



# Volumenregulatorische Transportwege von anorganischen und organischen Osmolyten in Säugetierzellen

---

*Dissertation zum Erlangen des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg*

vorgelegt von

**Joseph Andronic**

aus  
Heilbronn am Neckar

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Privatdozent Dr. V. Soukhoroukov

2. Gutachter: Professor Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| I.    | Abbildungsverzeichnis  | I   |
| II.   | Tabellenverzeichnis  | III |
| III.  | Abkürzungsverzeichnis  | IV  |
|       | Zusammenfassung  | i   |
|       | Summary  | iv  |
| 1.    | Einleitung   | 1   |
| 1.1   | Volumenregulation tierischer Zellen  | 1   |
| 1.2   | Anorganische Osmolyte in der hypotonen Volumenregulation                     | 3   |
| 1.3   | Beteiligung von organischen Osmolyten bei der hypotonen Volumenregulation    | 8   |
| 1.3   | Biotechnologische Bedeutung der Transportwege für kleine organische Osmolyte | 12  |
| 1.4   | Zielsetzung  | 12  |
| 2.    | Material   | 14  |
| 2.1   | Zelllinien   | 14  |
| 2.2   | Bakterienstamm   | 15  |
| 2.3   | Plasmide und Vektoren  | 15  |
| 2.4   | Plasmidkarten  | 16  |
| 2.5   | Oligonukleotide  | 17  |
| 2.6   | Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits                                     | 18  |
| 2.7   | Größenstandard   | 19  |
| 2.8   | Medien und Lösungen  | 20  |
| 2.9   | Verbrauchsmaterialien und Geräte   | 24  |
| 2.10  | Verwendete Computerprogramme   | 26  |
| 3.    | Methoden   | 27  |
| 3.1   | Zellkulturen   | 27  |
| 3.1.1 | Kultivierung der Säugetierzelllinien   | 27  |
| 3.1.2 | Primäre murine und humane Kulturen   | 28  |
| 3.1.3 | Transiente Transfektion tierischer Zelllinien                                | 28  |
| 3.2   | Zellvolumetrische Analysen   | 29  |
| 3.3   | Mikrobiologische Methoden  | 38  |
| 3.3.1 | Anzucht und Stammhaltung   | 38  |
| 3.3.2 | Bestimmung des Bakterienwachstums  | 38  |
| 3.3.3 | Herstellung kompetenter Zellen   | 38  |
| 3.3.4 | Transformation   | 39  |
| 3.4   | Molekularbiologische Methoden  | 39  |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 39        |
| 3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel  | 41        |
| 3.4.3 DNA-Sequenzierung   | 41        |
| 3.4.4 Semiquantitative RT-PCR   | 42        |
| 3.4.5 Rekombinante Herstellung von SLC5A3-pEGFPN1   | 45        |
| 3.5 Immunfluoreszenzfärbung   | 47        |
| 3.6 Mikroskopische Methoden   | 48        |
| 3.6.1 Konfokale Lasermikroskopie  | 48        |
| 3.6.2 dSTORM  | 50        |
| <b>4. Ergebnisse</b>  | <b>52</b> |
| 4.1 Volumenregulatorische Beteiligung der Zwei-Poren Domänen K <sup>+</sup> -Kanäle (K <sub>2P</sub> ) in T-Lymphozyten   | 52        |
| 4.2 Untersuchung volumensensitiver Transportwege für organische Osmolyte  | 68        |
| 4.2.1 Bestimmung der Größenselektivität schwellungsaktivierter Transportwege für organische Osmolyte                      | 69        |
| 4.2.2 Schwellungsaktivierte Transportwege für Taurin und myo-Inositol   | 73        |
| 4.3 Molekularbiologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von SLC5A3 und SLC6A6                                 | 83        |
| 4.3.1 Expressionsanalyse potentieller Transporter für organische Osmolyte   | 84        |
| 4.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von SLC5A3 unter isotonen und hypotonen Bedingungen              | 86        |
| <b>5. Diskussion</b>  | <b>92</b> |
| 5.1 Beteiligung der Zwei-Poren Domänen K <sup>+</sup> -Kanäle (K <sub>2P</sub> ) am RVD muriner und humaner T-Lymphozyten | 92        |
| 5.2 Transportwege organischer Osmolyte in Säugetierzellen   | 97        |
| 5.2.1 Größenselektivität schwellungsaktivierter Transportwege für organische Osmolyte                                     | 97        |
| 5.2.2 Molekulare Identität von schwellungsaktivierten Transportwegen organischer Osmolyte                                 | 100       |
| <b>Literatur</b>  |           |
| <b>Appendix</b>   |           |
| Vollständige Daten zu Abbildung 17  | a         |
| Volumetrische Messungen zu Abbildung 24   | b         |
| Antikörperspezifität des anti-SLC5A3-Antikörpers SAB1402920 (Sigma)   | d         |
| Eigene Publikationen  | f         |



## I. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1 Schematische Darstellung der vier Hauptklassen von Kaliumkanälen .....   | 4  |
| Abbildung 2 Beispiele wichtiger Vertreter der <i>small organic osmolytes</i> .....   | 8  |
| Abbildung 3 Membranzstrukturierungsmodell unter hypotonen Bedingungen nach Kinne<br><i>et al.</i> 1993 [46] .....  | 10 |
| Abbildung 4 Modell zur hypotonen Aktivierung von Transportwegen organischer<br>Osmolyte nach Kiesel.....   | 11 |
| Abbildung 5 Photographie einer Volumetriekammer .....  | 29 |
| Abbildung 6 Schematische Darstellung der experimentellen Einrichtung zur Volumetrie .....  | 30 |
| Abbildung 7 Chemische Strukturen der eingesetzten Kaliumkanalblocker.....  | 32 |
| Abbildung 8 Für die PCR verwendete Temperaturprotokolle .....  | 40 |
| Abbildung 9 Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese .....   | 44 |
| Abbildung 10 Fluoreszenzspektren von EGFP und AlexaFluor 568 .....   | 49 |
| Abbildung 11 Isotones und anisotones Volumenverhalten muriner CD4 <sup>+</sup> -Lymphozyten aus<br>wildtypischen und K <sub>2P</sub> - <i>Knockout</i> Mäusen.....                   | 53 |
| Abbildung 12 Boyle van't Hoff Plot muriner wildtypischer CD4 <sup>+</sup> -Lymphozyten .....   | 55 |
| Abbildung 13 Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die hypotone Volumenregulation von<br>murinen CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten aus wildtypischen und TASK2 <sup>-/-</sup> Mäusen ..... | 57 |
| Abbildung 14 Isotone Größenverteilung naïver und stimulierter humaner CD4 <sup>+</sup> -<br>Lymphozyten.....   | 60 |
| Abbildung 15 Isotones und anisotones Volumenverhalten humaner CD4 <sup>+</sup> -Lymphozyten .....  | 61 |
| Abbildung 16 Einfluss unterschiedlicher Anandamid-Konzentrationen auf die hypotone<br>Volumenregulation humaner CD4 <sup>+</sup> -Lymphozyten .....                                  | 62 |
| Abbildung 17 RVD-Inhibitorischer Effekt unterschiedlicher Kaliumkanalblocker bei<br>humanen CD4 <sup>+</sup> -Lymphozyten.....   | 63 |
| Abbildung 18 Zeitliche Volumenänderung von Jurkat-Lymphozyten in PEG-haltigen<br>Medien unterschiedlicher Osmolalität.....   | 70 |
| Abbildung 19 Abhängigkeit der RVD-Inhibierung vom hydrodynamischen Radius des<br>PEG-Polymers unter stark hypotonen Bedingungen (100 mOsm).....                                      | 72 |
| Abbildung 20 Zeitliche Volumenänderung von HEK293 und Jurkat-Zellen in Taurin oder<br>myo-Inositol-haltigen Medien variabler Osmolalität. ....                                       | 75 |
| Abbildung 21 Zeitlicher Vergleich der hypotonen Volumenregulation von HEK293 und<br>Jurkat-Zellen.....   | 76 |
| Abbildung 22 Osmotische Aktivierungsschwelle des Taurin- bzw. myo-Inositol-Transports<br>in HEK293- und Jurkat-Zellen .....  | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 23 Analyse der Aktivitätsdauer von schwellungsaktivierten Transportwege für Taurin und myo-Inositol in HEK293-Zellen.....                            | 80  |
| Abbildung 24 Bestimmung der Aktivitätsdauer hypoton aktivierter <i>small organic osmolyte</i> Transportwege für Taurin und myo-Inositol in HEK293-Zellen ..... | 81  |
| Abbildung 25 Einfluss von hypotonem Stress auf das mRNA-Niveau der Transporter SLC5A3 und SLC6A6.....  | 85  |
| Abbildung 26 Zelluläre Verteilung des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP unter isotonen und hypotonen Bedingungen.....  | 87  |
| Abbildung 27 dSTORM-Analyse des membranassoziierten SLC5A3-Transporters unter isotonen und hypotonen Bedingungen .....   | 90  |
| Abbildung 28 Schema der hypotonen Kaliumeffluxwege von murinen und humanen CD4 <sup>+</sup> -Lymphozyten.....  | 93  |
| Abbildung 29 Modell zur Beteiligung von SLC5A3 und SLC6A6 während des RVD-Prozesses .....  | 108 |
| Abbildung 30 Vollständige volumetrische myo-Inositol-Messungen zu Abbildung 24.....  | b   |
| Abbildung 31 Vollständige volumetrische Taurin-Messungen zu Abbildung 24.....  | c   |
| Abbildung 32 Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Spezifität des primären monoklonalen Antikörpers anti-SLC5A3 .....                       | e   |

## II. Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1 Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien  | 14 |
| Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Basisvektoren  | 15 |
| Tabelle 3 Übersicht der hergestellten Plasmidkonstrukte  | 15 |
| Tabelle 4 Plasmidkarten  | 16 |
| Tabelle 5 Verwendete Oligonukleotide   | 17 |
| Tabelle 6 Verwendete Kaliumkanalblocker  | 18 |
| Tabelle 7 Verwendete Enzyme und Reagenzien   | 18 |
| Tabelle 8 Verwendete Kits  | 19 |
| Tabelle 9 Verwendete Antikörper  | 19 |
| Tabelle 10 Verwendete Transfektionsreagenzien  | 19 |
| Tabelle 11 Hersteller der verwendeten Zellkulturlösungen   | 20 |
| Tabelle 12 Zellkulturmedien  | 21 |
| Tabelle 13 Bakterienkulturmedien   | 22 |
| Tabelle 14 Volumetriemedien  | 22 |
| Tabelle 15 pH-Puffer der Volumetriemedien  | 23 |
| Tabelle 16 Verwendete Lösungen für molekularbiologische Methoden   | 24 |
| Tabelle 17 Verwendete Computersoftware   | 26 |
| Tabelle 18 Kaliumkanalblocker und deren eingesetzter Konzentration   | 33 |
| Tabelle 19 Hydrodynamische Radien von Polyethylenglykolen unterschiedlicher Polymerlängen  | 37 |
| Tabelle 20 Einfluss des $K_{2P}$ - <i>Knockout</i> Status auf die osmoregulatorischen Eigenschaften von murinen $CD4^+$ -Lymphozyten                                 | 56 |
| Tabelle 21 Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die osmoregulatorischen Eigenschaften von $CD4^+$ -Lymphozyten aus wildtypischen und $TASK2^{-/-}$ Mäusen            | 58 |
| Tabelle 22 $P_{max}$ und $C50$ -Werte der logistischen Kurvenanpassung der Permeabilitätskoeffizientenwerte von Jurkat und HEK293-Zellen für Taurin und myo-Inositol | 77 |
| Tabelle 23 Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die osmoregulatorischen Eigenschaften von humanen naïven und stimulierten $CD4^+$ -Lymphozyten.                      | a  |

### III. Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| AmpR               | <u>A</u> mpicillin <u>r</u> esistenz  |
| AR                 | <u>A</u> ldose <u>r</u> eduktase  |
| ATP                | <u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat  |
| BGT                | <u>B</u> etain- <u>G</u> ABA- <u>T</u> ransporter   |
| Bla                | $\beta$ - <u>L</u> aktamase   |
| BSA                | <u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin  |
| cDNA               | <u>C</u> omplementary <u>D</u> NA   |
| CDO                | <u>C</u> ysteindioxygenase  |
| CGM                | <u>C</u> omplete <u>G</u> rowth <u>M</u> edium  |
| CSD                | <u>C</u> ystein- <u>S</u> ulfinat- <u>D</u> ecarboxylase                                    |
| CV                 | Variationskoeffizient   |
| ddH <sub>2</sub> O | Deionisiertes und sterilfiltriertes Wasser  |
| ddNTPs             | <u>D</u> i- <u>D</u> esoxyribonukleosid- <u>T</u> riphosphate                               |
| DMEM               | <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium                            |
| DMSO               | <u>D</u> imethylsulfoxid  |
| DNA                | <u>D</u> eoxyribonucleic acid   |
| dNTPs              | <u>D</u> esoxyribonukleosid- <u>t</u> riphosphate   |
| dSTORM             | <u>d</u> irect <u>s</u> tochastic <u>o</u> ptical <u>r</u> econstruction <u>m</u> icroscopy |
| <i>E. coli</i>     | <i>Escherichia coli</i>   |
| EAE                | <u>E</u> xperimental <u>a</u> utoimmune <u>e</u> ncephalomyelitis                           |
| EDTA               | <u>E</u> thylendiamintetraacetat  |
| EGFP               | <u>E</u> nhanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein                          |
| FCS                | <u>F</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum  |
| FITC               | <u>F</u> luoresceinisothiocyant   |
| FSH                | <u>F</u> ollikelstimulierendes <u>H</u> ormon   |
| FWHM               | <u>F</u> ull <u>w</u> idth at <u>h</u> alf <u>m</u> aximum                                  |
| GABA               | $\gamma$ - <u>a</u> mino <u>b</u> utyric acid   |
| GnHR               | <u>G</u> onadotropin releasing <u>h</u> ormone  |
| HEPES              | 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure  |
| IC <sub>RVD</sub>  | RVD <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oefficient  |
| IMCD               | <u>I</u> nn <u>e</u> r <u>M</u> edullary <u>C</u> ollecting <u>D</u> uct                    |
| K <sub>2P</sub>    | Zwei-Poren Domänen Kaliumkanäle   |
| KanR               | <u>K</u> anamycin <u>r</u> esistenz   |
| LB                 | <u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth  |
| LH                 | <u>L</u> uteinisierende <u>H</u> ormon  |

|        |  |
|--------|--|
| LSM    | <i><u>L</u>aser <u>S</u>canning <u>M</u>icroscope</i>                                      |
| MEA    | <i><math>\beta</math>-<u>M</u>ercapto<u>e</u>thyl<u>a</u>min</i>                           |
| MEM    | <i><u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i>  |
| mRNA   | <i><u>m</u>essenger <u>R</u>NA</i>   |
| MW     | <i><u>M</u>olecular <u>W</u>eight</i>  |
| NEAA   | <i><u>N</u>on <u>E</u>ssential <u>A</u>mino <u>A</u>cids</i>                               |
| NeoR   | <i><u>N</u>eomycin<u>r</u>esistenz</i>   |
| OD     | <i><u>O</u>ptische <u>D</u>ichte</i>   |
| PBS    | <i><u>P</u>hosphate <u>B</u>uffered <u>S</u>aline</i>                                      |
| PCR    | <i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>                                      |
| PDMS   | <i><u>P</u>oly<u>d</u>imethylsiloxan</i>   |
| PEG    | <i><u>P</u>oly<u>e</u>thylenglykol</i>   |
| PEI    | <i><u>P</u>oly<u>e</u>thylenimin</i>   |
| RNA    | <i><u>R</u>ibonucleic <u>a</u>cid</i>  |
| RPMI   | <i><u>R</u>oswell <u>P</u>ark <u>M</u>emorial <u>I</u>nstitute</i>                         |
| RT-PCR | <i><u>R</u>everse-<u>T</u>ranskriptase <u>P</u>CR</i>                                      |
| RVD    | <i><u>R</u>egulatory <u>V</u>olume <u>D</u>ecrease</i>                                     |
| RVI    | <i><u>R</u>egulatory <u>V</u>olume <u>I</u>ncrease</i>                                     |
| SB     | <i><u>S</u>odium <u>B</u>orate</i>   |
| SD     | Standardabweichung   |
| SE     | Standardfehler   |
| ShK    | <i>Strichodactyla helianthus Toxin</i>   |
| SLC    | <i><u>S</u>olute <u>c</u>arrier</i>  |
| SMIT   | <i><u>S</u>odium <u>m</u>yo-<u>I</u>nositol <u>t</u>ransporter</i>                         |
| SOO    | <i><u>s</u>mall <u>o</u>rganic <u>o</u>smolyte</i>   |
| TASK   | <i><u>T</u>WIK-related <u>a</u>cid-sensitive <u>K</u><sup>+</sup> channel</i>              |
| TauT   | <i><u>T</u>aurin <u>T</u>ransporter</i>  |
| TonEBP | <i><u>T</u>onicity-responsive <u>e</u>nhancer <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i>            |
| TRESK  | <i><u>T</u>WIK-related <u>s</u>pinal cord <u>K</u><sup>+</sup> channel</i>                 |
| TSS    | <i><u>T</u>ransport and <u>s</u>torage <u>s</u>olution</i>                                 |
| ÜNK    | <i><u>Ü</u>bernacht<u>k</u>ultur</i>   |
| Upm    | <i><u>U</u>mdrehungen pro <u>M</u>inute</i>  |
| UV     | <i><u>U</u>ltraviolett</i>   |
| VACHT  | <i><u>V</u>esicular <u>a</u>cetylcholine <u>t</u>ransporter</i>                            |
| VMAT   | <i><u>V</u>esicular <u>m</u>onoamine <u>t</u>ransporter</i>                                |
| VSOAC  | <i><u>V</u>olume <u>s</u>ensitive <u>o</u>rganic <u>a</u>nion <u>c</u>hannel</i>           |
| VSOR   | <i><u>V</u>olume <u>s</u>ensitive <u>o</u>utwardly <u>r</u>ectifying <u>C</u>l channel</i> |

## Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung des Zellvolumens unter variablen osmotischen Bedingungen stellt für nahezu alle tierischen Zellen eine essenzielle Aufgabe dar. Um regulatorische Volumenadjustierungen vorzunehmen besitzen sie daher effektive Mechanismen, mit deren Hilfe der zelluläre Gehalt an organischen und anorganischen Osmolyten erhöht (= regulatorische Volumenzunahme; RVI) oder gesenkt (= regulatorische Volumenabnahme; RVD) werden kann. Trotz langjähriger Forschung auf diesem Gebiet konnten die hieran beteiligten Transportwege für Osmolyte bisher nur unvollständig aufgeklärt werden.

Insbesondere bei T-Lymphozyten sind wichtige Zellfunktionen wie die Proliferation, Migration und die T-Zell-Aktivierung eng mit volumenregulatorischen Mechanismen verbunden. Bei all diesen Prozessen sind u. a. unterschiedliche Kaliumkanäle beteiligt, die insbesondere für die pharmakologische Manipulation von Immunsystemprozessen von wissenschaftlichem Interesse sind. Bisherige Modelle der hypotonen Volumenregulation von T-Lymphozyten berücksichtigen lediglich den spannungsabhängigen  $K_v1.3$  sowie den  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $IK_{Ca1}$ -Kanal, die zur Klasse der 6TM/P- $K^+$ -Kanäle gehören.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine potentielle Rolle von kürzlich entdeckten Zwei-Poren Domänen Kaliumkanälen ( $K_{2P}$ ) am RVD von murinen und humanen primären  $CD4^+$ -T-Lymphozyten untersucht. In einem kombinierten genetischen und pharmakologischen Ansatz mittels *knockout*-Tiermodellen und dem Einsatz kanalspezifischer Inhibitoren konnte mithilfe zellvolumetrischer Analysen gezeigt werden, dass die  $K_{2P}$ -Vertreter TASK1, TASK2, TASK3 und TRESK maßgeblich am schwellungsaktivierten Efflux von  $K^+$  beteiligt sind. Beurteilt an den Ergebnissen dieser Untersuchung sind der spannungsabhängige TASK2- und der  $Ca^{2+}$ -aktivierte TRESK-Kanal für die hypotone Volumenregulation in T-Zellen deutlich bedeutender als TASK1 und TASK3. Der Beitrag der Kanäle TASK2 und TRESK am RVD-Prozess war über dies vergleichbar mit dem des bisher bekannten  $K_v1.3$ -Kanals. In dieser Arbeit wurde damit erstmals eine Beteiligung der  $K_{2P}$ -Kanäle am RVD muriner und humaner  $CD4^+$ -Lymphozyten identifiziert. Aufgrund der engen Verbindung zwischen T-Zell-Funktion und der Volumenregulation können Zwei-Poren Domänen  $K^+$ -Kanäle damit in den engeren Kreis potentieller immunmodulierende Angriffspunkte aufgefasst werden.

Im zweiten und umfangreicheren Teil dieser Arbeit wurden darüber hinaus die schwellungsaktivierten Transportwege für organische Osmolyte (*small organic osmolytes*; SOOs) untersucht. SOOs stellen chemisch inerte Verbindungen dar, zu denen vor allem Polyole (Sorbitol, myo-Inositol), Methylamine (Betain,  $\alpha$ -Glycerophosphocholin) sowie Aminosäuren ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Alanin und Prolin) und deren Derivate (Taurin) zählen. Da SOOs weder die zelluläre Struktur noch die Funktion von Makromolekülen beeinträchtigen, sind sie wichtige Instrumente

der Volumenregulation, die sich in hohen Konzentrationen im Zytosol nahezu aller Zellen wiederfinden. Werden tierische Zellen mit hypotonen Bedingungen konfrontiert, dann ist bei nahezu allen Zellen die Freisetzung organischer Osmolyte zu beobachten, wodurch die zelluläre Osmolarität unabhängig von Elektrolyten angepasst werden kann. Trotz der wichtigen Funktion der SOOs in der Osmoregulation tierischer Zellen konnte die molekulare Identität beteiligter Effluxwege (Kanäle bzw. Transporter) bisher nicht aufgeklärt werden.

Ungeachtet der molekularen Identität der SOO-Effluxwege war es aus zahlreichen biotechnologischen Anwendungen zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass die schwellungsaktivierten Transportwege für organische Osmolyte eine größenselektive Permeabilität für eine Reihe monomerer Zucker und verwandter Verbindungen aufweisen. Um diese Größenselektivität näher zu charakterisieren, wurde im ersten Schritt die schwellungsaktivierte Membranpermeabilität für eine Reihe strukturell homogener Polyethylenglykole unterschiedlicher Polymerlänge (PEG200–1500; hydrodynamische Radien zwischen ~0,5-1,5 nm) unter iso- und hypotonen Bedingungen in Jurkat-Lymphozyten untersucht. Unter milden hypotonen Bedingungen (200 mOsm) war die Plasmamembran der untersuchten Lymphozyten für PEG300-1500 undurchlässig, was aus der Fähigkeit der Zellen zur hypotonen Volumenregulation geschlossen werden konnte. Darüber hinaus wurde RVD in stark hypotonen Lösungen (100 mOsm) mit PEG600-1500 beobachtet, während PEG300-400 unter vergleichbaren osmotischen Bedingungen die Volumenregulation der Zellen inhibierten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass starkes hypotones Zellschwellen der Lymphozyten zur Permeabilisierung der Plasmamembran für PEG300-400, nicht jedoch für PEG600-1500, führt. Anhand der hydrodynamischen Radien  $R_h$  der verwendeten PEGs konnte ein *cutoff*-Radius von ~0,74 nm für schwellungsaktivierte Transportwege organischer Osmolyte bestimmt werden. Da diese schwellungsaktivierten Transportwege vielfältig für Zellbeladungstechniken verwendet werden, könnte dieses Ergebnis für zahlreiche biotechnologische und biomedizinische Anwendungen von Interesse sein.

Im zweiten Schritt wurde der Versuch unternommen, potentielle Transportwege für organische Osmolyte im RVD-Prozess molekular zu identifizieren. Da es grundlegend ungeklärt war, wie viele unterschiedliche Transporter bzw. Kanäle am Efflux der zahlreichen organischen Osmolyte beteiligt sind, erfolgte zunächst die vergleichende Analyse des schwellungsaktivierten Membrantransports strukturell verschiedener SOOs einschließlich der Aminosulfonsäure Taurin und des Polyols myo-Inositol. Hierbei wurde erstmals gezeigt, dass die schwellungsaktivierten Transportwege für Taurin und myo-Inositol deutlich unterschiedliche Aktivitätsprofile aufweisen. Während der Taurintransport bereits unter milden hypotonen Bedingungen, d.h. nach einer geringen Absenkung der Osmolalität von 300 auf ~230 mOsm, aktiviert wurde, erfolgte die Aktivierung der Membranpermeabilität für myo-Inositol bei einer viel niedrigeren Osmolalität von ~150 mOsm. Darüber hinaus wiesen die beiden Transportwege unter vergleichbarem hypotonen Stress von 100 mOsm deutlich unterschiedliche Aktivitätsdauern auf (Transport von

Taurin ~95 min und myo-Inositol ~40 min). Somit deuteten diese Ergebnisse erstmals auf substrat-spezifische Transportwege für SOOs hin, die voneinander stark abweichende osmotische Aktivierungsprofile besitzen.

Als aussichtsreiche Kandidaten für diese Transportwege wurden zwei Mitglieder der Gruppe der *Solute Carrier* (SLC) untersucht, die klare Übereinstimmungen mit den gesuchten Transportern für SOOs aufweisen. Daher wurde im Weiteren eine RVD-Beteiligung dieser Transportergruppe mit einer Kombination aus molekularbiologischer und konventioneller bzw. hochaufgelöster mikroskopischen Techniken überprüft. Die semiquantitativen RT-PCR-Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dabei, dass die Gentranskription der potentiellen SOO-Transporter SLC5A3 und SLC6A6 in den untersuchten Zelllinien Jurkat, HEK wie auch HepG2-Zellen durch hypotone Bedingungen deutlich verstärkt wird. Hierbei nimmt der zelluläre mRNA-Gehalt der Gene SLC5A3 zwischen 20-60% und SLC6A6 um 30-100% innerhalb von 10-20 min zu, was auf eine potentielle RVD-Beteiligung von SLC-Transportern hindeutet. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde daraufhin die zelluläre Lokalisation des SLC5A3-Transporters unter isotonen und hypotonen Bedingungen mikroskopisch untersucht. Wie anhand der konfokalen lasermikroskopischen Untersuchung zu erkennen ist, findet unter hypotoner Stimulation eine zelluläre Umverteilung des mit EGFP fluoreszenzmarkierten Proteins SLC5A3 statt. Innerhalb von 10 min wird der Transporter dabei von intrazellulären Regionen in Richtung Plasmamembran verlagert. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der hochauflösenden Mikroskopie-Technik *d*STORM gezeigt werden, dass der Transporter SLC5A3 unter hypotoner Stimulation verstärkt mit der Plasmamembran assoziiert vorliegt. Diese verstärkte Membranassoziation des SLC5A3-Proteins deutet damit auf einen schwellungsinduzierten exozytotischen Einbau des Transporters hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit erstmals, dass SLC-Transporter wie SLC5A3, SLC6A6 und vermutlich andere Vertreter der SLC-Superfamilie potentiell am Mechanismus der hypotonen Volumenregulation beteiligt sind. Da SLC-Transporter als wichtige Transportsysteme für Therapeutika angesehen werden und die Mechanismen der Volumenregulation bereits in zahlreichen biotechnologischen Anwendungen implementiert sind, könnte der hier aufgedeckte Zusammenhang einen Erkenntnisgewinn für zahlreiche biomedizinische Forschungsgebiete darstellen.



## Summary

Cell volume homeostasis is critically important for the functional and structural integrity of mammalian cells. To counteract osmotically induced volume perturbations, cells possess efficient mechanisms that control the intracellular osmolyte composition. The volume regulatory mechanisms operating under hyper- and hypotonic conditions are known, respectively, as regulatory volume increase (RVI) and decrease (RVD). During both, RVI and RVD, cells adjust the cellular content of inorganic ions (most notably  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) and organic solutes in order to gain or lose osmotically obligated water. These mechanisms counteract osmotic cell damage and enable the adaptation of cells to a wide range of extracellular osmolarities. Despite decades of research in this field, many aspects of the mechanisms underlying RVD and RVI remain poorly understood.

In case of T lymphocytes, various cellular functions, including proliferation, migration and T cell activation are closely associated with the cell volume regulatory machinery. Among other mechanisms, all these processes are tightly linked by a network of potassium channels. The identification of this network is of great biomedical interest as it provides a key to pharmacological manipulation of the immune system. Current models of hypotonic volume regulation (RVD) in T-lymphocytes consider primarily the voltage-gated  $\text{K}_v1.3$  and the calcium-activated  $\text{IK}_{\text{Ca}1}$  channel.

The first part of this thesis explores the potential role of two-pore domain ( $\text{K}_{2\text{P}}$ ) potassium channels in RVD in murine and human primary  $\text{CD4}^+$ -T lymphocytes. Using a combined genetic and pharmacological approach, time-resolved cell volume analysis revealed an important role of the  $\text{K}_{2\text{P}}$  channels TASK1, TASK2, TASK3 and TRESK in swelling activated  $\text{K}^+$  efflux from hypotonically swollen T cells. Based on the analysis carried out here, the voltage-gated TASK2 as well as the calcium-activated TRESK channel were found as the most important  $\text{K}_{2\text{P}}$  channels involved in the RVD of both naïve and stimulated T cells. The importance of TASK2 and TRESK in the RVD process was comparable to that of  $\text{K}_v1.3$ . In summary, the data provide first evidence that hypotonic volume regulation of murine and human  $\text{CD4}^+$ -T lymphocytes relies on  $\text{K}_{2\text{P}}$  channels. With respect to the close relationship of T-cell function and volume regulatory mechanisms  $\text{K}_{2\text{P}}$  channels may thus be considered as potential targets for immunomodulation.

In the second and major part of this thesis, the swelling-activated transport pathways for small organic osmolytes (SOOs) were investigated. Nearly all eukaryotic cells possess a considerable reservoir of SOOs, such as polyols (e.g. sorbitol, myo-inositol), methylamines (e.g. betaine,  $\alpha$ -glycerophosphoryl choline) and small amino acids (e.g.  $\alpha$ -/ $\beta$ - alanine, proline and the derivate taurine), which are synthesized within the cells or accumulated from the extracellular medium. Since SOOs do not interfere with the integrity of macromolecules and the membrane potential, cells tolerate great cytosolic fluctuations of these solutes without negative effects on cellular

structure or function. Due to these properties, small organic osmolytes are important tools for cell volume regulatory mechanisms, by which the intracellular osmolarity can be adjusted independently of electrolytes. Although the importance of SOOs for hypotonic volume regulation has been known for long time, the molecular identity of participating membrane efflux pathways is far from being clear.

Regardless of the involved transporters, swelling-activated pathways have been reported to exhibit a size selective permeability for a wide range of sugars and related compounds. To gain a deeper insight into this issue, in a first step the impact of the molecular size on the permeation of low-molecular-weight polyethylene glycols (PEG200–1500) through the plasma membrane of Jurkat cells under iso- and hypotonic conditions was analyzed. Upon moderate swelling in slightly hypotonic solutions (200 mOsm), the lymphocyte membrane was found to remain impermeable to PEG300–1500, which allowed the cells to accomplish regulatory volume decrease. RVD also occurred in strongly hypotonic solutions (100 mOsm) of PEG600–1500, whereas 100 mOsm solutions of PEG300–400 inhibited RVD. These findings suggest that extensive hypotonic swelling rendered the cell membrane highly permeable to PEG300–400, but not to PEG600–1500. Using the values of hydrodynamic radii  $R_h$  for PEGs, the observed size-selectivity of membrane permeation yielded an estimate of  $\sim 0.74$  nm for the cut-off radius of the swelling-activated pathway for organic osmolytes. This result may be of interest for many biotechnological and biomedical applications, where swelling-activated SOO-pathways are widely used for cell-loading techniques.

As a second step, an attempt was made to elucidate the molecular identity of transporters for organic osmolytes potentially involved in RVD. Since it was not clear whether RVD-related efflux of SOOs is mediated by one common or several distinct transporter(s), at first, the plasma membrane permeability profiles for two structurally dissimilar SOOs, including the amino sulfonic acid taurine and the polyol myo-inositol were analyzed. The results of the time resolved volumetric measurements clearly showed that the membrane permeability to taurine was activated upon moderate cell swelling (by  $\sim 15\%$ ) in mildly hypotonic solutions ( $\sim 230$  mOsm). In sharp contrast, the membrane permeability to myo-inositol was activated after a much larger swelling ( $\sim 50\%$ ) in strongly hypotonic media ( $< 150$  mOsm). Moreover, the swelling-activated permittivity to taurine during RVD in 100 mOsm medium persisted for about twice as long as that for myo-inositol (taurine  $\sim 95$  min, myo-inositol  $\sim 40$  min). These findings clearly showed that, taurine and myo-inositol utilized separate, apparently substrate-specific pathways, which were activated at different hypotonic thresholds.

Since many members of SLC-family proteins (Solute Carrier) are known for their substrate selectivity and also for their contribution to osmoregulatory mechanisms a participation of SLCs was investigated in the context of RVD. To this end, a combination of molecular biological (semiquantitative RT-PCR) and fluorescence microscopy techniques (confocal and super-resolution microscopy) was used. The semiquantitative RT-PCR data showed a transcriptional

upregulation for the SLC proteins SLC5A3 (myo-inositol transporter; SMIT) and SLC6A6 (taurine transporter TauT) in hypotonically stressed Jurkat lymphocytes, HEK293, and HepG2 cells. In all three human cell lines strongly hypotonic solutions (100 mOsm) increased the mRNA level of the genes SLC5A3 and SLC6A6 between 20-60% and 30-100%, respectively, suggesting a potential participation of SLC transporters in RVD.

In addition, confocal microscopy images clearly showed the intracellular displacement of EGFP-tagged SLC5A3 expressed in HEK293 cells following strongly hypotonic stress (100 mOsm). Within 10 min the fluorescence of EGFP was shifted from intracellular regions towards the plasma membrane. Furthermore, super-resolution microscopy by means of *d*STORM revealed a considerably increased membrane association of SLC5A3 in strongly hypotonic stressed (100 mOsm) HEK293 and Jurkat cells. This finding suggests that SLC5A3 is integrated into the plasma membrane by swelling-induced exocytosis. Taken together, the results of this investigation provided first evidence that transporters such as SLC5A3, SLC6A6 and probably other SLC-proteins participate in the mechanism of hypotonic volume regulation. Due to the relevance of SLC-proteins as potential drug delivery systems the possible role of these transporters might be of great interest for many biomedical research areas.

## 1. Einleitung

### 1.1 Volumenregulation tierischer Zellen

Die Anpassung des zellulären Wassergehalts zur Erhaltung der biologischen Funktion und der Vitalität stellt für nahezu alle tierischen Zellen eine überlebenswichtige Aufgabe dar [1–3]. Insbesondere verdunstungsbedingter Wasserverlust, Nahrungsaufnahme oder metabolische Abläufe [4] führen zu stetigen Schwankungen im Wassergleichgewicht der Zelle, die eine effiziente Osmoregulation erfordern. Durch eine Reihe von entwicklungsgeschichtlich konservierten Mechanismen sind daher Zellen nahezu aller Evolutionsstufen in der Lage, über wirkungsvolle Osmoregulationsmechanismen ihren zellulären Wassergehalt innerhalb enger Grenzen zu steuern [5,6].

Während die meisten Zellmembranen für Wassermoleküle permeabel sind, stellen sie für große oder geladene Moleküle für gewöhnlich eine Diffusionsbarriere dar [2,3,6]. Durch diese als Semipermeabilität bezeichnete Eigenschaft führt eine Änderung im osmotischen ( $\Delta\Pi$ ) oder hydrostatischen ( $\Delta p$ ) Druckverhältnis zu einem Wasserfluss ( $J_v$ ) über die Membran. Dieser Wasserfluss kann über den Zusammenhang

$$J_v = L_p(\Delta p - \Delta\Pi) \quad (1)$$

beschrieben werden, wobei für die Berechnung des Wasserflusses neben den Druckänderungen  $\Delta\Pi$  oder  $\Delta p$  auch die hydraulische Leitfähigkeit der Membran ( $L_p$ ) berücksichtigt wird. Da tierische Membranen meist nur geringe hydrostatische Drücke von  $\Delta p \leq \sim 2$  kPa tolerieren [2,7,8], wird ein zellulärer Wasserfluss im tierischen System insbesondere durch eine osmotische Druckdifferenz ( $\Delta\Pi$ ) initiiert [2,3]. Vereinfacht betrachtet verhalten sich die meisten Zellen insbesondere bei der osmotischen Aufnahme von Wasser wie ein (annähernd ideales) Osmometer, bei dem sich die Volumenänderung weitestgehend proportional zur Osmolaritätsänderung verhält [2,3,6].

Die Höhe der osmotischen Druckdifferenz ( $\Delta\Pi$ ) ergibt sich aus der Konzentrationsdifferenz osmotisch aktiver Teilchen ( $\Delta c$ ) (= Osmolyte) beidseitig der Membran und kann für Osmolyte mit Hilfe der Van't Hoff-Gleichung

$$\Delta\Pi = \Delta c * R * T \quad (2)$$

bestimmt werden, wobei die allgemeine Gaskonstante (R) und die absolute Temperatur (T) einfließen. Ist die Konzentrationsdifferenz freier osmotisch aktiver Teilchen beidseitig der Membran gleich (= isoton), so findet kein Nettowasserfluss über die Membran statt. Befindet sich jedoch extrazellulär eine höhere (= hypertone) oder geringere (= hypotone) freie Osmolytkonzentration als intrazellulär, dann ist ein kompensierender Wasserfluss über die Membran zum Ort höherer Osmolytkonzentration zu beobachten [9]. Bei diesem als Osmose bezeichneten Effekt endet der Wasserfluss bei tierischen Zellen sowohl unter hyper- wie auch unter hypotonen Bedingungen vereinfacht mit dem Ausgleich des osmotischen Konzentrationsunterschieds.

Durch das Fehlen einer starren Zellwand geht im tierischen System der zelluläre Wasserein- bzw. -ausstrom stets mit einer Änderung des Zellvolumens einher [2,3]. Man unterscheidet hierbei die anisotone und die isotone Volumenänderung der Zelle [2]. Bei der anisotonen Volumenänderung führt eine Änderung der extrazellulären Osmolarität zu einem osmotisch getriebenen Wasserin- bzw. -efflux. Im Gegensatz dazu tritt eine isotone Volumenänderung durch eine intrazelluläre Osmolytkonzentrationsänderung z.B. durch den Nettoeinstrom oder der Synthese osmotisch aktiver Substanzen auf [2]. Da biologische Membranen eine laterale Dehnung kaum bzw. nur in geringem Umfang zulassen [8], wird eine Volumenänderung tierischer Zellen durch das Falten und Glätten von Membranreservoirs in Form von Mikrovillistrukturen organisiert, die auf der Zelloberfläche nahezu aller tierischen Zellen vorzufinden sind.

Über die Änderungen des Zellvolumens hinaus führt ein osmotisch getriebener Wasserfluss über die Zellmembran auch stets zu einer sich ändernden zytosolischen Ionenstärke [2,10]. Eine Erhöhung der Ionenstärke durch z.B. hypertonen Wasserverlust der Zelle, bewirkt eine verringerte Hydrathülle der zellulären Makromoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren, wodurch es zur Proteinpräzipitation [7] oder DNA-Strangbrüchen [11,12] kommen kann. Im Gegensatz dazu führt eine Erniedrigung der Ionenstärke z.B. durch Wasseraufnahme unter hypotonen Bedingungen zu einer Vergrößerung der Hydrathülle von Makromolekülen [1]. In beiden Fällen wird die Hydratation und damit die Funktion bedeutender Makromoleküle beeinflusst. Um negativen osmotischen Effekten entgegenzuwirken, ist die Konstanthaltung der zytosolischen Ionenstärke innerhalb physiologisch tolerierbarer Grenzen durch effiziente Osmoregulationsmechanismen für Zellen essenziell [10].

Aufgrund der Relevanz der Osmohomöostase für das Überleben, basiert die Osmoregulationsstrategie bei den höheren Tieren auf zwei Säulen: Während u. a. die Organe Niere und Leber durch die Veränderung der Blutplasmazusammensetzung systemische Osmohomöostase anstreben [4], verfügen alle Zellen des Körpers über potente Regulationsmechanismen, um unter lokalen osmotischen Schwankungen zelluläre Volumenkonstanz sicherzustellen [2,4]. Mechanistisch wird bei der zellulären Volumenregulation zwischen der regulatorischen Volumenzunahme (*regulatory volume increase*; RVI) als Reaktion

auf hypertone und der regulatorischen Volumenabnahme (*regulatory volume decrease* RVD) als Kompensationsmechanismus hypotoner Bedingungen unterschieden [2].

Sowohl der RVD-, wie auch der RVI-Regulationsweg erfolgen über die Anpassung des zellulären Osmolytgehalts, wobei die zytosolische Konzentration an Elektrolyten (vor allem  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Cl^-$ ) und organischen Osmolyten modifiziert wird [2,4,5]. Da eine Veränderung der intrazellulären Konzentration an organischen Osmolyten von Zellen nur langsam realisiert werden kann [7,13], wird die Anpassung der zellulären Elektrolytkonzentration als schnelle Reaktion auf osmotische Schwankungen präferiert. Tierische Zellen verfügen aus diesem Grund über zwei getrennte Wege, um Volumenänderungen vorzunehmen. Im ersten Schritt werden erforderliche Volumenadjustierungen mit Hilfe von Elektrolyten ausgeglichen, während langfristige oder größere Volumenadjustierungen im zweiten Schritt mit Hilfe von organischen Osmolyten organisiert werden [2].

In der vorliegenden Arbeit liegt das Hauptaugenmerk maßgeblich auf der Aufklärung der Mechanismen hypotoner Volumenregulation (RVD), wobei vorauszusetzen ist, dass sich diese mit den hypertonen Volumenregulationsmechanismen (RVI) ähneln [14].

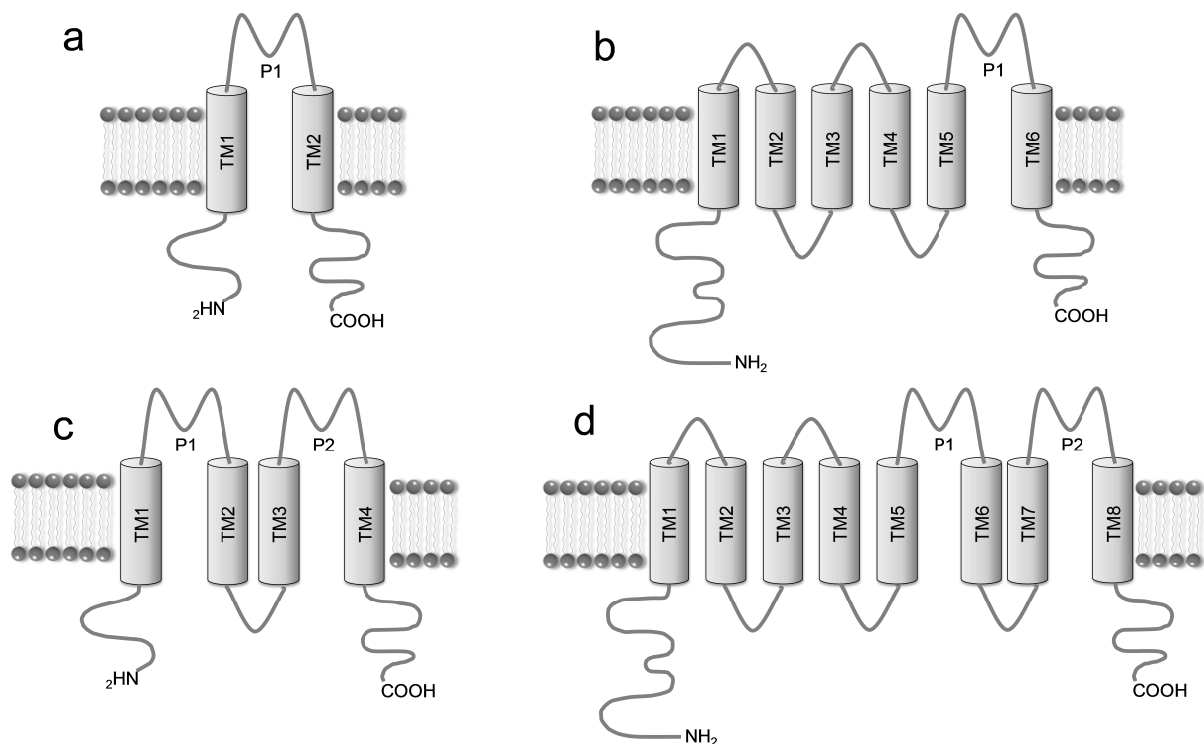
## 1.2 Anorganische Osmolyte in der hypotonen Volumenregulation

Der hypoton induzierte Efflux zellulärer Elektrolyte erfolgt maßgeblich durch die Aktivierung schwellungssensitiver Membrankanäle [2,15] und stellt für Zellen einen schnellen Weg der osmotischen Volumenadjustierung dar [3]. Da eine Änderung der Elektrolytkonzentration jedoch auch stets Auswirkungen auf die Ionenstärke des Zytoplasmas hat, werden Ionen nur begrenzt für volumenregulatorische Zwecke eingesetzt [10]. Insbesondere geringe Volumenauslenkungen unter mild hypotonen Bedingungen (z.B. 200 mOsm) werden von vielen Zellen nahezu vollständig über den Efflux von Elektrolyten ausgeglichen (z.B. Lymphozyten [16]).

Kaliumionen stellen aufgrund ihrer hohen intrazellulären Verfügbarkeit und des ständig aufrechterhaltenen elektrochemischen Gradienten (Membranpotential) mengenmäßig eines der wichtigsten anorganischen Osmolyte der hypotonen Volumenregulation dar [2]. Der Efflux von  $K^+$  während des RVD-Prozesses wird vorwiegend über zelltypspezifisch unterschiedliche Kaliumkanäle organisiert [2,6]. Darüber hinaus findet zur Bewahrung der Elektroneutralität ein Efflux von Chlorid [2,6], Hydrogencarbonat [1,3] sowie der organischen Anionen Glutamat, Aspartat und Lactat [14] über separate, teilweise noch nicht vollständig aufgeklärte Transportwege statt [6].

Kaliumkanäle werden in tierischen Zellen ubiquitär exprimiert und spielen über ihre volumenregulatorische Funktion bei einer Reihe von physiologischen Prozessen wie der Regulation des Membranpotentials, der Zellproliferation, der neuronalen Erregbarkeit sowie der Neurotransmitter- und Hormonfreisetzung eine bedeutende Rolle [17]. Strukturell werden Kaliumkanäle grundlegend über die Anzahl der Poren (P)- und Transmembran(TM)-Domänen klassifiziert. Wie in Abbildung 1 dargestellt unterscheidet man die vier Hauptklassen der Kaliumkanäle 2TM/P (beispielsweise einwärtsgerichtete Kaliumkanäle), 6TM/P (hauptsächliche Klasse von Vertretern der ligand- und spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanälen), 8TM2P und 4TM2P, wobei es sich bei den 8TM2P-Kanälen um Hybride aus 6TM/P und 2TM/P und bei den 4TM2P-Kanälen um eine Wiederholungen zweier 2TM/P-Domänen handelt [18].

Die am RVD beteiligten  $K^+$ -Kanäle sind in vielen Fällen elektrophysiologisch charakterisiert, wobei deren molekulare Identität häufig unvollständig aufgeklärt ist. Für die volumenregulatorischen Mechanismen in den meisten untersuchten Zellen übernehmen vor allem spannungsgesteuerte und kalziumaktivierte 4TM und 6TM-Kaliumkanäle (insbesondere  $K_V1.3$ ,  $K_V1.5$  und  $KCNE1/KCNQ1$  [1,4]) eine essenzielle Rolle [4,6], wobei auch eine Beteiligung mechanosensitiver  $K^+$ -Kanäle [6],  $K^+$ -Cl<sup>-</sup>-Kotransporter [1] und unspezifischer Kationenkanäle der TRP-Familie [1,4] diskutiert wird.



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der vier Hauptklassen von Kaliumkanälen**

Kaliumkanäle werden grundlegend über die Anzahl der Poren (P)- und Transmembran(TM)-Domänen in folgende vier Hauptklassen eingeteilt: a) 2TM/P Kanäle – bestehen aus zwei TM-Domänen die über eine Porendomäne miteinander verbunden sind b) 6TM/P-Kanäle - bestehen aus sechs TM- und einer Porendomäne zwischen TM5 und TM6 c) 8TM/2P Kanäle – Hybride aus 6TM/P und 2TM/P-Kanälen, die aus acht TM und zwei Porendomänen bestehen d) 4TM/2P Kanäle – bestehen aus Wiederholungen zweier 2TM/P-Domänen. Abbildung verändert nach[18].

Insbesondere bei Zellen des Immunsystems ist die Identifizierung des an zellphysiologischen Funktionen beteiligten Netzwerks von  $K^+$  Kanälen von großem Interesse [17,19,20]. Dabei wurde beobachtet, dass für Immunabwehrmechanismen wichtige Zellfunktionen in vielerlei Hinsicht eng mit volumenregulatorischen Prozessen verbunden sind [1]. So sind beispielsweise Proliferation, Migration, Phagozytose und die T-Zell-Aktivierung auf effektive Mechanismen der Zellvolumenanpassung angewiesen [1]. Wird die Volumenregulation dieser Zellen unzureichend ausgeführt, dann sind zahlreiche Immunsystemfunktionen nur eingeschränkt möglich. Dies wird u. a. im hypertonen Nierenmark beobachtet, welches stark anfällig für Infektionen ist [1,2].

Wichtige Mediatoren des Immunsystems sind T-Zellen, die meist zentrale immunologische Prozesse koordinieren. T-Lymphozyten werden immunologisch anhand von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen (meist Glykoproteine) in Unterscheidungsgruppen (englisch: *cluster of differentiation*; CD) eingeteilt [21]. Insbesondere die das Oberflächenantigen CD4-tragenden Helfer T-Zellen [21,22] (=  $CD4^+$ -Lymphozyten) sind als Haupt-Immunmodulatoren des erworbenen Immunsystems von zentraler Bedeutung für die Initiation einer zellvermittelten Immunantwort, wobei sie die Vermehrung und die Funktion aller Leukozytenpopulationen regulieren [21]. Zu ihren Hauptaufgaben zählen die Erkennung fremder Antigene und die Aktivierung anderer Komponenten der zellvermittelten Immunantwort [22].

Da die Aktivierung von  $CD4^+$ -Lymphozyten den Kernprozess der immunmodulierenden Zytokinproduktion darstellt und die hieran beteiligten Kaliumkanäle osmoregulatorische Relevanz besitzen, wird der Prozess der T-Zell-Aktivierung im nun Folgenden näher ausgeführt. Im Anschluss daran werden die hypotonen Volumenregulationsmechanismen von T-Zellen erläutert, wobei die mechanistische Verknüpfung des RVD mit der T-Zell-Aktivierung von humanen  $CD4^+$ -Lymphozyten verdeutlicht wird. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den beteiligten  $K^+$ -Kanälen, die in beiden Prozessen essenzielle Aufgaben übernehmen.

### *Aktivierung von $CD4^+$ -T-Lymphozyten*

Als Bestandteil der antigenspezifischen Immunabwehr werden  $CD4^+$ -Lymphozyten regulär durch professionell antigenpräsentierende Zellen (sog. *antigen presenting cells*, APCs) des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, dendritische Zellen oder Monozyten aktiviert. Zu Beginn des Aktivierungsprozesses präsentieren die APCs über spezifische HLA (*Human Leucocyte Antigen*)-Proteine der Klasse II Fragmente phagozytierter Fremdproteine an der Zelloberfläche. Mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (CD3-Rezeptor) erkennen  $CD4^+$ -Lymphozyten dieses präsentierte Fremdproteinfragment selektiv, wodurch die T-Zelle partiell aktiviert wird. Zur vollständigen Aktivierung von T-Lymphozyten ist über die antigenspezifische CD3-Rezeptorstimulation noch eine Kostimulation über beispielsweise den CD28-Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche



erforderlich [23]. Durch die gleichzeitige T-Zell-Stimulation über CD3/CD28 erfolgt die vollständige Aktivierung der T-Zelle. Bleibt die Kostimulation der naiven T-Zelle aus, dann wird die T-Zelle inaktiviert und apoptotisch [24].

Für die Aktivierung der T-Zelle ist über das Stimulationssignal durch CD3/CD28 ein deutlicher und langanhaltender Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unerlässlich [25]. Der hierfür notwendige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird mit Hilfe des Membranpotentials koordiniert. Im nicht-aktivierten Zustand wird das Membranpotential der Lymphozyten durch die Arbeit der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle  $\text{K}_v1.3$  (6TM/P-Kanal) auf etwa -50 mV reguliert [25–27]. Nach Stimulation der T-Zelle über CD3/CD28 steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb von 1-100 s [27] durch eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum und den zellulären Einstrom über sog. CRAC (*Calcium-Release Activated Calcium*)-Kanäle [27,28]. Da jedoch ein unkompensierter Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  sich selbst schnell durch die Depolarisation der Membranspannung inhibieren würde, bedingt die Aufnahme von weiterem extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  einen zeitgleichen Ausstrom von  $\text{K}^+$  aus dem Zytosol [25,29]. Dieser Kaliumausstrom wird durch die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Kaliumkanäle (z.B. dem 6TM/P-Kanal  $\text{IK}_{\text{Ca}1}$ ) ermöglicht, die durch den initialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aktiviert werden. Der Efflux von zellulärem  $\text{K}^+$  bewirkt eine Hyperpolarisation der Membran auf -80 mV [27], was den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom begünstigt und aufrechterhält. Durch den gestiegenen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel wird schließlich eine Reaktionskaskade ausgelöst, wodurch Zellwachstum, Proliferation und die Freisetzung von Zytokinen eingeleitet wird.

Die spannungsabhängigen  $\text{K}^+$  Kanäle (z.B.  $\text{K}_v1.3$ ) schaffen somit durch die Regulation des Membranpotentials den benötigten elektrischen Gradienten für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, während  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$  Kanäle (z.B.  $\text{IK}_{\text{Ca}1}$ ) ihn durch den kompensatorischen Kaliumefflux aufrechterhalten. Für die T-Zell-Aktivierung sind diese  $\text{K}^+$ -Kanäle somit essenziell. Daher sind die Kaliumkanäle der T-Lymphozyten wichtige Angriffsziele für immunmodulatorische Medikamente [27]. So ist es beispielsweise möglich, die T-Zell-Aktivierung zu inhibieren, indem mit Hilfe spezifischer pharmakologischer Kanalblocker die  $\text{K}_v1.3$ -Kanalfunktion inhibiert wird (siehe Diskussion Kapitel 5.1).

### *RVD von T-Lymphozyten*

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Mechanismen der Volumenregulation und der T-Zell-Aktivierung eng miteinander verwoben sind (Literaturübersicht siehe [28]). Insbesondere die spannungsabhängigen wie auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle scheinen über ihre wichtige Funktion bei der T-Zell-Aktivierung auch an osmoregulatorischen Mechanismen beteiligt zu sein [28]. Nach dem bisherigen Modell zur hypotonen Volumenregulation von

Lymphozyten nach Cahalan initiiert das hypotone Zellschwellen die Aktivierung eines ATP-abhängigen schwellungsaktivierten Cl<sup>-</sup>-Kanals (Cl<sub>Schwell</sub>) [30] bisher unbekannter molekularer Identität [16,28,31]. Der Ausstrom von Cl<sup>-</sup> wiederum initiiert durch die Depolarisation der Zellmembran die Aktivierung des spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanals Kv1.3, der unter physiologischen Bedingungen maßgeblich das Membranpotential reguliert und für die T-Zell-Aktivierung essenziell ist (siehe oben). Neben dem Kv1.3-Kanal wird in humanen Lymphozyten ein weiterer spannungsabhängiger Kaliumkanal Kv3.1 exprimiert [27,32,33]. Dieser Kv3.1-Kanal scheint jedoch keine volumenregulatorische Relevanz zu besitzen, da dessen Expression in einer zur Volumenregulation-unfähigen Zelllinie keinen Effekt auf die RVD-Fähigkeit zeigt [34].

Neben diesen spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen finden sich kontroverse Hinweise in der Literatur über eine potentielle RVD-Beteiligung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Kaliumkanäle in humanen und murinen Lymphozyten bzw. Thymozyten [28,35]. So wurde in einigen Studien sowohl eine Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Volumenregulation wie auch eine direkte Beteiligung des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten IK<sub>Ca1</sub>-Kanals festgestellt [16,35–37]. Die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Volumenregulationsmechanismen konnte jedoch in anderen Studien nicht belegt werden [38,39], sodass eine Beteiligung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Kaliumeffluxwege am RVD-Prozess in Frage gestellt wird.

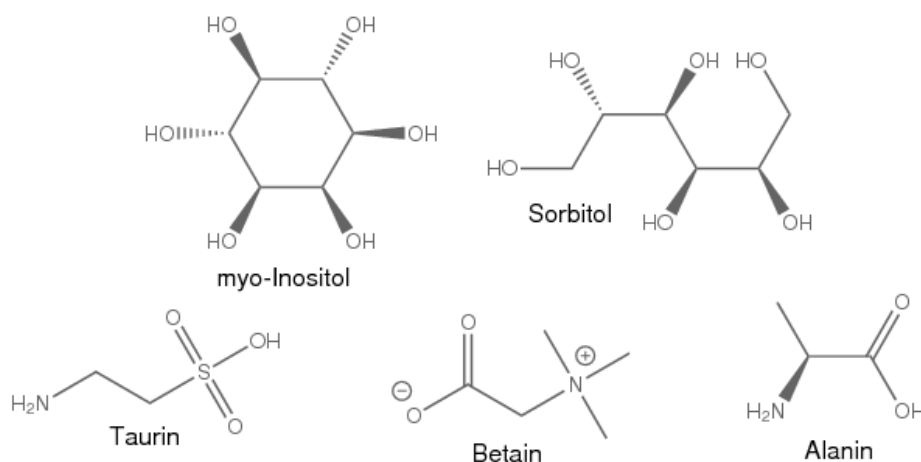
Als weitere RVD-involvierte Kaliumeffluxwege haben darüber hinaus neuere Studien eine mögliche Rolle der kürzlich entdeckten Zwei-Poren Domänen Kaliumkanalfamilie (K<sub>2P</sub>) an der Osmoregulation von Säugetierzellen vermutet [6]. So konnte in murinen Nierenzellen für den K<sub>2P</sub>-Vertreter TREK2 [40] eine volumenregulatorische Beteiligung gezeigt werden. Da weitere Vertreter dieser Kanalfamilie in murinen und humanen Lymphozyten exprimiert werden [25,41–44], ist eine mutmaßliche Beteiligung von K<sub>2P</sub>-Kanälen an der osmotischen Volumenregulation möglich. Zu Vertretern im Fokus dieser Vermutung zählen zum einen die zeit- und spannungsunabhängigen TASK-Kanäle (TASK1, TASK2, TASK3), die in T-Lymphozyten von Maus und Mensch exprimiert werden [41,42] und hier überwiegend für die auswärtsgerichtete Kaliumleitfähigkeit der Membran verantwortlich sein sollen [25]. Außerdem ist der Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Kaliumkanal TRESK, dessen Expression in Jurkat [44,45] T-Lymphozyten nachgewiesen wurde, ein möglicher Kandidat.

Insgesamt stellt der hypotone Efflux von Elektrolyten einen äußerst wichtigen und relativ zeitnah realisierbaren Mechanismus der Volumenregulation dar, mit dessen Hilfe Zellen bereits während der Wassereinstromphase plötzlich auftretenden osmotischen Schwankungen entgegenwirken können. Da die volumenregulatorisch einsetzbaren Elektrolytressourcen jedoch begrenzt sind [1,14,46] und durch die Änderung der intrazellulären Elektrolytkonzentration metabolische Prozesse und Transportvorgänge beeinflusst werden [7], können Zellen unter ausschließlicher Elektrolytbeteiligung lediglich geringe Volumenänderungen ausgleichen.

### 1.3 Beteiligung von organischen Osmolyten bei der hypotonen Volumenregulation

Werden Zellen mit stark anisotonen Bedingungen konfrontiert, dann wird bei nahezu allen tierischen Zellen die Freisetzung organischer Osmolyte beobachtet [1,7]. Durch diesen evolutionär konservierten Mechanismus kann die intrazelluläre Osmolarität unabhängig von Elektrolyten angepasst werden, wodurch organische Osmolyte wichtige Instrumente zur Anpassung der intrazellulären Osmolarität sind. Auch unter großen Volumenauslenkungen ist es der Zelle dadurch möglich innerhalb von etwa 10 - 20 min [13] das isotope Ausgangsvolumen wiederherzustellen.

Zu den wichtigsten Vertretern organischer Osmolyte zählen vor allem Polyole (Sorbitol, myo-Inositol), Methylamine (Betain,  $\alpha$ -Glycerophosphocholin) sowie kleine Aminosäuren ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Alanin und Prolin) und deren Derivate (Taurin) (Abbildung 2) [1,3,7,11,14,46], die sich in hohen Konzentrationen von 10- mehrere 100 mM im Zytosol nahezu aller Zellen befinden [7]. Aufgrund ihrer geringen Molekulargröße und ihrer Beteiligung an der osmotischen Volumenregulation wurden diese Verbindungen unter dem Begriff *small organic osmolytes* (kleine organische Osmolyte, SOO) zusammengefasst. Da sie kompatibel mit biologischen Zellfunktionen sind und keinen nachteiligen Einfluss auf die Struktur und Funktion von Proteinen nehmen, bezeichnete sie Brown und Kollegen [47,48] darüber hinaus auch als kompatible Osmolyte (*compatible osmolytes*) [10]. Der quantitativ Bedeutendste organische Osmolyt in tierischen Zellen ist Taurin [5,14].



**Abbildung 2** Beispiele wichtiger Vertreter der *small organic osmolytes*

SOOs stellen chemisch äußerst inerte Verbindungen dar, die im Verlauf der osmotischen Volumenregulation von den Zellen selbst synthetisiert, aus dem Extrazellularraum aufgenommen oder hierin abgeben werden können [3,14]. Für Zellen sind SOOs von großer Wichtigkeit, da sie zellprotektive Eigenschaften besitzen [7] und weder die Ionenstärke (und damit den

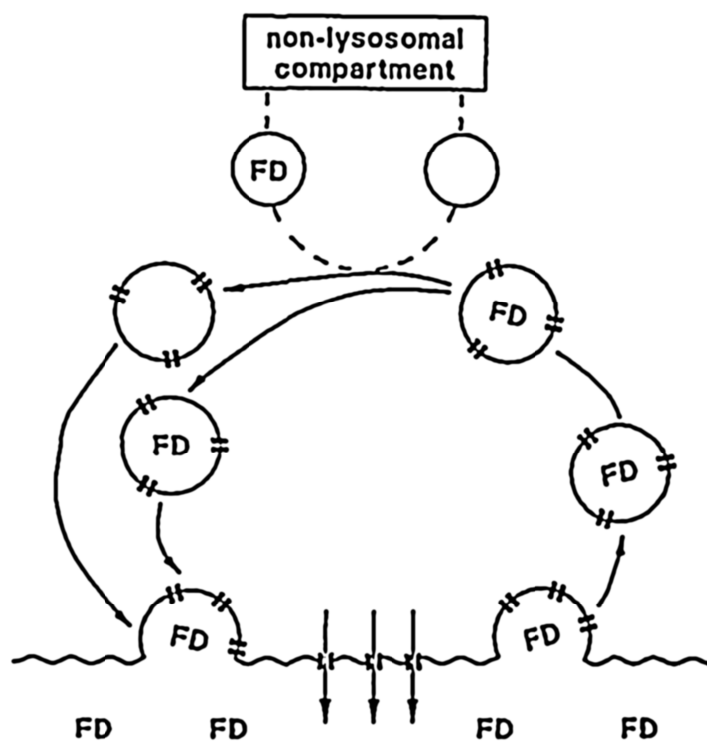
Hydratationsstatus von Makromolekülen) noch das Membranpotential beeinflussen [13,14,46]. Aufgrund dieser Eigenschaft tolerieren Zellen große zytosolische Konzentrationsschwankungen organischer Osmolyte [7].

Im Fokus der Forschung ist in zahlreichen Studien die Aufklärung der hypertonen Aufnahmewege von SOOs, da sie in den Organen Niere, Leber und im Gehirn große medizinische Relevanz besitzen [49]. Es konnte gezeigt werden, dass die hypertone Zunahme intrazellulärer organischer Osmolyte entweder über veränderte Genexpression der synthetisierenden Enzyme oder über Transporter aus dem Extrazellularraum erfolgt [1,13]. Insbesondere die Gene synthetisierender Enzyme wie Aldosereduktase (AR; Sorbitolsynthese), Cystein dioxygenase (CDO) und Cystein-Sulfinat-Decarboxylase (CSD; Taurinsynthese) sowie der beteiligten Natrium-gekoppelten Transporter SLC5A3 (SMIT, myo-Inositol), SLC6A6 (TauT, Taurin), SLC6A12 (BGT1; Betain/GABA) der *Solute Carrier Protein*-Superfamilie sind Gegenstand intensiver Forschung [49,50].

Im Gegensatz zu der gut untersuchten Aufnahme und Synthese der organischen Osmolyte sind die Mechanismen und die beteiligten Transporter/Kanäle der hypotonen SOO-Freisetzung nur unvollständig aufgeklärt [1,5,13,51]. Insbesondere über die Identität potentiell beteiligter Effluxwege werden in der Literatur deutlich kontroverse Diskussionen geführt, wobei häufig Anionenkanäle bzw. Anionenkanal-ähnliche Effluxwege in Betracht gezogen werden [5,6,51–53]. Die Hypothese eines Anionenkanal-vermittelten Efflux organischer Osmolyte wurde erstmals von Roy und Malo aufgestellt [53,54], wobei diese u. a. von Kirk [55], Banderali und Roy [56] sowie Jackson und Strange [53] bestätigt wurde. Grund für die Annahme eines Anionenkanal-vermittelten Efflux organischer Osmolyte ist beispielsweise eine elektrophysiologische Studie, die an Ratten-C6 Gliomzellen durchgeführt wurde [53]. In dieser Studie wurden volumensensitive Anionenkanäle nachgewiesen, die eine etwa 20%-ige Taurinpermeabilität gegenüber dem gemessenen Anionenstrom aufwiesen [5,13,14,53]. Darüber hinaus wurde in zahlreichen pharmakologischen Untersuchungen gezeigt, dass sich der schwellungsaktivierte Efflux von Taurin [55,57,58], myo-Inositol [53] und Glutamat [58] durch Chloridtransport-inhibierende Verbindungen wie Furosemid, NPPB, DIDS oder Nilfumil inhibieren lässt [6,14,53,59]. Jackson und Strange haben daher den Begriff des *volume sensitive organic anion channel* (VSOAC) als potentiellen Kanal unbekannter molekularer Identität geprägt, der für den volumenregulatorischen Efflux organischer Osmolyte und Anionen verantwortlich sein soll [5,53].

In anderen Studien konnte jedoch weder der gemeinsame Transport von SOOs und Anionen [5,60,61] noch die Taurinpermeabilität dieses schwellungsaktivierten Anionenkanals in anderen Zelltypen bestätigt werden [62–64]. Da somit lediglich Indizien auf die Existenz des VSOAC-Kanals hindeuten [5], wird eine generelle und maßgebliche Beteiligung dieses Kanals am schwellungsaktivierten Efflux organischer Osmolyte in Frage gestellt [5].

Unabhängig der molekularen Identität der Effluxwege konnte in Studien von Kinne und Czekay [46,65] ein potentieller Aktivierungsmechanismus der RVD-beteiligten Transporter/Kanäle aufgedeckt werden. Anhand vergleichender Untersuchungen von Zellen mariner Organismen und landlebender tierischer Nierenzellen (IMCD - *Inner Medullary Collecting Duct*) wurde festgestellt, dass unter hypotonen Stressbedingungen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Membranumstrukturierung zur Membranpermeabilisierung für den SOO-Vertreter Sorbitol führt [46]. Hierbei wurde beobachtet, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Sorbitolpermeabilität in einem linearen Verhältnis gekoppelt sind. Desweiteren konnte in Experimenten mit an Dextran gekoppeltem Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gezeigt werden, dass in diese Membranumstrukturierung intrazelluläre Vesikel involviert sind [2,46,65].



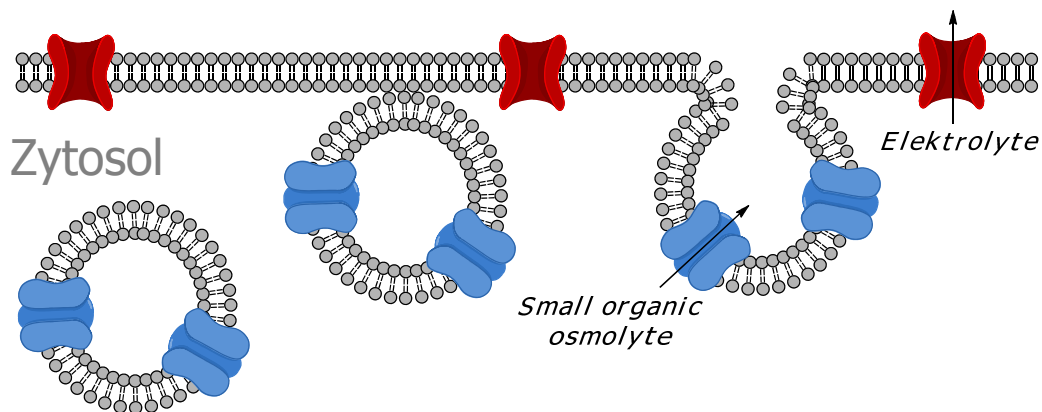
**Abbildung 3**  
**Membranumstrukturierungsmodell**  
**unter hypotonen Bedingungen nach**  
**Kinne et al. 1993 [46]**

Werden Zellen initial unter isotonen Bedingungen mit FITC-Dextran (FD) beladen und anschließend hypotonen Bedingungen ausgesetzt, so kommt es zu einer Vesikelverschmelzung im Verlauf der Volumenrückregulation und dadurch zu einer Freisetzung von intrazellulärem FITC-Dextran. Die an diesem Prozess beteiligten Vesikel tragen vermutlich Transporter, die die Membranpermeabilität für den SOO-Vertreter Sorbitol während des RVD-Prozesses vermitteln. (Kopiergenehmigung liegt vor.)

In einem daraus entstandenen Modell nach Kinne (Abbildung 3) [46,65] vermitteln bei hypotonem Stress putative mechanosensitive unselektive Kationen-Kanäle ein intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, wodurch Membranfusionsprozesse zu einer Membranpermeabilisierung für Sorbitol führen. Allerdings wurden organismusspezifische Unterschiede festgestellt, die eine Allgemeingültigkeit des Modells in Frage stellen. Während Ratten-IMCD-Zellen eine deutliche Kalziumabhängigkeit zeigen, konnte diese bei Kaninchen-IMCD-Zellen nur marginal nachgewiesen werden [46].

In einem von Kinne und Czekay unabhängigen experimentellen Ansatz wurde im Jahr 2006 an unserem Lehrstuhl ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus von Transportwegen für SOOs aufgedeckt. Durch eine Kombination aus dielektrischer Einzelzellspektroskopie (Zellrotation) und videomikroskopischer Zellvolumetrie wurde nachgewiesen, dass SOO-permeable

Kanäle/Transporter durch schwellungsbedingte Exozytose aus zytosolischen Vesikeln in die Plasmamembran integriert werden [15]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Säugetierzellen über separate volumensensitive Transportsysteme für Elektrolyte und SOOs verfügen [15,66]. Wie in dem Modell nach Kiesel in Abbildung 4 dargestellt, sind die am RVD-Prozess involvierten Elektrolytkanäle permanent in der Plasmamembran vorhanden. Im Gegensatz dazu werden SOO-permeable Kanäle/Transporter in einem sekundären Prozess bei Bedarf in die Zellmembran integriert [15]. Dieses Modell erklärt dabei sowohl die von einigen Autoren beobachtete getrennte Freisetzung von Elektrolyten und SOOs (siehe oben) wie auch die von Kinne und Czekay nachgewiesenen Membranamstrukturierung, die zur SOO-Freisetzung führt.



**Abbildung 4 Modell zur hypotonen Aktivierung von Transportwegen organischer Osmolyte nach Kiesel**

Werden Zellen mit mild hypotonen Bedingungen ( $\sim 200$  mOsm) konfrontiert, dann erfolgt der RVD maßgeblich über den Efflux von Elektrolyten. Die hierfür notwendigen Kanäle befinden sich bereits in der Plasmamembran der Zelle. Unter diesen Bedingungen ist die Membran für SOOs wie Sorbitol impermeabel. Wird die äußere Osmolarität jedoch auf 100 mOsm abgesenkt (stark hypotone Bedingungen), dann findet die Fusion von Vesikeln statt und SOO-permeable Kanäle/Transporter unbekannter molekularer Identität werden in die Membran integriert. Hierdurch kommt es im Verlauf des RVD zum kombinierten Efflux von Kaliumchlorid und organischen Osmolyten. Abbildung verändert nach [67]

Auch wenn der Mechanismus der hypotonen SOO-Freisetzung mit diesem Modell erklärt werden kann, konnten die am RVD-beteiligten Transporter/Kanäle für organische Osmolyte bisher auf molekularer Ebene nicht identifiziert werden. In der Literatur finden sich daher zahlreiche Studien zur Charakterisierung der beteiligten Transporter/Kanäle. Hierbei wurde festgestellt, dass die funktionelle Charakteristik des SOO-Efflux deutlich von bisher bekannten unidirektionalen und spezifischen Transportwegen abweicht [14]. Der hypoton induzierte Transportweg von SOOs scheint mit mangelnder Stereoselektivität demnach strukturell unterschiedliche organische Osmolyte über eine bidirektionale Funktionalität zu transportieren [5,14]. Der Transport von SOOs wird hierbei durch den Konzentrationsgradienten bestimmt, der unter physiologischen Bedingungen aus der Zelle weist und für den schwellungsaktivierten Efflux sorgt [5]. Da die Freisetzung organischer Osmolyte während des RVD demnach die funktionale Charakteristik von Kanälen aufweist [14] wird häufig die Hypothese eines kanalvermittelten und gemeinsamen Efflux organischer Osmolyte angenommen [5,14].

### 1.3 Biotechnologische Bedeutung der Transportwege für kleine organische Osmolyte

Auch wenn die molekulare Identität der RVD-beteiligten Transporter bisher nicht aufgeklärt werden konnte, hat das Verständnis der Mechanismen der schwellungsaktivierten Freisetzung von SOOs zu zahlreichen biotechnologischen und medizinischen Anwendungen geführt oder diese verbessert. Die in der Literatur beschriebene Bidirektionalität [14] der schwellungsaktivierten Transportwege organischer Osmolyte kann vielfältig genutzt werden, um Zellen mit niedermolekularen Kohlenhydratverbindungen (z.B. SOO-Vertretern, Polyethylenglykolen oder sonstigen Zuckerderivaten) zu beladen. Für diese Technik werden Zellen unter stark hypotonen Bedingungen hohen Konzentrationen der zu beladenden niedermolekularen Kohlenhydratverbindung ausgesetzt. Soweit die Permeabilität der SOO-Transporter/Kanäle für die aufzunehmende Verbindung gegeben ist, erfolgt durch die hypotone Aktivierung der Transportwege für organische Osmolyte die zelluläre Aufnahme der niedermolekularen Substanz. Aufgrund der Fülle an von Zellen osmoregulatorisch eingesetzten organischen Osmolyten und der Strukturähnlichkeit dieser Osmolyte mit anderen chemischen Verbindungen kann die Zelle mit diversen niedermolekularen Kohlenhydratverbindungen beladen werden.

Zu bedeutenden Beispielen dieser Anwendungen zählen u. a. die osmotische Beladung von Zellen und Geweben mit niedermolekularen kryoprotektiven Zucker- bzw. PEG-Derivaten [15,68] sowie das Einschleusen von radiosensibilisierenden Substanzen in strahlenresistente Tumorzellen [69]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die hypotone Beladung von Zellen mit SOO-Vertretern wie Sorbitol, myo-Inositol oder Taurin durch die Inhibierung des RVD über einen längeren Zeitraum eine glatte Zelloberfläche (durch die Entfaltung von Mikrovilli) schonend aufrecht erhalten werden kann. Hierdurch war es möglich die Effizienz der Elektrofusion von Säugetierzellen als Schlüsseltechnologie für die Herstellung monoklonaler Antikörper oder für Krebsimmuntherapien (Fusion dendritischer Zellen und Tumor-Zellen) erheblich zu verbessern [70,71].

### 1.4 Zielsetzung

Zu Beginn meiner Arbeit war zum einen die Rolle der Zwei-Poren Domänen  $K^+$ -Kanäle ( $K_{2P}$ ) an biophysiologicalen Prozessen in humanen Lymphozyten unbekannt und zum anderen gab es deutlich kontroverse Diskussionen über die schwellungsaktivierten Transportwege organischer Osmolyte. Daher gabelt sich die Zielsetzung dieser Dissertation in folgende zwei Bereiche auf:

*a) Untersuchung der Beteiligung von Zwei-Poren Domänen  $K^+$ -Kanäle ( $K_{2P}$ ) am RVD muriner und humaner T-Lymphozyten*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde versucht im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Physiologie I – Neuropathophysiologie des Universitätsklinikums Münster (Prof. Dr. Dr. Sven Meuth) die Bedeutung der kürzlich entdeckten Zwei-Poren Domänen  $K^+$ -Kanäle ( $K_{2P}$ ; TASK1, TASK2, TASK3 und TRESK) am Prozess der hypotonen Volumenregulation aufzuklären und deren Bedeutung in Relation zu bereits RVD-zugeordneten Kaliumkanälen einzuordnen. Dabei wurde ein kombinierter genetischer und pharmakologischer Ansatz verfolgt, bei dem eine Beteiligung der Kanäle am RVD-Prozess in murinen und humanen  $CD4^+$ -T-Lymphozyten untersucht wurde. Maßgeblich wurde hierbei mit Hilfe zellvolumetrischer Analysen durch zeitaufgelöste videomikroskopische Untersuchungsmethoden die Volumenregulationsfähigkeit primärer  $CD4^+$ -Zellen unter genetischer bzw. pharmakologischer Inaktivierung unterschiedlicher Kanäle analysiert. Übergreifendes Ziel dieser Untersuchung war dabei, eine funktionale Rolle der  $K_{2P}$ -Kanäle in T-Lymphozyten zu belegen und diese dadurch als potentielle pharmakologische Ziele zur Immunmodulation zu identifizieren.

*b) Charakterisierung und Identifizierung von schwellungsaktivierten Transportwegen organischer Osmolyte*

Im zweiten und umfangreicheren Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst über zeitaufgelöste volumetrische Analysen der schwellungsaktivierte Transport von SOOs untersucht. Hierbei wurde zum einen das Ziel verfolgt, die für biotechnologische Anwendungen relevante Größenselektivität der Transportwege für organische Osmolyte zu bestimmen. Zum anderen wurde die Hypothese eines gemeinsamen Effluxweges unterschiedlicher SOOs überprüft. Basierend auf den Ergebnissen dieser Analysen erfolgte außerdem die molekularbiologische und fluoreszenzmikroskopische Identifizierung mutmaßlicher Transporter für SOOs. Da die Fülle an von Zellen eingesetzten organischen Osmolyten groß ist, konzentrierten sich die Versuche hierbei auf die Vertreter Taurin und myo-Inositol, welche für ihre wichtige Rolle am RVD-Prozess von Säugetierzellen bekannt sind.

Insgesamt wurde hierdurch der Versuch unternommen, die schwellungsaktivierten Transportwege kleiner organischer Osmolyte zu charakterisieren und molekular zu identifizieren.



## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende humane und permanente Zelllinien verwendet:

**Tabelle 1 Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien**

| Zelllinie | Ursprung                | Referenz |
|-----------|-------------------------|----------|
| Jurkat    | Akute T-Zell Leukämie   | [72]     |
| HepG2     | Hepatoblastoma          | [73,74]  |
| HEK293    | embryonale Nierenzellen | [75]     |

Die Zelllinien Jurkat, HEK293 und HepG2 wurden von der Firma CLS (Cell Lines Service, Heidelberg, Deutschland) bezogen. Wegen ihres Ursprungs (Blut, Niere und Leber) und der damit verbundenen Toleranz gegenüber osmotischen Schwankungen wurden diese Zelllinien bereits vielfältig für die Erforschung der osmotischen Volumenregulation verwendet. Alle hier verwendeten Zelllinien sind im suspendierten Zustand von nahezu kugelförmiger Gestalt und zeigen unter anisotonen Bedingungen in alle Raumrichtungen eine gleichmäßige Volumenänderung. Dies erleichtert die Bestimmung des Zellvolumens, wodurch sie sich besonders für volumetrische Untersuchungen eignen.

Darüber hinaus wurden Primärkulturen von murinen und humanen CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten verwendet, die uns von der Neurologischen Klinik und Poliklinik (Universität Würzburg) bzw. dem Institut für Neurologie (Universität Münster) im Rahmen einer Kooperation bereitgestellt wurden.

Die transgenen Mausmodelle waren dort entweder selbst etabliert (TRESK<sup>-/-</sup>) oder von Douglas A. Bayliss (TASK1<sup>-/-</sup> und TASK3<sup>-/-</sup>; Pharmakologisches Institut, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA) oder Jacques Barhanin (TASK2<sup>-/-</sup>, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Antipolis, France) zu Verfügung gestellt worden. Die humanen Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert, die vom Institut für Transfusionsmedizin und Hemotherapie (Universität Würzburg) stammten.

## 2.2 Bakterienstamm

Für die Klonierungsarbeiten im molekularbiologischen Teil dieser Arbeit wurde der *E. coli* Laborstämme XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1*  
*lac[F'L proAB lacI<sup>f</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

## 2.3 Plasmide und Vektoren

Die verwendeten Basisvektoren, sowie die in dieser Arbeit hergestellten Plasmidkonstrukte, sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Basisvektoren**

| Vektor        | Hersteller                                  | Resistenzmarker | Beschreibung  |
|---------------|---|-----------------|---|
| pEGFP-N1      | Clontech<br>(Heidelberg,<br>Deutschland)    | KanR/NeoR       | Eukaryotischer Expressionsvektor zur C-terminalen Fusion von SLC5A3 mit Grün-floureszierendem Protein EGFP<br>( <i>enhanced green flourescent protein</i> ) |
| pJET1.2/blunt | Fermentas (St.<br>Leon-Rot,<br>Deutschland) | Bla (AmpR)      | Klonierungsvektor   |

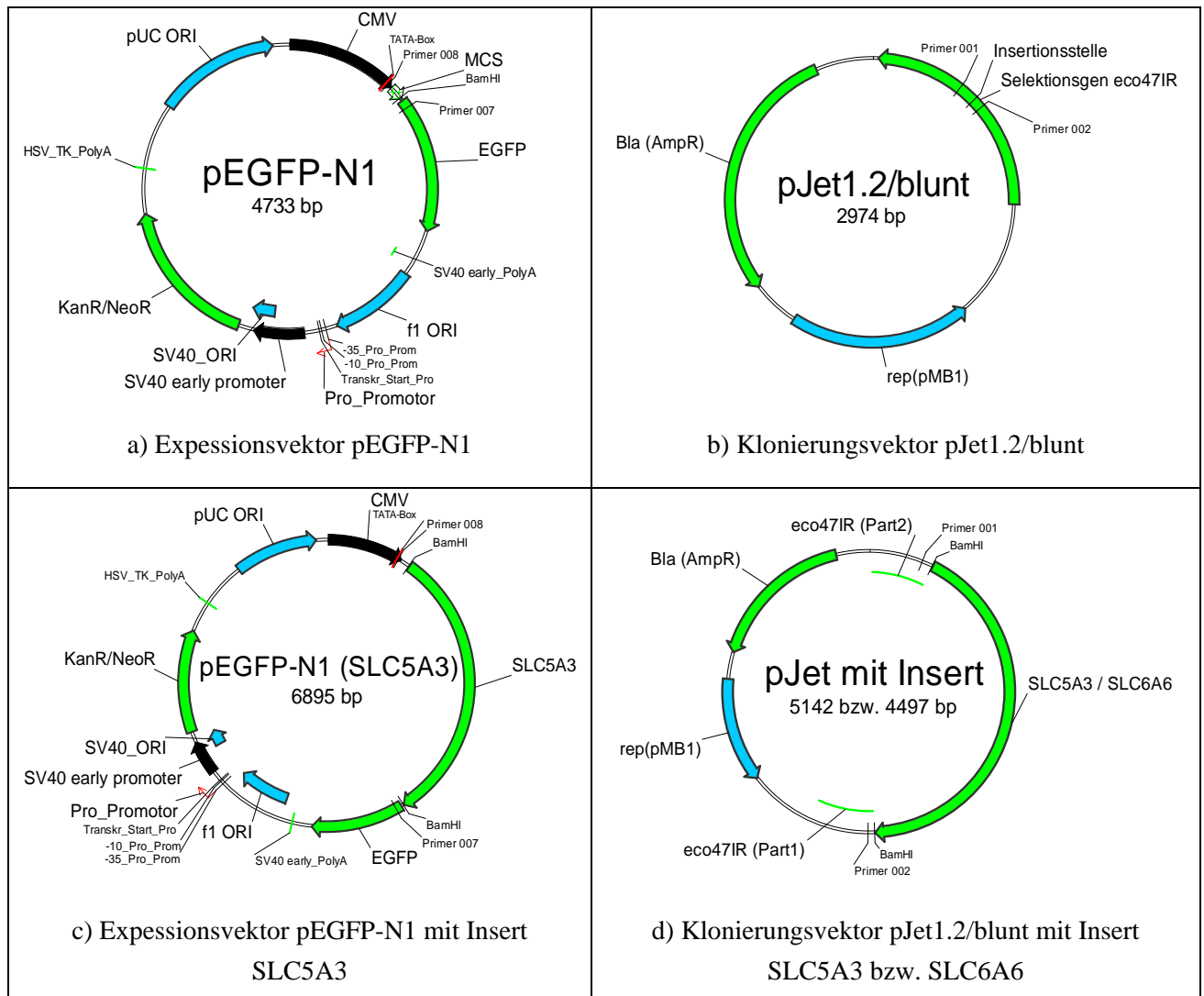
**Tabelle 3 Übersicht der hergestellten Plasmidkonstrukte**

| Plasmidkonstrukte | Beschreibung  |
|-------------------|---|
| pEGFP-N1-SLC5A3   | pEGFP-N1 mit der proteinkodierenden Region von SLC5A3 aus Jurkat-Lymphozyten      |
| pJET-SLC5A3       | pJET1.2/blunt mit der proteinkodierenden Region von SLC5A3 aus Jurkat-Lymphozyten |
| pJET-SLC6A6       | pJET1.2/blunt mit der proteinkodierenden Region von SLC6A6 aus HEK293-Zellen      |

## 2.4 Plasmidkarten

Die Plasmidkarten der im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Plasmide ist nachfolgender Tabelle zu entnehmen:

**Tabelle 4 Plasmidkarten**



## 2.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) standardaufgereinigt (=Cartridge) bezogen. Zusammen mit der jeweiligen Anwendung sind die Primer in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 5** Verwendete Oligonukleotide

| <b>ID</b> | <b>Bezeichnung</b> | <b>Sequenz (5' → 3')</b>   |
|-----------|--------------------|--|
| 026       | SLC5A3_FW          | <b>GGATCCATGAGAGCTGTACTGGACACAGCAGAC</b><br>Amplifikation von SLC5A3             |
| 027       | SLC5A3_REV         | <b>GGATCCGCTAAGGAGAAATAAACAAACATGAAAATTC</b><br>Amplifikation von SLC5A3         |
| 030       | SLC6A6_FW          | <b>GGATCCATGGCCACCAAGGAGAAGCTG</b><br>Amplifikation von SLC6A6                   |
| 031       | SLC6A6_REV         | <b>GGATCCGCCATCATGGTCTCCACAATG</b><br>Amplifikation von SLC6A6                   |
| 024       | BetaAktin_REV      | <b>GAATTCGAAGCATTGCGGTGGACG</b><br>Amplifikation von humanem $\beta$ -Aktin      |
| 025       | BetaAktin_FW       | <b>GAATTCGAAGCATTGCGGTGGACG</b><br>Amplifikation von humanem $\beta$ -Aktin      |
| 013       | SLC5A3_middle      | GCGCTTCCAGAAAATTGCCA<br>Primer für die Orientierungskontrolle des Inserts SLC5A3 |
| 008       | pEGFP-N1_FW        | GCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA<br>Sequenzierungsprimer für Inserts in pEGFP-N1           |
| 007       | pEGFP-N1_REV       | CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG<br>Sequenzierungsprimer für Inserts in pEGFP-N1           |
| 001       | pJET_FW            | CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC<br>Sequenzierungsprimer für Inserts in pJET1.2/blunt     |
| 002       | pJET_REV           | AAGAACATCGATTTTCATGGCAG<br>Sequenzierungsprimer für Inserts in pJET1.2/blunt     |

## 2.6 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits

Soweit nicht anders angegeben wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien in höchstmöglicher Reinheit von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), peQlab (Erlangen, Deutschland) und AppliChem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kaliumkanalblocker sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

**Tabelle 6 Verwendete Kaliumkanalblocker**

| <b>Blocker</b> | <b>Hersteller</b>                       |
|----------------|---|
| Anandamid      | Sigma-Aldrich                           |
| A293           | Sanofi Aventis (Frankfurt, Deutschland) |
| Bupivacain     | Sigma-Aldrich                           |
| Quinidin       | Sigma-Aldrich                           |
| Rutheniumrot   | Sigma-Aldrich                           |
| Spermin        | Sigma-Aldrich                           |
| ShK            | Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)          |
| TRAM34         | Sigma-Aldrich                           |

Die im molekularbiologischen Teil dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Reagenzien sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

**Tabelle 7 Verwendete Enzyme und Reagenzien**

| <b>Enzym/Reagenz</b>                | <b>Typ</b>                       | <b>Hersteller</b>                     |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Taq                                 | DNA-Polymerase                   | Zoologie I (Universität Würzburg)     |
| Phusion                             | DNA-Polymerase                   | Finnzymes (Espoo, Finnland)           |
| BamHI                               | Restriktionsenzym                | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| EcoRI                               | Restriktionsenzym                | Fermentas                             |
| Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) | Phosphatase                      | Fermentas                             |
| RevertAid                           | Reverse Transkriptase            | Fermentas                             |
| RiboLock                            | RNase-Inhibitor                  | Fermentas                             |
| Random Hexamer Primer               | Oligonukleotide                  | Promega (Mannheim, Deutschland)       |
| dNTPs                               | Desoxyribonukleosid-triphosphate | Fermentas                             |

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in nachfolgender Tabelle mit Herstellerangabe aufgelistet:

**Tabelle 8 Verwendete Kits**

| <b>Kit</b>              | <b>Hersteller</b>                     |
|-------------------------|---------------------------------------|
| QiaEX II                | Qiagen (Hilden, Deutschland)          |
| QIAGEN Plasmid Mega Kit | Qiagen (Hilden, Deutschland)          |
| CloneJet                | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| peqGOLD TriFast         | peQlab (Erlangen, Deutschland)        |
| NucleoSpin              | MACHEREY-NAGEL (Düren, Deutschland)   |

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in nachfolgender Tabelle mit Typbezeichnung, eingesetzter Verdünnung, Artikelnummer und Herstellerangabe aufgelistet:

**Tabelle 9 Verwendete Antikörper**

| <b>Antikörper</b>                             | <b>Typ</b>              | <b>Verdünnung</b> | <b>Artikel-Nr.</b> | <b>Hersteller</b> |
|---|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| $\alpha$ -SLC5A3 (Maus; monoklonal, Klon 3A6) | IgG                     | 1:500             | SAB1402920         | Sigma-Aldrich     |
| $\alpha$ -mouse-Alexa647 (Ziege)              | F(ab') <sub>2</sub> H+L | 1:200             | A-21237            | life technologies |
| $\alpha$ -mouse-Alexa568 (Ziege)              | F(ab') <sub>2</sub> H+L | 1:200             | A-11019            | life technologies |

In dieser Arbeit verwendete Transfektionsreagenzien sind in nachfolgender Tabelle mit Herstellerangabe aufgelistet:

**Tabelle 10 Verwendete Transfektionsreagenzien**

| <b>Transfektionsreagenz</b>       | <b>Hersteller</b>                     |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| FugeneHD                          | Promega (Mannheim, Deutschland)       |
| Polyethylenimin, linear MW 25.000 | Polysciences (Eppelheim, Deutschland) |

## 2.7 Größenstandard

Als DNA-Größenstandard für die Größenordnung von DNA-Fragmenten in der Agarose-Gelelektrophorese wurde der Marker *FastRuler Middle Range DNA Ladder* der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

## 2.8 Medien und Lösungen

Alle zur Volumetrie, Zellkultur und Bakterienkultur verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit deionisiertem und sterilfiltriertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einer Millipore-Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Schwalbach, Deutschland) hergestellt. Bei allen molekularbiologischen Arbeiten wurde hingegen DNase/RNase-freies steriles Wasser der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) eingesetzt.

Desweiter wurde in dieser Arbeit verwendetes PBS als 10-fach Konzentrat von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen (Dulbecco's PBS, ohne Kalzium und Magnesium) und mit Hilfe von steril aufgearbeitetem Wasser der Millipore-Aufbereitungsanlage zu einer einfach konzentrierten Arbeitslösung verdünnt und anschließend steril filtriert.

### a) für die Zellkultur eukaryotischer Zellen

Folgende zur Zellkultur verwendeten Lösungen wurden als fertige sterile Gebrauchslösungen bezogen:

**Tabelle 11 Hersteller der verwendeten Zellkulturlösungen**

| Hersteller                              | Lösung   |
|---|--|
| PAA Laboratories (Pasching, Österreich) | RPMI 1640 (ohne Glutamin)<br>DMEM High Glucose (mit 4,5 g/L Glucose und stabilem Glutamin)<br>DMEM (ohne Glutamin)<br>Penicillin/Streptomycin (100x; 100 U/mL)<br>Trypsin/EDTA (0.5 mg/ml Trypsin, 0.22 mg/ml EDTA in PBS)<br>Natriumpyruvat (100 mM)<br>MEM NEAA (100x)<br>FCS<br>Stabiles L-Glutamine (200 mM) |
| Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)  | Poly-D-Lysin Hydrobromid (MW 70.000 - 150.000, P0899)  |
| Gibco (Darmstadt, Deutschland)          | Gentamicin<br>1 M HEPES  |

Darüber hinaus wurde das verwendete humane Serum aus dem peripheren Blut gesunder Spender vom Institut für Transfusionsmedizin und Hemotherapie (Universität Würzburg) bereitgestellt.

Die in der Zellkultur humaner Zelllinien verwendeten Mediumzusammensetzungen sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen:

**Tabelle 12 Zellkulturmedien**

| <b>Zelllinie</b>           | <b>Mediumszusammensetzung</b>   |
|----------------------------|---|
| Jurkat                     | RPMI 1640 (ohne Glutamin)<br>10% (v/v) FCS<br>2 mM stabiles L-Glutamine<br>100 U/mL Penicillin/Streptomycin<br>1% (v/v) MEM NEAA<br>1 mM Natriumpyruvat |
| HEK293                     | DMEM High Glucose<br>10% (v/v) FCS<br>100 U/mL Penicillin/Streptomycin<br>1% (v/v) MEM NEAA   |
| HepG2                      | RPMI 1640 (ohne Glutamin)<br>10% (v/v) FCS<br>2 mM stabiles L-Glutamine<br>100 U/mL Penicillin/Streptomycin<br>1% (v/v) MEM NEAA                        |
| Primäre murine Lymphozyten | DMEM<br>5% (v/v) FCS<br>10 mM HEPES<br>25 µg/ml Gentamicin<br>50 µM β-Mercaptoethanol<br>2 mM L-Glutamin<br>1% (v/v) MEM NEAA                           |
| Primäre humane Lymphozyten | RPMI 1640<br>10% (v/v) humanes Serum<br>25 mM HEPES<br>100 U/mL Penicillin/Streptomycin<br>2 mM L-Glutamin  |

Als Kryokonservierungsmedium für die permanenten Zelllinien wurde 80% (v/v) FCS, 10% (v/v) Dimethylsulfoxid und 10% (v/v) Grundmedium der entsprechenden Zelllinie verwendet.



**b) Bakterienkulturmedien**

Folgende zur Kultivierung prokaryotischer Zellen verwendeten Lösungen wurden eingesetzt:

**Tabelle 13 Bakterienkulturmedien**

| Medium  | Zusammensetzung  |
|---|--|
| Lysogeny Broth (LB) Medium                          | 10 g Trypton<br>10 g Hefeextrakt<br>5 g NaCl<br>ad 1 L ddH <sub>2</sub> O, pH 7.4  |
| Transformation and Storage Solution<br>(TSS-Medium) | LB-Medium mit:<br>10% (w/v) PEG4000 (3350 oder 4500, optional)<br>5% (v/v) DMSO<br>62.5 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 6.5, lagern bei -20 °C |

Die Sterilisation der Medien erfolgte durch Autoklavieren (15 min, 121 °C). Hitzelabile Zusätze (z.B. Antibiotika) wurden zunächst durch Filtration sterilisiert und den Medien nach Abkühlen auf ca. 50 °C zugesetzt.

Antibiotikazusätze wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt und bei -20 °C gelagert.

Es wurden folgende Antibiotikaendkonzentrationen verwendet:

|             |  |
|-------------|--|
| Ampicillin  | 100 µg/mL (Lösungsmittel ddH <sub>2</sub> O) |
| Kanamycin   | 50 µg/mL (Lösungsmittel ddH <sub>2</sub> O)  |
| Tetracyclin | 12.5 µg/mL (Lösungsmittel Ethanol (absolut)) |

**c) Volumetriemedien und Puffer**

Zur Volumetrie wurden folgende wässrige Medien eingesetzt:

**Tabelle 14 Volumetriemedien**

| Volumetriemedium                  | Zusammensetzung  |
|-----------------------------------|--|
| 100 mOsm Standardvolumetriemedium | 0.9 mM Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub><br>0.1 mM Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub><br>10 mOsM Kaliumphosphatpuffer (siehe unten)<br>87 mOsM organischer Osmolyt (Taurin, myo-Inositol oder Saccharose) |
| 200 mOsm PBS                      | 10x PBS (ohne Kalzium und Magnesium) mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 mOsm   |

Abweichende Osmolalitäten des Standardvolumetriemediums wurden erreicht, indem lediglich die Konzentration des organischen Osmolyten entsprechend variiert wurde. Bei allen vollständig zusammengesetzten Volumetriemedien wurden sowohl die Osmolalität (Kryoosmometer) sowie der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls eingestellt.

Darüber hinaus wurden Polyethylenglykol (PEG1000 und 1500)-haltige Volumetriemedien in den Osmolalitäten 300, 200 und 100 mOsm verwendet. Da wässrige PEG-Lösungen keine lineare Beziehung zwischen Osmolalität [mOsm/kg] und Molarität [mol/L] aufweisen, wurde die Osmolalität aller wässrigen PEG-substituierten Volumetriemedien kryoskopisch eingestellt. Um den pH-Wert zu stabilisieren wurde anschließend die Leitfähigkeit zwischen 100-150  $\mu$ S mit geringen Mengen einer HEPES/KOH (pH 7,4)-Lösung (siehe unten) eingestellt. Die Leitfähigkeit wurde dabei mit Hilfe eines digitalen Konduktometers (Knick, Berlin, Deutschland) überprüft.

Um den pH-Wert der Standardvolumetriemedien auf einen Wert von 7.2-7.4 einzustellen wurden als pH-Puffer folgende Lösungen verwendet:

**Tabelle 15 pH-Puffer der Volumetriemedien**

| <b>pH-Puffer</b>     | <b>Zusammensetzung</b>  |
|----------------------|---|
| Kaliumphosphatpuffer | 80,2% (v/v) 1 M $K_2 HPO_4$ in ddH <sub>2</sub> O<br>19,8% (v/v) 1 M $KH_2PO_4$ in ddH <sub>2</sub> O |
| HEPES/KOH-Puffer     | 1 M HEPES mit KOH auf pH 7.4  |

Von diesen als Konzentrat angesetzten Lösungen, wurde der pH-Wert überprüft und die Osmolarität bestimmt. Zur Pufferung des pH-Wertes der Volumetriemedien wurde von diesen konzentrierten Puffer-Lösungen ein entsprechendes Volumen zu dem Volumetriemedium zugegeben, um eine Pufferendkonzentration im Medium von 10 mOsM zu erreichen.

Zum Beschichten der Deckgläschen für die Volumetrie wurde außerdem eine 0.05 mg/mL konzentrierte wässrige Poly-D-Lysin Lösung verwendet.

**d) Lösungen für die molekularbiologischen Methoden**

Bei den molekularbiologischen Methoden wurden folgende Lösungen verwendet:

**Tabelle 16** Verwendete Lösungen für molekularbiologische Methoden

| Lösung                              | Zusammensetzung  |
|-------------------------------------|--|
| 20x Natriumborat-Puffer (SB-Puffer) | 8 g/L NaOH<br>50 g/L Borsäure<br>pH 8.0-8.5  |
| 6x DNA Probenpuffer                 | 6 ml Glycerol<br>2 ml EDTA (0.2 M in ddH <sub>2</sub> O)<br>500 µl ddH <sub>2</sub> O<br>500 µl Orange G (4% w/v in ddH <sub>2</sub> O)<br>ad 10 ml ddH <sub>2</sub> O |
| 10x Taq-Reaktionspuffer             | 100 mM Tris/HCl (pH 9,9)<br>500 mM KCl<br>1% (v/v) Triton X-100<br>15 mM MgCl <sub>2</sub>   |
| dNTPs                               | 10 mM Desoxy-Adenosintri-phosphat<br>10 mM Desoxy-Cytosintri-phosphat<br>10 mM Desoxy-Guanosintri-phosphat<br>10 mM Desoxy-Thymintri-phosphat                          |

**2.9 Verbrauchsmaterialien und Geräte**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Analysewaage          | PT3100 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)  |
| Autoklaven            | Systec D-23 (Systec, Wettenberg, Deutschland)<br>5075 ELVC (Systec, Wettenberg, Deutschland)                  |
| Brutschrank           | CB 150 (Binder, Tuttlingen, Deutschland)<br>Heracell (Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)         |
| CLSM                  | LSM 710 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl-Immersionsobjektiv und Argonlaser-Anregung |
| Elektrophoresekammer  | Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad, München, Deutschland)  |
| Feinwaage             | R160P-*D1 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)   |
| Fluoreszenzmikroskope | Leica Leitz DMRM mit Leitz Objektive 10x,20x,40x,100x   |

|                           |  |
|---------------------------|--|
|                           | Olympus BX 51 (Olympus, Hamburg, Deutschland)  |
| Kugelfallviskosimeter     | PAA AMV 200 (Anton Paar AG, Graz, Österreich)  |
| Leitfähigkeitsmessgerät   | Konduktometer 702 (Knick, Berlin, Deutschland)   |
| Mikroskopkameras          | UEye UI-1640SE (IDS GmbH, Obersulm, Deutschland)<br>uEYE UI-2240SE (IDS, Obersulm, Deutschland)    |
|                           | Olympus ColorView 12 (Olympus, Hamburg, Deutschland)   |
| Geldokumentation          | Gel iX-System (Intas, Göttingen, Deutschland)  |
| Heizblock                 | ThermoShaker TS 1 (Biometra, Jena, Deutschland)  |
| Gefrierpunktsmometer      | OSMOMAT 010 (Gonotec, Berlin, Deutschland)   |
| pH-Meter                  | pH-Meter E 512 (Metrohm, Herisau, Schweiz)   |
| Photometer                | Nanophotometer <i>pearl</i> P360 (Implen, München, Deutschland)                                    |
| Schüttelmixer             | Vortex Genie 2 (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)  |
| Schüttelinkubator         | KS 4000i control (IKA, Staufen, Deutschland)   |
| Spannungsgeräte           | PowerPac Basic (BioRad, München, Deutschland)  |
| Sterilbank                | Herasafe (Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)  |
| Thermocycler              | C1000 Thermal Cycler (BioRad, München, Deutschland)  |
| Tischzentrifuge           | Biofuge fresco (Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)                                    |
| Vorschubpumpen            | KDS100 (KD Scientific, Holliston, USA)   |
| Wasseraufbereitungsanlage | Milli-Q (Millipore, Schwalbach, Deutschland)   |
| Zentrifugen               | Minifuge RF (Heraeus, Osterode, Deutschland)<br>Centrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) |
| Neubauer Zählkammer       | Neubauer Zählkammer <i>improved</i> (Brandt, Wertheim, Deutschland)                                |
| CASY Partikelanalysator   | CASY1 <i>Cell Counter</i> (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland)                                |

Falls nicht anders angegeben wurden die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien von den Firmen BioRad (München, Deutschland), Brand (Wertheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickhausen, Deutschland), life technologies (Darmstadt, Deutschland) und peqLab (Erlangen, Deutschland) bezogen.

## 2.10 Verwendete Computerprogramme

Im Rahmen dieser Dissertation wurde folgende Computersoftware verwendet:

**Tabelle 17 Verwendete Computersoftware**

| <b>Software</b>     | <b>Version</b> | <b>Hersteller</b>   | <b>Verwendung</b>                             |
|---------------------|----------------|---|---|
| ImageJ [76]         | 1.38x          | Wayne Rasband, National Institute of Health, USA  | Auswertung Volumetrie                         |
| Fiji/ImageJ [76]    | 1.48a          | Wayne Rasband, National Institute of Health, USA  | Bildanalyse und -bearbeitung                  |
| VirtualDub          | 1.9.8          | Avery Lee, GPL, SourceForge   | Auswertung Volumetrie                         |
| Origin              | 9.0.0G         | OriginLab Corporation, Northampton, USA   | Auswertung Volumetrie, Datenanalyse           |
| ZEN (Light Edition) | 2009           | Zeiss, Jena, Deutschland  | LSM-Bildauswertung                            |
| ZEN                 | 2008           | Zeiss, Jena, Deutschland  | LSM Steuerung                                 |
| IrfanView           | 4.25           | Irfan Skiljan, GPL, SourceForge   | Auswertung Volumetrie                         |
| rapidSTORM [77]     | 3.2            | Steve Wolter, GPL, <a href="http://www.super-resolution.de">www.super-resolution.de</a> | Auswertung <i>d</i> STORM-Bilddaten           |
| VectorNTI           | 9              | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  | Klonierungsplanung und Sequenzierdatenanalyse |
| BioEdit             | 7.0            | Thomas A. Hall Department of Microbiology, North Carolina State University, USA         | Sequenzierdatenanalyse                        |

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkulturen

Soweit nicht anders angegeben wurden tierische Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Alle erforderlichen Sedimentierschritte tierischer Zellen erfolgte darüber hinaus bei 300 \* g, 21 °C und über 5 min.

#### 3.1.1 Kultivierung der Säugetierzelllinien

Die humanen permanenten Zelllinien Jurkat, HepG2 und HEK293 wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> kultiviert und dreimal pro Woche unter sterilen Bedingungen passagiert, um die Zellen im exponentiellen Zellwachstumsbereich zu halten.

Das Ablösen der adhären Zellen HEK293 und HepG2 vom Substrat wurde enzymatisch mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (siehe Material) erreicht. Nach dem Spülen der Zellen mit einer auf 37 °C temperierten einfach konzentrierten PBS-Lösung wurden die Zellen hierzu unter Zugabe von 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung unter lichtmikroskopischer Kontrolle maximal 5 min abgelöst. Dabei wurde die Kulturflasche mehrfach flach auf den Tisch geklopft, um das Lösen zu beschleunigen. Die enzymatische Reaktion wurde unter Zugabe von 9 mL des entsprechenden Zellkulturmediums beendet.

Die Langzeitkonservierung permanenter Zelllinien erfolgte durch Kryokonservierung bei -80 °C (Gefriertruhe) oder bei -196 °C (flüssiger Stickstoff). Hierzu wurden am Vortag frisch passagierte Zellen in eisgekühltem DMSO-haltigen Kryokonservierungsmedium (siehe Material) in der Zelldichte von  $\sim 1 \cdot 10^6$  Zellen/mL resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in vorgekühlte 1 mL Kryokonservierungsröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt und diese sofort bei -80 °C eingefroren. Eine Überführung in flüssigen Stickstoff erfolgte bei Bedarf erst nach 24 Stunden. Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen zunächst angetaut und dann unter sterilen Bedingungen möglichst schnell in 37 °C warmes Kulturmedium überführt. Anschließend erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel und die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde erneut ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die Zellzahlbestimmung wurde zum einen optisch mit Hilfe einer Neubauer (*improved*)-Zählkammer bestimmt oder elektrisch über die Verwendung des Partikelanalysators CASY1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland). Bei der Verwendung der Neubauer Zählkammer wurden  $\sim 10 \mu\text{L}$  Zellsuspension in die Kammer eingebracht und die Zellzahl durch Auszählen von vier Eckquadraten (Großquadrate) bestimmt. Zur Zellzahlbestimmung mit Hilfe

des CASY wurden 50  $\mu\text{L}$  Zellsuspension in 10 mL PBS resuspendiert und diese Lösung mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine größendefinierte Glaskapillare vom Partikelanalysator angesaugt. Treten Zellen in die Kapillare ein, so erhöht sich aufgrund ihrer isolierenden Eigenschaft der über zwei Platinelektroden gemessene Widerstand der Glaskapillare proportional zum Zellvolumen, sodass die Zellzahl, die Zellgröße sowie der Totanteil der Kultur analysiert werden kann.

#### 3.1.2 Primäre murine und humane Kulturen

Die isolierten primären  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten (murin oder human) wurden uns ein- bis zweimal pro Woche von der Neurologischen Klinik und Poliklinik (Universität Würzburg) bzw. dem Institut für Neurologie (Universität Münster) bereitgestellt. Die Isolation muriner Lymphozyten aus dem Milzgewebe von adulten transgenen oder wildtypischen Mäusen erfolgte dort durch magnetische Zellseparation mit Hilfe des T-Zell Isolations-Kits II (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) [78].

Humane Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender (vom Institut für Transfusionsmedizin und Hemotherapie, Universität Würzburg) zunächst über Dichtegradientenzentrifugation in einem Lymphozyten-Separationsmedium (PAA, Pasching, Österreich) angereichert und schließlich ebenfalls über ein  $\text{CD4}^+$  Isolations-Kit II (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert [79]. Die T-Zell-Aktivierung (= Stimulation) der murinen oder humanen Lymphozyten erfolgte mit anti- $\text{CD3}/\text{CD28}$ -Antikörpern beladenen Partikeln [80] (Dynabeads, life technologies, Darmstadt, Deutschland) über 36-48 h, wobei das Verhältnis von Zellen zu *Beads* gemäß den Herstellervorgaben 4:1 betrug [78,79]. Die Kultivierung der Zellen für die Versuche erfolgte in unserem Lehrstuhl in 25  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen in einem Volumen von  $\sim 8$  mL wobei eine Zelldichte von  $\sim 5 \cdot 10^6$  Zellen/mL eingestellt wurde.

#### 3.1.3 Transiente Transfektion tierischer Zelllinien

Die chemische Transfektion der Zelllinie HEK293 mit dem Klonierungskonstrukt SLC5A3-pEGFP-N1 erfolgte mit Hilfe der Transfektionsreagenzien FugeneHD (Promega, Mannheim, Deutschland) oder Polyethylenimin (Polysciences, Eppelheim, Deutschland) einen Tag nach erfolgter Zellpassage. Die transiente Transfektion wurde entweder in einer 24-Well Multititerplatte auf Poly-D-Lysin-Beschichteten Deckgläsern, einer ibidi  $\mu\text{-Slide VI}^{0.4}$  Durchflusskammer (ibidi, Martinsried, Deutschland) oder in einem mit Kammern besetzten Deckglas LabTek II (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu

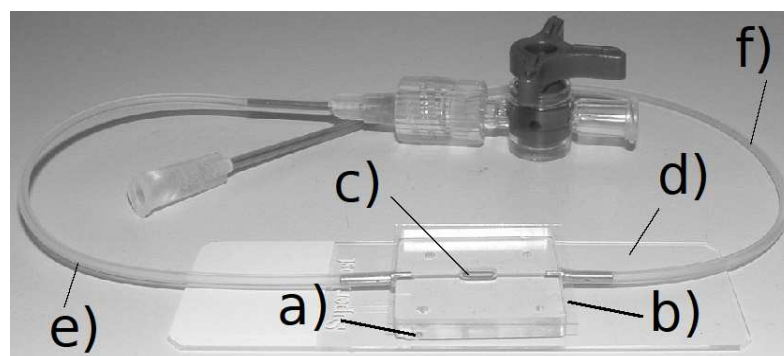
in entsprechender Konzentration ausgesät, um zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 30-50% vorzufinden.

Für den LSM-Versuchsteil erfolgte die Transfektion mit FugeneHD nach Herstellerangaben. Hierzu wurde ein DNA zu FugeneHD-Verhältnis von 1:3 gewählt, wobei 0,2 - 0,4  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA pro  $\text{cm}^2$  Wachstumsfläche eingesetzt wurde.

Die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) erfolgte zur Ermittlung der anti-SLC5A3-Antikörperspezifität, wobei das lineare Polymer der Kettenlänge 25.000 Da (Polysciences, Eppelheim, Deutschland) verwendet wurde. Dieses wurde in einer wässrigen Stammlösung der Konzentration 1 mg/mL eingesetzt. Zur PEI-Transfektion wurde ein Transfektionsgemisch bestehend aus dem Zellkulturgrundmedium DMEM ohne FCS oder Antibiotika, Plasmid-DNA und Polyethylenimin hergestellt, wobei ein experimentell bestimmtes optimales DNA zu PEI-Verhältnis von 1:3 verwendet wurde. Hierbei wurde  $\sim 0,3 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA pro  $\text{cm}^2$  Wachstumsfläche angestrebt. Dieser Transfektionsansatz wurde abends zu den Zellen gegeben und die Zellen im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel.

### 3.2 Zellvolumetrische Analysen

Die quantitative Analyse der Volumenänderung von tierischen Zellen unter anisotonen Bedingungen erfolgte mit Hilfe einer im Lehrstuhl konstruierten Volumetriekammer und videomikroskopischer Aufnahmen [15,68]. Anders als bisher beschrieben bestand die in dieser Arbeit verwendete Volumetriekammer aus einem rechteckigen PDMS (Polydimethylsiloxan) Block, der mit der Unterseite durch Eigenadhäsion auf einen Objektträger anhaftete (siehe Abbildung 5).

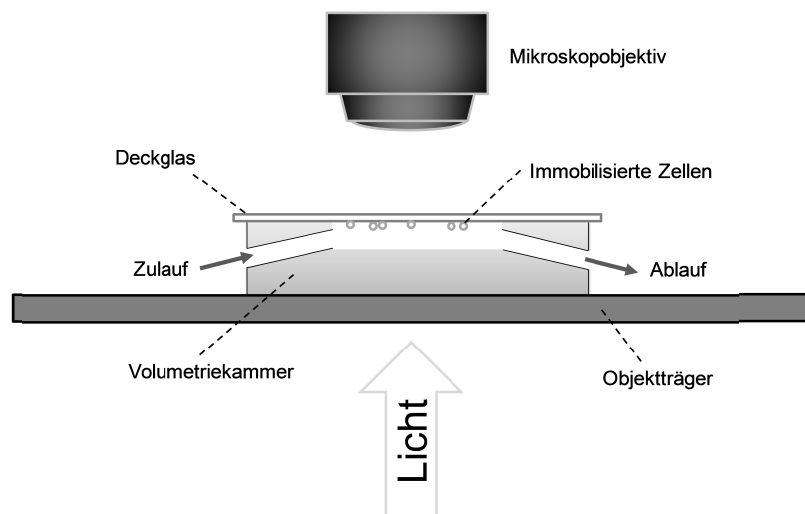


**Abbildung 5** Photographie einer Volumetriekammer  
 (a) PDMS-Form; (b) Deckglas; (c) Spülkammer; (d) Objektträger; (e) Zulauf; (f) Ablauf



Die Volumetriekammer besaß eine Vorrichtung für Zu- und Ablauf (Abbildung 5, e, f), die in einer ovalen Aussparung in der Mitte der Form mündeten (Abbildung 5, c), welche ein Volumen von 50  $\mu\text{L}$  hatte. Diese ovale Aussparung war nach oben hin geöffnet und musste mit einem Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen (Abbildung 5, b) durch vorsichtiges Andrücken verschlossen werden. Die Beschichtung war nötig um die suspendierten Zellen zu immobilisieren und wurde erreicht, indem die Deckgläschen mindestens für 20 min in eine wässrige Poly-D-Lysinlösung (0,5 mg/mL) eingelegt wurden. Zum Trocknen der so behandelten Deckgläschen wurde Druckluft verwendet.

Vor Befüllung der Kammer mit Zellen wurde diese auf die Oberseite gedreht, um den Zellen ein Absinken auf das Deckglas und damit das Anheften zu ermöglichen. Nach anschließender Equilibrierung mit vorgewärmtem Zellkulturmedium wurden die Zellen mit einer 1 mL Spritze über den mit einem Dreiwege-Hahn ausgestatteten Zulauf (Abbildung 5, e) vorsichtig und blasenfrei in die Kammer eingefüllt. Auf der Oberseite wurde die Kammer dann für ~10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde das vorgewärmte Volumetriemedium in einer 20 mL Spritze an den Zulauf der Kammer angeschlossen und die Kammer unter dem Lichtmikroskop (20-fache Vergrößerung, Leica Leitz DMRM) platziert (siehe Abbildung 6).



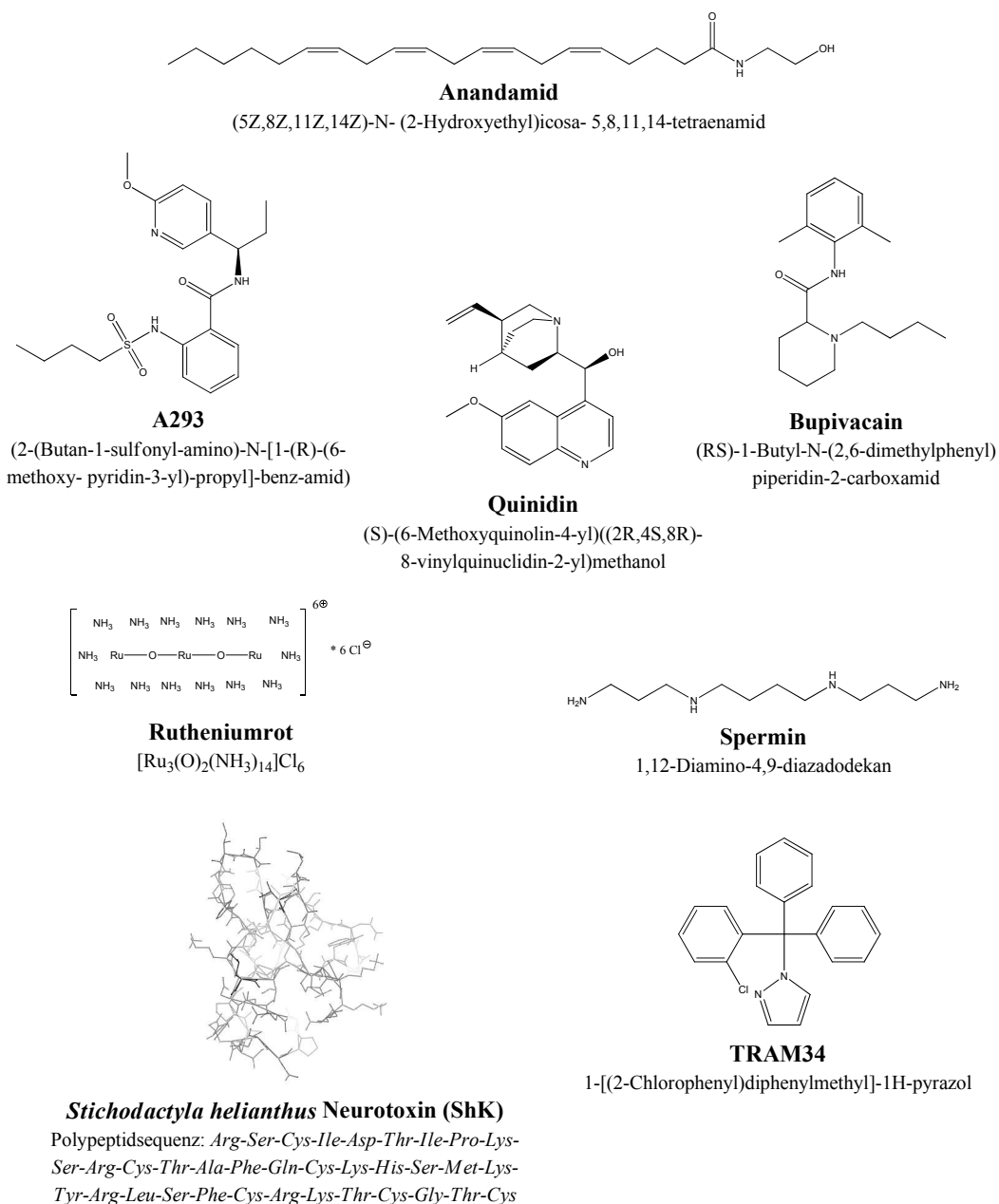
**Abbildung 6** Schematische Darstellung der experimentellen Einrichtung zur Volumetrie

Die Spritze wurde in eine Vorschubpumpe (KDS100) eingespannt, die nach Aktivierung mit der Geschwindigkeit 30 mL/h 2 mL Volumetrielösung durch die Kammer spülte und so den vollständigen Medienaustausch gewährleistete. Die Volumenänderung der Zellen wurde als Querschnittsflächenänderung der Zellen aufgezeichnet, wobei im Zeitraffermodus der Kamerasteuerung (uEye) alle 10 s über wenigstens 15 min Bilder aufgenommen wurden. Hierbei wurde 30 s nach Beginn der Messung der Austausch des Mediums durch starten der Vorschubpumpe vorgenommen. Die Mikroskopschärfeneinstellung wurde während der gesamten Messung überwacht, um einen stark kontrastierten Zellrand sicher zu stellen und die Ergebnisse der nachfolgenden Auswertung zu verbessern.

Die so hergestellten Videos im AVI (*Audio Video Interleave*)-Dateiformat wurden über die Programme VirtualDub und IrfanView in das Multitiff-Format konvertiert. Die Bildauswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ, wobei die Querschnittsfläche jeder Einzelzelle im Bildstapel bestimmt wurde. Anschließend wurden die Einzelzellvolumen auf das isotone Zellvolumen normiert nach  $v = V/V_0$  um die relativen Zellvolumina zu errechnen. Die so erhaltenen Einzelzellwerte wurden gemittelt und im zeitlichen Verlauf (t) aufgetragen. Die Datenauswertung, statistische Berechnungen sowie graphische Darstellung der Werte erfolgten schließlich mit Hilfe von Origin. Der Berechnung des Zellvolumens wurde dabei eine kugelförmige Zellsymmetrie zugrunde gelegt.

## a) Volumetrie humaner und muriner Lymphozyten

Um die Beteiligung unterschiedlicher Kaliumkanäle an der hypotonen Volumenregulation in murinen und humanen Lymphozyten zu analysieren, wurden volumetrische Messung in mild hypotonem Volumetriemedium (200 mOsm PBS) unter Einwirkung eines spezifischen Kanalblockers durchgeführt. Als Kaliumkanalblockersubstanzen wurden dabei Anandamid, A293, Bupivacain, Quinidin, Rutheniumrot, Spermin, *Stichodactyla helianthus* Toxin (ShK) und TRAM34 verwendet (siehe Abbildung 7).

**Abbildung 7 Chemische Strukturen der eingesetzten Kaliumkanalblocker**

Die in dieser Arbeit verwendete Kaliumkanalblocker Anandamid, A293, Bupivacain, Quinidin, Spermin, Rutheniumrot, ShK (*Proteinstruktur nach Fogh et al. 1990 [81]*) und TRAM34.

Die verwendeten Kaliumkanalblocker mit dem zu inhibierenden Zielkanal und den entsprechenden Referenzen sind in Tabelle 18 aufgelistet. Bei den Untersuchungen der humanen Lymphozyten entspricht dabei die mittlere Blockerkonzentration meist der in der Literatur angegebenen Konzentration für die spezifische Inhibition des entsprechenden Kaliumkanals. Bei den höheren Blockerkonzentrationen ist für die Blocker Anandamid, A293, Bupivacaine und Quinidin eine Inhibition zusätzlicher Kanäle (eingeklammerte Kanalbezeichnungen in Tabelle 18) nachgewiesen.

**Tabelle 18 Kaliumkanalblocker und deren eingesetzter Konzentration**

| <b>Blocker</b> | <b>Konzentration,<br/>murin</b> | <b>Konzentration,<br/>human</b> | <b>Zielkanal</b>   | <b>Referenz</b> |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|--|-----------------|
| Anandamid      | -                               | 3, 30, 100 $\mu$ M              | <b>K<sub>2P</sub>3.1</b> (K <sub>2P</sub> 9.1)             | [82–84]         |
| A293           | -                               | 1, 3, 10 $\mu$ M                | <b>K<sub>2P</sub>3.1</b> (K <sub>2P</sub> 9.1)             | [85]            |
| Bupivacain     | -                               | 3, 30, 300 $\mu$ M              | <b>K<sub>2P</sub>18.1</b><br>(K <sub>2P</sub> 3.1/5.1/9.1) | [44,86–88]      |
| Quinidin       | 20 $\mu$ M                      | 2, 20, 100 $\mu$ M              | <b>K<sub>2P</sub>5.1 und K<sub>2P</sub>18.1</b>            | [43,89]         |
| Rutheniumrot   | -                               | 10, 100, 1000 $\mu$ M           | <b>K<sub>2P</sub>9.1</b>                                   | [90,91]         |
| Spermin        | 500 $\mu$ M                     | 100, 500, 1000 $\mu$ M          | <b>K<sub>2P</sub>9.1</b>                                   | [90]            |
| ShK            | 10 nM                           | 1, 10, 100 nM                   | <b>K<sub>V</sub>1.3</b>                                    | [92–94]         |
| TRAM34         | 100 nM                          | -                               | <b>IK<sub>Ca</sub>1</b>                                    | [95]            |

Vor der Messung wurden jeweils 500  $\mu$ L Zellsuspension ( $\sim 2 \cdot 10^5$  Zellen/mL) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit entsprechendem Kaliumkanalblocker versetzt und die Zellsuspension anschließend in die Volumetriekammer eingespritzt. Auf der Deckglasseite wurde die Volumetriekammer  $\sim 15$  min inkubiert, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen und die Messung (siehe oben) durchgeführt.

### Auswertung der volumetrischen Daten

Für die Quantifizierung der Kaliumkanalblockerwirkung auf das hypotone Volumenregulationsverhalten humaner Lymphozyten wurde die RVD inhibierende Fähigkeit ( $IC_{RVD}$ ) der Blocker nach der Gleichung

$$IC_{RVD} = \left(1 - \frac{v_2 - v_{end}}{v_2 - v_{end}^{contr}}\right) * 100 \quad (3)$$

berechnet. Hierbei entspricht  $v_2$  dem normalisierten Zellvolumen am maximalen Schwellwert 2-3 min nach Applikation des hypotonen Stresses (siehe Abbildung 16),  $v_{end}$  dem normalisierten Zellvolumen am Ende der Messung (gemittelt zwischen 17-20 min) und  $v_{end}^{contr}$  dem normalisierten Zellvolumen der unbehandelten Kontrollmessung. Ein  $IC_{RVD}$ -Wert von 0 würde demnach erreicht, wenn Zellen in Anwesenheit eines Kaliumkanalblockers in der Lage waren ihr Zellvolumen vergleichbar zu den Kontrollzellen zu regulieren. Im Gegensatz dazu bedeutete ein  $IC_{RVD}$ -Wert von 100%, dass ein Kaliumkanalblocker die Volumenregulation der Zellen vollständig inhibierte.

Desweiteren wurde für die Analyse der Membranpermeabilitätskoeffizienten für Wasser und gelöste Teilchen der murinen transgenen Lymphozyten die volumetrischen Ergebnisse mit Hilfe des Osmoregulationsmodells nach Lúcio *et al.* 2003 [96] angepasst. Hiernach lässt sich das Zellvolumen  $V(t)$  als Funktion der Zeit  $t$  vereinfacht über die Gleichung (3) beschreiben als

$$V(t) = Ae^{-t/\tau_1} - Be^{-t/\tau_2} + V_R \quad (4)$$

wobei  $A = \frac{(V_0 - V_b)\Delta\phi_0}{\phi_e}$ ,  $B = \frac{(V_0 - V_b)\Delta\phi_0}{\phi_e} + (V_R - V_0)$ ,  $\tau_1 = \frac{\rho_w(V_0 - V_b)}{P_w A_0 \phi_e}$  und  $\tau_2 = \frac{\phi_e V_0}{\alpha A_0}$ . Hierbei entspricht  $V_0$  dem isotonen Ausgangsvolumen der Zellen,  $V_b$  dem isotonen nicht-osmotischen Zellvolumen (isoton = 330 mOsm), der Term  $\Delta\phi_0$  der Osmolalitätsdifferenz zwischen intra- und extrazellulär,  $\phi_e$  der extrazellulären Osmolalität,  $A_0$  der Gesamtmembranfläche der Zelle, sowie  $V_R$  dem Gleichgewichtsendvolumen nach osmotischer Volumenauslenkung und RVD. Die Größe  $A_0$  wurde dabei als konstant während der Volumenregulation angenommen und nach  $A_0 = 4\pi r_0^2$  unter Annahme von Kugelsymmetrie mit Hilfe des optisch bestimmten Zellradius  $r$  bestimmt.

Darüber hinaus beschreiben die Zeitkonstanten  $\tau_1$  das initiale osmotische Zellschwellen in der Wasserphase und  $\tau_2$  die zelluläre Osmolytfreisetzung während der hypotonen Volumenregulation, wobei  $\rho_w$  dabei der molaren Wasserkonzentration ( $1/18 \text{ mol cm}^{-3}$ ),  $P_w$  der osmotischen

Wasserpermeabilität der Zellmembran [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ] und  $\alpha$  der schwellungsaktivierten Teilchenpermeabilität [ $\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ] entspricht.

Das Modell nach Lúcio enthält demnach die unbekanntenen Größen  $V_b$ ,  $P_w$ ,  $\alpha$  und  $V_R$ . Um die Anzahl der unbekanntenen Parameter zu reduzieren, wurde das isotone nicht-osmotische Zellvolumen  $V_b$  mit Hilfe der Boyle van't Hoff-Gleichung

$$v_2 = \frac{\varphi_{iso}}{\varphi} (1 - b) + b \quad (5)$$

bestimmt. Hierbei wurden die experimentell ermittelten maximalen Zellschwellwerte während der Wasserphase  $v_2$  (siehe Abbildung 11) gegen die reziproke normalisierte Osmolalität  $\frac{\varphi_{iso}}{\varphi}$  aufgetragen. Aus dem y-Achsenschnittpunkt bei 330 mOsm der hieraus resultierenden Ausgleichsgeraden wurde schließlich das isotone nicht-osmotische Zellvolumen  $V_b$  über den Zusammenhang  $b = \frac{V_b}{V_0}$  bestimmt.

Analog zur Datenauswertung humaner Lymphozyten (siehe oben) wurde die Quantifizierung der Kaliumkanalblockerwirkung auf das hypotone Volumenregulationsverhalten muriner Lymphozyten über die Berechnung der RVD-Inhibitionswerte ( $IC_{RVD}$ ) vorgenommen. Aufgrund der nahezu vollständigen Volumenregulation innerhalb von 12 min wurde hier die Gleichung

$$IC_{RVD} = \left( \frac{v_{12} - v_0}{v_2 - v_0} \right) * 100\% \quad (6)$$

verwendet, wobei  $v_0=1$  als relatives isotones Volumen angenommen wurde. Darüber hinaus entspricht  $v_2$  dem relativen Zellvolumen 2 min nach hypotonem Stress und  $v_{12}$  dem entsprechenden Volumen nach 12 min.

## b) Volumetrische Untersuchung zur Charakterisierung des hypotonen Transports organischer Osmolyte

Die Analyse der hypotonen Taurin- oder myo-Inositol-Freisetzung in HEK293 und Jurkat-Zellen erfolgte durch die volumetrische Bestimmung der Membranpermeabilitätskoeffizienten für beide SOO-Vertreter während der hypotonen Volumenregulation. Hierbei wurde zum einen (a) der osmotische Schwellwert bestimmt, der die hypotone SOO-Permeabilität aktiviert, zum anderen wurde (b) die Dauer des hypoton induzierten Transports der organischen Osmolyte nach hypotonem Stress analysiert. In Übereinstimmung mit der angenommenen Bidirektionalität des Transports von SOOs [2,14,53,59,97,98] wurde in beiden experimentellen Ansätzen zur Bestimmung der Membranpermeabilitätskoeffizienten der physiologische Konzentrationsgradient jeweils für Taurin oder myo-Inositol invertiert.

Experimentell wurden dabei folgende Ansätze verfolgt:

- (a) Zur Bestimmung des osmotischen Schwellwerts wurden die HEK293 und Jurkat Zellen unter variablen osmotischen Bedingungen mit Taurin oder myo-Inositol im VolumetriemEDIUM konfrontiert. Hierbei wurde 100 - 300 mOsm StandardvolumetriemEDIUM verwendet, welches mit 87-287 mM Taurin oder myo-Inositol versetzt war.
- (b) Die Dauer der hypoton induzierten Membranpermeabilität für SOOs nach hypotonem Stress wurde ermittelt, indem HEK293-Zellen zunächst mit 100 mOsm Saccharosehaltigem StandardvolumetriemEDIUM konfrontiert wurden. In diesem Medium sind die Zellen in der Lage RVD zu vollziehen und innerhalb von 30 min ihr isotones Ausgangsvolumen wiederherzustellen. Durch Substitution des 100 mOsm Saccharosehaltigem StandardvolumetriemEDIUM durch äquiosmolares StandardvolumetriemEDIUM mit Taurin oder myo-Inositol zu unterschiedlichen Zeitpunkten (7 - 85 min nach dem initialen hypotonen Stress) wurde den Zellen dann SOOs angeboten. Der Mediaustausch erfolgte bei den Messungen mit myo-Inositol jeweils 7, 20, 25, 30, 35, und 40 min und mit Taurin 7, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 75 und 85 min nach dem initialen hypotonen Stress.

In beiden experimentellen Ansätzen resultierte eine hypotone Aktivierung des SOO-Transports durch den darauf folgenden Einstrom der organischen Osmolyte in die Zellen in einer sekundären Zellvolumenzunahme. Aus den (a) maximalen sekundären Schwellwerten in einem Zeitintervall zwischen 10 und 20 min nach Applikation des hypotonen Stresses oder (b) mittleren sekundären Schwellwerten in einem Zeitintervall von 15 min nach der extrazellulären Verfügbarkeit von Taurin oder myo-Inositol unter hypotonen Bedingungen wurde anschließend der Membranpermeabilitätskoeffizient  $P$  für Taurin oder myo-Inositol bestimmt (siehe Ergebnis).

### c) Bestimmung der Größenselektivität von Transportwegen für organische Osmolyte

In einem ähnlich aufgebauten experimentellen Ansatz erfolgte die Bestimmung der Porengröße schwellungsaktivierter Transportwege für organische Osmolyte über die Analyse der Membranpermeabilität für Polyethylenglykole (PEG) unterschiedlicher Polymerlängen (200 - 1500). Dabei wurden Jurkat-Lymphozyten in wässrigen PEG-Lösungen der Osmolalitäten 100, 200 und 300 mOsm (siehe Material) über einen Zeitraum von 25 min volumetrisch vermessen (siehe oben). Die von Martin Kiesel vorgenommenen Volumetrie-Messungen der PEGs 200-600 wurden hierbei in dieser Arbeit um die volumetrischen Messungen mit den PEGs 1000 und 1500 erweitert.

Die Permeabilisierung der Membran für die untersuchten PEGs führte dabei zu einem konzentrationsgerichteten zellulären Einstrom der Polymere, was ein sekundäres Zellschwellen verursachte. Durch die Analyse der Volumen-Endwerte (~25 min nach Messbeginn) und der Berücksichtigung der experimentell bestimmten hydrodynamischen Radien der verwendeten PEGs erfolgte die Determination der Porengröße schwellungsaktivierter Transportwege für organische Osmolyte (siehe Ergebnis).

Die hydrodynamischen Radien der PEGs 200-1500 wurden dabei von Martin Kiesel im Verlauf seiner Dissertation über Kugelfallviskosimetrie ermittelt [67]. Hierzu wurden wässrige Lösungen der PEGs in einem Konzentrationsbereich von 25 mM bis 300 mM hergestellt. Die dynamische Viskosität  $\eta$  [mPa s] dieser Lösungen wurde schließlich mit Hilfe des Kugelfallviskosimeters PAA AMV 200 (Anton Paar AG, Graz, Österreich) bestimmt. Durch lineare Regression der gegen die molare Konzentration aufgetragenen viskosimetrischen Daten wurden aus der ermittelten Geradensteigung  $m$  mit der Gleichung

$$R_h = \sqrt[3]{\frac{3 m}{10 \pi \eta_0 N_a}}$$

die hydrodynamischen Radien der unterschiedlichen PEGs ermittelt. In dieser Gleichung wird neben der Geradensteigung zudem die Wasserviskosität  $\eta_0$  und die Avogadro-Zahl  $N_a$  berücksichtigt. Die so ermittelten hydrodynamischen Radien der PEGs sind in Tabelle 19 zusammengestellt.

**Tabelle 19 Hydrodynamische Radien von Polyethylenglykolen unterschiedlicher Polymerlängen**

| PEG-Größe                    | 200  | 300  | 400  | 600  | 1000 | 1500 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Hydrodynamischer Radius [nm] | 0,57 | 0,65 | 0,70 | 0,84 | 1,15 | 1,41 |



### 3.3 Mikrobiologische Methoden

#### 3.3.1 Anzucht und Stammhaltung

Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm XL1 Blue wurde in LB-Medium oder auf festen LB-Agar-Platten über Nacht bei 37 °C angezogen. Zur Anzucht des untransformierten Stammes wurde das Nährstoffmedium mit 12.5 µg/mL Tetracyclin versetzt, während bei Transformationen das durch die plasmidkodierte Resistenz vorbestimmte Antibiotikum (siehe Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Basisvektoren) verwendet wurde.

Für eine Übernachtkultur (ÜNK) wurden ~5 mL LB-Medium mit zugesetztem Antibiotikum in einem sterilem 10 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flachröhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) vorgelegt. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurde das Medium mit dem transformierten oder untransformierten Bakterienstamm entweder aus einem Glycerinstock (s. u.) oder von einer LB-Agarplatte beimpft. Die Flüssigkultur wurde daraufhin über Nacht schüttelnd (etwa 220 bis 300 Upm) im temperierten Inkubator angezogen. Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen hergestellt, indem eine Übernachtkultur im Verhältnis 1:1 mit sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren wurde.

#### 3.3.2 Bestimmung des Bakterienwachstums

Die Bakteriendichte wurde mittels eines Photometers über die optische Dichte (OD) bestimmt. Dabei wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (OD<sub>600</sub>), wobei reines LB-Medium als Referenz diente.

#### 3.3.3 Herstellung kompetenter Zellen

Um den Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue kompetent für die Aufnahme von exogener Plasmid-DNA zu machen, wurde die Methode nach Chung *et al.* 1989 [99] verwendet, bei der die Bakterien durch divalente Kationen (Magnesiumionen) und langkettigen Polyethylenglykol-Verbindungen chemisch zur DNA-Aufnahme befähigt werden. Hierzu wurden 200 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) mit einer *E. coli* XL1 Blue ÜNK im Verhältnis 1:40 beimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C geschüttelt (OD<sub>600</sub> ~0.3-0.4). Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei 4 °C gekühlt, pelletiert (10 min, 2500 x g, 4 °C), in 1/30 bis 1/40 des Ausgangsvolumens in TSS-Medium (siehe Material) aufgenommen und in Aliquote zu 100 µL in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.4 Transformation

Für die Transformation wurden 100 µL kompetente XL1 Blue-Zellen 10 min auf Eis aufgetaut, mit ~10 ng Plasmid-DNA oder mit 10 µL Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis gekühlt. Nach einem Hitzeschock (30 s, 42 °C) wurden die Zellen erneut 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien mit 900 µL LB versetzt und 30 min bei vermittelter Ampicillinresistenz bzw. 1 h bei vermittelter Kanamycinresistenz bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die transformierten Bakterien auf geeignete vorgewärmte LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgebracht und die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion [100] ist eine Methode zur gezielten *in vitro* Vervielfältigung (=amplifizieren) bestimmter DNA-Sequenzen. Ein DNA-Abschnitt wird dabei mit Hilfe einer DNA-Polymerase und zweier synthetisch hergestellter Oligonukleotide (Primer), die die gewünschte Sequenz flankieren, neu synthetisiert.

Die PCR wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für

- die Semi-Quantifizierung von RNA (semiquantitative RT-PCR)
- die Amplifikation von SLC5A3 und SLC6A6 zu Klonierungszwecken und
- den Nachweis und der Orientierungsüberprüfung von DNA-Fragmenten in einzelnen transformierten *E. coli*-Klonen (Kolonie-PCR) verwendet.

Sowohl für die semiquantitative RT-PCR wie auch für die Amplifikation von SLC5A3 und SLC6A6 zu Klonierungszwecken wurde die Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet. Im Gegensatz zu der bei Kolonie-PCRs verwendeten Taq-Polymerase, besitzt die Phusion-Polymerase eine Korrekturlesefunktion in Form einer 3' → 5' Exonukleaseaktivität. Darüber hinaus erzeugt die Taq-Polymerase einen 3'-Adenin-Überhang am synthetisierten DNA-Strang, wodurch eine *Blunt-End*-Ligation im hier verwendeten pJET1.2/Blunt-Vektor nicht möglich wäre.

Soweit nicht anders angegeben wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

|                   | Amplifikation           | Kolonie-PCR          |
|-------------------|-------------------------|----------------------|
| DNA-Template      | 10 – 100 ng DNA         | *)                   |
| Primer 1          | 0,25 $\mu$ M            | 0,25 $\mu$ M         |
| Primer 2          | 0,25 $\mu$ M            | 0,25 $\mu$ M         |
| dNTPs             | 0,25 mM                 | 0,25 mM              |
| Polymerase-Puffer | 20% (v/v) HF            | 10% (v/v) Taq-Puffer |
| DNA-Polymerase    | 0,05 u/ $\mu$ L Phusion | 0,08 u/ $\mu$ L Taq  |

\*) In einzelnen Kolonie-PCR-Ansätzen wurde als Template ein von festem LB-Agar gepickter Bakterienklon einer Transformation eingesetzt. Alle so gepickten Klone wurden auf einer neuen LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

Generell wurden polymerasenabhängig folgende Temperaturprotokolle verwendet:

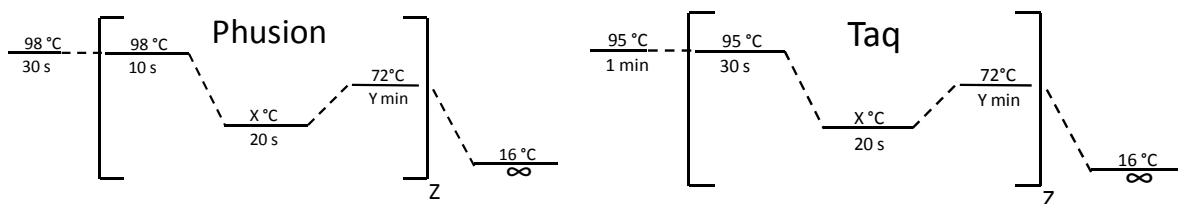


Abbildung 8 Für die PCR verwendete Temperaturprotokolle

Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert um die Polymerasenaktivität möglichst gering zu halten. Die Temperaturprotokolle variierten abhängig von der *Annealing*-Temperatur der Primer (= X-Variable in Abbildung 8), der verwendeten Polymerase und der zu erwartenden Produktlänge (= Y und Z-Variablen in Abbildung 8).

Die Primerpaar-*Annealing*-Temperaturen wurden experimentell mit Hilfe eines Temperaturgradientenprotokolls ermittelt oder den von Biomers mitgelieferten Datenblättern entnommen. Experimentell wurde die höchste *Annealing*-Temperatur als optimal bestimmt, bei der das verwendete Primerpaar ein möglichst spezifisches Produkt hervorbrachte. Die Analyse der PCR erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren im Agarosegel (s.u.).

### 3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Die Analyse bzw. die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der horizontalen zweidimensionalen Gelelektrophorese. Bei dieser Methode erfolgt die Größendiskriminierung von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten im elektrophoretischen Gleichstromfeld hauptsächlich durch die molekularen Siebeigenschaften von Agarosegelen. Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer aus den Phosphatresten resultierenden Ladung negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Dieser Effekt wird als Triebkraft in der Elektrophorese eingesetzt, um Nukleinsäuren durch das Agarosegel zu bewegen. Die Agarosekonzentration des Gels bestimmt dabei den Grad der Behinderung, den unterschiedlich große DNA-Moleküle bei ihrer Wanderung durch das Gel erfahren und somit das Auflösungsvermögen dieser Methode. In dieser Arbeit wurden 1%-ige Agarosegele verwendet, die mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 10 mg/mL) versetzt waren. Als Laufpuffer wurde eine einfach konzentrierte Natriumborat-Pufferlösung [101] verwendet.

Zur Beladung des Gels wurden die DNA-Proben mit 6-fach konzentriertem OrangeG-haltigem Probenpuffer versetzt. Zur späteren Größenordnung der Fragmente wurden 3  $\mu$ L eines Größenstandards aufgebracht. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung bei ca. 10-15 V/cm wurde das Gel schließlich mit Hilfe der Geldokumentation unter UV-Licht fotografiert und bei Bedarf Banden zur weiteren Aufreinigung unter 50% reduzierter UV-Beleuchtung aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen).

### 3.4.3 DNA-Sequenzierung

Die genaue Bestimmung der DNA-Sequenzen von Inserts im Klonierungsvektor pJET1.2/-blunt oder in pEGFP-N1 erfolgte über die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* 1977 [102]. Bei dieser Methode werden im PCR-Ansatz zusätzlich zu den Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs) fluoreszenzmarkierte Di-Desoxyribonukleosid-triphosphate (ddNTPs) verwendet. Hierbei handelt es sich um dNTPs deren 3'OH-Gruppe fehlt, wodurch sie in der folgenden PCR als Elongationsterminatoren wirken. Durch den Einsatz vier verschiedener fluoreszenzmarkierter ddNTPs resultieren unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren terminales Ende jeweils mit einem anderen Fluorochrome versehen ist. In der anschließenden Sequenzierung kann die Basenabfolge des DNA-Matrixstranges daraus rekonstruiert werden. Hierfür werden die DNA-Fragmente zunächst ihrer Größe nach aufgetrennt (Kapillarelektrophorese) und anschließend mittels Laserlichtanregung und Detektion die Farbzunordnung der unterschiedlich langen Fragmente erreicht.

Die Sequenzierungen in dieser Arbeit wurde von der Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Für die anschließende Auswertung der Sequenzdaten wurde die Software VectorNTI und Bioedit verwendet.

### 3.4.4 Semiquantitative RT-PCR

Die Semi-Quantifizierung der Genexpression von SLC5A3 und SLC6A6 erfolgte mit Hilfe der semiquantitativen Reverse-Transkriptase (RT-) PCR. Bei dieser Methode wird zunächst die Gesamt-mRNA der Zellen unter geeigneten experimentellen Bedingungen extrahiert, die mRNA in DNA transkribiert (= reverse Transkription) und schließlich mit Hilfe genspezifischer Primer die zu untersuchenden Gene hieraus amplifiziert. Die Technik der semiquantitativen PCR beruht auf der Quantifizierung der zu untersuchenden Gene zur Basis eines im Idealfall unveränderlichen konstitutiv exprimierten Haushaltsgens. In dieser Arbeit wurde die Normalisierung analog zu anderen Studien [103,104,104,105] zur Basis von  $\beta$ -Aktin vorgenommen. Für dieses Gen wurde bereits nachgewiesen, dass die mRNA-Menge bei hypotonem Stress leicht zunimmt [106], wodurch die hier ermittelten semiquantitativen Ergebnisse tendenziell unterschätzt werden, was jedoch die qualitative Aussage nicht verändert. Die Semi-Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Produktbandenintensität im Agarosegel, wobei als interner Standard die Produktbandenintensität des  $\beta$ -Aktins als Beladungsschlüssel verwendet wurde.

#### 3.4.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA aus isoton bzw. hypoton vorinkubierten Jurkat, HepG2 und HEK293-Zellen erfolgte nach Chomczynski und Sacchi [107] durch phenolische Extraktion. Hierzu wurde das Reagenz peqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) verwendet. Aufgrund dem krebserzeugendem Verdacht phenolischer Verbindungen, wurden sämtliche Arbeiten unter dem Abzug durchgeführt.

Die adhären Zellen HepG2 und Hek293 wurden zuvor in einer 6-Well Multititerplatte ausgesät ( $2 \cdot 10^5$  Zellen je experimenteller Bedingung und Well) und bis zur Konfluenz von 80-90% kultiviert. Vor der RNA-Extraktion wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitdauern (10, 20 bzw. 30 min jeweils) mit 100 mOsm Bedingungen konfrontiert. Die hypotone Stimulation erfolgte durch Substitution des CGMs durch 100 mOsm Zellkulturmedium (3 mL je Well), welches durch die Verdünnung des jeweiligen Zellkulturmediums mit entsprechendem Volumen sterilem ddH<sub>2</sub>O hergestellt wurde. Die Osmolalität der hypotonen Medien wurde entsprechend am Osmometer eingestellt. Zellen der Suspensionslinie Jurkat ( $4 \cdot 10^6$  Zellen je experimenteller Bedingung) wurden vor der hypotonen Stimulation sedimentiert (200 rcf, 5 min, 21 °C) und die Zellpellets anschließend in hypotonem Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert. Nach der entsprechenden hypotonen Inkubationszeit (10, 20 bzw. 30 min) wurde das hypotone Medium verworfen, wobei Jurkat Zellen erneut sedimentiert wurden (200 rcf, 5 min, 4 °C). Alle isotonen Kontrollen wurden 30 min in isotonem CGM bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die RNA der Zellen zu extrahieren wurde nach Herstellerangaben 1 mL TriFast je Zelllinie und experimenteller Bedingung zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Chloroform, 30 s Schütteln und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bildeten sich durch anschließende Zentrifugation (12.000 x g, 22 °C) zwei Phasen aus. Die wässrige Phase (obere) wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die hierin enthaltene RNA durch Zugabe von 600  $\mu\text{L}$  Isopropanol und 15 minütiger Inkubation auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet zweimal mit 450  $\mu\text{L}$  eisgekühltem 75% (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich im offenen Gefäß getrocknet. Schließlich wurde das RNA-Pellet in 20  $\mu\text{L}$  nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm an einem Nanophotometer (Implen, München, Deutschland) zur Nullwertreferenz des zur Elution verwendeten ddH<sub>2</sub>O. Desweiteren wurde die Absorptionen bei den Wellenlängen 230 nm (organische Lösungsmittel/Peptidbindung) und 260 nm (aromatische Verbindungen) analysiert, die auf eventuelle Verunreinigungen hindeuten können. Der gemessene Absorptionsquotient zwischen den Werten bei 260 nm und 280 nm lag bei allen verwendeten RNA-Proben zwischen 1,7 und 2,0. Zuletzt wurde der RNA 1.5  $\mu\text{L}$  RiboLock (RNase-Inhibitor; 40 u/ $\mu\text{L}$ ) zugesetzt. Die so hergestellte RNA wurde direkt als Template für die cDNA-Synthese eingesetzt und parallel bei -80 °C gelagert.

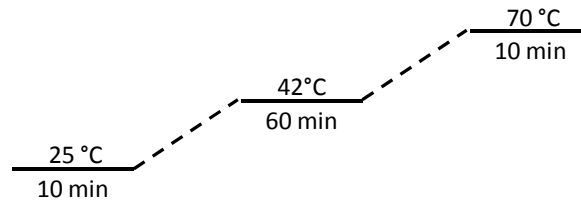
#### 3.4.4.2 Reverse Transkription

Die Herstellung von cDNA (*complementary DNA*) ist für die Amplifikation von Genen aus RNA unablässig und wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in einer sog. Reversen Transkription katalysiert. Hierin verwendet die Reverse Transkriptase (hier: RevertAid) RNA als *Template* und setzt dieses in cDNA um. Hierzu benötigt sie als Primer sog. randomisierte Hexanukleotide, mit deren Hilfe alle RNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben werden können.

Folgender 20  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz wurde dabei verwendet:

|                      |  |
|----------------------|--|
| 1 $\mu\text{g}$      | RNA                                    |
| 25 ng/ $\mu\text{L}$ | randomisierte Hexanukleotide (Promega) |
| 0,5 mM               | dNTPs (Fermentas)                      |
| 20 % (v/v)           | 5 x RT-Puffer (Fermentas)              |
| 1 u/ $\mu\text{L}$   | RiboLock (Fermentas)                   |
| 200 u                | RevertAid (Fermentas)                  |

Die Gesamt-mRNA wurde zuerst mit ddH<sub>2</sub>O bei 70 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und die cDNA-Synthese zu verbessern. Anschließend wurden der Puffer sowie die Reverse Transkriptase zugesetzt und die Reaktion mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:



**Abbildung 9** Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese

Die so hergestellte cDNA wurde daraufhin direkt als *Template* in PCR-Ansätzen verwendet.

#### 3.4.4.3 Semiquantitative PCR

Für die Amplifikation der Gene SLC5A3, SLC6A6 und  $\beta$ -Aktin aus der frisch hergestellten cDNA (jeweils isoton bzw. 10, 20 oder 30 min hypoton) wurde folgender Ansatz verwendet:

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| Template          | 5 ng/ $\mu$ L cDNA      |
| Primer 1          | 0,25 $\mu$ M            |
| Primer 2          | 0,25 $\mu$ M            |
| dNTPs             | 0,25 mM                 |
| Polymerase-Puffer | 20% (v/v) HF            |
| DNA-Polymerase    | 0,05 u/ $\mu$ L Phusion |

Um die gleiche cDNA-Menge in allen PCR-Ansätzen sicherzustellen, wurde stets ein Mastermix bestehend aus cDNA (isoton bzw. 10, 20 oder 30 min hypoton), ddH<sub>2</sub>O, dNTPs, Polymerase-Puffer und DNA-Polymerase verwendet. Dieser Mastermix wurde aliquotiert und schließlich mit den entsprechenden Primerpaaren versetzt. Die Zyklenanzahl für die jeweilige semiquantitative PCR-Reaktion wurde zuvor einmalig experimentell bestimmt. Dabei wurde die Zyklenanzahl als optimal bestimmt, bei der sich die Amplifikation im exponentiellen Zuwachsbereich befindet. Die PCR-Reaktion erfolgte schließlich wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

Die Analyse der semiquantitativen PCR erfolgte im 1%-igen Agarosegel (siehe Kapitel 3.4.2) wobei die Expression von SLC5A3 und SLC6A6 zur Basis des  $\beta$ -Aktin-Expressionsniveaus erfolgte. Die Bandenintensität wurde mit Hilfe von ImageJ ermittelt und anschließend relativ zur isotonen Kontrolle berechnet.

### 3.4.5 Rekombinante Herstellung von SLC5A3-pEGFPN1

#### 3.4.5.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion einer SLC5A3-DNA-Bande aus dem Agarosegel zu Klonierungszwecken erfolgte mit Hilfe des Kits Qiaex II (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Im zugrundeliegenden Prinzip nach Vogelstein und Gillespie [108] wird das Agarosegelstück zunächst in geeignetem Puffer aufgelöst, die enthaltene DNA an Silikapartikel gebunden und nach mehreren Waschschritten die DNA von den Silikapartikel mit nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration und die Sauberkeit der so extrahierte DNA wurde schließlich bestimmt und diese bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.5.2 Klonierung von DNA

Zur Klonierung des DNA-Fragmentes SLC5A3 aus der Gelextraktion wurde das Clone Jet-Kit (Fermentas) gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Das Kit besteht aus den für den Ligationsansatz benötigten Reagenzien sowie dem Klonierungsvektor pJET1.2/blunt in bereits linearisierter Form. Das Insert wurde bei Verwendung dieses Kits mit sog. *blunt-ends* (glatte Enden) in den Vektor pJET1.2/blunt ligiert. Nach erfolgreicher Ligation wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert und am darauf folgenden Tag gewachsene Klone mit Hilfe einer Kolonie-PCR analysiert. Potentiell richtige Klone wurden jeweils in einer Übernachtskultur angezogen, deren Plasmide extrahiert und schließlich sequenziert.

#### 3.4.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe der Kits NucleoSpin (Macherey-Nagel) oder dem Plasmid Mega Kit (QIAGEN), in welchem die Plasmidextraktion mit Hilfe der alkalischen Lyse nach Birnboim [109] erfolgt. Dabei wird die bakterielle Zellwand zunächst destabilisiert (z.B. EDTA) und anschließend die Bakterien mittels NaOH und Detergenzien wie SDS (Natriumdodecylsulfat) lysiert. Durch die Neutralisation mit Na<sup>+</sup>-/ oder K<sup>+</sup>-Acetat bilden Proteine, chromosomale DNA und verbleibende Zelltrümmer mit SDS einen Komplex, während die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt. Durch Zentrifugation werden daraufhin alle höhermolekularen Bestandteile als Salzkomplexpräzipitate abgetrennt. Anders als im ursprünglichen Protokoll nach Birnboim wird in kommerziellen Kits die Plasmid-DNA schließlich an eine Silikasäule gebunden, mit ethanolischem Puffer gewaschen und mit ddH<sub>2</sub>O eluiert.



Zur Präparation der Plasmid-DNA mit dem Kit NucleoSpin (Macherey-Nagel) im kleinen Maßstab (MiniPräp) wurden 3-7 mL Bakterienübernachtskultur pelletiert (5 min, 2.000 x g, 22 °C), nach Herstellerangaben aufgearbeitet und schließlich mit 30-50 µL ddH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA-Extraktion im großen Maßstab erfolgte analog mit dem Plasmid Mega Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben, wobei 500 mL Bakterienübernachtskultur verwendet wurden. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte schließlich mit 500 µL ddH<sub>2</sub>O in zwei Schritten.

Im Anschluss an die Plasmidpräparationen erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsmessung bei 260 nm an einem Nanophotometer (Implen, München, Deutschland) (siehe 3.4.4.1 Isolierung von RNA). Als Nullwertreferenz diente dabei das zur Elution verwendete ddH<sub>2</sub>O. Die Lagerung der so hergestellten Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

#### 3.4.5.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme (oder Restriktionsendonukleasen) sind Enzyme, die ursprünglich nativ von Bakterien synthetisiert wurden, um Fremd-DNA (z.B. Phagen-DNA) zu schneiden (= verdauen). Das Restriktionsenzym erkennt dabei eine bestimmte DNA-Basenfolge als Erkennungssequenz (meist Palindrome) und schneidet an vorgegebener Stelle. Die so entstandenen Schnittstellen können Restriktionsenzym-abhängig entweder glatt (*blunt*) oder mit Einzelstrang-Basenüberhängen versehen sein (*sticky*).

Zur Klonierung des pEGFP-N1-SLC5A3-Vektors wurde das Restriktionsenzy BamHI (*sticky*) eingesetzt. Dieses Enzym wurde sowohl zur Linearisierung des Expressionsvektors pEGFP-N1 als auch für die Extraktion des SLC5A3-Inserts aus dem Klonierungsvektor pJET1.2/blunt verwendet. Um das Gen SLC5A3 aus dem Vektor pJET1.2/blunt schneiden zu können, wurde bei der Amplifikation des Insert SLC5A3 aus cDNA Primer verwendet, die die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI als flankierende Bereiche vermitteln.

Es wurde folgender Ansatz (20 µL) verwendet:

- 10 % (v/v) Restriktionsenzym-Puffer (10x)
- 10 u Restriktionsenzym (10 u/µL)
- 1 µg Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau wurde bei 37 °C etwa 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 65 °C) beendet. Anschließend wurde der Verdau-Ansatz über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe Kapitel 3.4.2) und die benötigten DNA-Banden hieraus extrahiert (siehe Kapitel 3.4.5.1).

### 3.4.5.6 Ligation

Bei der Ligrationsreaktion verbindet das Enzym T4-Ligase unter ATP-Verbrauch zwei DNA-Stränge unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung kovalent. Hierbei wird das 3' Hydroxy-Ende des einen Stranges mit dem 5' Phosphatende des anderen verbunden.

Die Ligationen in dieser Arbeit wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei das Insert zu Vektor-Verhältnis bei ~3:1 lag. Der Reaktionsansatz wurde entweder für 5 min bis zu 1h bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend zur Transformation von kompetenten *E. coli*-XL1-Blue-Zellen verwendet (siehe 3.3.4 Transformation).

## 3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Fluoreszenzmarkierung des membranassoziierten SLC5A3-Transporters unter iso- und hypotonen Bedingungen für die dSTORM-Analyse wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung des nativ-exprimierten SLC5A3-Proteins unter weitestgehend nicht-permeabilisierenden Bedingungen durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst  $5 \cdot 10^4$  HEK293 oder Jurkat-Zellen je Well eines mit Poly-D-Lysin-beschichteten 8-Well Lab-Tek II-Deckglases ausgesät. Um die Oberflächenproteine der adhärenen HEK293-Zellen bestmöglich zu erhalten, wurde beim Ablösen der Zellen vom Substrat auf Trypsin verzichtet. Die Zellen wurden daher durch mehrfaches Aufklopfen der Kulturflasche auf den Tisch und abspülen mit frischem Medium in Suspension gebracht. Im mit Poly-D-Lysin-beschichteten Lab-Tek wurden die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert, um Zelladhäsion zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit einfach konzentriertem PBS gewaschen.

Entsprechend den experimentellen Bedingungen für die dSTORM-Analyse erfolgte der hypotone Stress der Zellen, indem das PBS durch 100 mOsm myo-Inositolhaltiges StandardvolumetriemEDIUM (siehe Material) ersetzt wurde. Die Kontrollzellen wurden in PBS belassen. Nach entsprechender Inkubationszeit (isoton = 10 min, hypoton = 10 und 20 min) erfolgte die Fixierung der Zellen für 30 min bei Raumtemperatur durch Zugabe von 4% (v/v) Formaldehyd (Sigma) direkt in das auf den Zellen befindliche Medium. Die so fixierten Zellen wurden daraufhin dreimal mit PBS gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit 5% (w/v) BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde das SLC5A3-Protein mit Hilfe des monoklonalen primären Antikörpers SAB1402920 (Sigma) 1:500 verdünnt in 5% (w/v) BSA in PBS über 30 min bei Raumtemperatur markiert. Dieser Antikörper wurde verwendet, da er nach der Vorhersage der Proteinstruktur nach Kwon [104] ein extrazelluläres Epitop erkennt und damit membranassoziiertes SLC5A3-Protein markiert. Nach

erneutem dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Fluoreszenzmarkierung über 20 min bei Raumtemperatur mit Hilfe dem AlexaFluor 647-konjugierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des Ziege-Anti-Maus-IgGs (A-21237, Invitrogen), welcher 1:200 in 5% (w/v) BSA in PBS verdünnt wurde. Um den Fluoreszenzhintergrund bzw. die Spezifität des sekundären Antikörpers zu analysieren, wurde als Negativkontrolle eine isotone Zellprobe lediglich mit dem sekundären Antikörper gefärbt. Nach erneutem gründlichem Waschen der Zellen (4x PBS) erfolgte zuletzt eine Nachfixierung der Zellen zur Immobilisierung der Antikörper. Hierzu wurden die Zellen für 10 min in 4% (v/v) Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur inkubiert.

Da eine molekularbiologische Analyse des hier verwendeten primären Antikörpers SAB1402920 (z.B. mittels Westernblot) aufgrund mangelnder Löslichkeit des SLC5A3-Proteins nicht möglich war, wurde die Spezifität des Antikörpers mit Hilfe einer vergleichenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse überprüft (siehe unten). Hierzu wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung an SLC5A3-EGFP exprimierenden HEK293-Zellen mit Hilfe eines AlexaFluor 568 gekoppelten sekundären Antikörpers durchgeführt EGFP-Signal mit dem Fluoreszenzsignal des immunmarkierten SLC5A3-AlexaFluor 568 verglichen. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen dazu auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesät und mit dem Vektor SLC5A3-pEGFPN1 transfiziert (Polyethylenimin). Nach 24 h erfolgte im Anschluss an einem PBS-Waschschritt die Fixierung der Zellen mit 4% (v/v) Formaldehyd in PBS über 10 min bei Raumtemperatur. Die fixierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe einer 0,1%igen (v/v PBS) Triton-X 100-Lösung für 5 min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden unspezifische Epitope geblockt (5% (w/v) BSA in PBS, 30 min, RT) und die Zellen mit dem primären Antikörper SAB1402920 (Sigma, Klon 3A6, Maus) 1:500 verdünnt in 5% (w/v) BSA in PBS 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (AlexaFluor 568-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des Ziege-Anti-Maus-IgGs, A-11019, Invitrogen) 1:200 verdünnt in 5% (w/v) BSA in PBS fluoreszenzmarkiert. Zuletzt erfolgte nach gründlichem Waschen der Zellen mit PBS die Nachfixierung (10 min; 4% (v/v) Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur).

## 3.6 Mikroskopische Methoden

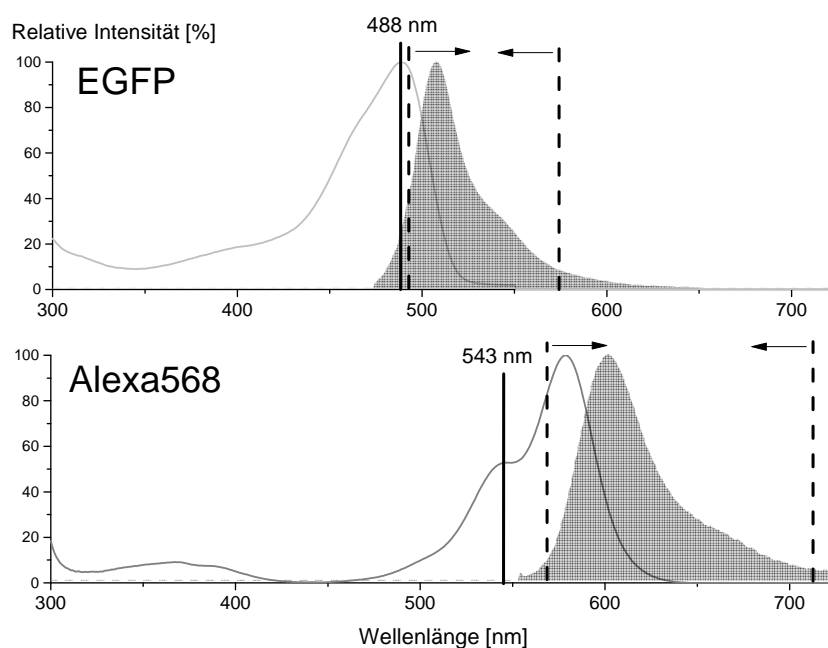
### 3.6.1 Konfokale Lasermikroskopie

Die Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP sowie zur Spezifität des primären anti-SLC5A3-Antikörpers erfolgten mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops LSM 710 (Zeiss, Jena, Deutschland). Dieses war mit einem Plan-Apochromat

63x/NA1.40 Öl-Immersionsobjektiv sowie einem für diese Versuche relevanten Argon- (488 nm) und Helium/Neon-Laser (543 nm) ausgestattet. Für Fluoreszenzaufnahmen wurde typischerweise eine Laserintensität von 1,25 - 3,75 mW (Argon) bzw. 0,25 - 0,75 mW (Helium/Neon) verwendet (entspricht etwa ~5 - 15% der maximalen Laserstärke). Die Mikroskopsteuerung wurde mit Hilfe der dafür vorgesehenen Software Zen (Zeiss) übernommen.

Für die Distributionsuntersuchung des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP in HEK-Zellen wurden diese zuvor in die mikrofluidischen Kanäle einer  $\mu$ -slide-Kammer (ibidi) ausgesät und mit Hilfe von FugeneHD mit dem in dieser Arbeit klonierten Vektor pEGFP-N1-SLC5A3 transfiziert. 30 h nach Transfektion der Zellen erfolgte die lasermikroskopische Untersuchung unter isotonen (CGM) und hypotonen (100 mOsm myo-Inositol Standardvolumetriemedium) Bedingungen. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer *Pinhole*weite von 49  $\mu$ m 40 konfokale Schnittebenen durch die Zellen aufgenommen, wobei die Schnitte in Z-Dimension 0,43-0,44  $\mu$ m entfernt waren. EGFP wurde bei 488 nm angeregt und das EGFP-Emissionssignal in einem Wellenlängenbereich von 493-539 nm gefiltert. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden optische Schnitte einer vergleichbaren Z-Position verwendet und die Fluoreszenzintensität mit Hilfe der Software ImageJ (Grauwertanalyse mittels der *plot profile*-Funktion) quantifiziert.

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Beurteilung der Spezifität des primären Antikörpers anti-SLC5A3 wurde das Fluoreszenzsignal von EGFP und AlexaFluor 568 von SLC5A3-EGFP-exprimierenden und immunfluoreszenzmarkierten HEK293-Zellen aufgenommen (siehe 3.5 Immunfluoreszenzfärbung). Dabei wurden mit einer *Pinhole*weite von 50  $\mu$ m etwa 25 konfokale Schnitte durch die Zellen angefertigt, die eine Schnittweite in Z-Dimension von 0,25  $\mu$ m hatten. Sowohl die Unterschiede im Absorptions- und Emissionsspektrum beider Fluorophore (Abbildung 10) sowie die abwechselnde und separate Aufnahme des EGFP- und AlexaFluor 568-Signals erlaubten eine überlagerungsfreie Trennung der Fluoreszenzsignale.



**Abbildung 10 Fluoreszenzspektren von EGFP und AlexaFluor 568**

Darstellung des Absorptions- und Emissionsspektrums der Fluorophore EGFP und AlexaFluor 568. Die durchgezogenen Linien stellen dabei das Absorptions- und die gestrichelte Linie oberhalb der gefüllten Fläche das Emissionsspektrum der entsprechenden Fluorophore dar. Die durchgezogene vertikale Linie entspricht dabei der für die LSM-Versuche eingesetzten Anregungswellenlänge und die und die gestrichelte Linien den Fluoreszenzemissionsfiltergrenzen.

EGFP wurde hierbei bei einer Wellenlänge von 488 nm und AlexaFluor 568 bei 543 nm angeregt. Die Emissionsfiltergrenzen für EGFP lagen dabei zwischen 492–574 nm und für AlexaFluor 568 zwischen 568–712 nm. Zur Reduktion des Fluoreszenzhintergrunds wurde darüber hinaus die Mittelung des Signals von zwei Scanvorgängen pro konfokale Ebene vorgenommen.

#### 3.6.2 dSTORM

Um nativ exprimiertes SLC5A3-Protein in der Plasmamembran von HEK293 und Jurkat-Zellen unter isotonen und hypotonen Bedingungen zu quantifizieren, wurde die hochaufgelöste Mikroskopietechnik *d*STORM (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*) [110,111] verwendet. Diese Technik ermöglicht eine präzise Lokalisation einzelner Fluorophore mit einer (an der Halbwertsbreite der Lokalisationsverteilung gemessenen (FWHM; *Full Width at Half Maximum*)) lateralen Präzision von bis zu ~20 nm [112].

Wird eine fluoreszierende Zellprobe mit Hilfe einer geeigneten Lichtquelle angeregt, so emittieren typischerweise nahezu alle Fluorophore einer Probe gleichzeitig. Ist der Abstand der fluoreszierenden Moleküle zueinander dabei geringer als die halbe Wellenlänge des eingestrahlt Lichts ( $\lambda/2$ ), so können die Emissionen der einzelnen Fluorophore nach der Abbe'schen Gleichung nicht mehr voneinander getrennt wahrgenommen werden. Dieser als räumliche Beugungsgrenze bezeichnete Zusammenhang limitiert die herkömmliche Lichtmikroskopie auf eine laterale Auflösung von etwa 200–300 nm. Da somit eine räumliche Trennung der Fluoreszenzsignale unmöglich ist, erfolgt bei der *d*STORM-Technik die hochaufgelöste Lokalisation individueller fluoreszierender Moleküle zeitdifferenziert. Dies bedeutet, dass in der Probe die Mehrzahl der fluoreszierenden Moleküle nicht – und nur eine sehr geringe Anzahl – leuchten darf. Erreicht wird dies, indem zur Fluoreszenzmarkierung sog. photoschaltbare Farbstoffe eingesetzt werden, die unter bestimmten chemischen Bedingungen und unter Anregung hoher Laserleistungsdichten stochastisch an- und ausgeschaltet werden (= blinken) [110]. Das Photoschalten der Farbstoffe basiert darauf, dass diese in Anwesenheit von Thiolverbindungen (hier:  $\beta$ -Mercaptoethylamin; MEA) nach Fluoreszenzanregung reduziert werden und dabei in einen langlebigen (über mehrere Sekunden) nicht-fluoreszierenden Zustand überführt werden.

Die Rückführung in den fluoreszierenden Zustand erfolgt meist über die Oxidation der Farbstoffe mit Sauerstoff, welcher daher in nur sehr geringen Mengen vorhanden sein darf. Daher erfolgt die Elimination von Sauerstoff im verwendeten Schaltpuffer über Zugabe eines Sauerstoff-entziehenden Systems aus Glukose und dem Enzym Glukoseoxidase. Von diesen blinkenden Farbstoffmolekülen wird nun eine Bilderserie aufgenommen und anschließend in jeder Einzelaufnahme dieser Bilderserie die Positionen der hierin leuchtenden Moleküle sehr präzise bestimmt. Die exakte Ortsbestimmung der blinkenden Fluorophore in dem jeweiligen Bild wird mithilfe der in unserem Lehrstuhl entwickelten Software *rapid*dSTORM durchgeführt [77,113].

Diese hochpräzise Lokalisation wird erreicht, indem das Fluoreszenzzentrum einer Einzellokalisation über die Anpassung der Punktabbildungsfunktion mit Hilfe einer Gaußfunktion ermittelt wird. Nachdem so die Positionen der einzelnen fluoreszierenden Moleküle bestimmt wurden, kann aus den Einzelmoleküllokalisationen ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert werden.

Für die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals membranassoziierter SLC5A3-Transporter unter isotonen und hypotonen Bedingungen wurden HEK293 und Jurkat-Zellen verwendet. Die Fluoreszenzmarkierung des nativen SLC5A3-Proteins erfolgte an einem extrazellulären Epitop über eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung unter weitestgehend nicht-permeabilisierenden Bedingungen (siehe 3.5 Immunfluoreszenzfärbung). Das SLC5A3-Protein wurde dabei mit dem photoschaltbaren Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 647 markiert. Das reversible Photoschalten des Farbstoffs wurde in einem Schaltpuffer bestehend aus 100 mM MEA (Sigma) in PBS (pH 7.4–8.0 mit KOH) erreicht, wobei als Sauerstofffänger-System 5-10 u/mL Glucoseoxidase (Sigma), ~120 u/mL Katalase (Sigma) und 4% (w/v) Glucose zugesetzt waren [110]. Direkt vor der *d*STORM-Messung wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und 500  $\mu$ L/Well des frisch hergestellten Schaltpuffer auf die Zellen gegeben.

Der *d*STORM-Aufbau bestand dabei aus einem inversen Olympus-Mikroskop (Olympus IX-71), welches mit einem 60-fach Öl-Immersionsobjektiv (NA 1,49) ausgerüstet war. Für die Anregung von AlexaFluor 647 bei 639 nm wurde ein Genesis MX 639-1000STM-Laser (Coherent, Santa Clara, USA) in den Strahlengang des Mikroskops mit Hilfe eines Strahlenteilers (FF425/532/656-Di01, Semrock, Rochester, USA) eingekoppelt. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren und weitestgehend plasmamembrannahen Zellbereiche zu analysieren wurde das Fluoreszenzanregungslicht schräg in die Probe eingestrahlt (sog. *highly inclined illumination*-Modus). Das von den Proben emittierte Licht wurde über das Objektiv durch zwei Bandpassfilter (FF01-697/75 und EM01-R442/514/647, Semrock, Rochester, USA) geleitet und über eine EMCCD-Kamera (iXon Ultra 897; Andor, Belfast, UK) aufgenommen. Bei konstanter Anregungsintensität von 1-5  $\text{kWcm}^{-2}$  und einer Belichtungszeit von meist 15 ms wurden so 15.000 Einzelbilder mit einer Bildrate von ~65 Hz angefertigt.

Die Datenauswertung und Bildrekonstruktion erfolgte schließlich mit der Software *rapid*STORM 3.2 [77,113]. Dabei wurden lediglich fluoreszierende Moleküle berücksichtigt, die mehr als 769 Photonen emittierten. Über die Analyse der Punktspreizfunktion wurden darüber hinaus Multi-Fluorophore-Ereignisse erkannt (Gauss-Anpassung zweier direkt benachbarter Fluorophore, [113]) und verworfen. Die Anzahl der zellulären AlexaFluor 647-Einzellokalisationen wurde ermittelt, indem die Lokalisationswerte aus *rapid*STORM (*density map*-Funktion) unter Berücksichtigung der durch das Durchlichtbild bestimmten Zellränder aufsummiert wurden. Die durchschnittliche Anzahl an Zelllokalisationen wurde schließlich aus der Mittelung von 8-16 Einzelzelllokalisationen einer jeden Zelllinie und osmotischer Versuchsbedingung errechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Volumenregulatorische Beteiligung der Zwei-Poren Domänen $K^+$ -Kanäle ( $K_{2P}$ ) in T-Lymphozyten

Die hypotone Volumenregulation von Lymphozyten basiert unter mild hypotonen Bedingungen (zwischen ~300-200 mOsm) maßgeblich auf der schwellungsaktivierten Freisetzung von  $K^+$  und  $Cl^-$  [16]. Der Efflux von Kaliumionen erfolgt in murinen und humanen Lymphozyten hierbei über ein teilweise redundantes Netzwerk von unterschiedlichen (und meist noch nicht vollständig identifizierten) Kaliumkanälen [6]. Nach den bisherigen Modellen zur Volumenregulation von Lymphozyten soll der spannungsabhängige  $K_v1.3$  und der  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $IK_{Ca1}$ -Kanal maßgeblich am RVD von Lymphozyten beteiligt sein [28,36,114].

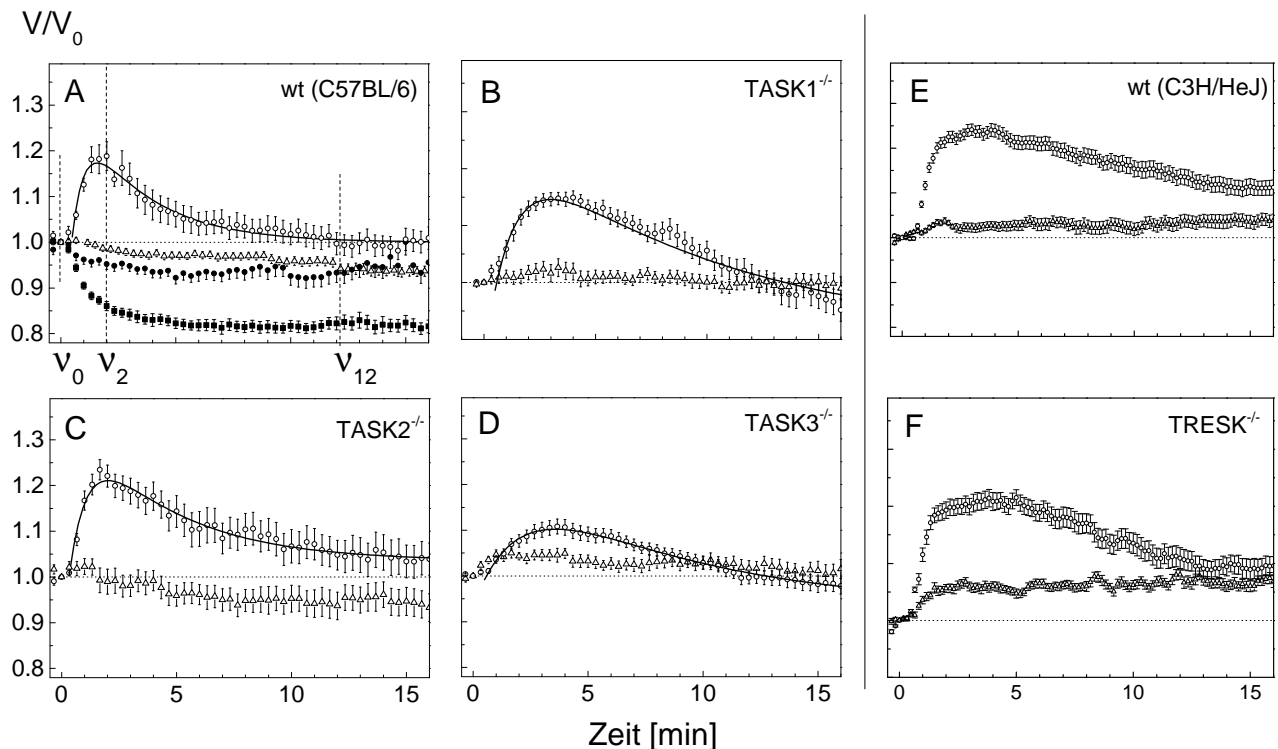
Zur Aufklärung der Bedeutung der kürzlich entdeckten Zwei-Poren Domänen  $K^+$ -Kanäle ( $K_{2P}$ ; TASK1, TASK2, TASK3 und TRESK) am RVD von Lymphozyten wurde das Volumenregulationsverhalten von  $CD4^+$ -Zellen mit Hilfe volumetrischer Messungen untersucht. Da T-Zellen aus unterschiedlichen Spezies eine deutlich voneinander abweichende Kaliumkanalexpression aufweisen [115] wurden für die Analysen sowohl a) murine und b) humane  $CD4^+$ -T-Lymphozyten verwendet. Im murinen System wurde dabei ein kombinierter genetischer und pharmakologischer Versuchsansatz verfolgt, während für humane Lymphozyten ein pharmakologischer Ansatz unter Berücksichtigung des Aktivierungsstatus der Zellen untersucht wurde.

#### a) murine $CD4^+$ -Lymphozyten

Im ersten Teil dieser Analyse wurde das Volumenregulationsverhalten von Lymphozyten aus wildtypischen und homozygoten  $K_{2P}$ -*knockout* Mäusen ( $TASK1/2/3^{-/-}$  und  $TRESK^{-/-}$ ) in PBS-Lösungen unterschiedlicher Osmolalitäten verglichen. Die  $TASK1/2/3^{-/-}$  mutierten Mäuse waren dabei auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6-Mäusen (Abbildung 11, A-D) und die  $TRESK^{-/-}$  -Mutanten auf C3H/HeJ Mäusen (Abbildung 11, E-F) gezüchtet (siehe Material).

Werden  $CD4^+$ -Lymphozyten aus wildtypischen C57/BL6 Mäusen mit isotonem PBS (330 mOsm) konfrontiert (Abbildung 11, A, ungefüllte Dreiecke), dann ist eine leichte aber konstante Volumenreduktion der Zellen über den gesamten Messzeitraum zu beobachten. Innerhalb von 15-20 min schrumpfen die Zellen durch den Verlust intrazellulärer Osmolyte um ~5%. Im Gegensatz dazu weisen  $CD4^+$ -Zellen aus wildtypischen C3H/HeJ Mäusen (Abbildung 11, E, ungefüllte

Dreiecke) unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen durch die mutmaßliche Aufnahme von extrazellulärem NaCl aus dem Medium eine schwache Volumenzunahme von ~5% auf.



**Abbildung 11 Isotones und anisotones Volumenverhalten muriner CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten aus wildtypischen und K<sub>2P</sub>-Knockout Mäusen.**

Die Änderungen des normalisierten Zellvolumens ( $v=V/V_0$ ) von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten aus wildtypischen (A+E) und K<sub>2P</sub>-Knockout-Mäusen (B= TASK1<sup>-/-</sup>; C= TASK2<sup>-/-</sup>; D= TASK3<sup>-/-</sup>; F=TRESK<sup>-/-</sup>) unter hypertonen (400 gefüllte Kreise, 450 mOsm, gefüllte Vierecke), isotonen (330 mOsm, Dreiecke) und mild hypotonen (200 mOsm PBS, Kreise) Bedingungen sind im zeitlichen Verlauf dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ( $\pm$ SE) von bis zu 47 relativen Einzelzellvolumina (siehe Tabelle 20) aus 2-4 unabhängigen Messungen. Alle Zellen wurden zunächst in isotonem CGM (330 mOsm) inkubiert. Nach 30 s erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das isotone CGM durch 450, 400, 330 oder 200 mOsm PBS ersetzt wurde. Hypotone Bedingungen verursachten innerhalb von 2-3 min osmotisches Zellschwellen, wobei das Volumen der Lymphozyten im Vergleich zum isotonen Ausgangsvolumen um 10-25 % zunahm. Anschließend erfolgte entweder ein vollständiger oder partieller RVD der Zellen, wobei die Regulation des Zellvolumens auf das annähernde Ausgangsniveau zu beobachten war. Das normalisierte Zellvolumen 2 bzw. 12 min nach hypotoner Exposition entspricht dabei v2 bzw. v12. Isotone Bedingungen verursachten hingegen nur langsame und geringe Volumenauslenkungen der Zellen, wobei das relative Zellvolumen entweder nahezu konstant blieb (B, D, E), leicht ab- (A, C) oder zunahm (F). Hypertone Bedingungen (nur A gezeigt) führten dagegen innerhalb von 2-3 min zu einer schnellen Reduktion des Zellvolumens und stagnierte anschließend auf einem konstanten Niveau. Mit Hilfe des Lúcio-Models wurden die hypotonen Werte angepasst (Erläuterungen siehe Text).

Vergleicht man die isotonen volumetrischen Ergebnisse der TASK<sup>-/-</sup> Mutanten mit der entsprechenden wildtypischen C57/BL6-Kontrolle (Abbildung 11, A-D), dann zeigt sich bei den transgenen Lymphozyten ein fehlendes oder geringer ausgeprägtes isotones Zellschrumpfen. Dieser schwächere Volumenverlust der Zellen unter isotonen Bedingungen weist auf einen grundlegend verringerten zytosolischen Elektrolytabfluss über die Membran hin. Die TRESK<sup>-/-</sup> - Zellen hingegen weisen im Vergleich zu ihrer wildtypischen Kontrolle eine höhere



Volumenzunahme auf, die jedoch ebenfalls auf den geringeren Verlust (bei gleichbleibend starker Elektrolytaufnahme) hindeutet.

Im Gegensatz zu isotonen Bedingungen ist im Anschluss an die Konfrontation von wildtypischen Lymphozyten mit mild hypotonen Bedingungen von 200 mOsm (Abbildung 11, A+E) innerhalb von 2-3 min ein schneller osmotisch getriebener Wassereinstrom (= initiales Zellschwellen) zu beobachten. Das relative Zellvolumen ( $v=V/V_0$ ) steigt dabei vom isotonen Ausgangswert  $v_0 = 1$  auf den maximalen Volumenwert von  $v_2 \approx 1,2$ .

Nach dem initiellen Zellschwellen ist die Rückregulation des Zellvolumens zu beobachten (RVD, Abbildung 11). Durch den maßgeblichen Efflux von KCl stellen die Lymphozyten aus wildtypischen C57BL/6-Mäusen (Abbildung 11, A) innerhalb von  $\sim 12$  min nahezu ihr isotones Ausgangsvolumen wieder her ( $v_{12} \approx 1$ ). Das Zeitintervall von 12 min wurde daher als Referenz verwendet, um die RVD inhibierende Fähigkeit ( $IC_{RVD}$ ) des Mutationsstatus und der eingesetzten Kaliumkanalblocker durch die Berechnung der  $IC_{RVD}$ -Werte mit Hilfe der Gleichung (6) (siehe Methoden, Kapitel 3.2.1) zu berechnen (Werte in Tabelle 20).

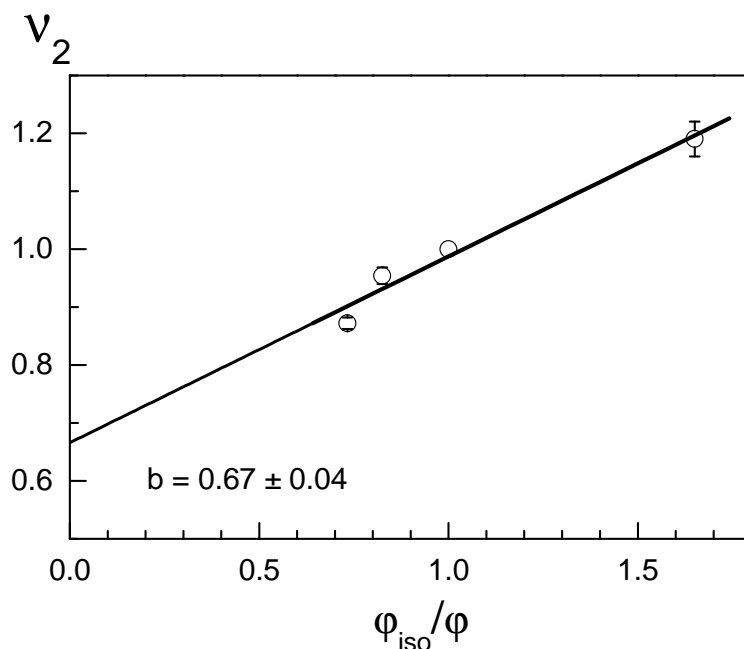
Vergleicht man die hypotone Volumenregulation von wildtypischen mit transgenen Zellen (Abbildung 11), dann erscheint der genetische *Knockout* der Kaliumkanäle TASK1 (Abbildung 11, B), TASK2 (Abbildung 11, C), TASK3 (Abbildung 11, D) und TRESK (Abbildung 11, F) nur einen geringen Effekt auf den RVD der Lymphozyten zu haben. Die transgenen Lymphozyten waren unabhängig ihres genetischen Status weitestgehend zum Erreichen des dem Wildtyp entsprechenden isotonen Endvolumens fähig (TASK1/2/3<sup>-/-</sup> = C57BL/6; TRESK<sup>-/-</sup> = C3H/HeJ). Auch beim Vergleich der errechneten  $IC_{RVD}$ -Daten zwischen wildtypischen mit transgenen Zellen (Tabelle 20) sind nur geringe Unterschiede zu erkennen. Lediglich bei TASK2<sup>-/-</sup>-Lymphozyten ist eine um  $\sim 13\%$  geringere Volumenregulationsfähigkeit verglichen mit der wildtypischen Kontrolle zu erkennen.

Im Gegensatz zum Volumenregulationsverhalten unter hypotonen Bedingungen sind murine CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, wie in Abbildung 11, A zu erkennen, unter hypertonen Bedingungen zu keiner Volumenregulation fähig [114,116]. Werden sie mit hypertonen Bedingungen von 400 (Abbildung 11, A, gefüllte Kreise) oder 450 mOsm (Abbildung 11, A, gefüllte Vierecke) konfrontiert, dann schrumpfen die Zellen zunächst innerhalb von 2-3 min. Anschließend verbleibt das relative Zellvolumen auf einem konstanten Niveau, ohne erkennbarem RVI.

Zur detaillierteren Analyse des RVD von wildtypischen und transgenen Lymphozyten wurden die Membranpermeabilitätskoeffizienten für Wasser ( $P_w$ ) und gelöste Teilchen ( $\alpha$ ) mit Hilfe des Osmoregulationsmodells nach Lúcio *et al.* 2003 [96] (siehe Methoden) bestimmt. Für die Berechnung der Permeabilitätswerte über dieses Modell musste hierfür zunächst das isotone nicht-osmotische Zellvolumen ( $v_b$ ) von murinen CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten bestimmt werden. Beim nicht-osmotische Zellvolumen handelt es sich um den Zellvolumenanteil, der sich nicht an

osmotischen Volumenänderungen beteiligt und daher keinen Beitrag zur effektiven Volumenänderung leistet.

Mit Hilfe der Boyle van't Hoff-Gleichung wurden die experimentell ermittelten  $v_2$ -Volumenwerte der Lymphozyten aus wildtypischen C57/BL6 Mäusen (Abbildung 11, A) in unterschiedlichen Osmolaritäten (200-450 mOsm) gegen die reziproke normalisierte Osmolarität  $\phi_{\text{iso}}/\phi$  aufgetragen und linear angepasst (siehe Methoden). Aus dem y-Achsenabschnitt der extrapolierten Ausgleichsgeraden (b) konnte für murine  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten ein nicht-osmotische Zellvolumen ( $v_b$ ) über den Zusammenhang  $b = v_b/v_0$  von  $67 \pm 4\%$  bestimmt werden (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12 Boyle van't Hoff Plot muriner wildtypischer  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten**

Jeder Datenpunkt entspricht dem relativen Zellvolumen ( $\pm \text{SE}$ ) am maximalen Schwellwert 2 min nach hypotoner Exposition der Zellen ( $v_2$ ), wie in Abbildung 11 definiert. Die experimentell ermittelten  $v_2$ -Werte sind dabei gegen die reziproke normalisierte Osmolarität ( $\phi_{\text{iso}}/\phi$ , wobei  $\phi_{\text{iso}} = 330 \text{ mOsm}$  des äußeren Mediums (450-200 mOsm PBS) aufgetragen. Die Linie repräsentiert die lineare Regression der Werte mit Hilfe der Boyle van't Hoff-Gleichung (siehe Methoden). Durch die Extrapolation der Regressionsgeraden wurde das nicht-osmotische Volumen (b) über den y-Achsenabschnitt auf  $b = 67 \pm 4\%$  des Zellvolumens bestimmt.

Anschließend wurde unter Berücksichtigung des isotonen nicht-osmotischen Zellvolumens die volumetrischen Daten über das Lucio-Osmoregulationsmodell angepasst (Kurven in Abbildung 11. Zusammen mit den experimentellen  $v_2$ ,  $v_{12}$  und den errechneten RVD-Inhibitionswerten ( $\text{IC}_{\text{RVD}}$ ; siehe Methoden) sind die bestimmten Permeabilitätskoeffizientenwerte  $P_w$  und  $\alpha$  für die untersuchten wildtypischen und transgenen  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten in Tabelle 20 dargestellt. Die hier bestimmten Werte des nicht-osmotischen Zellvolumens ( $b \approx 0,67$ ) und des Membranpermeabilitätskoeffizienten für Wasser ( $P_w \approx 1,6 \mu\text{m/s}$ ) unterscheiden sich deutlich von Literaturwerten muriner L2-T-Lymphozyten ( $b \approx 0,28$ ;  $P_w \approx 3,2 \mu\text{m/s}$  [114]). Diese Abweichungen lassen sich zum einen durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen und zum anderen durch die Berücksichtigung unterschiedlicher Modelle als Grundlage der Datenanalyse zurückführen.

Verglichen mit der wildtypischen Kontrolle (Abbildung 11, A+B) weisen  $\text{TASK1}^{-/-}$ -Zellen unter mild hypotonen Bedingungen ein geringeres initiales osmotisches Zellschwellen und eine

verlangsamte RVD-Kinetik auf (Abbildung 11, A+B). Zieht man hierzu die ermittelten Permeabilitätswerte (Tabelle 20) in Betracht, dann besitzen die TASK1<sup>-/-</sup>-Zellen unter den TASK-*Knockouts* die geringste Wasserpermeabilität von  $\sim 0,46 \mu\text{m/s}$  und im Bezug zur wildtypischen CD4<sup>+</sup>-Kontrolle ( $\sim 0,82 \text{ nmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ) eine um etwa 50% reduzierte Teilchenpermeabilität ( $\sim 0,41 \text{ nmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ).

**Tabelle 20 Einfluss des K<sub>2P</sub>-Knockout Status auf die osmoregulatorischen Eigenschaften von murinen CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten**

| Status               | $v_2 \pm \text{SE}$ | $v_{12} \pm \text{SE}$ | $\text{IC}_{\text{RVD}} \pm \text{SE}$<br>[%] | $P_{\text{W}} \pm \text{SE}$<br>[ $\mu\text{m/s}$ ] | $\alpha \pm \text{SE}$<br>[ $\text{nmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ] | Zellzahl |
|----------------------|---------------------|------------------------|---|---|--|----------|
| wt (C57BL/6)         | $1.19 \pm 0.03$     | $1.00 \pm 0.02$        | $0 \pm 8$                                     | $1.59 \pm 0.13$                                     | $0.82 \pm 0.05$  | 38       |
| TASK1 <sup>-/-</sup> | $1.15 \pm 0.01$     | $1.00 \pm 0.01$        | $0 \pm 7$                                     | $0.46 \pm 0.08$                                     | $0.41 \pm 0.04$  | 13       |
| TASK2 <sup>-/-</sup> | $1.16 \pm 0.02$     | $1.02 \pm 0.01$        | $13 \pm 6$                                    | $0.59 \pm 0.07$                                     | $0.60 \pm 0.04$  | 38       |
| TASK3 <sup>-/-</sup> | $1.11 \pm 0.01$     | $1.00 \pm 0.01$        | $0 \pm 9$                                     | $0.66 \pm 0.03$                                     | $0.24 \pm 0.01$  | 28       |
| wt (C3H/HeJ)         | $1.24 \pm 0.01$     | $1.13 \pm 0.02$        | $52 \pm 7$                                    | $0.34 \pm 0.01$                                     | $0.61 \pm 0.01$  | 47       |
| TRESK <sup>-/-</sup> | $1.22 \pm 0.01$     | $1.10 \pm 0.02$        | $46 \pm 9$                                    | $0.37 \pm 0.01$                                     | $0.48 \pm 0.01$  | 40       |

$v_2, v_{12}$  = relatives Zellvolumen nach 2 bzw. 12 min

$\text{IC}_{\text{RVD}}$  = RVD inhibierender Effekt

$P_{\text{W}}, \alpha$  = Membranpermeabilitätskoeffizienten für Wasser bzw. gelöste Teilchen

Wie TASK1<sup>-/-</sup>-Zellen weisen TASK2<sup>-/-</sup>-Lymphozyten eine deutlich verlangsamte RVD-Kinetik auf, allerdings ist das initiale Zellschwellen hier vergleichbar mit den Kontrollzellen (Abbildung 11, A+C). Im Gegensatz jedoch zur wildtypischen Kontrolle ist auch bei den TASK2<sup>-/-</sup>-Zellen die Wasser und Teilchenpermeabilität deutlich erniedrigt ( $P_{\text{W}} \approx 0,59 \mu\text{m/s}$ ;  $\alpha \approx 0,60 \text{ nmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ). Darüber hinaus ist bei TASK2<sup>-/-</sup>-Lymphozyten ein RVD-inhibierender Effekt ( $\text{IC}_{\text{RVD}} \approx 13\%$ ) zu erkennen, der bei anderen TASK<sup>-/-</sup>-Zellen nicht beobachtet wird.

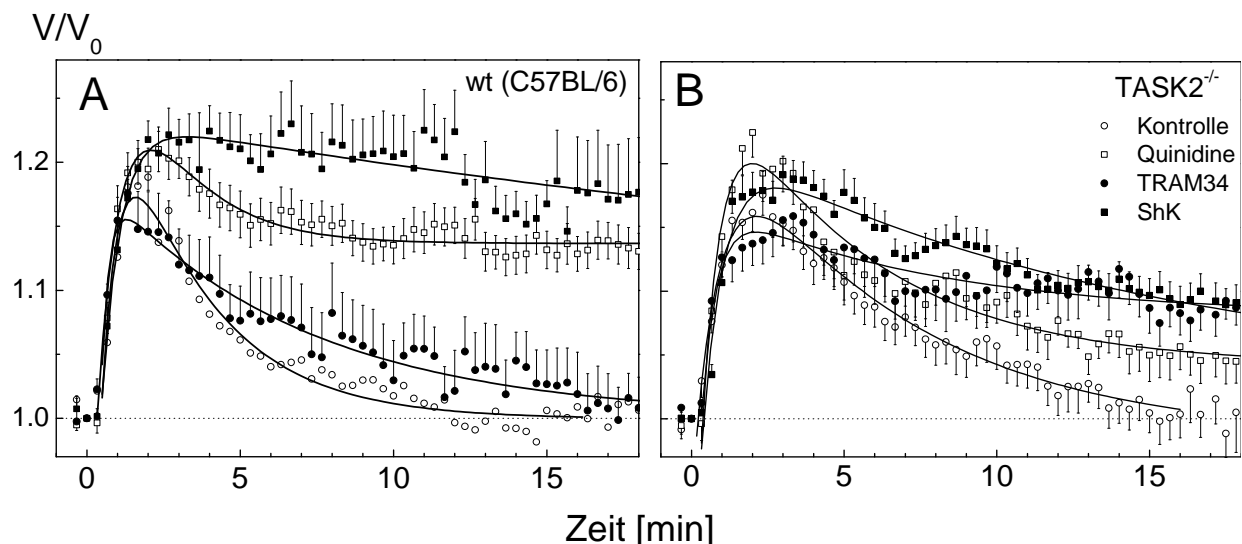
TASK3<sup>-/-</sup>-Zellen zeigen in hypotonem PBS das geringste initiale Zellschwellen ( $\sim 10\%$ ). Unter den K<sub>2P</sub>-*Knockout*-Zellen besitzen sie die höchste Wasserpermeabilität ( $P_{\text{W}} \approx 0,66 \mu\text{m/s}$ ), die jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen um etwa 50% geringer ist ( $P_{\text{W}} \approx 1,59 \mu\text{m/s}$ ). Darüber hinaus weisen die TASK3<sup>-/-</sup>-Zellen unter allen untersuchten wildtypischen und transgenen murinen Lymphozyten die geringste Teilchenpermeabilität von  $\alpha \approx 0,24 \text{ nmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  auf.

Im Gegensatz zu den TASK<sup>-/-</sup> mutanten Lymphozyten, die auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6-Mäusen gezüchtet wurden, zeigen TRESK<sup>-/-</sup>-Zellen (genetischer Hintergrund = C3H/HeJ Mäuse) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen kein deutlich abweichendes Volumenverhalten unter hypotonen Bedingungen. Die wildtypische Kontrolle und die TASK<sup>-/-</sup> mutierten Zellen weisen dabei annähernd gleiche Wasserpermeabilitätswerte auf (Wildtyp  $\approx 0,34 \mu\text{m/s}$ ; TRESK<sup>-/-</sup>  $\approx 0,37 \mu\text{m/s}$ ). Die in Relation zur entsprechenden Kontrolle um  $\sim 21\%$

geringere Teilchenpermeabilität der  $TRESK^{-/-}$  Lymphozyten ist darüber hinaus vergleichbar mit der Reduktion, die bei  $TASK^{-/-}$  beobachtet wurde.

Zusammenfassend zeigen die Werte in Tabelle 20, dass ein genetischer *Knockout* der untersuchten Kaliumkanäle durch die Beeinflussung der Wasser und Teilchenpermeabilität der Membran einen starken Effekt auf die Volumenregulationsfähigkeit der murinen  $CD4^{+}$ -Lymphozyten besitzt. Insbesondere die Teilchenpermeabilität wird durch den genetischen *Knockout* bei allen untersuchten Zellen reduziert und war unabhängig des betroffenen Kaliumkanals zwischen 2,5-3,5 geringer als bei den wildtypischen Kontrollzellen. Unter Berücksichtigung der hypotonen Teilchenpermeabilitäten ( $\alpha$ ) kann folgende Reihenfolge aufgestellt werden: Wildtyp (100%) >  $TRESK$  (~79%) >  $TASK2$  (~73%) >  $TASK1$  (~50%) >  $TASK3$  (~29%).

Im zweiten Teil der Untersuchung der  $K_{2P}$ -Kanalbeteiligung am RVD von murinen Lymphozyten wurde unter Einsatz der Kaliumkanalblocker Quinidin (Zielkanal:  $TASK2$ , auch  $TRESK$  und  $K_{V1.3}$ ),  $TRAM34$  (Zielkanal:  $IK_{Ca1}$ ) und  $ShK$  (Zielkanal:  $K_{V1.3}$ ) die Bedeutung der  $K_{2P}$  – Kanäle in Relation zu den bereits im RVD-Prozess identifizierten Kaliumkanälen  $K_{V1.3}$  und  $IK_{Ca1}$  untersucht. Diese pharmakologische Untersuchung wurde zum einen an wildtypischen und zum anderen an  $TASK2$ -*knockout* Lymphozyten durchgeführt. Die Kanalblocker wurden dabei in Konzentrationen eingesetzt, in denen eine inhibierende Wirkung hauptsächlich auf den Zielkanal aus elektrophysiologischen Studien bekannt ist (Referenzen in Tabelle 6). Die eingesetzten Konzentrationen waren dabei: Quinidin: 20  $\mu M$ ;  $ShK$ : 10 nM und  $TRAM34$ : 100 nM.



**Abbildung 13 Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die hypotone Volumenregulation von murinen  $CD4^{+}$  Lymphozyten aus wildtypischen und  $TASK2^{-/-}$  Mäusen**

Werden wildtypische (A) oder  $TASK2^{-/-}$  (B)-Lymphozyten mit 200 mOsm PBS konfrontiert (ungefüllte Kreise), dann regulieren sie innerhalb von 15 min annähernd ihr isotones Ausgangsvolumen zurück. Die Behandlung der Zellen mit 20  $\mu M$  Quinidin (ungefüllte Vierecke), 100 nM  $TRAM$  (gefüllte Kreise) oder 10 nM  $ShK$  (gefüllte Vierecke) inhibiert jedoch in beiden Zellproben die RVD-Fähigkeit der Zellen. Die Linien repräsentieren die Kurvenanpassungen mit Hilfe des Lúcio-Modells. Die RVD inhibierende Fähigkeit der Blocker wurde durch die Berechnung der  $IC_{RVD}$ -Werte aus den experimentell ermittelten  $v_2$  und  $v_{12}$ -Werte quantifiziert (Tabelle 21).

Wie in Abbildung 13, A zu erkennen, nehmen alle Kaliumkanalblocker einen inhibitorischen Einfluss auf das Volumenregulationsverhalten der wildtypischen Lymphozyten in 200 mOsm PBS. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit den  $K_{2P}^{-/-}$  mutanten  $CD4^{+}$  Lymphozyten (siehe oben) sind die Zellen durch die Inhibierung der unterschiedlichen Kaliumkanäle nicht in der Lage ihr isotones Ausgangsvolumen wiederherzustellen. Für die Auswertung der volumetrischen Ergebnisse wurde daher die RVD inhibierende Fähigkeit ( $IC_{RVD}$ ) der Blocker als Bewertungsgrundlage berechnet (siehe Methoden; Kapitel 3.2.1).

Vergleicht man die  $IC_{RVD}$ -Werte der unterschiedlichen Kaliumkanalblocker bei wildtypischen Lymphozyten (Tabelle 21), dann haben die Blocker ShK und Quinidin den stärksten inhibitorischen Effekt auf die hypotone Volumenregulation ( $\sim 77\%$  und  $\sim 75\%$ ). TRAM34 weist hierbei die geringste RVD-inhibierende Fähigkeit von  $\sim 6\%$  auf. Für den RVD der murinen wildtypischen  $CD4^{+}$ -Lymphozyten ergibt sich hieraus eine Relevanz der Kaliumkanäle von  $K_{V1.3} \approx TASK2(/TRESK) \gg IK_{Ca1}$ .

Im Gegensatz dazu verschiebt sich der inhibitorische Einfluss der Blocker, wenn *TASK2-knockout* Lymphozyten für die Analyse verwendet werden. Wie zu erwarten weist Quinidin, welches maßgeblich den *TASK2*-Kaliumkanal inhibiert, nun einen deutlich geringeren RVD-inhibitorischen Effekt von  $\sim 32\%$  auf. Während somit der inhibierende Effekt von Quinidin abnimmt, führt die Blockierung des  $IK_{Ca1}$ -Kanals durch TRAM34 zu einer Verzehnfachung der RVD inhibierenden Fähigkeit des Blockers im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle (von  $\sim 6\%$  auf  $\sim 60\%$ ). Dem gegenüber nimmt die Bedeutung des  $K_{V1.3}$  Kanals durch den genetischen *Knockout* des *TASK2*-Kanals leicht ab, da der RVD-inhibierende Effekt von 10 nM ShK um  $\sim 20\%$  in *TASK2*<sup>-/-</sup> - Zellen im Vergleich zur Kontrolle abnimmt.

**Tabelle 21 Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die osmoregulatorischen Eigenschaften von  $CD4^{+}$ -Lymphozyten aus wildtypischen und *TASK2*<sup>-/-</sup> Mäusen**

| Status                      | Behandlung           | Zielkanal  | $v_2 \pm SE$    | $v_{12} \pm SE$ | $IC_{RVD} \pm SE$<br>[%] | Zellzahl |
|-----------------------------|----------------------|------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------|
| wt (C57BL/6)                | -                    | -          | $1.19 \pm 0.03$ | $1.00 \pm 0.02$ | $0 \pm 8$                | 38       |
| wt (C57BL/6)                | 20 $\mu$ M Quinidine | TASK2      | $1.20 \pm 0.03$ | $1.15 \pm 0.02$ | $75 \pm 9$               | 40       |
| wt (C57BL/6)                | 100 nM TRAM34        | $IK_{Ca1}$ | $1.16 \pm 0.03$ | $1.01 \pm 0.04$ | $6 \pm 10$               | 17       |
| wt (C57BL/6)                | 10 nM ShK            | $K_{V1.3}$ | $1.22 \pm 0.02$ | $1.17 \pm 0.04$ | $77 \pm 11$              | 22       |
| <i>TASK2</i> <sup>-/-</sup> | -                    | -          | $1.16 \pm 0.02$ | $1.02 \pm 0.01$ | $13 \pm 6$               | 38       |
| <i>TASK2</i> <sup>-/-</sup> | 20 $\mu$ M Quinidine | TASK2      | $1.22 \pm 0.02$ | $1.07 \pm 0.02$ | $32 \pm 10$              | 20       |
| <i>TASK2</i> <sup>-/-</sup> | 100 nM TRAM34        | $IK_{Ca1}$ | $1.16 \pm 0.02$ | $1.10 \pm 0.02$ | $63 \pm 15$              | 27       |
| <i>TASK2</i> <sup>-/-</sup> | 10 nM ShK            | $K_{V1.3}$ | $1.18 \pm 0.01$ | $1.11 \pm 0.01$ | $61 \pm 7$               | 31       |

$v_2, v_{12}$  = relatives Zellvolumen nach 2 bzw. 12 min

$IC_{RVD}$  = RVD inhibierender Effekt

Insgesamt zeigen die genetischen und pharmakologischen Ergebnisse deutlich, dass Zwei-Poren Domänen  $K^+$ -Kanäle am RVD von murinen  $CD4^+$ -Lymphozyten beteiligt sind. In Relation zu den in bisherigen RVD-Modellen berücksichtigten Kanälen  $K_V1.3$  und  $IK_{Ca1}$ , steht die Bedeutung der  $K_{2P}$ -Kaliumkanäle TASK2 und TRESK für den Prozess der hypotonen Volumenregulation etwa auf gleicher Stufe mit  $K_V1.3$ . Desweiteren wird durch diese Ergebnisse verdeutlicht, dass Kaliumkanäle bei der Volumenregulation ein redundantes Netzwerk bilden, wobei das Ausfallen einzelner Kanäle für volumenregulatorische Aufgaben von anderen Kaliumkanälen kompensiert wird.

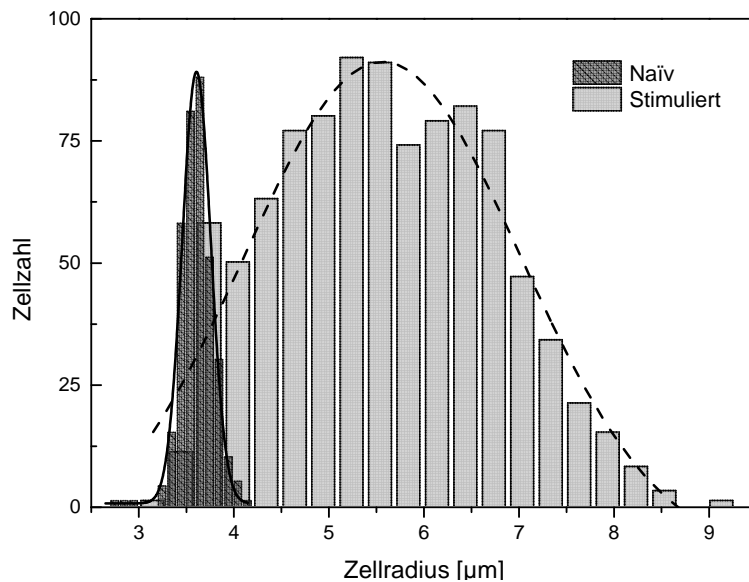
### b) humane $CD4^+$ -Lymphozyten

Da sich murine Analysen nur begrenzt mit Bedingungen in humanen Zellen vergleichen lassen [16], wurde eine ergänzende Untersuchung zur Beteiligung der  $K_{2P}$ -Kanäle TASK1, TASK2, TASK3 und TRESK am RVD humaner  $CD4^+$ -Lymphozyten durchgeführt. Auf Grund mangelnder etablierter genetischer Zellmodelle wurde hierfür ein rein pharmakologischer volumetrischer Versuchsansatz verfolgt. Dabei wurde das Volumenregulationsverhalten humaner  $CD4^+$ -Lymphozyten unter Einwirkung der Kaliumkanalblocker Anandamid, A293 (AVE), Rutheniumrot, Spermin, Quinidin, Bupivacain und ShK in 200 mOsm PBS-Lösung analysiert. Um konzentrationsabhängige Effekte der Blocker zu berücksichtigen, wurde jeder Blocker in drei Konzentrationen eingesetzt. Hierbei entsprach die mittlere Konzentration weitestgehend der in der Literatur angegebenen Blockerkonzentration zur spezifischen Inhibierung des Zielkanals.

Wie in neueren Studien gezeigt, wird das Expressionsprofil durch den T-Zell-Aktivierungsstatus beeinflusst. So wird beispielsweise der humane TASK2-Kanal durch die T-Zell-Stimulation verstärkt exprimiert [43,117]. Das aktivierungsabhängige Expressionsprofil der Kaliumkanäle in T-Zellen könnte somit Einfluss auf die relative Beteiligung unterschiedlicher Kaliumkanäle nehmen. Daher wurde der Einfluss des T-Zell Aktivierungsstatus der humanen  $CD4^+$ -Lymphozyten berücksichtigt, indem unaktivierte (= naive) oder aktivierte (= stimulierte) T-Zellen für die volumetrischen Analysen verwendet wurden. Da die T-Zell-Stimulation stets mit einer signifikanten Vergrößerung des Zellvolumens einhergeht (siehe Einleitung), wurde zur Kontrolle des Stimulationserfolgs eine Größenuntersuchung der Lymphozyten mit Hilfe der unter isotonen Bedingungen mikroskopisch determinierten Zellradien vorgenommen (Abbildung 14).

Vergleicht man die ermittelten isotone Radienverteilung der naiven und stimulierten Zellen (Abbildung 14), so ist ein deutlich vergrößerter Zellradius der stimulierten Lymphozyten zu erkennen. Während naive Lymphozyten einen mittleren Zellradius von  $\sim 3,6 \mu\text{m}$  aufweisen, beträgt der durchschnittliche Radius stimulierter  $CD4^+$ -Lymphozyten unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen  $5,6 \mu\text{m}$ . Unter Berücksichtigung des Variationskoeffizient

( $CV=SD/Mittelwert$ ) weisen stimulierte  $CD4^+$ -Lymphozyten darüber hinaus eine breitere Größenverteilung von  $CV \sim 20\%$  auf, während diese bei naïven T-Zellen  $\sim 6\%$  beträgt. Insgesamt besitzen damit rezeptorstimulierte  $CD4^+$ -Lymphozyten einen um  $\sim 60\%$  vergrößerten Zellradius, was einer etwa vierfachen Gesamtvolumenzunahme durch Aktivierung der Zellen entspricht. Dieser deutliche Größenunterschied naïver und stimulierter humaner  $CD4^+$ -Lymphozyten deutet somit auf die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen hin.

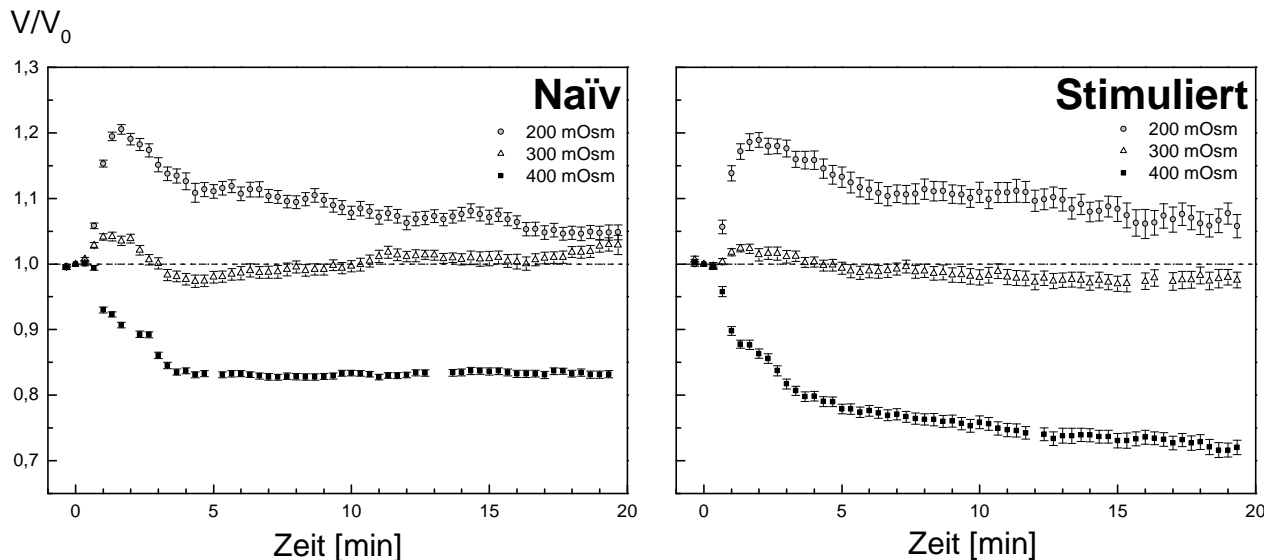


**Abbildung 14** Isotone Größenverteilung naiver und stimulierter humaner  $CD4^+$ -Lymphozyten

Das Histogramm stellt die Größenverteilung naiver (dunkel-graue Balken) und stimulierter humaner  $CD4^+$ -Lymphozyten (hellgraue Balken) dar. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Rezeptor-vermittelte T-Zell-Aktivierung mit anti- $CD3/CD28$ -Antikörper beladenen Dynabeads über 36-48 h. Die Kurven stellen die Anpassungen der Daten unter Annahme einer Gauß'schen Normalverteilung dar. Der mittlere Zellradius ( $\pm SD$ ) naiver und stimulierter Lymphozyten beträgt  $3,6 \pm 0,2 \mu m$  ( $N = 350$  Zellen) bzw.  $5,6 \pm 1,1 \mu m$  ( $N = 950$  Zellen).

Nachdem die Methode der T-Zell-Aktivierung durch die Analyse der Größenverteilung validiert wurde, erfolgte die Untersuchung der zeitlichen Zellvolumenänderung naiver und stimulierter T-Lymphozyten unter variablen osmotischen Bedingungen. Wie in Abbildung 15 zu erkennen, führen hypo-(200 mOsm, Kreise) oder hypertone (400 mOsm, gefüllte Vierecke) Bedingungen, unabhängig des Aktivierungsstatus der untersuchten T-Zellen, innerhalb von 2-3 min zu einem schnellen osmotisch getriebenen Schwellen oder Schrumpfen. Trotz der beträchtlichen Größenunterschiede zwischen naïven (Zellvolumen  $\sim 0,2$  pL) und stimulierten  $CD4^+$ -Zellen (Zellvolumen  $\sim 0,74$  pL) beträgt die relative Volumenänderung sowohl unter hypo- wie auch unter hypertonen Bedingungen dabei  $\sim 20\%$ .

Unter hypotonen Bedingungen (Abbildung 15, Kreise) ist im Anschluss an das initiale hypotone Zellschwellen sowohl bei naïven, wie auch bei stimulierten Lymphozyten RVD zu beobachten. Beide Zellproben sind jedoch nicht in der Lage ihr isotones Ausgangsvolumen innerhalb von 20 min vollständig wiederherzustellen. Unbehandelte naïve Lymphozyten erreichen nach 20 min Messzeit ein relatives Endvolumen ( $v_{end}$ ) von  $v_{end;naïv} = \sim 1,05$  während stimulierte T-Zellen einen Endwert von  $v_{end;stim} = \sim 1,07$  erlangen.



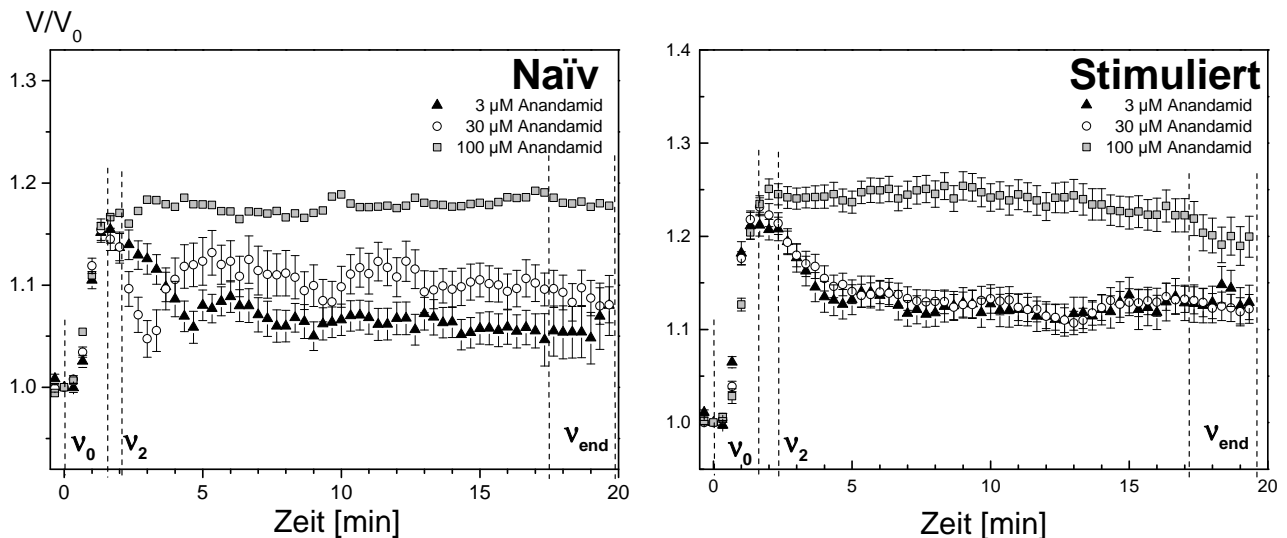
**Abbildung 15 Isotones und anisotones Volumenverhalten humaner CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten**

Die zeitlichen Änderungen des normalisierten Zellvolumens ( $v=V/V_0$ ) von humanen naiven (linke Seite) und stimulierten (rechte Seite) CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten unter hypertonen (400 mOsm; gefüllte Vierecke), isotonen (300 mOsm, Dreiecke) und mild hypotonen (200 mOsm, Kreise) Bedingungen sind dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ( $\pm$ SE) von 40-120 relativen Einzelzellvolumenwerten aus 4-16 unabhängigen Messungen. Zu Beginn der Messung wurden alle Zellen zunächst in isotonem CGM (300 mOsm) inkubiert. Nach 30 s wurde das isotone CGM durch 200, 300 oder 400 mOsm PBS ersetzt. Während isotones PBS nur eine geringe Volumenauslenkung bei naiven oder stimulierten Lymphozyten herruft, schwellen beide Zellproben unter hypotonen Bedingungen (Kreise) innerhalb von 2-3 min an, wobei sich das isotone Ausgangsvolumen der Lymphozyten um ~20% vergrößert. Unabhängig des Stimulationsstatus der Zellen ist anschließend RVD zu beobachten. Unter hypertonen Bedingungen (400 mOsm; Vierecke) ist zunächst das schnelle osmotisch getriebene Schrumpfen der Zellen innerhalb von etwa 2-3 min zu erkennen, wobei das Zellvolumen um ~20% abnimmt. Während sich bei naiven Lymphozyten das Zellvolumen anschließend nahezu konstant verhält (linke Seite, Vierecke), sinkt das Volumen der stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen langsam aber stetig weiter (rechte Seite, Vierecke).

Im Gegensatz zur hypotonen Volumenregulation sind beide Zellproben unabhängig ihres Aktivierungszustandes nicht zur Anpassung des Zellvolumens unter hypertonen Bedingungen fähig (Abbildung 15, gefüllte Vierecke). Werden die Zellen hypertont gestresst, dann ist bei beiden Zellproben zunächst innerhalb von 2-3 min ein schnelles osmotisches Zellschrumpfen (~20%) zu erkennen. Anschließend stagniert das Zellvolumen naiver Lymphozyten (Abbildung 15, linke Seite), während stimulierte T-Zellen (Abbildung 15, rechte Seite) ein langsames aber stetiges sekundäres Schrumpfen zeigen. Die Unfähigkeit der T-Zellen zur hypertonen Volumenregulation deckt sich hierbei mit anderen Studien [114,116].

Zur Beurteilung der Bedeutung der K<sub>2P</sub>-Kanälen TASK1, TASK2, TASK3 und TRESK am RVD humaner CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten wurde der Einfluss der Kaliumkanalblocker Anandamid, A293 (AVE), Rutheniumrot, Spermin, Quinidin, Bupivacain und ShK auf das hypotone Volumenregulationsverhalten in 200 mOsm PBS-Lösung analysiert. Stimulierte und naive CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten wurden dazu vor Beginn der volumetrischen Messung mit dem entsprechenden Blocker in den angegebenen Konzentrationen behandelt und anschließend die hypotone Volumenregulationsfähigkeit untersucht, wie in Abbildung 16 exemplarisch für den Blocker Anandamid dargestellt.



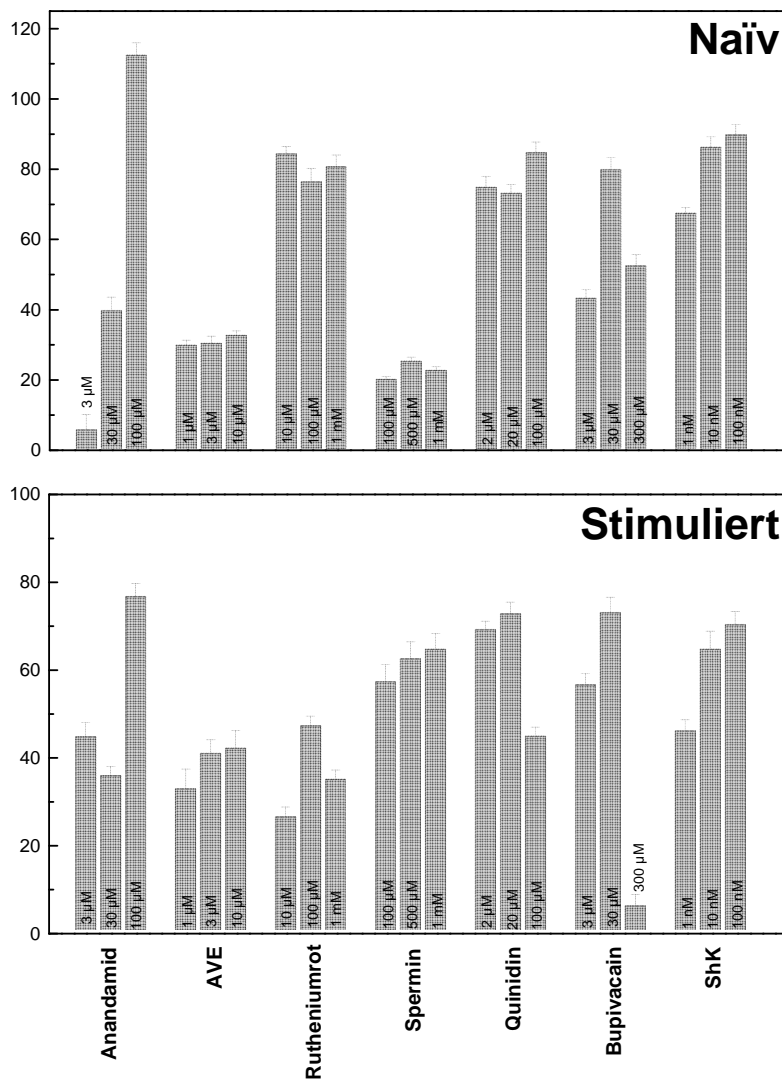


**Abbildung 16 Einfluss unterschiedlicher Anandamid-Konzentrationen auf die hypotone Volumenregulation humaner CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten**

Die Änderungen des normalisierten Zellvolumens ( $v=V/V_0$ ) von humanen naiven und stimulierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten nach Konfrontation mit mild hypotonen Bedingungen (200 mOsm PBS) unter Einfluss von 3, 30 oder 100  $\mu\text{M}$  Anandamid sind hier im zeitlichen Verlauf dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ( $\pm\text{SE}$ ) von 15-140 Einzelzellwerten aus 3-16 unabhängigen Messungen. Das Symbol  $v_0$  entspricht dabei dem relativen Zellvolumen zum Zeitpunkt  $t=0$ ,  $v_2$  dem aus den drei maximalen Schwellwerten gemittelten Zellvolumen zum Zeitpunkt  $t\sim 2$  min und  $v_{\text{end}}$  dem normalisierten Endvolumen der Zellen, welches in einem Zeitintervall zwischen 15-20 min gemittelt wurde. Über die Gleichung (3) wurde mit Hilfe der  $v_2$  und  $v_{\text{end}}$ -Werte der RVD-Inhibitions-Index des jeweilig eingesetzten Blockers berechnet (siehe Tabelle 23 und Abbildung 17).

Die quantitative Analyse der RVD-Inhibierenden Fähigkeit der unterschiedlichen Kaliumkanalblocker erfolgte analog zu den murinen Messungen (siehe oben) durch die Bestimmung der RVD-Inhibitions-Koeffizienten-Werte ( $\text{IC}_{\text{RVD}}$ ) für die einzelnen Blockerkonzentrationen. Zur Berechnung der  $\text{IC}_{\text{RVD}}$ -Werte wurde, wie in Abbildung 16 am Beispiel des Blockers Anandamid illustriert, die für die Anwendung der Gleichung (3) benötigten  $v_2$ -Werte aus den maximalen Schwellungswerten zwischen 2-3 min nach hypotonem Stress der Zellen gemittelt. Entsprechend wurden als  $v_{\text{end}}$ -Werte die gemittelten relativen Zellvolumina im Zeitintervall zwischen 15 und 20 min verwendet, da in diesem Bereich nur geringe Volumenänderungen zu beobachten sind. Die so bestimmten  $v_2$ - und  $v_{\text{end}}$ -Werte sind zusammen mit den errechneten  $\text{IC}_{\text{RVD}}$ -Werten in Tabelle 23 (siehe Appendix) zusammengefasst. In Abbildung 17 sind die RVD-Inhibitions-Index-Werte der unterschiedlichen Blocker aus Tabelle 23 (siehe Appendix) zur vergleichenden Analyse in einem Balkendiagramm dargestellt.

## RVD Inhibition [%]



**Abbildung 17 RVD-Inhibitorischer Effekt unterschiedlicher Kaliumkanalblocker bei humanen CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten**

Im Balkendiagramm ist der RVD-inhibierende Effekt der Kaliumkanalblocker Anandamid (3 µM, 30 µM, 100 µM), AVE (1 µM, 3 µM, 10 µM), Rutheniumrot (10 µM, 100 µM, 1 mM), Spermin (100 µM, 500 µM, 1 mM), Quinidin (2 µM, 20 µM, 100 µM), Bupivacain (3 µM, 30 µM, 300 µM) und Shk (1 nM, 10 nM, 100 nM) auf das hypotone Volumenregulationsverhalten humaner naiver (oben) und stimulierter (unten) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen dargestellt. Unbehandelte und mit Blockern behandelte Zellproben wurden mit 200 mOsm PBS konfrontiert und mit Hilfe zeitaufgelöster volumetrischer Messungen analysiert (vergleiche Abbildung 16). Der RVD-inhibierende Effekt einer jeden Blockerkonzentration wurde über die entsprechenden  $v_2$ - und  $v_{end}$ -Werte aus Tabelle 23 (siehe Appendix) nach Gleichung (3) berechnet.

- Inhibition von TASK1 und TASK3

Zur Inhibition des TASK1-Kanals wurden CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten zunächst mit dem Endocannabinoid Anandamid behandelt. Eine spezifische TASK1-inhibitorische Wirkung dieses Blockers ist in der Literatur im Konzentrationsbereich von 3-30 µM bekannt [82,83], während höhere Konzentrationen eine zusätzliche Inhibition des TASK3-Kanals hervorrufen [84]. Wie in Abbildung 17 zu erkennen, ist bei naiven und stimulierten Zellen in der Konzentration von 30 µM eine um ~40% verminderte hypotone Volumenregulationsfähigkeit der Zellen zu beobachten. Die inhibierte Volumenregulation der behandelten Zellen deutet auf eine Beteiligung des TASK1-Kanals am RVD-Prozess hin. Die Erhöhung der Anandamidkonzentration auf 100 µM (zusätzliche Inhibition des TASK3-Kanals) verstärkt diesen RVD-inhibierenden Effekt, wobei der RVD naiver Lymphozyten um ~110% und der von stimulierten Zellen um ~80% inhibiert wird.

Dieser starke Effekt auf das Volumenregulationsvermögen der T-Zellen lässt auf eine bedeutende Rolle von TASK1 und TASK3 bei der hypotonen Volumenregulation schließen.

Werden T-Lymphozyten darüber hinaus mit einem weiteren TASK1-Blocker AVE (A293) behandelt, dann wird die Annahme einer TASK1-Beteiligung am RVD-Prozess der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten bestärkt. Der Kaliumkanalblocker AVE (A293) ist für seine spezifische TASK1-Inhibition bekannt, wobei eine 50%-ige Inhibition (= IC<sub>50</sub>) des humanen TASK1-Kanals bei einer Konzentration von 222 nM erreicht wird [85]. In höheren Konzentrationen wird darüber hinaus (wie bei Anandamid) eine Inhibition des TASK3-Kanals beobachtet [85]. Wie in Abbildung 17 zu erkennen, weisen CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten unabhängig ihres Stimulationstatus durch die Behandlung mit 1-10 µM AVE (A293) einen RVD-Inhibitionswert von 30-40% auf. Das Ausmaß der RVD-Inhibition der mit AVE behandelten Zellen ist damit etwa vergleichbar mit dem von Anandamid (30 µM; siehe oben). Beide Kaliumkanalblocker deuten auf eine starke Beteiligung des TASK1-Kanals am RVD humaner CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten hin, auch wenn eine partielle Inhibition des TASK3-Kanals durch höhere Konzentrationen dieser Blocker nicht auszuschließen ist.

Um die Rolle des TASK3-Kanals am RVD der humanen T-Lymphozyten gezielt zu untersuchen, wurde der RVD-inhibierende Einfluss der Blocker Rutheniumrot und Spermin untersucht (Abbildung 17). Die spezifische Inhibition des humanen TASK3-Kanals um 50% ist durch eine Rutheniumrotkonzentration von 0,1 µM bekannt [90]. Rutheniumrot zeigt im Gegensatz zu Anandamid und AVE (A293) eine quantitativ deutlich abweichende RVD-inhibierende Wirkung auf stimulierte und naive CD4<sup>+</sup>-Zellen (siehe Abbildung 17). Stimulierte Lymphozyten werden durch Rutheniumrot zwischen 25-45% inhibiert, wobei die mittlere Konzentration von 100 µM (vermutlich durch Sättigungseffekte) den stärksten Einfluss auf das hypotone Volumenregulationsvermögen besitzt. Bei unstimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen tritt dagegen unabhängig der eingesetzten Blockerkonzentration eine nahezu vollständige Inhibition des RVDs auf (~75-85%). Auch wenn Nebeneffekte des Blockers Rutheniumrot auf z.B. den Ryanodinerezeptors nicht ausgeschlossen sind [118], deutet dieses Ergebnis somit auf eine wichtige aber auch durch die T-Zell-Rezeptor-Stimulation abnehmende relative Beteiligung des TASK3-Kanals hin.

Im Gegensatz dazu konnte durch die Inhibierung des TASK3-Kanals mit Hilfe von Spermin dieser Effekt nicht bestätigt werden. Wie in elektrophysiologischen Studien an thalamokortikalen Relayneuronen gezeigt [90], inhibiert Spermin in einer Konzentration von 100 µM den TASK3-vermittelten Kaliumefflux um 50%. Wie in Abbildung 17 zu sehen, inhibiert Spermin nahezu unabhängig seiner eingesetzten Konzentration (0,1 - 1 mM) den RVD naiver T-Zellen nur gering (~25%). Das Volumenregulationsvermögen stimulierter CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten wird hingegen mit steigender Spermin-Konzentration zunehmend von ~55% bis 65% inhibiert. Die Ergebnisse des Blockers Spermin weisen damit einen zu Rutheniumrot entgegengesetzten Trend auf, wobei der inhibitorische Effekt auf stimulierte Zellen stärker ausfällt als auf naive Lymphozyten.

Insgesamt sprechen die Experimente mit den Blockern Anandamid, Rutheniumrot, AVE (A293) und Spermin für eine wichtige Rolle der Kanäle TASK1 und TASK3 im RVD humaner CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten. Insbesondere die kontroversen Ergebnisse von Rutheniumrot und Spermin deuten jedoch auch auf unspezifische Effekte der Kaliumkanalblocker hin, die eine eindeutige Bestimmung der Bedeutung des TASK3-Kanals für den RVD-Prozess erschweren. Die klar zu erkennende starke Inhibition des RVDs naïver und stimulierter Lymphozyten in der höchsten eingesetzten Anandamid-Konzentration von 100 µM deutet dennoch auf eine deutliche Beteiligung von TASK3 hin.

#### - *Pharmakologische Inhibierung von TASK2*

Die Analyse der Beteiligung des TASK2-Kanals am RVD humaner CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte mit Hilfe des Antiarrhythmikums Quinidin als TASK2-Blocker in den Konzentrationen 2, 20 und 100 µM. Quinidin inhibiert in einer Konzentration von 100 µM den TASK2-vermittelten Kationenefflux um 65% [119]. Darüber hinaus ist in dieser Konzentration eine schwächere inhibitorische Wirkung von ~40% auf den TASK3-vermittelten Efflux nachgewiesen [120].

Quinidin zeigt sowohl bei naïven wie auch bei unstimulierten T-Zellen eine stark inhibitorische Wirkung des RVD ( $IC_{RVD}$  zwischen 70-90%) über nahezu den gesamten Konzentrationsbereich (Abbildung 17). Während sich bei naïven T-Zellen dabei eine leichte konzentrationsabhängige Zunahme der RVD-Inhibition von ~75-90% erkennen lässt, zeigen die stimulierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten zunächst eine Zunahme zwischen 2-20 µM ( $IC_{RVD}$  zwischen 70-75%) und anschließend eine reduzierte RVD-Inhibition von ~45%. Der Effekt der inversen Konzentrationsabhängigkeit der RVD-Inhibition bei stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen könnte möglicherweise auf einen zytotoxischen Effekt des Blockers in hohen Konzentrationen hinweisen. Der Mangel eines weiteren geeigneteren Kaliumkanalblockers für TASK2 erschwert hier die Interpretation dieses Effektes. Dennoch deutet der starke RVD-inhibitorische Einfluss des Blockers in den niedrigen Konzentrationen von 2 und 20 µM auf eine maßgebliche Rolle des TASK2-Kanals am Prozess der hypotonen Volumenregulation in naïven wie auch stimulierten T-Zellen hin.

#### - *Blockade von TRESK*

Die Inhibition des TRESK-Kanals erfolgte in dieser Studie mit Hilfe des Lokalanästhetikums Bupivacain. Wie in zahlreichen Studien gezeigt wurde, blockiert Bupivacain in der Konzentration

von 17-100  $\mu\text{M}$  die Kanalaktivität der  $\text{K}_{2\text{P}}$ -Kanäle TASK1, TASK2 und TASK3 [86,88,119–121]. Eine Inhibition des TRESK-verursachten Ionenflusses wird darüber hinaus in einem Konzentrationsbereich von 5-80  $\mu\text{M}$  beobachtet [44]. In dieser Arbeit wurde Bupivacain in den Konzentrationen 3, 30 und 300  $\mu\text{M}$  verwendet.

Wie in Abbildung 17 zu erkennen, ist die RVD-inhibierende Wirkung von Bupivacain auf stimulierte und naive  $\text{CD4}^+$ -Zellen ähnlich stark ausgeprägt. Unabhängig ihres Stimulationsstatus führt die Behandlung mit der niedrigsten Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  zu einer RVD-Inhibition von 45-55%. Die Erhöhung der Blockerkonzentration auf 30  $\mu\text{M}$  steigert den RVD-inhibitorischen Effekt in beiden Zelltypen, wobei die Volumenregulationsfähigkeit hierdurch um 75-80% reduziert wird. Die weitere Erhöhung der Bupivacain-Konzentration auf 300  $\mu\text{M}$  senkt die RVD-Inhibition wieder auf ~50% in naiven und ~10% bei stimulierten  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen. Dieser starke Abfall der Wirksamkeit des Blockers in der höchsten eingesetzten Konzentration könnte durch die vom Hersteller angedeutete mangelnde Löslichkeit Bupivacains in Phosphatpufferlösungen verursacht sein.

Dennoch weisen die Ergebnisse der geringeren Bupivacain-Konzentrationen (3-30  $\mu\text{M}$ ) auf eine deutliche Rolle des TRESK-Kanals in der Volumenregulation humaner  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten hin. Die Bedeutung des TRESK-Kanals scheint hierbei unabhängig des Stimulationsstatus der Zellen zu sein.

#### - Inhibition des spannungsabhängigen 6TM-Kanals $\text{Kv1.3}$

Um die Bedeutung der TASK-Kanäle am RVD humaner  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten in Relation zur Beteiligung bereits RVD-zugeordneter 6TM-Kaliumkanälen einzuordnen, erfolgte die Inhibition des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $\text{Kv1.3}$  mit Hilfe des *Strichodactyla helianthus* Toxins ShK. Die spezifisch inhibitorische Eigenschaft des aus einer Seeanemone isolierten toxischen Peptids ShK auf die Kanalaktivität des 6TM-Kaliumkanals  $\text{Kv1.3}$  konnte bereits in zahlreichen Studien im nanomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden [92,93]. In dieser Arbeit wurde dieser Kaliumkanalblocker in den Konzentrationen 1, 10 und 100 nM eingesetzt.

Wie in Abbildung 17 zu erkennen, zeigt ShK einen deutlich inhibitorischen Einfluss auf das Volumenregulationsverhalten von naiven und stimulierten T-Zellen. Der inhibitorische Effekt weist dabei eine konzentrationsabhängige Steigerung auf, die bereits in anderen Studien beschrieben wurde [94]. Im Gegensatz zu den Blockern der  $\text{K}_{2\text{P}}$ -Kanäle, die einen vom Aktivierungszustand nahezu unabhängigen Effekt aufwiesen, zeigt ShK jedoch eine deutlich stärkere RVD-Inhibition bei naiven  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten (Abbildung 17). Während 1-10 nM ShK in stimulierten Lymphozyten eine RVD-Inhibition von ~45-65% verursacht, wird der RVD naiver

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen um ~65-85% inhibiert. Eine Steigerung der ShK-Konzentration auf 100 nM bewirkte lediglich eine geringere Zunahme des RVD-inhibitorischen Effektes. Die Messungen mit ShK weisen somit auf eine größere relative Bedeutung des K<sub>V</sub>1.3-Kanals für den RVD naiver CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die K<sub>2P</sub>-Kaliumkanäle im RVD-Prozess eine essenzielle Rolle übernehmen. Die Bedeutung dieser Kanäle ist dabei vergleichbar mit der des bisher bekannten Hauptakteurs K<sub>V</sub>1.3. Innerhalb der K<sub>2P</sub>-Kanäle scheinen der spannungsabhängige TASK2 und der Ca<sup>2+</sup>-aktivierte TRESK-Kanal für den RVD-Prozess einen wichtigeren Einfluss zu übernehmen als TASK1 und TASK3.

## 4.2 Untersuchung volumensensitiver Transportwege für organische Osmolyte

Die schwellungsaktivierte Freisetzung organischer Osmolyte stellt für Zellen einen essenziellen Mechanismus der Volumen Anpassung dar. Doch trotz zahlreicher Untersuchungen auf diesem Gebiet, konnten die Identität der beteiligten Transportwege bisher nicht aufgeklärt werden. In diesem Teil wurde daher die Charakterisierung der schwellungsaktivierten Transportwege organischer Osmolyte mit Hilfe zeitaufgelöster volumetrischer Messungen vorgenommen.

Die Charakterisierung gliedert sich in die Bereiche

- Bestimmung der Größenausschlussgrenze (*Cutoff*-Radius) von schwellungsaktivierten Transportwegen für organische Osmolyte mit Hilfe strukturell homogener Polyethylenglykole (PEG) unterschiedlichen Molekulargewichts

und

- Analyse der hypotonen Transportdynamik unterschiedlicher organischer Osmolyte zur Bestimmung der osmotischen Aktivierungsschwelle und der Aktivitätsdauer von Transportern für organische Osmolyte

auf.

Die Bestimmung der Größenausschlussgrenze RVD beteiligter Transportwege für organische Osmolyte verfolgt dabei das Ziel, die für biotechnologische Anwendungen relevante Größenselektivität der schwellungsaktivierten Transportsysteme für *small organic osmolyte* zu bestimmen. Die Bestimmung des *Cutoff*-Radius in dieser Arbeit basiert dabei auf der durch Martin Kiesel im Zuge seiner Dissertation begonnenen Größenselektivitätscharakterisierung der schwellungsaktivierten Transportwege organischer Osmolyte [67]. Hierbei konnte er durch volumetrische Messungen bis PEG600 die Größenselektivität der Transportwege organischer Osmolyte zwischen 0,73 und 0,95 nm eingrenzen [67]. In der vorliegenden Arbeit wurden die von ihm angefertigten Messungen um die volumetrischen Messungen mit PEG1000-PEG1500 ergänzt, wodurch die hier durchgeführte Datenanalyse der kombinierten Ergebnisse eine genaue Bestimmung des Porensperrradius ermöglicht.

Darüber hinaus soll über die Untersuchung der Transportdynamik die für die Identifizierung der Transporter grundlegende Frage nach einem gemeinsamen oder getrennten Transportweg unterschiedlicher organischer Osmolyte beantwortet werden. Aufgrund der Fülle von tierischen Zellen zur Volumenregulation eingesetzten organischen Osmolyte wurde bei dieser Analyse der Fokus auf den Transport von Taurin und Myo-Inositol gesetzt.

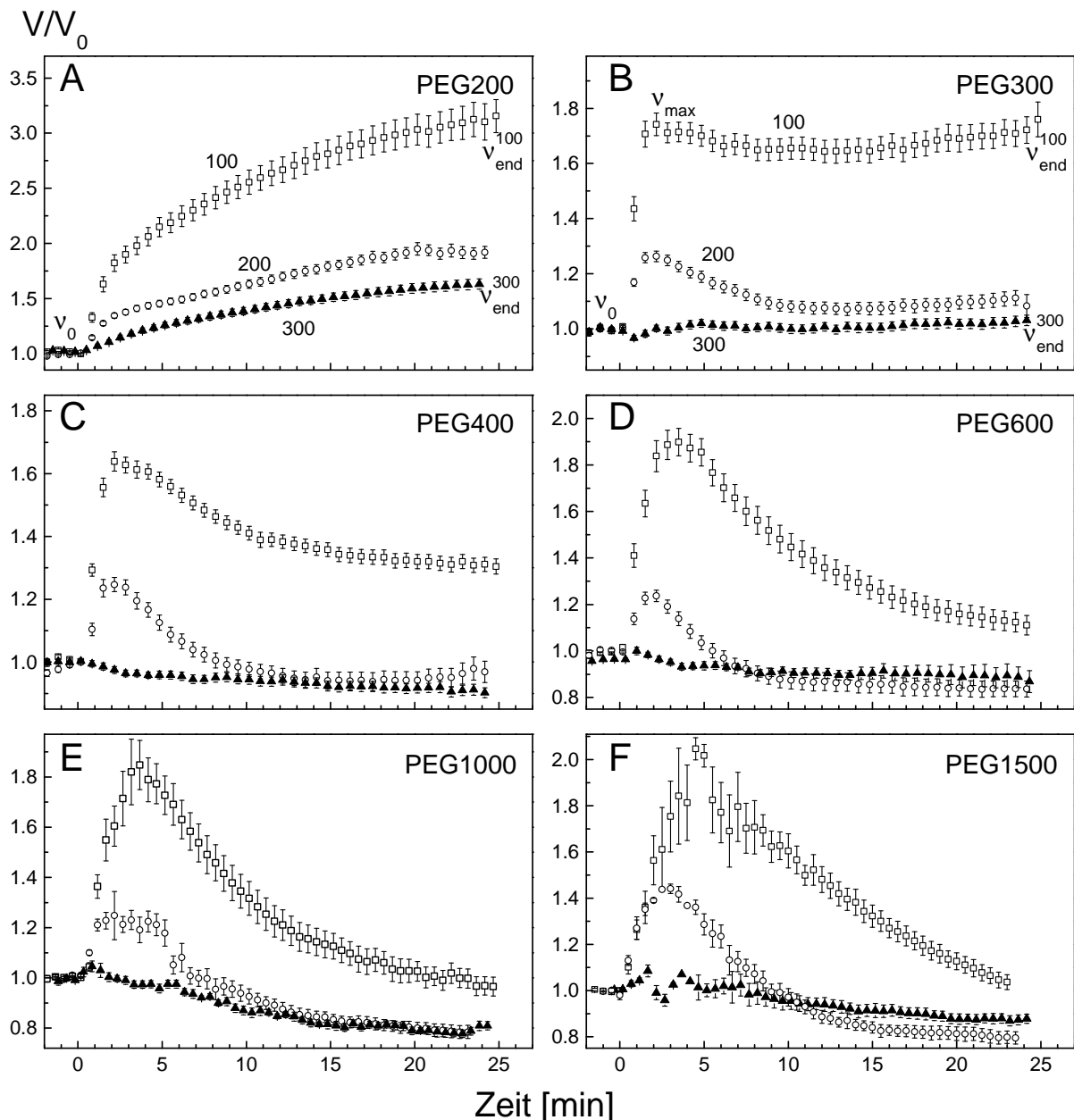
#### 4.2.1 Bestimmung der Größenselektivität schwellungsaktivierter Transportwege für organische Osmolyte

Wie in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, ist der schwellungsaktivierte Effluxweg organischer Osmolyte ungeachtet seiner molekularen Identität größenselektiv [15,68,70,71]. Während der volumensensitive SOO-Transportweg für kleine Kohlenhydratverbindungen (z.B. Sorbitol, myo-Inositol) und andere Verbindungen wie Aminosäuren und deren Derivate permeabel ist, werden Oligosaccharide (z.B. Saccharose, Trehalose) hierüber nicht transportiert [68]. Dies deutet auf eine unspezifische Durchlässigkeit schwellungsaktivierter Transportwege organischer Osmolyte für strukturell ähnliche chemische Verbindungen hin.

In dieser Arbeit wurde daher die Größenselektivität der hypoton aktivierten Transportwege organischer Osmolyte durch die Bestimmung der Größenausschlussgrenze von schwellungsaktivierten Transportwegen für SOOs analysiert. Die Bestimmung des *Cutoff*-Radius der Transportwege organischer Osmolyte erfolgte hierbei durch die volumetrische Analyse der Membranpermeabilität für Moleküle mit bekanntem hydrodynamischem Radius. Da sich die Gruppe der SOOs aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur für diese Untersuchung schlecht eignen, wurden strukturell homogene Polyethylenglykole (PEG) unterschiedlicher Polymerlänge (PEG200-1500) verwendet. Im Gegensatz zu natürlich vorkommenden SOOs stellten PEGs chemisch betrachtet einfache organische Polymere dar, deren Molekülgrößen durch Addition der Monomere schrittweise variiert werden kann. Unter unterschiedlichen osmotischen Bedingungen (100, 200 und 300 mOsm) wurde hierzu das hypotone Volumenregulationsverhalten von Jurkat-Lymphozyten in Gegenwart der niedermolekularen Polyethylenglykolen (PEG 200-1500) als Hauptosmotika im verwendeten Volumetriemedium analysiert.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist die zeitliche Volumenänderung der untersuchten Zellen nicht nur von der extrazellulären Osmolalität, sondern auch von der Polymerlänge des verwendeten PEGs abhängig. Werden Zellen mit PEG200 konfrontiert, dann ist unabhängig der extrazellulären Osmolalität ein Zellschwellen über den gesamten Messzeitraum von 25 min zu beobachten (Abbildung 18, A). Vergleicht man hierzu die relativen Volumenendwerte der 200 und 100 mOsm Messungen ( $v_{end}^{200} \approx 1,7$ ;  $v_{end}^{100} \approx 3,2$ ), dann liegen diese deutlich über ihrem ursprünglichen isotonen Ausgangswert ( $v_0 = 1$ ). Selbst unter isotonen Messbedingungen (300 mOsm) schwellen die Zellen in Anwesenheit von PEG200 konstant und steigern ihr Volumen innerhalb von 25 min um ~67% ( $v_{end}^{iso} \approx 1,67$ ). Dieses Volumenverhalten der Lymphozyten zeigt deutlich, dass die Membran für PEG200 unter allen osmotischen Bedingungen permeabel ist.





**Abbildung 18 Zeitliche Volumenänderung von Jurkat-Lymphozyten in PEG-haltigen Medien unterschiedlicher Osmolalität**

Jurkat-Lymphozyten wurden zu Beginn der Messung (Zeitpunkt  $t < 30$ s) in isotonem CGM inkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen unter variablen osmotischen Bedingungen (100, 200 und 300 mOsm) mit Polyethylenglykolen unterschiedlicher Polymerlängen (PEG200-1500, A-F) konfrontiert. Die relative Volumenänderung aus 20-30 Zellen (+SE) ist hier im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Permeabilität der Membran wird durch den konzentrationsgerichteten Einstrom mancher PEGs in die Zelle und dem daraus resultierenden sekundären Zellschwellen aufgezeigt. Die Plasmamembranpermeabilität für die untersuchten PEGs variiert abhängig der PEG-Polymerlängen und der osmotischen Bedingungen. Während die Membranpermeabilität für PEG200 (A) unter isotonen (300 mOsm) und mild hypotonen (200 mOsm) Bedingungen gegeben ist (kontinuierliches Zellschwellen in A), ist die Membran für die länger-kettigen PEGs (PEG300-1500, B-F) unter gleichen osmotischen Bedingungen weitestgehend impermeabel (initiales relatives Zellvolumen  $v_0$  entspricht weitestgehend dem Endvolumenwerten  $v_{end}$ ). Unter stark hypotonen Bedingungen (100 mOsm) ist die Membran für PEG200 und PEG300 vollständig und für PEG400 und PEG600 teilweise permeabel. Für die Polymere PEG1000 und PEG1500 ist die Membran hingegen im gesamten osmotischen Messbereich impermeabel. Die Messungen A-D wurden von Martin Kiesel übernommen [67] und in dieser Arbeit zur Bestimmung der Größenbegrenzung schwellungsaktivierte Transportwege für kleine organische Osmolyte um die Messungen E+F erweitert (siehe unten).

Werden die Zellen jedoch mit längerkettigeren PEG-Polymeren (PEG300-1500) konfrontiert (Abbildung 18, B-F), dann ist ein sekundäres Zellschwellen aufgrund der zellulären Aufnahme der PEGs unter isotonen und mild hypotonen (200 mOsm) Bedingungen kaum zu erkennen. Die relativen Volumenendwerte der isotonen ( $v_{end}^{iso}$ ) wie auch mild hypotonen ( $v_{end}^{200}$ ) Messungen entsprechen hierbei annähernd dem isotonen Ausgangsvolumen der Zellen (PEG300-400;  $v_{end} \approx 1$ ) oder liegen sogar etwas darunter (PEG600-1500;  $v_{end} \approx 0,8$ ). Insgesamt scheint eine Permeabilität der Membran jedoch für die PEGs der Polymerlänge 300-1500 unter isotonen und mild hypotonen Bedingungen daher lediglich gering zu sein.

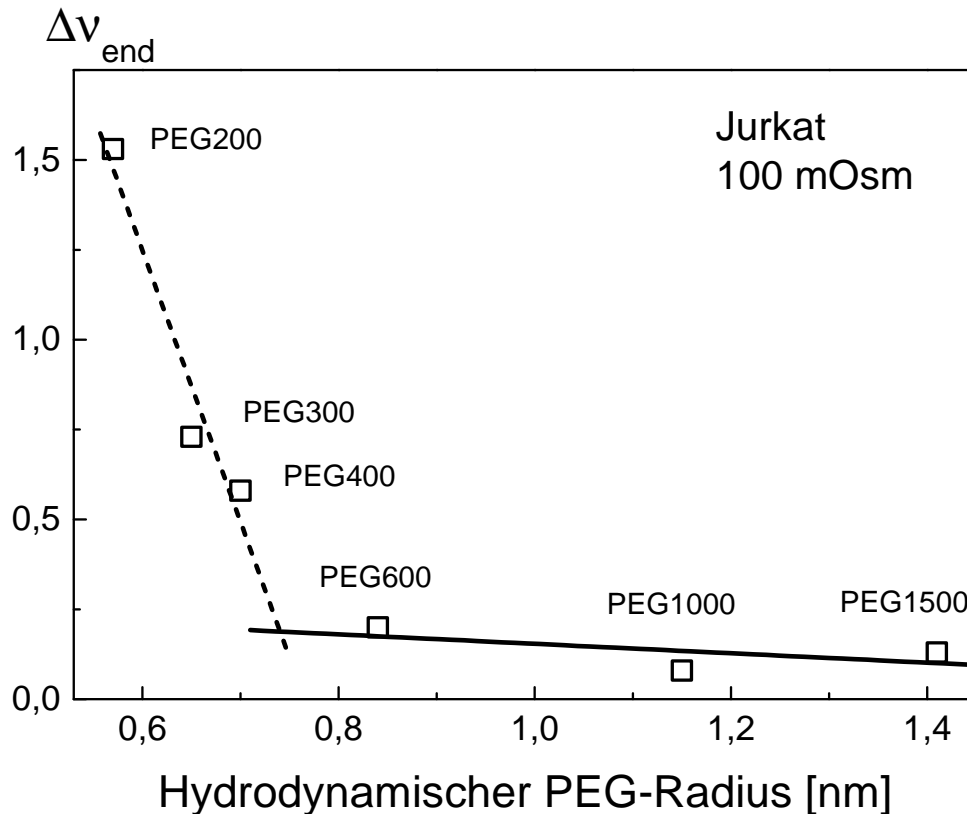
Im Gegensatz dazu ist unter stark hypotonen Bedingungen (100 mOsm) die Permeabilität der Membran deutlich abhängig von der Polymerlänge des verwendeten PEGs. Werden die Zellen beispielsweise in Anwesenheit von PEG300 stark hypoton gestresst (Abbildung 18, B), dann ist zunächst innerhalb von 2-3 min ein schnelles osmotisch getriebenes Zellschwellen zu beobachten. Dieses primäre Zellschwellen führt zu einer maximalen Zunahme des relativen Zellvolumens um ~75% ( $v_{max}^{100} \approx 1,75$ ). Im Anschluss an das primäre Zellschwellen verbleibt das Zellvolumen auf annähernd dem gleichen Niveau ( $v_{end}^{100} \approx 1,75$ ). Die Volumenregulation der Zellen ist somit inhibiert, was auf eine Permeabilität der Membran für PEG300 unter stark hypotonen Bedingungen hindeutet.

Während durch PEG300 die Volumenregulationsfähigkeit in 100 mOsm-Medium nahezu vollständig inhibiert wird, sind Jurkat Lymphozyten in Anwesenheit von PEG400 unter gleichen osmotischen Bedingungen zu einer partiellen Volumenregulation fähig (Abbildung 18, C). In PEG400-haltigem stark hypotonen Medium sind die untersuchten Jurkat-Lymphozyten in der Lage, ausgehend von dem maximalen Schwellwert von  $v_{max}^{100} \approx 1,65$  einen Endwert des relativen Zellvolumens von  $v_{end}^{100} \approx 1,35$  zu erreichen. Diese hypotone Volumenreduktion um 30% deutet auf eine geringere hypotone Membranpermeabilität des PEG400 im Vergleich zu PEG300 hin.

Wird die Polymerlänge weiter erhöht (PEG600-1500, Abbildung 18, D-F), dann nimmt die Volumenregulationsfähigkeit der Zellen zu. Während bei PEG600 noch eine schwache Inhibition des RVDs zu erkennen ist ( $v_{end}^{100} \approx 1,1$ ), sind die Lymphozyten ab PEG1000 zu einer vollständigen Volumenregulation innerhalb der Messzeit fähig ( $v_{end}^{100} \approx 1,0$ ). Mit zunehmender Polymerkettenlänge nimmt somit die Membranpermeabilität der PEG-Polymere unter stark hypotonen Bedingungen ab.

Um mit Hilfe dieser volumetrischen Daten die genaue Porengröße der hypoton aktivierten und PEG-permeablen Transportwege für organische Osmolyte zu bestimmen, wurde wie in Abbildung 19 dargestellt die Langzeitvolumenänderung ( $\Delta v_{end} = v_{end}^{100} - v_{end}^{300}$ ) der einzelnen Messungen gegen die experimentell ermittelten hydrodynamischen Radien der verwendeten PEGs (PEG200-1500) aufgetragen. Wie bereits gezeigt werden konnte [68], verhält sich die Langzeitvolumenänderung  $\Delta v_{end}$  proportional zur RVD-inhibierenden Fähigkeit und damit zur schwellungsaktivierten Membranpermeabilität für extrazellulär gelöste chemische Verbindungen.

Die 100 mOsm ( $v_{end}^{100}$ ) und 300 mOsm ( $v_{end}^{300}$ ) relativen Volumen-Endwerte nach ~25 min Messzeit wurden hierfür den volumetrischen Kurven in Abbildung 18 entnommen. Die darüber hinaus benötigten hydrodynamischen Radien der PEGs wurden von Martin Kiesel (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Universität Würzburg) viskosimetrisch bestimmt (siehe Methoden). Die hydrodynamischen Radien der PEG-Polymere variieren im Bereich von 0,57 nm (PEG200) bis 1,41 nm (PEG1500) und sind in Tabelle 19 zusammengefasst.



**Abbildung 19** Abhängigkeit der RVD-Inhibition vom hydrodynamischen Radius des PEG-Polymers unter stark hypotonen Bedingungen (100 mOsm)

Die relative Langzeitvolumenänderung ( $\Delta v_{end} = v_{end}^{100} - v_{end}^{300}$ ) von Jurkat-Lymphozyten in PEG200-1500-haltigen Medien ist in diesem Diagramm als Funktion der hydrodynamischen PEG-Radien dargestellt. Die hypotonen ( $v_{end}^{100}$ ) und isotonen ( $v_{end}^{300}$ ) Volumenendwerte nach ~25 min Messzeit sind den volumetrischen Kurven in Abbildung 18 entnommen. Die Größe  $\Delta v_{end}$  verhält sich hierbei proportional zur RVD-inhibierenden Fähigkeit und damit zur hypotonen Permeabilität der entsprechenden PEGs. Die hydrodynamischen Radien der PEG200-1500 wurden von Martin Kiesel (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Universität Würzburg) viskosimetrisch bestimmt (siehe Methoden) und sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Der Schnittpunkt beider Regressionsgeraden ermöglicht die Bestimmung der Porengröße von PEG-permeablen schwellungsaktivierten Transportern/Kanälen auf ~0,74 nm.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, ist die Langzeitvolumenänderung  $\Delta v_{end}$ , und damit die Membranpermeabilität, unter 100 mOsm Bedingungen für die unterschiedlichen PEGs abhängig von deren hydrodynamischen Radien. Während die Membran unter stark hypotonen Bedingungen für die langkettigen PEGs mit einem hydrodynamischen Radius  $> 0,8$  nm nahezu impermeabel ist ( $\Delta v_{end} < 0,25$ ; durchgezogene Regressionsgerade in Abbildung 19), nimmt die Durchlässigkeit

der Membran mit sinkendem hydrodynamischen Radius der PEGs zu. Wie durch die gestrichelte Regressionsgerade in Abbildung 19 zu sehen, steigen hierbei die  $\Delta v_{end}$ -Werte der PEGs mit einem hydrodynamischen Radius zwischen 0,7 und 0,57 nm (PEG200-400) von  $\Delta v_{end} \approx 0,55$  (PEG400) bis  $\sim 1,5$  (PEG200) an.

Die Membranpermeabilität für die untersuchten PEGs unter stark hypotonen Bedingungen zeigen deutlich, dass die Größenselektivität PEG-leitender und schwellungsaktivierten Transporter/Kanäle (wie bereits von Martin Kiesel abgeschätzt [67]) im Bereich zwischen  $\sim 0,7$  nm (PEG400) und 0,95 nm (PEG600) liegt. Die graphische Auswertung unter Berücksichtigung des Schnittpunktes beider Ausgleichsgeraden in Abbildung 19 ermöglicht in dieser Arbeit darüber hinaus die Bestimmung des *cutoff*-Radius von PEG-permeablen schwellungsaktivierten Transportern/Kanälen auf  $\sim 0,74$  nm.

#### 4.2.2 Schwellungsaktivierte Transportwege für Taurin und myo-Inositol

Über den schwellungsaktivierten Transport organischer Osmolyte werden in der Fachliteratur kontroverse Diskussionen geführt (siehe Diskussion Kapitel 5.2). Insbesondere die Frage eines gemeinsamen oder separaten Transportweges für unterschiedliche organische Osmolyte konnte bisher nicht geklärt werden (siehe Diskussion Kapitel 5.2). Daher soll in dieser Arbeit über die Untersuchung der Transportdynamik diese für die Identifizierung der Transporter grundlegende Frage beantwortet werden.

Die Untersuchung der Dynamik des hypotonen Transports organischer Osmolyte erfolgte zum einen durch (a) die Bestimmung der osmotischen Aktivierungsschwelle für den Transport von Taurin und myo-Inositol und zum anderen über (b) die Ermittlung der Aktivitätsdauer von Transportern für Taurin und myo-Inositol während des RVD nach stark hypotoner Exposition der Zellen. Mit diesem Versuchsansatz ist es möglich, die Aktivierung und die Deaktivierung des Transports von Taurin und myo-Inositol zu charakterisieren und so einen gemeinsamen oder getrennten Transportweg für unterschiedliche organische Osmolyte abzuleiten.

##### *(a) Bestimmung der osmotischen Aktivierungsschwelle für den Transport von Taurin und myo-Inositol*

Werden Zellen hypoton gestresst, so erfolgt ein osmotisch getriebener Wassereinstrom innerhalb von 2-3 min, der zu einer deutlichen Volumenzunahme (= initiales Zellschwellen) führt. Die Ausprägung dieses anisotonen Zellschwellens nimmt dabei mit abnehmender Osmolalität des

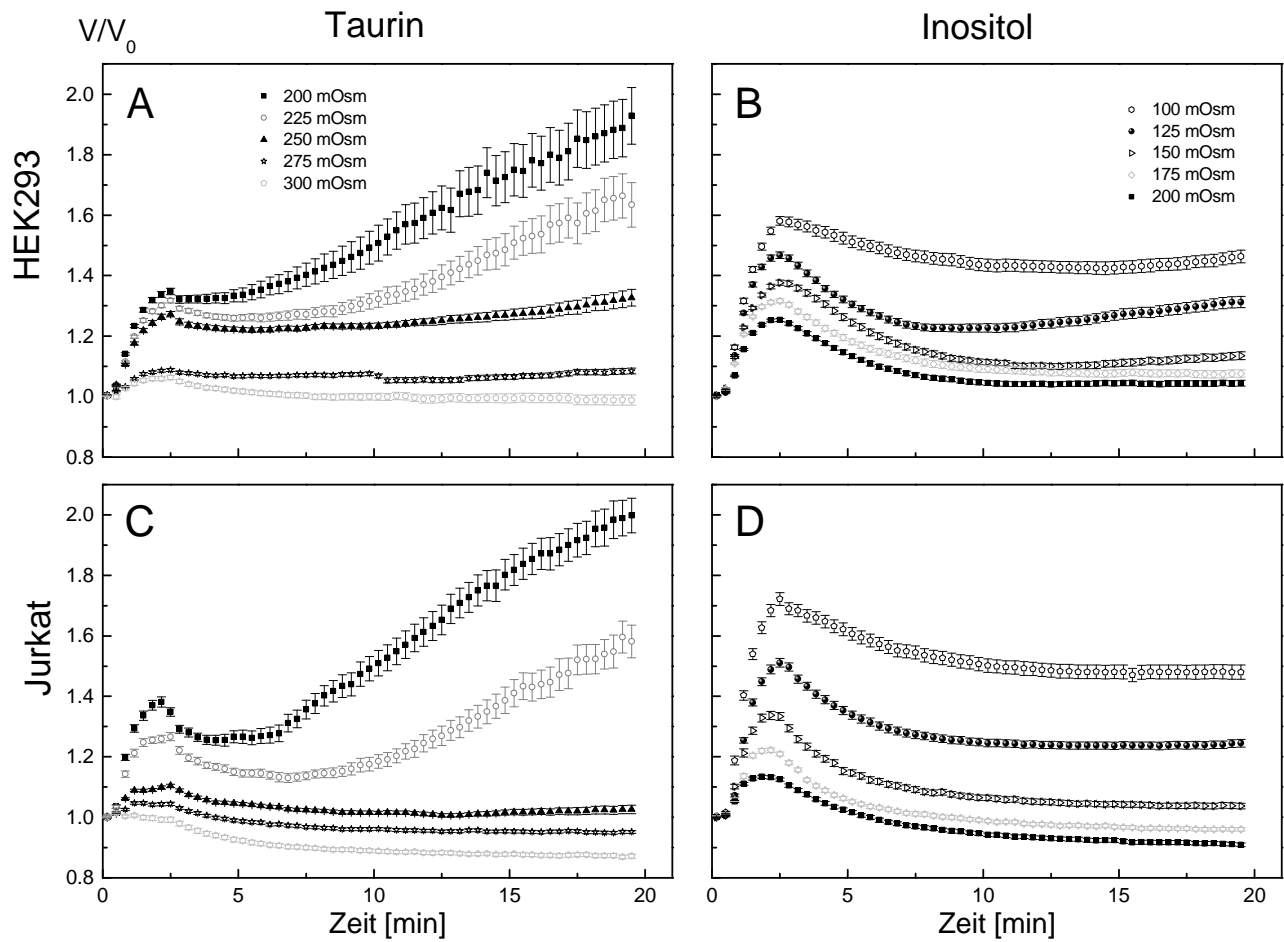
hypotonen Volumetriemediums zu (Abbildung 20). Dieses initiale Zellschwellen leitet die Volumenrückregulation der Zellen über den Ausstrom von Elektrolyten und organischen Osmolyten ein (siehe Einleitung).

Um die Aktivierungsschwelle für den Transport unterschiedlicher organischer Osmolyte aufzuzeigen, wurde in dem hier verwendeten Versuchsaufbau die physiologische Konzentrationsdifferenz für Taurin und myo-Inositol im eingesetzten hypotonen Volumetriemedium invertiert (siehe Kapitel 1.3). Im Außenmedium befindet sich dadurch eine erhöhte Konzentration (87-287 mM) des entsprechenden organischen Osmolyts, wodurch die schwellungsbedingte Aktivierung des Transports zum konzentrationsgerichteten Einstrom in die Zellen führt. Dieser hypotone Osmolyteinstrom ist durch ein sekundäres Zellschwellen (siehe Einleitung, isotone Volumenzunahme) gekennzeichnet, der die Membranpermeabilität der Zelle für den jeweiligen SOO aufzeigt. Durch stufenweises Absenken der Gesamtosmolalität des Mediums kann mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus ermittelt werden, ab welchem osmotischen Schwellenwert die Aktivierung der Transporter für unterschiedliche organische Osmolyte einsetzt.

Wie in Abbildung 20, A zu sehen, sind HEK293-Zellen unter milden hypotonen Bedingungen (bis ~275 mOsm) bei der extrazellulären Anwesenheit von Taurin zur Volumenregulation fähig. Wird die Osmolalität auf 250 mOsm gesenkt (Abbildung 20, gefüllte Dreiecke), dann wird RVD der Zellen inhibiert und eine schwache Volumenzunahme (sekundäres Schwellen) ist ab ~ 10 min zu erkennen. Dieses sekundäre Schwellen wird durch das Absenken der Mediums-osmolalität auf 225 oder 200 mOsm deutlich verstärkt.

Jurkat-Lymphozyten weisen in hypotonem Medium unter vergleichbaren Bedingungen ein ähnliches Verhalten auf (Abbildung 20, C). In der extrazellulären Präsenz von erhöhten Taurinkonzentrationen sind sie bis zu einer Osmolalität des Mediums von 250 mOsm in der Lage ihr Volumen zu regulieren. Weiteres Absenken der Osmolalität auf 225 oder 200 mOsm verhindert die Volumenrückregulation und ein starkes sekundäres Zellschwellen ab 10 min ist zu erkennen (Abbildung 20, C, offene Kreise und gefüllte Rechtecke).

Die Substitution von Taurin durch myo-Inositol (Abbildung 20, B+D) ändert das Volumenverhalten beider Zelllinien deutlich. HEK293-Zellen sind bis zu einer osmotischen Stresshöhe von ~175 mOsm (Abbildung 20, B) zu einer raschen Volumenregulation innerhalb von ~10 bis 15 min fähig. Erst das Absenken der Osmolalität auf 150 mOsm (Abbildung 20, B, offene Dreiecke) führt zu einem schwachen aber stetigen sekundären Zellschwellen ab ~12 min. Durch weitere Reduktion der äußeren Osmolalität auf 125 mOsm wird dieses sekundäre Schwellen deutlich verstärkt (Abbildung 20, B, gefüllte Kreise).

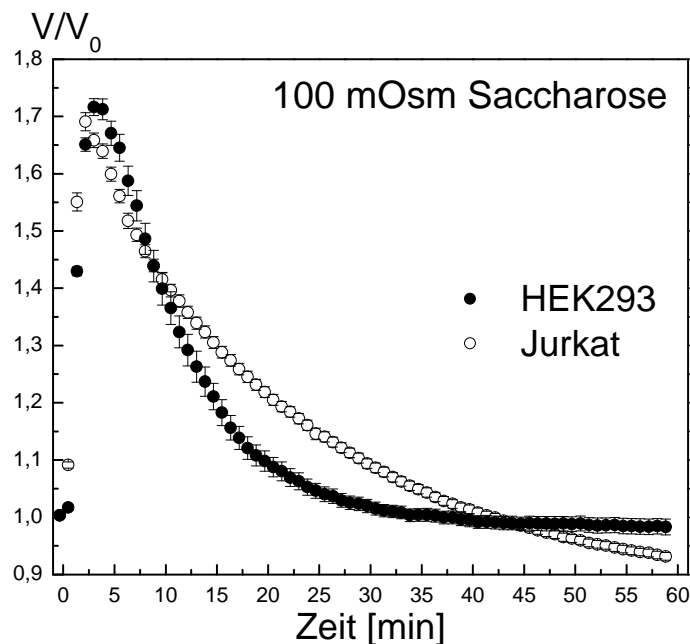


**Abbildung 20** Zeitliche Volumenänderung von HEK293 und Jurkat-Zellen in Taurin oder myo-Inositol-haltigen Medien variabler Osmolalität.

HEK293 (A+B) und Jurkat (C+D) Zellen wurden zunächst (Zeitpunkt  $t < 30$  s) in isotonem CGM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter variablen osmotischen Bedingungen (100-300 mOsm) mit 87-287 mM Taurin (A+C) oder myo-Inositol (B+D) als Hauptosmotikum im hypotonen VolumetriemEDIUM konfrontiert ( $t = 30$  s). Die relative Volumenänderung aus 27-86 Zellen (+SE) ist hier gegen die Zeit aufgetragen. Durch die extrazellulär erhöhte Taurin- oder myo-Inositol-Konzentration führt die schwellungsbedingte Aktivierung volumensensitiver Transporter zum konzentrationsgerichteten Einstrom der Osmolyte in die Zelle. Dieser Osmolyteinstrom wird durch das sekundäre Zellschwellen aufgezeigt. Für Taurin und myo-Inositol unterscheidet sich die osmotische Aktivierungsschwelle in beiden Zelllinien. So wird die Aktivierungsschwelle für den Transport von Taurin bei etwa  $< 250$  mOsm beobachtet, während diese für myo-Inositol  $< 150$  mOsm zu erkennen ist.

Im Vergleich zu Taurin (Abbildung 20, B, 200 mOsm) fällt das durch myo-Inositol hervorgerufene sekundäre Schwellen in HEK293-Zellen deutlich schwächer aus (Abbildung 20, B, 125 mOsm). Während die Volumenzunahme durch Taurin innerhalb von 10 min  $\sim 40$  % beträgt, verursacht myo-Inositol im selben Zeitraum lediglich einen Volumenzuwachs von  $\sim 5$ %. Durch die geringere hypotone Aufnahme von myo-Inositol, ist vor dem Einsetzen des sekundären Zellschwellens ein partielles RVD innerhalb von 7 min nach hypotonem Stress der Zellen zu erkennen (Abbildung 20, B, 125 und 150 mOsm). Unter 100 mOsm Bedingungen ist die Volumenregulationsfähigkeit der HEK293-Zellen im myo-Inositol-haltigen Medium bereits ab 5 min eingeschränkt (Abbildung 20, B, 100 mOsm). Dies deutet bereits in der frühen Phase des RVDs auf einen starken Influx des extrazellulären Osmolyten hin.

Wie in Abbildung 20 (D) zu erkennen, ist der RVD-inhibierende Effekt von myo-Inositol bei geringen Osmolalitäten auf Jurkat-Lymphozyten weit schwächer ausgeprägt als bei HEK293-Zellen (Abbildung 20, B, 100-150 mOsm). Lediglich bei den Osmolalitäten 100 und 125 mOsm (Abbildung 20, D) lässt sich eine schwache sekundäre Volumenzunahme von ~ 1-2% innerhalb von 10 min erkennen. Bei höheren Osmolalitäten (>125 mOsm) ist hingegen eine stetige Volumenreduktion über den gesamten Messzeitraum zu erkennen, wobei das isotone Ausgangsvolumen innerhalb der Messzeit von 20 min annähernd rückreguliert wird.



**Abbildung 21 Zeitlicher Vergleich der hypotonen Volumenregulation von HEK293 und Jurkat-Zellen**

HEK293 (gefüllte Kreise) und Jurkat (ungefüllte Kreise) Zellen wurden zu Beginn der Messung (Zeitpunkt  $t < 30s$ ) in isotonem CGM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 mOsm saccharosehaltigem VolumetriemEDIUM konfrontiert ( $t = 30 s$ ). Die relative Volumenänderung aus 88 HEK293 bzw. 174 Jurkat Zellen (+SE) ist hier im zeitlichen Verlauf dargestellt. Beide Zelllinien zeigen unter 100 mOsm Bedingungen zunächst ein schnelles osmotisches Zellschwellen innerhalb von ~3 min, wobei das relative Zellvolumen um ~70% zunimmt. Anschließend erfolgt über den Efflux intrazellulärer Osmolyte die Regulation des Zellvolumens, wodurch HEK293-Zellen innerhalb von 25-30 min und Jurkat-Lymphozyten nach etwa 40 min ihr isotones Ausgangsvolumen wieder erlangen.

Grund für die fehlende Deutlichkeit einer Aktivierungsgrenze für den Transport von myo-Inositol könnte die verzögerte Volumenregulationsfähigkeit von Jurkat-Lymphozyten im Vergleich zu HEK293-Zellen sein. Während HEK293-Zellen in 100 mOsm Saccharose-haltigem VolumetriemEDIUM innerhalb von 25-30 min ihr isotones Ausgangsvolumen rückregulieren (Abbildung 21, gefüllte Kreise), benötigen Jurkat-Lymphozyten unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen 40 min (Abbildung 21; ungefüllte Kreise). Im Vergleich zum isotonen Ausgangsvolumen weisen Jurkat-Lymphozyten 20 min nach 100 mOsm hypotonem Stress ein um etwa 20 % vergrößertes Zellvolumen auf (Abbildung 21). Diese verzögerte Volumenregulationsfähigkeit von Jurkat-Lymphozyten verringert den Effekt des sekundären Zellschwellens deutlich (Abbildung 20, D), wodurch eine Quantifizierung der Ergebnisse erforderlich war.

Um die Transportdynamik von Taurin und myo-Inositol in HEK293 und Jurkat-Zellen zu quantifizieren wurde der Membranpermeabilitätskoeffizient  $P$  jeweils aus den sekundären Schwellraten der volumetrischen Messungen bei den unterschiedlichen Osmolalitäten (Abbildung 20) bestimmt. Beim Permeabilitätskoeffizient  $P$  handelt es sich um ein Maß für den Nettovolumenfluss durch eine Membran der durch einen hydrostatischen oder osmotischen Druck hervorgerufen wird. Durch die Annahme einer linearen Beziehung zwischen dem sekundären Zellschwellen und der Aufnahme des im Medium vorhandenen organischen Osmolyts wurden die Permeabilitätskoeffizienten  $P$  [nm/s] für Taurin und myo-Inositol aus der maximalen Steigung der sekundären Volumenzunahme in einem Zeitintervall von 10-20 min über die Gleichung

$$P \approx \frac{R_0 \Delta(V/V_0)}{3 \Delta t} \quad (7)$$

berechnet (Professor Ryo Shirakashi (persönliche Mitteilung), University of Tokyo, Japan). Hierbei ist  $R_0$  der durchschnittliche isotone Zellradius (HEK=  $7,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ , Jurkat=  $8,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) und der Term  $\frac{\Delta(V/V_0)}{\Delta t}$  die durchschnittliche zeitliche Volumenänderung der Zellen zwischen 10 und 20 min nach hypotonem Stress, wobei es sich um die Steigung des sekundären Zellschwellens handelt. Die so berechneten  $P$ -Werte wurden gegen die Osmolalität des Volumetriemediums aufgetragen (Abbildung 22, Datenpunkte) und mit Hilfe der logistischen Funktion mit der Gleichung (9)

$$P_{fit} = \frac{P_{init} - P_{max}}{1 + (\frac{C}{C_{50}})^W} + P_{max} \quad (8)$$

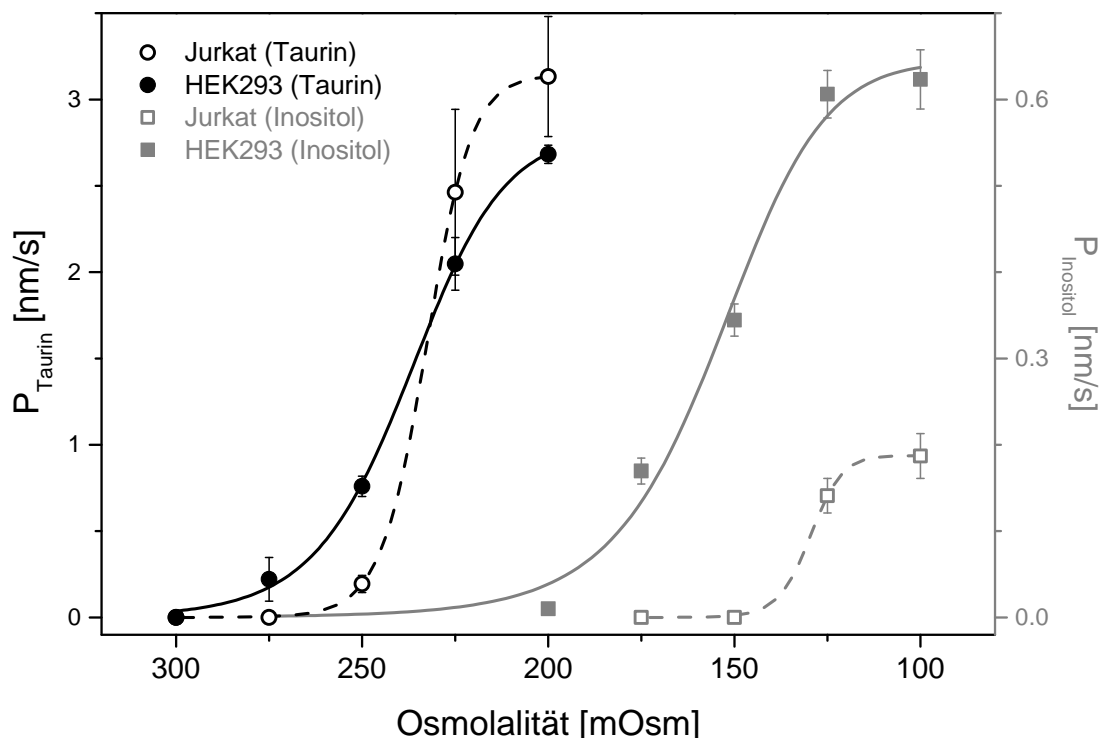
angepasst (Abbildung 22, Ausgleichskurven). Dabei ist  $P_{init} \approx 0$  der initiale und  $P_{max}$  der End-Permeabilitätskoeffizientenwert der logistischen Funktion. Der Exponent  $W$  des Terms  $(\frac{C}{C_{50}})^W$  beschreibt darüber hinaus die Steilheit im Wendepunkt der Kurve, wobei  $C$  der Osmolalität des Volumetriemediums und  $C_{50}$  der Osmolalität der Halbaktivierung der Permeabilität entspricht. Die  $C_{50}$ -Werte wurden hierbei als osmotische Aktivierungsschwelle für den Transport von Taurin und myo-Inositol interpretiert. Die Kurvenanpassung wurde mit Hilfe der Software Origin vorgenommen, wobei die in Tabelle 22 zusammengefassten  $P_{max}$  und  $C_{50}$  ermittelt wurden.

**Tabelle 22  $P_{max}$  und  $C_{50}$ -Werte der logistischen Kurvenanpassung der Permeabilitätskoeffizientenwerte von Jurkat und HEK293-Zellen für Taurin und myo-Inositol**

|              |        | $P_{max}$ [nm/s] | $C_{50}$ [mOsm] |
|--------------|--------|------------------|-----------------|
| Taurin       | Jurkat | 3,1              | 232             |
|              | HEK293 | 2,8              | 237             |
| myo-Inositol | Jurkat | 0,19             | 129             |
|              | HEK293 | 0,64             | 154             |



Wie in Abbildung 22 zu sehen ist die Membran in beiden Zelllinien unter 300 mOsm Bedingungen sowohl für Taurin (Abbildung 22, Kreise) wie auch für myo-Inositol (Abbildung 22, Vierecke) impermeabel ( $P \approx 0$ ). Durch Reduktion der Osmolalität des Volumetriemediums erfolgt in HEK293 und Jurkat-Zellen die Permeabilisierung der Membran zuerst für Taurin ab  $\sim 225$  mOsm, wobei die Membranpermeabilität für Taurin in Jurkat einen Maximalwert von  $P_{max} = 3,1$  nm/s und für HEK293 von  $P_{max} = 2,8$  nm/s erreicht. Da die Membranpermeabilität in linearer Beziehung zu der von den Zellen aufgenommenen Osmolytmenge steht, erfolgt in Jurkat-Lymphozyten demnach ein stärkerer Taurin-Einstrom als in HEK293-Zellen. Unter Berücksichtigung der  $C_{50}$ -Werte (Tabelle 22) befindet sich die osmotische Aktivierungsschwelle für den Transport von Taurin in HEK293-Zellen bei  $\sim 237$  mOsm und in Jurkat-Lymphozyten bei  $\sim 232$  mOsm.



**Abbildung 22 Osmotische Aktivierungsschwelle des Taurin- bzw. myo-Inositol-Transports in HEK293- und Jurkat-Zellen**

Die Bestimmung der hypotonen Aktivierungsschwelle für den Transport von Taurin (Kreise) und myo-Inositol (Vierecke) in HEK293 (gefüllte Symbole) und Jurkat-Zellen (ungefüllte Symbole) erfolgte durch die Analyse der volumetrischen Daten aus Abbildung 20. Aus den sekundären Zellschwellraten in einem Zeitintervall von 10-20 min nach hypotoner Exposition der Zellen aus Abbildung 20 (weitere Erläuterung siehe Text) erfolgte die Berechnung der Membranpermeabilitätskoeffizienten ( $P$ ) nach Gleichung (8). Zur Bestimmung der osmotischen Aktivierungsschwelle des Taurin- und myo-Inositol-Transports wurden die  $P$ -Werte in Abhängigkeit der Osmolalität des verwendeten Volumetriemediums (100-300 mOsm) aufgetragen. Anhand des Graphen ist zu erkennen, dass die Permeabilität für beide Osmolyte in einem deutlich unterschiedlichen osmotischen Bereich gegeben ist. Während der Transport von Taurin ab einem osmotischen Stress von  $< \sim 250$  mOsm aktiviert wird, ist die Permeabilität für myo-Inositol erst ab einem hypotonen Stress  $< \sim 150$  mOsm vorhanden. Unter Berücksichtigung der logistischen Anpassungen der Permeabilitätskoeffizientenwerte (Gleichung (9); Linien) und der zugehörigen Osmolalitäten am Wendepunkt der Funktionen ( $C_{50}$ -Werte) kann die osmotische Aktivierungsschwelle für den Transport von Taurin auf  $\sim 235$  mOsm und für myo-Inositol zwischen  $\sim 150 - 130$  mOsm bestimmt werden.

Unter diesen mild hypotonen Bedingungen ist die Membran beider Zelllinien jedoch undurchlässig für myo-Inositol. Erst das Absenken der Osmolalität unter 175 mOsm aktiviert die Permeabilisierung der Membran für myo-Inositol. Wie bereits an den volumetrischen Kurven zu sehen (Abbildung 20, Text siehe oben), ist beim Vergleich der  $P_{max}$ -Werte (Tabelle 22) eine reduziertere Membranpermeabilität für myo-Inositol im Vergleich zu Taurin zu erkennen. Obwohl die hypoton induzierte Membranpermeabilität für myo-Inositol in beiden Zelllinien weit schwächer ausgeprägt ist, ermöglichen die  $C_{50}$ -Werte eine Bestimmung der osmotischen Aktivierungsschwelle für den Transport von myo-Inositol in HEK293-Zellen bei ~150 mOsm und bei Jurkat-Lymphozyten in den hypotonen Bereich von ~130 mOsm.

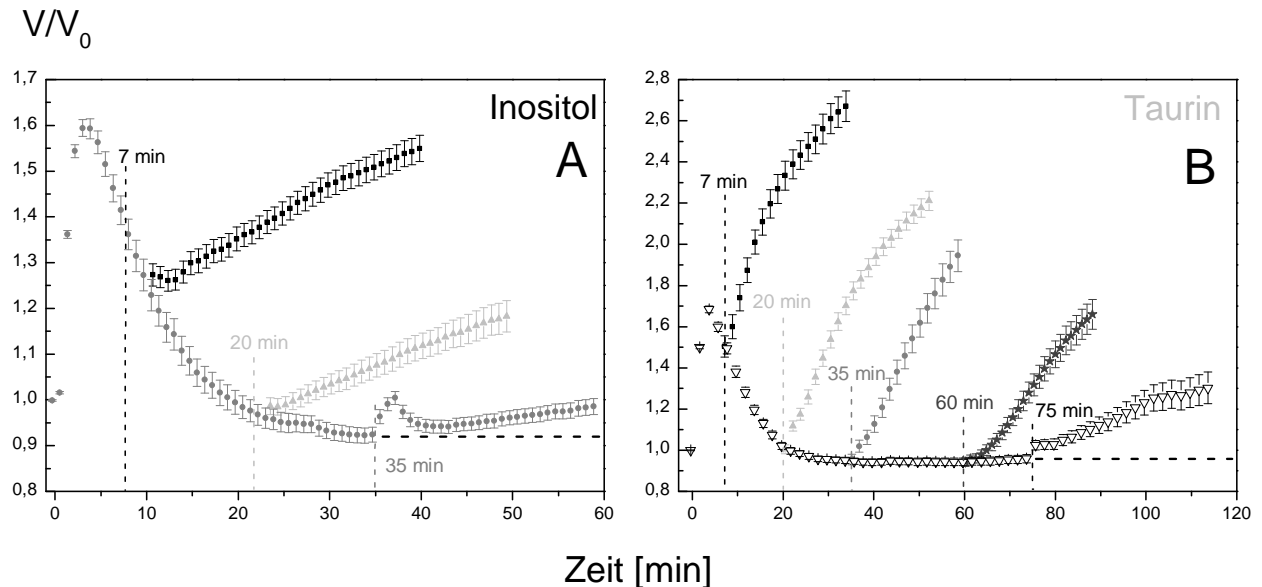
*(b) Ermittlung der Aktivitätsdauer von Transportern für Taurin und myo-Inositol während des RVD-Prozesses*

Im zweiten Teil dieser Analyse wurde die Deaktivierung bzw. die Aktivitätsdauer des Transports von Taurin und myo-Inositol bei der hypotonen Volumenregulation mit Hilfe volumetrischer Messungen charakterisiert. Bei diesen Versuchen wurden HEK293-Zellen zunächst mit 100 mOsm Saccharose-haltigen StandardvolumetriemEDIUM konfrontiert. Aufgrund der fehlenden Membrandurchlässigkeit der Zellen für Saccharose [68], sind die Zellen in diesem Medium innerhalb von ~30 min zur vollständigen Volumentrückregulation fähig (Abbildung 21). Wie im ersten Teil dieser Untersuchung bereits gezeigt (siehe oben), sind unter 100 mOsm Bedingungen die Transportwege für Taurin wie auch für myo-Inositol aktiviert.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwischen 7-85 min nach dem initialen hypotonen Stress) wurde den Zellen dann myo-Inositol oder Taurin angeboten (Beispiele in Abbildung 23, A+B), indem das Saccharose-haltige VolumetriemEDIUM durch äquiosmolares myo-Inositol- (Abbildung 23, A) oder Taurin-haltiges (Abbildung 23, B) VolumetriemEDIUM (jeweils 87 mM) ersetzt wurde. Der Konzentrationsgradient für beide Osmolyte ist dabei in die Zelle gerichtet, so dass Taurin oder myo-Inositol entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zellen einströmen können. Das Einströmen von Osmolyten in die Zelle verursacht ein sekundäres Zellschwellen (Vergleiche erster Teil). Durch zeitliche Variation der hypotonen Taurin- oder myo-Inositol-Exposition der Zellen kann auf diese Weise die schwellungsinitiierte Aktivitätsdauer der Transportwege für beide organische Osmolyte ermittelt werden.

Für diesen Versuchsteil wurden ausschließlich HEK293-Zellen verwendet, da sie sich aufgrund ihres schnellen Volumenregulationsvermögens hierfür am besten eigneten. Ein Ende der Membranpermeabilität für Taurin oder myo-Inositol konnte für Jurkat-Lymphozyten auch 110 min nach initialem hypotonen Stress nicht ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 23 zu erkennen, führt der stark hypotone Stress der Zellen in Saccharose-haltigem

Volumetriemedium innerhalb von etwa 3 min zu einer Volumenzunahme um 60-70 % des isotonen Ausgangsvolumens. Anschließend ist die Volumenregulation der Zellen durch die Aktivierung von Mechanismen für den Efflux von intrazellulären Elektrolyten und organischen Osmolyten zu erkennen.



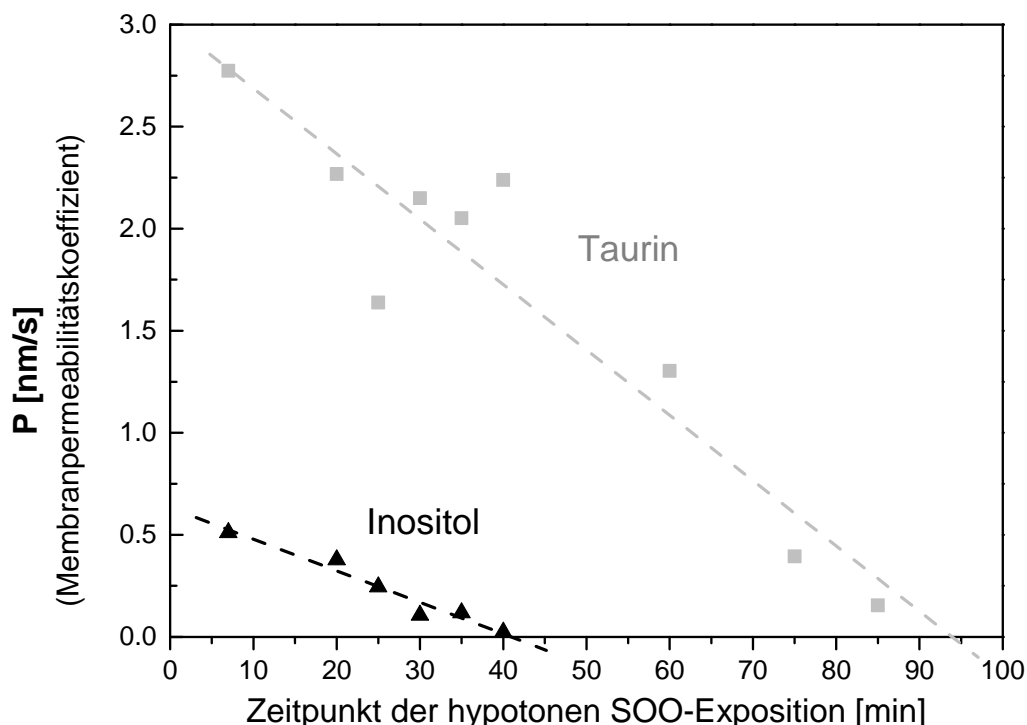
**Abbildung 23 Analyse der Aktivitätsdauer von schwellungsaktivierten Transportwege für Taurin und myo-Inositol in HEK293-Zellen**

Die Änderung des relativen Zellvolumens von 19-52 HEK293-Zellen aus 2-3 unabhängigen Messungen ist hier im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Zellen wurden zunächst mit 100 mOsm Saccharose-Volumetriemedium hypoton gestresst. In diesem Medium sind die Zellen zur vollständigen Volumenregulation innerhalb von ~30 min fähig (siehe Abbildung 21). Ohne die extrazelluläre Osmolalität zu ändern, wurde anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (7-85 min nach dem initialen hypotonen Stress) das Saccharose-Medium durch äquiosmolares (100 mOsm) myo-Inositol- (A) oder Taurin-Volumetriemedium (B) ersetzt. Durch den plötzlichen konzentrationsgerichteten Einstrom des entsprechenden Osmolyts erfolgte bei gegebener Membranpermeabilität sekundäres Zellschwellen (Anstieg von  $V/V_0$ ). Wird den Zellen 7 min nach initialem hypotonen Stress myo-Inositol oder Taurin angeboten, dann ist anschließend deutliches Zellschwellen zu erkennen, was die Permeabilität der Membran für beide Osmolyte aufzeigt. Das sekundäre Zellschwellen und damit die Permeabilität der Membran für myo-Inositol bzw. Taurin sinkt, je später die organischen Osmolyte im Verlauf des RVDs angeboten werden. Während die Permeabilität der Membran für myo-Inositol bereits 35 min nach hypotonem Stress deutlich verringert ist (geringe Steigung des sekundären Schwellens), fällt die Durchlässigkeit für Taurin erst ab ~75 min deutlich ab.

Wird den Zellen 7 min nach initialem hypotonen Stress myo-Inositol (Abbildung 23, A) oder Taurin (Abbildung 23, B) im extrazellulären Medium angeboten, so findet ein konzentrationsgerichteter Einstrom des jeweiligen Osmolyten durch die aktivierten Transportwege statt. Dieser Einstrom von myo-Inositol oder Taurin in die Zellen ist durch ein starkes sekundäres Zellschwellen gekennzeichnet. Dabei ist die von Taurin verursachte Schwellungsrate (Abbildung 23, B, 7 min) etwa 5-6-Fach so hoch wie die von myo-Inositol (Abbildung 23, A). Werden die organischen Osmolyte zu späteren Zeitpunkten angeboten, so verlangsamen sich die Schwellraten der Zellen je später das Saccharose-Volumetriemedium durch myo-Inositol oder Taurin-haltige

Medien ersetzt wird. Die Permeabilität der Membran für myo-Inositol und Taurin nimmt demnach im Verlauf der hypotonen Volumenregulation ab.

Zur Bestimmung des Zeitpunktes der Deaktivierung des schwellungsinduzierten Transports organischer Osmolyte wurde Analog zum ersten Versuchsteil (siehe oben) die Membranpermeabilitätskoeffizienten ( $P$ ) aus den gemittelten Steigungswerten bestimmt. Hierzu wurde aus den in einem Zeitintervall von  $\sim 10$ - $20$  min nach dem erfolgten Mediumwechsel gemittelten sekundären Schwellungsraten die  $P$ -Werte für Taurin und myo-Inositol nach der Gleichung (7) berechnet. Die so erhaltenen Permeabilitätskoeffizienten wurden gegen den Zeitpunkt der hypotonen Taurin oder myo-Inositol-Exposition aufgetragen (Abbildung 24, Datenpunkte) und mit Hilfe einer linearen Ausgleichsfunktion angepasst (Abbildung 24, gestrichelte Linien).



**Abbildung 24 Bestimmung der Aktivitätsdauer hypoton aktivierter *small organic osmolyte* Transportwege für Taurin und myo-Inositol in HEK293-Zellen**

Die Bestimmung der Aktivitätsdauer hypoton aktivierter Transportwege für Taurin (Kreise) und myo-Inositol (Vierecke) in HEK293 erfolgte durch die Analyse der volumetrischen Kurven in Abbildung 23. Aus den sekundären Zellschwellraten in einem Zeitintervall von 10-20 min nach Substitution des 100 mOsm Saccharose-Mediums durch äquiosmolares Taurin oder myo-Inositol-Medium erfolgte die Berechnung der Membranpermeabilitätskoeffizienten ( $P$ ) für beide Osmolyte nach Gleichung (7). Zur Bestimmung der Aktivitätsdauer hypoton aktivierter Transportwege für Taurin und myo-Inositol wurden die  $P$ -Werte in Abhängigkeit des Zeitpunktes der hypotonen SOO-Exposition der Zellen aufgetragen. Wie im Graph zu erkennen, ist die Membran 7 min nach erfolgtem Mediumwechsel für Taurin deutlich stärker permeabel als für myo-Inositol ( $P(\text{Taurin}) \approx 2,7$  nm/s;  $P(\text{myo-Inositol}) \approx 0,5$  nm/s). Für beide Osmolyte nimmt die Permeabilität jedoch mit fortschreitendem zeitlichen Verlauf des RVD ab. Während die Membran nach 30 min nur noch schwach permeabel für myo-Inositol ist ( $P \approx 0,25$  nm/s) ist die Durchlässigkeit für Taurin noch hoch ( $P \approx 2,2$  nm/s). Wie durch die lineare Regression der Permeabilitätskoeffizientenwerte (gestrichelte Linien) zu erkennen, endet die Membranpermeabilität (und damit die Aktivität der schwellungsaktivierten Transportwege) für myo-Inositol  $\sim 40$  min und für Taurin  $\sim 95$  min nach initialem hypotonen Stress

Wie bereits in den volumetrischen Kurven zu erkennen (siehe oben), ist die Permeabilität der Membran für Taurin deutlich höher als für myo-Inositol. Demnach liegt der Permeabilitätskoeffizient für Taurin 7 min nach dem initialen hypotonen Stress bei seinem höchsten Wert von  $\sim 2,7$  nm/s und für myo-Inositol bei  $\sim 0,5$  nm/s. Mit fortschreitendem zeitlichem Verlauf des RVD nehmen die Membranpermeabilitäten für beide organische Osmolyte ab, wie anhand der linearen Ausgleichsgeraden in Abbildung 24 zu erkennen. Dies zeigt, dass die Transportwege organischer Osmolyte einen Efflux von Taurin oder myo-Inositol nur zeitlich begrenzt vermitteln und diese mit fortschreitender Volumenrückregulation inaktiviert werden. Für beide Osmolyte ist die Membranpermeabilität 30 min nach dem initialen hypotonen Stress deutlich verringert (Abbildung 24). Während die Membran nach dieser Zeitdauer noch eine starke Membrandurchlässigkeit für Taurin aufweist ( $\sim 2,2$  nm/s), ist die myo-Inositol-Aufnahme der Zellen nur noch gering ( $\sim 0,25$  nm/s).

Durch die Extrapolation der linearen Ausgleichsgeraden kann die Aktivitätsdauer der schwellungsaktivierten Transporter für Taurin und myo-Inositol ermittelt werden. Dieser Zeitpunkt ist gekennzeichnet durch einer Volumenkonstanz auf isotonem Zellvolumenniveau trotz der Verfügbarkeit von Taurin oder myo-Inositol im extrazellulären Medium ( $P = 0$ ). Für myo-Inositol endet die Membranpermeabilität  $\sim 40$  min und für Taurin nach  $\sim 95$  min nach 100 mOsm hypotonem Stress.

Unter Berücksichtigung des Volumenregulationsverhaltens in 100 mOsm Saccharose-Medium (Abbildung 21) steht die hier bestimmte Aktivitätsdauer des Taurin-Transportweges in Widerspruch mit der Annahme eines einzelnen volumensensitiven Kanals (siehe Diskussion, Kapitel 5.2.2), dessen Selektivität über das Zellvolumen gesteuert wird. Anhand der Saccharose-Kontrollmessung in Abbildung 21 ist deutlich zu erkennen, dass das isotone Ausgangsvolumen der Zellen nach  $\sim 30$  min wiederhergestellt ist und somit eine mechanische Belastung ab diesem Zeitpunkt nahezu ausgeschlossen werden kann. Da der Taurin-Effluxweg jedoch erst nach 95 min inaktiviert wird, ist eine mechanische Steuerung des beteiligten Transporters/Kanals unwahrscheinlich.

### 4.3 Molekularbiologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von SLC5A3 und SLC6A6

Über die volumetrische Charakterisierung des hypotonen Transports von SOOs hinaus wurde in dieser Arbeit die RVD-Beteiligung potentieller Transporterproteine untersucht. Da die volumetrischen Ergebnisse auf separate Transportwege mit substratspezifischer Präferenz hinweisen (siehe 4.2.2), wurden als mögliche Kandidaten der myo-Inositol-Transporter SLC5A3 (SMIT; Na<sup>+</sup>/myo-Inositol Kotransporter) und der Taurin-Transporter SLC6A6 (TauT; Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>abhängiger Taurintransporter) aus der *Solute Carrier* (SLC)-Proteinfamilie in näheren Betracht gezogen.

Beide Transporter repräsentieren weitestgehend substratspezifische Plasmamembranproteine, die bereits mit der hypertonen Volumenregulation in Verbindung gebracht wurden (RVI [11]). So konnte gezeigt werden, dass die Expression von SLC5A3 (myo-Inositol) und SLC6A6 (Taurin) hyperton induziert wird, um die zelluläre Aufnahme von Taurin und myo-Inositol im Verlauf der hypertonen Volumenregulation (RVI) sowie zur osmotischen Langzeitvolumenanpassungen zu ermöglichen [4,13,122].

Um eine mögliche Beteiligung von SLC-Transportern an der hypotonen Volumenregulation zu überprüfen wurde ein kombinierter molekularbiologischer und mikroskopischer Versuchsansatz verfolgt. Hierfür wurde zunächst die Genexpression von SLC5A3 (myo-Inositol) und SLC6A6 (Taurin) in den humanen Zelllinien Jurkat, HEK293 und HepG2 im zeitlichen Verlauf der hypotonen Volumenregulation mit Hilfe semiquantitativer Reverse-Transkriptase (RT) PCR analysiert. Im Anschluss an diese molekularbiologische Untersuchung erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse des SLC5A3-Transporters unter isotonen und hypotonen Bedingungen. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie wurde zunächst die Lokalisation des in HEK293-Zellen exprimierten fluoreszenzmarkierten Fusionsproteins SLC5A3-EGFP unter 300 und 100 mOsm Bedingungen untersucht. Außerdem erfolgte im zweiten fluoreszenzmikroskopischen Teil die Analyse der Membranpräsenz des nativ exprimierten SLC5A3-Proteins unter variablen osmotischen Bedingungen mit Hilfe der hochauflösenden Mikroskopietechnik *d*STORM.

#### 4.3.1 Expressionsanalyse potentieller Transporter für organische Osmolyte

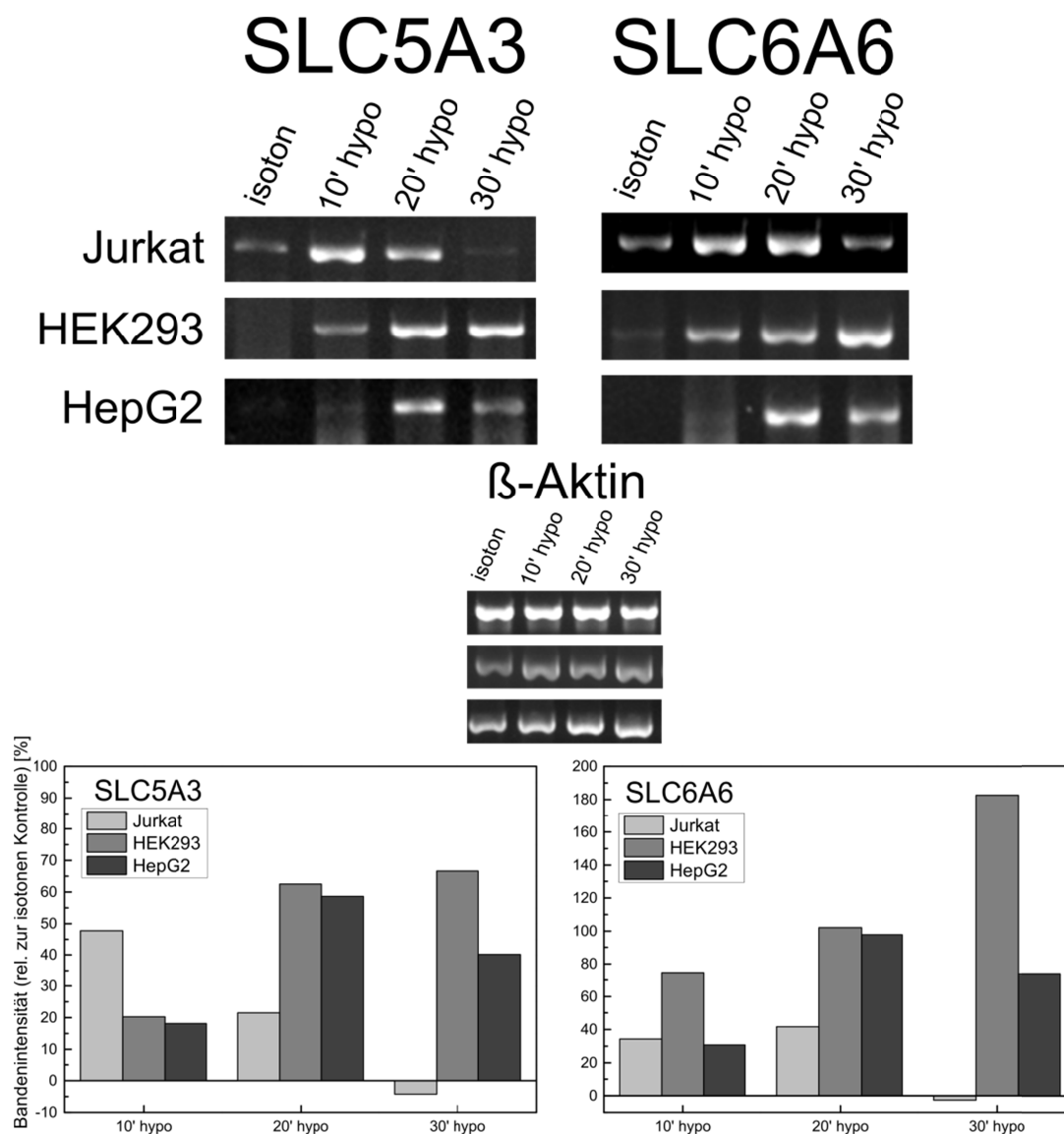
SLC5A3 und SLC6A6 repräsentieren mögliche Kandidaten, die aufgrund ihrer Substratspezifität und ihrer zellulären Lokalisation Anforderungen einer potentiellen RVD-Beteiligung erfüllen (siehe Diskussion, Kapitel 5.2.2). Da eine RVD-Beteiligung potentieller Transporter für *small organic osmolytes* deren Genexpression in zahlreichen Zellen voraussetzt, wurde in dieser Arbeit erstmals die Transkription von SLC5A3 und SLC6A6 im zeitlichen Verlauf der hypotonen Volumenregulation untersucht. Die Analyse der zellulären mRNA-Konzentration erfolgte hierbei mit Hilfe semiquantitativer RT(Reverse Transkriptase)-PCR unter Verwendung der humanen Zelllinien Jurkat, HEK293 und HepG2.

Vor der Extraktion der Gesamt-RNA wurden die Zellen jeweils für 10, 20 bzw. 30 min mit 100 mOsm Bedingungen durch Substitution des isotonen CGMs mit 100 mOsm Zellkulturmedium konfrontiert. Das hypotone Zellkulturmedium wurde hierbei durch die Verdünnung des jeweiligen Zellkulturmediums mit sterilem ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Nach der hypotonen Stimulation der Zellen erfolgte die RNA-Isolation und Semiquantifizierung der mRNA mit Hilfe genspezifischer Primer für SLC5A3 und SLC6A6 (siehe Tabelle 5) zur Basis des Gentranskripts von  $\beta$ -Aktin.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist der Einfluss von stark hypotonem Stress auf das mRNA-Niveau beider Transporter in allen untersuchten Zelllinien tendenziell ähnlich. Unter isotonen Bedingungen wird die mRNA von sowohl SLC5A3 wie auch SLC6A6 nur gering exprimiert. Lediglich bei Jurkat und HEK293-Zellen sind schwache Gelbanden zu erkennen (Abbildung 25, oben). Das Absenken der extrazellulären Osmolalität auf 100 mOsm induziert jedoch in allen Zelllinien die Expression von SLC5A3 und SLC6A6.

Innerhalb von 10 min nach hypotonem Stress wird hierbei die Genexpression von SLC5A3 und SLC6A6 in allen drei untersuchten Zelllinien deutlich erhöht. Unter Berücksichtigung der Bandenintensitäts-Analyse (Abbildung 25, unten) nimmt die Transkription von SLC5A3 hierbei um 20-65% und SLC6A6 um 30-100% im Vergleich zum isotonen Niveau zu. Jurkat und HepG2-Zellen erreichen zwischen 10-20 min für SLC5A3 und SLC6A6 ihr Maximalniveau.

Im Anschluss ist 30 min nach hypotonem Stress bei Jurkat und Hep-G2-Zellen eine deutliche Abnahme der Bandenintensität zu erkennen (Abbildung 25, oben). Im Vergleich zum 20 min-Wert sinkt hierbei das Transkriptionsniveau für SLC5A3 und SLC6A6 um etwa 20-40% (Abbildung 25, unten). Lediglich bei HEK293-Zellen ist 30 min nach hypotonem Stress ein gleichbleibendes (SLC5A3) oder höheres (SLC6A6) Expressionsniveau als nach 20 min zu erkennen.



**Abbildung 25 Einfluss von hypotonem Stress auf das mRNA-Niveau der Transporter SLC5A3 und SLC6A6**  
 Semiquantitative Analyse des mRNA-Niveaus von SLC5A3 (Gelbild links) und SLC6A6 (Gelbild rechts) in den Zelllinien Jurkat, HEK293 und HepG2 zur Basis des Transkripts von  $\beta$ -Aktin (Gelbild mitte). Die Gesamt-mRNA wurde von isoton (CGM) und jeweils 10, 20 und 30 min hypoton vorbehandelten Zellen extrahiert. Anschließend erfolgte die Semiquantifizierung der mRNA mit Hilfe genspezifischer Primer für SLC5A3 und SLC6A6 (semiquantitativer RT(Reverse Transkriptase)-PCR). Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mit dem Programm ImageJ und Intensitätswerte wurde anschließend relativ zur isotonen Kontrolle berechnet (Diagramm unten). Während die mRNA von SLC5A3 und SLC6A6 unter isotonen Bedingungen nur gering exprimiert wird, führt anhaltender hypotoner Stress zu einer deutlichen gesteigerten Transkriptionsrate beider Transporter in allen untersuchten Zelllinien. (Für weitere Erläuterungen siehe Text)

Die maximale Expression wird dabei zelltypspezifisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht. Während die Expression von SLC5A3 Jurkat-Zellen bereits ihr maximales Niveau nach 10 min erreicht, ist dieses bei HepG2 erst nach 20 und wird bei HEK293 erst am Ende der Messung bei 30 min erreicht. In gleicher Weise wird die maximale Transkription von SLC6A6 in den drei Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht. In Jurkat und Hep-G2-Zellen ist das höchste



Expressionsniveau nach 20 min und bei HEK293-Zellen nach 30 min zu beobachten. Die zeitlichen Unterschiede sind dabei vermutlich auf die unterschiedliche Zellkulturbedingungen und abweichende experimentelle Temperaturbedingungen (Raumtemperatur) zurückzuführen. Insgesamt kann die Geschwindigkeit der Genexpression in diesen Versuchen jedoch in die Reihe Jurkat > Hep-G2 > HEK293 sortiert werden.

Zusammenfassend zeigen alle drei untersuchten Zelllinien eine vergleichbare Antwort als Reaktion auf 100 mOsm Bedingungen. Während die mRNA der Gene SLC5A3 und SLC6A6 unter isotonen Bedingungen nur sehr gering vorhanden ist, führen stark hypotone Bedingungen zu einer deutlichen Induktion der Transkription. Hierbei wird in den meisten Fällen die maximale Expressionsrate etwa 10-20 min nach Applikation der hypotonen Bedingungen erreicht. Tendenziell schließt sich nach 30 min ein sinkendes SLC5A3 und SLC6A6 mRNA-Niveau an, welches insbesondere bei den Zelllinien Jurkat und HepG2 deutlich zu beobachten ist.

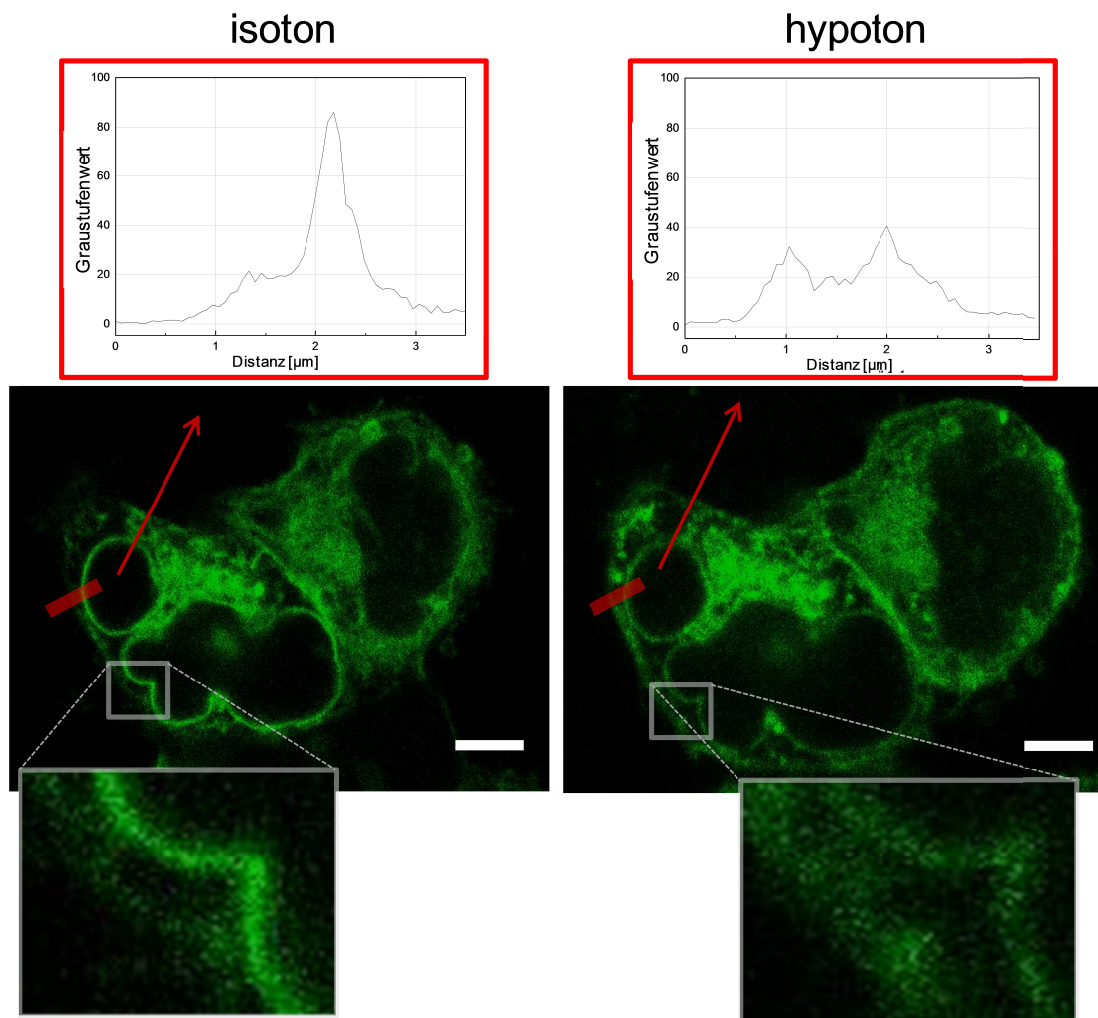
#### 4.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von SLC5A3 unter isotonen und hypotonen Bedingungen

Kiesel *et al.* 2006 zeigte mit Hilfe einzelzellspektroskopischer Messungen (Zellrotation) und videomikroskopischer Zellvolumetrie, dass Transporter für SOOs unbekannter molekularer Identität durch schwellungsbedingte Exozytose aus zytosolischen Vesikeln in die Plasmamembran integriert werden [15]. Da meiner Arbeitshypothese nach Transporter der SLC-Familie am RVD-beteiligten Transport von organischen Osmolyten beteiligt sind, muss sich damit die intrazelluläre Lokalisation der vermuteten Transporter unter hypotonen Bedingungen verändern. Um die potentielle Beteiligung von SLC-Transportern an der hypotonen Volumenregulation zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit erstmals die zelluläre Proteinverteilung des SLC5A3-Transporters über unterschiedliche fluoreszenzmikroskopische Verfahren untersucht.

##### (a) Konfokale Lasermikroskopie (LSM)

Im ersten Schritt wurde mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie (LSM) die zelluläre Lokalisation des mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) C-terminal markierten SLC5A3-Proteins in HEK293-Zellen unter iso- und hypotonen Bedingungen analysiert. Zur Herstellung des benötigten Plasmidkonstrukts wurde die aus Jurkat-Lymphozyten amplifizierte protein-kodierende Gensequenz des SLC5A3-Transporters in den Expressionsvektor pEGFP-N1 eingebracht (siehe

Methoden). Die transiente Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte ~30 h vor der lasermikroskopischen Untersuchung. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden 40 konfokale Schnittebenen unter isotonen (CGM) und hypotonen (100 mOsm myo-Inositol StandardvolumetriemEDIUM) Bedingungen aufgenommen, wobei in Abbildung 26 der optische Schnitt einer vergleichbaren Z-Position gezeigt ist.



**Abbildung 26 Zelluläre Verteilung des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP unter isotonen und hypotonen Bedingungen**

Die zelluläre Fluoreszenzverteilung SLC5A3-EGFP exprimierender HEK293-Zellen wurde ~30 h nach erfolgter transienter Transfektion unter isotonen (linke Seite) und stark hypotonen Bedingungen (rechte Seite) konfokal mikroskopisch untersucht. Die hypotone Fluoreszenzaufnahme erfolgte 10 min nach Substitution des sich auf den Zellen befindlichen CGMs durch 100 mOsm myo-Inositolhaltiges Medium. Das Absenken der äußeren Osmolalität auf 100 mOsm führt innerhalb von 10 min zu einer deutlichen Umverlagerung des Fluoreszenzsignals von perinuklearen Bereichen in Richtung Zellmembran. Im Fluoreszenzintensitätsprofil (rote Kästen) ist zu erkennen, dass sich das isotone Intensitätsmaximum reduziert (von der relativen Intensität ~85 auf ~40, siehe linker roter Kasten) und in der Distanz von 1 µm entfernt ein lokales Maximum im potentiellen Bereich der Zellmembran ausgebaut wird (rechter roter Kasten). Die Analyse der Fluoreszenzverteilung des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP unter isotonen und hypotonen Bedingungen zeigt, dass das SLC5A3-Protein durch hypotone Bedingungen in Richtung Plasmamembran umverlagert wird. Der Messbalken in der Fluoreszenzaufnahme entspricht einer Distanz von 5 µm.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen, ist das Fluoreszenzsignal unter isotonen Bedingungen (linke Seite) hauptsächlich in den perinuklearen Bereichen lokalisiert. Insbesondere das starke Fluoreszenzsignal um und neben dem Zellkern (Abbildung 26, links, neben den Zellkernen) weist auf die typische Lokalisation eines membranassoziierten Proteins hin, welches im endoplasmatischen Retikulum/Golgi und in der äußeren Kernhülle vorgefunden werden kann [123]. Darüber hinaus ist vergleichsweise wenig Fluoreszenzsignal in peripheren Zellbereichen zu erkennen. Dies wird insbesondere durch die Berücksichtigung des vergrößerten Ausschnitts in Abbildung 26 (links unten) deutlich. Demnach finden sich unter isotonen Bedingungen nur geringe Mengen des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP nahe der Plasmamembran.

Um eine Umverteilung des Fusionsproteins zu quantifizieren wurde ein relatives Fluoreszenzintensitätsprofil für den rot markierten Bereich der Aufnahme (Abbildung 26, mitte links) über die Intensitätsprofilfunktion der Software ImageJ erstellt (Abbildung 26, Graph links). Anhand dieses Fluoreszenzprofils ist deutlich zu erkennen, dass unter isotonen Bedingungen ein Bereich sehr hoher Fluoreszenzintensität (relative Intensität  $\sim 85$ ) direkt am Zellkern (vermutlich äußere Kernmembran) vorzufinden ist. Im Bereich der Plasmamembran hingegen liegt die relative Intensität bei  $\sim 20$ , was auf ein nur geringes Vorkommen des SLC5A3-EGFP hinweist.

Wird die äußere Osmolalität auf 100 mOsm abgesenkt, dann ändert sich die Lokalisation des Fluoreszenzsignals innerhalb von 10 min beträchtlich (Abbildung 26, rechte Seite). Wie am Fluoreszenzbild und der Bildvergrößerung in Abbildung 26 zu sehen nimmt hierbei das Fluoreszenzsignal um den Zellkern ab und wird in Richtung Plasmamembran verlagert (Abbildung 26, rechte Seite). Diese Umverteilung wird auch durch das Fluoreszenzintensitätsprofil (Abbildung 26, rechts, roter Kasten) widerspiegelt. Die relative Intensität des Maximums im Bereich des Zellkerns nimmt durch die hypotone Stimulation der Zellen etwa um die Hälfte ab. Im gleichen Zug wird ein  $\sim 1 \mu\text{m}$  entfernt lokalisiertes Intensitätsmaximum (Region der Zellmembran) deutlich ausgebaut.

Insgesamt zeigt dieses Ergebnis, dass die zelluläre Lokalisation des Fusionsprotein SLC5A3-EGFP durch die äußere Osmolalität beeinflusst wird. Stark hypotone Bedingungen führen zu einer Umverlagerung des Proteins in periphere Zellbereiche. Diese hypotone Umverteilung des SLC5A3-EGFP deutet auf eine mögliche Beteiligung des myo-Inositol-Transporters an hypotonen Volumenregulationsmechanismen hin. Aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens der konventionellen Lasermikroskopie stellt diese Umverlagerung jedoch lediglich einen Hinweis auf eine potentielle schwellungsaktivierte Integration des SLC5A3-Transporters in die Plasmamembran dar. Daher erfolgte im Weiteren die mikroskopische Untersuchung der Membranpräsenz des SLC5A3-Proteins.

*(b) Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie (dSTORM)*

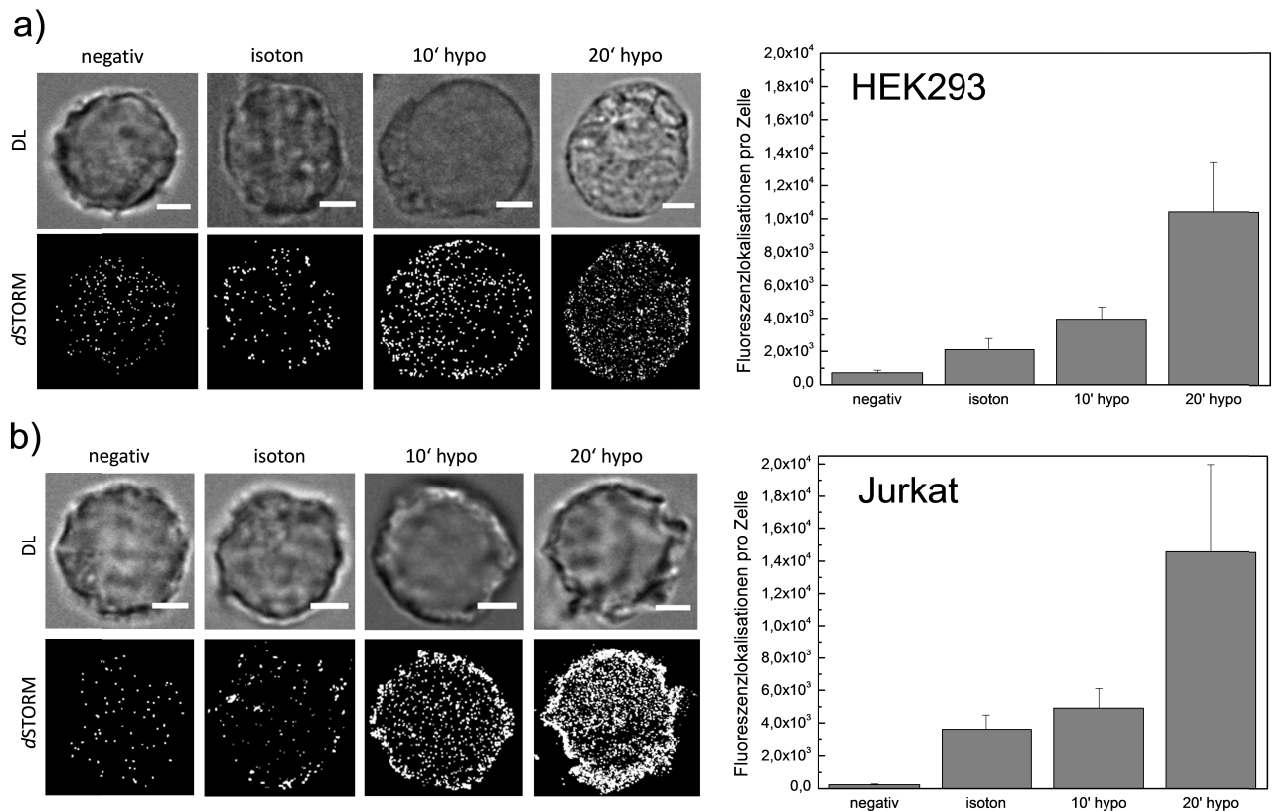
Im zweiten Schritt der mikroskopischen Untersuchung erfolgte die quantitative Analyse des membranassoziierten nativen SLC5A3-Transporters mithilfe des hochauflösenden lasermikroskopischen Verfahrens *dSTORM* (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*) [110,111]. Hierzu wurde zunächst der membranassoziierte SLC5A3-Transporter an einem extrazellulären Epitop mit dem photoschaltbaren Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 647 indirekt immunmarkiert. Anschließend wurde das AlexaFluor 647-Fluoreszenzsignal durch die Analyse der *dSTORM*-Aufnahmen quantifiziert.

Zum Vergleich der in der Plasmamembran vorhandenen Transporterproteinmenge unter verschiedenen osmotischen Bedingungen wurden dabei isoton bzw. für 10 oder 20 min stark hypoton vorinkubierte HEK293 und Jurkat-Zellen verwendet. Hypotone Bedingungen wurden induziert, indem das auf den Zellen befindliche CGM durch 100 mOsm myo-Inositol-haltiges Standardvolumetriemedium ersetzt wurde. In diesem hypotonen Medium sind die Zellen nicht zur Volumenregulation fähig, wodurch eine Inaktivierung von hypotonen Transportwegen für organische Osmolyte (und damit die Endozytose der beteiligten Transporter) verhindert wird [68] (vgl. Kapitel 4.2.2). Um das durch den sekundären Antikörper verursachte Hintergrundsignal zu Quantifizieren, wurde eine Negativkontrolle angefertigt, wobei die Zellen lediglich mit dem sekundären Antikörper markiert wurden.

Nach hypotonem Stress wurden die HEK293 und Jurkat-Zellen durch das Hinzufügen von Formaldehyd (4% (V/V) Endkonzentration) direkt in das auf den Zellen befindliche Medium fixiert. Anschließend wurde das membranassoziierte SLC5A3-Protein über den monoklonalen Antikörper (SAB1402920, Klons 3A6; Sigma) und einen AlexaFluor 647-gekoppelten sekundären Antikörper indirekt fluoreszenzmarkiert (siehe Methoden Kapitel 3.5). Nach der SLC5A3-Proteinvorhersage nach Kwon und Yamauchi [104] bindet der verwendete primäre Antikörper SAB1402920 an einem extrazellulären Epitop. Daher war die Fluoreszenzmarkierung des membranassoziierten SLC5A3-Transporters ohne die Permeabilisierung der Zellmembran mittels Detergenzien möglich, sodass die Immunfluoreszenzfärbung von intrazellulärem SLC5A3-Protein weitestgehend vermieden werden konnte. Die Antigenspezifität des verwendeten primären Antikörpers wurde zuvor fluoreszenzmikroskopisch verifiziert (siehe Anhang). Die vergleichende Analyse des membranintegrierten myo-Inositol-Transporters erfolgte über die Quantifizierung der Membranfluoreszenz mittels *dSTORM*.

Zum Vergleich des membranassoziierten SLC5A3-Transporters unter isotonen und hypotonen Bedingungen, wurde aus 8-16 Einzelzellaufnahmen die durchschnittliche Dichte der zellulären AlexaFluor 647-Fluoreszenzlokalisationen berechnet (Diagramm in Abbildung 27). Unter Berücksichtigung der durch das Durchlichtbild bestimmten Zellgrenzen wurden hierzu die aus

den *d*STORM-Aufnahmen ermittelten Einzelfluoreszenzlokalisationswerte (ermittelt über die *density-map*-Funktion des Programmes *rapidSTORM*) aufsummiert und so die zellulären Gesamtfluoreszenz im ausgewerteten Membranbereich bestimmt.



**Abbildung 27 *d*STORM-Analyse des membranassoziierten SLC5A3-Transporters unter isotonen und hypotonen Bedingungen**

Dargestellt ist die vergleichende Analyse des nativ exprimierten und membranassoziierten SLC5A3-Transporters unter 300 und 100 mOsm Bedingungen mit dem hochauflösenden lasermikroskopischen Verfahren *d*STORM. Die Analyse erfolgte über die Fluoreszenzquantifizierung des extrazellulär immunfluoreszenzmarkierten (AlexaFluor 647) SLC5A3-Proteins in HEK293 (a) und Jurkat-Zellen (b) (detaillierte Erläuterung siehe Text). HEK293 und Jurkat-Zellen zeigen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzdichte unter anhaltenden hypotonen Bedingungen. Die Anzahl der durchschnittlichen Lokalisationen nimmt hierbei innerhalb von 20 min um den 3,5-5-fachen isotonen Ausgangswert zu, was auf eine deutlich erhöhte Membranassoziation des SLC5A3-Transporters nach stark hypotonem Stress hindeutet. Der im Durchlichtbild dargestellte Messbalken entspricht einer Distanz von 5  $\mu\text{m}$ .

Wie an den *d*STORM-Aufnahmen in Abbildung 27 gezeigt, weisen in PBS inkubierte Jurkat und HEK293-Zellen unter isotonen Bedingungen eine geringe Zellmembranfluoreszenz auf. Das Fluoreszenzsignal ist über die gesamte Zellmembranfläche verteilt, was auf die korrekte Fokussierung der Membran in den *d*STORM-Aufnahmen hindeutet. Unter Berücksichtigung der quantitativen Fluoreszenzauswertung (Abbildung 27, Balkendiagramme) weisen isoton inkubierte HEK293- bzw. Jurkat-Zellen durchschnittlich zwischen 2.000-3.000 Fluoreszenzlokalisierungen im ausgewerteten Membranausschnitt auf. Wird die extrazelluläre Osmolalität auf 100 mOsm erniedrigt, dann ist eine Steigerung der Membranfluoreszenz zu beobachten (Abbildung 27; *d*STORM-Aufnahmen). Innerhalb von 10 min führt der Stress der Zellen mit 100 mOsm myo-Inositolmedium zu einer Verdoppelung der durchschnittlichen Fluoreszenzlokalisierungen im

Vergleich zu den isoton inkubierten Zellproben. Sowohl bei Jurkat wie auch bei HEK293-Zellen steigt die Anzahl der zellulären Fluoreszenzlokalisationen dabei auf einen durchschnittlichen Wert von ~4.000 (Abbildung 27; Balkendiagramm).

Wird der stark hypotone Stress für 20 min aufrecht erhalten, dann ist eine weitere Steigerung der Membranfluoreszenz zu beobachten. Die Fluoreszenzdichte nimmt bei HEK293-Zellen auf ~10.000 und bei Jurkat-Zellen auf ~15.000 zelluläre Lokalisationen zu. Die Anzahl der zellulären AlexaFluor 647-Fluoreszenzlokalisationen nimmt demnach innerhalb von 20 min um den 3,5 - 5-fachen isotonen Ausgangswert zu.

Jurkat und HEK293-Zellen weisen somit ein vergleichbares Verhalten beim Stress mit 100 mOsm myo-Inositol-haltigem Volumetriemedium auf, wobei durch anhaltende hypotone Bedingungen die Membranfluoreszenz signifikant zunimmt. Da die Anzahl der zellulären Fluoreszenzlokalisationen proportional zur Anzahl der in der Plasmamembran vorhandenen SLC5A3-Transportermenge ist, nimmt damit die Anzahl an membranassoziierten SLC5A3-Transportern durch hypotonen Stress der Zellen zu. Insgesamt zeigen die Ergebnisse damit deutlich, dass die Membranassoziation des myo-Inositol-Transporter SLC5A3 durch hypotone Bedingungen begünstigt wird.

## 5. Diskussion

Die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse zur Untersuchung der Mechanismen der hypotonen Volumen Anpassung von Säugetierzellen aus Kapitel 4 werden in den nun folgenden Teilen eingehend interpretiert.

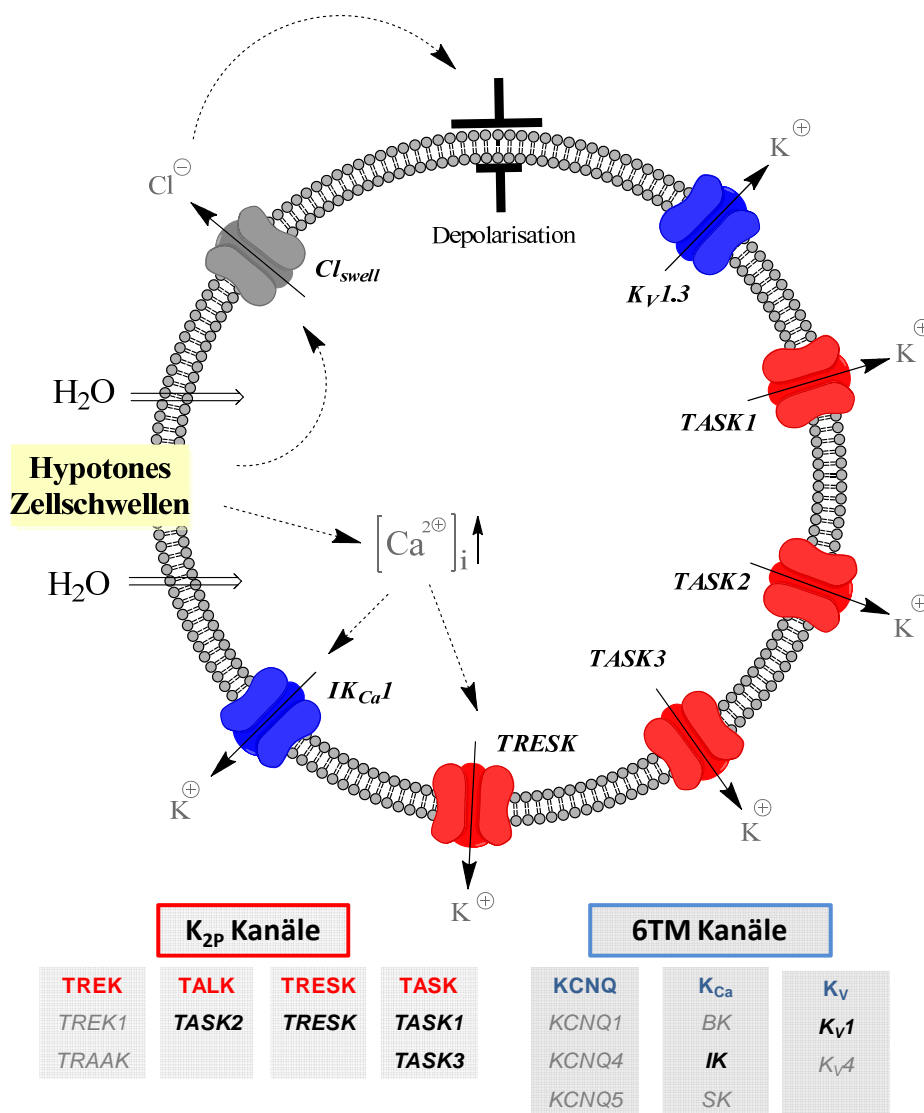
### 5.1 Beteiligung der Zwei-Poren Domänen $K^+$ -Kanäle ( $K_{2P}$ ) am RVD muriner und humaner T-Lymphozyten

Insbesondere für periphere Blutzelltypen wie beispielsweise T-Lymphozyten sind die Mechanismen der osmotischen Volumenregulation aus unterschiedlichen Gründen bedeutend. So sind T-Zellen zum einen bei der Passage entzündlicher Gewebe, dem Verdauungstrakt oder der Niere beträchtlichen osmotischen Schwankungen ausgesetzt [2,124], wobei ihre Zellintegrität und immunologische Funktion nur durch eine effiziente Volumenregulation aufrechterhalten werden kann. Zum anderen werden die Mechanismen der Volumenregulation von Lymphozyten aktiv eingesetzt, um ihre Zellform für die Migration oder der aktiven Fortbewegung im Gewebe zu modifizieren [2]. Gemeinsam ist hierbei nahezu allen volumenadaptiven Mechanismen die maßgebliche Beteiligung von Kaliumkanälen (siehe Einleitung Kapitel 1.2).

Der schwellungsaktivierte Kaliumefflux in Lymphozyten erfolgt nach bisherigen Modellen maßgeblich über die Aktivierung der  $6TM/P$ -Kanäle  $K_V1.3$  sowie  $IK_{Ca1}$  [16,28,35]. Wie die volumetrischen Analysen mit den Blocker ShK und TRAM34 übereinstimmend bestätigten (Abbildung 13 und Abbildung 17), zeigen auch beide Kanäle eine Beteiligung am RVD-Prozess der untersuchten  $CD4^+$ -T-Zellen. Während  $IK_{Ca1}$  hierbei jedoch nur eine geringe volumenregulatorische Beteiligung in murinen wildtypischen Zellen zeigte (Abbildung 13), wiesen sowohl die Untersuchung humaner wie auch muriner  $CD4^+$ -T-Zellen auf die bereits bekannte entscheidende Rolle des  $K_V1.3$ -Kanals bei osmoregulatorischen Mechanismen hin (siehe Abbildung 13 und Abbildung 17).

Neben den  $6TM/P$ -Kanälen identifizierten die Analysen dieser Arbeit erstmals (Kapitel 4.1) eine Beteiligung der  $K_{2P}$ -Kanäle TASK1, TASK2, TASK3 und TRESK am RVD muriner und humaner  $CD4^+$ -Lymphozyten. Beurteilt am RVD-inhibitorischen Einfluss der verwendeten Kaliumkanalblocker sowie den Permeabilitätsanalysen der wildtypischen und transgenen murinen Zellen, besitzen die Kanäle TASK2 und TRESK sowohl in murinen wie auch in humanen  $CD4^+$ -T-Zellen eine dem  $K_V1.3$ -Kanal etwa gleichbedeutende RVD-Relevanz. Im Gegensatz zu TASK2 und TRESK scheinen die Kanäle TASK1 und TASK3 jedoch eine geringere Bedeutung zu besitzen. Damit weisen  $K_{2P}$ -Kanäle eine funktionale Beteiligung am RVD-Prozess von  $CD4^+$ -Zellen auf, die in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Wie in Abbildung 28 dargestellt,

basiert der RVD-bezogene  $K^+$ -Efflux demnach auf den 6TM/P-Kanälen  $K_{v1.3}$  und  $IK_{Ca1}$  sowie den  $K_{2P}$ -Kanäle TASK1, TASK2, TASK3 und TRESK.



**Abbildung 28** Schema der hypotonen Kaliumeffluxwege von murinen und humanen  $CD4^+$ -Lymphozyten

Die volumenregulatorischen Effluxwege von Kalium und Chlorid sind in Anlehnung an das Volumenregulationsmodell nach Cahalan [16] für humane und murine  $CD4^+$ -Lymphozyten dargestellt. Hypotones Zellschwellen initiiert zunächst die Aktivierung von Chloridkanälen bisher unbekannter molekularer Identität. Die anschließende Depolarisation der Zellmembran führt daraufhin zu einer spannungsgesteuerten Aktivierung des 6TM/P-Kanals  $K_{v1.3}$  sowie der  $K_{2P}$ -Kanäle TASK1, TASK2 und TASK3. Über die Beteiligung der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle erfolgt außerdem die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanäle  $IK_{Ca1}$  und TRESK. Dabei zeigen die Ergebnisse der murinen wildtypischen Messungen dieser Arbeit jedoch, dass der TRESK-Kanal für den RVD-Prozess eine weit bedeutendere Rolle spielt als der  $IK_{Ca1}$ -Kanal. In humanen  $CD4^+$ -T-Zellen wird die Beteiligung des  $IK_{Ca1}$ -Kanals vermutet [28,35]. Die Mitglieder der  $K_{2P}$ - (rot)- und 6TM/P- (blau)-Familie sind unter dem Schema aufgelistet (Verändert nach [4]). Alle am RVD-Prozess von murinen und humanen T-Zellen beteiligten Mitglieder der  $K_{2P}$ - und 6TM/P-Familie sind unter dem Schema schwarz hervorgehoben.

Da die Expression von Kaliumkanälen in T-Zellen während Aktivierung und Differenzierung stark variieren kann [16] und sich dadurch potentiell auch die osmoregulatorischen Eigenschaften



der Zellen ändern, wurde außerdem die relative Bedeutung der unterschiedlichen Kaliumkanäle für den RVD-Prozess in humanen Lymphozyten abhängig des T-Zell-Aktivierungsstatus untersucht. Wie die Ergebnisse der humanen Lymphozyten zeigten, weist der  $K_{V1.3}$ -Kanal in unstimulierten Zellen eine geringere RVD-Relevanz als in stimulierten Lymphozyten auf (Abbildung 17). Obwohl die  $K_{V1.3}$ -Expression von ~300-400 Kanälen pro Zelle in naïven T-Zellen auf etwa 600 Kanäle in antigenstimulierten T-Zellen zunimmt [28], ist der RVD-inhibitorische Effekt des Blockers ShK auf unstimulierte Lymphozyten etwas stärker ( $IC_{RVD} \approx 90\%$  bei 10 nM ShK) als auf stimulierte Lymphozyten ( $IC_{RVD} \approx 70\%$  bei 10 nM ShK). Der sinkende Einfluss des Blockers ShK zeigt deutlich, dass die relative Bedeutung des  $K_{V1.3}$ -Kanals für die Volumenregulation in stimulierten Lymphozyten abnimmt.

Im Gegensatz zu der sinkenden RVD-Bedeutung des  $K_{V1.3}$ -Kanals scheint jedoch die Wichtigkeit der untersuchten  $K_{2P}$ -Vertreter am RVD-Prozess von humanen Lymphozyten weitestgehend unabhängig des Aktivierungszustands der T-Zellen zu sein (Abbildung 17). So war der RVD-inhibitorische Effekt der verwendeten TASK1, TASK2 und TRESK-Blocker auf unstimulierte und stimulierte  $CD4^+$ -T-Zellen vergleichbar stark ausgeprägt (Abbildung 17), obwohl eine verstärkte Expression insbesondere der Kanäle TASK1 und TASK2 in stimulierten T-Zellen beobachtet wird [79]. Lediglich die volumetrische Untersuchungen mit den Kanalblockern Rutheniumrot und Spermin deuteten eine T-Zell-Status abhängige Bedeutung des Kanals TASK3 für den RVD-Prozess an, die jedoch hier aufgrund der Gegenläufigkeit der einzelnen Blocker-Ergebnisse nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abbildung 17).

Wie die hier durchgeführten Analysen deutlich zeigten, sind die  $K_{2P}$ -Kanäle TASK1/2/3 und TRESK an der hypotonen Volumenregulation von primären  $CD4^+$ -Lymphozyten von Maus und Mensch beteiligt. Die hier beobachtete bedeutende Rolle der  $K_{2P}$ -Kanäle (und insbesondere des TASK2-Kanals) an Volumenregulationsprozessen von Lymphozyten deckt sich mit Studien anderer Zelltypen. Wie bereits in Nierenzellen [125,126], Spermatozoen [127] und Ehrlich Aszites Tumor Zellen [128,129] gezeigt wurde, sind  $K_{2P}$ -Kanäle damit auch für Volumenregulationsmechanismen von T-Lymphozyten relevant.

Desweiteren zeigten die Ergebnisse mit den Blockern Shk und TRAM34 eine bisher kontrovers diskutierte Beteiligung  $Ca^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanäle (TRESK und  $IK_{Ca1}$ ) am RVD-Prozess von T-Zellen (Abbildung 13, Abbildung 17). Insbesondere die hier beobachtete wichtige Rolle des  $Ca^{2+}$ -aktivierten TRESK-Kanals für den RVD-Prozess steht dabei im Gegensatz zu der von Grinstein beobachteten  $Ca^{2+}$ -Unabhängigkeit des Kaliumeffluxes während der Volumenregulation [38,39]. Über dies zeigten die Analysen von wildtypischen und transgenen murinen  $CD4^+$ -Zellen (Abbildung 11, Abbildung 13), dass der  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $IK_{Ca1}$ -Kanal im RVD-Prozess eine kompensatorische Aufgabe übernimmt, sobald andere  $K^+$ -Effluxwege ausfallen (Tabelle 21). Während die volumenregulatorische Bedeutung des  $IK_{Ca1}$ -Kanals bei wildtypischen  $CD4^+$ -Zellen lediglich gering war (Abbildung 11, Tabelle 20, Wildtyp), nahm sie durch den genetischen *Knockout* des TASK2-Kanals zu (Abbildung 13, Tabelle 21,  $TASK2^{-/-}$ ). Möglicherweise ist die

schwache RVD-Beteiligung des  $IK_{Ca1}$ -Kanals unter wildtypischen Bedingungen verantwortlich für die in der Literatur vorzufindenden Kontroversen. Insgesamt deutet die hier gefundene Beteiligung von TRESK und  $IK_{Ca1}$  am RVD-Prozess der untersuchten  $CD4^+$ -Lymphozyten damit auf eine  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit der hypotonen Volumenregulationsmechanismen hin, auch wenn sie nicht direkter Gegenstand dieser Untersuchung war.

Da Kaliumkanäle in Lymphozyten über ihrer Rolle bei der Volumenregulation an wichtigen Prozessen wie der T-Zell-Aktivierung, der Proliferation und der zellvermittelten Zytotoxizität beteiligt sind [35], stellen sie für die pharmakologische Manipulation der T-Zell-Aktivität einen bedeutenden Angriffspunkt dar [17,19,20]. So wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass sich Kaliumkanalblocker als immunsupprimierende Therapeutika eignen. Die immunsupprimierende Wirkung beruht maßgeblich auf direkten oder indirekten Effekten: So können Kaliumkanalblocker in pharmakologisch relevanten Konzentrationen direkt die Aktivierung von T-Zellen durch die Inhibition des hierfür nötigen  $Ca^{2+}$ -Einstroms verhindern [16,19,25]. Andererseits kann die Volumenregulation der Lymphozyten durch die Inhibition von Kaliumkanälen (z.B.  $K_v1.3$ ) beeinträchtigt werden, wodurch die Migration und Beweglichkeit der Lymphozyten im peripheren Gewebe stark beeinträchtigt wird [16,28] und so einen indirekten immunsupprimierenden Einfluss haben kann.

Aufgrund von Unterschieden in der Kaliumkanalexpression in Immunzellen [28] kann durch die zielgerichtete Manipulation bestimmter Kaliumkanäle selektiv in Immunsystemfunktionen eingegriffen werden [19,20,25]. So wurde gezeigt, dass sich z. B. die Inhibition des in T-Lymphozyten stark vertretenen  $K_v1.3$ -Kanals als selektive immunsupprimierende Strategie bei der Behandlung von chronisch entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen besonders eignet, während die Behandlung mit  $IK_{Ca1}$ -Blocker zur Verhinderung akuter Aktivierungsereignisse verwendet werden kann [16]. Gegenüber der sog. generalisierten Immunsuppression mittels Therapeutika wie Glucocorticoiden oder Zytostatika lassen sich die sonst auftretenden Gefahren einer opportunistischen Infektion sowie toxischer Nebenwirkungen deutlich reduzieren [115].

Insbesondere bei der therapeutischen Immunsuppression zur Behandlung von entzündlichen neurodegenerativen und autoimmunen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, rheumatischer Arthritis und Diabetes melitus Typ 1 wurde die Wirksamkeit spezifischer Kaliumkanalblocker nachgewiesen [20,25,27,115,130], wobei der Immunschutz vor akuten Infektionen hierbei weitestgehend ausgeschlossen bleibt [115]. So wurde jüngst als möglicher therapeutischer Ansatz der Multiplen Sklerose die erfolgreiche Behandlung des etablierten MS-Nagetiermodells EAE (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*-Modell) [131] mit Kaliumkanalblockern für  $K_v1.3$  und  $IK_{Ca1}$  berichtet [25]. Gesunden Ratten wurden hierfür Lymphozyten aus EAE-Ratten übertragen (sog. Adoptiver EAE-Transfer; AT-EAE) und der sonst letale AT-EAE-Verlauf durch die Behandlung mit ShK ( $K_v1.3$ ) und/oder TRAM34 ( $IK_{Ca1}$ ) verhindert [25,130].

Um die Selektivität der therapeutischen Immunsuppression mittels Kaliumkanalblocker zu verbessern und neue Therapeutika zu finden, ist die Identifikation und die Funktionsaufklärung von Kaliumkanälen in den verschiedenen Lymphozyten-Populationen essenziell. Insbesondere in Helfer-T-Zellen stellt die Identifikation von Kaliumkanälen eine wichtige Aufgabe dar, da sie als Hauptregulatoren der Antikörperproduktion eine bedeutende Säule der zellvermittelten Immunantwort repräsentieren [21]. Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.1 zeigten, könnten sich neben den 6TM/P-Kanälen  $K_{V1.3}$  und  $IK_{Ca1}$  auch  $K_{2P}$ -Kanäle aufgrund ihrer funktionalen Bedeutung in der Volumenregulation von  $CD4^+$ -T-Zellen als potentielle Zielproteine für immunmodulatorische Arzneimittel eignen.

Insbesondere die TASK-Kanäle sind hierbei von besonderem wissenschaftlichem Interesse, da sie neben ihrer osmoregulatorischen Relevanz auch möglicherweise am Prozess der T-Zell-Aktivierung und neurodegenerativen Erkrankungen wie Multiple Sklerose beteiligt sind [25,132]. Für die Beteiligung der TASK-Kanäle am T-Zell-Aktivierungsprozess sprechen kürzlich veröffentlichte Studien, die zeigen, dass die pharmakologische Inhibition des TASK1-Kanals zu einer verminderten Zytokinproduktion und Zellproliferation nach T-Zellaktivierung führt [25,132]. Darüber hinaus konnte im etablierten Nagetiermodell der Multiplen Sklerose, EAE, gezeigt werden, dass sich neben  $K_{V1.3}$  oder  $IK_{Ca1}$ -Blockern auch die Inhibition der TASK-Kanäle zur Therapie der Multiplen Sklerose eignet [41].

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend verdeutlichten, basiert die überlebenswichtige Volumenregulation von  $CD4^+$  T-Zellen nicht auf wenigen Kaliumkanälen, sondern aus einem vernetzten Geflecht mehrerer unterschiedlicher Kationenkanäle, die den redundanten Kaliumefflux während der Volumenregulation ermöglichen. Aufgrund der engen Verknüpfung der  $CD4^+$  T-Zell-Funktion mit dem Zellvolumen [16,25,27], können  $K_{2P}$ -Kanäle damit in den engeren Kreis potentieller therapeutischer Angriffspunkte für den pharmakologischen Eingriff in Immunreaktionen aufgefasst werden.

## 5.2 Transportwege organischer Osmolyte in Säugetierzellen

Wie bereits gezeigt [10], wird die Aktivität zytosolischer Enzyme durch Elektrolyte dramatisch beeinflusst, während organische Osmolyte auch in molarer Konzentration hierauf keinen Einfluss nehmen [46]. Die volumenregulatorische Beteiligung organischer Osmolyte stellt daher für Zellen einen bedeutenden Mechanismus zur Anpassung der intrazellulären Osmolytkonzentration dar. Trotz der wichtigen osmoregulatorischen Funktion der SOOs sind ihre zellulären Effluxwege im Verlauf der hypotonen Volumenregulation bisher nicht identifiziert [13].

### 5.2.1 Größenselektivität schwellungsaktivierter Transportwege für organische Osmolyte

Trotz der unbekanntenen Identität der beteiligten Transporter/Kanäle konnte in zahlreichen Studien unseres Lehrstuhls gezeigt werden, dass sich die Mechanismen der Volumenregulation für Zellbeladungstechniken im biotechnologischen und –medizinischen Anwendungsbereich verwenden lassen (siehe Einleitung Kapitel 1.3). Voraussetzung für diese vielseitig einsetzbare Technik ist die Permeabilität der schwellungsaktivierten SOO-Transportwege für die aufzunehmende Verbindung, die für viele Substanzen lediglich größenselektiv zu sein scheint [68]. So wurde beobachtet, dass kleine Kohlenhydrate wie Sorbitol, Inositol, Glukose und Galaktose die Zellmembran unter stark hypotonen Bedingungen (100 mOsm) passieren können, während die Membran für Disaccharide wie Trehalose oder Saccharose unter diesen Bedingungen impermeabel bleibt [68]. Ungeachtet der molekularen Identität der Effluxwege organischer Osmolyte spielt daher die funktionale Größenbeschränkung dieser Transportwege eine wichtige Bedeutung. Daher war das erste Ziel dieser Untersuchung die Quantifizierung der Größenbegrenzung schwellungsaktivierter Transportwege für SOOs, die Martin Kiesel anhand seiner Ergebnisse bereits auf einen Größenbereich zwischen 0,73 und 0,95 nm eingrenzen konnte [67].

Wie in zahlreichen Studien gezeigt, kann die Größenselektivität von Kanälen mit Hilfe von unterschiedlich großen neutralen organischen Polymeren wie Polyethylenglykolen (PEGs) untersucht werden [133–135]. PEGs stellen chemisch gesehen biokompatible Polyether des Ethandiols dar, die aus zahlreichen medizinischen, pharmazeutischen und biotechnologischen Anwendungen bekannt sind. Sie werden häufig als Feuchthaltemittel oder Salbengrundlage in kosmetischen Produkten [136], als pharmazeutische Wirkstoffträgersubstanz [137] oder als Laxans [138] verwendet, wobei sie aufgrund ihres chemisch inerten Verhaltens und ihrer guten Wasserlöslichkeit weitläufigen Einsatz finden. Zur Bestimmung der Porengröße von Ionen-

Kanälen und Porinen werden insbesondere kleine PEG-Polymere mit einem Molekulargewicht <2000 g/mol verwendet [139–143].

Die Bestimmung der Porengröße von Ionenkanälen erfolgt meist über die sog. Größenausschluss-Technik [133]. Diese Technik basiert auf der elektrophysiologischen Messung der Membranpermeabilität von unterschiedlich großen PEG-Polymeren mit bekanntem Molekülradius [133,134]. Da sich der Molekülradius der knäulartigen PEGs, wie nach der Kuga-Beziehung beschrieben [144], annähernd proportional zu seinem Molekulargewicht verhält, kann durch die graduelle Variation der Polymerlänge und aus der Permeabilität des zu untersuchenden Kanals für bestimmte PEG-Längenvarianten die Größenausschlussgrenze des Kanals (sog. *cutoff*-Radius) ermittelt werden [134]. Insgesamt wird der *cutoff*-Radius des Kanals somit indirekt über dessen Selektivität für unterschiedlich große PEG-Moleküle quantifiziert. Da hypotone Transportwege organischer Osmolyte kanal-ähnliche Eigenschaften besitzen (siehe Einleitung Kapitel 1.3), ist die Charakterisierung ihrer funktionalen Größenbeschränkung über diese Technik möglich.

In Anlehnung an die Größenausschluss-Technik zur Bestimmung der Porengröße von Ionenkanälen erfolgte daher im experimentellen Ansatz dieser Arbeit die Bestimmung des *cutoff*-Radius schwellungsaktivierter SOO-Transportwege mithilfe von PEGs der Polymerlängen 200–1500. Um die zelluläre Aufnahme (und damit die Membranpermeabilität) für die untersuchten PEGs zu quantifizieren, wurde die Volumenregulationsfähigkeit der verwendeten Zellen untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Studien, haben membranimpermeable Osmolyte wie beispielsweise Disaccharide keinen Einfluss auf die hypotone Volumenregulationsfähigkeit von Zellen, während membranpermeable Osmolyte die RVD-Fähigkeit stark einschränken [68]. Ursächlich hierfür ist die konzentrationsgerichtete Aufnahme der membrangängigen Substanz, die zu einer der aufgenommenen Osmolytmenge entsprechenden zellulären Wasseraufnahme führt. Diese Wasseraufnahme kompensiert den RVD-vermittelten Wasserefflux, sodass das Zellvolumen auf einem annähernd stabilen Niveau verbleibt oder (wie bei PEG200 zu beobachten (Abbildung 18)) in einem langsamen Prozess moderat steigt (sekundäre Volumenzunahme). Als Maß für die Membranpermeabilität wurde daher die Langzeitvolumenänderung  $\Delta v_{end}$  der Zellen berücksichtigt, die sich proportional zur RVD-inhibierenden Fähigkeit und der damit verbundenen Aufnahme osmotisch aktiver Verbindungen (hier PEGs) verhält [68]. Während PEGs mit einer geringeren Größe als der *Cutoff*-Radius schwellungsaktivierter Transporter/Kanäle eine RVD-Inhibition verursachen, führen größere PEGs als der *Cutoff*-Radius zu keiner Beeinträchtigung der Volumenregulationsfähigkeit der Zellen.

Wie in den volumetrischen Ergebnissen deutlich zu erkennen (Kapitel 4.2.1, Abbildung 18), variierte die Plasmamembranpermeabilität der Jurkat-Zellen für die untersuchten PEGs abhängig der PEG-Polymerlängen und der hypotonen Stresshöhe. Mit Ausnahme von PEG200, war die Membran der untersuchten Lymphozyten unter mild hypotonen Bedingungen von 200 mOsm für PEG300–1500 impermeabel. Da die Zellen unter milden hypotonen Bedingungen ihr Volumen

weitestgehend über den Efflux intrazellulärer Elektrolyte regulieren [15], zeigt dies, dass die hypoton aktivierten Elektrolytkanäle für die untersuchten PEG300-1500 impermeabel waren.

Anders als unter mild hypotonen Bedingungen (200 mOsm) sind Zellen zur Volumenregulation unter stark hypotonen Bedingungen (100 mOsm) auf den zusätzlichen Efflux organischer Osmolyte angewiesen [15,68]. Wie am Beispiel der SOO-Vertreter Sorbitol und myo-Inositol gezeigt, erfolgt die Aktivierung des SOO-Transports durch den exozytotischen Einbau molekular bisher nicht-identifizierter Transporter/Kanäle [15]. Wurden die Zellen nach Aktivierung dieser Transporter/Kanäle mit kleinen PEGs konfrontiert (PEG300-400), dann war eine deutliche Inhibition des RVD zu erkennen. Diese RVD-Inhibition zeigte damit die Permeabilität der Membran für beide Polymere auf (Kapitel 4.2.1, Abbildung 18). Da in diesem osmotischen Bereich die Aktivierung SOO-permeabler Transportwege nachgewiesen wurde, ist von einer Passage der kleinen PEG-Vertreter PEG300 und PEG400 durch die hypoton aktivierten Transportwege organischer Osmolyte auszugehen.

Im Gegensatz zu den PEGs 300-1500 wies PEG200 unter allen untersuchten osmotischen Bedingungen eine Membranpermeabilität auf (Abbildung 18, Abbildung 19). Da die starke Hydrophilie des PEG200 eine freie Diffusion über die Membran annähernd ausschließt, deutet die basale Membrangängigkeit des PEG200s auf einen unregulierten und kanalvermittelten Aufnahmeweg des Polymers hin. Die Membrandurchlässigkeit des PEG200 war dabei möglicherweise durch Aqua(glycero)porine vermittelt, die eine Permeabilität für kleine Verbindung wie Urea oder Glycerin [145,146] sowie für diverse niedermolekulare Kryokonservierungsmittel wie Ethylen- und Propylenglykol aufweisen [147]. Die Unabhängigkeit der PEG200-Membranpermeabilität von den osmotischen Bedingungen weist jedoch darauf hin, dass PEG200 nicht ausschließlich über schwellungsaktivierte Transportwege in die Zelle gelangt.

Die volumetrischen Ergebnisse zeigten insgesamt, dass die Membran abgesehen von PEG200 unter stark hypotonen Bedingungen weitestgehend nur für PEG300 und PEG400 permeabel war. Über diese Beobachtung hinaus wurde in dieser Arbeit erstmals der Größenbeschränkungsradius schwellungsaktivierter Transporter für SOOs bestimmt. Für diese Analyse wurden die viskosimetrisch bestimmten hydrodynamischen Radien der hier verwendeten PEGs (Tabelle 19) sowie die durch sie verursachte RVD-Inhibition berücksichtigt. Anhand der graphischen Auswertung dieser Größen beträgt der *Cutoff*-Radius schwellungsaktivierter SOO-Transportwege  $\sim 0,74$  nm (Abbildung 19).

Wie kürzlich in einer elektrophysiologischen Studie gezeigt, weist der hier untersuchte hypoton aktivierte Transportweg damit einen deutlich größeren *Cutoff*-Radius auf, als der RVD-beteiligte Chloridkanal VSOR (*volume-sensitive outwardly rectifying Cl channel*) [135]. Für diesen Kanal unbekannter molekularer Identität [148] wurde über die Größenausschluss-Technik mittels PEGs eine Porengröße von 0.63 nm bestimmt [135]. Der Unterschied in der Größenselektivität zwischen Transportern für organische Osmolyte und dem VSOR-Kanal bestätigen damit unsere [15,68] und

andere Studien, die einen getrennten Transport von Ionen und SOOs beobachtet haben [60,61,63,149].

Für biotechnologische Anwendungen stellt der *Cutoff*-Radius eine wichtige Größe dar, über die eine Membrangängigkeit eines Probenmoleküls potentiell vorhergesagt werden kann. Die hier bestimmte Größenbeschränkung schwellungsaktivierter Transportwege organischer Osmolyte kann daher insbesondere für die kryotechnologische Konservierung von wertvollen Zellen und Geweben von Relevanz sein. Da die hypotone Beladung eine schonende Art darstellt, Zellen mit kleinen Kohlenhydratverbindungen, PEGs und verwandten Verbindungen zu beladen, könnte die hier aufgeklärte Größenselektivität schwellungsaktivierter Transportwege zu zahlreichen neuen biotechnologischen und medizinischen Anwendungen führen.

### 5.2.2 Molekulare Identität von schwellungsaktivierten Transportwegen organischer Osmolyte

Neben der Charakterisierung der schwellungsaktivierten Transportwege für organische Osmolyte ist ihre molekulare Identifizierung seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Insbesondere die Frage, wie viele unterschiedliche Transporter bzw. Kanäle am schwellungsaktivierten Efflux der zahlreichen organischen Osmolyte beteiligt sind, ist bisher ungeklärt [1]. Da sich der Efflux organischer Osmolyte in weiten Teilen ähnelt und in einigen Studien ein gemeinsamer Transport unterschiedlicher SOOs beobachtet wurde [53,55,150,151], wird von einigen Autoren ein gemeinsamer Effluxweg vermutet [5,6]. In anderen Untersuchungen konnte der gemeinsame Transportweg für unterschiedlicher organischer Osmolyte jedoch nicht bestätigt werden [5,51,152,153]. Insgesamt stehen sich demnach die Hypothesen 1.) eines gemeinsamen und volumensensitiven kanalvermittelten Effluxweges sowie 2.) getrennte Transporter/Kanäle für unterschiedliche SOOs gegenüber.

#### *a) Volumetrische Untersuchung zur Charakterisierung der Dynamik des hypotonen Transports organischer Osmolyte*

Für die molekulare Identifizierung schwellungsaktivierter Transportwege organischer Osmolyte ist es jedoch relevant, die Art und Anzahl potentiell beteiligter Transportproteine abzuschätzen. Da ein gemeinsamer oder getrennter Membrantransport meist anhand verschiedener Aktivitätsprofile der beteiligten Transportmoleküle unterschieden werden kann (Beispiele

[53,151]), wurde in dieser Arbeit der Transport der strukturell unähnlichen SOO-Vertreter Taurin und myo-Inositol analysiert. Ziel war hierbei die Bestimmung der osmotischen Aktivierungsschwelle sowie der Aktivitätsdauer beteiligter Transportwege für die jeweiligen SOOs anhand einer vergleichenden Analyse der Membranpermeabilität zu ermitteln.

Da der schwellungsaktivierte Transport für organische Osmolyte bidirektional und konzentrationsgerichtet erfolgt [2,14,53,59,97,98], kann die Membranpermeabilität (und damit die Aktivität der Transportwege organischer Osmolyte) sowohl über den zellulären In – wie auch über den Efflux von SOOs gemessen werden [14] (Beispiele [15,68]). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der physiologische Konzentrationsgradient für die verwendeten SOOs Taurin oder myo-Inositol in den durchgeführten volumetrischen Messungen invertiert, sodass die Aktivierung der beteiligten Transportwege unabhängig der äußeren Osmolarität zu einem konzentrationsgerichteten Influx der Osmolyte führte. Die Membranpermeabilität der jeweils untersuchten SOOs wurde dadurch über eine zur Kontrollmessung abweichenden Zellvolumenänderung aufgezeigt. Je nach Ausmaß der zellulären SOO-Aufnahme wurde eine RVD-Inhibition oder ein sekundäres Zellschwellen beobachtet.

Wie in Kapitel 4.2.2 zu erkennen, hängt die Membranpermeabilität der untersuchten Osmolyte in HEK293 und Jurkat-Zellen sowohl von der hypotonen Stresshöhe, wie auch von der Art des für die Messung verwendeten SOOs ab. Beide Zelltypen wiesen ab einer extrazellulären Hypotonizität von ~230 mOsm eine Membranpermeabilität für Taurin auf, was durch die deutliche Beeinträchtigung der Volumenregulation bei geringeren Osmolalitäten (<230 mOsm) aufgezeigt wurde (Abbildung 20 und Abbildung 22). Im Gegensatz zu Taurin war die Membranpermeabilität für myo-Inositol erst ab einer hypotonen Aktivierungsschwelle von ~130-150 mOsm gegeben (Abbildung 22). In beiden untersuchten Zelllinien wurde der Transport von Taurin damit bereits bei geringeren hypotonen Stresshöhen aktiviert (~230 mOsm) als myo-Inositol (~150-130 mOsm).

Die hier beobachteten osmotischen Aktivierungsschwellen der untersuchten Transportwege für Taurin und myo-Inositol decken sich dabei weitestgehend mit Studien anderer humaner Zelllinien. So wurde der Taurinefflux in NIH/3T3-Zellen ab einer Reduktion der äußeren Osmolarität um 20% (entspricht ~240 mOsm) nachgewiesen [4,154]. Ebenso erfolgt die Freisetzung von Taurin in humanen Epithelzellen (Intestine 407) ab einer Schwelle <225 mOsm [61]. Im Gegensatz zu Taurin wird der schwellungsaktivierte Transport von myo-Inositol ab einer osmotischen Stresshöhe zwischen 200 und 100 mOsm beobachtet [68].

Die hier ermittelten Ergebnisse zeigten, dass der Transport von Taurin und myo-Inositol in einem signifikant unterschiedlichen osmotischen Bereich aktiviert wird. Während der Taurin-Transport bereits bei geringeren Volumenauslenkungen eingeleitet wurde, fand die Beteiligung von myo-Inositol erst bei höheren osmotischen Stresszuständen statt. Abhängig von der hypotonen Stresshöhe diskriminieren Zellen somit zwischen dem Transport unterschiedlicher organischer



Osmolyte. Der Unterschied in der hypotonen Aktivierungsschwelle deutet auf getrennte Effluxwege für Taurin und myo-Inositol hin, schließt jedoch einen zellvolumengesteuerten Einzelkanal für mehrere SOOs nicht vollständig aus. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Aktivitätsdauer der beteiligten Transportwege für Taurin und myo-Inositol analysiert.

In anderen Studien wurde beobachtet, dass der zelluläre Efflux von myo-Inositol und Taurin eine ähnliche Aktivitätsdauer aufweist [53,152]. So wurde beispielsweise der Efflux von myo-Inositol (in Nierenzellen) [151,152] und Taurin (in intestinalen 407-Zellen) [61] über eine Dauer von ~10 min beobachtet. Unter anderen experimentellen Bedingungen beobachteten Jackson und Strange eine Taurin- und myo-Inositol-Effluxdauer von ~60 min [53]. Da der schwellungsaktivierte Transport beider Osmolyte anhand dieser Studien nahezu zeitgleich erfolgt, wurde darauf geschlossen, dass myo-Inositol und Taurin den gleichen Effluxweg nehmen [53,152]. Im experimentellen Ansatz der bisher durchgeführten Studien wurde die Transportdauer der untersuchten Osmolyte mithilfe radioaktiver Quantifizierungsmethoden bestimmt [53,61,151]. Bei dieser Technik wird der Efflux der SOOs bemessen, der maßgeblich vom Konzentrationsgradient (und damit der intrazellulären Ausgangskonzentration) der untersuchten SOOs abhängig ist [13]. Somit wird bei dieser Isotopenmessmethode die Effluxrate der organischen Osmolyte ermittelt, was jedoch nur eine begrenzte Aussagefähigkeit über die Aktivitätsdauer der beteiligten Transportwege zulässt.

Im Gegensatz zu den o.g. Studien, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivitätsdauer der schwellungsaktivierten Transportwege über die Permeabilität der Membran für SOOs bestimmt. Wie die Ergebnisse in Abbildung 24 deutlich zeigen, war die Membranpermeabilität nach einem initialen hypotonen Stress von 100 mOsm für Taurin und myo-Inositol eine unterschiedlich lange Zeit gegeben. Während die Membran für myo-Inositol lediglich ~40 min nach der hypotonen Konfrontation durchlässig war, hielt die Membranpermeabilität für Taurin ~95 min an. Dabei war jedoch das isotone Ausgangsvolumen der Zellen bereits nach ~25-30 min wiederhergestellt (Abbildung 21). Dies bedeutet, dass die Membran für beide untersuchten organischen Osmolyte permeabel war, obwohl die osmotische Volumenauslenkung und ein damit einhergehender mechanischer Effekt auf die Zellen bereits verschwunden war. Eine zellvolumenabhängige Steuerung eines Einzelkanals könnte damit keine Diskriminierung im Transport unterschiedlicher organischer Osmolyte vornehmen, sodass ein Einzelkanal anhand dieser Ergebnisse nahezu ausgeschlossen werden kann.

Darüber hinaus zeigen die volumetrisch bestimmten Permeabilitätskoeffizientenwerte (Tabelle 22, Abbildung 24), dass die Membran beider untersuchter Zelllinien für Taurin deutlich permeabler war als für myo-Inositol. Beurteilt an den maximalen Permeabilitätskoeffizientenwerten (Tabelle 22; Abbildung 24, 7 min) wiesen die untersuchten HEK293-Zellen für Taurin eine ~4-5-fach höhere Membranpermeabilität auf als für myo-Inositol. Auch für Jurkat-Lymphozyten war diese deutlich stärkere Taurinpermeabilität zu erkennen (Tabelle 22 ;  $P_{\max, \text{Taurin}} = 3,1 \text{ nm/s}$ ;  $P_{\max, \text{Inositol}} = 0,19 \text{ nm/s}$ ). Die Ergebnisse zeigen demnach, dass Taurin in größerem Umfang von

den Zellen zur hypotonen Volumenregulation eingesetzt wurde als myo-Inositol. Die hier nachgewiesene stärkere osmoregulatorische Beteiligung von Taurin wurde bereits in anderen Studien beobachtet (Literaturübericht siehe [14]). So wurde beispielsweise in C6-Gliom-Zellen gezeigt, dass Taurin im Vergleich zu myo-Inositol unter mild hypotonen Bedingungen (250 mOsm) eine ~2,5-fach höhere Permeabilität aufweist ([53] Fig. 1). Diese im Volumenregulationsprozess hervortretende Rolle von Taurin bestätigt die Beobachtung, dass verschiedene organische Osmolyte am RVD-Prozess von Säugetierzellen unterschiedlich stark beteiligt sind [7,14]. Möglicherweise ist diese unterschiedlich starke Beteiligung auf evolutionäre Anpassungsprozesse zurückzuführen [7]. Ob die erhöhte Membranpermeabilität (und damit die Priorisierung einzelner SOOs) jedoch durch einen beschleunigten Membrantransport (z. B. höhere Einzeltransporterpermeabilität), einen unterschiedlichen zellulären Gehalt an SOOs (= höhere Konzentrationsdifferenz), oder durch eine höhere Anzahl an Transportern in der Membran verursacht wird, lässt sich über die hier durchgeführten Messungen nicht aussagen.

Insgesamt zeigten die volumetrischen Untersuchungen zur Charakterisierung der hypotonen Transportdynamik organischer Osmolyte in Kapitel 4.2.2 erstmals, dass die schwellungsaktivierten Transportwege von Taurin und myo-Inositol ein signifikant unterschiedliches Aktivitätsprofil aufwiesen. Die Permeabilität der Membran für Taurin wurde hierbei bereits durch eine Osmolalität von ~230 mOsm aktiviert und dauerte nach 100 mOsm Stress etwa 95 min an. Im Gegensatz dazu wurde die Membran für myo-Inositol erst ab einer osmotischen Stresshöhe von ~130-150 mOsm durchlässig und hielt diese unter 100 mOsm Bedingungen für ~40 min aufrecht. Da sich somit sowohl das hypotone Permeabilitätsprofil von Taurin und myo-Inositol stark unterschieden und auch ein volumensensitiver Einzelkanal nahezu ausgeschlossen werden konnte, weisen die Ergebnisse auf osmolytspezifische separate Transporter hin, die stresshöhenabhängig aktiviert werden.

*b) Molekularbiologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von SLC5A3 und SLC6A6 als potentielle RVD-beteiligte Transporter organischer Osmolyte*

Wie die hier durchgeführten volumetrischen Ergebnisse (s.o.) und unsere frühere Studien [15] zeigten, handelt es sich bei den RVD-beteiligten Transportwegen organischer Osmolyte vermutlich um osmolytspezifische Einzeltransporter, die über schwellungsbedingte Exozytose in die Membran integriert werden. Da es in der Literatur (nach bestem Wissen) aktuell keinen Hinweis auf geeignete molekular identifizierte Kandidaten gibt, folgte ich der Hypothese, dass bereits bekannte Osmolyttransporter der *Solute Carrier* (SLC) Transporter-Superfamilie am RVD-Prozess tierischer Zellen beteiligt sein könnten. Die SLC-Superfamilie besteht aus 52

Genfamilien mit etwa 400 Mitgliedern (Stand 24.02.2014; Quelle: <http://www.bioparadigms.org>), die am Transport von zahlreichen organischen Verbindungen wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Nukleotide, Neurotransmitter sowie anorganischen Ionen beteiligt sind [155,156]. Zu den einzelnen SLC-Mitgliedern gehören passive - und ionengekoppelte Transporter sowie Austauscher, die primär aufgrund ihrer biologischen Funktion und weniger ihrer entwicklungsgeschichtlichen Verwandtschaft in diese Superfamilie eingeordnet werden [155,156]. Neuere Studien begünstigen jedoch auch die Theorie einer phylogenetischen Verwandtschaft vieler SLC-Familien [156]. Innerhalb einer SLC-Familie besitzen die Mitglieder untereinander eine minimale Aminosäuresequenzhomologie von 20-25% [155].

Als aussichtsreiche RVD-beteiligte Kandidaten kommen insbesondere Proteine der SLC-Familien 5 (Natrium-Glukose-Kotransporterfamilie) und 6 (Natrium- und Chlorid-abhängige Neurotransmitter-Transporterfamilie) in die engere Auswahl, da Vertreter dieser Familien bereits mit Mechanismen der hypertonen Volumenregulation in Verbindung gebracht wurden (siehe Einleitung Kapitel 1.3). Hierzu zählen u. a. die substratspezifischen Transporter SLC5A3 (SMIT) und SLC6A6 (TauT) die aus RVI-Modellen bekannt sind. So wurde gezeigt, dass diese Transporter an der hypertonen Aufnahme von myo-Inositol bzw. Taurin beteiligt sind [1,11–13,50,157]. Dabei wurde beobachtet, dass die mRNA-Expression der Gene SLC5A3 und SLC6A6 unter hypertonen Bedingungen in MDCK-, C6-Gliom- und Nieren-Zellen (innere Medula) hochreguliert wird [13,103–105,158–161]. Die Transkription dieser Gene scheint daher eine wichtige Regulationsebene in der Funktionssteuerung der beteiligten Transporter zu sein [103,162,163].

Um eine potentielle Beteiligung von SLC-Transportern auch am RVD-Prozess zu prüfen, erfolgte in dieser Arbeit zunächst die Analyse von hypotonem Einfluss (100 mOsm) auf das mRNA-Expressionsniveau beider Transportergene mithilfe semiquantitativer RT-PCR. Um einen zelltypspezifischen Effekt weitestgehend auszuschließen, wurden die unterschiedlichen humanen Zelllinien Jurkat, HEK293 und HepG2 verwendet. Wie die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten (siehe Kapitel 4.3.1), wurde das Expressionsniveau von SLC5A3 und SLC6A6 in allen untersuchten Zelllinien durch hypotone Bedingungen beeinflusst. Wurde die äußere Osmolalität auf 100 mOsm abgesenkt, dann war innerhalb von 10-20 min sowohl in Jurkat, HEK wie auch HepG2-Zellen die verstärkte Transkription beider Gene zu erkennen. Im Vergleich zum isotonen Ausgangsniveau nahm dabei die zelluläre mRNA-Konzentration von SLC5A3 zwischen 20-60% und SLC6A6 um 30-100% zu.

Insbesondere die hier beobachtete hypotone Induktion von SLC5A3 stehen im Kontrast zu früheren Studien, die eine verminderte mRNA-Expression dieses Gens unter hypotonen Bedingungen beobachteten [103,160]. So wurde beispielsweise an MDCK-Zellen gezeigt, dass die Geneexpression von SLC5A3 über das regulatorische Protein TonEBP (*tonicity-responsive enhancer binding protein*) gesteuert wird [162]. Dieses regulatorische Protein wird durch hypertone Bedingungen aktiviert, während hypotone Bedingungen es auf RNA-Ebene

herunterregulieren. Die geringere TonEBP-mRNA-Konzentration unter hypotonen Bedingungen korrelierte in dieser Studie mit einer geringeren Transkription von SLC5A3 [162]. In einem ähnlichen experimentellen Ansatz konnte an humanen Monozyten und Makrophagen gezeigt werden, dass die mRNA von SLC5A3 lediglich unter hypertonen Bedingungen exprimiert wird [164]. Im Gegensatz dazu wurde unter isotonen und mild hypotonen Bedingungen (330-205 mOsm) die mRNA des myo-Inositol-Transporters nicht nachgewiesen. Schließlich wurde von Cha *et al.* 2001 [103] aus *in-vivo* Experimenten an Ratten berichtet, dass in hydrierten Ratten (3% Saccharose in Trinkwasser) im Vergleich zur ungezuckerten Trinkwasserkontrolle bzw. zu dehydrierten Tieren (3 Tage kein Wasser) die renale SLC5A3 mRNA-Konzentration deutlich verringert ist.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgedeckten kontroversen Ergebnisse bezüglich der hypotonen Induktion der SLC5A3-mRNA-Expression sind vermutlich auf experimentelle Unterschiede zurückzuführen. So wurde in den beschriebenen Studien (s. o.) lediglich die Langzeitanpassung an hyper- oder hypotone Bedingungen untersucht (Beispiele: Woo *et al.* 2000 [162]: 3-18 Stunden; Cha *et al.* 2001 [103]: 3 Tage; Denkert *et al.* 1998 [164]: 3-12 Stunden). Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen wurde in der hier durchgeführten Analyse die kurzfristige Genregulation innerhalb von 30 min nach hypotonem Stress untersucht (siehe Kapitel 4.3.1).

Wie die semiquantitativen Ergebnisse aus Kapitel 4.3.1 damit erstmals zeigten, wurden Gene von SLC-Transportern nach hypotoner Konfrontation in mehreren untersuchten Zelllinien innerhalb kurzer Zeit verstärkt transkribiert. Eine RVD-Beteiligung von Transportern der SLC5- und SLC6-Familie könnte damit potentiell möglich sein. Da der zelluläre mRNA-Gehalt eines Gens aufgrund regulatorischer Mechanismen auf RNA und Protein-Ebene jedoch nur als Hinweis auf eine Beteiligung von SLC-Transportern am RVD-Prozess gedeutet werden kann, waren zur Überprüfung dieser Hypothese Analysen auf Proteinebene nötig. Daher erfolgte im Weiteren die mikroskopische Untersuchung des SLC5-Vertreters SLC5A3 (natriumabhängiger myo-Inositol-Kotransporter) mithilfe konfokaler und hochaufgelöster mikroskopischer Verfahren.

Hierzu wurde zunächst die zelluläre Verteilung des C-terminal mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) fluoreszenzmarkierten SLC5A3-Transporters unter isotonen und hypotonen Bedingungen in HEK293-Zellen analysiert. Wie anhand der konfokalen mikroskopischen Untersuchung in Kapitel 4.3.2 zu erkennen, fand eine zelluläre Umverteilung des Proteins SLC5A3 nach hypotoner Konfrontation der untersuchten HEK-Zellen statt (Abbildung 26). Innerhalb von 10 min wurde der myo-Inositol-Transporter von intrazellulären Regionen in Richtung Plasmamembran verlagert. Sie unterstützte damit die Annahme einer möglichen RVD-Beteiligung des myo-Inositol-Transporters, konnte jedoch aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens der konventionellen Lasermikroskopie den schwellungsaktivierten Einbau des SLC5A3-Proteins in die Plasmamembran nicht nachweisen.

Aus diesem Grund erfolgte eine vergleichende Analyse des membranassoziierten SLC5A3-Transporters unter iso- und hypotonen Bedingungen mit Hilfe des hochauflösenden lasermikroskopischen Verfahrens *d*STORM [110,111]. Da diese Technik auf der Lokalisation einzelner Fluoreszenzsignale mit annähernd molekularem Auflösungsvermögen beruht [166] (siehe Methoden Kapitel 3.6.2), ist die *d*STORM-Mikroskopie insbesondere für die hier durchgeführte vergleichende Analyse des membranassoziierten SLC5A3-Transporters geeignet. Wie die *d*STORM-Ergebnisse zeigten (siehe Kapitel 4.3.2; Abbildung 27), nahm das Fluoreszenzsignal der untersuchten HEK293 und Jurkat-Zellen durch Konfrontation mit 100 mOsm Bedingungen im zeitlichen Verlauf stetig zu. Im Vergleich zur isotonen Kontrolle stieg die Anzahl zellulärer AlexaFluor 647-Fluoreszenzlokalisationen innerhalb von 20 min um den 3,5 - 5-fachen Ausgangswert. Da die Immunmarkierung des SLC5A3-Transporters ohne Membranpermeabilisierung und mithilfe eines extrazellulär bindenden monoklonalen Primäantikörpers erfolgte, ist davon auszugehen, dass die AlexaFluor 647-Fluoreszenzzunahme durch eine verstärkte Membranpräsenz des SLC5A3-Proteins verursacht wurde. Die Ergebnisse zeigten damit, dass der myo-Inositol-Transporter SLC5A3 durch hypotone Bedingungen verstärkt in die Membran integriert wurde. Diese beobachtete Zunahme der Plasmamembranpräsenz von SLC5A3 deckt sich mit dem von Kiesel *et al.* 2006 [15] beschriebenen Aktivierungsmechanismus RVD-beteiligter Transportwege für organische Osmolyte.

Diese hier mikroskopisch beobachtete schwellungsaktivierte Umverteilung und Integration des SLC5A3-Transporters ähnelt stark dem für den Betain-GABA-Transporter SLC6A12 (BGT1) beschriebenen Aktivierungsmechanismus. Neben den bereits beschriebenen Osmolyttransportern SLC5A3 und SLC6A6 ist der SLC6A12-Transporter im Verlauf des RVI-Prozesses an der extrazellulären Aufnahme von Betain beteiligt. Unter hypertoner Stimulation wurde für diesen Transporter eine Umverlagerung des SLC6A12-Proteins aus zytosolischen Bereichen in Richtung Plasmamembran nachgewiesen [167]. SLC6A12 weist damit einen analogen Aktivierungsmechanismus im RVI-Prozess auf, der in dieser Arbeit unter hypotonen Bedingungen für SLC5A3 beobachtet wurde. Dieser interessante Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Transports von SOOs beim RVD und RVI-Prozess deutet darauf hin, dass in beiden volumenregulatorischen Prozessen die gleichen Transporter die Membranpermeabilität für organische Osmolyte vermitteln. Folgt man dieser bisher auf Indizien beruhenden Hypothese, dann würde sich die Aktivierung des Transports von SOOs während RVD und RVI lediglich in der Regulation des exozytotischen Einbaus der beteiligten Transporter unterscheiden.

Für die Annahme einer RVD-Beteiligung von SLC-Transportern spricht darüber hinaus, dass die Plasmamembranintegration vieler anderer prominenter SLC-Transporter den von uns gesuchten schwellungsaktivierten Transportern ähnelt. So ist beispielsweise in der SLC2-Familie der in Muskelzellen und Adipozyten exprimierte Glukosetransporter GLUT4 (SLC2A4) zu finden, der u. a. insulinvermittelt über einen gesteuerten Exozytosevorgang in die Plasmamembran integriert wird [165,168–170]. Desweiter sind in der Gruppe SLC18 an neurotransmitterhaltigen Vesikeln

befindliche Transporter SLC18A1 (VMAT1), SLC18A2 (VMAT2) und SLC18A3 (VACHT) zu finden, die die vesikuläre Aufnahme von Neurotransmittern wie Serotonin, Dopamin, Noradrenalin oder Acetylcholin in der Präsynapse ermöglichen [171]. Im Verlauf der neuronalen Signalweiterleitung verschmelzen diese Vesikel mit der Plasmamembran, wodurch diese neuronalen Botenstoffe in den synaptischen Spalt entlassen werden [171].

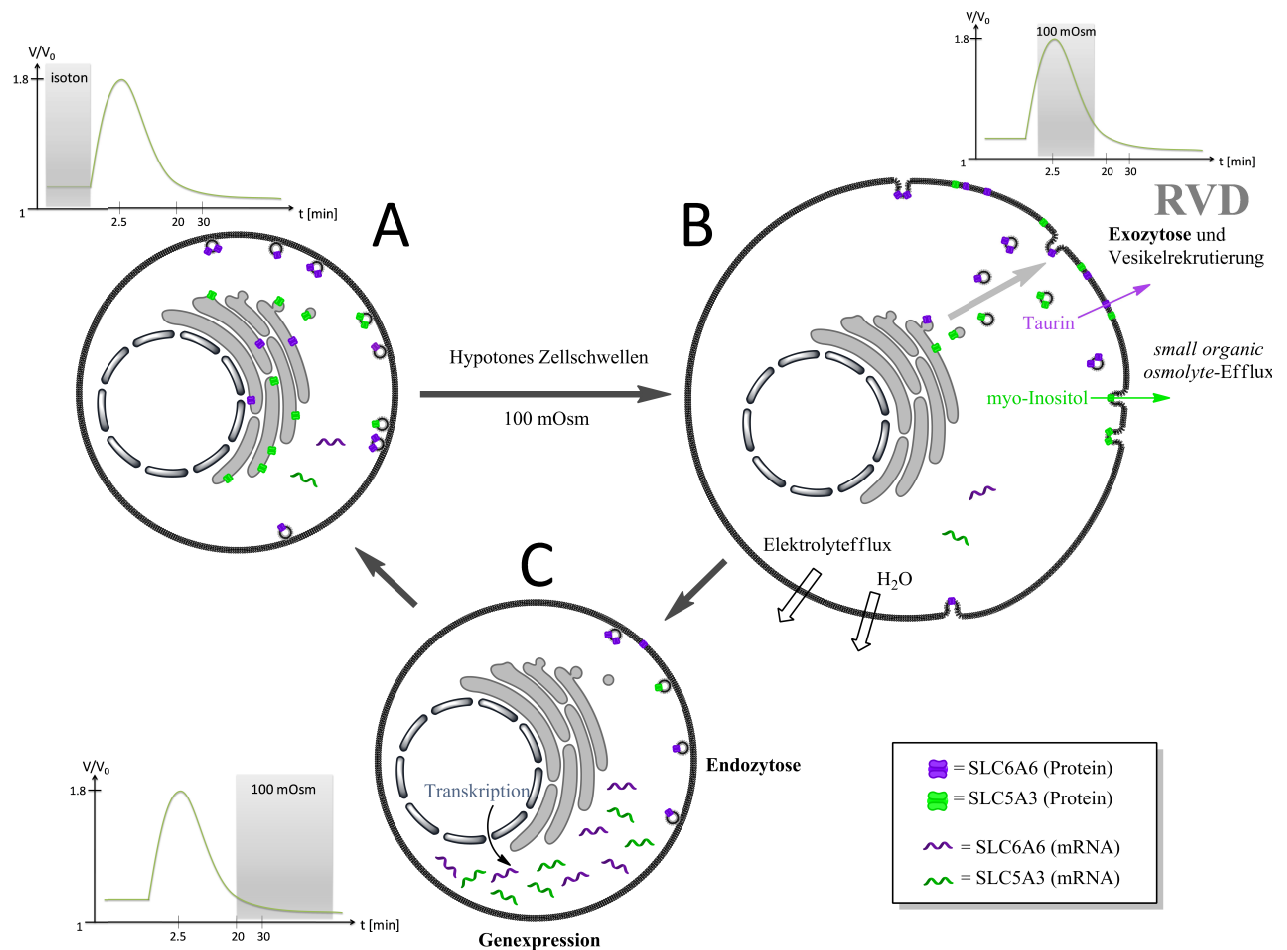
Die oben diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit deuten erstmals darauf hin, dass der hypotone myo-Inositol-Efflux durch den SLC5A3-Transporter verursacht sein könnte. Wie die volumetrischen Ergebnisse darüber hinaus zeigten, sind am Efflux von SOOs neben dem SLC5A3-Protein vermutlich weitere Transporter beteiligt. Insbesondere die semiquantitativen Ergebnisse sprechen für eine mögliche RVD-Beteiligung des Taurin-Transporters SLC6A6. Weitere potentielle Kandidaten könnten der Betain-GABA-Transporter SLC6A12 sowie der Transporter SNAT2 = SLC38 sein, der während des RVI-Prozesses mit dem Transport von neutralen Aminosäuren in Verbindung gebracht wurde [172]. Da sich noch weitere Transporter bekannter Vertreter von organischen Osmolyten innerhalb der SLC-Familien befinden, könnte dies lediglich eine kleine Auswahl sein. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann eine generelle Beteiligung von SLC-Vertretern am Prozess der hypotonen Volumenregulation potentiell angenommen werden.

Darüber hinaus sprechen insbesondere die volumetrischen Ergebnisse in Kapitel 4.2.2 für eine osmotisch versetzte Aktivierung bzw. eine zeitlich versetzte Deaktivierung der RVD-beteiligten Transportwege für unterschiedliche SOOs. Unter Berücksichtigung einer potentiellen RVD-Beteiligung von SLC-Transportern wäre diese Beobachtung entweder dadurch zu erklären, dass sich die osmolytspezifischen Transporter wie z. B. SLC5A3 und SLC6A3 in getrennten Vesikeltypen befinden. Auf diese Weise könnten sie bei unterschiedlichen Schwellungszuständen aktiviert werden und eine unterschiedlich lange Dauer in der Membran verweilen. Diese Hypothese könnte zelltypspezifisch unterschiedliche osmotische Aktivitätsschwellen für Taurin und myo-Inositol erklären. Andererseits könnten eine Kombination aus schwellungsaktivierter Integration von SLC-Transportern und die Aktivierung von dem bereits beschriebenen kanalvermitteltem SOO-Transport (z.B. über VSOAC, siehe Einleitung Kapitel 1.3) zu einer Permeabilisierung der Membran abhängig der osmotischen Bedingungen führen.

Zusammenfassend weisen die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit diskutierten Ergebnisse darauf hin (Kapitel 5.2.2), dass die Membranpermeabilität für die Osmolyte Taurin und myo-Inositol während des RVD-Prozesses über SLC-Einzeltransporter vermittelt wird. Durch die Kombination der Ergebnisse dieser Arbeit und dem von Kiesel *et al.* 2006 beschriebenen Mechanismus [15] kann die Beteiligung von organischen Osmolyten am RVD-Prozess in dem in Abbildung 29 dargestellten Modell schematisch abgebildet werden.

Dieses Modell beschreibt die potentielle Beteiligung von SLC5A3 und SLC6A6 während des RVD-Prozesses wobei die volumetrischen, molekularbiologischen und mikroskopischen Analysen

dieser Arbeit berücksichtigt sind. Unter isotonen Bedingungen (Abbildung 29, A) sind die Transporter SLC5A3 und SLC6A6 in zytosolischen Bereichen (z.B. Endoplasmatisches Retikulum) und in fusionsbereiten Vesikeln an der Plasmamembran lokalisiert. Unter diesen osmotischen Bedingungen ist das mRNA-Expressionsniveau gering, da ausreichend Transporterproteine in der Zelle vorhanden sind.



#### Abbildung 29 Modell zur Beteiligung von SLC5A3 und SLC6A6 während des RVD-Prozesses

Das Modell stellt die potentielle Beteiligung der Transporter SLC5A3 und SLC6A6 an der schwellungsaktivierten Freisetzung von myo-Inositol und Taurin im zeitlichen Verlauf des RVD-Prozesses dar. A) In der Ausgangssituation befinden sich die Zellen unter isotonen Bedingungen. Das Zellvolumen befindet sich auf einem konstanten Niveau, wie im Graph dargestellt. Die Transporter SLC5A3 und SLC6A6 befinden sich sowohl in aktivierungsbereiten Vesikeln an der Plasmamembran sowie in kernnahen Bereichen (z.B. Endoplasmatisches Retikulum). Die Transkription der beiden Gene erfolgt in geringem Umfang. B) Hypotone Stimulation (z. B. 100 mOsm) führt zu einer schnellen Volumenzunahme der Zellen (siehe Graph), wodurch die RVD-Mechanismen aktiviert werden. In einem schnellen Prozess erfolgt daraufhin die Aktivierung von Elektrolyteffluxwegen. Außerdem wird die Membranintegration der Transporter SLC5A3 und SLC6A6 durch Exozytose eingeleitet. Als Folge dieser Mechanismen wird die Membran permeabel für Elektrolyte und die organischen Osmolyte Taurin und myo-Inositol. In einem parallel stattfindenden Prozess werden weitere SLC-Transporterproteine aus inneren Ressourcen rekrutiert. C) Am Ende der Volumenregulation ( $t > \sim 20$  min) werden die SLC-Transporter endozytiert, wodurch die Impermeabilität der Membran für die entsprechenden Osmolyte zunehmend wiederhergestellt wird. Darüber hinaus findet in einem zeitlichen Bereich zwischen  $\sim 10$ - $20$  min nach hypotoner Stimulation der Zellen die verstärkte Transkription der Gene SLC5A3 und SLC6A6 statt, wodurch die Transportervorräte wieder aufgefüllt werden.

Werden die Zellen jedoch stark hypoton stimuliert (Abbildung 29, B), dann wird der RVD-Prozesses initiiert, wobei Elektrolytkanäle aktiviert und die SLC-Transporter in die Plasmamembran integriert werden. Abhängig von der osmotischen Stresshöhe werden SLC6A6-tragende Vesikel möglicherweise früher in die Membran integriert (geringere hypotone Aktivierungsschwelle) als SLC5A3-tragende Vesikel (höhere hypotone Aktivierungsschwelle). Der exozytotische Einbau führt zur Permeabilität der Plasmamembran für Taurin und myo-Inositol. In einem parallelen Prozess werden zusätzliche Transportermoleküle aus inneren Zellregionen rekrutiert, zur Plasmamembran transportiert und hierin eingebaut.

Am Ende des RVD-Prozesses (Abbildung 29, C) wird die Undurchlässigkeit der Membran für myo-Inositol und Taurin durch die Endozytose der membranassoziierten Transporter SLC5A3 und SLC6A6 wiederhergestellt. Im Vergleich zu SLC6A6 werden bei diesem Prozess die myo-Inositol-Transporter SLC5A3 vermutlich früher endozytiert, was die in den volumetrischen Daten beobachtete längere Aktivitätsdauer des Taurin-Transports nach hypotoner Stimulation erklärt. Zeitgleich wird darüber hinaus die verstärkte Genexpression von SLC5A3 und SLC6A6 beobachtet (~10-20 min nach hypotoner Stimulation der Zellen), die die Vorräte an verfügbaren RVD-beteiligten Transportern für SOOs wieder auffüllen.

Schließlich würde das Modell der schwellungsaktivierten Freisetzung organischer Osmolyte über den exozytotischen Einbau von SLC-Transportern zahlreiche Beobachtungen erklären, die mit anderen Exozytosevorgängen in Verbindung stehen [2,6,173]. Entwicklungsgeschichtlich betrachtet stellt die schwellungsbedingte Exozytose einen evolutionär sehr früh entwickelten Mechanismus dar, aus dem sich vermutlich viele andere Exozytose-gesteuerte Vorgänge potentiell abgeleitet haben. Diese Betrachtung könnte die in der Literatur gefundene Korrelation zwischen hypotonen Volumenregulationsmechanismen und anderen Exozytose-Mechanismen erklären. So wurde beispielsweise gezeigt, dass unterschiedliche Zellen und Gewebe zur Freisetzung von Hormonen (z. B. Insulin, Prolaktin, LH, FSH, GnHR, Beta-Endorphin und Glukagon) [2,173] oder Neurotransmitter wie GABA [6] durch Zellschwellen stimuliert werden können. Die osmotische Volumenregulation könnte damit als einfaches Modell für komplexe und bisher nur lückenhaft verstandene gesteuerte Exozytosevorgänge wie die Hormon- oder Neurotransmitterfreisetzung dienen, die in biologischen Systemen weit verbreitet sind.

Auch wenn in dieser Arbeit nur ein Teil der osmoregulatorischen Mechanismen beleuchtet werden konnte, so bleiben Fragen wie die Regulation der beteiligten Transportergene, der Sortiermechanismus auf Proteinebene oder die Koordinierung der Prozesse abhängig der hypotonen Stresshöhe offen. Dennoch könnte der hier aufgedeckte Zusammenhang einer RVD-Beteiligung von SLC-Proteinen für pharmazeutische, medizinische und biotechnologische Forschungsgebiete relevant sein, da SLC-Transporter seit Jahren als therapeutische Angriffspunkte bzw. Transportsysteme für Therapeutika angesehen werden [155]. Die gezielte hypotone Aktivierung einiger SLC-Transporter könnte auf diesen Gebieten somit gänzlich neue Perspektiven zur Manipulation von Zellfunktionen ermöglichen.



## Literatur

- [1] F. Lang, Mechanisms and significance of cell volume regulation, *J. Am. Coll. Nutr.*, 26 (2007) 613S–623S.
- [2] F. Lang, G.L. Busch, M. Ritter, H. Völkl, S. Waldegger, E. Gulbins, D. Häussinger, Functional significance of cell volume regulatory mechanisms, *Physiol. Rev.*, 78 (1998) 247–306.
- [3] D. Häussinger, The role of cellular hydration in the regulation of cell function, *Biochem. J.*, 313 ( Pt 3) (1996) 697–710.
- [4] E.K. Hoffmann, I.H. Lambert, S.F. Pedersen, Physiology of cell volume regulation in vertebrates, *Physiol. Rev.*, 89 (2009) 193–277.
- [5] P.R. Junankar, K. Kirk, Organic Osmolyte Channels: A Comparative View, *Cell. Physiol. Biochem.*, 10 (2000) 355–360.
- [6] H. Pasantes-Morales, R.A. Lezama, G. Ramos-Mandujano, K.L. Tuz, Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality, *Am. J. Med.*, 119 (2006) S4–11.
- [7] M.L. McManus, K.B. Churchwell, K. Strange, Regulation of cell volume in health and disease, *N. Engl. J. Med.*, 333 (1995) 1260–1266.
- [8] F. Guharay, F. Sachs, Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle, *J. Physiol.*, 352 (1984) 685–701.
- [9] S.N. Ho, Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response, *J. Cell. Physiol.*, 206 (2006) 9–15.
- [10] P.H. Yancey, M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus, G.N. Somero, Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science*, 217 (1982) 1214–1222.
- [11] S.A. Kempson, M.H. Montrose, Osmotic regulation of renal betaine transport: transcription and beyond, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, 449 (2004) 227–234.
- [12] J.D. Ferraris, M.B. Burg, Tonicity-dependent regulation of osmoprotective genes in mammalian cells, *Contrib. Nephrol.*, 152 (2006) 125–141.
- [13] H.M. Kwon, J.S. Handler, Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7 (1995) 465–471.
- [14] K. Kirk, Swelling-activated organic osmolyte channels, *J. Membr. Biol.*, 158 (1997) 1–16.
- [15] M. Kiesel, R. Reuss, J. Endter, D. Zimmermann, H. Zimmermann, R. Shirakashi, E. Bamberg, U. Zimmermann, V.L. Sukhorukov, Swelling-activated pathways in human T-lymphocytes studied by cell volumetry and electrorotation, *Biophys. J.*, 90 (2006) 4720–4729.
- [16] M.D. Cahalan, K.G. Chandy, The functional network of ion channels in T lymphocytes, *Immunol. Rev.*, 231 (2009) 59–87.
- [17] A.D. Wickenden, K<sup>+</sup> channels as therapeutic drug targets, *Pharmacol. Ther.*, 94 (2002) 157–182.

- [18] S. Choe, Potassium channel structures, *Nat. Rev. Neurosci.*, 3 (2002) 115–121.
- [19] C. Beeton, H. Wulff, N.E. Standifer, P. Azam, K.M. Mullen, M.W. Pennington, A. Kolski-Andreaco, E. Wei, A. Grino, D.R. Counts, P.H. Wang, C.J. LeeHealey, B. S Andrews, A. Sankaranarayanan, D. Homerick, W.W. Roeck, J. Tehranzadeh, K.L. Stanhope, P. Zimin, P.J. Havel, et al., Kv13 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (2006) 17414–17419.
- [20] J. Lam, H. Wulff, The lymphocyte potassium channels Kv13 and KCa31 as targets for immunosuppression, *Drug Dev. Res.*, 72 (2011) 573–584.
- [21] M. Scharl, M. Gessler, A. von Eckardstein, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*, Elsevier, Urban&FischerVerlag, 2013.
- [22] J. Parkin, B. Cohen, An overview of the immune system, *Lancet*, 357 (2001) 1777–1789.
- [23] K.A. Frauwirth, C.B. Thompson, Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation, *J. Clin. Invest.*, 109 (2002) 295–299.
- [24] Y. Yashiro, X.-G. Tai, K. Toyo-oka, C.-S. Park, R. Abe, T. Hamaoka, M. Kobayashi, S. Neben, H. Fujiwara, A fundamental difference in the capacity to induce proliferation of naive T cells between CD28 and other co-stimulatory molecules, *Eur. J. Immunol.*, 28 (1998) 926–935.
- [25] P. Ehling, S. Bittner, T. Budde, H. Wiendl, S.G. Meuth, Ion channels in autoimmune neurodegeneration, *FEBS Lett.*, 585 (2011) 3836–3842.
- [26] R.S. Lewis, M.D. Cahalan, Potassium and Calcium Channels in Lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.*, 13 (1995) 623–653.
- [27] M.D. Cahalan, K.G. Chandy, Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8 (1997) 749–756.
- [28] M.D. Cahalan, H. Wulff, K.G. Chandy, Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system, *J. Clin. Immunol.*, 21 (2001) 235–252.
- [29] T.J. Kindt, R.A. Goldsby, B.A. Osborne, *Immunology*, W.H. Freeman, New York, 2007.
- [30] R.S. Lewis, P.E. Ross, M.D. Cahalan, Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes, *J. Gen. Physiol.*, 101 (1993) 801–826.
- [31] S. Grinstein, C.A. Clarke, A. Dupre, A. Rothstein, Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes, *J. Gen. Physiol.*, 80 (1982) 801–823.
- [32] S. Grissmer, S. Ghanshani, B. Dethlefs, J.D. McPherson, J.J. Wasmuth, G.A. Gutman, M.D. Cahalan, K.G. Chandy, The Shaw-related potassium channel gene, Kv31, on human chromosome 11, encodes the type I K<sup>+</sup> channel in T cells, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 20971–20979.
- [33] R.S. Lewis, M.D. Cahalan, Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes, *Science*, 239 (1988) 771–775.
- [34] C. Deutsch, L.Q. Chen, Heterologous expression of specific K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90 (1993) 10036–10040.

- [35] R. Khanna, M.C. Chang, W.J. Joiner, L.K. Kaczmarek, L.C. Schlichter, hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes Roles in proliferation and volume regulation, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 14838–14849.
- [36] L.C. Schlichter, G. Sakellaropoulos, Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling induced by osmotic shock in human T lymphocytes, *Exp. Cell Res.*, 215 (1994) 211–222.
- [37] P.E. Ross, M.D. Cahalan, Ca<sup>2+</sup> influx pathways mediated by swelling or stores depletion in mouse thymocytes, *J. Gen. Physiol.*, 106 (1995) 415–444.
- [38] S. Grinstein, J.D. Smith, Ca<sup>2+</sup> induces charybdotoxin-sensitive membrane potential changes in rat lymphocytes, *Am. J. Physiol.*, 257 (1989) C197–206.
- [39] S. Grinstein, J.D. Smith, Calcium-independent cell volume regulation in human lymphocytes Inhibition by charybdotoxin, *J. Gen. Physiol.*, 95 (1990) 97–120.
- [40] H. Zheng, J.H. Nam, B. Pang, D.H. Shin, J.S. Kim, Y.-S. Chun, J.-W. Park, H. Bang, W.K. Kim, Y.E. Earm, S.J. Kim, Identification of the large-conductance background K<sup>+</sup> channel in mouse B cells as TREK-2, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 297 (2009) C188–197.
- [41] S.G. Meuth, S. Bittner, P. Meuth, O.J. Simon, T. Budde, H. Wiendl, TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) and TASK3 critically influence T lymphocyte effector functions, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 14559–14570.
- [42] S. Bittner, S.G. Meuth, K. Gobel, N. Melzer, A.M. Herrmann, O.J. Simon, A. Weishaupt, T. Budde, D.A. Bayliss, M. Bendszus, H. Wiendl, TASK1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system, *Brain*, (2009) awp163.
- [43] S. Bittner, N. Bobak, A.M. Herrmann, K. Göbel, P. Meuth, K.G. Höhn, M.-P. Stenner, T. Budde, H. Wiendl, S.G. Meuth, Upregulation of K2P51 potassium channels in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.*, 68 (2010) 58–69.
- [44] I.I. Pottosin, E. Bonales-Alatorre, G. Valencia-Cruz, M.L. Mendoza-Magaña, O.R. Dobrovinskaya, TRESK-like potassium channels in leukemic T cells, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, 456 (2008) 1037–1048.
- [45] G. Valencia-Cruz, L. Shabala, I. Delgado-Enciso, S. Shabala, E. Bonales-Alatorre, I.I. Pottosin, O.R. Dobrovinskaya, K(bg) and Kv13 channels mediate potassium efflux in the early phase of apoptosis in Jurkat T lymphocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 297 (2009) C1544–1553.
- [46] R.K. Kinne, The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals, *J. Exp. Zool.*, 265 (1993) 346–355.
- [47] L.J. Borowitzka, A.D. Brown, The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella* The role of glycerol as a compatible solute, *Arch. Für Mikrobiol.*, 96 (1974) 37–52.
- [48] A.D. Brown, J.R. Simpson, Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols, *J. Gen. Microbiol.*, 72 (1972) 589–591.
- [49] U. Warskulat, A. Reinen, S. Grether-Beck, J. Krutmann, D. Häussinger, The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis, *J. Invest. Dermatol.*, 123 (2004) 516–521.

- [50] M. Bitoun, M. Tappaz, Gene expression of taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in brain of rats with acute or chronic hyperosmotic plasma A comparative study with gene expression of myo-inositol transporter, betaine transporter and sorbitol biosynthetic enzyme, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 77 (2000) 10–18.
- [51] D.F. Perlman, L. Goldstein, Organic osmolyte channels in cell volume regulation in vertebrates, *J. Exp. Zool.*, 283 (1999) 725–733.
- [52] E.K. Hoffmann, S.F. Pedersen, Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways, *Acta Physiol.*, 202 (2011) 465–485.
- [53] P.S. Jackson, K. Strange, Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux, *Am. J. Physiol.*, 265 (1993) C1489–1500.
- [54] G. Roy, C. Malo, Activation of amino acid diffusion by a volume increase in cultured kidney (MDCK) cells, *J. Membr. Biol.*, 130 (1992) 83–90.
- [55] K. Kirk, J.C. Ellory, J.D. Young, Transport of organic substrates via a volume-activated channel, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 23475–23478.
- [56] U. Banderali, G. Roy, Anion channels for amino acids in MDCK cells, *Am. J. Physiol.*, 263 (1992) C1200–1207.
- [57] J.M. Solís, A.S. Herranz, O. Herreras, J. Lerma, R. Martín del Río, Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain?, *Neurosci. Lett.*, 91 (1988) 53–58.
- [58] H.K. Kimelberg, S.K. Goderie, S. Higman, S. Pang, R.A. Waniewski, Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 10 (1990) 1583–1591.
- [59] H. Pasantes-Morales, R.A. Murray, R. Sánchez-Olea, J. Morán, Regulatory volume decrease in cultured astrocytes II Permeability pathway to amino acids and polyols, *Am. J. Physiol.*, 266 (1994) C172–178.
- [60] S.J. Culliford, J.J. Borg, M.J. O'Brien, R.Z. Kozlowski, Differential effects of pyrethroids on volume-sensitive anion and organic osmolyte pathways, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31 (2004) 134–144.
- [61] S.F.B. Tomassen, D. Fekkes, H.R. de Jonge, B.C. Tilly, Osmotic swelling-provoked release of organic osmolytes in human intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286 (2004) C1417–1422.
- [62] I.H. Lambert, E.K. Hoffmann, Cell swelling activates separate taurine and chloride channels in Ehrlich mouse ascites tumor cells, *J. Membr. Biol.*, 142 (1994) 289–298.
- [63] A. Stutzin, R. Torres, M. Oporto, P. Pacheco, A.L. Eguiguren, L.P. Cid, F.V. Sepúlveda, Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease, *Am. J. Physiol.*, 277 (1999) C392–402.
- [64] E.M. Davis-Amaral, M.W. Musch, L. Goldstein, Chloride and taurine effluxes occur by different pathways in skate erythrocytes, *Am. J. Physiol.*, 271 (1996) R1544–1549.
- [65] R.-P. Czekay, Osmo- und Volumenregulation in isolierten Sammelrohrzellen der inneren Medulla der Rattenniere (IMCD): die Rolle der Plasmamembran und des Cytoskeletts bei der Freisetzung des organischen Osmolyts Sorbitol, (1991).

- [66] V.L. Sukhorukov, D. Imes, M.W. Woellhaf, J. Andronic, M. Kiesel, R. Shirakashi, U. Zimmermann, H. Zimmermann, Pore size of swelling-activated channels for organic osmolytes in Jurkat lymphocytes, probed by differential polymer exclusion, *Biochim. Biophys. Acta*, 1788 (2009) 1841–1850.
- [67] Kiesel, Martin, *Biophysikalische Analyse der Volumenregulation tierischer Zellen*, Julius-Maximilians-Universität, 2008.
- [68] R. Reuss, J. Ludwig, R. Shirakashi, F. Ehrhart, H. Zimmermann, S. Schneider, M.M. Weber, U. Zimmermann, H. Schneider, V.L. Sukhorukov, Intracellular delivery of carbohydrates into mammalian cells through swelling-activated pathways, *J. Membr. Biol.*, 200 (2004) 67–81.
- [69] C.S. Djuzenova, J. Krasnyanska, M. Kiesel, L. Stingl, U. Zimmermann, M. Flentje, V.L. Soukhoroukov, Intracellular delivery of 2-deoxy-D-glucose into tumor cells by long-term cultivation and through swelling-activated pathways: Implications for radiation treatment, *Strahlenther. Onkol.*, 185 (2009) 159.
- [70] V.L. Sukhorukov, R. Reuss, D. Zimmermann, C. Held, K.J. Müller, M. Kiesel, P. Gessner, A. Steinbach, W.A. Schenk, E. Bamberg, U. Zimmermann, Surviving high-intensity field pulses: strategies for improving robustness and performance of electrotransfection and electrofusion, *J. Membr. Biol.*, 206 (2005) 187–201.
- [71] V.L. Sukhorukov, R. Reuss, J.M. Endter, S. Fehrmann, A. Katsen-Globa, P. Gessner, A. Steinbach, K.J. Müller, A. Karpas, U. Zimmermann, H. Zimmermann, A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346 (2006) 829–839.
- [72] U. Schneider, H.U. Schwenk, G. Bornkamm, Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, 19 (1977) 621–626.
- [73] B.B. Knowles, C.C. Howe, D.P. Aden, Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science*, 209 (1980) 497–499.
- [74] D.P. Aden, A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, B.B. Knowles, Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, *Nature*, 282 (1979) 615–616.
- [75] F.L. Graham, J. Smiley, W.C. Russell, R. Nairn, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J. Gen. Virol.*, 36 (1977) 59–74.
- [76] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, 9 (2012) 671–675.
- [77] S. Wolter, M. Schüttpelz, M. Tscherepanow, S. VAN DE Linde, M. Heilemann, M. Sauer, Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images, *J. Microsc.*, 237 (2010) 12–22.
- [78] N. Bobak, S. Bittner, J. Andronic, S. Hartmann, F. Mühlpfordt, T. Schneider-Hohendorf, K. Wolf, C. Schmelter, K. Göbel, P. Meuth, H. Zimmermann, F. Döring, E. Wischmeyer, T. Budde, H. Wiendl, S.G. Meuth, V.L. Sukhorukov, Volume regulation of murine T lymphocytes relies on voltage-dependent and two-pore domain potassium channels, *Biochim. Biophys. Acta*, 1808 (2011) 2036–2044.

- [79] J. Andronic, N. Bobak, S. Bittner, P. Ehling, C. Kleinschnitz, A.M. Herrmann, H. Zimmermann, M. Sauer, H. Wiendl, T. Budde, S.G. Meuth, V.L. Sukhorukov, Identification of two-pore domain potassium channels as potent modulators of osmotic volume regulation in human T lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828 (2013) 699–707.
- [80] A. Trickett, Y.L. Kwan, T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads, *J. Immunol. Methods*, 275 (2003) 251–255.
- [81] R.H. Fogh, W.R. Kem, R.S. Norton, Solution structure of neurotoxin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* A nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics study, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 13016–13028.
- [82] H. Schwarz, F.J. Blanco, M. Lotz, Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis, *J. Neuroimmunol.*, 55 (1994) 107–115.
- [83] S.G. Meuth, T. Budde, T. Kanyshkova, T. Broicher, T. Munsch, H.-C. Pape, Contribution of TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 23 (2003) 6460–6469.
- [84] F. Maingret, A.J. Patel, M. Lazdunski, E. Honoré, The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K<sup>(+)</sup> channel TASK-1, *EMBO J.*, 20 (2001) 47–54.
- [85] C. Putzke, K. Wemhöner, F.B. Sachse, S. Rinné, G. Schlichthörl, X.T. Li, L. Jaé, I. Eckhardt, E. Wischmeyer, H. Wulf, R. Preisig-Müller, J. Daut, N. Decher, The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle, *Cardiovasc. Res.*, 75 (2007) 59–68.
- [86] C.H. Kindler, C.S. Yost, A.T. Gray, Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem, *Anesthesiology*, 90 (1999) 1092–1102.
- [87] C.H. Kindler, M. Paul, H. Zou, C. Liu, B.D. Winegar, A.T. Gray, C.S. Yost, Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K<sup>+</sup> channel TASK-2 (KCNK5), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306 (2003) 84–92.
- [88] S.A. Goldstein, D. Bockenbauer, I. O’Kelly, N. Zilberberg, Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2 (2001) 175–184.
- [89] S.A.N. Goldstein, D.A. Bayliss, D. Kim, F. Lesage, L.D. Plant, S. Rajan, International Union of Pharmacology LV Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels, *Pharmacol. Rev.*, 57 (2005) 527–540.
- [90] B. Musset, S.G. Meuth, G.X. Liu, C. Derst, S. Wegner, H.-C. Pape, T. Budde, R. Preisig-Müller, J. Daut, Effects of divalent cations and spermine on the K<sup>+</sup> channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons, *J. Physiol.*, 572 (2006) 639–657.
- [91] G. Czirják, P. Enyedi, Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits, *Mol. Pharmacol.*, 63 (2003) 646–652.
- [92] O. Castañeda, V. Sotolongo, A.M. Amor, R. Stöcklin, A.J. Anderson, A.L. Harvey, A. Engström, C. Wernstedt, E. Karlsson, Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*, *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology*, 33 (1995) 603–613.

- [93] M.W. Pennington, M.E. Byrnes, I. Zaydenberg, I. Khaytin, J. de Chastonay, D.S. Krafte, R. Hill, V.M. Mahnir, W.A. Volberg, W. Gorczyca, Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 46 (1995) 354–358.
- [94] C. Beeton, B.J. Smith, J.K. Sabo, G. Crossley, D. Nugent, I. Khaytin, V. Chi, K.G. Chandy, M.W. Pennington, R.S. Norton, The D-diastereomer of ShK toxin selectively blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels and inhibits T lymphocyte proliferation, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 988–997.
- [95] H. Wulff, M.J. Miller, W. Hansel, S. Grissmer, M.D. Cahalan, K.G. Chandy, Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a potential immunosuppressant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (2000) 8151–8156.
- [96] A.D. Lúcio, R.A.S. Santos, O.N. Mesquita, Measurements and modeling of water transport and osmoregulation in a single kidney cell using optical tweezers and videomicroscopy, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 68 (2003) 041906.
- [97] A.W. Siebens, K.R. Spring, A novel sorbitol transport mechanism in cultured renal papillary epithelial cells, *Am. J. Physiol.*, 257 (1989) F937–946.
- [98] P.R. Junankar, A. Karjalainen, K. Kirk, Osmotic swelling activates two pathways for K<sup>+</sup> efflux in a rat hepatoma cell line, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 14 (2004) 143–154.
- [99] C.T. Chung, S.L. Niemela, R.H. Miller, One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86 (1989) 2172–2175.
- [100] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 1 (1986) 263–273.
- [101] J.R. Brody, S.E. Kern, Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis, *BioTechniques*, 36 (2004) 214–216.
- [102] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74 (1977) 5463–5467.
- [103] J.H. Cha, S.K. Woo, K.H. Han, Y.H. Kim, J.S. Handler, J. Kim, H.M. Kwon, Hydration status affects nuclear distribution of transcription factor tonicity responsive enhancer binding protein in rat kidney, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, 12 (2001) 2221–2230.
- [104] H.M. Kwon, A. Yamauchi, S. Uchida, A.S. Preston, A. Garcia-Perez, M.B. Burg, J.S. Handler, Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 6297–6301.
- [105] S. Uchida, H.M. Kwon, A. Yamauchi, A.S. Preston, F. Marumo, J.S. Handler, Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na<sup>(+)</sup>- and Cl<sup>(-)</sup>-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89 (1992) 8230–8234.
- [106] W.A. Schulz, P. Eickelmann, C. Hallbrucker, H. Sies, D. Häussinger, Increase of beta-actin mRNA upon hypotonic perfusion of perfused rat liver, *FEBS Lett.*, 292 (1991) 264–266.

- [107] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 162 (1987) 156–159.
- [108] B. Vogelstein, D. Gillespie, Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76 (1979) 615–619.
- [109] H.C. Birnboim, J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, 7 (1979) 1513–1523.
- [110] S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes, *Nat. Protoc.*, 6 (2011) 991–1009.
- [111] S. van de Linde, S. Aufmkolk, C. Franke, T. Holm, T. Klein, A. Löschberger, S. Proppert, S. Wolter, M. Sauer, Investigating Cellular Structures at the Nanoscale with Organic Fluorophores, *Chem. Biol.*, 20 (2013) 8–18.
- [112] T. Klein, A. Löschberger, S. Proppert, S. Wolter, S. van de Linde, M. Sauer, Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins, *Nat. Methods*, 8 (2011) 7–9.
- [113] S. Wolter, A. Löschberger, T. Holm, S. Aufmkolk, M.-C. Dabauvalle, S. van de Linde, M. Sauer, rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy, *Nat. Methods*, 9 (2012) 1040–1041.
- [114] S.C. Lee, M. Price, M.B. Prystowsky, C. Deutsch, Volume response of quiescent and interleukin 2-stimulated T-lymphocytes to hypotonicity, *Am. J. Physiol.*, 254 (1988) C286–296.
- [115] S. Rangaraju, V. Chi, M.W. Pennington, K.G. Chandy, Kv13 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis, *Expert Opin. Ther. Targets*, 13 (2009) 909–924.
- [116] S. Grinstein, A. Rothstein, B. Sarkadi, E.W. Gelfand, Responses of lymphocytes to anisotonic media: volume-regulating behavior, *Am. J. Physiol.*, 246 (1984) C204–215.
- [117] S. Bittner, N. Bobak, M. Feuchtenberger, A.M. Herrmann, K. Göbel, R.W. Kinne, A.J. Hansen, T. Budde, C. Kleinschnitz, O. Frey, H.-P. Tony, H. Wiendl, S.G. Meuth, Expression of K2P51 potassium channels on CD4+ T lymphocytes correlates with disease activity in rheumatoid arthritis patients, *Arthritis Res. Ther.*, 13 (2011) 1–9.
- [118] L. Xu, A. Tripathy, D.A. Pasek, G. Meissner, Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca(2+) release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 32680–32691.
- [119] R. Reyes, F. Duprat, F. Lesage, M. Fink, M. Salinas, N. Farman, M. Lazdunski, Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K+ channel from human kidney, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 30863–30869.
- [120] H.J. Meadows, A.D. Randall, Functional characterisation of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel, *Neuropharmacology*, 40 (2001) 551–559.
- [121] D. Leonoudakis, A.T. Gray, B.D. Winegar, C.H. Kindler, M. Harada, D.M. Taylor, R.A. Chavez, J.R. Forsayeth, C.S. Yost, An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 18 (1998) 868–877.



- [122] M.S. Kwon, K.Y. Na, G. Moeckel, S.D. Lee, H.M. Kwon, Urea promotes TonEBP expression and cellular adaptation in extreme hypertonicity, *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, 459 (2009) 183–189.
- [123] E.L. Snapp, P. Lajoie, Imaging of Membrane Systems and Membrane Traffic in Living Cells, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2011 (2011) pdb.top066548.
- [124] A. Shukla, N. Hashiguchi, Y. Chen, R. Coimbra, D.B. Hoyt, W.G. Junger, Osmotic regulation of cell function and possible clinical applications, *Shock Augusta Ga*, 21 (2004) 391–400.
- [125] H. Barriere, R. Belfodil, I. Rubera, M. Tauc, F. Lesage, C. Poujeol, N. Guy, J. Barhanin, P. Poujeol, Role of TASK2 Potassium Channels Regarding Volume Regulation in Primary Cultures of Mouse Proximal Tubules, *J. Gen. Physiol.*, 122 (2003) 177–190.
- [126] S. L'Hoste, M. Poet, C. Duranton, R. Belfodil, H. é Barriere, I. Rubera, M. Tauc, C. Poujeol, J. Barhanin, P. Poujeol, Role of TASK2 in the control of apoptotic volume decrease in proximal kidney cells, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 36692–36703.
- [127] T.G. Cooper, C.H. Yeung, Involvement of potassium and chloride channels and other transporters in volume regulation by spermatozoa, *Curr. Pharm. Des.*, 13 (2007) 3222–3230.
- [128] M.I. Niemeyer, L.P. Cid, F.V. Sepúlveda, K<sup>+</sup> conductance activated during regulatory volume decrease The channels in Ehrlich cells and their possible molecular counterpart, *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 130 (2001) 565–575.
- [129] M.I. Niemeyer, L.P. Cid, L.F. Barros, F.V. Sepúlveda, Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 43166–43174.
- [130] C. Beeton, H. Wulff, J. Barbaria, O. Clot-Faybesse, M. Pennington, D. Bernard, M.D. Cahalan, K.G. Chandy, E. Béraud, Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (2001) 13942–13947.
- [131] S.D. Miller, W.J. Karpus, T.S. Davidson, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse, *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan A1, CHAPTER (2007) Unit–15.1.
- [132] S. Bittner, M.A. Bauer, P. Ehling, N. Bobak, J. Breuer, A.M. Herrmann, M. Golfels, H. Wiendl, T. Budde, S.G. Meuth, The TASK1 channel inhibitor A293 shows efficacy in a mouse model of multiple sclerosis, *Exp. Neurol.*, 238 (2012) 149–155.
- [133] S.M. Bezrukov, I. Vodyanoy, V.A. Parsegian, Counting polymers moving through a single ion channel, *Nature*, 370 (1994) 279–281.
- [134] Z. Siwy, Y. Gu, H.A. Spohr, D. Baur, A. Wolf-Reber, R. Spohr, P. Apel, Y.E. Korchev, Rectification and voltage gating of ion currents in a nanofabricated pore, *Europhys. Lett.*, 60 (2002) 349–355.
- [135] V.I. Ternovsky, Y. Okada, R.Z. Sabirov, Sizing the pore of the volume-sensitive anion channel by differential polymer partitioning, *FEBS Lett.*, 576 (2004) 433–436.
- [136] O. Biondi, S. Motta, P. Mosesso, Low molecular weight polyethylene glycol induces chromosome aberrations in Chinese hamster cells cultured in vitro, *Mutagenesis*, 17 (2002) 261–264.

- [137] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert, Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 6288–6308.
- [138] J.I. van der Spoel, H.M. Oudemans-van Straaten, M.A. Kuiper, E.N. van Roon, D.F. Zandstra, P.H.J. van der Voort, Laxation of critically ill patients with lactulose or polyethylene glycol: A two-center randomized, double-blind, placebo-controlled trial\*, *Crit. Care Med.*, 35 (2007) 2726–2731.
- [139] C.M.M. Carneiro, P.G. Merzlyak, L.N. Yuldasheva, L.G. Silva, F.P. Thinnés, O.V. Krasilnikov, Probing the volume changes during voltage gating of Porin 31BM channel with nonelectrolyte polymers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1612 (2003) 144–153.
- [140] P.G. Merzlyak, L.N. Yuldasheva, C.G. Rodrigues, C.M. Carneiro, O.V. Krasilnikov, S.M. Bezrukov, Polymeric nonelectrolytes to probe pore geometry: application to the alpha-toxin transmembrane channel, *Biophys. J.*, 77 (1999) 3023–3033.
- [141] V.D. Antonenkov, R.T. Sormunen, J.K. Hiltunen, The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites in vitro, *J. Cell Sci.*, 117 (2004) 5633–5642.
- [142] R.Z. Sabirov, Y. Okada, Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway, *Biophys. J.*, 87 (2004) 1672–1685.
- [143] O.S. Ostroumova, P.A. Gurnev, L.V. Schagina, S.M. Bezrukov, Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning, *FEBS Lett.*, 581 (2007) 804–808.
- [144] S. Kuga, Pore size distribution analysis of gel substances by size exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A*, 206 (1981) 449–461.
- [145] K. Ishibashi, S. Sasaki, K. Fushimi, S. Uchida, M. Kuwahara, H. Saito, T. Furukawa, K. Nakajima, Y. Yamaguchi, T. Gojobori, Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91 (1994) 6269–6273.
- [146] D. Fu, M. Lu, The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins (Review), *Mol. Membr. Biol.*, 24 (2007) 366–374.
- [147] Y. Yamaji, D.M. Valdez Jr, S. Seki, K. Yazawa, C. Urakawa, B. Jin, M. Kasai, F.W. Kleinhans, K. Edashige, Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in *Xenopus* oocytes, *Cryobiology*, 53 (2006) 258–267.
- [148] Y. Okada, Cell Volume-Sensitive Chloride Channels: Phenotypic Properties and Molecular Identity, in: F. Lang (Ed.), *Contrib. Nephrol.*, KARGER, Basel, 2006: pp. 9–24.
- [149] C. Stegen, I. Matskevich, C.A. Wagner, M. Paulmichl, F. Lang, S. Bröer, Swelling-induced taurine release without chloride channel activity in *Xenopus laevis* oocytes expressing anion channels and transporters, *Biochim. Biophys. Acta*, 1467 (2000) 91–100.
- [150] T.J. Furlong, T. Moriyama, K.R. Spring, Activation of osmolyte efflux from cultured renal papillary epithelial cells, *J. Membr. Biol.*, 123 (1991) 269–277.

- [151] B. Ruhfus, R.K. Kinne, Hypotonicity-activated efflux of taurine and myo-inositol in rat inner medullary collecting duct cells: evidence for a major common pathway, *Kidney Blood Press. Res.*, 19 (1996) 317–324.
- [152] R.K. Kinne, Mechanisms of osmolyte release, *Contrib. Nephrol.*, 123 (1998) 34–49.
- [153] B. Ruhfus, H. Tinel, R.K. Kinne, Role of G-proteins in the regulation of organic osmolyte efflux from isolated rat renal inner medullary collecting duct cells, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, 433 (1996) 35–41.
- [154] S.F. Pedersen, K.H. Beisner, C. Hougaard, B.M. Willumsen, I.H. Lambert, E.K. Hoffmann, Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts, *J. Physiol.*, 541 (2002) 779–796.
- [155] M.A. Hediger, M.F. Romero, J.-B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, E.A. Bruford, The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, 447 (2004) 465–468.
- [156] R. Fredriksson, K.J.V. Nordström, O. Stephansson, M.G.A. Hägglund, H.B. Schiöth, The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families, *FEBS Lett.*, 582 (2008) 3811–3816.
- [157] H. Satsu, M. Manabe, M. Shimizu, Activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is involved in hyperosmotic induction of the human taurine transporter, *FEBS Lett.*, 569 (2004) 123–128.
- [158] J.S. Rim, M.G. Atta, S.C. Dahl, G.T. Berry, J.S. Handler, H.M. Kwon, Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple tonicity-responsive enhancers spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 20615–20621.
- [159] J.J. Mallee, M.G. Atta, V. Lorica, J.S. Rim, H.M. Kwon, A.D. Lucente, Y. Wang, G.T. Berry, The Structural Organization of the Human Na<sup>+</sup>/Myo-inositol Cotransporter (SLC5A3) Gene and Characterization of the Promoter, *Genomics*, 46 (1997) 459–465.
- [160] A. Paredes, M. McManus, H.M. Kwon, K. Strange, Osmoregulation of Na<sup>(+)</sup>-inositol cotransporter activity and mRNA levels in brain glial cells, *Am. J. Physiol.*, 263 (1992) C1282–1288.
- [161] C. Zhou, N. Agarwal, P. Cammarata, Osmoregulatory alterations in myo-inositol uptake by bovine lens epithelial cells Part 2: Cloning of a 626 bp cDNA portion of a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, an osmotic shock protein, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35 (1994) 1236–1242.
- [162] S.K. Woo, S.C. Dahl, J.S. Handler, H.M. Kwon, Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 278 (2000) F1006–1012.
- [163] E.M. Wright, Glucose transport families SLC5 and SLC50, *Mol. Aspects Med.*, 34 (2013) 183–196.
- [164] C. Denkert, U. Warskulat, F. Hensel, D. Häussinger, Osmolyte strategy in human monocytes and macrophages: involvement of p38MAPK in hyperosmotic induction of betaine and myoinositol transporters, *Arch. Biochem. Biophys.*, 354 (1998) 172–180.

- [165] P.B. Oatey, D.H. Van Weering, S.P. Dobson, G.W. Gould, J.M. Tavaré, GLUT4 vesicle dynamics in living 3T3 L1 adipocytes visualized with green-fluorescent protein, *Biochem. J.*, 327 ( Pt 3) (1997) 637–642.
- [166] T. Klein, S. Proppert, M. Sauer, Eight years of single-molecule localization microscopy, *Histochem. Cell Biol.*, (2014) 1–15.
- [167] S.A. Kempson, V. Parikh, L. Xi, S. Chu, M.H. Montrose, Subcellular redistribution of the renal betaine transporter during hypertonic stress, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285 (2003) C1091–1100.
- [168] M. Uldry, B. Thorens, The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, 447 (2004) 480–489.
- [169] H.P.M.M. Lauritzen, In vivo imaging of GLUT4 translocation, *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appliquée Nutr. Métabolisme*, 34 (2009) 420–423.
- [170] J.W. Slot, H.J. Geuze, S. Gigengack, D.E. James, G.E. Lienhard, Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 (1991) 7815–7819.
- [171] L.E. Eiden, M.K.-H. Schäfer, E. Weihe, B. Schütz, The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, 447 (2004) 636–640.
- [172] R. Franchi-Gazzola, V. Dall'Asta, R. Sala, R. Visigalli, E. Bevilacqua, F. Gaccioli, G.C. Gazzola, O. Bussolati, The role of the neutral amino acid transporter SNAT2 in cell volume regulation, *Acta Physiol.*, 187 (2006) 273–283.
- [173] V. Strbák, M.A. Greer, Regulation of hormone secretion by acute cell volume changes: Ca(2+)-independent hormone secretion, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 10 (2000) 393–402.

# Appendix

## Vollständige Daten zu Abbildung 17

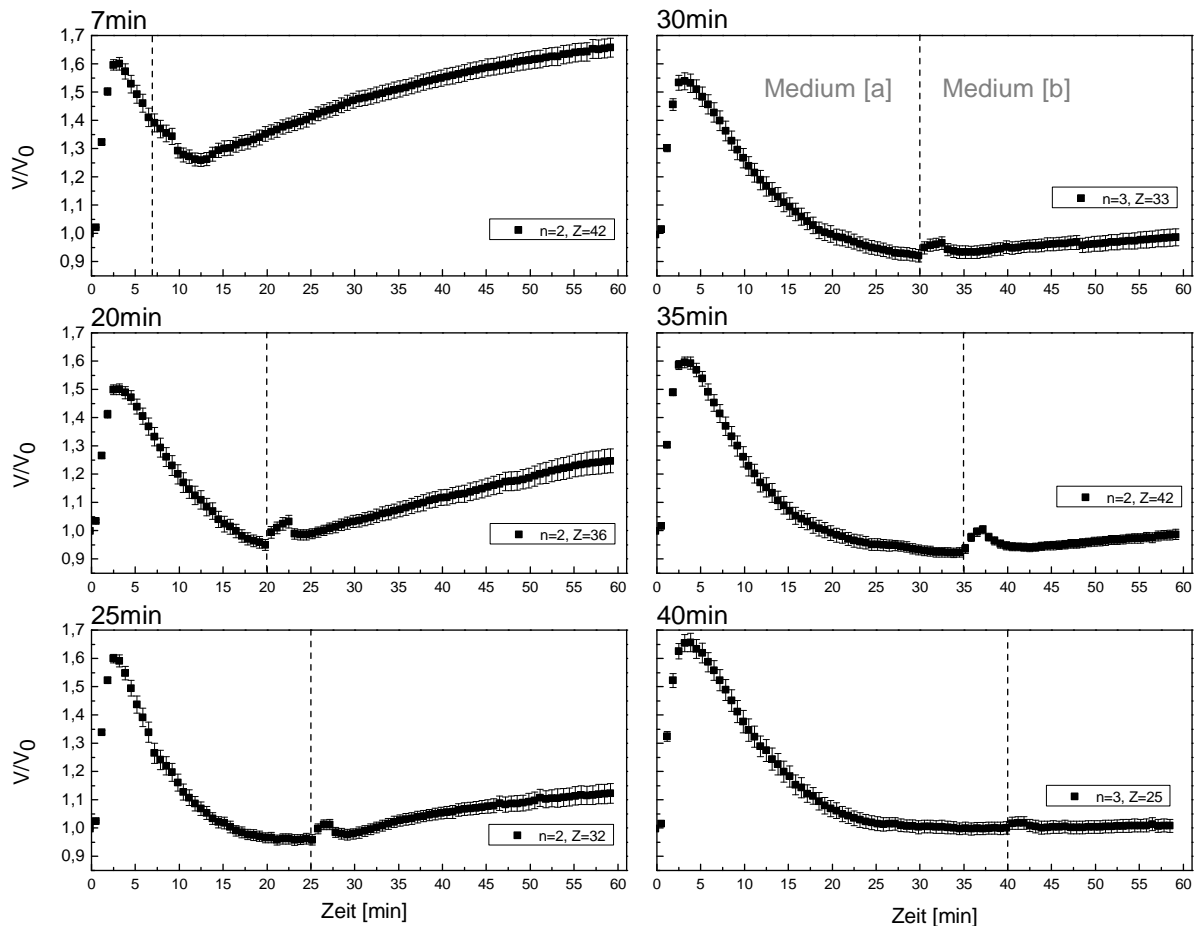
**Tabelle 23 Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die osmoregulatorischen Eigenschaften von humanen naiven und stimulierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten.**

Verändert nach Andronic *et al.* 2013 [siehe eigene Publikationen]

|            | Kanalblocker           | Blockerkonzentration | $v_2 \pm SE$      | $v_{end} \pm SE$  | IC <sub>RVD</sub> $\pm SE$<br>% | N<br>Zellzahl |
|------------|------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------------|
| Naiv       | unbehandelte Kontrolle |                      | 1.207 $\pm$ 0.004 | 1.049 $\pm$ 0.003 |                                 | 118           |
|            | Anandamid              | 3 $\mu$ M            | 1.158 $\pm$ 0.007 | 1.055 $\pm$ 0.006 | 5.2 $\pm$ 4.4                   | 39            |
|            |                        | 30 $\mu$ M           | 1.150 $\pm$ 0.006 | 1.089 $\pm$ 0.004 | 39.3 $\pm$ 3.8                  | 39            |
|            |                        | 100 $\mu$ M          | 1.168 $\pm$ 0.005 | 1.182 $\pm$ 0.002 | 112.2 $\pm$ 3.6                 | 81            |
|            | AVE                    | 1 $\mu$ M            | 1.194 $\pm$ 0.004 | 1.092 $\pm$ 0.002 | 29.4 $\pm$ 1.4                  | 141           |
|            |                        | 3 $\mu$ M            | 1.209 $\pm$ 0.006 | 1.097 $\pm$ 0.003 | 29.9 $\pm$ 2.0                  | 64            |
|            |                        | 10 $\mu$ M           | 1.213 $\pm$ 0.004 | 1.102 $\pm$ 0.002 | 32.2 $\pm$ 1.3                  | 138           |
|            | Rutheniumrot           | 10 $\mu$ M           | 1.207 $\pm$ 0.004 | 1.182 $\pm$ 0.002 | 84.1 $\pm$ 2.1                  | 78            |
|            |                        | 100 $\mu$ M          | 1.173 $\pm$ 0.007 | 1.143 $\pm$ 0.002 | 76.1 $\pm$ 3.8                  | 61            |
|            |                        | 1 mM                 | 1.158 $\pm$ 0.005 | 1.137 $\pm$ 0.003 | 80.4 $\pm$ 3.3                  | 85            |
|            | Spermin                | 100 $\mu$ M          | 1.212 $\pm$ 0.006 | 1.029 $\pm$ 0.002 | 19.6 $\pm$ 0.9                  | 104           |
|            |                        | 500 $\mu$ M          | 1.178 $\pm$ 0.004 | 1.032 $\pm$ 0.002 | 24.8 $\pm$ 1.2                  | 67            |
|            |                        | 1 mM                 | 1.212 $\pm$ 0.005 | 1.035 $\pm$ 0.002 | 22.2 $\pm$ 1.0                  | 82            |
|            | Quinidin               | 2 $\mu$ M            | 1.183 $\pm$ 0.006 | 1.149 $\pm$ 0.002 | 74.5 $\pm$ 3.1                  | 68            |
|            |                        | 20 $\mu$ M           | 1.177 $\pm$ 0.004 | 1.142 $\pm$ 0.002 | 72.8 $\pm$ 2.4                  | 82            |
|            |                        | 100 $\mu$ M          | 1.185 $\pm$ 0.006 | 1.163 $\pm$ 0.003 | 84.4 $\pm$ 3.0                  | 80            |
|            | Bupivacain             | 3 $\mu$ M            | 1.183 $\pm$ 0.006 | 1.107 $\pm$ 0.003 | 42.8 $\pm$ 2.5                  | 84            |
|            |                        | 30 $\mu$ M           | 1.163 $\pm$ 0.006 | 1.140 $\pm$ 0.003 | 79.6 $\pm$ 3.4                  | 51            |
|            |                        | 300 $\mu$ M          | 1.170 $\pm$ 0.006 | 1.112 $\pm$ 0.004 | 52.0 $\pm$ 3.3                  | 52            |
|            | ShK                    | 1 nM                 | 1.228 $\pm$ 0.005 | 1.169 $\pm$ 0.002 | 67.1 $\pm$ 1.7                  | 155           |
| 10 nM      |                        | 1.207 $\pm$ 0.006    | 1.185 $\pm$ 0.002 | 85.9 $\pm$ 3.0    | 93                              |               |
| 100 nM     |                        | 1.183 $\pm$ 0.006    | 1.169 $\pm$ 0.002 | 89.4 $\pm$ 3.0    | 78                              |               |
| Stimuliert | unbehandelte Kontrolle |                      | 1.189 $\pm$ 0.007 | 1.067 $\pm$ 0.005 |                                 | 57            |
|            | Anandamid              | 3 $\mu$ M            | 1.209 $\pm$ 0.007 | 1.129 $\pm$ 0.005 | 44.1 $\pm$ 3.2                  | 49            |
|            |                        | 30 $\mu$ M           | 1.231 $\pm$ 0.006 | 1.125 $\pm$ 0.004 | 35.2 $\pm$ 2.2                  | 56            |
|            |                        | 100 $\mu$ M          | 1.245 $\pm$ 0.006 | 1.202 $\pm$ 0.005 | 76.1 $\pm$ 3.0                  | 59            |
|            | AVE                    | 1 $\mu$ M            | 1.198 $\pm$ 0.008 | 1.109 $\pm$ 0.008 | 32.2 $\pm$ 4.5                  | 26            |
|            |                        | 3 $\mu$ M            | 1.224 $\pm$ 0.007 | 1.130 $\pm$ 0.005 | 40.3 $\pm$ 3.0                  | 43            |
|            |                        | 10 $\mu$ M           | 1.202 $\pm$ 0.008 | 1.123 $\pm$ 0.006 | 41.5 $\pm$ 4.1                  | 37            |
|            | Rutheniumrot           | 10 $\mu$ M           | 1.224 $\pm$ 0.007 | 1.107 $\pm$ 0.004 | 25.8 $\pm$ 2.2                  | 31            |
|            |                        | 100 $\mu$ M          | 1.252 $\pm$ 0.007 | 1.153 $\pm$ 0.004 | 46.6 $\pm$ 2.2                  | 45            |
|            |                        | 1 mM                 | 1.279 $\pm$ 0.008 | 1.140 $\pm$ 0.004 | 34.4 $\pm$ 2.1                  | 21            |
|            | Spermin                | 100 $\mu$ M          | 1.195 $\pm$ 0.010 | 1.102 $\pm$ 0.006 | 56.7 $\pm$ 3.9                  | 21            |
|            |                        | 500 $\mu$ M          | 1.170 $\pm$ 0.009 | 1.098 $\pm$ 0.005 | 61.9 $\pm$ 3.9                  | 19            |
|            |                        | 1 mM                 | 1.239 $\pm$ 0.009 | 1.146 $\pm$ 0.007 | 64.1 $\pm$ 3.6                  | 28            |
|            | Quinidin               | 2 $\mu$ M            | 1.265 $\pm$ 0.005 | 1.202 $\pm$ 0.003 | 68.6 $\pm$ 1.9                  | 119           |
|            |                        | 20 $\mu$ M           | 1.213 $\pm$ 0.006 | 1.172 $\pm$ 0.003 | 72.2 $\pm$ 2.7                  | 86            |
|            |                        | 100 $\mu$ M          | 1.211 $\pm$ 0.004 | 1.130 $\pm$ 0.004 | 44.2 $\pm$ 2.1                  | 82            |
|            | Bupivacain             | 3 $\mu$ M            | 1.221 $\pm$ 0.005 | 1.153 $\pm$ 0.004 | 56.0 $\pm$ 2.6                  | 46            |
|            |                        | 30 $\mu$ M           | 1.254 $\pm$ 0.009 | 1.202 $\pm$ 0.005 | 72.5 $\pm$ 3.5                  | 41            |
|            |                        | 300 $\mu$ M          | 1.214 $\pm$ 0.007 | 1.075 $\pm$ 0.005 | 5.4 $\pm$ 2.6                   | 35            |
|            | ShK                    | 1 nM                 | 1.234 $\pm$ 0.007 | 1.143 $\pm$ 0.004 | 45.4 $\pm$ 2.5                  | 46            |
| 10 nM      |                        | 1.217 $\pm$ 0.011    | 1.163 $\pm$ 0.003 | 64.1 $\pm$ 4.2    | 49                              |               |
| 100 nM     |                        | 1.208 $\pm$ 0.007    | 1.165 $\pm$ 0.003 | 69.7 $\pm$ 3.0    | 52                              |               |

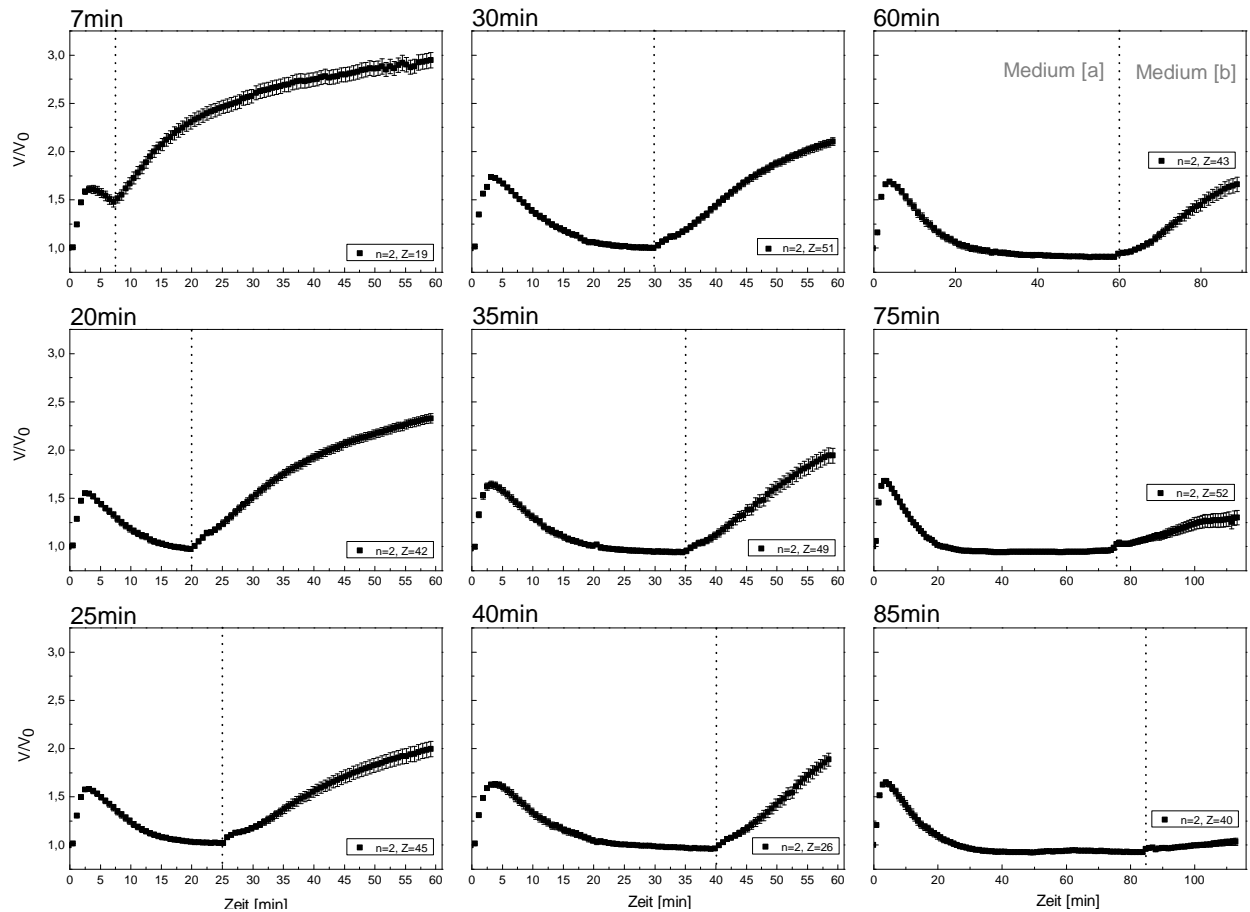
## Volumetrische Messungen zu Abbildung 24

In den folgenden Abbildungen sind die vollständigen Messergebnisse zu Abbildung 24 dargestellt. Die detailliertere Beschreibung zu diesen Messungen sind den Kapiteln 3.2.2 sowie 4.2.2 zu entnehmen.



**Abbildung 30** Vollständige volumetrische myo-Inositol-Messungen zu Abbildung 24

Die Änderung des relativen Zellvolumens ( $V/V_0$ ) von HEK293-Zellen ist hier im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Zellen wurden zunächst mit 100 mOsm Saccharose-Volumetriemedium (= Medium A) konfrontiert. In diesem Medium sind die Zellen innerhalb von ~30 min zur vollständigen Volumenregulation fähig (siehe Abbildung 24, A). Ohne die extrazelluläre Osmolalität zu ändern, wurde das Saccharose-Medium nach 7, 20, 25, 30, 35 und 40 min durch äquiosmolares myo-Inositol-Volumetriemedium (Medium B) ersetzt. Der jeweilige Zeitpunkt des Mediumwechsels ist in den Graphen durch die gestrichelten Linien angezeigt. Durch den plötzlichen konzentrationsgerichteten Einstrom des Osmolyten erfolgte, bei gegebener Membranpermeabilität, sekundäres Zellschwellen (Anstieg von  $V/V_0$ ). Wird den Zellen 7 min nach initialem hypotonen Stress myo-Inositol angeboten, dann ist anschließend deutliches Zellschwellen zu erkennen, was die Permeabilität der Membran für den Osmolyten aufzeigt. Das sekundäre Zellschwellen und damit die Permeabilität der Membran für myo-Inositol sinkt jedoch, je später der organische Osmolyte im Verlauf des RVDs angeboten wird. Nach etwa 35-40 min verursacht myo-Inositol im Medium keine nennenswerte Volumenzunahme mehr, so dass die Membranpermeabilität nach diesem Zeitpunkt nicht mehr gegeben ist. Die Anzahl sowohl der Zellen (Z) wie auch der unabhängig voneinander durchgeführten Messwiederholungen (n) sind im jeweiligen Graphen angegeben.



**Abbildung 31 Vollständige volumetrische Taurin-Messungen zu Abbildung 24**

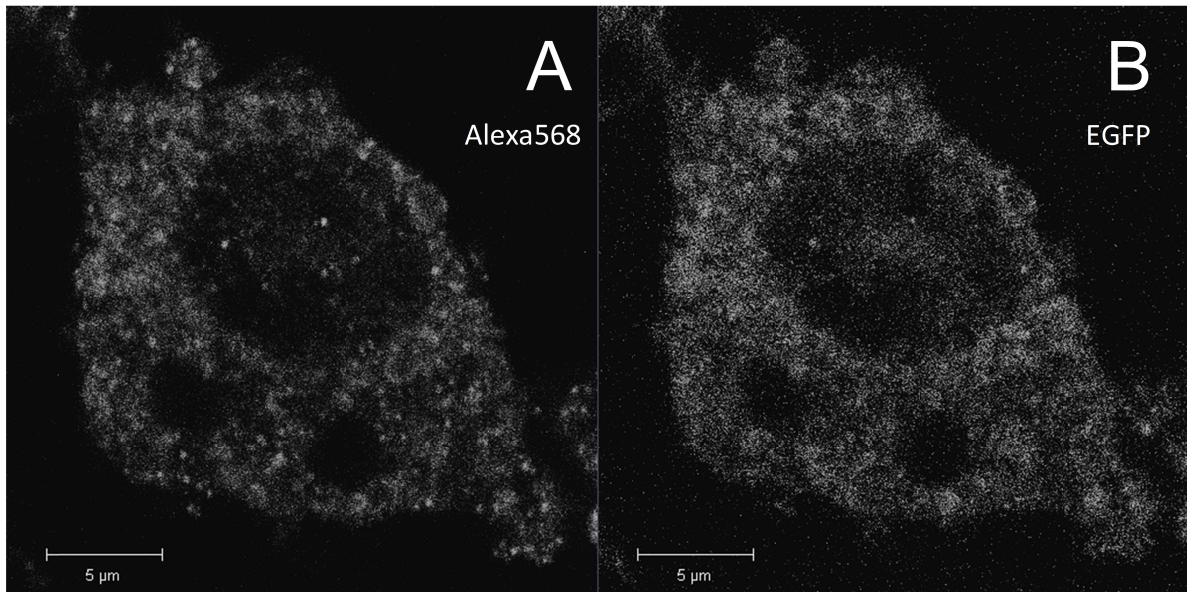
Die relativen Zellvolumenänderungen ( $V/V_0$ ) von HEK293-Zellen sind hier im zeitlichen Verlauf dargestellt. Zu Beginn der Messung wurden die HEK293-Zellen zunächst mit 100 mOsm Saccharose-VolumetriemEDIUM (= Medium A) konfrontiert, in dem die Zellen innerhalb von ~30 min zur vollständigen Volumenregulation fähig sind (siehe Abbildung 24, A). Anschließend wurde das Saccharose-Medium nach 7, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 75 und 85 min durch äquiosmolares Taurin-VolumetriemEDIUM (Medium B) ersetzt. Der jeweilige Zeitpunkt des Mediumwechsels ist in den Graphen durch die gestrichelten Linien angezeigt. Werden die Zellen 7 min nach initialem hypotonen Stress mit hohen extrazellulären Konzentrationen an Taurin konfrontiert, dann ist anschließend ein deutliches Zellschwellen zu erkennen. Dieses sekundär verursachte Zellschwellen zeigt dabei die Permeabilität der Membran für Taurin auf. Das sekundäre Zellschwellen und damit die Permeabilität der Membran für Taurin sinkt jedoch, je später der organische Osmolyte im Verlauf des RVDs angeboten wird. Nach etwa 85 min verursacht Taurin im Medium keine nennenswerte Volumenzunahme mehr, so dass die Membranpermeabilität nach diesem Zeitpunkt nicht mehr gegeben ist. Sowohl die Anzahl der Zellen (Z) wie auch die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Messwiederholungen (n) sind im jeweiligen Graphen angegeben.

## Antikörperspezifität des anti-SLC5A3-Antikörpers SAB1402920 (Sigma)

Aufgrund der beobachteten Unlöslichkeit des SLC5A3-Proteins konnte die Spezifität des für die *d*STORM-Messungen verwendeten primären anti-SLC5A3-Antikörpers nicht mit molekularbiologischen Standardmethoden (z.B. Westernblot) nachgewiesen werden. Daher erfolgte die Analyse der Antikörperspezifität über eine konfokale lasermikroskopische Untersuchung. Hierzu wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung des SLC5A3-Proteins mit AlexaFluor 568 an SLC5A3-EGFP-exprimierenden HEK293-Zellen vorgenommen (siehe Methoden Kapitel 3.5). Die Bewertung der Antikörperspezifität erfolgte dabei durch eine vergleichende mikroskopische Untersuchung der markierten Zellen (siehe Abbildung 32), wobei durch das EGFP-Signal (rechte Seite) die Lokalisation des SLC5A3-EGFP-Fusionproteins und durch das Alexafluor 568-Fluoreszenzsignal (linke Seite) die des primären Antikörpers bestimmt werden konnte. Eine überlagerungsfreie Fluoreszenzsignaltrennung wurde bei den anschließend vorgenommenen konfokalen Mikroskopaufnahmen sowohl durch die Unterschiede im Absorptions- und Emissionsspektrum der verwendeten Fluorophore (siehe Methoden, Kapitel 3.6.1, Abbildung 10), wie auch durch die abwechselnd zeitversetzte Aufnahme des EGFP- und AlexaFluor 568-Signals sichergestellt.

Wie in den Aufnahmen in Abbildung 32 zu erkennen, zeigt das Fluoreszenzsignal sowohl der Fluorophore AlexaFluor 568 (Immunfluoreszenzfärbung, Abbildung 32 - linke Seite) wie auch des EGFP (Fusionsprotein SLC5A3-EGFP; Abbildung 32 - rechte Seite) ein nahezu identisches Bild derselben Zelle. In beiden Aufnahmen ist das Protein in zytosolischen Bereichen lokalisiert, wobei der Zellkern weitestgehend ausgespart ist. Während die EGFP-Lichtemission hierbei jedoch diffuser erscheint ist, das AlexaFluor 568-Fluoreszenzsignal lokal begrenzter, wodurch sich die AlexaFluor 568-Fluoreszenzaufnahme schärfer darstellt.





**Abbildung 32 Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Spezifität des primären monoklonalen Antikörpers anti-SLC5A3**

*HEK293-Zellen wurden zunächst mit dem Vektor SLC5A3-pEGFP-N1 transient transfiziert (Polyethylenimin; siehe Methoden). Nach 24-stündiger Expression des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP erfolgte die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung des SLC5A3-Proteins mit Hilfe des monoklonalen primären Antikörpers SAB1402920 (Klons 3A6; Sigma) und des sekundären AlexaFluor 568-konjugierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des Ziege-Anti-Maus-IgGs (A-11019, Invitrogen) Anschließend wurden konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt, wobei das Fluoreszenzsignal von AlexaFluor 568 (links) und EGFP (rechts) getrennt und abwechselnd erfasst wurde. Die Unterschiede im Absorptions- und Emissionsspektrum beider Fluorophore gewährleistete dabei eine überlagerungsfreie Trennung der Fluoreszenzsignale. Das Fluoreszenzsignal sowohl der Immunfluoreszenzfärbung wie auch des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP zeigen ein nahezu identisches Bild der Zelle, wobei das AlexaFluor 568-Signal aufgrund der stärkeren Lichtquantenausbeute der Fluorophore deutlicher vom Hintergrund abgesetzt ist. Da die zelluläre Fluoreszenzlokalisierung des Fusionsproteins SLC5A3-EGFP und der Fluorophore AlexaFluor 568 nahezu identisch sind, scheint der primäre Antikörper das SLC5A3-Protein spezifisch zu erkennen. Der Messbalken in der Fluoreszenzaufnahme entspricht einer absoluten Distanz von 5 µm.*

Insgesamt werden durch die Antikörperfärbung jedoch identische zelluläre Bereiche markiert, in denen auch das SLC5A3-EGFP-Protein lokalisiert ist. Da die Fluoreszenzsignallokalisationen beider Fluorophore weitestgehend übereinstimmen, kann eine für die dSTORM-Analyse ausreichende Spezifität des verwendeten primären Antikörpers SAB1402920 (Sigma) angenommen werden.

## Eigene Publikationen

Andronic *et al.* (2014) – *Hypotonic activation of the myo-inositol transporter SLC5A3 in mammalian cells probed by cell volumetry, confocal and super resolution microscopy*, Manuskript in Fertigung

**J. Andronic**, N. Bobak, S. Bittner, P. Ehling, C. Kleinschnitz, A. M. Herrmann, H. Zimmermann, M. Sauer, H. Wiendl, T. Budde, S. G. Meuth, und V. L. Sukhorukov, „*Identification of two-pore domain potassium channels as potent modulators of osmotic volume regulation in human T lymphocytes.*“, *Biochimica et biophysica acta*, Bd. 1828, Nr. 2, Okt. 2013.

N. Bobak, S. Bittner, **J. Andronic**, S. Hartmann, F. Mühlfordt, T. Schneider-Hohendorf, K. Wolf, C. Schmelter, K. Göbel, P. Meuth, H. Zimmermann, F. Döring, E. Wischmeyer, T. Budde, H. Wiendl, S. G. Meuth, und V. L. Sukhorukov, „*Volume regulation of murine T lymphocytes relies on voltage-dependent and two-pore domain potassium channels*“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1808, Nr. 8, S. 2036–2044, Aug. 2011.

V. L. Sukhorukov, D. Imes, M. W. Woellhaf, **J. Andronic**, M. Kiesel, R. Shirakashi, U. Zimmermann, und H. Zimmermann, „*Pore size of swelling-activated channels for organic osmolytes in Jurkat lymphocytes, probed by differential polymer exclusion*“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1788, Nr. 9, S. 1841–1850, Sep. 2009.

Erklärungen:

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig, ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Darüber hinaus erkläre ich, dass die Richtlinien der Universität Würzburg zur Wahrung der guten wissenschaftlichen Praxis bei der Erstellung dieser Arbeit beachtet wurden.

Würzburg, den 04. Juni 2014

Joseph Andronic

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben.

Insbesondere danke ich ...

- meinem Betreuer Privatdozent Dr. Vladimir Soukhoroukov, der mit seinem Engagement, seinen Anregungen, seiner Geduld und auch seiner Kritik wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.
- unserem Lehrstuhlinhaber Professor Markus Sauer, der es mir ermöglicht hat, dieses interessante und vielseitige Thema an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten und immer ein offenes Ohr für Fragen, Probleme und Diskussionen hatte.
- Professor Georg Krohne für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit.
- unseren Kooperationspartnern Professor Sven Meuth, Dr. Nicole Bobak, Dr. Stefan Bittner (Universitätsklinikum Münster) sowie Melanie Glaser und Andrea Sauer (Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg), ohne die ein Teil dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.
- Professor Ryo Shirakashi (University of Tokyo) für die Hilfe bei der mathematischen Analyse der volumetrischen Daten.
- Thorge Holm und Teresa Klein für die tatkräftige und stets hilfsbereite und freundschaftliche Unterstützung bei den *d*STORM-Messungen sowie ihrer engelsgleichen Geduld bei der anschließenden Auswertung.
- Petra Geßner und Lisa Pließ für die Unterstützung in der Zellkultur, ihrer aufmunternden Worte und der fachkundigen Hilfe in sämtlichen Laborfragen.
- Albert Gessner, Willibald (alias Matthias) Bauer und Oliver Reichert für Hilfe bei jeglichen feinmechanischen, elektronischen sowie computertechnischen Fragestellungen. Außerdem Marcus Behringer für die Anfertigung der Volumetriekammern und der technischen Unterstützung bei Problemen rund um Mikroskope.

Desweiteren möchte ich mich bei den MitarbeiterInnen des Lehrstuhls für Biotechnologie und Biophysik für die nette Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen fachlichen Diskussionen bedanken. Insbesondere danke ich hierbei auch allen Praktikanten, Bachelor- und Masterstudenten wie Katrin Schulz, Katherine Westerling, Simon Memmel und Simone Pickel, die als Büronachbarn für viele erheiternde Momente gesorgt haben und mich darüber hinaus bei den volumetrischen Versuchen unterstützten.

Ganz besonders danke ich darüber hinaus meiner Martina für ihre Geduld, ihre Motivation, das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihren Rückhalt und noch vielem mehr... <3 :\*

Zum Schluss danke ich meiner Familie, die mich in den Jahren meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt hat.

Herzlichen Dank Euch allen!