



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Fakultät Life Sciences

**Etablierung von Frozen Instant Assays mit kryokonservierten
Zellen in 384-Well-Platten für Hochdurchsatzscreenings**

Diplomarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von
Kristina Meck

Hamburg-Bergedorf

am 30. September 2010

Gutachter: Prof. Dr. Wacker
Dr. Oliver Klotzsche

HAW Hamburg
CCS Cell Culture Service GmbH

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielsetzung	2
1.2 Kryokonservierung von Zellen	3
1.3 Grundlagen der Kryokonservierung	4
1.4 Kryoprotektiva	7
1.5 Die verwendeten Zelllinien	10
1.5.1 Die Zellen A549-NF κ B-SEAP	10
1.5.2 Die Zellen CHO-CHRM1.....	12
1.6 Statistische Auswertung	15
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Verwendetes Material.....	18
2.1.1 Geräte.....	18
2.2 Verbrauchsmaterial	19
2.2.1 Medien für die Zellkultur	20
2.2.2 Fertiglösungen für die Zellkultur	20
2.2.3 Standardchemikalien	21
2.2.4 Zelllinien.....	21
2.2.5 Verwendete Assay-Kits.....	22
2.2.6 Hergestellte Lösungen.....	22
2.3 Methoden der Zellkultur.....	23
2.3.1 Sicherheit und Abfallentsorgung.....	23
2.3.2 Kultivierung der Zellen	23
2.3.3 Auftauen kryokonservierter Zellen aus Kryoröhrchen.....	24
2.3.4 Einfrieren in 384-Well-Platten	25
2.3.5 Auftauen der 384-Well-Platten.....	26
2.4 Proteinchemische Methoden.....	27
2.4.1 Vitalitätsassay mit Resazurin.....	27
2.4.2 SEAP-Reportergen-Assay mit A549-NF κ B-Zellen	29

2.4.3	IP-One Tb HTRF [®] Assay mit CHO-CHRM1-Zellen.....	31
2.5	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Optimierung der Assaybedingungen	35
3.1.1	Vergleich der dialysierten Seren der Hersteller PAA und Sigma für die Zelllinie A549-NF κ B-SEAP	36
3.1.2	Vergleich einer weißen 384-Well-Platte mit einer weißen <i>clear bottom</i> 384-Well-Platte für CHO-CHRM1	39
3.1.3	Problematik bei der Kryokonservierung in 384-Well-Platten	41
3.1.4	Ermittlung der optimalen Zellzahl von CHO-CHRM1	42
3.2	Optimierung der Einfriermethode	49
3.2.1	Erhöhung der Abkühlrate durch Einfrieren auf einer Metallplatte	49
3.3	Optimierung des Einfriermediums	51
3.3.1	Kryokonservierung der Zellen CHO-CHRM1 in IP-One Stimulationspuffer.....	51
3.3.2	Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic auf die Zellen A549-NF κ B-SEAP	53
3.3.3	Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic auf die Zellen CHO-CHRM1	57
3.3.4	Auswirkungen des Kryoprotektivums Methylcellulose auf CHO-CHRM1 ..	61
4	Diskussion.....	65
	Zusammenfassung.....	74
5	Literatur	76
	Danksagung.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle nach der Kryokonservierung und anschließendem Auftauen.....	6
Abbildung 1-2: Strukturformel von Dimethylsulfoxid.....	8
Abbildung 1-3: Strukturformel von Glycerin.....	9
Abbildung 1-4: Strukturformel des Blockcopolymers Pluronic F-68	9
Abbildung 1-5: Strukturformel von Methylcellulose	10
Abbildung 1-6: Signalweg von aktiviertem NF κ B	12
Abbildung 1-7: Darstellung des Signalweges einer Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors.....	14
Abbildung 1-8: Verdeutlichung der statistischen Größen des Z-Faktors.....	16
Abbildung 2-1: Umsatz von Resazurin zu Resorufin.....	27
Abbildung 2-2: Absorption und Fluoreszenz von Resazurin und Resofurin.....	28
Abbildung 2-3: Chemische Umsetzung des chemilumineszenten Substrates CSPD [®]	30
Abbildung 2-4: Funktionsprinzip des HTRF [®] IP-One Assays	32
Abbildung 3-1: Morphologischer Unterschied von A549-NF κ B-SEAP, kultiviert mit unterschiedlichen Seren.....	36
Abbildung 3-2: S/B-Werte frischer A549-NF κ B-SEAP im SEAP Assay, kultiviert mit unterschiedlichen Seren.....	37
Abbildung 3-3: Vergleich einer weißen mit einer weißen <i>clear bottom</i> 384 Well Platte im IP-One Assay	40
Abbildung 3-4: Kryokonservierte Zellen direkt nach Zugabe des Auftaumediums.....	42
Abbildung 3-5: S/B-Werte kryokonservierter CHO-CHRM1 zur Optimierung der Zellzahl im Resazurin Assay	43
Abbildung 3-6: Bilder kryokonservierter CHO-CHRM1 zur Zellzahloptimierung	44
Abbildung 3-7: (S/B) ⁻¹ -Werte kryokonservierter CHO-CHRM1 zur Zellzahloptimierung im IP-One Assay	45
Abbildung 3-8: Dosis-Wirkungs-Kurven kryokonservierter CHO-CHRM1, ermittelt im IP-One Assay.....	46

Abbildung 3-9: Dosis-Wirkungs-Kurven frischer CHO-CHRM1, ermittelt im IP-One Assay.....	47
Abbildung 3-10: S/B-Werte kryokonservierter A549-NF κ B-SEAP im Resazurin Assay.....	50
Abbildung 3-11: S/B-Werte kryokonservierter CHO-CHRM1, eingefroren in Stimulations-puffer, ermittelt im Resazurin Assay	52
Abbildung 3-12: Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic auf kryokonservierte A549-NF κ B-SEAP im Resazurin Assay	54
Abbildung 3-13: Darstellung der S/B-Werte frischer und kryokonservierter A549-NF κ B-SEAP mit Pluronic im SEAP Assay	55
Abbildung 3-14: Vergleich der Vitalitäten kryokonservierter CHO-CHRM1, eingefroren mit 0 % und mit 0,5 % Pluronic im Resazurin Assay.....	58
Abbildung 3-15: (S/B) ⁻¹ -Werte kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1 im IP-One Assay, mit 0 % und 0,5 % Pluronic	59
Abbildung 3-16: Resazurin Assay mit kryokonservierten CHO-CHRM1, Vergleich verschiedener Konzentrationen Methylcellulose im Kryomedium	61
Abbildung 3-17: Dosis-Wirkungs-Kurven kryokonservierter CHO-CHRM1 mit Methylcellulose im Kryomedium	62
Abbildung 3-18: Dosis-Wirkungs-Kurven frischer CHO-CHRM1 mit Methylcellulose im Medium	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Beurteilung des Z-Faktors	17
Tabelle 2-1: Verwendete Geräte	18
Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterial	19
Tabelle 2-3: Medien für die Zellkultur	20
Tabelle 2-4: Fertiglösungen für die Zellkultur	20
Tabelle 2-5: Standardchemikalien	21
Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien	21
Tabelle 2-7: Verwendete Assay-Kits	22
Tabelle 2-8: Hergestellte Lösungen	22
Tabelle 2-9: Kulturmedien der verschiedenen Zelllinien	24
Tabelle 2-10: Kryomedien der verschiedenen Zelllinien	26
Tabelle 3-1: Auswertung des SEAP Assays frischer A549-NFkB-SEAP, kultiviert mit unterschiedlichen Seren	38
Tabelle 3-2: Auswertung des IP-One Assays mit frischen CHO-CHRM1, Vergleich einer weißen <i>clear bottom</i> und einer weißen Platte	40
Tabelle 3-3: Auswertung des Resazurin Assays mit kryokonservierten CHO-CHRM1 zur Zellzahloptimierung	43
Tabelle 3-4: Stimulierbarkeit kryokonservierter CHO-CHRM1 im IP-One Assay zur Zellzahloptimierung	45
Tabelle 3-5: Auswertung des IP-One Assays kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1	47
Tabelle 3-6: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter A549-NFkB-SEAP	50
Tabelle 3-7: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter CHO-CHRM1, eingefroren in Stimulationspuffer	52
Tabelle 3-8: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter A549-NFkB- SEAP, Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic	54
Tabelle 3-9: Auswertung des SEAP Assays kryokonservierter und frischer A549-NFkB-SEAP, Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic	56

Tabelle 3-10: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter CHO-CHRM1, mit 0 % und 0,5 % Pluronic	58
Tabelle 3-11: Auswertung des IP-One Assays kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1, mit 0 % und 0,5 %Pluronic	60
Tabelle 3-12: Auswertung des Resazurin Assays mit kryokonservierten CHO-CHRM1 und Methylcellulose.....	62
Tabelle 3-13: Auswertung des IP-One Assays kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1 mit Methylcellulose im Medium.....	63

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
c/w	<i>cells per well</i> , Zellzahl pro Well
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> , Chinesische Hamsterovarien
CSPD®	Chemilumineszentes Substrat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Effektive Konzentration mit 50 % Effekt
EC ₈₀	Effektive Konzentration mit 80 % Effekt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G-Proteine	Guanosintriphosphat-bindende Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HTRF	<i>Homogenous Time Resolved Fluorescence</i> , Homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz
HTS	<i>High Throughput Screening</i> , Hochdurchsatz-Screening
IKK	Inhibitorprotein-Kinase Komplex
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP1	Inositolmonosphosphat
IP3	Inositoltrisphosphat
I κ B	Inhibitorprotein- κ B

MW	Mittelwert
NF κ B	nuclear factor- κ B
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PLC	Phospholipase C
RFU	<i>Relative Fluorescence Unit</i> , Relative Fluoreszenzeinheit
RLU	<i>Relative Luminescence Units</i> , Relative Lumineszenzeinheit
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
S/B	<i>Signal to Background</i> , Signal zu Hintergrund
SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SEAP	Sekretierte Alkalische Phosphatase
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

Das Verständnis um die Abläufe biochemischer Prozesse im Organismus und das gezielte Eingreifen in diese ist die Motivation vieler Forschungsarbeiten. Nicht nur in pharmakologischer Hinsicht ist die Aufklärung der Signaltransduktion im Körper von Interesse. Insbesondere um Erkrankungen zu lindern oder zu heilen, ist das Bestreben Wirkstoffe ausfindig zu machen, die in die Signalkaskade eingreifen. Die gezielte Entwicklung eines pharmazeutisch relevanten Wirkstoffes erfordert daher die Untersuchung der Bindung an das Zielprotein (Target) und die dadurch aktivierten biochemischen Reaktionen.

Um molekulare Prozesse aufzudecken wird zunächst die kleinste Einheit, die Zelle, betrachtet. Hierfür werden Primärzellen oder rekombinante Zelllinien genutzt, an denen die Signalwege durch Stimulierung oder Inhibition von verschiedensten Rezeptoren mit verschiedenen Substanzen aufgezeigt werden. Die Zellkulturen als Testsysteme stammen aus unterschiedlichen Organen und Geweben und besitzen, je nach Herkunft, unterschiedliche Targets, die untersucht werden. Die hohe Nachfrage neuer Wirkstoffe führte zu einer Entwicklung zellbasierter Testsysteme, bei denen Zellen in einer definierten Zelldichte in Mikrotiterplatten ausgesät und mit dem potentiellen Wirkstoff behandelt werden. Nachfolgend kann beispielsweise die Aktivierung einer Signalweiterleitung oder die Cytotoxizität eines Wirkstoffes geprüft werden. Das Prinzip der zellbasierten Assays ist die Kopplung der zu untersuchenden Signaltransduktion mit einer Reaktion, welche es ermöglicht die Aktivierung zu quantifizieren. Die Anwendung von Fluoreszenz, Chemi- und Biolumineszenz sind hier weit verbreitet. Das Signal kann anschließend in Mikroplatten-Lesegeräten detektiert und ausgewertet werden.

Die zunehmende Anzahl therapeutischer Targets und die dadurch auch steigende Anzahl potentieller Wirkstoffe führten zu einer Automatisierung und Miniaturisierung der Assays. Der Assaydurchsatz wurde anfänglich in Mikrotiterplatten mit 96 Wells unter Verwendung von *Plate Handling* Robotern adaptiert.

Sie ermöglichen das Hoch-Durchsatz-Screening (engl.: High-Throughput-Screening, HTS) einer Vielzahl neuer Substanzen in kürzester Zeit. Eine Weiterentwicklung ist die Durchführung solcher Assays in Mikrotiterplatten mit 384 Wells. Durch die Miniaturisierung kann ein höherer Durchsatz an Substanzen in kürzerer Zeit erfolgen. Ein weiterer Vorteil ist der geringere Verbrauch an Medien und Zellmengen je Screening. Eine einfache Umstellung des Assays auf die nächsthöhere Dichte gelingt meist nicht ohne Hürden und wird oft zum Flaschenhals in der Etablierung solcher automatisierter Systeme. [Sundberg, 2000]

Trotz der Automatisierung bleibt der kritische Punkt die Bereitstellung ausreichender Zellmengen in gleichbleibender Qualität. Eine Weiterentwicklung sind daher Princess[®] Platten. Die Zellen werden bei -80 °C in Mikrotiterplatten bereitgestellt, sodass eine kulturunabhängige Testung zu jedem beliebigen Zeitpunkt ermöglicht wird. Dadurch können Einflüsse der Kultivierung, welche sich auf den Assay und somit die Vergleichbarkeit auswirken, eliminiert werden.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Einfrieren verschiedener Zellkulturen bei -80 °C in 384 Well Platten zu etablieren. Dazu wurden die Zelllinien A549-NF κ B-SEAP und CHO-CHRM1 verwendet.

Für jede Zelllinie sollte eine optimale Aussaatdichte und Zusammensetzung des Kryomediums ermittelt werden.

Nach dem Auftauen der Platten wurde die Vitalität der Zellen mittels des Resazurin Assays ermittelt. Darüber hinaus wurde die Stimulierbarkeit der Zellen anhand eines funktionalen Assays für die jeweilige Zelllinie überprüft. Die verwendeten Assays waren für die Zellen A549-NF κ B-SEAP der SEAP Reporter gen Assay, sowie für die Zellen CHO-CHRM1 der HTRF IP-One Assay.

1.2 Kryokonservierung von Zellen

Einfache Erhaltungstechniken von Zellkulturen bergen mehrere Nachteile. Viele Kulturen sind durch ihren natürlichen Alterungsprozess nur begrenzt kultivierbar und erreichen unterschiedlich schnell ihr Passagenlimit. Währenddessen besteht immer die Gefahr einer Kontaminierung oder der Verlust der transfizierten Gene einer transgenen Zelllinie. Die Kryokonservierung ist daher eine gute Alternative zur Langzeitlagerung von Zellen. Sie basiert auf dem Prinzip, die chemischen, biologischen und physikalischen Prozesse bei kryogenen Temperaturen von -80 °C bis -196 °C aufzuhalten.

Unter Kryokonservierung versteht man das Einfrieren und Lagern von Zellen und Geweben bei Temperaturen weit unter dem Gefrierpunkt unter Verwendung von Gefrierschutzsubstanzen. *Kryos* stammt aus dem Griechischen und bedeutet Kälte. Die Kryokonservierung humaner Zellen und Gewebe erlangte seit 1949, als die kryoprotektive Eigenschaft von Glycerin entdeckt wurde, immer größeres Interesse. Inzwischen ist es sogar möglich, eine homogene Zellpopulation oder ein Gewebeverband aus einem Zellmonolayer unter bestimmten Konditionen einzufrieren, sodass ein hoher Anteil der ursprünglichen Zellmenge erhalten bleibt. Optimal ist die Kryokonservierung jedoch erst, wenn ursprüngliche Zellstrukturen und Gewebekomponenten erhalten werden können [Bakhach, 2009]. Die Kryokonservierung wird immer wichtiger, da die permanente Nachfrage für Zellen oder Geweben bis hin zu Organen stetig wächst.

Die Kryokonservierung von Zellen in Suspension in Kryoröhrchen ist ein für viele Zelllinien etablierter Prozess. Zum Einsatz für Screenings im Rahmen eines zellbasierten Assays müssen die Zellen für einige Passagen in Kultur gehalten werden, um die volle Funktionalität und Vitalität nach dem Einfrieren zu erhalten. Eine Produktnische im Bereich Kryokonservierung füllen die Princess[®] Platten der Firma Cell Culture Service aus. Bei diesen werden definierte Zellmengen in Mikrotiterplatten in einem optimierten Kryomedium bei -80 °C eingefroren. Die Zellen benötigen keine weiteren Kultivierungsschritte, sondern können direkt nach dem Auftauen am nächsten Tag zur Durchführung eines Screenings verwendet werden.

1.3 Grundlagen der Kryokonservierung

Unter Gefrieren versteht man zunächst den Übergang vom flüssigen Aggregatzustand des Wassers in den thermodynamisch stabileren Festzustand, das Eis. Die Bildung der Eiskristalle tritt wenige Grad unter dem Nullpunkt auf und schreitet zunächst in der extrazellulären Lösung voran. Wasser ist der Hauptbestandteil in Zellen und Geweben. Der Übergang von Wasser zu Eis ist daher der leitende Prozess, von dem die Qualität der Probe nach dem Auftauen abhängt.

Bei Temperaturen zwischen 0 °C und -25 °C verlangsamt sich zwar der enzymatische Reaktionsapparat in der Zelle, er bleibt jedoch aktiv. Im Temperaturbereich zwischen -25 °C und -130 °C besteht die Gefahr der Rekristallisation. Bei diesen Temperaturen sind Wassermoleküle noch in der Lage, ihre Position zu verändern und sich zu größeren Kristallen zusammenfinden. Die meisten zellulären Reaktionen kommen jenseits von -130 °C zum Stillstand. Unter diesen extremen Bedingungen steht immer weniger Energie für die metabolischen Aktivitäten in der Zelle zur Verfügung. Erst bei einer Temperatur von -196 °C erliegt der Stoffwechsel vollständig. Die extrem niedrige Temperatur wird durch die Lagerung in Stickstoff möglich, dieser besitzt seinen Siedepunkt bei -196 °C.

Beim Herunterkühlen der Zellen und Geweben von +37 °C auf bis zu -196 °C treten mehrere Prozesse gleichzeitig auf, denen die Zelle mehr oder weniger gut Widerstand leisten kann. Dabei dehydriert die Zelle, wobei bis zu 95 % Wasser aus der Zelle ausströmen kann. Während des Herunterkühlens bildet das vorhandene Wasser nach und nach Eiskristalle, was wiederum zu einer veränderten Elektrolytkonzentration innerhalb und außerhalb der Zelle führt. Außerhalb der Zelle nimmt die Elektrolytkonzentration um ein Vielfaches zu und kann Werte bis zu mehreren Mol annehmen. Des Weiteren permeieren organische Lösemittel des Kryomediums die Zelle.

Sinkt die Temperatur unter den Nullpunkt, aggregieren die Wassermoleküle einer isotonischen Lösung in einen Verband. Von diesen Kristallkeimen aus schreitet das Eiswachstum weiter voran.

Durch die Eisbildung der Wassermoleküle werden Elektrolyte aus dem sich aufbauenden Kristallgitter verdrängt, wodurch die noch flüssige Fraktion zunehmend konzentrierter wird. Der Konzentrationsanstieg hat ein Sinken der Schmelztemperatur zur Folge. Dieser Prozess dauert solange, bis ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen der Eisphase und der flüssigen Lösung herrscht, dabei ist die endgültige Gleichgewichtskonzentration der noch flüssigen Lösung von der Temperatur abhängig. Andererseits ist die absolute Eismenge, die sich bei einer bestimmten Temperatur bildet, von der initialen Zusammensetzung der Lösung abhängig.

Einige Lösungen sind in der Lage die Kristallisation zu vermeiden, wenn die Temperatur unter ihre Schmelztemperatur sinkt. Die Flüssigkeit verhält sich solange physikalisch wie eine Flüssigkeit, bis eine charakteristische Temperatur, die Glasübergangstemperatur, erreicht wird. Sie befindet sich in der Regel bei -120 ± 10 °C. Bei der Glasübergangstemperatur ist die Viskosität der Flüssigkeit so hoch, dass jede molekulare Diffusion verhindert wird. Somit wird auch der Phasenübergang angehalten. Sinkt die Temperatur unter diesen Punkt, verbleiben die Moleküle in einer amorphen, nicht-kristallinen Anordnung. Die Entstehung des glasartigen Zustandes wird Vitrifikation genannt (*vitri*, griech. für Glas). Eine weitere Ausbildung des Kristallgitters ist bei dieser Temperatur nicht mehr möglich. Die Bildung von Eis kann daher nur bei Temperaturen über der Glasübergangstemperatur und unter dem Gleichgewichtsschmelzpunkt der Lösung geschehen.

Die Vitrifikation tritt bei der Kryokonservierung bei zwei verschiedenen Einfriermethoden auf. Einerseits bei der Kryokonservierung mit niedrigen Abkühlraten, wo die Flüssigkeit zwischen den Eiskristallen ab einer bestimmten Temperatur vitrifiziert, andererseits bei der Kryokonservierung ganzer Proben in flüssigem Stickstoff. Hier ist die Kühlrate so hoch, dass sofort die ganze Probe ohne jegliches Kristallwachstum vitrifiziert. Für die Vitrifikation von z. B. reinem Wasser werden Kühlraten um -10^7 °C/min benötigt. Ohne den Zusatz von Kryoprotektiva ist dies mit praktikablen Volumina nicht erreichbar.

Wird eine biologische Probe auf Temperaturen unter ihren Gleichgewichtsschmelzpunkt gekühlt, bilden sich Eiskristalle in der extrazellulären Lösung.

Dies hat ein chemisches Ungleichgewicht zwischen der extrazellulären Lösung und dem Cytosol zur Folge. Das chemische Potential ist die treibende Kraft für den Wasserstrom aus der Zelle heraus und der Diffusion von gelösten Stoffen in die Zelle hinein. Jedoch ist die Permeabilität der Plasmamembran bei niedrigen Temperaturen für Wasser wesentlich höher als für Salze. Daher verhält sich die Zellmembran eher semipermeabel in der Phase des Herunterkühlens. Die Konsequenz ist ein großer Wasserverlust der Zelle durch Osmose. Die Zelle schrumpft während der Dehydratation immer mehr, während gleichzeitig Eiskristalle zunehmend um die Zelle wachsen. Die Eiskristalle vergrößern sich, bis die Restflüssigkeit nur noch Kanäle um die Kristalle bildet. Die Kanäle verkleinern sich mit sinkender Temperatur, was die Zellen zwingt sich in diesen Flüssigkeitskanälen aufzuhalten. In diesem Zustand wirken enorme mechanische Kräfte auf die Zelle ein, zum einen durch das starke Schrumpfen der Zelle, zum anderen wirken die umgebenden Kristalle wie Speerspitzen auf die Zellmembran ein. Das Ausmaß solcher Einwirkungen ist in Abbildung 1-1 gut erkennbar.

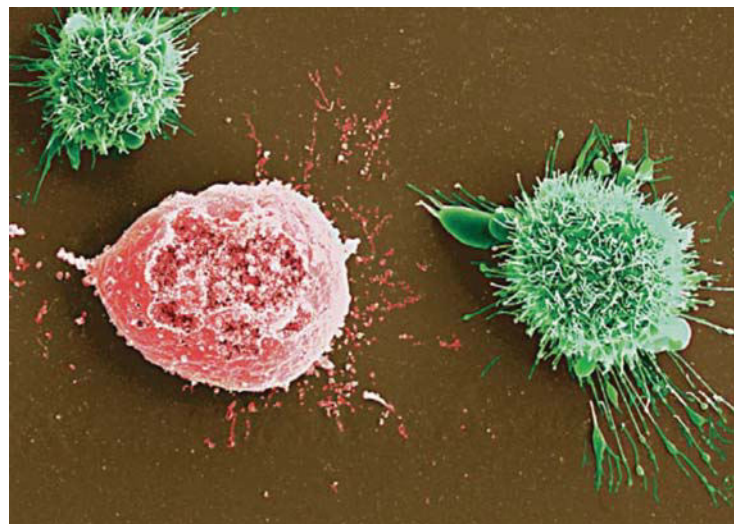


Abbildung 1-1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle nach der Kryokonservierung und anschließendem Auftauen

Zellen nach einem vollständigen Einfrier- und Auftauvorgang. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme wurde nachträglich digital eingefärbt. Die rot eingefärbte Zelle weist deutliche Kryoschäden auf. [Hibbeler, Krüger-Brand, 2007]

Die Eiskristallbildung folgt unter Umständen weniger thermodynamischen, sondern eher kinetischen Gesetzen. Dabei spielt die Kühlrate eine entscheidende Rolle. Sinkt die Temperatur rasch mit einer hohen Kühlrate, schreitet die Eisbildung so schnell voran, dass der Zelle kaum Zeit verbleibt zu dehydrieren. Das Wasser bleibt in der Zelle und bildet dort Eiskristalle, welche ebenfalls schädigend wirken können. In der Regel wird versucht, die intrazelluläre Eisbildung zu vermeiden, da sie als Hauptursache der Zellschäden vermutet wird. Andere Studien hingegen belegen einen schützenden Effekt von intrazellulärem Eis in konfluenten Monolayern. [Acker et al., 1999]

Bei einer niedrigen Kühlrate schreitet die Eisbildung langsam voran, die Zelle dehydriert stark und ist lange Zeit hohen Elektrolytkonzentrationen ausgesetzt. Dies kann zu starken Veränderungen des pH-Wertes führen. Die zahlreichen Proteine der Zellmembran können dadurch modifiziert oder denaturiert werden. Des Weiteren kann die Gefrierschutzsubstanz, welche ein organisches Lösemittel sein kann, die Phospholipide der Zellmembran in hoher Konzentration angreifen und verändern. Dies kann sogar soweit führen, dass nicht nur die Zellmembran beschädigt wird, sondern ebenso intrazelluläre Proteine. [Karlsson, Toner, 1996]

Eine Kühlrate ist daher dann optimal, wenn es gelingt die schädigenden Prozesse auf ein Minimum zu senken. Einige Forscher versuchen dazu theoretische mathematische Modelle zu entwickeln, mit der sie den Prozess der Eiskristallbildung intrazellulär und extrazellulär möglichst genau bestimmen können [Mazur, 2010]. Jedoch ist dies für jede Zellart mit ihrer individuellen Zellmembran und somit der Permeabilität spezifisch und bedarf einer Vielzahl empirischer Versuche.

1.4 Kryoprotektiva

Eine Konservierung von Zellen oder Geweben durch Einfrieren ist ohne Gefrierschutzmittel nicht möglich. Die Aufgabe der Kryoprotektiva ist die Zellen vor Gefrierschäden durch Eiskristalle zu schützen.

Erste Erfolge wurden erzielt, als für die Langzeitlagerung von Spermien die kryoprotektive Eigenschaft von Glycerin entdeckt wurde.

Die genaue Schutzwirkung der Kryoprotektiva ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutet wird, dass das Kryoprotektivum dazu beiträgt, den Gefrierpunkt zu senken und kleinere Eiskristalle zu bilden. Außerdem entstehen Kanäle mit ungefrorener Flüssigkeit zwischen den gefrorenen Fragmenten, die den Zellen Schutz bieten. Zusätzlich kann durch den Zusatz von Kryoprotektiva der elektrolytfreie Anteil des Kryomediums erhöht werden. Dieser Effekt beruht auf der Fähigkeit des Kryoprotektivums Wasser zu binden, was zu einer Erhöhung der Viskosität und einer verzögerten Dehydratation der Zelle führt.

Die Gefrierschutzmittel können in die Kategorien penetrierende und nicht penetrierende Schutzmittel eingeteilt werden. Die penetrierenden haben die Fähigkeit in die Zelle einzudringen, wohingegen die nicht penetrierenden extrazellulär wirken.

Penetrierende Kryoprotektiva, wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Glycerin und 1,2-Propandiol, sind mit ihrem geringen Molekulargewicht von 60-90 g/mol in der Lage, die Zellmembran zu passieren und in die Zelle einzudringen. Dort verhindern sie eine zu starke osmotische Dehydrierung der Zelle, indem sie in die Zelle einströmen, bis ein Gleichgewicht zwischen extra- und intrazellulärer Lösung herrscht. Jedoch lösen sie in hohen Konzentrationen Zellschäden aufgrund ihrer toxischen Wirkung aus. Eingesetzt werden sie bevorzugt bei niedrigen Kühlraten.

Eines der meist verwendeten Gefrierschutzmittel ist DMSO (Abbildung 1-2). Es ist ein farb- und geruchloses organisches Lösemittel und dringt schnell in die Membran ein.

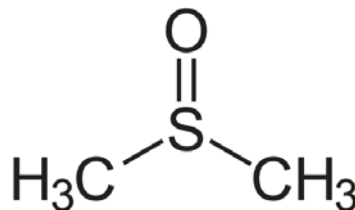


Abbildung 1-2: Strukturformel von Dimethylsulfoxid

Ein weiteres penetrierendes Kryoprotektivum ist Glycerin (IUPAC: Glycerol). Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol, der farb- und geruchslos ist (Abbildung 1-3). Es ist eine viskose Flüssigkeit mit hygroskopischen Eigenschaften. Im Gegensatz zu DMSO kann es die Zellwand schlechter passieren. Jedoch sind die eingesetzten Konzentrationen geringer als bei DMSO.

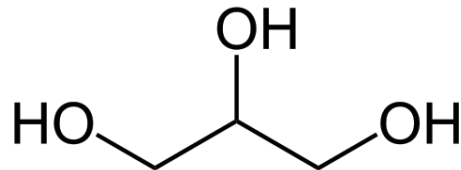


Abbildung 1-3: Strukturformel von Glycerin

Zu den nicht penetrierenden Kryoprotektiva zählen Polymere wie Hydroxyethylstärke, Methylcellulose und Pluronic. Sie haben aufgrund ihrer großen molaren Masse nicht die Möglichkeit die Zellwand zu passieren und verbleiben im extrazellulären Raum, wo sie ihre Schutzwirkung entfalten. Eingesetzt werden sie bevorzugt bei höheren Kühlraten. Sie erhöhen die Viskosität der Lösung, indem sie Wasser binden, und reduzieren dadurch die Geschwindigkeit, mit der sich Eiskristalle bilden und wachsen.

Pluronic F-68, auch Poloxamer 188 genannt, ist ein Blockcopolymer aus Ethylenoxid und Propylenoxid (Abbildung 1-4). Es ist ein nichtionisches Detergenz, welches insbesondere bei der Fermentierung im Bioreaktor verwendet wird. Seine positive Wirkung beruht auf der Stabilisierung der Zellwände bei Scherstress, der durch das Begasen und Rühren entsteht. [Chisti, 2000]

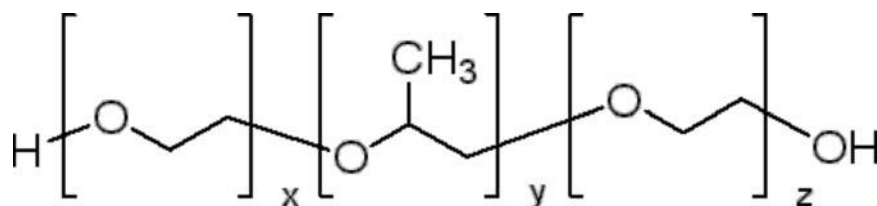


Abbildung 1-4: Strukturformel des Blockcopolymers Pluronic F-68

In dem Molekül sind die beiden Monomerbausteine Ethylenoxid und Propylenoxid blockweise verknüpft. Man spricht daher auch von einem Blockcopolymer $(EO)_x-(PO)_y-(EO)_z$; $x, z = 75$, $y = 30$

Methylcellulose ist ein Polymer aus den Monomeren methylierter Cellobiose (Abbildung 1-5). Es entsteht durch den Ersatz von Wasserstoffatomen der Hydroxygruppen durch Methylgruppen. Aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Gruppen $-OH$ und $-OCH_3$ besitzt Methylcellulose sowohl hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften. Eingesetzt wird es als Verdicker und Emulgator, sowohl im Lebensmittelbereich als auch in der industriellen Herstellung von Werkstoffen. Methylcellulose findet ebenfalls Anwendung bei der Fermentierung, um die Zellen vor Scherkräften zu schützen. [Chisti, 2000]

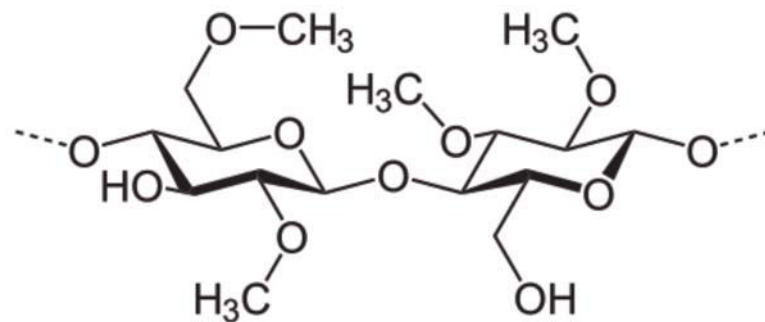


Abbildung 1-5: Strukturformel von Methylcellulose

1.5 Die verwendeten Zelllinien

1.5.1 Die Zellen A549-NF κ B-SEAP

Die adhärenente Zelllinie A549-NF κ B-SEAP wurde für das Screening von inflammatorischen und entzündungshemmenden Substanzen entwickelt. Die Zellen A549 stammen ursprünglich aus humanem Lungenkarzinom und wurden in den 70er Jahren daraus isoliert. [Giard et al., 1973; Lieber et al. 1976]

Die Zelllinie A549-NF κ B-SEAP wurde stabil mit einem Reporterkonstrukt transfiziert. Die Expression des Reportergens SEAP wird von dem Element, welches auf den Transkriptionsfaktor *nuclear factor- κ B* (NF κ B) responsiv ist, kontrolliert.

Der Transkriptionsfaktor spielt bei einer großen Anzahl zellulärer Prozesse wie dem Zellwachstum und der Apoptose, sowie bei Immunantworten und Entzündungen eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist bekannt, dass NF κ B bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern, darunter Arthritis, Asthma, neurodegenerativen Erkrankungen und Herzerkrankungen, beteiligt ist. In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise für einen Zusammenhang zwischen einer Entzündung und Krebs unter Beteiligung von NF κ B. [Mantovani, 2010]

Der Transkriptionsfaktor NF κ B initiiert im Organismus die Transkription einer Reihe von Genen. Zum Nachweis der Aktivierung von NF κ B wurde dieser Faktor zusammen mit einem Reporter-gen in A549-Zellen kloniert. Das Reporter-gen-Produkt dient dabei als Maß für die Expression und codiert in diesem Fall eine verkürzte Form der humanen plazentaren alkalischen Phosphatase. Die verkürzte Version wird nicht in der Membran verankert, sondern wird von den Zellen sekretiert [Cullen, Halim, 1992]. Die Expression der sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) steht dabei unter der Kontrolle des NF κ B responsiven Elements. [Pessara, Koch 1990]

Zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B wird der entsprechende Rezeptor an der Zelloberfläche durch proinflammatorische Cytokine, wie den Tumornekrosefaktor (TNF) oder durch Interleukin-1 stimuliert. Der Tumornekrosefaktor wird im Organismus in erster Linie von Makrophagen gebildet und dient zur Steuerung der Immunzellen. Zur Simulation eines proinflammatorischen Signals wird im Assay mit rekombinantem TNF α stimuliert.

NF κ B ist ein Dimer und kann aus verschiedenen Untereinheiten bestehen, z.B. aus den Proteinen p50 und RelA, wie in Abbildung 1-6 dargestellt. Üblicherweise liegt der Faktor NF κ B in inaktiver Form, d. h. komplexiert mit einem Inhibitorprotein (I κ B) im Cytoplasma vor. Bindet TNF α an den Rezeptor, wird ein Komplex aus Kinasen (IKK) aktiviert. Diese sind in der Lage, das Inhibitorprotein, welches an NF κ B gebunden ist, zu phosphorylieren und somit davon zu lösen. Der nun aktivierte Transkriptionsfaktor kann in den Zellkern translozieren und sich dort an die entsprechende Stelle der DNA heften.

Damit aktiviert er die Transkription der nachfolgenden Gene, in diesem Fall die der plazentaren alkalischen Phosphatase. Diese wird daraufhin effizient in den Überstand sekretiert und dient so zum indirekten quantitativen Nachweis der Aktivierung.

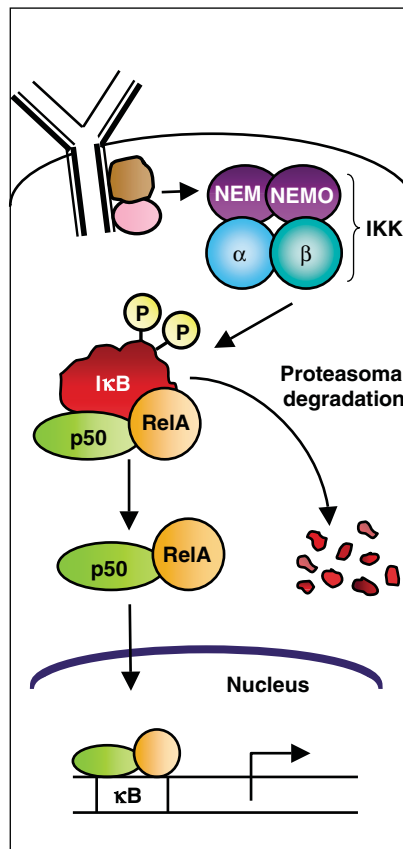


Abbildung 1-6: Signalweg von aktiviertem NFκB

NFκB als Dimer kann aus verschiedenen Untereinheiten bestehen (hier aus den Proteinen p50 und RelA). Normalerweise liegt NFκB in inaktiver Form im Cytoplasma komplexiert mit einem Inhibitorprotein IκB vor. Der klassische Signalweg einer Aktivierung von NFκB beginnt mit einer Anheftung eines Aktivatorproteins, wie z.B. eines Cytokins an den Rezeptor. Diese Bindung führt zu einer Aktivierung eines Kinase-Komplexes (IKK), der in der Lage ist, das Inhibitorprotein IκB zu phosphorylieren und von NFκB zu lösen. Dadurch kann NFκB in den Zellkern diffundieren und sich dort an die entsprechende Stelle der DNA heften. Damit wird die Transkription der nachfolgenden Gene aktiviert. [Gilmore, 2006]

1.5.2 Die Zellen CHO-CHRM1

In der Biotechnologie vielfach verwendete Zellen sind CHO-Zellen, die ursprünglich aus den Ovarien chinesischer Hamster isoliert wurden.

Sie sind sehr robust und finden oft Anwendung in zellbasierten Assays und in der Produktion von therapeutischen Proteinen.

Für die rekombinante Zelllinie CHO-CHRM1 wurde der Subklon CHO-K1 mit dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor M1 (M1-Rezeptor) stabil transfiziert. Dieser gehört zu der großen Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und wird der Klasse A zugeordnet, welche die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren umfasst. Im Organismus kommt der M1-Rezeptor im parasympathischen Nervensystem vor. Eine Aktivierung findet bei Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin statt, wird aber auch von anderen Substraten wie Muskarin, Oxotremorin oder Carbachol hervorgerufen. Die Stimulation des Rezeptors ruft die Aktivierung der $G_{\alpha q}$ -Signalkaskade hervor und beeinflusst die kognitiven Fähigkeiten. Störungen in diesem System resultieren in Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer oder Parkinson.

Die membranintegralen GPCRs führen die Signalweiterleitung über Guanosintriphosphat-bindende Proteine (G-Proteine) in das Zellinnere fort. Diese Proteine sind heterotrimer aus drei Untereinheiten α , β und γ aufgebaut, wobei die Untereinheit G_{α} im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP) bindet.

Der Signalweg bei einer Aktivierung der $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren ist komplex und verläuft über die Phosphoinositid-Kaskade, dargestellt in Abbildung 1-7. Bei einer extrazellulären Stimulierung durch Bindung eines Agonisten an den Rezeptor, erfährt dieser eine Konformationsänderung. Dadurch wird der G-Protein-Komplex aktiviert, wodurch die G_{α} -Untereinheit von dem $G_{\beta, \gamma}$ -Dimer dissoziiert. Gleichzeitig ist es nun möglich, dass anstatt GDP Guanosintriphosphat (GTP) aus der Umgebung an die G_{α} -Untereinheit binden kann. Das Signal wird beendet, indem GTP zu $GDP + P_i$ durch die GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit hydrolysiert wird. Ein einziger Agonist/Rezeptor-Komplex ist ausreichend, um das Signal für hunderte G_{α} -Untereinheiten zu liefern. Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC).

Sie spaltet von dem in der Zellmembran vorkommenden Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) den Botenstoff Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) ab.

Dieser als *second messenger* bezeichnete Botenstoff veranlasst die Ausschüttung von Calciumionen, welche viele weitere biochemische Prozesse aktivieren und daher selbst Signalmoleküle sind. Die Halbwertszeit von IP₃ ist sehr kurz (ca. 30 sec), der Abbau findet daher zügig durch Dephosphorylierung statt. Es entsteht Inositolbiphosphat (IP₂) und weiter Inositolmonophosphat (IP₁). Der Metabolit IP₁ dient als Nachweis der Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors. [Berg et al., 2007]

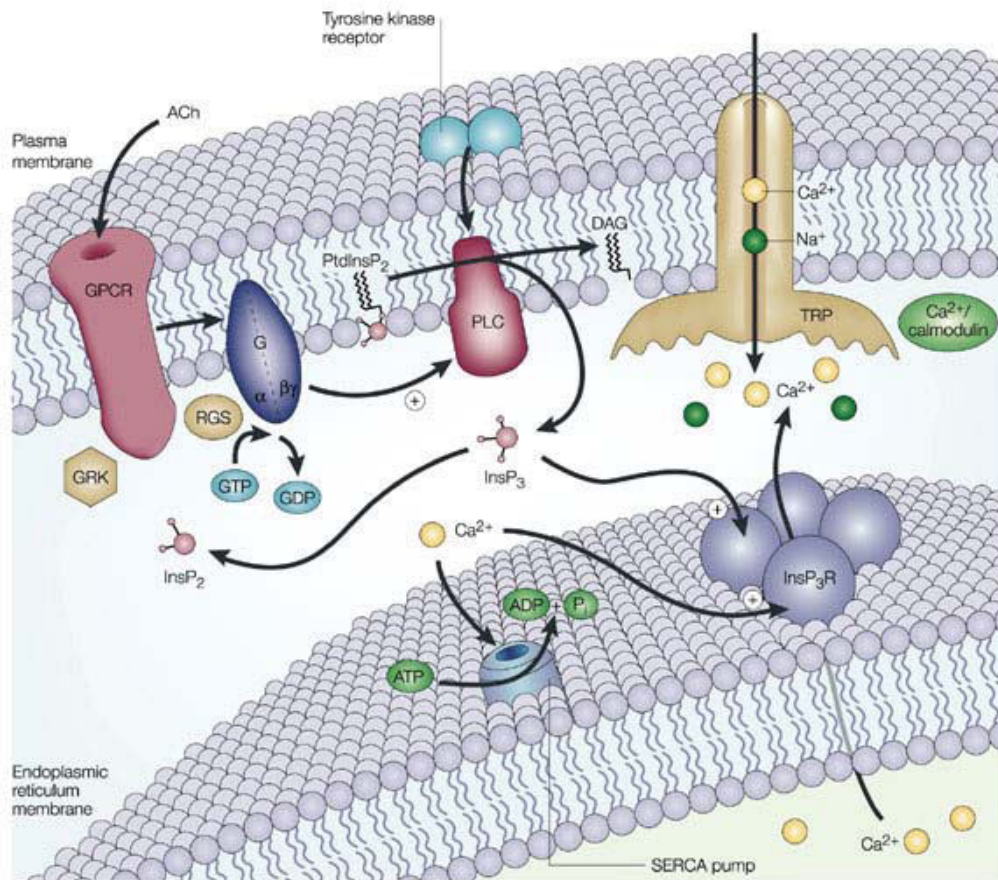


Abbildung 1-7: Darstellung des Signalweges einer Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors

Der G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPCR) ist transmembranal lokalisiert. An ihn ist ein G-Protein-Trimer gebunden. Dieses besteht aus den drei Untereinheiten α , β und γ , wobei die Untereinheit G_α Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat, wenn der GPCR im inaktiven Zustand vorliegt. Bei Aktivierung durch Bindung von z.B. Acetylcholin (ACh), kommt es einerseits zur Spaltung der Untereinheiten G_α und $G_{\beta,\gamma}$ und andererseits zum Austausch von GDP durch Guanosintriphosphat (GTP). Dies wiederum aktiviert Phospholipase C (PLC), die Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) aus einem membranal Phospholipid spaltet. Dieses Signalmolekül veranlasst die Ausschüttung vieler Calciumionen, welche weitere Signalwege in Gang bringt. Daher wird InsP₃ rasch durch Dephosphorylierung abgebaut. [Review Ion Channel Research, 2004]

1.6 Statistische Auswertung

Um eine Substanz in einem Bioassay zu testen, muss das Ergebnis reproduzierbar sein. Da aber viele Parameter auf das Ergebnis Einfluss haben, insbesondere wenn es sich um zellbasierte Assays handelt, muss dennoch eine Vergleichbarkeit geschaffen werden.

Zur Ermittlung der Stimulierbarkeit der Zellen wird mit einer Verdünnungsreihe des Agonisten stimuliert. Aus diesem konzentrationsabhängigen Antwortsignal können Werte wie die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) bzw. die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bestimmt werden. Diese geben die Sensitivität der Zellen an. Mit der EC_{50} -Konzentration des Agonisten wird ein 50-prozentiger Effekt erreicht. Um einen 80-prozentigen Effekt zu errechnen, wird dieser Wert aus den vorhandenen Daten nach folgender Formel errechnet:

$$EC_{80} = \left(\frac{80}{100 - 80} \right)^{\frac{1}{H}} \times EC_{50}$$

H (Hillslope) = Steilheit der sigmoidalen Kurve

Ein Parameter, der ebenfalls bei einem Assay bestimmt wird, um die Stimulierbarkeit zu beurteilen ist der Quotient aus dem Mittelwert der Signalstärke und dem Mittelwert des Hintergrunds (S/B).

$$S/B = \frac{\mu_{signal}}{\mu_{background}}$$

μ_{signal} = Mittelwert des Signals

$\mu_{background}$ = Mittelwert des Hintergrunds

Dieser Wert hat die Aussagekraft, inwieweit die Substanz stimulierend im Vergleich zur Negativkontrolle oder zu nicht stimulierten Zellen wirkt. Jedoch kann anhand des Wertes nicht die Streuung und somit die Güte des durchgeführten Assays beurteilt werden.

Um die Qualität eines Assays beurteilen zu können und eine Vergleichbarkeit zu schaffen, wurde eine neue dimensionslose Größe eingeführt: der Z-Faktor.

$$Z = 1 - \frac{(3\sigma_s + 3\sigma_c)}{|\mu_s - \mu_c|}$$

σ_s = Standardabweichung der Probe

σ_c = Standardabweichung der Kontrolle

μ_s = Mittelwert der Probe

μ_c = Mittelwert der Kontrolle

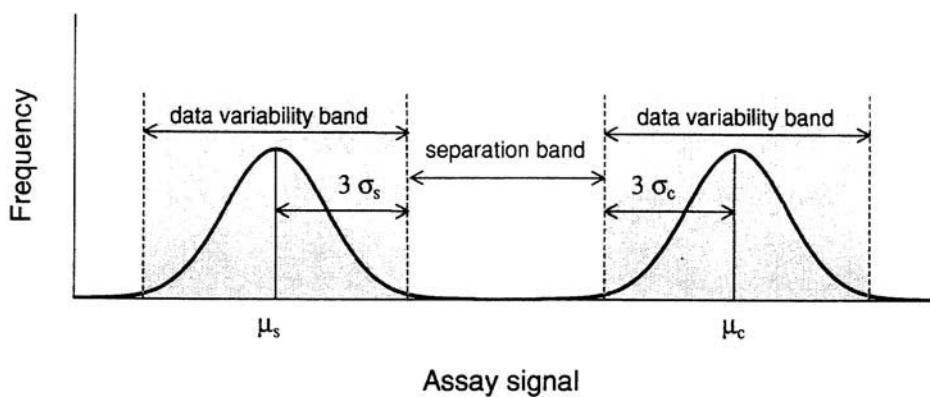


Abbildung 1-8: Verdeutlichung der statistischen Größen des Z-Faktors

Der Z-Faktor integriert sowohl die dynamische Signalbandbreite, als auch die Datenschwankungen. Anschaulich sind die Werte in Abbildung 1-8 dargestellt. Der Z-Faktor lässt daher eine Aussage über die Qualität der Daten im jeweiligen Assay zu und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Negative Z-Faktoren sprechen für eine unzureichende Güte des Assays. Wie die Bewertungen der Z-Faktoren einzuordnen sind, ist aus Tabelle 1-1 zu entnehmen.

Tabelle 1-1: Beurteilung des Z-Faktors

Z-Faktor	Beurteilung
$Z = 1$	Ideal
$Z > 0,5$	Exzellent
$0 < Z < 0,5$	Durchführbar
$Z = 0$	Aussage ja/nein
$Z < 0$	Nicht akzeptabel

Bei der Bewertung von Bioassays wird die Bezeichnung Z'-Faktor verwendet. Dieser berechnet sich mit der selben Formel, allerdings wird eine Positiv- gegen eine Negativkontrolle aufgetragen. [Zhang et al., 1999]

2 Material und Methoden

2.1 Verwendetes Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
8-Kanal Pipetten		
15 – 1250 µl	Matrix Impact 2	Thermo Scientific, Wiesbaden
5 – 250 µl		
0,5 – 12,5 µl		
Autoklav	5075 ELVC	Tuttnauer Systec, Wetzlar
CO ₂ -Inkubator	HeraCell	Heraeus, Hanau
Einkanal Pipetten		
100 – 1000 µl	Research® variabel	Eppendorf, Hamburg
20 – 200 µl		
0,5 – 10 µl		
0,1 – 2,5 µl		
Kühlgeräte		
4 °C	handelsübliche Geräte	Heraeus, Hanau
-20 °C		
-80 °C		
	Forma Model 8417	Thermo Scientific, Wiesbaden
	Model MDF-U5186S	Sanyo, Wiesloch
-190 °C	EuroCyl MVE 810	German-Cryo, Jüchen
Mikroplatten-Leser	Pherastar	BMG, Labtech
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Pipettierhilfe	Matrix CellMate II	Thermo Scientific, Wiesbaden
Plattenschüttler	Titramax 100	Heidolph, Schwabach
Reinstwasser-Anlage	Milli-Q biocel	Millipore, Eschborn

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Schüttler	REAX top	Heidolph, Schwabach
	Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg
Sicherheitswerkbänke	Herasafe	Heraeus, Hanau
	MSC-Advantage	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zellzählgerät	CASY [®] Model TT	Innovatis, Reutlingen
Zentrifugen	Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
	Multifuge 1S	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
5ml PP Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well-Platte, klar	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well-Platte, schwarz	Greiner bio-one, Frickenhausen
384-Well-Platte, klar	Corning, Amsterdam (Niederlande)
384-Well-Platte, weiß	Greiner bio-one, Frickenhausen
384-Well-Platte, weiß <i>clear bottom</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen
CASY [®] cup	Innovatis, Reutlingen
Pipette, serologisch 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, Amsterdam (Niederlande)
Pipettenspitzen für Einkanalpipette	MBP, San Diego, CA (USA)
Pipettenspitzen für 8-Kanalpipette	Thermo Scientific, Wiesbaden
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Corning, Amsterdam (Niederlande)

2.2.1 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2-3: Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose, ohne L-Glutamin	PAA, Linz (Österreich)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose, ohne L-Glutamin, ohne Phenolrot	PAA, Linz (Österreich)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), ohne L-Glutamin	PAA, Linz (Österreich)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), ohne L-Glutamin, ohne Phenolrot	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
OPTI-MEM [®] I + GlutaMAX [™] I	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

2.2.2 Fertiglösungen für die Zellkultur

Tabelle 2-4: Fertiglösungen für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	PAA, Linz (Österreich)
Bovines Serumalbumin Fraction V (BSA)	AppliChem, Darmstadt
CASY [®] ton	Innovatis, Reutlingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (PBS)	PAA, Linz (Österreich)
Fetal Bovine Serum Dialysed	PAA, Linz (Österreich) Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetal Bovine Serum Gold	PAA, Linz (Österreich)
G-418 Sulfat	PAA, Linz (Österreich)
HEPES Puffer 1M	PAA, Linz (Österreich)

Bezeichnung	Hersteller
Hygromycin B 50 mg/ml	PAA, Linz (Österreich)
L-Glutamin 200 mM (1x)	PAA, Linz (Österreich)
Natrium-Pyruvat	PAA, Linz (Österreich)
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Linz (Österreich)
Pluronic [®] F-68	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x)	PAA, Linz (Österreich)

2.2.3 Standardchemikalien

Tabelle 2-5: Standardchemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbachol	Calbiochem
Methylcellulose	Roth, Karlsruhe
Natrium-Selenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Resazurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TNF- α	PeptoTech. Hamburg

2.2.4 Zelllinien

Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
A549-NF κ B-SEAP	Humanes Lungenkarzinom
CHO-CHRM1	Chinesische Hamster Ovarien

2.2.5 Verwendete Assay-Kits

Tabelle 2-7: Verwendete Assay-Kits

Bezeichnung	Hersteller
IP-One Tb HTRF [®] Assay	Cisbio, Bagnols-sur-Cèze (Frankreich)
Phospha-Light [™] System	Applied Biosystems, Carlsbad, CA (USA)

2.2.6 Hergestellte Lösungen

Tabelle 2-8: Hergestellte Lösungen

Substanz	Konzentration/Lösemittel	Lagerung
Ascorbinsäure	5 mg/ml in PBS	-20 °C
BSA-Lösung	1 % (w/v) in H ₂ O	steril filtriert (0,2 µm), 4 °C
Carbachol	10 mM in H ₂ O	-20 °C
G-418	100 mg/ml in HEPES	steril filtriert (0,2 µm), 4 °C
Methylcellulose	10 % (w/v) in H ₂ O	autoklaviert, 4 °C
Resazurin	0,4 mM in PBS	4 °C
TNF α	10 µg/ml in PBS + 0,1 % BSA	-80 °C
Trypsin-EDTA(2x)	20 % (v/v) Trypsin-EDTA(10x) in PBS	4 °C

2.3 Methoden der Zellkultur

2.3.1 Sicherheit und Abfallentsorgung

Biologischer Abfall, sowie kontaminierte Lösungen und Materialien wurden durch Dampfsterilisation 20 min bei 121 °C mit 1 bar Überdruck autoklaviert.

Verwendete Chemikalien wurden gemäß den Sicherheitsvorschriften behandelt und entsorgt.

2.3.2 Kultivierung der Zellen

Jede Zellart vermehrt sich mit unterschiedlichen Teilungsraten. Je dichter der Zellrasen wird, desto eher ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontaktinhibition, welche zum Zellteilungsstopp führt. Bei Erreichen einer Konfluenz des Zellrasens von ca. 80 % sollten die Zellen passagiert werden, um das Zellverhalten der exponentiellen Wachstumsphase zu bewahren.

Für die Kultivierung der Zellen wurde zunächst das entsprechende Zellkulturmedium auf 37 °C erwärmt, sowie Trypsin-EDTA und PBS auf Raumtemperatur gebracht. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Die Zelllinien A549-NF κ B und CHO-CHRM1 wurden mit 2xTrypsin-EDTA abgelöst. Der Trypsinverdau fand bei 37 °C im Inkubator statt. Nach Ablösen der Zellen wurde die enzymatische Reaktion mit Kulturmedium inhibiert und die Zellzahl mittels des CASY[®]-Zellzählgerätes bestimmt. Anhand der ermittelten Zellkonzentration wurde eine neue Aussaatdichte bestimmt, mit der die Zellen für 2-3 Tage in Kultur gehalten werden konnten. Die Zelllinien A549-NF κ B-SEAP und CHO-CHRM1 wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert. Die Zusammensetzungen der jeweiligen Kulturmedien sind in Tabelle 2-9 aufgeführt. Beide Zellkulturen wurden im Inkubator bei 37 °C, einer CO₂-Sättigung von 5 % und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tabelle 2-9: Kulturmedien der verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Zusammensetzung des Kulturmediums	
A549-NFkB		IMDM
	2 % (v/v)	FCS, dialysiert
	4 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natrium-Pyruvat
	0,4 mg/ml	G-418
CHO-CHRM1		DMEM
	10 % (v/v)	FCS
	4 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natrium-Pyruvat
	0,5 mg/ml	G-418

2.3.3 Auftauen kryokonservierter Zellen aus Kryoröhrchen

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und auf Trockeneis zwischengelagert. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen so lange im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bis keine Eiskristalle mehr sichtbar waren. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde je nach Zellzahl in eine Zellkulturflasche mit entsprechender Größe überführt und mit vorgewärmtem Kulturmedium vorsichtig vermischt. Die Inkubationszeit mit DMSO-haltigem Kryomedium sollte so kurz wie möglich sein, da die DMSO-Konzentration im Kryomedium oberhalb des Gefrierpunktes toxisch auf die Zellen wirkt.

Am nächsten Tag wurde, je nach Dichte des Zellrasens, entweder das Medium gewechselt oder, wie in 2.3.2 beschrieben, die Zellen abgelöst und im entsprechenden Verhältnis ausgedünnt.

2.3.4 Einfrieren in 384-Well-Platten

Um die Zellen in 384-Well-Platten zu kryokonservieren, wurden die Zellen in ausreichender Menge expandiert. Die Konfluenz des Zellrasens von 80 % sollte bei der Expansion keinesfalls überschritten werden, da dies die Vitalität und Stimulierbarkeit der Zellen negativ beeinflusst.

Das Ablösen der Zellen erfolgte wie in 2.3.2, jedoch wurde anstatt 2xTrypsin-EDTA Accutase zum Ablösen verwendet, welche zuvor auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Durch Accutase werden die Oberflächenproteine in ihrer Funktion und Qualität nicht beschädigt. Bei der Bestimmung der Zellzahl sollte die Zellvitalität mindestens 90 % betragen. Nach dem Ablösen wurde die benötigte Menge Zellsuspension bei 180 x g für 4 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem entsprechenden Kryomedium für die jeweilige Zelllinie resuspendiert. Die verschiedenen Kryomедien sind in Tabelle 2-10 aufgeführt.

Mit einer Mehrkanal-Pipette wurden je 15 µl Zellsuspension pro Well in eine 384-Well-Platte pipettiert. Für die Kurzzeitlagerung war die Fixierung des Deckels mit Klebeband ausreichend.

Die 384-Well-Platten wurden direkt auf dem Metallboden bei -80 °C eingefroren. Die Inkubationszeit mit DMSO-haltigem Kryomedium bei Raumtemperatur sollte möglichst kurz sein, um die toxische Wirkung des DMSO auf die Zellen zu minimieren.

Tabelle 2-10: Kryomedien der verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Zusammensetzung des Kryomediums	
A549-NFkB		IMDM ohne Phenolrot
	2 % (v/v)	FCS, dialysiert
	4 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natrium-Pyruvat
	5 µg/ml	Ascorbinsäure
	4 % (v/v)	DMSO
CHO-CHRM1		DMEM ohne Phenolrot
	10 % (v/v)	FCS
	4 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natrium-Pyruvat
	5 µg/ml	Ascorbinsäure
	5 % (v/v)	DMSO

2.3.5 Auftauen der 384-Well-Platten

Vor dem Auftauen der 384-Well-Platten wurden die Platten auf Trockeneis gelagert, um ein Antauen zu verhindern. Die geringen Volumina in den Platten reagieren sehr empfindlich auf eine Temperaturerhöhung, was eine veränderte Zellvitalität zur Folge hat.

Zum Auftauen wurden die Platten in den Inkubator bei 37 °C für 30 min direkt auf den Metallboden gestellt. Der Inkubator wurde während dieses Auftauvorgangs nicht geöffnet, um eine gleichmäßige Auftaurate zu gewährleisten. Nach Ablauf der 30 min wurde das zuvor im Wasserbad erwärmte OptiMEM[®] zupipettiert. OptiMEM ist eine serumreduzierte Variante des *Modified Eagle Medium* mit minimalem Proteinanteil und zusätzlichen Wachstumsfaktoren und Spurenelementen. Das zupipettierte Volumen wurde so gewählt, dass die anschließend vorliegende DMSO-Konzentration im Well höchstens 2 % betrug.

Damit die Zellen adhäreren konnten, wurden die Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator über Nacht inkubiert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Vitalitätsassay mit Resazurin

Vitale Zellen weisen eine hohe metabolische Aktivität auf. Bei der Metabolisierung werden u. a. Oxidoreduktasen in der Zelle gebildet. Je vitaler eine Zelle ist, desto schneller kann der zugesetzte Indikatorfarbstoff durch die gebildeten Oxidoreduktasen umgesetzt werden. Die Zunahme des neu gebildeten Farbstoffes oder die Abnahme des zugesetzten Farbstoffs kann photometrisch quantitativ ermittelt werden.

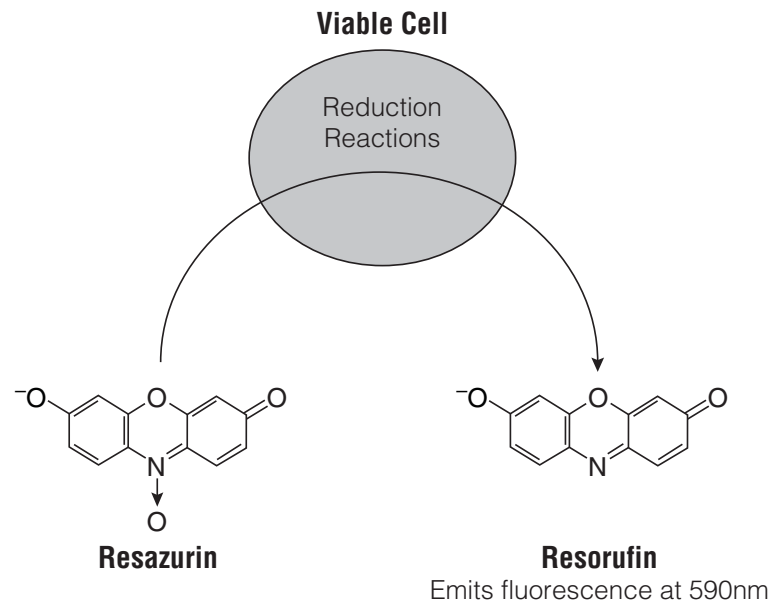


Abbildung 2-1: Umsatz von Resazurin zu Resorufin

Die Abbildung zeigt die Strukturformel von Resazurin, die oxidierte Form, und Resorufin, die reduzierte Form des Farbstoffs. Resorufin ist stark fluoreszierend bei einer Wellenlänge von 590 nm [Promega]

Zur Bestimmung der Vitalität und der gleichmäßigen Verteilung der Zellen in Mikrotiterplatten wird der Redox-Farbstoff Resazurin verwendet (Abbildung 2-1).

Resazurin oder *7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid* ist ein blauer, nicht fluoreszierender Farbstoff. Die Substanz wurde erstmals 1929 verwendet, um den bakteriellen Gehalt in Milch zu bestimmen. Durch mitochondriale Enzymaktivität in den Zellen wird Resazurin zu Resorufin reduziert. [Twigg, 1945]

Das Absorptionsmaximum von Resazurin liegt bei 605 nm, das Absorptionsmaximum von Resorufin bei 573 nm (Abbildung 2-2A.). Resorufin ist im Gegensatz zu Resazurin pink gefärbt und stark fluoreszierend. Bei Anregung mit einer Wellenlänge von 579 nm kommt es zu einer Verschiebung, wonach Resorufin Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 584 nm (Abbildung 2-2B.) emittiert. Der farbliche Umschlag von blau nach pink ist mit bloßem Auge erkennbar. Quantitativ kann die Vitalität entweder über Messung der Absorption oder Messung der Fluoreszenz von Resorufin bestimmt werden.

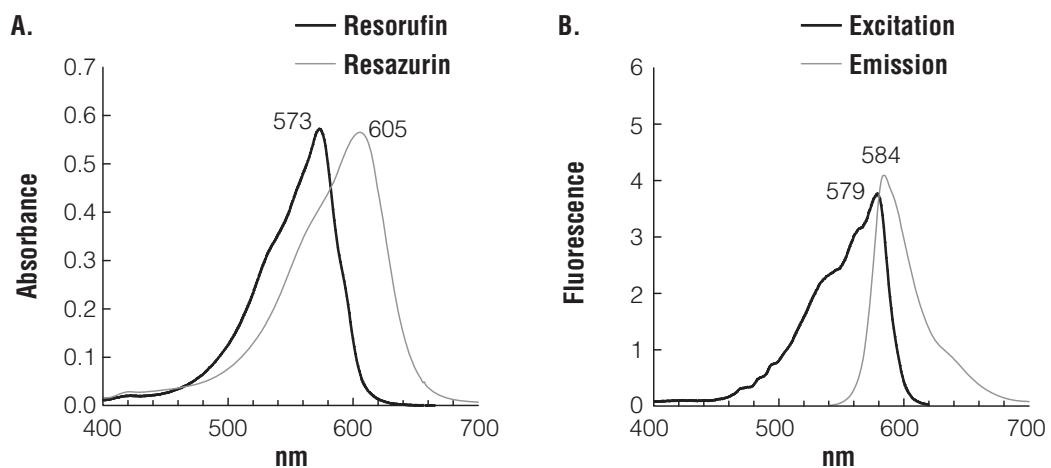


Abbildung 2-2: Absorption und Fluoreszenz von Resazurin und Resorufin

A. Absorptionsmaxima von Resazurin und Resorufin

B. Emission von Resorufin in Abhängigkeit der Anregung [Promega]

Für den Assay wurde eine klare 384-Well-Platte wie unter 2.2.5 beschrieben aufgetaut. Nach dem 30minütigen Auftauvorgang im Inkubator wurden 45 µl OptiMEM zu den Wells pipettiert. Werden Negativkontrollen mitgeführt, enthalten diese entweder 7,5-mmol/l Natrium-Selenit oder alternativ 10 % DMSO.

Natrium-Selenit wird für die Abtötung der Zellen CHO-CHRM1 verwendet. Bei Verwendung der Zellen A549-NFκB-SEAP bildet Natrium-Selenit einen nichtlöslichen Niederschlag, weswegen hier DMSO zum Einsatz kommt. Zum Adhären der Zellen inkubierte die Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht im Brutschrank.

Am nächsten Tag wurde die Resazuringebrauchslösung im Wasserbad erwärmt. Für den Assay wurden 6 µl Resazurinlösung pro Well zugegeben. Die Platte wurde solange bei 37 °C inkubiert, bis sich optisch ein deutlicher Umsatz des Resazurins durch einen Farbumschlag von blau nach rosa erkennen ließ. Bei zu langer Inkubationszeit des Assays wird Resazurin von den Zellen vollständig zu Resorufin umgesetzt und es sind keine Unterschiede zwischen den Wells mehr messbar. Bei vitalen Zellen wurde ungefähr eine Inkubationszeit von 5 h benötigt, bei weniger vitalen Zellen konnte auch über Nacht inkubiert werden.

Nach der Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz mit dem Pherastar Plattenleser gemessen, wobei die Wellenlänge der Anregung 540 nm und die der Emission 590 nm betrug.

2.4.2 SEAP-Reportergen-Assay mit A549-NFκB-Zellen

Das Genprodukt, die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP), wird von den Zellen A549-NFκB-SEAP in das Zellkulturmedium sekretiert, wenn der Transkriptionsfaktor NFκB durch den Tumornekrosefaktor TNFα aktiviert wurde. Zur Detektion der SEAP wird das Phospha-Light™ System Kit der Firma Applied Biosystems verwendet.

Alkalische Phosphatasen sind in jeder Zelle vorhanden. Die sekretierte alkalische Phosphatase der Zelllinie A549-NFκB-SEAP ist eine verkürzte, sekretierte Version der plazentaren alkalischen Phosphatase des Menschen, welche regulär in der Zellmembran verankert wird. In diesem Assay wird das Genprodukt SEAP, welches bei erfolgter Stimulierung produziert wird, nachgewiesen.

Um nur die plazentaren alkalischen Phosphatasen detektieren zu können, werden die endogenen alkalischen Phosphatasen mittels Inhibitoren im *Phospha-Light™ assay buffer* inhibiert.

Zur Detektion wird das chemilumineszente Substrat CSPD[®] zugefügt. Dieses wird von alkalischen Phosphatasen dephosphoryliert. Es entsteht zunächst ein metastabiles Zwischenprodukt, das Dioxetan-Anion, welches beim Zerfall Licht emittiert (Abbildung 2-3). Das Lumineszenzsignal ist zu der Konzentration an sekretierter alkalischer Phosphatase im Überstand proportional und wird im Plattenleser detektiert.

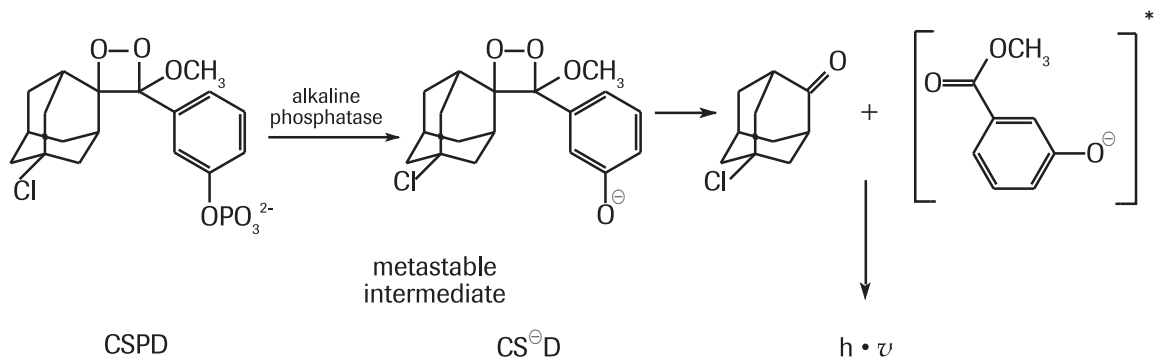


Abbildung 2-3: Chemische Umsetzung des chemilumineszenten Substrates CSPD[®]

Das Testprinzip des SEAP-Assays beruht darauf, dass die sekretierte alkalische Phosphatase im Zellkulturüberstand das zugefügte chemilumineszente Substrat CSPD dephosphoryliert. Als kurzlebiges Zwischenprodukt entsteht das Anion CS⁻D. Beim Zerfall des Moleküls wird durch das Lösen der Bindung Licht emittiert. Die detektierte Lumineszenzmenge ist direkt proportional zur Menge an alkalischer Phosphatase im Überstand. [Roche]

Die Zellen A549-NF κ B-SEAP wurden entweder, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, in einer klaren Princess Platte aufgetaut oder frisch in eine klare 384-Well-Platte ausgesät. Nach dem Auftauen der Princess Platte wurden 22 μ l OptiMEM zu der eingefrorenen Zellsuspension gegeben. Frische Zellen hingegen wurden direkt in 37 μ l Kulturmedium ausgesät. Zum Adhärenieren der Zellen wurde die Platte über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation der Zellen zur Expression der sekretierten alkalischen Phosphatase.

Die Expression von SEAP wurde mit dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) induziert. Die Verdünnungen wurden doppelt konzentriert in Kulturmedium angesetzt. Für eine Dosis-Wirkungs-Kurve wurde TNF α in den Endkonzentrationen 6,08x10⁻⁸ g/ml bis 9,26x10⁻¹² g/ml eingesetzt. Zur Überprüfung der Stimulierbarkeit wurde mit einer EC₈₀-Konzentration von 1,16x10⁻⁸ g/ml stimuliert. Von den Verdünnungen wurden 37 μ l zur Zellsuspension gegeben.

Es hat sich erwiesen, dass die Stimulierbarkeit in Gegenwart von ca. 1 % DMSO erhöht ist. Bei den eingefrorenen Zellen war DMSO bereits im Kryomedium enthalten und musste nicht zugefügt werden. Die frischen Zellen wurden auf 1 % DMSO Endkonzentration im Well eingestellt.

Die Inkubation mit $TNF\alpha$ betrug 20 bis 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank.

Die Durchführung des SEAP Reporter gen Assays erfolgte nach den Herstellerangaben. Dafür wurde am nächsten Tag 15 μ l Überstand je Well in eine schwarze 384-Well-Platte überführt. Anschließend wurden 15 μ l *Phospha-Light™ assay buffer* zu den vorgelegten Überständen pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das chemilumineszente Substrat *CSPD®* wurde mit *Phospha-Light reaction buffer diluent* im Verhältnis 1:20 verdünnt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden davon ebenfalls 15 μ l in die Wells pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit.

Die Lumineszenz wurde mit dem Pherastar Plattenleser gemessen.

2.4.3 IP-One Tb HTRF® Assay mit CHO-CHRM1-Zellen

Mit dem Immunoassay IP-One Tb HTRF® (IP-One Assay) der Firma Cisbio wird die Stimulierbarkeit des muskarinischen Acetylcholinrezeptors M1 (M1-Rezeptor) in den Zellen CHO-CHRM1 nachgewiesen. Wird der M1-Rezeptor durch den Agonisten Carbachol aktiviert, so wird im Laufe des Signalweges Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) produziert. IP3 besitzt eine kurze Halbwertszeit und wird innerhalb der Zelle rasch durch Dephosphorylierung abgebaut zu Inositol-1-Phosphat (IP1), welches in diesem Assay zum Nachweis einer Aktivierung des Rezeptors herangezogen wird. Durch Zugabe von Lithiumchlorid, welches im IP1-Stimulationspuffer enthalten ist, akkumuliert IP1 und wird vor weiterer Dephosphorylierung geschützt.

Der Nachweis erfolgt mit der von Cisbio entwickelten Technologie der homogenen, zeitaufgelösten Fluoreszenz (engl.: homogenous time resolved fluorescence, HTRF) gekoppelt mit Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET).

Diese Technologie basiert auf der Übertragung der Energie zwischen zwei fluorophoren Molekülen. Als Donor wird *Lumi4™Tb-Kryptat*, als Akzeptor wird IP1-d2 eingesetzt. Das im Kit enthaltene Terbiumkryptat ist an einen monoklonalen anti-IP1-spezifischen Antikörper gebunden. Um die Bindung an dem Antikörper konkurrieren das zelluläre IP1 und das im Kit enthaltene IP1, welches mit dem fluorophoren Molekül d2 konjugiert ist. Ein Signal entsteht nur bei Bindung von d2-konjugiertem IP1 mit dem Antikörper. Findet eine Anregung mit Licht statt, fluoresziert Kryptat mit einer Wellenlänge von 620 nm. Diese Fluoreszenz absorbiert das Farbstoffmolekül d2 und emittiert daraufhin Licht mit einer Wellenlänge von 665 nm (Abbildung 2-4). Die Verdrängung des d2-gekoppelten IP1 führt zu einer Abnahme des gemessenen Signals und ist daher umgekehrt proportional zur Agonistenkonzentration.

Das HTRF-Signal wird aus dem Quotienten der Emissionen bei 665 nm und 620 nm gebildet.

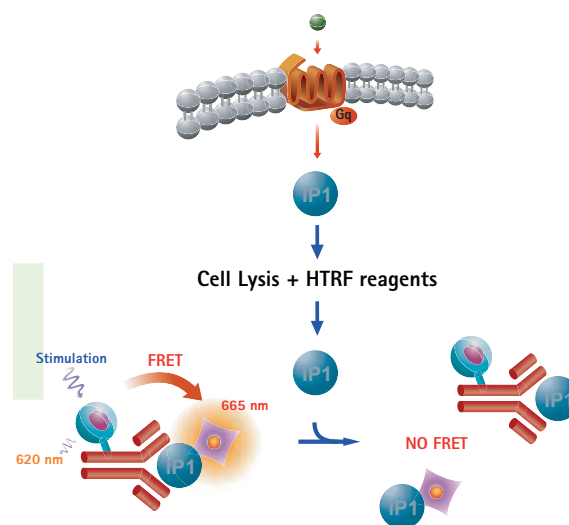


Abbildung 2-4: Funktionsprinzip des HTRF® IP-One Assays

Durch Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors in der Zellmembran, wird im Laufe der Signalkaskade Inositol-1-Phosphat (IP1) in der Zelle produziert. Das im Kit enthaltene IP1 ist gekoppelt mit einem fluorophoren Akzeptormolekül d2. Zelleigenes und d2-gekoppeltes IP1 konkurrieren um die Bindung am anti-IP1-Antikörper, welcher mit einem fluorophoren Donor, dem Terbiumkryptat, verbunden ist. Erst durch Bindung des d2-gekoppelten IP1 an den Antikörper entsteht bei Anregung mit Licht ein Signal. Mit zellulär gebundenem IP1 hingegen wird kein Signal erzeugt.

Für den Assay wurden am Vortag entweder Zellen aus laufender Kultur in eine weiße 384-Well-Platte in 80 µl Kulturmedium ausgesät oder kryokonservierte Zellen in einer weißen Princess Platte, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, aufgetaut. Zu den kryokonservierten Zellen wurden nach dem Auftauen 65 µl OptiMEM zupipettiert. Bei frischen Zellen wurde zusätzlich eine Wachstumskontrolle durchgeführt, indem Zellen in einer klaren 384-Well-Platte zur mikroskopischen Kontrolle ausgesät wurden. Die Platten wurden bis zur Durchführung des Assays im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag wurde der IP-One Assay durchgeführt. Dessen Ablauf richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Dafür wurde zunächst der IP1-Stimulationspuffer angesetzt. Dieser bestand aus 3,5 Teilen H₂O, 1 Teil 5xStimulationspuffer und 0,5 Teilen 1%BSA-Lösung. Mit diesem Puffer wurden die Verdünnungen des Agonisten Carbachol und die Standardreihe angesetzt.

Zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurde Carbachol in den Konzentrationen $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l eingesetzt. Für die Überprüfung der Stimulierbarkeit wurde eine Konzentration von $9,1 \times 10^{-6}$ mol/l gewählt, die dem EC₈₀-Wert von Carbachol entspricht. Die Verdünnungen wurden zunächst doppelt konzentriert in Stimulationspuffer angesetzt. Für die Standardreihe mit IP1-Tb-Kalibrationssubstanz wurde der *IP1 calibrator* in den Konzentrationen $1,1 \times 10^{-6}$ mol/l bis $1,1 \times 10^{-8}$ mol/l in Stimulationspuffer angesetzt.

Der Assay wurde direkt in den weißen 384-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurde zuerst das vorhandene Kulturmedium durch Ausschlagen entfernt. Unmittelbar danach wurden je Well 10 µl des zuvor angesetzten IP1-Stimulationspuffer pipettiert, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. 10 µl der doppelt konzentrierten Carbachol-Verdünnungen wurden zu den entsprechenden Wells pipettiert. Für die Standardreihe wurden je 20 µl pro Standard in zellfreie Wells pipettiert. Für die Assaypositiv- und Assaynegativkontrolle wurden je 10 µl in weitere zellfreie Wells pipettiert. Durch kurzes Anzentrifugieren bis ca. 1000 rpm bei Raumtemperatur wurden die Lösungen in den Wells durchmischt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C im Brutschrank.

In der Zwischenzeit wurden die Stocklösungen der Chromophore *IP1-d2* und *anti-IP1-Cryptat Tb* im Verhältnis 1:20 mit *conjugate and lysis buffer* verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zunächst 5 µl der *IP1-d2*-Lösung zu allen Wells, außer der Negativkontrolle, pipettiert. Bei dieser wurden 5 µl *lysis buffer* verwendet. Anschließend wurden zu allen Wells 5 µl der *anti-IP1-Cryptat-Tb*-Lösung pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur.

Die Platte wurde im Pherastar Plattenleser mit dem HTRF-Modul ausgelesen. Dabei wurde mit einer Wellenlänge von 337 nm angeregt und gleichzeitig die Emission bei 620 nm und 665 nm detektiert. Das Verhältnis der Signale 665 nm und 620 nm diente zur Auswertung.

2.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Dosis-Wirkungskurven wurden mit der Software GraphPad Prism, Version 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Diplomarbeit sollte eine Methode etabliert werden, mit der die Zelllinien A549-NF κ B-SEAP und CHO-CHRM1 in 384-Well-Platten kryokonserviert werden können. Dazu zählt zum einen der Erhalt der Vitalität der Zellen nach der Kryoprozedur, zum anderen der damit verbundene Erhalt der Sensitivität der Zellen bei der Stimulation durch einen Agonisten.

Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen nach dem Auftauen wurde zunächst der Resazurin Assay durchgeführt. Dieser zeigte sowohl die Vitalität der Zellen, als auch deren Gleichverteilung auf der 384-Well-Platte an. Im nächsten Schritt erfolgte die Expressionsanalyse mit einem jeder Zelllinie angepassten Assay.

In den Abbildungen sind die Mittelwerte (MW) der Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) dargestellt. Wurden Negativkontrollen mitgeführt, wurde das Verhältnis von Signal zu Hintergrund ausgewertet (S/B). Bei der Auswertung des IP-One Assays wird hingegen das reziproke Verhältnis von Hintergrund zu Signal $(S/B)^{-1}$ ausgewertet. Der Z-Faktor bzw. Z'-Faktor wurde ebenfalls mit angegeben, wenn eine Negativkontrolle mitgeführt wurde. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven wurde die mittlere effektive Dosis (EC_{50}), welche ein Indiz für die Sensitivität der Zellen ist, berechnet.

3.1 Optimierung der Assaybedingungen

Vor der Kryokonservierung der Zellen in 384-Well-Platten wurden die Bedingungen für die Durchführung eines funktionellen Assays überprüft. Einflüsse, welche sich geringfügig auf frische Zellen auswirken, werden durch die Kryokonservierung und den damit verbundenen Stress der Zellen noch verstärkt. Daher sollte vor der Kryokonservierung für die Zellen A549-NF κ B-SEAP dialysiertes Serum unterschiedlicher Hersteller getestet werden und für die Zellen CHO-CHRM1 zwei verschiedene 384-Well-Platten zur Durchführung des IP-One Assays verglichen werden.

3.1.1 Vergleich der dialysierten Seren der Hersteller PAA und Sigma für die Zelllinie A549-NF κ B-SEAP

Die in der Zellkultur verwendeten Seren werden aus Kälberblut gewonnen und besitzen je Charge unterschiedliche Zusammensetzungen. Die Zellen A549-NF κ B-SEAP wurden im Gegensatz zu den Zellen CHO-CHRM1 mit 2 % dialysiertem Serum kultiviert. Die Reduktion der Serumkonzentration sowie die Verwendung von dialysiertem Serum verhindern eine basale Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B der Zellen A549-NF κ B-SEAP. Aus dialysiertem Serum wurde mittels Dialyse kleinere Moleküle, wie Hormone, Nukleotide und Aminosäuren entfernt.

Durch die Kultivierung mit unterschiedlichen dialysierten Seren wurde überprüft, ob sich dadurch ein Unterschied in der Stimulierbarkeit der Zellen feststellen lässt.

Für die Kultivierung von A549-NF κ B-SEAP wurden die dialysierten Seren der Hersteller Sigma und PAA verglichen. Dafür wurde je eine Kultur mit dialysiertem Serum des Herstellers PAA und des Herstellers Sigma über mehrere Passagen kultiviert. Ein Unterschied durch das Serum konnte in der Morphologie der Kulturen beobachtet werden (Abbildung 3-1). Die Zellen, welche mit Serum von PAA kultiviert wurden, hatten ein gleichmäßigeres Erscheinungsbild. Die Zellen, die mit Serum von Sigma kultiviert wurden, schienen kleiner und leicht abgerundet mit konzentrierterem Cytosol, was die dunklere Färbung des Zellinneren vermuten lässt.

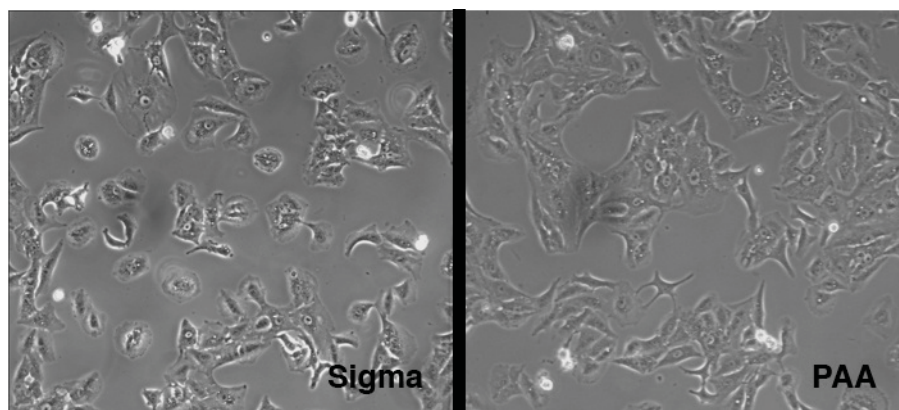


Abbildung 3-1: Morphologischer Unterschied von A549-NF κ B-SEAP, kultiviert mit unterschiedlichen Seren

Die Kultur links wurde mit Serum des Herstellers Sigma kultiviert, die Kultur rechts mit Serum des Herstellers PAA. Die Zellen wurden 100fach vergrößert

Ob sich die Kultivierung mit unterschiedlichen Seren auch in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors und somit der Sekretion der alkalischen Phosphatasen bemerkbar macht, wurde mit der Durchführung des SEAP-Assays überprüft.

Dafür wurden 10.000 c/w und 20.000 c/w je Kultur in eine 384 Well-Platte ausgesät und mit der EC_{80} -Konzentration $1,16 \times 10^{-8}$ g/ml von $TNF\alpha$ stimuliert. Die Werte wurden 6fach bestimmt. Am nächsten Tag wurde der SEAP Assay durchgeführt.

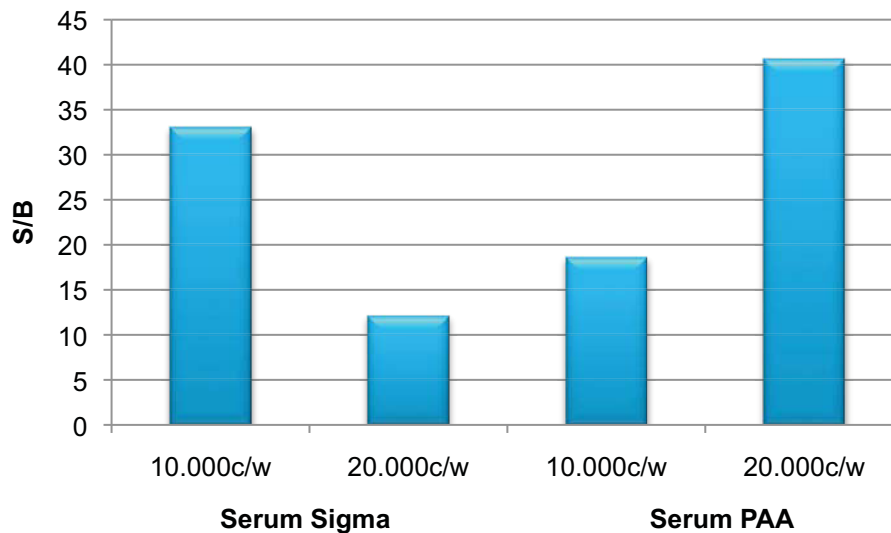


Abbildung 3-2: S/B-Werte frischer A549-NFκB-SEAP im SEAP Assay, kultiviert mit unterschiedlichen Seren

Die Zellen A549-NFκB-SEAP wurden parallel mit dialysiertem Serum des Herstellers Sigma und des Herstellers PAA kultiviert. Die Zellen wurden mit jeweils 10.000 c/w und 20.000 c/w in eine 384-Well-Platte ausgesät und mit der EC_{80} -Konzentration $1,16 \times 10^{-8}$ g/ml von $TNF\alpha$ stimuliert. Anschließend wurde der SEAP Assay durchgeführt und damit die Menge an sekretierter alkalischer Phosphatase im Überstand bestimmt. Aufgetragen wurde das Verhältnis von Signal der stimulierten zu Signal der unstimulierten Zellen (S/B). Die Werte wurden 6fach bestimmt.

Tabelle 3-1: Auswertung des SEAP Assays frischer A549-NFkB-SEAP, kultiviert mit unterschiedlichen Seren

Serum	Zellzahl		MW [RLU]	SD [%]	S/B	Z'
Sigma	10.000 c/w	stimuliert	20.618	37,3	32,94	-0,20
		unstimuliert	626	52,8		
	20.000 c/w	stimuliert	11.267	17,4	11,96	0,33
		unstimuliert	942	35,0		
PAA	10.000 c/w	stimuliert	33.896	28,8	18,52	0,03
		unstimuliert	1.831	32,6		
	20.000 c/w	stimuliert	54.552	3,7	40,50	0,87
		unstimuliert	1.347	22,6		

Die Durchführung des SEAP Assays sollte zeigen, ob sich durch die Kultivierung mit unterschiedlichen dialysierten Seren Unterschiede in der Stimulierbarkeit und somit der Menge an produzierter sekretierter alkalischer Phosphatase feststellen lassen. Werden die S/B-Werte betrachtet, ist der S/B-Wert von 10.000 c/w mit Serum Sigma höher als der S/B-Wert der selben Zellzahl mit Serum von PAA. Bei 20.000 c/w ist der S/B-Wert von PAA wesentlich höher (Abbildung 3-2). Mit Serum des Herstellers PAA wird mit beiden Zellzahlen ein wesentlich höheres Lumineszenzsignal bei den stimulierten Zellen detektiert (Tabelle 3-1). Auffällig ist, dass die Lumineszenz von 20.000 c/w der Kultur Sigma ca. die Hälfte der Signalhöhe erreicht, die mit 10.000 c/w gemessen wurde. Ursache dafür könnte eine fehlerhafte Aussaat der Zellmenge sein. Der S/B-Wert von 20.000 c/w der Kultur Sigma ist mit 11,96 demnach ebenso geringer als mit 10.000 c/w, wo ein S/B-Wert von 32,94 erreicht wird.

Die Zellen kultiviert mit dialysiertem Serum von PAA liefern durchweg höhere Lumineszenzsignale. Das Hintergrundsignal ist hier jedoch höher als mit Serum von Sigma, was sich negativ auf den S/B-Wert auswirkt. Dieser ist mit 10.000 c/w trotz deutlich höherem Fluoreszenzsignal der stimulierten Zellen geringer als das Signal der 10.000 c/w mit Serum Sigma. Der Z'-Faktor ist mit Serum von PAA positiv und erreicht mit 20.000 c/w einen exzellenten Wert.

Der Versuch zeigte, dass durch Verwendung eines natürlich gewonnenen Produktes, wie die Verwendung von dialysiertem Serum, Unterschiede in der Stimulierbarkeit festgestellt werden können. Mit dialysiertem Serum des Herstellers PAA lassen sich höhere Fluoreszenzsignale und somit eine höhere Stimulierbarkeit erreichen. Dieses wurde für die Kryokonservierung der Zellen A549-NF κ B-SEAP demnach eingesetzt.

3.1.2 Vergleich einer weißen 384-Well-Platte mit einer weißen *clear bottom* 384-Well-Platte für CHO-CHRM1

Der IP-One Assay, der die Expression des M1-Rezeptors der Zellen CHO-CHRM1 nachweist, wird aufgrund der zu detektierenden Fluoreszenz in weißen 384-Well-Platten durchgeführt. In klaren Platten würde ein Teil der Fluoreszenz durch das klare Polystyrol verschwinden und nicht detektiert werden können. Außerdem würden Nebensignaleffekte benachbarter Wells stören.

Die Zellen CHO-CHRM1 müssen daher in weißen Platten eingefroren werden, um eine Durchführbarkeit des IP-One Assays nach dem Auftauen zu gewährleisten. Eine mikroskopische Kontrolle ist in den weißen 384-Well-Platten nicht möglich, sondern wird separat in einer klaren 384-Well-Platte durchgeführt.

Alternativ sind Platten vom Hersteller erhältlich, welche eine weiße Wandung mit einer klaren Bodenplatte besitzen und damit das Mikroskopieren ermöglichen. Inwieweit die Ergebnisse in sowohl weißer als auch weißer *clear bottom* 384-Well-Platte vergleichbar sind, wurde mittels des IP-One Assays überprüft.

Dafür wurden 25.000 c/w frische Zellen in Stimulationspuffer des Kits ausgesät. Ohne Anheftung der Zellen über Nacht wurde der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit Carbachol wurde mit $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l stimuliert und damit eine Dosis-Wirkungs-Kurve in jeder Platte ermittelt. Das HTRF-Signal wurde mit dem HTRF-Modul des Plattenlesegerätes ausgelesen. Dieses Modul ist in der Lage, gleichzeitig Licht der Wellenlänge 665 nm und 620 nm zu erfassen.

Das HTRF-Signal ergibt sich aus dem Verhältnis der Emission bei 665 nm, welches vom angeregten d2-gekoppelten IP1 geliefert wird, und der Emission bei 620 nm, die das fluorophore Terbium-Kryptat am Antikörper liefert.

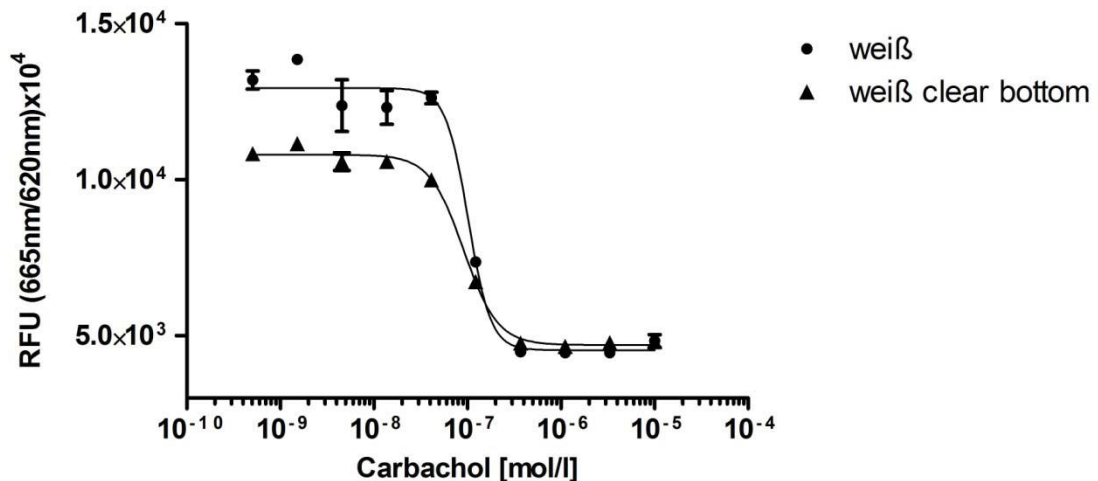


Abbildung 3-3: Vergleich einer weißen mit einer weißen *clear bottom* 384 Well Platte im IP-One Assay

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden frisch mit 25.000 c/w in eine weiße 384-Well-Platte und zum Vergleich in eine *clear bottom* 384-Well-Platte ausgesät. Mit Carbachol wurde zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve von $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l stimuliert und anschließend der IP-One Assay durchgeführt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 3-2: Auswertung des IP-One Assays mit frischen CHO-CHRM1, Vergleich einer weißen *clear bottom* und einer weißen Platte

Plattenart		RFU (665nm/620nm)x10 ⁴	(S/B) ⁻¹	EC ₅₀ [mol/l]	Z'
weiß <i>clear bottom</i>	Top	10.803	2,29	$9,09 \times 10^{-8}$	0,74
	Bottom	4.705			
weiß	Top	12.934	2,85	$1,01 \times 10^{-7}$	0,29
	Bottom	4.538			

Im IP-One Assay verhält sich das gemessene Fluoreszenzsignal zum Hintergrundsignal reziprok. Eine höhere Stimulierbarkeit des M1-Rezeptors äußert sich in einer größeren Produktion an zellulärem IP1 und führt somit zu einem verringerten Fluoreszenzsignal. Grund hierfür ist die Verdrängung des im Kit enthaltenen d2-gekoppelten IP1 durch zelluläres IP1.

Die Höhe des Maximalsignals, gemessen in der weißen *clear bottom* Platte, ist geringer als das Fluoreszenzsignal, welches in der weißen Platte gemessen wurde (Abbildung 3-3, Tabelle 3-2). Ein Teil der Fluoreszenz geht durch die klare Bodenplatte verloren und kann nicht detektiert werden. Dementsprechend ist der $(S/B)^{-1}$ -Wert der Zellen in der weißen *clear bottom* Platte geringer. Einen Einfluss auf die Sensitivität zeigt der EC_{50} -Wert nicht. Dieser unterscheidet sich nicht nennenswert. Der Z' -Faktor ist bei dem Assay, welcher in der *clear bottom* Platte durchgeführt wurde, wesentlich besser als in der weißen Vergleichsplatte, da geringe Schwankungen im Fluoreszenzsignal nicht detektiert werden.

Es wurde mit der Durchführung dieses IP-One Assays überprüft, ob die Verwendung der *clear bottom* Platten ein vergleichbares Ergebnis zu den weißen Platten liefert. Das Fluoreszenzsignal ist in *clear bottom* Platten jedoch wesentlich geringer. Die Verwendung der *clear bottom* Platten wurde aufgrund des Signalverlustes nicht weitergeführt. Daher wurde weiterhin parallel in weißen 384-Well-Platten zur Durchführung des IP-One Assays und in klaren 384-Well-Platten für die mikroskopische Kontrolle kryokonserviert.

3.1.3 Problematik bei der Kryokonservierung in 384-Well-Platten

Bei der Kryokonservierung der Zellen in 384-Well-Platten stellte sich heraus, dass das Verhältnis von Fläche zu Volumen der Wells einer 384-Well-Platte ungünstig für eine homogene Verteilung der Zellen im Well ist. Während frische Zellen bereits homogen in Suspension sind, wird bei den kryokonservierten Zellen Medium zum bereits vorhandenen Kryomedium hinzugegeben. Durch das Hinzupipettieren werden die kryokonservierten Zellen an die Ränder des Wells gespült (Abbildung 3-4). In 96-Well-Platten wird diese Inhomogenität der Zellen durch kurzes Schütteln auf dem Plattenschüttler aufgehoben. Die Wells der 384-Well-Platte hingegen bauen aufgrund ihrer geringen Größe so hohe Kapillarkräfte auf, dass eine gleichmäßige Verteilung der Zellen durch das Schütteln nicht möglich ist. Als Folge können nicht alle Zellen adhären und sterben dadurch ab.

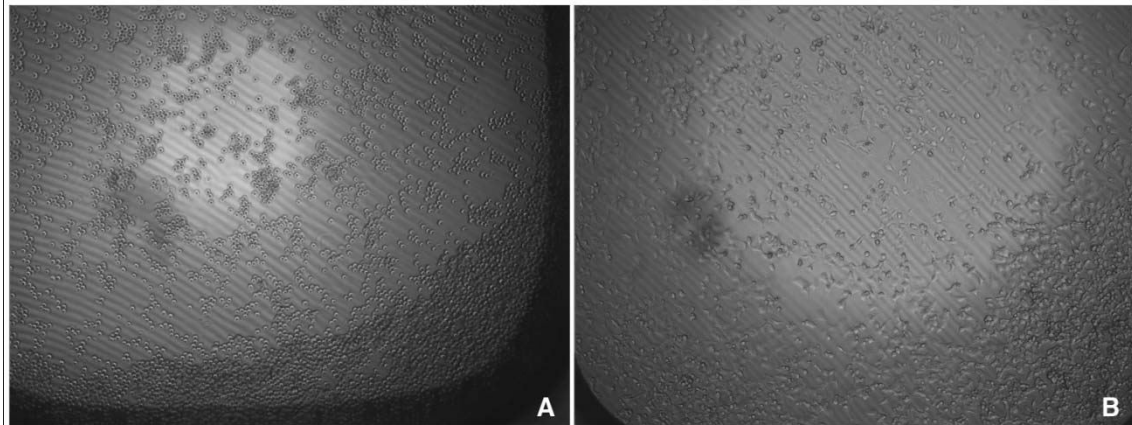


Abbildung 3-4: Kryokonservierte Zellen direkt nach Zugabe des Auftaumediums

Eingefroren wurden die Zellen A549-NFkB-SEAP mit 10.000 c/w. A: Inhomogene Verteilung der Zellen direkt nach Zugabe von OptiMEM. B: Die adhärierten Zellen am darauffolgenden Tag. Die Zellen sind 50fach vergrößert.

Eine Lösung hierfür ist die Reduktion der Pipettiergeschwindigkeit. Dadurch kann das Spülen der Zellen an die Ränder minimiert werden. Praktikabel ist dies allerdings beim manuellen Pipettieren nicht, da die Zeitspanne zwischen den ersten und den letzten Wells zu groß wäre, wenn alle Wells einer kryokonservierten 384-Well-Platte verwendet werden würden. Für die Kryokonservierungen der Zellen in 384-Well-Platten wurde diese Inhomogenität der Zellen im Well in Kauf genommen werden.

3.1.4 Ermittlung der optimalen Zellzahl von CHO-CHRM1

Mit zunehmender Zellzahl im Well wird eine Zunahme des Signals erwartet. Jedoch bedeutet der Einsatz von größeren Zellkonzentrationen im Well eine größere Menge an Ausgangsmaterial. Es wurde daher getestet, bei welcher Zellzahl sich die Vitalität der Zellen mit einer hohen Stimulierbarkeit vereinbaren lässt.

Für diesen Versuch wurden die Zellen CHO-CHRM1 mit 10.000 c/w, 20.000 c/w, 30.000 c/w und 40.000 c/w in 384-Well-Platten kryokonserviert. Um die Vitalität der Zellen nach dem Auftauen zu ermitteln, wurde der Resazurin Assay durchgeführt. Die Pipettiergeschwindigkeit bei Zugabe von OptiMEM nach dem Auftauen wurde bei diesem Versuch auf die kleinste Stufe eingestellt, damit das Spülen der Zellen an den Rand minimiert wird. Nach 18 h Inkubation mit Resazurin wurde die Platte vermessen.

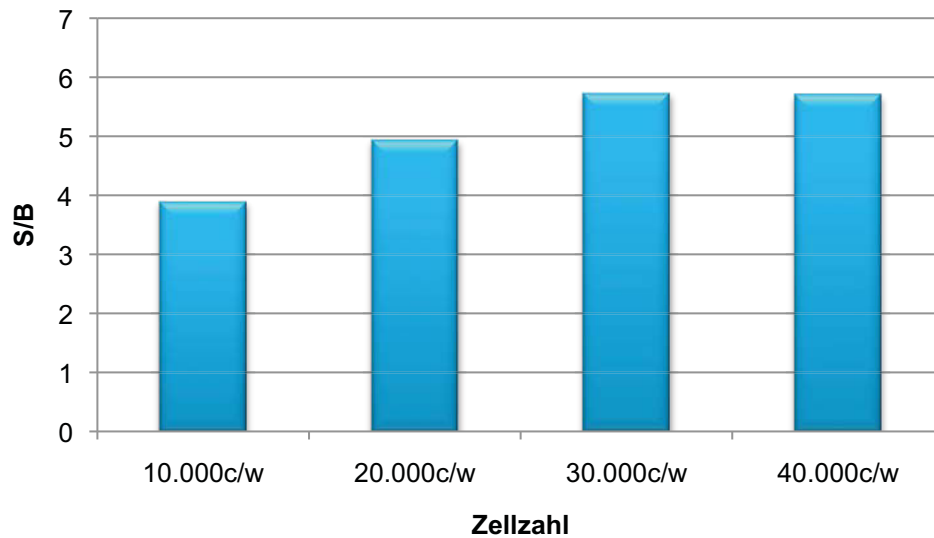


Abbildung 3-5: S/B-Werte kryokonservierter CHO-CHRM1 zur Optimierung der Zellzahl im Resazurin Assay

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 10.000 c/w, 20.000 c/w, 30.000 c/w und 40.000 c/w kryokonserviert. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurde Resazurin zugefügt. Resazurin inkubierte für 18 h. Die Bestimmung erfolgte 20fach.

Tabelle 3-3: Auswertung des Resazurin Assays mit kryokonservierten CHO-CHRM1 zur Zellzahloptimierung

Zellzahl		MW [RFU]	SD [%]	S/B	Z
10.000 c/w	Vital	91.515	13,3	3,88	0,41
	Tot	23.606	4,9		
20.000 c/w	Vital	119.460	18,2	4,92	0,26
	Tot	24.284	7,1		
30.000 c/w	Vital	145.738	11,9	5,73	0,54
	Tot	25.450	4,9		
40.000 c/w	Vital	147.716	9,2	5,69	0,64
	Tot	25.975	4,3		

Die Durchführung des Resazurin Assays sollte die Vitalität der Zellen der unterschiedlichen Zellkonzentrationen im Well aufzeigen. Die Abhängigkeit der S/B-Werte von der Zellzahl ist gut erkennbar (Abbildung 3-5). Jedoch nimmt das Fluoreszenzsignal nicht im selben Verhältnis zur Zellzahl zu. Im Vergleich zu 10.000 c/w wird mit 40.000 c/w kein 4faches Fluoreszenzsignal erreicht (Tabelle 3-3). Zwischen 30.000 c/w und 40.000 c/w kann praktisch kein Unterschied mehr detektiert werden.

Die Streuung der vitalen Zellen zeigt einen geringen Trend zur Abnahme mit größer werdender Zellzahl. Die S/B-Werte werden mit höherer Zellzahl ebenso größer. Daher werden mit den Zellzahlen 30.000 c/w und 40.000 c/w exzellente Werte für die Z-Faktoren erreicht.

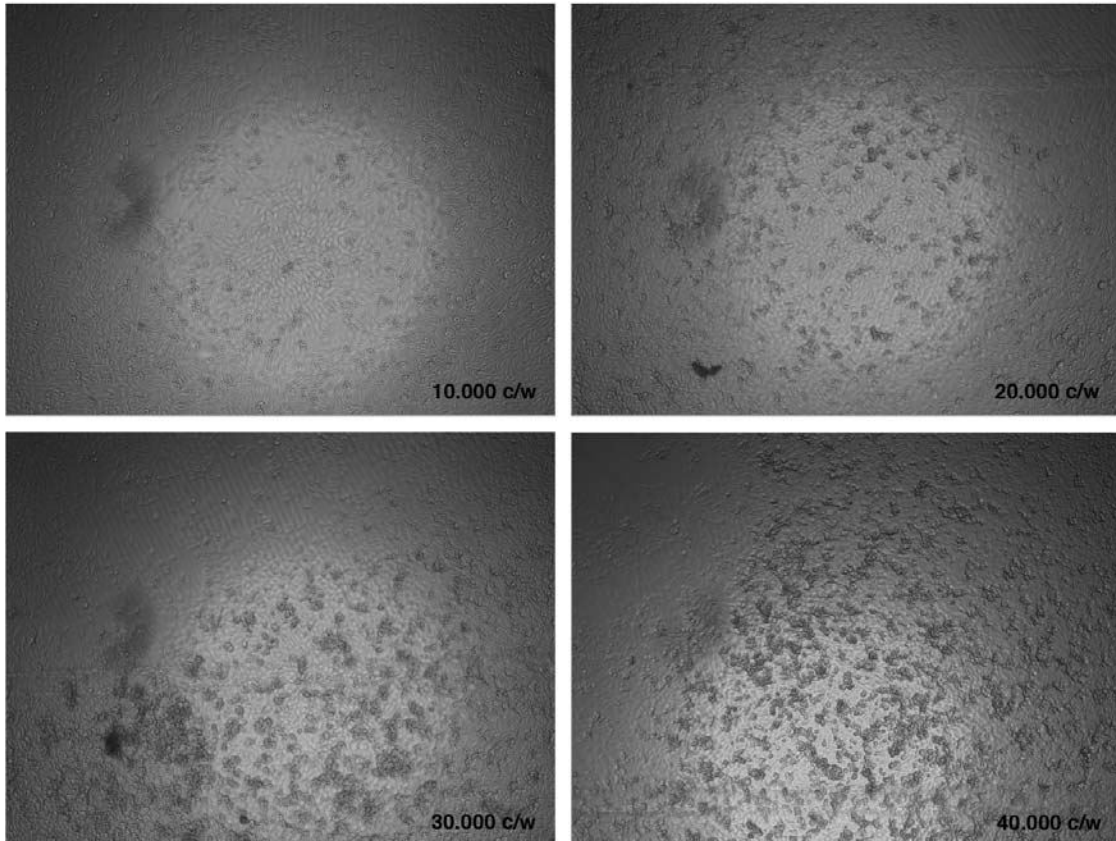


Abbildung 3-6: Bilder kryokonservierter CHO-CHRM1 zur Zellzahloptimierung

Abgebildet sind die kryokonservierten Zellen am Tag nach dem Auftauen. Bei Hinzufügen des Auftaumediums wurde die Pipettiergeschwindigkeit auf ein Minimum eingestellt, was das Wegspülen der Zellen an den Rand verhinderte. Die Zunahme an abgestorbenen Zellen, welche nicht adhärirten, ist deutlich zu erkennen. Die Zellen sind 50fach vergrößert abgebildet.

Die Bilder der kryokonservierten Zellen CHO-CHRM1 am Tag nach dem Auftauen zeigen, dass der Zellrasen bereits mit 10.000 c/w konfluent ist (Abbildung 3-6). Je höher die Zellzahl im Well ist, desto mehr steigt der Anteil abgerundeter Zellen an. Diese sind auf den Bildern abgerundet und dunkler als der Zellrasen erkennbar. Sie besitzen aufgrund der Konfluenz nicht die Möglichkeit zu adhärirten.

Inwieweit sich die Stimulierbarkeit der unterschiedlichen Zellzahlen bemerkbar macht, wurde im IP-One Assay überprüft. Es wurde mit Carbachol mit der EC₈₀-Konzentration $9,1 \times 10^{-6}$ mol/l stimuliert.

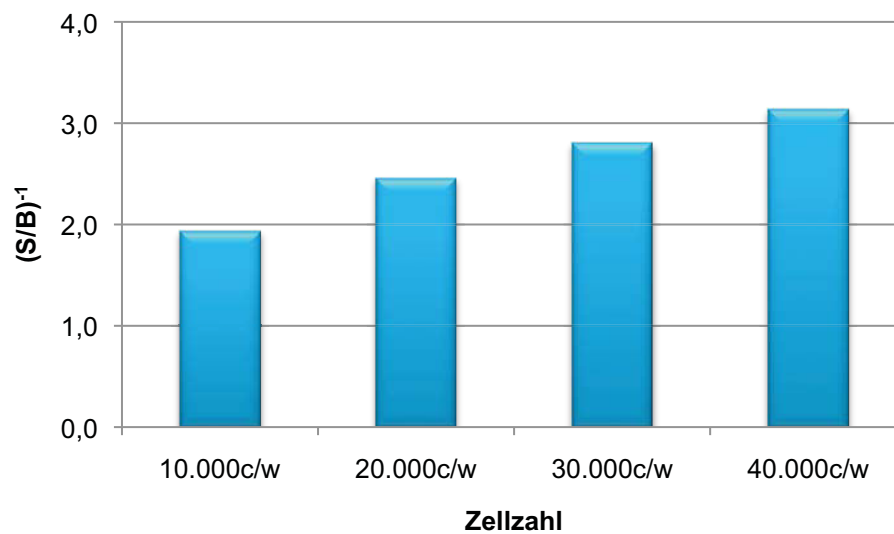


Abbildung 3-7: (S/B)⁻¹-Werte kryokonservierter CHO-CHRM1 zur Zellzahloptimierung im IP-One Assay

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 10.000 c/w, 20.000 c/w, 30.000 c/w und 40.000 c/w kryokonserviert. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurden die Zellen mit der EC₈₀-Konzentration $9,1 \times 10^{-6}$ mol/l von Carbachol stimuliert und anschließend der IP-One Assay durchgeführt. Aufgetragen wurde das Verhältnis der Signale der stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (S/B)⁻¹. Jeder Wert wurde 12fach bestimmt.

Tabelle 3-4: Stimulierbarkeit kryokonservierter CHO-CHRM1 im IP-One Assay zur Zellzahloptimierung

Zellzahl		RFU (665nm/620nm)×10 ⁴	SD [%]	(S/B) ⁻¹	Z'
10.000 c/w	unstimuliert	18.853	3,6	1,93	0,31
	stimuliert	9.787	14,3		
20.000 c/w	unstimuliert	15.510	4,4	2,45	0,50
	stimuliert	6.338	13,4		
30.000 c/w	unstimuliert	14.783	7,1	2,80	0,38
	stimuliert	5.288	17,3		
40.000 c/w	unstimuliert	14.233	6,5	3,13	0,52
	stimuliert	4.546	13,8		

Es ist zu erkennen, dass mit größer werdender Zellzahl die (S/B)⁻¹-Werte zunehmen (Abbildung 3-7). Je Zellzahl herrscht ein anderes Verhältnis der Fluoreszenz von stimulierten zu unstimulierten Zellen (Tabelle 3-4). Je mehr Zellen vorhanden sind, desto geringer werden die Signale. Ein verringertes Signal bedeutet einen höheren Anteil an zellulärem IP1 und somit eine höhere Stimulierbarkeit.

Die Streuung der Werte der stimulierten Zellen ist höher als die der unstimulierten und bewegt sich mit höchstens 17,3 % bei 30.000 c/w in einem akzeptablen Bereich. Demnach fällt der Z'-Faktor durchweg positiv aus und befindet sich im durchführbaren und mit 20.000 c/w und 40.000 c/w sogar im exzellenten Bereich.

Mit 30.000 c/w und 40.000 c/w wurden zwar entsprechend den Erwartungen höhere $(S/B)^{-1}$ -Werte als mit kleineren Zellzahlen im IP-One Assay erhalten, jedoch wurde auf diese hohen Zellzahlen aufgrund der Fülle im Well verzichtet.

Werden funktionale Assays mit frischen Zellen durchgeführt, werden dafür so wenig Zellen wie möglich eingesetzt. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, wie sich weniger Zellen im Well nach der Kryokonservierung bei der Bestimmung einer Dosis-Wirkungs-Kurve verhalten. Dafür wurden durch Stimulation mit Carbachol die Expression des M1-Rezeptors im IP-One Assay nachgewiesen. Parallel dazu wurde der Assay mit frischen Zellen durchgeführt, um den Effekt der Kryokonservierung auf die Stimulierbarkeit beobachten zu können.

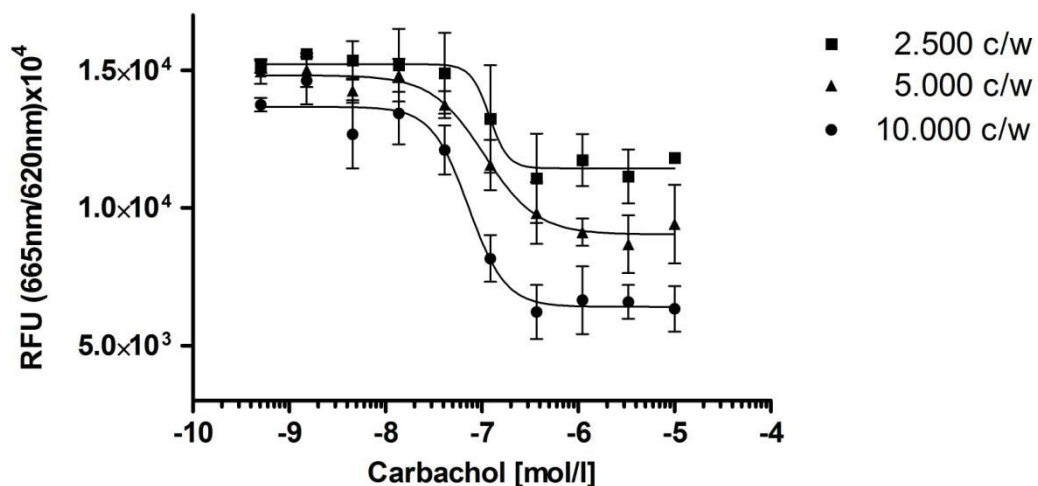


Abbildung 3-8: Dosis-Wirkungs-Kurven kryokonservierter CHO-CHRM1, ermittelt im IP-One Assay

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 2.500 c/w, 5.000 c/w und 10.000 c/w in einer 384-Well-Platte kryokonserviert. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurde mit Carbachol von $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l stimuliert und anschließend der IP-One Assay durchgeführt. Die Werte wurden jeweils 3fach bestimmt.

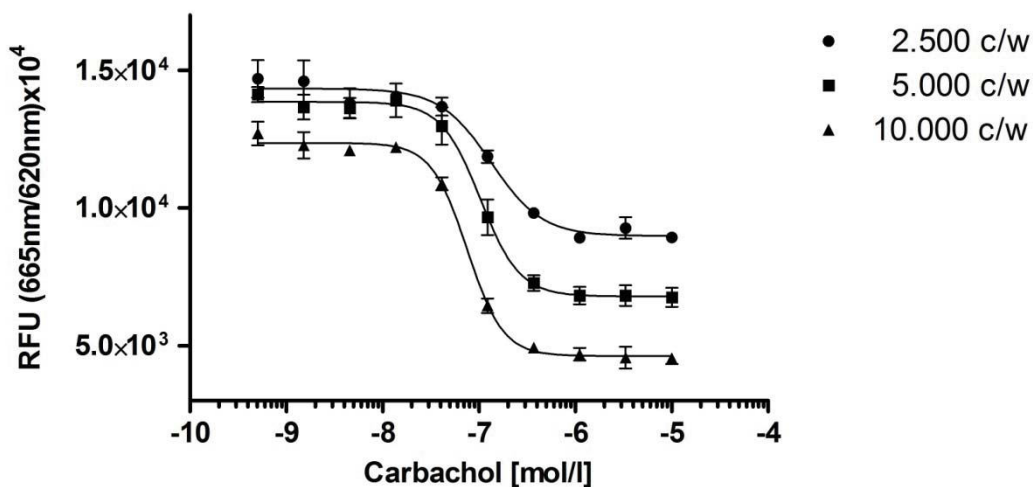


Abbildung 3-9: Dosis-Wirkungs-Kurven frischer CHO-CHRM1, ermittelt im IP-One Assay

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 2.500 c/w, 5.000 c/w und 10.000 c/w in einer 384-Well-Platte frisch ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen über Nacht wurde mit Carbachol zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve von $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l stimuliert und anschließend der IP-One Assay durchgeführt. Die Werte wurden jeweils 2fach bestimmt.

Tabelle 3-5: Auswertung des IP-One Assays kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1

Zellzahl			RFU (665nm/620nm) $\times 10^4$	(S/B) $^{-1}$	EC ₅₀ [mol/l]	Z'	
2.500 c/w	kryo-konserviert	Top	15.221	1,33	$1,20 \times 10^{-7}$	0,70	
		Bottom	11.445				
	frisch	Top	14.336	1,59			
		Bottom	8.983				
5.000 c/w	kryo-konserviert	Top	14.820	1,63	$1,06 \times 10^{-7}$	-0,23	
		Bottom	9.040				
	frisch	Top	13.852	2,03		$1,03 \times 10^{-7}$	0,64
		Bottom	6.796				
10.000 c/w	kryo-konserviert	Top	13.670	2,12	$7,27 \times 10^{-8}$		0,57
		Bottom	6.418				
	frisch	Top	12.368	2,67		$7,53 \times 10^{-8}$	0,77
		Bottom	4.627				

Die Durchführung des IP-One Assays sollte aufzeigen, wie sich geringere Zellzahlen im Well nach der Kryokonservierung bei einer dosisabhängigen Stimulierung mit Carbachol verhalten. Anhand der ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven ist eine zellzahlabhängige Wirkung zu erkennen (Abbildung 3-8).

Je mehr Zellen vorhanden sind, desto schwächer wird das Signal und die gesamte Kurve verläuft bei geringeren Signalthöhen. Die Verringerung des Signals ist auf eine höhere Stimulierbarkeit der Zellen zurückzuführen. Je höher die Stimulierung ist, was für eine vermehrte Produktion an IP-One durch die Zelle spricht, desto eher wird das fluorophore d2-gekoppelte IP-One von der Antikörper-Bindungsstelle verdrängt und kann somit kein Fluoreszenzsignal mehr liefern. Noch deutlicher ist dieser Effekt anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven der frischen CHO-CHRM1 zu sehen (Abbildung 3-9).

Die Fluoreszenzverhältnisse der frischen Zellen sind bei gleicher Zellzahl grundsätzlich geringer als die der kryokonservierten Zellen, was wiederum für eine erhöhte zelluläre IP-One Produktion spricht (Tabelle 3-5). Dies lässt sich auch an den $(S/B)^{-1}$ -Werten beobachten, welche bei den frischen Zellen erhöht sind. Einen Verlust der Sensitivität durch die Kryokonservierung findet nicht statt, da je Zellzahl die EC_{50} -Werte beinahe identisch sind. Die Standardabweichungen der Messwerte sind bei den frischen Zellen nicht höher als 10 %, die der kryokonservierten Zellen erreichen bis zu 21 %. Daher ist der Z'-Faktor der frischen Zellen durchweg positiv, mit 5.000 c/w und 10.000 c/w sogar exzellent. Durch die ungleichmäßige Streuung der Messwerte der kryokonservierten Zellen schwankt der Z'-Faktor zwischen exzellenten und negativen Werten.

Die Kryokonservierung mit weniger Zellen pro Well hat gezeigt, dass eine gewisse Masse an Zellen vorhanden sein muss, um die Streuung der Messwerte zuverlässig einzugrenzen. Nur so kann eine verlässliche Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt werden und daraus exakte Aussagen über Parameter wie die Sensitivität gemacht werden.

3.2 Optimierung der Einfriermethode

3.2.1 Erhöhung der Abkühlrate durch Einfrieren auf einer Metallplatte

Idealerweise werden Zellen mit einer Abkühlrate von -1 °C/min in Kryogefäßen eingefroren. Eine schnellere Abkühlrate durch das Stellen der Mikrotiterplatten direkt in den -80 °C temperierten Gefrierschrank stellte sich bei der Entwicklung der Princess Platten ebenso praktikabel heraus.

Mikrotiterplatten besitzen aufgrund des umlaufenden Stehrandes einen Hohlraum unter den Wells. Dieser Hohlraum bildet ein Luftpolster zwischen den Wells und dem auf -80 °C temperierten Blech des Gefrierschranks, auf das die Mikrotiterplatte gestellt wird. Durch die Verwendung einer vorgekühlten Aluminiumplatte, welche den Luftraum zwischen Mikrotiterplatte und Blechboden füllt, wird eine höhere Abkühlrate erreicht. Das schnellere und gleichmäßigere Abkühlen der 384-Well-Platte sollte sich in der Vitalität der Zellen und in einer geringeren Streuung der Werte widerspiegeln.

Dafür wurde eine an die 384-Well-Platte angepasste Aluminiumplatte angefertigt. Vor dem Einfrieren der 384-Well-Platte wurde diese bei -80 °C vorgekühlt. Die Zellen A549-NF κ B-SEAP wurden mit den Zellzahlen 5.000 c/w, 10.000 c/w und 20.000 c/w in 384-Well-Platten eingefroren. Bei der Überführung der 384-Well-Platten in den Gefrierschrank bei -80 °C , wurden die Mikrotiterplatten auf die Metallplatte gestellt. Im Vergleich dazu wurden weitere Platten direkt auf dem Blechboden eingefroren.

Zunächst wurde ermittelt, ob durch die verschiedenen Einfriermethoden sich Unterschiede in der Vitalität zeigen. Zur Ermittlung der Vitalität wurde der Resazurin Assay durchgeführt. Resazurin inkubierte hier für 5 h.

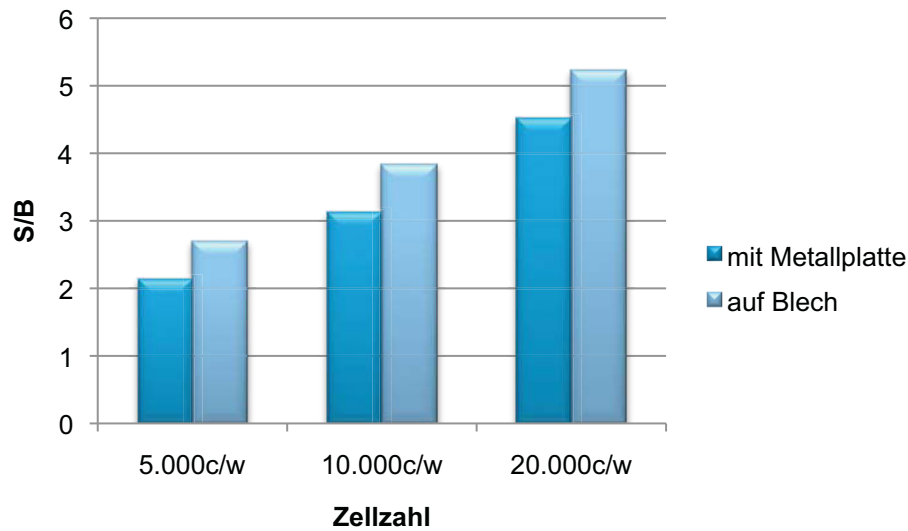


Abbildung 3-10: S/B-Werte kryokonservierter A549-NFκB-SEAP im Resazurin Assay

Die Zellen A549-NFκB-SEAP wurden mit 5.000 c/w, 10.000 c/w und 20.000 c/w kryokonserviert. Eingefroren wurden die Platten auf dem Blechboden und parallel dazu auf einer Metallplatte. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurde Resazurin zugefügt. Resazurin inkubierte für 5 h. Die Werte der vitalen Zellen wurden 18fach, die der Negativkontrollen 6fach bestimmt.

Tabelle 3-6: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter A549-NFκB-SEAP

Einfrier- methode	Zellzahl		MW [RFU]	SD [%]	S/B	Z
Metallplatte	5.000 c/w	Vital	29.998	24,6	2,14	-0,61
		Tot	14.045	8,2		
	10.000 c/w	Vital	41.873	39,2	3,12	-0,83
		Tot	15.128	6,9		
	20.000 c/w	Vital	57.888	38,8	4,51	-0,61
		Tot	12.185	13,0		
Blechboden	5.000 c/w	Vital	40.124	26,7	2,69	-0,42
		Tot	14.912	8,2		
	10.000 c/w	Vital	54.705	24,7	3,82	-0,08
		Tot	14.303	6,8		
	20.000 c/w	Vital	75.702	20,9	5,22	0,16
		Tot	14.513	8,5		

Die gemessenen Fluoreszenzsignale der vitalen Zellen erreichen bei Verwendung der Metallplatte nicht die Werte, welche durch Einfrieren auf dem Blechboden gemessen werden (Abbildung 3-10).

Durch Einfrieren auf dem Blechboden konnten höhere S/B-Werte als durch Einfrieren auf der Metallplatte erreicht werden. Die Streuung der Werte wird durch Einfrieren auf dem Blechboden tendenziell mit zunehmender Zellzahl geringer, durch Verwendung der Metallplatte wird dieser Effekt nicht erreicht (Tabelle 3-6).

Die Z-Faktoren sind bei beiden Einfrieremethoden negativ, wobei durch Einfrieren auf dem Blechboden die Z-Faktoren tendenziell höher sind. Nur mit 20.000 c/w, welche auf dem Blechboden eingefroren wurden, wird ein positiver Z-Faktor erreicht.

Die Verwendung der Aluminiumplatte beim Einfriervorgang sollte durch eine höhere Abkühlrate eine höhere Vitalität der Zellen und eine geringere Streuung der Messwerte bewirken. Das Einfrieren der 384-Well-Platte auf der Aluminiumplatte zeigte weder eine Verbesserung der Vitalität der Zellen noch eine Verringerung der Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten reproduziert werden. Die Erhöhung der Abkühlrate durch Verwendung dieser Aluminiumplatte hat sich als nachteilig erwiesen und wurde nicht weiter genutzt.

3.3 Optimierung des Einfriermediums

3.3.1 Kryokonservierung der Zellen CHO-CHRM1 in IP-One Stimulationspuffer

Das Protokoll zur Durchführung des IP-One Assays empfiehlt ein Anheften der Zellen CHO-CHRM1 über Nacht, sodass am darauffolgenden Tag das Kulturmedium durch den Stimulationspuffer aus dem Kit gewechselt werden kann. Eine Aussaat der Zellen direkt in Stimulationspuffer und anschließende Durchführung des Assays wie in 3.1.2 ist ebenso praktikierbar. Um den Mediumwechsel und somit die Inkubationszeit über Nacht auch mit den eingefrorenen Zellen in 384-Well-Platten zu umgehen, wurden die Zellen in Stimulationspuffer eingefroren.

Die Zusammensetzung des Kryomediums bestand im Wesentlichen aus dem Stimulationspuffer, wie er laut Assayvorschrift einzusetzen ist, welchem 5 % DMSO und 5 µg/ml Ascorbinsäure zugefügt wurde.

Vor der Verwendung wurde der Puffer steril filtriert (0,2 μm). Die Zellen wurden mit 5.000 c/w, 7.500 c/w und 20.000 c/w in eine weiße 384-Well-Platte ausgesät.

Nach dem Auftauen der Platte wurde zunächst die Vitalität im Resazurin Assay ermittelt. Die Platte inkubierte für 16 h mit Resazurin und konnte dann ausgelesen werden.

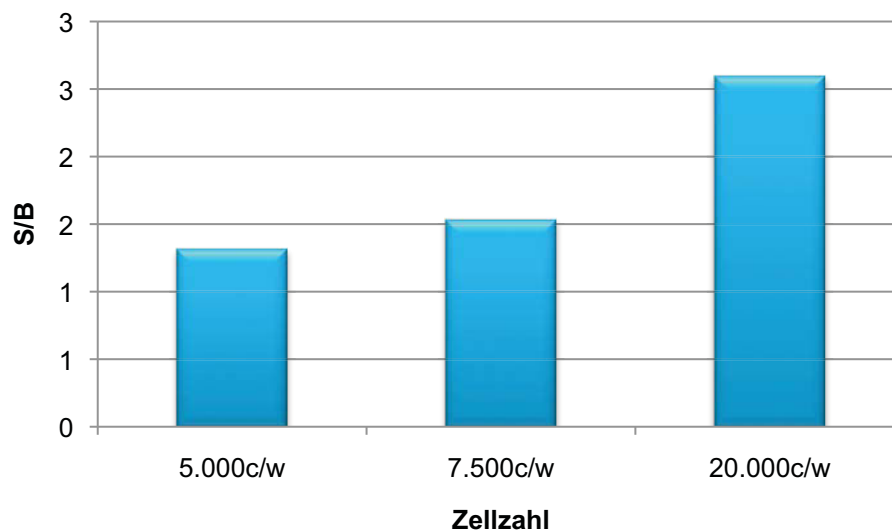


Abbildung 3-11: S/B-Werte kryokonservierter CHO-CHRM1, eingefroren in Stimulationspuffer, ermittelt im Resazurin Assay

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 5.000 c/w, 7.500 c/w und 20.000 c/w kryokonserviert. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurde Resazurin zugefügt. Resazurin inkubiert für 16 h. Aufgetragen ist das Verhältnis der Fluoreszenzsignale der vitalen Zellen zu denen der Totkontrolle (S/B). Die Bestimmung erfolgte 20fach.

Tabelle 3-7: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter CHO-CHRM1, eingefroren in Stimulationspuffer

Zellzahl		MW [RFU]	SD [%]	S/B	Z
5.000 c/w	Vital	27.363	17,1	1,31	-1,54
	Tot	20.932	3,7		
7.500 c/w	Vital	31.341	23,8	1,53	-1,41
	Tot	20.471	6,2		
20.000 c/w	Vital	56.342	24,5	2,59	-0,27
	Tot	21.792	3,8		

Die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Anzahl der Zellen im Well ist erkennbar (Abbildung 3-11). Somit erzeugt die höchste Zellzahl mit 20.000 c/w den höchste S/B-Wert (Tabelle 3-7). Jedoch sind die S/B-Werte trotz 16stündiger Inkubation mit Resazurin wesentlich geringer als bei der Durchführung des Resazurin Assays zur Zellzahloptimierung (siehe 3.1.3). Aufgrund der geringen Signalhöhe der vitalen Zellen und der hohen Streuung ergeben sich die jeweiligen Z-Faktoren nur im negativen Bereich.

Die geringe Vitalität der kryokonservierten CHO-CHRM1 in Stimulationspuffer veranlasste dazu, keine Untersuchung der Expression des M1-Rezeptors im IP-One Assay vorzunehmen.

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden in diesem Versuch in Stimulationspuffer kryokonserviert um nach dem Auftauvorgang sofort den IP-One Assay ohne Wechsel des Mediums durchführen zu können. Die Vitalität der Zellen leidet jedoch enorm unter der Verwendung dieser reduzierten Variante des Kryomediums. Das üblicherweise verwendete Kryomedium mit seinen vitalitätsfördernden Additiven kann demnach nicht ohne Weiteres ersetzt werden. Daher wurde versucht, das Kryomedium durch den Zusatz von Kryoprotektiva zu optimieren.

3.3.2 Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic auf die Zellen A549-NF κ B-SEAP

Pluronic ist ein nichtionisches Detergenz und vermag die Zellmembran zu stabilisieren. Es ist ein Polymer und damit so hochmolekular, dass es die Zellmembran nicht permeieren kann. Seine Wirkung entfaltet es im extrazellulären Raum und verringert dadurch schädigende Kräfte auf die Zellmembran.

Der Einfluss des Kryoprotektivums Pluronic im Kryomedium wurde getestet, indem die Zellen A549-NF κ B-SEAP parallel in Kryomedium wie zuvor und in Kryomedium mit zusätzlich 0,5 % Pluronic eingefroren wurden. Es wurden jeweils 10.000 c/w und 20.000 c/w eingefroren.

Die Durchführung des Resazurin Assays sollte die kryoprotektive Eigenschaft von Pluronic in Bezug auf die Vitalität aufzeigen.

Zur Durchführung des Assays wurde je eine Platte mit 0,5 % Pluronic und ohne Pluronic im Kryomedium aufgetaut. Am nächsten Tag wurde nach 4 h Inkubation mit Resazurin ausgelesen. Auf eine Totkontrolle wurde verzichtet.

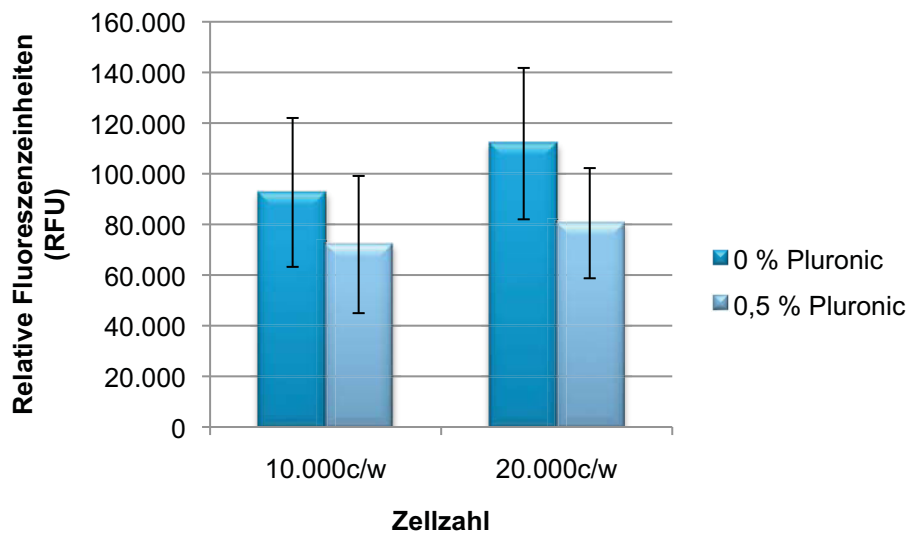


Abbildung 3-12: Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic auf kryokonservierte A549-NFκB-SEAP im Resazurin Assay

Die Zellen A549-NFκB-SEAP wurden mit 10.000 c/w und 20.000 c/w sowohl mit 0,5 % Pluronic als auch ohne Pluronic kryokonserviert. Nach dem Anheften der Zellen über Nacht wurde Resazurin zugefügt. Resazurin inkubierte für 4 h. Aufgetragen sind die Fluoreszenzsignale mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Werte wurden 33fach bestimmt.

Tabelle 3-8: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter A549-NFκB-SEAP, Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic

Zellzahl		MW [RFU]	SD [%]
10.000 c/w	0 % Pluronic	92.619	31,7
	0,5 % Pluronic	72.036	37,6
20.000 c/w	0 % Pluronic	111.886	26,7
	0,5 % Pluronic	80.475	27,0

Die Signalstärke der mit Pluronic kryokonservierten Zellen erreicht sowohl mit 10.000 c/w, als auch mit 20.000 c/w ca. 70 % der Signalstärke der ohne Pluronic kryokonservierten Zellen. Ebenso weisen die gemessenen Fluoreszenzsignale mit Pluronic im Medium eine größere Streuung auf als die Werte ohne Pluronic. In Bezug auf die Vitalität konnte mit Pluronic bei der Zelllinie A549-NFκB-SEAP kein Vorteil ermittelt werden.

Eine zusätzliche Durchführung des SEAP Assays sollte den Einfluss des Kryoprotektivums Pluronic auf die Stimulierbarkeit der Zellen aufzeigen. Dafür wurde jeweils eine Platte mit 0,5 % Pluronic und ohne Pluronic im Kryomedium aufgetaut. Parallel dazu wurden frische Zellen ausgesät. Stimuliert wurde direkt nach dem Auftauen mit der EC_{80} -Konzentration von $TNF\alpha$ in 12facher Bestimmung.

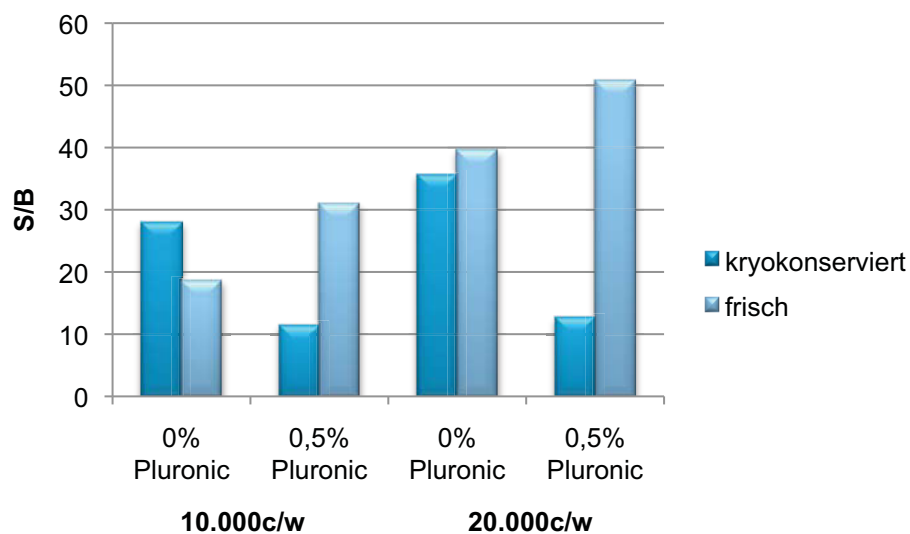


Abbildung 3-13: Darstellung der S/B-Werte frischer und kryokonservierter A549-NFκB-SEAP mit Pluronic im SEAP Assay

Die Zellen A549-NFκB-SEAP wurden mit 10.000 c/w und 20.000 c/w sowohl mit 0,5 % Pluronic als auch ohne Pluronic kryokonserviert. Nach dem Auftauen der Zellen wurden parallel dazu frische Zellen ausgesät und nach Anheften über Nacht mit der EC_{80} -Konzentration $1,16 \times 10^{-8}$ g/ml von $TNF\alpha$ stimuliert. Am darauffolgenden Tag wurde der SEAP Assay durchgeführt. Die Werte wurden 33fach bestimmt.

Tabelle 3-9: Auswertung des SEAP Assays kryokonservierter und frischer A549-NFkB-SEAP, Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic

Zellzahl			MW [RLU]	SD [%]	S/B	Z'	
10.000 c/w	0 % Pluronic	kryo-konserviert	stimuliert	47.607	41,3	27,89	-0,32
			unstimuliert	1.707	33,0		
		frisch	stimuliert	33.896	28,8	18,51	0,03
			unstimuliert	1.831	32,6		
	0,5 % Pluronic	kryo-konserviert	stimuliert	12.914	38,8	11,42	-0,88
			unstimuliert	1.131	25,0		
		frisch	stimuliert	33.250	18,7	30,84	-0,05
			unstimuliert	1.078	33,3		
20.000 c/w	0 % Pluronic	kryo-konserviert	stimuliert	43.748	24,0	35,58	0,24
			unstimuliert	1.231	23,5		
		frisch	stimuliert	53.274	6,8	39,55	0,77
			unstimuliert	1.347	22,6		
	0,5 % Pluronic	kryo-konserviert	stimuliert	14.752	43,3	12,6	-0,47
			unstimuliert	1.171	22,2		
		frisch	stimuliert	54.675	6,1	50,71	0,80
			unstimuliert	1.078	18,7		

Die Durchführung des SEAP Assays sollte zeigen, ob Pluronic sich auf die Stimulierbarkeit auswirkt. Werden die S/B-Werte betrachtet, zeigt sich eine unterschiedliche Wirkung von Pluronic auf kryokonservierte und frische Zellen (Abbildung 3-13). Die kryokonservierten Zellen reagieren auf Pluronic im Kryomedium bei beiden Zellzahlen mit einem deutlich verringerten S/B-Wert. Ein umgekehrter Effekt kann hingegen bei den frischen Zellen beobachtet werden. Dort kann durch Pluronic der S/B-Wert jeweils gesteigert werden.

Vergleicht man die Höhe der gemessenen Lumineszenzsignale, sind die der frischen stimulierten Zellen mit und ohne Pluronic bei der jeweiligen Zellzahl gleich stark (Tabelle 3-9). Hier wirkt sich demnach Pluronic nicht aus. Bei den kryokonservierten stimulierten Zellen kann mit Pluronic im Kryomedium nur ca. ein Drittel des Lumineszenzsignals der ohne Pluronic kryokonservierten Zellen erreicht werden.

Die Streuung der Signale zeigt keine Verringerung durch den Einsatz von Pluronic. Diese sind sowohl bei frischen als auch kryokonservierten Zellen relativ hoch. Die breite Streuung der Werte spiegelt sich in den Z'-Faktoren wider. Nur mit frischen 20.000 c/w wird ein exzellenter Z'-Faktor erreicht. Mit frischen 10.000 c/w ist die Streuung so hoch, dass ein Z'-Faktor um 0 erreicht werden kann.

Pluronic konnte im Vergleich zu frischen Zellen keine Verbesserung der Parameter erzielen. Die Signale der kryokonservierten Zellen mit Pluronic sind deutlich geringer als die kryokonservierten Zellen im Vergleichsmedium. Pluronic ist demnach als Kryoprotektivum in Verbindung mit der Durchführung des SEAP Assays nicht geeignet.

3.3.3 Auswirkungen des Kryoprotektivums Pluronic auf die Zellen CHO-CHRM1

Das Kryoprotektivum Pluronic wurde ebenfalls mit den Zellen CHO-CHRM1 getestet. Dafür wurden diese mit 10.000 c/w und 20.000 c/w in Kryomedium mit 0,5 % Pluronic und vergleichsweise dazu ohne Pluronic im Kryomedium eingefroren.

Zum Vergleich der Vitalitäten der Zellen, welche in Kryomedium mit 0,5 % Pluronic und ohne Pluronic eingefroren wurden, wurde jeweils eine Platte aufgetaut. Es wurden keine Negativkontrollen mitgeführt und jeweils 40fach bestimmt. Nach Zugabe von Resazurin konnte nach 4 h Inkubationszeit ausgelesen werden.

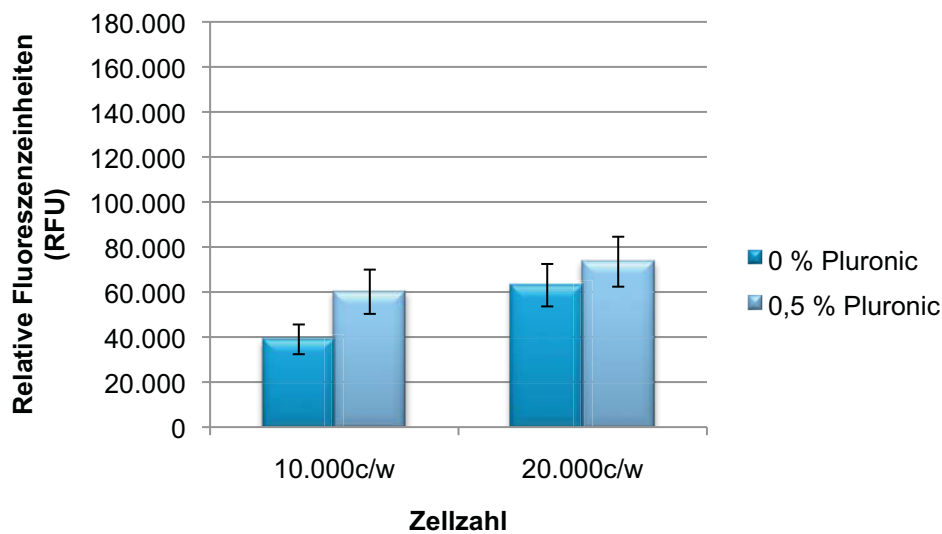


Abbildung 3-14: Vergleich der Vitalitäten kryokonservierter CHO-CHRM1, eingefroren mit 0 % und mit 0,5 % Pluronic im Resazurin Assay

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 10.000 c/w und 20.000 c/w sowohl mit 0,5 % Pluronic als auch ohne Pluronic kryokonserviert. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurde Resazurin zugefügt. Resazurin inkubierte für 4 h. Die Werte wurden 40fach bestimmt.

Tabelle 3-10: Auswertung des Resazurin Assays kryokonservierter CHO-CHRM1, mit 0 % und 0,5 % Pluronic

Zellzahl		MW [RFU]	SD [%]
10.000 c/w	0 % Pluronic	38.984	16,9
	0,5 % Pluronic	60.122	16,4
20.000 c/w	0 % Pluronic	63.034	15,0
	0,5 % Pluronic	73.467	15,1

Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind mit 0,5 % Pluronic im Kryomedium deutlich höher als ohne Zusatz des Kryoprotektivums (Abbildung 3-14). Die Streuung der Messwerte konnte jedoch durch Pluronic nicht eingedämmt werden (Tabelle 3-10). Diese bewegen sich mit maximal 16,9 % und minimal 15,0 % alle im selben Bereich.

Inwieweit Pluronic die Stimulierbarkeit der CHO-CHRM1 beeinflusst oder ob eine Störung im Assay stattfindet, wurde im IP-One Assay ermittelt. Hierfür wurde jeweils eine 384-Well-Platte mit 0,5 % und zum Vergleich eine Platte ohne Pluronic im Kryomedium aufgetaut. Parallel dazu wurden frische Zellen mit selber Zellzahl ebenfalls mit 0,5 % und ohne Pluronic ausgesät.

Mit den kryokonservierten Zellen wurde eine 40fache Bestimmung und mit frischen Zellen eine 5fache Bestimmung durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde mit Carbachol in der EC_{80} -Konzentration von $9,1 \times 10^{-6}$ mol/l stimuliert. Anschließend wurde der IP-One Assay durchgeführt.

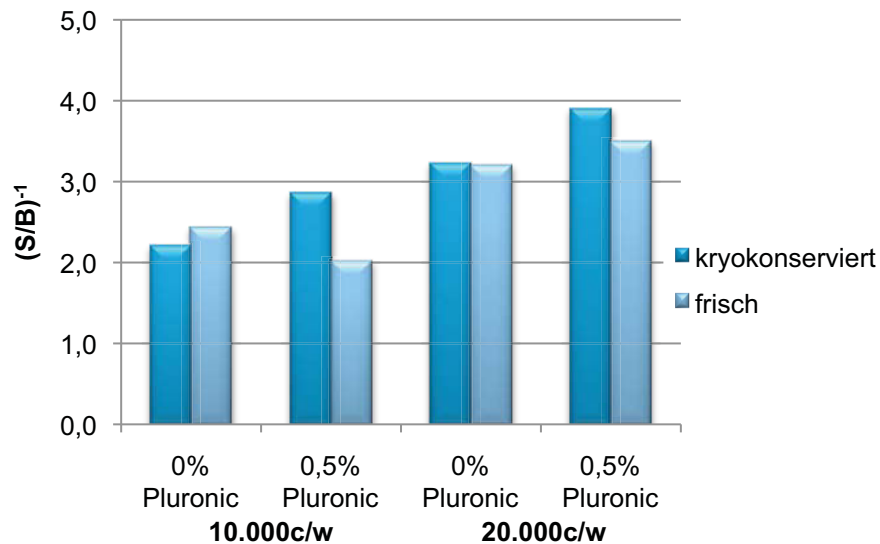


Abbildung 3-15: $(S/B)^{-1}$ -Werte kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1 im IP-One Assay, mit 0 % und 0,5 % Pluronic

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 10.000 c/w und 20.000 c/w, sowohl mit 0,5% als auch ohne Pluronic kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden frische Zellen parallel dazu ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen über Nacht wurde mit der EC_{80} -Konzentration $9,1 \times 10^{-6}$ mol/l von Carbachol stimuliert und anschließend der IP-One Assay durchgeführt. Aufgetragen sind die Verhältnisse der Fluoreszenzverhältnisse der stimulierten Zellen zu denen der unstimulierten Zellen $(S/B)^{-1}$. Die Bestimmung erfolgte 40fach.

Tabelle 3-11: Auswertung des IP-One Assays kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1, mit 0 % und 0,5 % Pluronic

Zellzahl			RFU (665/620)nm $\times 10^4$	SD [%]	$(S/B)^{-1}$	Z'
10.000 c/w	0 % Pluronic	kryo-konserviert unstimuliert	14.695	3,4	2,21	0,57
		stimuliert	6.664	9,9		
	frisch	unstimuliert	12.814	2,1	2,42	0,85
		stimuliert	5.294	2,0		
	0,5 % Pluronic	kryo-konserviert unstimuliert	15.233	3,2	2,85	0,70
		stimuliert	5.343	9,2		
frisch	unstimuliert	11.750	4,1	2,02	0,66	
	stimuliert	5.827	3,3			
20.000 c/w	0 % Pluronic	kryo-konserviert unstimuliert	13.210	6,2	3,22	0,54
		stimuliert	4.100	14,4		
	frisch	unstimuliert	11.818	1,8	3,20	0,90
		stimuliert	3.690	1,8		
	0,5 % Pluronic	kryo-konserviert unstimuliert	13.114	2,3	3,89	0,82
		stimuliert	3.370	8,4		
frisch	unstimuliert	13.874	1,2	3,49	0,91	
	stimuliert	3.976	2,8			

Der Effekt von Pluronic, welches als Kryoprotektivum eingesetzt wurde, wurde im IP-One Assay untersucht. Werden die $(S/B)^{-1}$ -Werte betrachtet, werden diese bei den kryokonservierten Zellen durch Pluronic jeweils erhöht. Mit frischen Zellen tritt dieser Effekt nur bei 20.000 c/w auf (Abbildung 3-15). Die Streuung der Fluoreszenzverhältnisse ist sowohl bei frischen als auch kryokonservierten beinahe durchweg unter 10 % (Tabelle 3-11). Eine Verringerung der Standardabweichungen kann bei dieser geringen Streuweite nicht beobachtet werden. Die Z'-Faktoren fallen daher sowohl bei frischen, als auch bei kryokonservierten Zellen exzellent aus. Pluronic zeigt hier nur bei den kryokonservierten Zellen eine Erhöhung des Z'-Faktors.

In Bezug auf die Vitalität konnte die kryoprotektive Eigenschaft von Pluronic nicht reproduziert werden. Daher wurde das Kryoprotektivum Methylcellulose als Zusatz getestet.

3.3.4 Auswirkungen des Kryoprotektivums Methylcellulose auf CHO-CHRM1

Ein weiteres Kryoprotektivum ist Methylcellulose. Es zählt zu den nicht penetrierenden Kryoprotektiva, da es als Makromolekül außerhalb der Zellen verbleibt und dort schützend wirken soll. Seine Eigenschaft als Verdickungsmittel durch Wasserbindung wurde durch Zusatz zum Kryomedium getestet.

Um dessen Einfluss auf die Zellen CHO-CHRM1 bei der Kryokonservierung zu untersuchen, wurden diese mit 10.000 c/w in 384-Well-Platten eingefroren. Methylcellulose wurde in den Konzentrationen 0 %, 1 % und 3 % als Zusatz im Kryomedium verwendet.

Zur Ermittlung der Vitalität der kryokonservierten Zellen nach dem Auftauen wurde ein Resazurin Assay durchgeführt. Resazurin inkubierte hierbei für 5,5 h und es wurden keine Negativkontrollen mitgeführt.

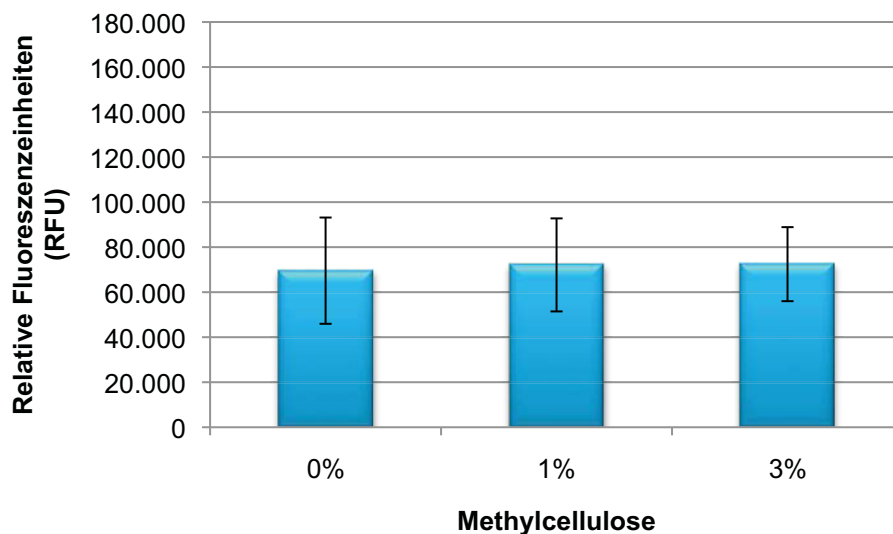


Abbildung 3-16: Resazurin Assay mit kryokonservierten CHO-CHRM1, Vergleich verschiedener Konzentrationen Methylcellulose im Kryomedium

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 10.000 c/w und mit 0 %, 1 % und 3 % Methylcellulose kryokonserviert. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurde Resazurin zugefügt. Resazurin inkubiert für 5,5 h. Die Werte wurden 30fach bestimmt.

Tabelle 3-12: Auswertung des Resazurin Assays mit kryokonservierten CHO-CHRM1 und Methylcellulose

Methylcellulose	MW [RFU]	SD [%]
0 %	69.547	33,9
1 %	72.111	28,7
3 %	72.443	22,7

Die Durchführung des Resazurin Assays hat gezeigt, dass durch den Zusatz von Methylcellulose keine wesentlichen Vitalitätsvorteile ermittelt werden konnten (Abbildung 3-16). Die Fluoreszenzsignale unterscheiden sich nur marginal (Tabelle 3-12). Jedoch wird die Streuung der Messwerte durch Erhöhung des Anteils an Methylcellulose verringert.

Ob Methylcellulose sich auf die Stimulierbarkeit der Zellen CHO-CHRM1 auswirkt, wurde im IP-One Assay überprüft. Um den Vergleich zu frischen Zellen zu ziehen, wurden diese in gleicher Zellzahl ausgesät. Die Zellen wurden mit Carbachol in den Konzentrationen $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l für eine Dosis-Wirkungs-Kurve stimuliert.

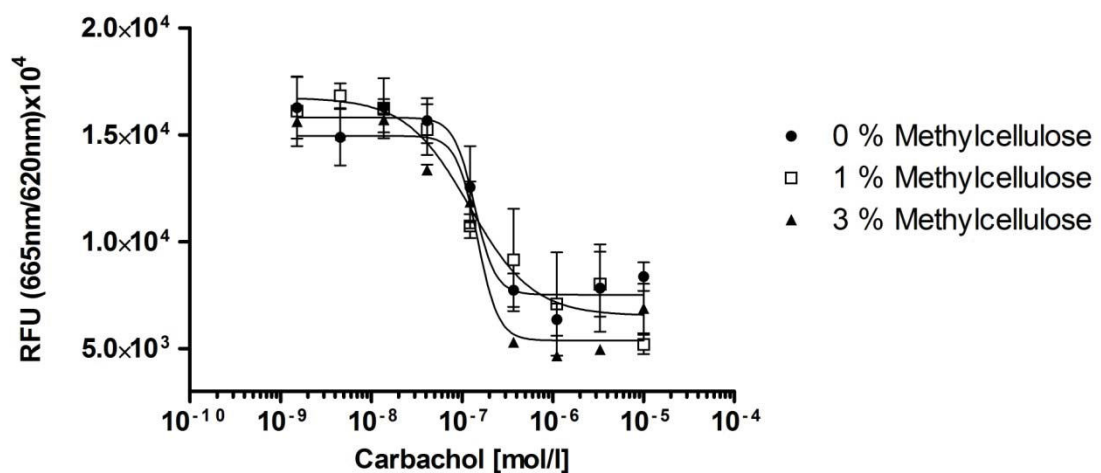


Abbildung 3-17: Dosis-Wirkungs-Kurven kryokonservierter CHO-CHRM1 mit Methylcellulose im Kryomedium

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden mit 10.000 c/w und 0 %, 1 % und 3 % Methylcellulose kryokonserviert. Nach dem Auftauen und Anheften der Zellen über Nacht wurde mit Carbachol zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve von $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l stimuliert und anschließend der IP-One Assay durchgeführt. Die Werte wurden jeweils 3fach bestimmt.

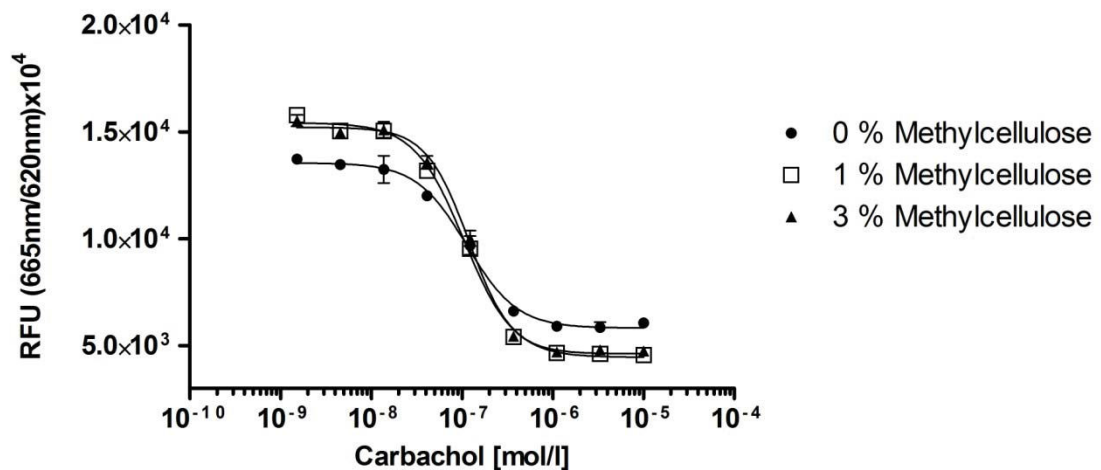


Abbildung 3-18: Dosis-Wirkungs-Kurven frischer CHO-CHRM1 mit Methylcellulose im Medium

Die Zellen CHO-CHRM1 wurden frisch mit 10.000 c/w und 0 %, 1 % und 3 % Methylcellulose ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen über Nacht wurde mit Carbachol zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve von $1,00 \times 10^{-5}$ mol/l bis $1,52 \times 10^{-9}$ mol/l stimuliert und anschließend der IP-One Assay durchgeführt. Die Werte wurden jeweils 2fach bestimmt.

Tabelle 3-13: Auswertung des IP-One Assays kryokonservierter und frischer CHO-CHRM1 mit Methylcellulose im Medium

Methylcellulose			RFU (665nm/620nm)x10 ⁴	(S/B) ⁻¹	EC ₅₀ [mol/l]	Z'
0 %	kryo-konserviert	Top	15.808	2,09	1,37x10 ⁻⁷	0,20
		Bottom	7.533			
	frisch	Top	13.560	2,32		
		Bottom	5.828			
1 %	kryo-konserviert	Top	16.746	2,55		
		Bottom	6.550			
	frisch	Top	15.425	3,46	1,05x10 ⁻⁷	0,90
		Bottom	4.457			
3 %	kryo-konserviert	Top	14.964	2,77		
		Bottom	5.385			
	frisch	Top	15.213	3,30	1,18x10 ⁻⁷	0,87
		Bottom	4.628			

Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven der frischen CHO-CHRM1 ist zu erkennen, dass Methylcellulose einen wesentlichen Einfluss auf die Stimulierbarkeit hat (Abbildung 3-18). Durch den Zusatz von Methylcellulose wird das Maximalsignal erhöht und das Minimalsignal verringert.

Dieser Effekt ist aufgrund der höheren Schwankungen der Werte bei den kryokonservierten Zellen anhand der Abbildung nicht zu erkennen (Abbildung 3-17). Werden die Fluoreszenzsignale betrachtet, sind diese mit frischen Zellen im stimulierten Bereich geringer als mit gefrorenen Zellen (Tabelle 3-13). Dies spricht für einen geringen Verlust der Stimulierbarkeit der kryokonservierten Zellen, da sie weniger zelluläres IP-One bildeten als die frischen Zellen. Durch eine höhere Konzentration an zellulärem IP-One wird das fluoreszenzliefernde d2-gekoppelte IP-One von der Antikörper-Bindungsstelle verdrängt und es kann so kein Fluoreszenzsignal entstehen. Der $(S/B)^{-1}$ -Wert wird durch die Zugabe von Methylcellulose eindeutig vergrößert. Diese Wirkung tritt bei den frischen CHO-CHRM1 wieder deutlicher hervor. Der Z'-Faktor nimmt bei den kryokonservierten Zellen mit der Zunahme an Methylcellulose im Kryomedium ebenso zu und erreicht sogar einen exzellenten Wert von 0,78 mit 3 % Methylcellulose. Der Z'-Faktor der frischen Zellen ist durchweg über 0,8. Der EC_{50} -Wert wird durch den Zusatz an Methylcellulose nicht beeinflusst, die Sensitivität bleibt daher durch den Zusatz des Kryoprotektivums voll erhalten. Jedoch zeigt sich auch hier, dass die Zellen durch die Kryokonservierung geringfügig an Sensitivität verloren haben.

Der Versuch hat gezeigt, dass durch den Zusatz an Methylcellulose im Kryomedium die Expression des M1-Rezeptors deutlich gesteigert werden kann.

4 Diskussion

Das Screening pharmakologischer Substanzen wird vermehrt an Primärzellen und an permanenten Zelllinien durchgeführt. In dieser Phase der Wirkstofffindung werden die Toxizität und das Eingreifen des Wirkstoffes in die Signaltransduktion ermittelt. Die Masse an potentiellen Substanzen lässt sich nur durch automatisierte Durchführung der Assays mittels Robotersystemen handhaben. Das High-Throughput-Screening erfordert jedoch die ständige Bereitstellung ausreichender Zellmengen. Während der Kultivierung der Zellen können Kontaminationen drohen und sich minimale Veränderungen auf den Assay auswirken.

Eine wesentliche Erleichterung ist hierfür die Kryokonservierung der Zellen in Mikrotiterplatten. Die jeweilige Zelllinie wird in definierter Zellzahl bei -80 °C kryokonserviert und ermöglicht eine Durchführung des funktionalen Assays ohne weitere Kultivierungsschritte und damit in wesentlich kürzerer Zeit.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, die Kryokonservierung anhand der Zelllinien A549-NF κ B-SEAP und CHO-CHRM1 in 384-Well-Platten zu etablieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen eine Optimierung des Einfriervorgangs, zum anderen eine Verbesserung der Zusammensetzung des Kryomediums erarbeitet. Hierbei war die Gewährleistung der Zellvitalität und der Zellfunktionalität von größter Bedeutung.

Die Zellen werden während des Herunterkühlens auf -80 °C hohen Belastungen ausgesetzt. Die intrazelluläre und extrazelluläre Eiskristallbildung, sowie die veränderten Konzentrationsverhältnisse wirken enorm auf die Zelle ein. Je nach Robustheit der Zelle verliert sie nach dem Auftauen an Vitalität und somit Stimulierbarkeit. Es wurden daher noch vor der Kryokonservierung die Assaybedingungen überprüft. Nachteilige Faktoren fallen mit frischen Zellen weniger ins Gewicht, wirken sich jedoch wesentlich auf die durch die Kryokonservierung gestresste Zelle aus.

Die Zelllinie A549-NF κ B-SEAP wird mit 2 % dialysiertem Serum kultiviert und ist durch die reduzierte Konzentration an Serum im Kulturmedium eher anfällig für veränderte äußere Einflüsse. Die Qualität des Serums wirkt sich hier direkt auf die Assayqualität aus. Da dialysiertes Serum für die Kultivierung verwendet wird, werden weitere Wachstumsfaktoren eliminiert, die eine Vorstimulation der Zellen verursachen würden. Der Vergleich von dialysierten Seren unterschiedlicher Hersteller sollte einen eventuellen Unterschied aufzeigen. Ein Unterschied durch die Seren wurde in der Morphologie beobachtet, eine Durchführung des SEAP Assays untermauerte diese Vermutung. Mit Serum des Herstellers PAA wurde wesentlich mehr sekretierte alkalische Phosphatasen gemessen als mit dialysiertem Serum des Herstellers Sigma. Die Testung verschiedener Seren unterschiedlicher Chargen ist demnach unerlässlich, bevor Zellen kryokonserviert werden. Der Einfluss des Serums und damit die direkte Abhängigkeit der Qualität des Assays werden immer problematisch sein, solange Produkte natürlichen Ursprungs verwendet werden. Eine Alternative würde hier die Verwendung eines serumfreien und chemisch definierten Mediums sein.

Nicht nur die Bedingungen der Zellen galt es zu überprüfen, sondern auch das für einen Assay verwendete Material. Die Messung der Fluoreszenz als Resultat eines Bioassays wird in weißen Mikrotiterplatten vollzogen. In klaren Platten würde zuviel des Fluoreszenzsignals durch die Wandung verloren gehen, des Weiteren würde das Fluoreszenzsignal der benachbarten Wells stören. Die mikroskopische Kontrolle der in der Mikrotiterplatte ausgesäten Zellen ist zur morphologischen Beurteilung notwendig und kann nur parallel dazu in klaren Platten erfolgen. Die Verwendung der weißen *clear bottom* Platten würde die Messung der Fluoreszenz zusammen mit einer mikroskopischen Kontrolle ermöglichen. Durch die klare Bodenplatte verringert sich die Fluoreszenz und kann so nicht vollständig detektiert werden. Wie groß dieser Verlust ist, wurde mit den Zellen CHO-CHRM1 im IP-One Assay getestet. Wie erwartet ist das Fluoreszenzsignal, welches in der weißen *clear bottom* Platte detektiert wurde, schwächer als das der weißen Vergleichsplatte. Einen Einfluss auf die Sensitivität hat das geringere Fluoreszenzsignal nicht, wohingegen der $(S/B)^{-1}$ -Wert deutlich geringer ausfällt.

Gravierender ist, dass durch den Verlust der Fluoreszenz die Messwerte weniger streuen. Im durchgeführten Assay wird durch die Verwendung der weißen *clear bottom* Platte durch diesen Verlust ein exzellenter Z'-Faktor erreicht. Dies hat zur Folge, dass eine Qualität des durchgeführten Assays vorgetäuscht wird, welche real nicht vorhanden ist. Im Falle der Kryokonservierung ist dies nicht zu tolerieren. Hier muss die Expression des M1-Rezeptors in vollem Maße detektierbar sein, um geringe Veränderungen beobachten zu können. In diesem Versuch hat sich erwiesen, dass die weißen *clear bottom* Platten für die Kryokonservierung theoretisch eine Lösung darstellen, bei der Entwicklung jedoch nachteilig sind. Für spätere etablierte Verfahren und wenn die Quantität der Stimulierbarkeit weniger im Vordergrund steht, ist die Verwendung dieser *clear bottom* Platten durchaus vorstellbar.

Die Bedingungen zur Durchführung der funktionellen Assays nach dem Auftauen der Zellen wurden überprüft und waren somit geeignet für die Kryokonservierung der Zellen. Es hat sich bewährt, die Zellen in 15 µl Kryomedium je Well einzufrieren. Ausschlaggebend war, dass das DMSO-haltige Kryomedium nach dem Auftauen ausreichend mit Medium verdünnt werden kann. Für die Verdünnung des Kryomediums sollte soviel Raum wie möglich zur Verfügung stehen. Andererseits sollte die Zellsuspension den Boden des Wells vollständig benetzen, damit die Zellen im Well eine möglichst gleichmäßige Abkühlung durch den Bodenkontakt erfahren. Nach dem Auftauen der Zellen könnten sie außerdem direkt anheften. Dies wurde jedoch durch die Zugabe des Auftaumediums OptiMEM verhindert. Die Zugabe spülte die Zellen an die Ränder der Wells. Durch Schütteln auf dem Plattenschüttler konnte die ungleichmäßige Verteilung der Zellen im Well nicht erreicht werden. Die Geometrie der Wells einer 384-Well-Platte ist so ungünstig, dass derartige Kapillarkräfte aufgebaut werden, welche eine Durchmischung der Zellen verhindern. Eine Lösung für dieses Problem wurde gefunden, indem die Geschwindigkeit beim Zupipettieren von OptiMEM nach dem Auftauvorgang auf ein Minimum gestellt wurde. Dies war ausreichend um die Verteilung der Zellen im Well, wie sie während der Kryokonservierung war, beizubehalten. Diese Art des Zupipettierens ist für die manuelle Durchführung nicht probat.

Durch die Verlangsamung des Pipettierens ist die Zeitspanne zwischen den ersten und letzten Wells einer Platte zu groß, sodass die zytotoxische Wirkung des hohen Gehaltes an DMSO greifen würde und die Vergleichbarkeit hinfällig wäre. Für die Versuche dieser Arbeit wurde weiterhin normal zupipettiert, ohne die Geschwindigkeit zu verringern. Eine Automatisierung dieses Schrittes würde die langsame Zugabe von Medium ermöglichen, da die ganze Platte gleichzeitig bearbeitet werden könnte. Somit wäre die Vergleichbarkeit der Wells untereinander gewährleistet.

Ein weiterer Parameter, der für eine Optimierung der Zellen für die Kryokonservierung ausgetestet wurde, war die Kryokonservierung einer geeigneten Zellzahl im Well. Je mehr Zellen vorhanden sind, desto höher wird das zu detektierende Signal. Wie sich die Zellzahl im Vergleich zur Vitalität und der Stimulierbarkeit verhält, wurde mit den Zellen CHO-CHRM1 getestet. Es zeigte sich, dass mit Zunahme der Zellzahl sich die S/B-Werte sowohl bei der Vitalität als auch der Stimulierbarkeit vergrößern. Die Höhe der Fluoreszenzsignale war jedoch keineswegs proportional zur Zellzahl. Mit der 4fachen Menge an Zellen konnte im Resazurin Assay nur eine 1,6fache Steigerung des Fluoreszenzsignals erreicht werden. Im IP-One Assay konnte der $(S/B)^{-1}$ -Wert mit der 4fachen Menge an Zellen ebenfalls nur um den Faktor 1,6 vergrößert werden. Die mikroskopische Überprüfung zeigte, dass der Zellrasen bereits mit 10.000 c/w konfluent ist. Unnötig viele Zellen im Well begünstigen zwar die Signalhöhe, es muss aber der Einsatz eines Vielfachen an Zellen im Vergleich zum Nutzen abgewägt werden.

Tendenziell sind für die Durchführung zellbasierter Assays weniger Zellen als 10.000 c/w ausreichend, wenn frische Zellen verwendet werden. Bis zu welcher Zellzahl die kryokonservierten Zellen im Well reduziert werden können, wurde durch die Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve im IP-One Assay ermittelt. Dies zeigte, dass mit weniger als 10.000 c/w nach der Kryokonservierung die Ergebnisse unzuverlässig wurden. Es wird eine teilweise zu hohe Streuung der Messwerte erreicht, wohingegen mit frischen Zellen ein noch durchführbares Ergebnis erzielt wurde. Um die Streuung der Messwerte einzudämmen, könnte die Anzahl der Replika erhöht werden. Dies würde jedoch einen erhöhten Verbrauch an Substanzen bedeuten.

Für die Kryokonservierung der Zellen ist es daher von Vorteil mehr Zellen pro Well einzufrieren, als für einen frischen Assay verwendet werden würde, um die Streuung der Werte so zu minimieren. Für die Entwicklung der kryokonservierten Zellen in 384-Well-Platten wurden daher die Zellzahlen 10.000 c/w und 20.000 c/w als geeignet erachtet.

Die Vitalität der Zellen nach der Kryokonservierung ist von entscheidender Wichtigkeit, da von dieser die Qualität der Ergebnisse in einem funktionalen Assay abhängt. Während des Abkühlens auf -80 °C wird die Zelle hohen Belastungen ausgesetzt, wobei sich sowohl die Zelle als auch und ihre Umgebung enorm verändert. Einen Einfluss auf diese komplex verlaufenden Prozesse hat dabei die Abkühlrate. Werden größere Zellmengen für die Langzeitlagerung in einem Röhrchen eingefroren, werden diese mit -1 °C/min abgekühlt. Hier spielt die Einhaltung dieser Geschwindigkeit aufgrund des größeren Volumens der Probe eine wichtige Rolle. Bei der Kryokonservierung von Zellen in Multiwellplatten hat es sich bewährt, die Platten direkt auf den -80 °C temperierten Blechboden des Gefrierschranks zu stellen. Das geringere Flüssigkeitsvolumen wird dadurch wesentlich schneller auf Lagertemperatur gebracht. Je höher die Abkühlrate gewählt wird, desto eher wird dem übermäßigen Wachstum großer Eiskristalle entgegengewirkt.

Die 384-Well-Platten besitzen aufgrund ihrer Bauweise einen äußeren Stehrand, der unter den Wells die Bildung einer Isolationsschicht aus Luft verursacht. Diese isolierende Schicht wirkt durch den indirekten Kontakt der Platte mit dem Untergrund verlangsamend auf den Kälte transport vom -80 °C temperierten Untergrund auf das Polypropylen der Mikrotiterplatte und letztlich auf die Flüssigkeit. Um diese Isolationsschicht zu entfernen und damit den Kälteübergang zu beschleunigen, wurde die 384-Well-Platte auf eine Art Podest gestellt. Dieses Podest bestehend aus einer auf die 384-Well-Platte maßangefertigte Aluminiumplatte und wurde vor der Kryokonservierung der Zellen auf -80 °C vorgekühlt. Eine damit beschleunigte Abkühlrate sollte sich in einer erhöhten Vitalität der Zellen widerspiegeln. Die kryokonservierten Zellen A549-NF κ B-SEAP zeigten durch die beschleunigte Abkühlrate keine erhöhte Vitalität. Durch die Verwendung der Metallplatte wurde ein wesentlicher Vitalitätsverlust der Zellen nach dem Auftauen verursacht.

Dieser Versuch zeigte, wie gravierend sich eine Veränderung der Abkühlrate auf die Vitalität der Zellen nach der Kryokonservierung auswirkt. Da die verschiedenen Zellen individuell auf osmotische Bedingungen reagieren, müsste für jede Zelllinie ein eigenes Einfrierprotokoll empirisch entwickelt werden, womit die Vitalität auch empfindlichster Zellen erhöht werden könnte. Dies lässt sich nur mit der Verwendung eines Einfrierautomaten realisieren. Durch die programmgesteuerte Abkühlung im Automat kann ein individuell angepasster Einfriervorgang ermöglicht werden. Durch die Erhöhung Vitalität aufgrund eines optimierten Einfriervorganges könnte die Verwendung von Gefrierschutzmitteln wie DMSO vermieden werden.

[Ross-Rodriguez et al., 2010]

Der Einfriervorgang konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht verändert werden, daher wurde der Fokus auf die Zusammensetzung des Kryomediums gerichtet. Die Zellen werden in einem Medium eingefroren, dessen Zusammensetzung auf der des Kulturmediums beruht, dem kryoprotektives DMSO und antioxidativ wirkende Ascorbinsäure zugesetzt wurde. Wichtig für die Entwicklung der Kryokonservierung war, dass der Assay direkt in den Platten durchgeführt werden kann.

Im Falle des IP-One Assays mit den Zellen CHO-CHRM1 muss zur Durchführung des Assays das Medium gegen Stimulationspuffer ausgetauscht werden. Dieser Austausch kann umgangen werden, indem frische Zellen direkt in Stimulationspuffer ausgesät werden. Für die Kryokonservierung der Zellen, wurde getestet, ob Stimulationspuffer als Grundlage für das Kryomedium auch geeignet wäre. Die Vitalität der kryokonservierten Zellen CHO-CHRM1 nach dem Auftauen fiel so schlecht aus, dass teilweise kaum höhere Signale als die der Totkontrolle erreicht wurden. Dies zeigte, dass das Kulturmedium als Kryomedium die wesentlich bessere Wahl ist, mit der die Zellen den schädigenden Prozess der Kryokonservierung deutlich vitaler überstehen.

Aufgrund der Ergebnisse wurde versucht die Zusammensetzung des Kryomediums weiter zu optimieren. Dazu wurde die kryoprotektive Eigenschaft des Detergenz Pluronic getestet. Bei Fermentierungen wird diese Substanz eingesetzt, um den Scherstress auf die Zellen zu vermindern und die Zellwand zu stabilisieren.

Die Auswirkungen von Pluronic wurden sowohl mit den Zellen A549-NF κ B-SEAP als auch mit CHO-CHRM1 getestet und zeigten jeweils unterschiedliche Ergebnisse.

In Bezug auf die Vitalität waren die Zellen A549-NF κ B-SEAP mit Pluronic im Kryomedium deutlich weniger vital als die Zellen des Vergleichsmediums ohne Pluronic. Das Detergenz hat das Kryomedium zum Nachteil für die Zellen verändert. Im SEAP-Assay zeigten die kryokonservierten im Vergleich zu den frischen Zellen unterschiedliche Ergebnisse. Mit kryokonservierten Zellen und Pluronic im Kryomedium wurde eine wesentlich geringere Konzentration an sekretierter alkalischer Phosphatase im Überstand ermittelt, als mit kryokonservierten Zellen, die kein Pluronic enthielten. Mit frischen Zellen wurde zwar der S/B-Wert durch Pluronic erhöht, jedoch wurde dies durch Verringerung des Hintergrundsignals erreicht. Die absolute Menge an sekretierter alkalischer Phosphatase wird durch Pluronic nicht beeinflusst.

Die genaue Wirkung von Pluronic auf die Zellen ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass Pluronic eine leicht toxische Wirkung hat und an die Zellmembran adsorbiert. Bei ausreichend langer Exposition wird Pluronic sogar in diese inkorporiert. Durch diese Inkorporation wird die Festigkeit der Zellmembran deutlich verändert [Zhang et al., 1992]. Diese Veränderung durch Pluronic in Zusammenhang mit den Belastungen der Kryokonservierung wirkt sich demnach negativ auf die Sekretion der alkalischen Phosphatase aus. Für die Kryokonservierung der Zellen A549-NF κ B-SEAP ist Pluronic aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht geeignet.

Die protektive Wirkung von Pluronic wurde ebenfalls anhand der Zellen CHO-CHRM1 getestet. Hier zeigten die Zellen nach dem Auftauen durch Pluronic eine deutlich höhere Vitalität als die kryokonservierten Vergleichszellen ohne Pluronic. Ob die höhere Vitalität auch in einer erhöhten Stimulierbarkeit resultiert, wurde im IP-One Assay ermittelt. Hier zeigt sich durch den Zusatz an Pluronic einer Erhöhung der $(S/B)^{-1}$ -Werte bei den kryokonservierten Zellen. Bei den frischen Zellen wird die Wirkung von Pluronic nicht in dem Maße deutlich und zeigt auch keinen eindeutigen Trend.

Wird die Höhe der Fluoreszenzsignale betrachtet, zeigt sich durch Pluronic eine geringfügig höhere Expression des M1-Rezeptors. Die frischen Zellen zeigen diese vermehrte Expression durch Pluronic nicht.

Sowohl in Bezug auf die Vitalität als auch auf die Stimulierbarkeit spricht die Zelllinie CHO-CHRM1 positiv auf das Detergenz Pluronic an. Zur Ermittlung der Menge an gebildetem IP1 als Maß für die Stimulierbarkeit werden die Zellen CHO-CHRM1 im funktionellen Assay im Gegensatz zu den Zellen A549-NF κ B-SEAP lysiert. Das gebildete IP1 befindet sich im intrazellulären Raum und muss zur Detektion nicht sekretiert werden. Die Veränderung der Zellwand durch Pluronic kann demnach erfolgen, ohne die Bildung an IP1 negativ zu beeinflussen. Pluronic müsste noch weiter in verschiedenen Konzentrationen getestet werden, um eine zuverlässige Aussage über dessen kryoprotektive Eigenschaft zuzulassen.

Daraufhin wurde Methylcellulose als weitere kryoprotektive Substanz getestet. Es wurde ursprünglich als kryoprotektiver Zusatz für Zellen genutzt, die ohne Serum kultiviert werden sollten [Ohno et al., 1988]. Durch seine wasserbindende Eigenschaft verhindert es während der Kryokonservierung einen zu großen Wasserstrom aus der Zelle heraus. Des Weiteren verlangsamt es die Bildung der Eiskristalle. Die Wasserbindung durch Methylcellulose hat eine Erhöhung der Viskosität zur Folge. Inwieweit diese Eigenschaften sich positiv bei der Kryokonservierung erweisen, wurde mit den Zellen CHO-CHRM1 getestet.

Deren Vitalität war durch den Zusatz an Methylcellulose geringfügig erhöht. Jedoch wurde die Streuung der Fluoreszenzsignale durch Methylcellulose deutlich verringert. Dieser positive Effekt wird auch bei der Ermittlung der Stimulierbarkeit im IP-One Assay beobachtet. Anhand der Dosis-Wirkungskurven der frischen Zellen ist deutlich zu erkennen, dass durch den Zusatz an Methylcellulose das Signalfenster erweitert werden kann. Bei den kryokonservierten Zellen ist sogar ein konzentrationsabhängiger Effekt zu beobachten, der das Signalfenster erweitert. Durch den Zusatz an Methylcellulose kann der Z'-Faktor deutlich verbessert werden.

Mit den kryokonservierten Zellen ohne Pluronic wird ein Z'-Faktor von 0,2 erreicht, wohingegen mit 3 % Methylcellulose dieser auf einen exzellenten Wert von 0,78 erhöht werden kann. Trotz der Verbesserung des Kryomediums ist der kryoprotektive Stress auf die Zellen und eine damit geringfügig Einbuße an Sensitivität anhand des etwas erhöhten EC₅₀-Wertes erkennbar.

Durch die Verwendung des Kryoprotektivums konnte das Kryomedium so optimiert werden, dass bei der Bestimmung der Stimulierbarkeit des M1-Rezeptors im IP-One Assay eine deutliche Erhöhung der Qualität des Assays erreicht werden konnte und damit mit der von frischen Zellen vergleichbar ist.

Zusammenfassung

Die Signaltransduktion im Körper und das Eingreifen in diese wird erforscht, um die Entstehung und Entwicklung der Erkrankungen des Organismus aufzudecken. Das Screening potentieller pharmakologischer Wirkstoffe wird an primären Zellen und rekombinanten Zelllinien getestet. In diesen zellbasierten Assays werden erste Hinweise auf die Signalkaskade und eine daraus resultierende Wirkweise gegeben. Das Screening ganzer Wirkstoff-Bibliotheken erforderte eine Automatisierung der Durchführung der zellbasierten Assays. Durch das Hochdurchsatz-Screening wird es ermöglicht, Testungen vieler Substanzen mittels Robotern durchzuführen. Dies erfordert jedoch eine ständige Bereitstellung ausreichender Zellmengen. Um sowohl Zellen als auch Substanzen einzusparen, wurde das anfänglich verwendete 96-Well-Format nach und nach auf das 384-Well-Format umgestellt. Trotz der Miniaturisierung müssen ausreichende Zellmengen jederzeit zur Verfügung gestellt werden. Die Entwicklung der Princess Platten der Cell Culture Service GmbH beruht darauf, die Zellen in definierter Zellzahl in Mikrotiterplatten zu kryokonservieren. Dies ermöglicht das von der Zellkultur unabhängige Durchführen der Assays in gleichbleibender Qualität zu jedem beliebigen Zeitpunkt.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, anhand den Zelllinien A549-NF κ B-SEAP und CHO-CHRM1 die Kryokonservierung in 384-Well-Platten zu etablieren. Dazu zählte sowohl die Optimierung der Einfrieremethode, als auch die Optimierung der Zusammensetzung des jeweiligen Kryomediums. Die Qualität der kryokonservierten Zellen wurde mittels eines Vitalitätsassays und einem jeweiligen funktionellen Assay ermittelt.

Durch die Kryokonservierung wird die Zelle hohen Belastungen durch die Eiskristallbildung und die damit verbundene intrazelluläre und extrazelluläre Konzentrationsänderung ausgesetzt. Vor der Kryokonservierung wurden daher die Kultivierungsbedingungen überprüft. Diese haben gezeigt, dass durch die Verwendung eines geeigneten Serums die Stimulierbarkeit verbessert werden kann.

Zu einer qualitativen Kryokonservierung zählt sowohl eine geeignete Abkühlrate, als auch die Verwendung geeigneter Kryoprotektiva. Die Veränderung der Abkühlrate hat gezeigt, dass dies bereits einen enormen Verlust der Vitalität zur Folge hat. Eine geeignete Zellzahl im Well ist ebenso entscheidend, um ein zuverlässiges Ergebnis des Assays zu erhalten. Tendenziell wird jeder Assay mit so wenig Zellen wie nötig durchgeführt. Durch die Kryokonservierung treten jedoch bei zu geringer Zellzahl unverlässliche Werte durch eine zu hohe Streubreite auf. Die Zellzahl wurde mit 10.000 c/w bis 20.000 c/w als probat eingestuft, da hier die höchste Signalstärke erreicht wurde, ohne dabei an Vitalität zu verlieren.

Die Verwendung von Kryoprotektiva sollte sich positiv auf die Vitalität der Zellen nach dem Auftauen auswirken. Die getesteten Substanzen Pluronic und Methylcellulose zeigten dabei unterschiedliche Ergebnisse. Während Pluronic auf die Zellen A549-NF κ B-SEAP sich sowohl negativ auf die Vitalität und die Stimulierbarkeit auswirkte, war ein gegenteiliger Effekt auf die kryokonservierten Zellen CHO-CHRM1 zu beobachten. Eine eindeutige kryoprotektive Eigenschaft konnte jedoch nicht ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wirkte das Kryoprotektivum Methylcellulose deutlich positiver. Durch den Zusatz an Methylcellulose konnte mit den Zellen CHO-CHRM1 eine derartige Verbesserung erlangt werden, dass die Qualität des Assays mit der von frischen durchaus vergleichbar ist.

5 Literatur

Acker, J. P., Larese, A., Yang, H., Petrenko, S., McGann, L.E. (1999). Intracellular Ice Formation Is Affected by Cell Interactions. *Cryobiology* 38, 363-371.

Bakhach, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis* 5 (3), 119-126.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2007). *Stryer Biochemie*, 6. Auflage. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Chisti, Y. (2000). Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends in Biotechnology* 18, 420-432.

Cullen B. R., Halim, M. H.(1992). Secreted Placental Alkaline Phosphatase as a Eukaryotic Reporter Gene. *Methods In Enzymology* 216, 362-368.

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51(5), 1417-1423.

Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684.

Hibbeler, B., Krüger-Brand, H. (2007). Kryobanken: Tiefkühlarchiv für die Forschung. *Deutsches Ärzteblatt* 104 (39), 2634-2638.

Karlsson, J. O. M, Toner, M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17, 243-256.

Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G., (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer* 17 (1), 62-70.

Mantovani, A. (2010). Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer. *Current Molecular Medicine* 10, 369-373.

Mazur, P. (2010). A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology* 60, 4-10

Pessara, U., Koch, N. (1990). Tumor Necrosis Factor regulates Expression of the Major Histocompatibility Complex Class II-Associated Invariant Chain by Binding of an NF- κ B-Like Factor to a Promoter Element. *Molecular and Cellular Biology* 10 (8), 4146-4154.

Promega, CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, Technical Bulletin #317 (06/09)

Ohno (methylcell, diskussion)

Review Ion Channel Research (2004). *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 239-278.

Roche, SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent, Pack Insert #1779842a, (08/09)

Ross-Rodriguez, L. U., Elliott, J. A. W., McGann, L. E. (2010). Characterization of cryobiological responses in TF-1 cells using interrupted freezing procedures. *Cryobiology* 60, 106–116.

Sundberg, S. A. (2000). High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Current Opinion In Biotechnology* 11(1), 47-53.

Twigg, R. S. (1945). Oxidation Reduction Aspects of Resazurin. *Nature* 155, 401-402.

Zhang, Z., Al-Rubeai, M., Thomas, C. R. (1992). Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells. *Enzyme and Microbial Technology* 14(12), 980-983

Zhang, J., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* 4 (2), 67-73.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Dr. Oliver Klotzsche und Herrn Dr. Bernd Laffert bedanken, die mir diese interessante Diplomarbeit im Hause der Firma CCS GmbH in der Abteilung Forschung & Entwicklung ermöglicht haben.

In der Funktion meines Betreuers möchte ich ganz besonders Herrn Dr. Oliver Klotzsche danken. Er nahm sich stets die Zeit, mir mit kompetenten Ratschlägen und konstruktiven Hinweisen zur Seite zu stehen.

Für die gute und freundliche Betreuung von Seiten der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg möchte ich Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker meinen Dank aussprechen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dipl.-Ing (FH) Stefanie Rüger und Dipl.-Ing (FH) Julia Kühlke bedanken. Sie unterstützten mich jederzeit mit fachlichen Auskünften, praktischen Hilfen, wertvollen Erfahrungen in vielerlei Hinsicht und nicht zuletzt bei der Erstellung meiner Arbeit.

Meine Anerkennung gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der CCS GmbH, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und den Laboralltag äußerst angenehm werden ließen.

Ein dicker Dank geht an meine Familie, die mir den Weg hierher ermöglicht und mich bis zum Schluss ermutigt und unterstützt hat.