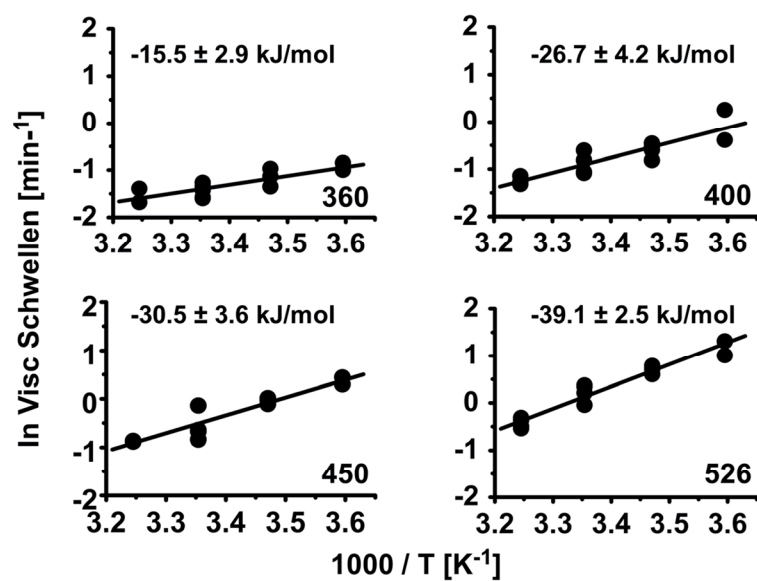


Abbildung 7.1-6: Arrhenius-Plots der Viskositätsänderung beim Schwellen gemessen mit FCS.

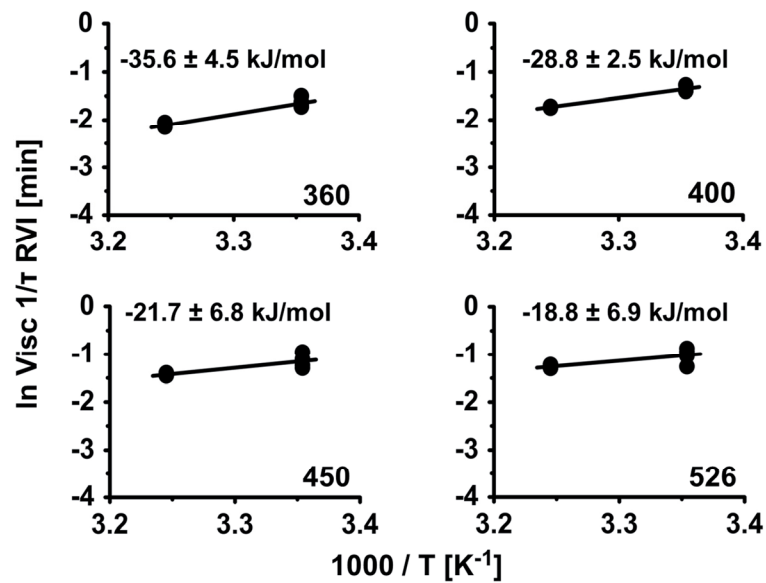


Abbildung 7.1-7: Arrhenius-Plots der Viskositätsänderung beim RVI gemessen mit FCS.

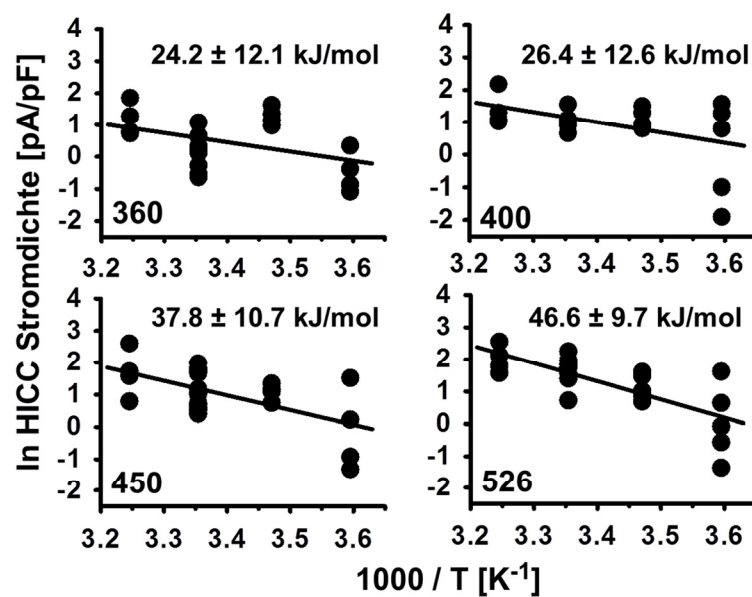


Abbildung 7.1-8: Arrhenius-Plots für die HICC Aktivierungsenergien in HeLa-Zellen.

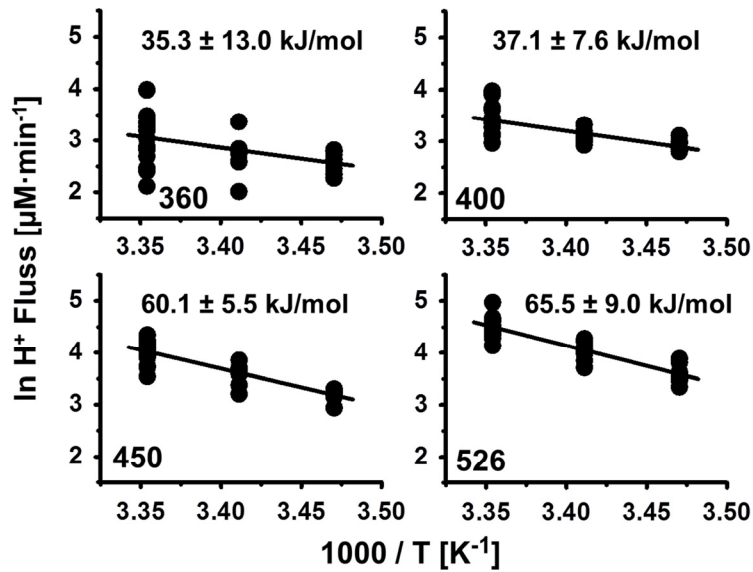


Abbildung 7.1-9: Arrhenius-Plots für NHE1 Aktivierungsenergien in HeLa-Zellen.

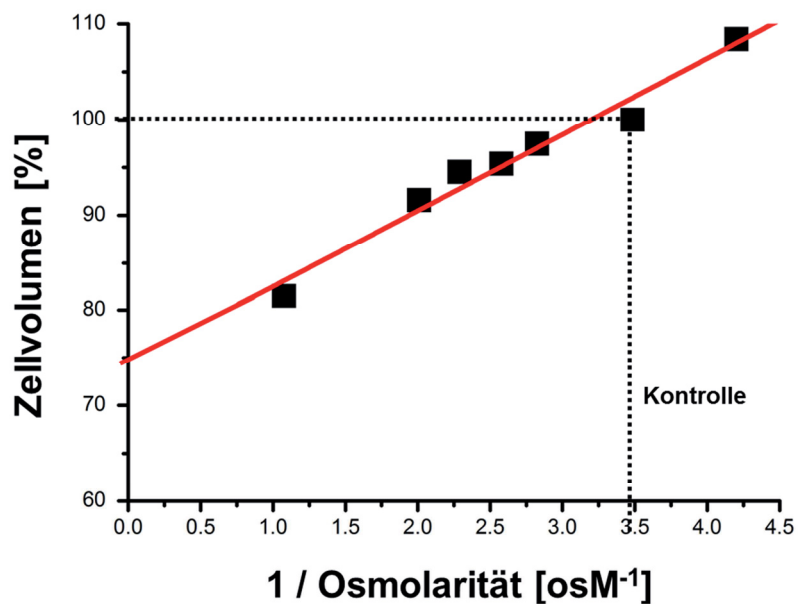


Abbildung 7.1-10: Boyle-van't-Hoff-Plot von HeLa-Zellen bei 35°C.

Darstellung des Zellvolumens in Abhängigkeit der reziproken Osmolarität. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt das Verhältnis von osmotisch aktivem (oberhalb) und inaktivem (unterhalb) Volumen.

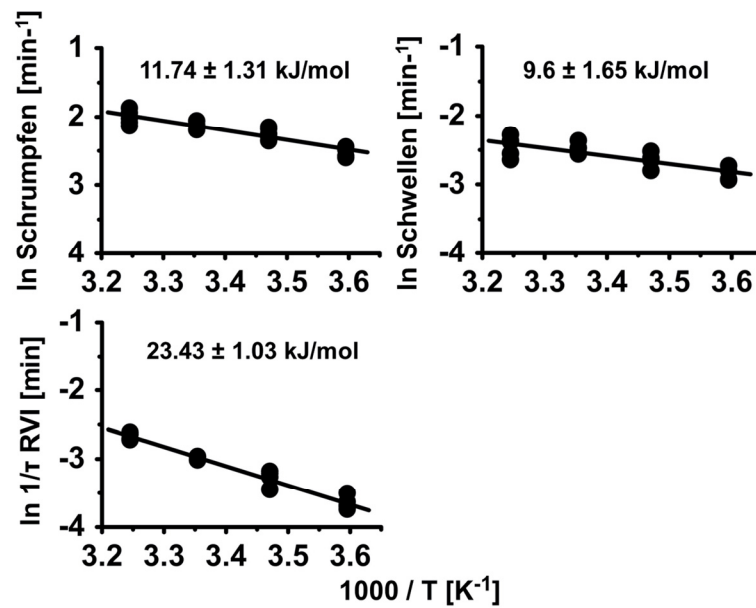


Abbildung 7.1-11: Arrhenius-Plots für die Volumenänderungen in HeLa-Zellen nach Frieren.

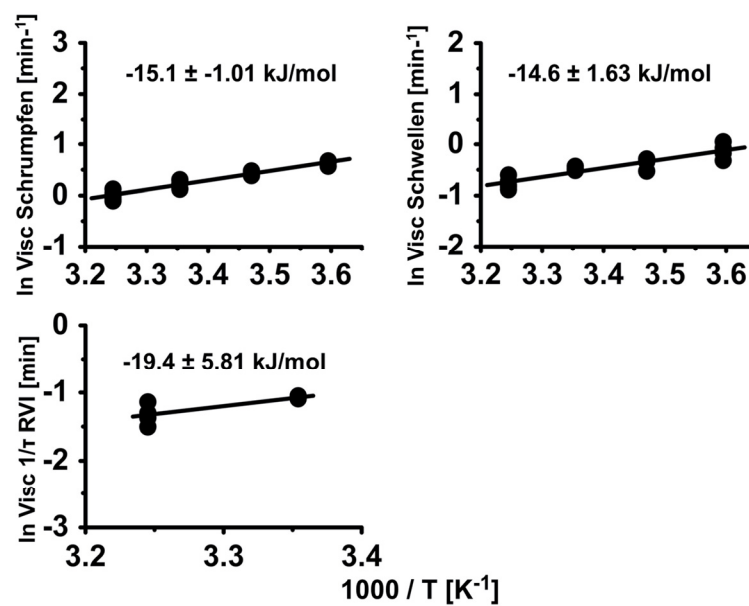


Abbildung 7.1-12: Arrhenius-Plots für die Viskositätsänderungen in HeLa-Zellen nach Frieren.

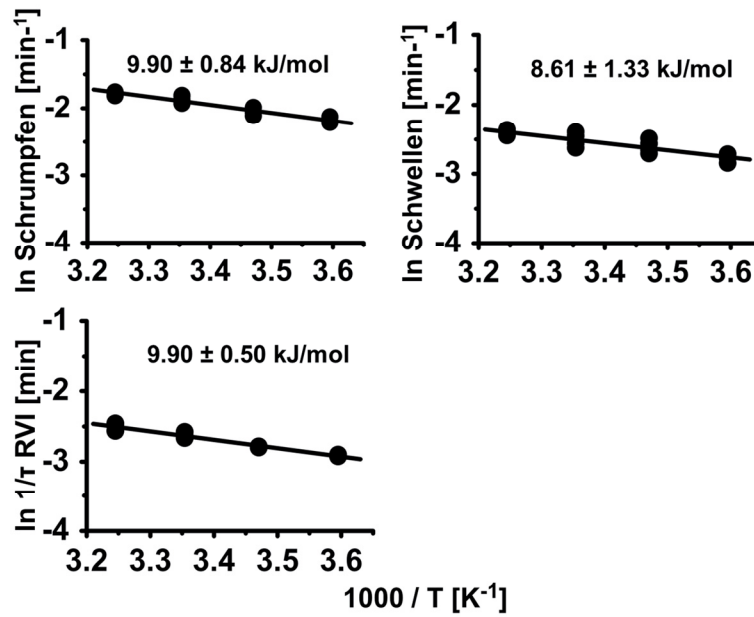


Abbildung 7.1-13: Arrhenius-Plots für die Volumenänderungen in HeLa-Zellen nach Frieren nach Vasopressin-Vorinkubation.

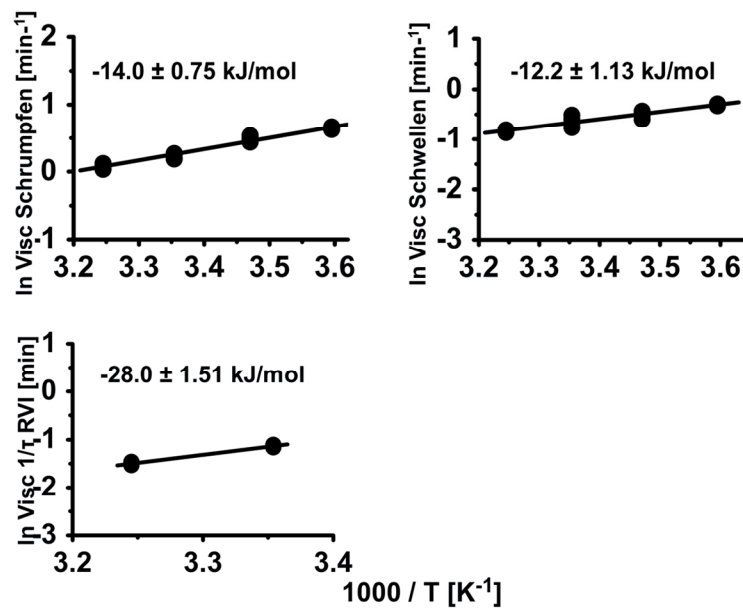


Abbildung 7.1-14: Arrhenius-Plots für die Viskositätsänderungen in HeLa-Zellen nach Frieren nach Vasopressin-Vorinkubation.

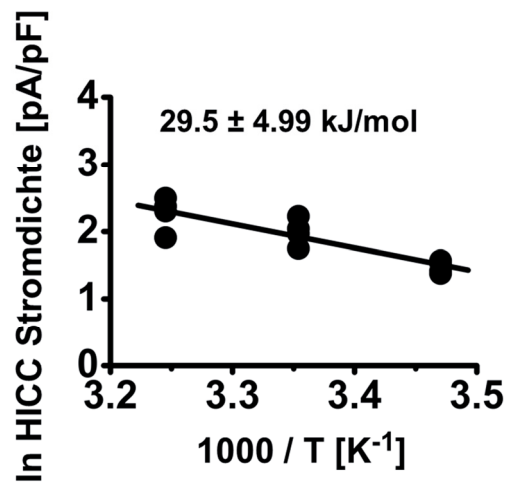


Abbildung 7.1-15: Arrhenius-Plot für HICC Aktivierungsenergie nach dem Frieren.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.4-1: Schematische Darstellung der regulatorischen Volumen-	9
Abbildung 1.4-2: Schematische Darstellung der regulatorischen Volumen-	11
Abbildung 1.5-1: Modell eines ENaC in der Membran. (Entnommen aus	12
Abbildung 1.5-2: Phylogenetischer Baum der TRP-Familie. (Entnommen aus.....	15
Abbildung 1.6-1: Lineare Strom-Spannungs-Kennlinie des HICC in HeLa-	17
Abbildung 1.6-2: Schematische Darstellung von TRPM2. (Entnommen aus	18
Abbildung 1.6-3: Membrantopologie und Bindungspartner von NHE1 (Entnommen aus (Hoffmann <i>et al</i> , 2009)).....	19
Abbildung 3.5-1: Prinzip der FCS Messung.....	37
Abbildung 4.1-1: Boyle-van't-Hoff-Plot von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von	47
Abbildung 4.1-2: Wasserverteilung in HeLa-Zellen gemessen mit Raman-	48
Abbildung 4.1-3: Relativer Wassergehalt in HeLa-Zellen beim Kühlen gemessen	49
Abbildung 4.2-1: Typische Auto-Korrelationskurve für die Messung von eGFP.....	50
Abbildung 4.2-2: FCS-Messung der Volumenänderung einer Zelle bei 35°C.....	51
Abbildung 4.2-3: Verlauf der Viskosität während einer FCS-Messung bei 35°C.....	52
Abbildung 4.2-4: Raten für Schrumpfen und Schwellen der Zellen bei vier	54
Abbildung 4.2-5: Zeitkonstante des RVI bei HeLa-Zellen.....	55
Abbildung 4.2-6: Raten der Viskositätsänderung beim Schrumpfen der HeLa-	56
Abbildung 4.2-7: Viskositätsänderung beim Schwellen der HeLa-Zellen.	57
Abbildung 4.2-8: τ -Werte der Viskositätsänderung während des RVI.	57
Abbildung 4.2-9: Ermittlung der E_{as} für 450 mosM	58
Abbildung 4.2-10: Zusammenfassung der Aktivierungsenergien der FCS	59
Abbildung 4.2-11: TIRF-Mikroskopie von Aquaporin 1 exprimierenden HepG2-	61
Abbildung 4.2-12: Veränderung der Aquaporin 1 Intensität in der Membran.	62
Abbildung 4.2-13: HeLa-Zellproliferation nach siRNA Behandlung.	64
Abbildung 4.2-14: cADP-Ribose Konzentration von HeLa-Zellen.	65
Abbildung 4.2-15: Immunpräzipitation von TRPM2 und CD38.....	66
Abbildung 4.2-16: FLIM von HEK293 Zellen transfiziert mit TRPM2-eGFP und	67
Abbildung 4.2-17: <i>Donor</i> -Kontrolle für TRPM2-eGFP	68
Abbildung 4.2-18: <i>Whole-Cell</i> Aufnahme in HeLa-Zellen.	69
Abbildung 4.2-19: HICC-Ströme in Abhängigkeit von Temperatur und	70
Abbildung 4.2-20: HICC Aktivierungsenergien.....	71

Abbildung 4.2-21: pH-Verlauf bei hypertonem Stress.....	72
Abbildung 4.2-22: Protonenausstrom aus HeLa-Zellen bei hypertonem Stress.....	73
Abbildung 4.2-23: Aktivierungsenergien von NHE1 in HeLa-Zellen.....	74
Abbildung 4.2-24: Vergleich der Aktivierungsenergien von HICC und NHE1.....	74
Abbildung 4.3-1: Überleben von HeLa-Zellen nach dem Frieren als adhärentem.....	76
Abbildung 4.3-2: Zellproliferation von HeLa-Zellen.....	78
Abbildung 4.3-3: Geschwindigkeit der Zellproliferation nach Frieren.....	79
Abbildung 4.3-4: Vergleich von Volumen- und Viskositätsänderung vor und.....	80
Abbildung 4.3-5: Raten der Volumenänderung von HeLa-Zellen bei 450 mosM.....	81
Abbildung 4.3-6: Raten der Viskositätsänderung von HeLa-Zellen bei.....	82
Abbildung 4.3-7: Aktivierungsenergien der Volumenregulation vor und nach.....	83
Abbildung 4.3-8: HICC-Stromdichte nach Frieren von HeLa-Zellen.....	84
Abbildung 4.3-9: HICC-Stromdichten nach dem Frieren von HeLa-Zellen in.....	85
Abbildung 4.3-10: HICC Aktivierungsenergien bei 450 mosM vor und nach dem....	85
Abbildung 4.3-11: Vergleich von HICC-Strömen vor und nach Frieren mit und.....	86
Abbildung 4.3-12: Vergleich von Auto-Korrelationskurven für eGFP in HeLa-.....	87
Abbildung 4.3-13: Viskosität von HeLa-Zellen beim Frieren und Auftauen.....	88
Abbildung 4.3-14: Intrazelluläre Viskositätssteigerung führt zu einer Aktivierung.....	89
Abbildung 4.3-15: Aktivierungsenergie des HICCs nach Aktivierung durch eine.....	90
Abbildung 4.4-1: Übersicht des Kryo- <i>Superresolution</i> -Mikroskopie Aufbaus.....	91
Abbildung 4.4-2: Probenhalterung mit Kühlung und Anschlüssen zum Medium-.....	92
Abbildung 4.4-3: Temperatur und DMSO-Protokoll zum Kühlen und Wärmen.....	93
Abbildung 4.4-4: <i>Superresolution</i> -Mikroskopie von EGFR-mEOS2 in HeLa-.....	94
Abbildung 4.4-5: Aufbau zum Schock-Gefrieren mit Probenhalter und Zeiss.....	96
Abbildung 4.4-6: Schemazeichnung des Probenkühlers mit Proben und Mikros-.....	96
Abbildung 4.4-7: Mikroskopie bei -190°C, Darstellung der Interaktion von.....	97
Abbildung 7.1-1: Messung der Diffusionszeiten von GFP bei verschiedenen.....	134
Abbildung 7.1-2: Arrhenius-Plots der Volumenänderung beim Schrumpfen.....	134
Abbildung 7.1-3: Arrhenius-Plots der Volumenänderung beim Schwellen.....	135
Abbildung 7.1-4: Arrhenius-Plots der Volumenänderung beim RVI gemessen.....	135
Abbildung 7.1-5: Arrhenius-Plots der Viskositätsänderung beim Schrumpfen.....	136
Abbildung 7.1-6: Arrhenius-Plots der Viskositätsänderung beim Schwellen.....	136
Abbildung 7.1-7: Arrhenius-Plots der Viskositätsänderung beim RVI gemessen....	137
Abbildung 7.1-8: Arrhenius-Plots für die HICC Aktivierungsenergien in HeLa-.....	137

Abbildung 7.1-9: Arrhenius-Plots für NHE1 Aktivierungsenergien in HeLa-138
Abbildung 7.1-10: Boyle-van't-Hoff-Plot von HeLa-Zellen bei 35°C.138
Abbildung 7.1-11: Arrhenius-Plots für die Volumenänderungen in HeLa-Zellen139
Abbildung 7.1-12: Arrhenius-Plots für die Viskositätsänderungen in HeLa-139
Abbildung 7.1-13: Arrhenius-Plots für die Volumenänderungen in HeLa-Zellen140
Abbildung 7.1-14: Arrhenius-Plots für die Viskositätsänderungen in HeLa-140
Abbildung 7.1-15: Arrhenius-Plot für HICC Aktivierungsenergie nach dem141

7.3 Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Frank Wehner für die Möglichkeit danken, dieses interessante Projekt in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ebenso danke ich für die häufigen kritischen Diskussionen, die Einführung in die *Patch-Clamp* Technik und die generelle Unterstützung während dieser Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen.

Prof. Dr. Philippe Bastiaens danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeiten in seiner Abteilung durchzuführen und die Übernahme des Zweitgutachtens. Darüber hinaus danke ich Ihm für die Möglichkeit an den spannenden Themen der Kryo-Arretierung für die Mikroskopie mitarbeiten zu können.

Den Mitgliedern des Kryo-Projektes, insbesondere Herrn Jan Hübinger und Frau Lale Azer danke ich für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, viele Diskussionen und die Unterstützung bei gemeinsamen Experimenten.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Biomedizinische Optik am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert danke ich für die Möglichkeit, aufgrund immer neuer Ideen, Raman-Messungen an Ihrem Aufbau durchführen zu können. Ebenso danke ich für die freundliche Zusammenarbeit während der ersten Testmessungen mit dem Schock-Gefrier-Gerät. Mein besonderer Dank gilt Herrn Daniel Dörr, der mich in die Kryo- und Raman-Mikroskopie eingeführt hat. Während einiger Messwochen in St. Ingbert hat er auch außerhalb der Arbeit für Kurzweile gesorgt.

Bei Dr. Martin Bierbaum möchte ich mich für die Einführung in die FCS-Messungen bedanken und bei Dr. Sven Müller für die unzähligen Hilfestellungen bei der Bezwingung des Eigenlebens des Zeiss LSM 510.

Dr. Martin Masip danke ich für die angenehme Zusammenarbeit bei den Kryo-Mikroskopie-Projekten.

Ein großer Dank gilt Frau Gabriela Beetz für die vielseitige technische Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Frau Jutta Luig und Frau Lisaweta Roßmannek danke ich für die Unterstützung bei der Klonierung verschiedener Konstrukte und die Antwort auf viele Fragen in der Molekular-Biologie.

Danke an Frau Annette Langerak, Frau Petra Glitz und Herrn Michael Reichl für die Arbeiten in der Zellkultur.

Bei den Mitgliedern der Abteilung II möchte ich mich für Hilfe, Diskussionen und eine angenehme Atmosphäre bedanken. Darüber hinaus haben unter anderem Dr. Jan Hübinger, Björn Papke, Sven Fengler, Johann Jarzombek, Lale Azer, Dr. Aneta Koseska, Dr. Martin Masip, Dr. Klaus Christian Schuermann, Dr. Marton Gelleri und Dr. Ola Sabet für eine sehr freundschaftliche Atmosphäre, auch über die Arbeit hinaus, gesorgt.

Danke an Nils, Jan, Matthias, Martin und Peter für die Freundschaft sowie Unterstützung in allen Lebensbereichen und die nötige Abwechslung. Vielen Dank an Heiner, Hannes und Thomas für Eure Freundschaft während des Studiums und darüber hinaus.

Mein tiefster Dank gilt meine Eltern und meinem Bruder, sowie meiner Familie, im engeren wie weiteren Sinne, für bedingungslose Unterstützung und Ermutigung während meiner Arbeit.

Vielen Dank Daniela. Ohne Dich wäre das Alles nicht möglich gewesen.