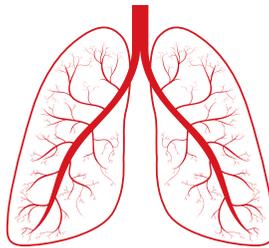


SAMIRA DÉsirÉE NEUBAUER

UNTERSUCHUNGEN ZUR VIABILITÄT VON
PRECISION CUT LUNG SLICES VON MAUS
UND MENSCH NACH KRYOKONSERVIERUNG



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publisher.

1st Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Untersuchungen zur Viabilität von Precision Cut Lung Slices von Maus und Mensch nach Kryokonservierung

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Samira Désirée Neubauer, geb. Schwindt
aus Karlsruhe (Deutschland)

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik II

Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Günther

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andre Menke

Tag der Disputation: 14.10.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Allgemeines zur Kryokonservierung	- 1 -
1.1.2 Überblick über die physikalischen und biologischen Zusammenhänge der langsamen Kryokonservierung mit Kristallisation	- 2 -
1.1.3 Kryokonservierung ohne Kristallisation (Vitrifikation)	- 5 -
1.3 Kryoprotektiva	- 6 -
1.3.1 Allgemeines	- 6 -
1.3.2 Dimethylsulfoxid	- 9 -
1.3.3 Trehalose	- 9 -
1.4 Kryokonservierung von Geweben	- 11 -
1.5 Biobank	- 12 -
1.6 Gewebepräzisionsschnitte	- 13 -
1.6.1 Allgemeines	- 13 -
1.6.2 Precision Cut Lung Slices (PCLS)	- 15 -
1.6.3 Kryokonservierung von PCLS	- 19 -
1.7 Ziele der Arbeit	- 22 -
2. Materialien und Methoden	- 23 -
2.1 Material	- 23 -
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	- 23 -
2.1.2 Chemikalien	- 25 -
2.1.3 Verwendete Kits	- 26 -
2.1.4 Antikörper	- 27 -
2.2 Methoden	- 28 -
2.2.1 Versuchstiere	- 28 -
2.2.2 Humanes Lungengewebe	- 28 -
2.2.3 Präparation der Mäuse	- 28 -

2.2.4 Herstellung von Präzisionsschnitten der Lunge (PCLS).....	- 29 -
2.2.5 Kultivierung der PCLS	- 30 -
2.2.6 Kryokonservierungs- und Auftaustrategie der PCLS	- 30 -
2.2.7 Bestimmung der Zytotoxizität mittels Lactatdehydrogenase (LDH) Detection Kit	- 31 -
2.2.8 Bestimmung der enzymatischen Zellaktivität mittels MTT Assay	- 32 -
2.2.9 Lebend-/Totfluoreszenzfärbung	- 33 -
2.2.10 Fluoreszenzfärbung mit LysoTracker Green zur Markierung differenzierter Pneumozyten Typ II	- 34 -
2.2.11 Proteinisolation aus den Präzisionsschnitten der Lunge.....	- 35 -
2.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration	- 35 -
2.2.13 Vorbereitung der Proben.....	- 37 -
2.2.14 SDS - Polyacrylamid-Gelelektrophorese	- 37 -
2.2.15 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot Methodik - 39 -	
2.2.16 Antikörperinkubation und Entwicklung	- 40 -
2.2.17 Verwendete Primärantikörper	- 41 -
2.2.18 Densitometrische Auswertung der Immunoblots	- 41 -
2.2.19 Statistische Auswertung	- 42 -
3. Ergebnisse.....	- 43 -
3.1. Bestimmung der Zytotoxizität mittels LDH Detection Kit	- 43 -
3.1.1 Murine PCLS.....	- 43 -
3.1.2 Humane PCLS	- 45 -
3.2 Bestimmung der Zellaktivität mittels MTT-Assay	- 47 -
3.2.1 Murine PCLS.....	- 47 -
3.2.2 Humane PCLS.....	- 49 -
3.3 Lebend-/ Totfluoreszenzfärbung.....	- 50 -
3.3.1 Murine PCLS.....	- 50 -
3.3.2 Humane PCLS.....	- 54 -
3.4. Gespaltene Caspase-3 Gehalt in Lungengewebsschnitten mittels Western Blot	- 57 -

3.4.1	Gespaltene Caspase-3 Gehalt in murinen PCLS	- 57 -
3.4.2	Gespaltene Caspase-3 Gehalt in humanen PCLS	- 60 -
3.5	Fluoreszenzfärbung mit LysoTracker Green zur Markierung differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II	- 62 -
3.5.1	Murine PCLS	- 62 -
3.5.2	Humane PCLS	- 66 -
3.6.	Matures SP-B Gehalt in Lungengewebschnitten mittels Western Blot	- 69 -
3.6.1	Gehalt an Maturem SP-B in murinen PCLS	- 69 -
3.6.2	Gehalt an maturem SP-B in humanen PCLS	- 72 -
3.7.	Matures SP-C Gehalt in Lungengewebschnitten mittels Western Blot	- 74 -
3.7.1	Gehalt an maturem SP-C in murinen PCLS	- 74 -
3.7.2	Gehalt an maturem SP-C in humanen PCLS	- 76 -
4.	Diskussion	- 78 -
4.1	Beurteilung der Methode zur Herstellung und Kultivierung der PCLS	- 78 -
4.2	Beurteilung der Methode der Kryokonservierung der PCLS	- 80 -
4.3	Zellviabilität und metabolische Aktivität von frischen und kryokonservierten PCLS - 81 -	
4.3.1	Beurteilung der Ergebnisse des LDH-Assay	- 82 -
4.3.2	Beurteilung der Ergebnisse des MTT-Assay	- 84 -
4.3.3	Strukturelle Schädigung der PCLS durch Kryokonservierung	- 86 -
4.4	Bewertung der Markierung differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II mittels LysoTracker Green	- 87 -
4.5	Bewertung der Vitalität der PCLS auf Proteinebene	- 88 -
4.6	Fazit und Ausblick	- 91 -

5. Zusammenfassung	- 93 -
6. Summary.....	- 94 -
7. Abkürzungsverzeichnis	- 95 -
8. Abbildungsverzeichnis.....	- 97 -
9. Tabellenverzeichnis.....	- 99 -
10. Literaturverzeichnis.....	- 101 -
11. Erklärung zur Dissertation.....	- 113 -
12. Danksagungen.....	- 114 -
13. Tabellarischer Lebenslauf.....	- 115 -

1. Einleitung

1.1. Allgemeines zur Kryokonservierung

Das Wort Kryokonservierung kommt zu einem aus dem Griechischen von *krýos* = Kälte, zum anderen von lateinisch *conservare* = erhalten.

Wie der Name somit sagt, sorgt Kryokonservierung für den Erhalt von Zellen, Organellen und Geweben, indem diese auf sehr niedrige Temperaturen, unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser, heruntergekühlt werden. Ziel ist es, die biologische Aktivität zu stoppen, um die Viabilität des Gewebes für einen späteren Gebrauch zu erhalten (Iussig et al. 2019).

Bei niedrigen Temperaturen werden die biologischen und chemischen Prozesse von lebenden Zellen und Geweben stark minimiert, sodass dieser Vorgang eine Langzeitlagerung von Zellen und Geweben ermöglichen kann. Dennoch ist das Kühlen für die meisten lebenden Zellen schädlich. Dies ist auf die intra- und extrazelluläre Eiskristallbildung zurückzuführen, die zu zellulären mechanischen Einschränkungen führt (Jang et al. 2017). Den einschränkenden Faktor der Kryokonservierung stellt die unkontrollierte Eiskristallbildung der verwendeten Methoden dar. Zur Minimierung der Eiskristallbildung kommen Kryoprotektoren zum Einsatz. Jedoch muss auch das Gehalt der Kryoprotektoren in akzeptabler Konzentration verwendet werden, da diese einen zelltoxischen Charakter haben (Taylor et al. 2019).

Die ersten Anfänge der Kryokonservierung fanden bereits vor ca. 200 Jahren statt. Seit Beginn stellte die Kryokonservierung von lebendem Gewebe einen zentralen Punkt der Kryobiologie dar (Arav 2014). 1938 wurde die erste erfolgreiche Kryokonservierung von pflanzlichen Zellen bekannt gegeben, die von Luyet durchgeführt wurde (Luyet und Thoennes 1938), gefolgt von tierischen Zellen im Jahre 1949 (POLGE et al. 1949). Seitdem wird Kryokonservierung an verschiedenen Zelltypen angewandt, wie z. B. an Eizellen (Argyle et al. 2016), humanen Stammzellen (Hunt 2011), Lebergewebe bis hin zu kardiovaskulären Allografts zur klinischen Anwendung (Jashari et al. 2013). Um sowohl eine optimale Zellviabilität sowie ein Erhalt der physiologischen Funktionen zu erreichen, arbeiten Wissenschaftler stetig daran die Strategie der Kryokonservierung zu verbessern (Iussig et al. 2019).

Gerade die Kryokonservierung von Eizellen spielt bereits seit mehreren Jahren eine relevante klinische Rolle. Im Jahre 1986 wurde von der ersten Schwangerschaft berichtet, die durch eine zuvor kryokonservierte Eizelle hervorgerufen wurde (Chen 1986). Durch diese Errungenschaft wird Frauen in fertilem Zustand ermöglicht ihre funktionsfähigen Eizellen einzufrieren, um

diese zu einem späteren Zeitpunkt zu befruchten. Dies stellt einen großen Vorteil für Frauen dar, die z. B. mit einer neuen Diagnose wie einer malignen Neoplasie konfrontiert werden und sich daher einer sterilisierenden Therapie wie z. B. Chemotherapie oder Bestrahlung unterziehen müssen (Jain und Paulson 2006).

1.1.2 Überblick über die physikalischen und biologischen Zusammenhänge der langsamen Kryokonservierung mit Kristallisation

Wie bereits erwähnt, ist die Methodik der Kryokonservierung durch den negativen Einfluss auf die Zellviabilität limitiert. Der Prozess der Kryokonservierung wird durch potenziell schädliche Faktoren beeinflusst, denen thermische, mechanische und chemische Komponenten zugrunde liegen.

Aus diesem Grund ist es wichtig die Vorgänge, die sich während des Einfrier-, aber auch während des Auftauprozesses im Gewebe abspielen, zu verstehen (Mazur 1984). Das Einfrieren kann Zellen für einen langen Zeitraum konservieren. Die Schwierigkeit der Erreichbarkeit der optimalen Viabilität liegt in dem Prozess die Zellen bzw. das Gewebe auf sehr niedrige Temperaturen zu überführen, bei denen es zu keiner Zellschädigung mehr kommt. Zwischen $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ liegt die schädigende Temperatur, die gleich zweimal überwunden werden muss, zum einen beim Einfrieren, zum anderen erneut beim Auftauen. Bei Temperaturen des flüssigen Stickstoffs, also bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ereignen sich keine thermischen Prozesse mehr, auch ist keine thermische Energie mehr vorhanden um chemische Reaktionen durchzuführen (Mazur 1984). Aus diesem Grund bleiben die Eigenschaften der Zelle zeitlich unbeschränkt erhalten, es findet somit auch keine Alterung der Zellen mehr statt (Friedler et al. 1988). Wie in Abb.1 dargestellt kommt es zwischen $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu einer extrazellulären Eiskristallbildung, die Zellorganellen bleiben jedoch zunächst ungefroren, da durch die Plasmamembran eine Eiskristallbildung im Cytoplasma verhindert wird. Das extrazelluläre Medium enthält weniger gelöste Stoffe und ist zudem volumenmäßig größer, sodass dieses zuerst gefriert. Da nur das reine Wasser kristallisiert, steigt die Konzentration der gelösten Stoffe im Wasser während des Einfrierens an. Das Wasser in der Zelle hat ein höheres osmotisches Potenzial als das Gefrorene extrazellulär, weshalb es entlang eines osmotischen Gradienten nach extrazellulär fließt. Ist die Kühlrate langsam genug, kann das Wasser nach extrazellulär weichen und es kommt intrazellulär nicht zu einer Eiskristallbildung. Folge ist jedoch, dass die Zelle dehydriert, da der osmotische Gradient zu lange einwirkt und die Zelle zu stark schrumpft. Auch führt die daraus resultierende steigende Konzentration an Elektrolyten zur Schädigung der Zellorganellen. Bei schneller

Einleitung

Kühlrate kann das Wasser nicht vollständig nach extrazellulär gelangen und es kommt zur intrazellulären Eiskristallbildung, die ebenso zellschädigend wirkt (Han und Bischof 2004). Eine optimale Kühlrate ist somit entscheidend, um einen erfolgreichen Erhalt der Viabilität der Zelle zu erreichen. Es muss die Überführung in flüssigen Stickstoff erfolgen, bevor die Zelle dehydriert, aber nachdem ausreichend Wasser nach extrazellulär gelangt ist. Das Optimum liegt dort, wo diese beiden Effekte der unterschiedlichen Kühlraten am kleinsten sind (Mazur 1988). Die daraus abgeleitete Hypothese wird Zwei-Faktor-Hypothese genannt, da es zwei Faktoren (Dehydrierung der Zelle und intrazelluläre Eiskristallbildung) gibt, die die Zelle beim Einfrieren schädigen (Abb. 2).

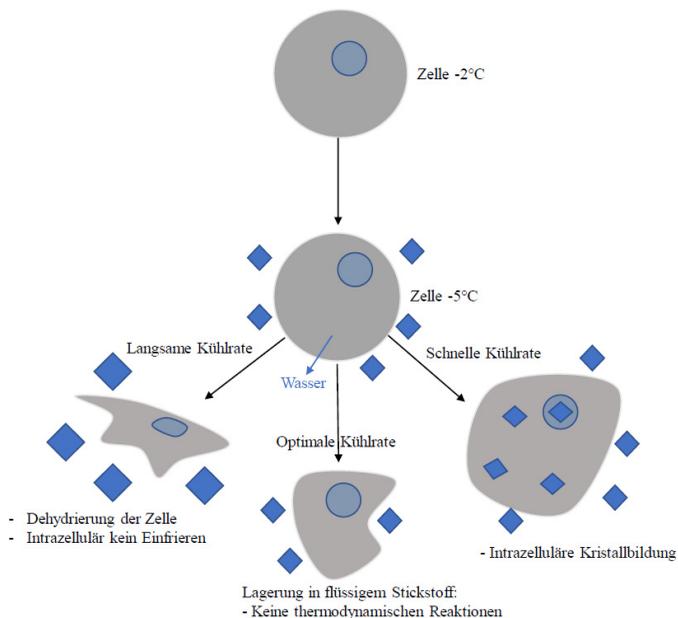


Abb. 1: Schematische Darstellung der physikalischen Ereignisse während des Einfrierens einer Zelle, erstellt in Anlehnung an (Mazur 1977) und (Jang et al. 2017). Dargestellt sind die physikalischen Ereignisse einer Zelle in Abhängigkeit der Kühlrate. Die Rauten stellen Eiskristalle dar.

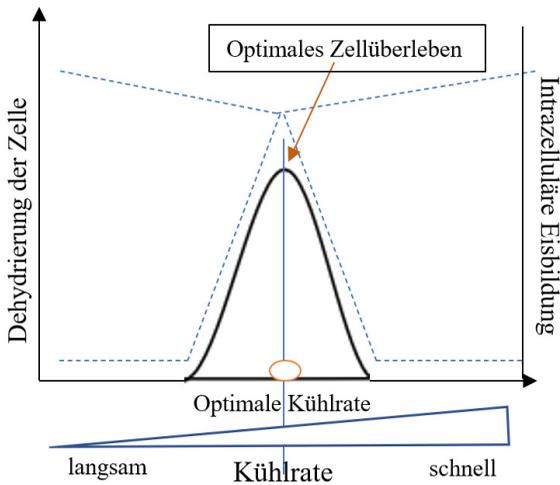


Abb. 2: Zwei-Faktoren-Hypothese nach Mazur et al., erstellt in Anlehnung an (Karlsson und Toner 1996). Gezeigt wird der Zellschaden bei langsamer und schneller Kühlrate, sowie die daraus resultierende optimale Kühlrate. Suboptimale Temperaturen beim Einfrieren führen zu Dehydratierung oder intrazellulärer Eisbildung. Die Hypothese beruht darauf, diese zwei Faktoren zu vermeiden und daher eine optimale Kryokonservierung zu erzeugen.

Die Schäden von Zellen durch das Einfrieren sind im Folgenden noch einmal zusammengefasst:

- I. Steigende intrazelluläre Elektrolytkonzentration mit der Folge der osmotischen Schädigung der Zellmembran (Mazur 1977).**
- II. Schädigung der intrazellulären Proteine durch erhöhte Elektrolytkonzentrationen.**
- III. Mechanische Schädigung durch Eiskristallbildung. Das Ausmaß der Schädigung steht in Korrelation mit der Gesamtmenge des Eises in einer Zelle (Farrant et al. 1977).**

Nicht nur das Einfrieren, sondern auch der Auftauprozess hat einen Einfluss auf die Überlebensraten der Zellen. Ein zu langsames Auftauen kann zu einer sogenannten Rekristallisierung der intrazellulär gebildeten Eiskristalle führen (Pegg 2007). Beim Unterschreiten der kritischen Temperatur zwischen -15 °C und -60 °C wird das Wachstum der Kristalle eingestellt. Durchlaufen die Zellen beim Auftauen erneut diese Temperaturen kann es zu einem weiteren Kristallwachstum kommen und somit auch zu ansteigenden intrazellulären Elektrolytkonzentrationen durch den wachsenden osmotischen Gradienten zwischen intra- und extrazellulär. Die beim Einfrieren entstehenden Eiskristalle sind zunächst nicht weiter schädlich, solange sie eine gewisse Größe nicht überschreiten (Mazur 1977); (Hunt 2019). Durch hohe Auftauraten kann erreicht werden, dass das Kristallwachstum verringert wird. Die Auftaurate sollte somit so hoch wie möglich gewählt werden (Koshimoto und Mazur 2002). In Studien hat das schnelle Erwärmen der Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C die besten Überlebensraten gezeigt (Royere et al. 1996).

1.1.3 Kryokonservierung ohne Kristallisation (Vitrifikation)

Auf Grund der entstehenden Schäden bei der langsamen Kryokonservierung, sowohl durch Dehydratation als auch durch Eiskristallbildung, wurde in den 1980er versucht eine neue Methode zu entwickeln. Diese neue Methode wird Vitrifikation (Verglasung) genannt (Pegg 2002). Die Vitrifikation (von lat. vitrium= Glas) bezeichnet eine Methode, bei der es durch eine sehr schnelle Kühlrate zu geringeren Zellschäden durch Eiskristallbildung kommt (Arav 2014). Es zeigte sich, dass hierbei die Zellen direkt von einem flüssigen Zustand unter Zunahme der Viskosität in einen amorphen, glasartigen Zustand überführt werden (Khalili et al. 2017). Die Zellen bzw. das Gewebe werden direkt in flüssigen Stickstoff überführt, sodass sehr hohe Abkühlraten bis zu 20.000 °C/min erreicht werden, daher kommt es anstatt zu der schädlichen Eiskristallbildung zu einer Erstarrung, auch Soldifikation genannt (Vajta und Kuwayama 2006). Ein Nachteil der Vitrifikation ist, dass sehr hohe Konzentrationen an Kryoprotektiva benötigt werden, die jedoch einen zelltoxischen Effekt aufweisen. Dieses Problem stellt auch den limitierenden Faktor der Methode dar (Kader et al. 2009). Für das Überführen in einen amorphen Zustand ist jedoch beides notwendig, die hohen Abkühlraten sowie eine ausreichende Konzentration an gelösten Stoffen durch Kryoprotektiva, um bereits zuvor die Viskosität zu erhöhen (Chen und Yang 2009).

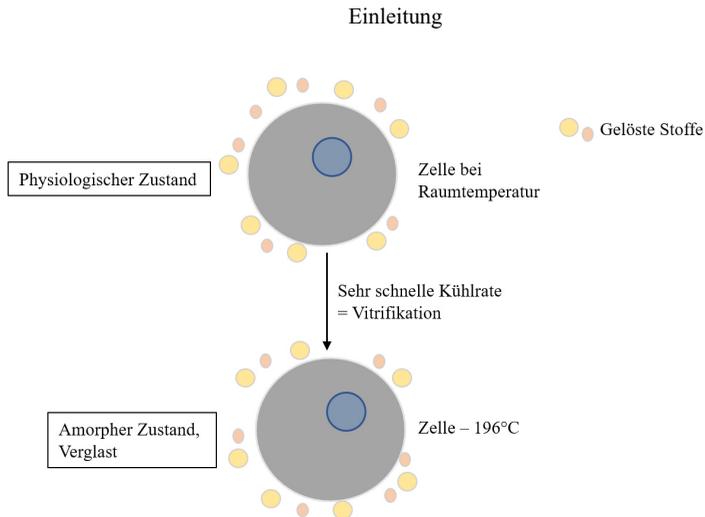


Abb. 3: Schematische Darstellung der Vitrifikation. Ist die Konzentration an gelösten Stoffen, sowie die Abkühlrate ausreichend hoch, können Zellen ohne Kristallisation kryokonserviert werden. Erstellt in Anlehnung an (Jang et al. 2017).

1.3 Kryoprotektiva

1.3.1 Allgemeines

Prinzipiell sind Kryoprotektiva verschiedene chemische Stoffgruppen, die die Funktion besitzen, die Schädigungen der Kryokonservierung zu minimieren oder sogar vollständig zu verhindern. Das erste Kryoprotektivum, das von Polge 1949 als Einflussreichstes entdeckt wurde war Glycerol. Nach dieser Entdeckung gab es eine Vielzahl von Studien, die zahlreiche weitere Kryoprotektiva erforschten, die Zellen nach dem Einfrieren und Auftauen erhalten können (Rajan und Matsumura 2018). 1950 zeigte Smith, dass die Zugabe einer 10-15 % Lösung mit Glycerol die Hämolyse von Erythrozyten nach dem Einfrieren verhindert (SMITH 1950). 1959 zeigte sich eine neue Entdeckung der Kryoprotektiva, denn Lovelock und Bishop entdeckten Dimethylsulfoxid (DMSO). Sie beobachteten, dass DMSO ebenso die Zellmembran penetriert, jedoch deutlich schneller als Glycerol und daher eine geringere Konzentration zum vollständigen Schutz vor Einfrierschäden notwendig ist (Misch und Misch 1967).

Kryoprotektiva, auch als CPAs (cryoprotective agents) bezeichnet, reduzieren allgemein die Eismenge, die bei bestimmten Temperaturen gebildet wird, indem sie die

Einleitung

Gesamtkonzentrationen an gelösten Stoffen erhöhen. Sie besitzen unterschiedliche Strategien, um das gemeinsame Ziel zu erreichen: Es kann der Gefrierpunkt der Lösung gesenkt, die Zellmembran stabilisiert und auch die Dehydratation der Zelle beeinflusst werden (Meryman 1974). Es bestehen jedoch bestimmte Anforderungen an CPAs, denn zum einen müssen sie in die Zelle eindringen können und zum anderen eine geringe Toxizität aufweisen (Pegg 2007).

Ein Einfrieren von Zellen und Geweben ohne die Verwendung von CPAs würde zu einer deutlichen Reduktion der Viabilität des Gewebes führen.

Kryoprotektiva werden in zwei wesentliche Gruppen unterteilt, je nach ihrer Fähigkeit die Zellmembran zu durchdringen, spricht man von penetrierenden oder nicht-penetrierenden CPAs (Meryman und Howard 1977).

Penetrierende Kryoprotektiva	Nicht-penetrierende Kryoprotektiva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Trehalose
Ethylenglykol	Saccharose
1,2-Propandiol	Hydroxyethylstärke
Glyzerin	Fetales Kälberserum
Propylenglykol	Humanes Serumalbumin

Tab. 1: Übersicht über Beispiele für penetrierende und nicht-penetrierende Kryoprotektiva.

Penetrierende Kryoprotektiva können ihre schützende Wirkung sowohl intra- als auch extrazellulär entwickeln. Im Allgemeinen haben penetrierende CPAs zwei Schutzwirkungen. Sie erniedrigen den Gefrierpunkt, indem sie die Osmolalität intra- und extrazellulär erhöhen. Dies führt zu einer geringeren Aufkonzentrierung der Elektrolyte und einer geringeren Eisbildung, da ein größerer Wasserausstrom aus der Zelle ermöglicht wird (Benson et al. 2012). Des Weiteren ersetzen sie Wassermoleküle während der Dehydratation und stabilisieren dadurch die Membran und Makromoleküle durch die extrazelluläre Eiskristallbildung. Sie können wie Wasser an die Makromoleküle binden und erzeugen dadurch die Stabilisation dieser (Meryman 1974).

Einleitung

Nicht-penetrierende Kryoprotektiva haben ein hohes Molekulargewicht und können, wie der Name schon sagt, die Zellmembran nicht durchdringen. Sie schützen aber im Extrazellulärraum vor osmotischen Schäden und stabilisieren die Zellmembran. Die Stabilisierung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen, die die Kryoprotektiva mit den hydrophilen Gruppen der Zellmembran eingehen (Shaw und Jones 2003). Sie verändern die Elektrolytkonzentration der Zelle, da der Zelle durch die osmotischen Vorgänge Wasser entzogen wird. Es wird daher der intrazellulären Eiskristallbildung entgegengewirkt, da es zu einer Dehydrierung der Zelle kommt. Da sich dadurch jedoch auch die Osmolalität extrazellulär erhöht, wird auch in diesem Kompartiment der Eisbildung entgegengewirkt. Sie sorgen auch dafür, dass die Zelle vor zu großen Volumenänderungen während des Einfrierens bewahrt wird, indem sie als osmotischer Puffer wirken und die Wassereinstrom- und die Wasserausstromgeschwindigkeit beeinflussen (Friedler et al. 1988). Die häufigsten verwendeten Kryoprotektiva dieser Gruppe sind Mono- und Disaccharide. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Schutzfunktion der Saccharide abhängig von deren Molekulargewicht ist (Izutsu et al. 2004).

Durch CPAs kann zwar in gewissem Ausmaß die Eisbildung der Zellen, Gewebe und Organe verringert werden. Dennoch stellt die Toxizität dieser Stoffe ein Problem dar. Die toxische Wirkung der CPAs ist sowohl temperatur-, aber auch konzentrationsabhängig (Best 2015). Kryokonservierung ohne eine Eiskristallbildung wäre somit möglich, wenn CPAs in unlimitierter Konzentration verwendet werden könnten (Elliott et al. 2017). Oftmals wird eine Kombination aus penetrierenden und nicht-penetrierenden Kryoprotektiva verwendet, da hierdurch die Wirkung penetrierender CPAs verstärkt wird und die Toxizität herabgesetzt werden kann (Gao und Critser 2000). Eine Kombination ist ebenso sinnvoll, da während des Auswaschens von penetrierenden CPAs ein osmotisch bedingtes Anschwellen der Zelle durch die Zugabe nicht-penetrierender CPAs reduziert werden kann (Woods et al. 2004).

Im Folgenden soll kurz auf die in dieser Arbeit verwendeten Kryoprotektiva, DMSO und Trehalose, genauer eingegangen werden.

1.3.2 Dimethylsulfoxid

Die kryoprotektive Eigenschaft von DMSO wurde im Jahre 1959 erstmalig von Lovelock und Bishop entdeckt. Seither wird es regelmäßig zur Kryokonservierung verwendet, besonders auf Grund seiner niedrigen Kosten, aber auch wegen der geringen Zelltoxizität (Jang et al. 2017). DMSO gehört zu den membrangängigen Kryoprotektiva und entfaltet seine schützende Wirkung erst intrazellulär. Es erreicht seine Wirkung, indem es eine Erniedrigung des Gefrierpunktes hervorruft, dadurch wird den Zellen während des Einfrierens ermöglicht mehr Wasser nach extrazellulär abzugeben (Ashwood-Smith 1967). Der Vorteil von DMSO gegenüber Glycerol wird darin begründet, dass DMSO die Zellmembran schneller passiert und der osmotische Schock beim Hinzugeben und Auswaschen geringer ist (Ashwood-Smith 1967).

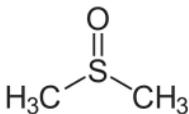


Abb. 4: Strukturformel von Dimethylsulfoxid.

1.3.3 Trehalose

Trehalose gehört in die Gruppe der nicht reduzierenden Disaccharide, es besteht aus zwei α,α' -1,1-glycosidisch verknüpften Glucose-Molekülen. Einige Organismen und Bakterien können in stressbedingten Situationen Trehalose produzieren. Dadurch konnten sie eine Kühlung und Wiedererwärmung und die einhergehende Dehydrierung überleben (Crowe et al. 1992).

Ein Beispiel für einen natürlich vorkommenden Organismus, der das Kryoprotektivum Trehalose produziert um Trockenperioden zu überstehen, ist die Wüstenpflanze *Selaginella lepidophylla* (Olsson et al. 2016). In Anlehnung an diese Erkenntnisse wurde Trehalose auf seine kryoprotektiven Eigenschaften an Bakterien, Pilzen sowie komplexen Geweben wie beispielsweise Pankreasgewebe untersucht (Crowe et al. 1992; Yokomise et al. 1995). Es wurde von mehreren Autoren berichtet, dass ein höheres Potential des kryoprotektiven Effektes durch die Zugabe von Trehalose zu DMSO erzielt werden konnte (Kim et al. 2001; Solocinski et al. 2017). Trehalose zeigte auch eine größere Effizienz im Schutz der Proteine beim Einfrieren als andere einfache Zucker. Experimente haben ebenso gezeigt, dass es auch im Schutz der Membranstrukturen einzigartig ist und bessere Ergebnisse erzielt als andere Zucker (Lillford und Holt 2002).

Einleitung

Es bildet Wasserstoffbrücken mit den Makromolekülen aus und sorgt dadurch für den Erhalt ihrer funktionsfähigen Konstellation während des Wasserentzugs beim Einfriervorgang (Hara et al. 2017). Es konnte in mehreren Studien festgestellt werden, dass durch die Zugabe von Trehalose zum Einfriermedium eine höhere Überlebensrate der Zellen und Gewebe erzeugt werden kann (Lee et al. 2013).

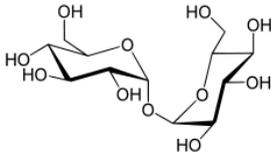


Abb. 5: Strukturformel von Trehalose.

1.4 Kryokonservierung von Geweben

Gewebe stellen komplexe Verbände verschiedener Zellen dar, um eine funktionelle Einheit zu bilden.

Der Gefrierprozess von komplexen Geweben und Organen ist durchaus komplizierter als bei einzelnen Zellen, da diese aus unterschiedlichsten Zelltypen bestehen, die zum Teil individuelle kryobiologische Anforderungen besitzen. Durch die erhöhte Zelldichte in Organen ist auch der Wärmetransport eingeschränkt (Mazur 1984). Einzelzellen werden daher mit größerem Erfolg kryokonserviert als Gewebe (Pegg 2001). Der Größenunterschied zwischen Gewebe und Einzelzelle stellt einen wesentlichen Einfluss dar, da die Diffusionsstrecke für die Kryoprotektiva deutlich erhöht wird. Äußere Zellschichten sind länger dem Kryoprotektivum ausgesetzt, während die Diffusion in das Innere des Gewebes deutlich länger andauert. Jedoch nicht nur das Eindringen der Kryoprotektiva, sondern auch der Wasserausstrom aus großen Gewebeteilen ist verlangsamt. Der verlangsamte Wasserausstrom wiederum begünstigt das Auftreten von intrazellulärer Eiskristallbildung (Korniski et al. 1999). Bei Systemen, die aus mehreren Zellen bestehen, kann es zudem zu einer interzellulären Eiskristallbildung kommen (Acker et al. 2001). Diese Eisbildung zwischen den Zellen beschädigt die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sowie die Blutgefäße in vaskularisiertem Gewebe, die für das Überleben des Gewebes essenziell sind (Acker und McGann 2000). Wenn sich ein Eiskristall interzellulär bildet, führt dies dazu, dass aus den umgebenden Arealen weiterhin Wasser in dessen Richtung strömt, sodass der Eiskristall weiter wachsen kann und das Gewebe durch den mechanischen und osmotischen Einfluss schädigt (Taylor et al. 2019).

1.5 Biobank

In Biobanken können Zellen und Gewebe über einen längeren Zeitraum gelagert werden, auf mikrobielle Kontamination überprüft und letztendlich zu einem beliebigen Zeitpunkt für den Gebrauch im Labor oder am Patienten bereitgestellt werden. Das Wort Biobank wurde erstmals im Jahre 1996 von Loft und Poulson in Zusammenhang mit dem Gebrauch von humanem biologischen Material gebracht (Loft und Poulsen 1996).

Seitdem hat sich eine enorme Entwicklung in Bezug auf das Sammeln und Lagern von humanen Proben vollzogen. Heute können über einen langen Zeitraum konserviertes Gewebe, Zellen, DNA und Proteine gelagert werden. Es können zwei Arten von Biobanken unterschieden werden. Zum einen die populationsbasierte Biobank, deren Bestreben darin besteht bei der Entwicklung verschiedener Krankheiten den Einfluss genetischer, sowie die Exposition externer Faktoren zu untersuchen. Zum anderen gibt es die krankheiten-orientierte Biobank, die entstanden ist, mit dem Ziel die Pathogenese der menschlichen Krankheiten zu untersuchen und neue Therapiestrategien zu entwickeln (Coppola et al. 2019).

Seit dem Jahre 2000 stellen Biobanken eine nicht mehr wegdenkbare Unterstützung der Medizin dar. Sie ermöglichen es prospektive und retrospektive Studien zu speziellen Krankheiten durchzuführen (Kinkorová und Topolčan 2018).

Die Möglichkeit einer erfolgreichen Kryokonservierung von Organen und Geweben würde einen weltweiten medizinischen Nutzen bringen, einen Nutzen für die öffentliche Gesundheit. Kryokonservierung könnte es ermöglichen Organe und Gewebe so lange aufzubewahren, bis sie benötigt werden, sei es zur Transplantation oder zur Forschung. Da menschliche Gewebe für die Forschung nur eingeschränkt verfügbar sind, beruht ein Großteil der Daten auf Tiermodellen. In vielen Fällen könnten gerade in Hinblick auf die Wirkstoffforschung menschliche Gewebemodelle aussagekräftigere Daten liefern. Die Voraussetzung, die hierfür geschaffen werden muss, ist die schädlichen Faktoren der Kryokonservierung soweit zu minimieren, dass kein relevanter Einfluss auf die Versuchsergebnisse besteht. Ein weiterer Vorteil, den die Kryobank mit sich bringt, ist die Reduktion der Tierversuche (Giwa et al. 2017).

1.6 Gewebepräzisionsschnitte

1.6.1 Allgemeines

Die Entwicklung der Gewebepräzisionsschnitte ist auf Krumdieck et al. zurückzuführen, der im Jahre 1980 ein handbetriebenes Mikrotom entwickelte. Bereits 50 Jahre zuvor wurden von Otto Warburg Gewebeschnitte erstellt. Jedoch gelang es damals noch nicht eine standardisierte Technik zu etablieren, da die Schnitte mit Hand erstellt wurden (Stribos et al. 2016). Durch Krumdiecks Mikrotom wurde dies ermöglicht. Das Ziel war es dünne Gewebeschnitte zu produzieren, die die gleiche Dicke aufweisen und geringem mechanischem Trauma ausgesetzt werden. Es konnten so erstmalig Gewebeschnitte einer Dicke zwischen 160 und 640 μm hergestellt werden, die histologisch eine gut erhaltene Gewebestruktur aufwiesen (Krumdieck et al. 1980).

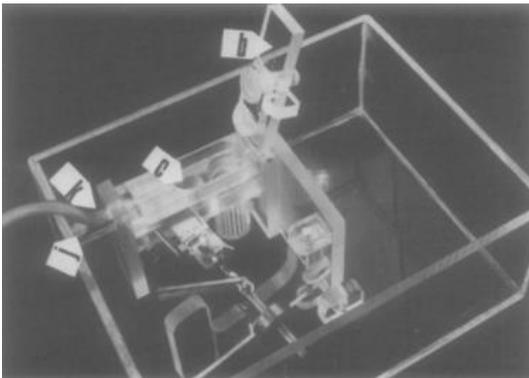


Abb. 6: Mikrotom aus dem Jahr 1980 nach (Krumdieck et al. 1980).

Man unterscheidet prinzipiell *in-vivo*- und *in-vitro*-Methoden. Diese unterscheiden sich in ihrer Spezifität und Komplexität. In Bezug auf die Komplexität stehen *in-vivo*-Methoden, also Versuche am ganzen Organismus, an der Spitze. Gewebeschnitte stellen eine geringere Komplexität dar, jedoch dafür eine höhere Spezifität. Sie dienen als *in-vitro*-Modell, die sehr gut die *in-vivo*-Verhältnisse darstellen. Hierbei wird ein gesamter Gewebeverband betrachtet. Dieser spiegelt die physiologischen Eigenschaften eines ganzen Organes wieder, sowohl auf „zellulärer, struktureller und funktioneller Ebene“ (Vickers und Fisher 2005).

Ein besonderer Vorteil gegenüber Versuchen an reinen Zellkulturen ist der Erhalt der Zell-Zell-Verbindungen in einem Organ (Resau et al. 1991).

Einleitung

Der Gebrauch von Organschnitten hat sich mittlerweile weltweit etabliert (Abb. 7) und wird vor allem von der pharmazeutischen Industrie, aber auch von universitären Laboren genutzt.

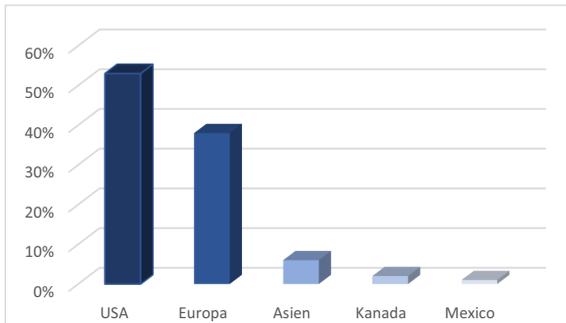


Abb. 7: Gebrauch von Gewebeschnitten nach Ländern, im prozentualen Vergleich untereinander, modifiziert nach (Vickers und Fisher 2005).

Es gibt viele Gründe, warum Gewebepräzisionsschnitte eine adäquate in-vitro-Methode darstellen. Dazu gehören der Erhalt der normalen Organarchitektur, die Möglichkeit von einem Organ multiple Schnitte herzustellen, sowie die Einfachheit der Präparation der Schnitte (Parish et al. 1995).

Im Falle von Gewebeschnitten von humanem Gewebe muss besonders auch auf den Zeitraum nach dem Tod bis zur Explantation des Organs, den Todesgrund und den ursprünglichen Gesundheitsstatus geachtet werden, da sich diese Faktoren auf die Viabilität des Gewebes auswirken können (Resau et al. 1991).

1.6.2 Precision Cut Lung Slices (PCLS)

Es gelang in der Vergangenheit relativ leicht Schnitte von Leber, Milz, Niere, Herz und Haut herzustellen. Krumdiecks Technik zur Erstellung von Gewebeschnitten konnte aber nicht so einfach auf die Lunge übertragen werden, da diese aus sehr weichem und luftgefülltem Gewebe besteht und daher keinen effizienten Widerstand beim Schneiden aufbringt. Es wurde deshalb Agarosegel in das Gewebe instilliert, wodurch dieses aushärtet. Dieser wichtige Schritt in der Weiterentwicklung kam von Placke und Fisher. Es wurde flüssige Agarose in die Atemwege gefüllt, die bei Temperaturen unter 25 °C hart wird, sodass während des Schneidevorgangs der Status der Lunge erhalten bleibt und die Atemwege nicht kollabieren können (Placke und Fisher 1987). Martin et al. entwickelten die Technik von Krumdieck et al. noch weiter. Dadurch wurde es möglich Lungengewebeschnitte mit einer Dicke von 250 µm zu erstellen und diese über einen Zeitraum von 72 Stunden zu kultivieren. Die geringere Schichtdicke der Schnitte macht eine verbesserte Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen möglich (Martin et al. 1996). Zwar sinkt die Zahl der beschädigten Zellen mit steigender Dicke und führt daher zu einem geringeren Einfluss auf den gesamten Metabolismus des Schnittes, jedoch steigt auch die Diffusionsstrecke für das Kulturmedium an, was zu einer geringeren Viabilität beiträgt (Freeman und O'Neil 1984). Ziel ist es also, durch die Schnittdicke ein Minimum an Zellschädigung und ein Maximum an Substratdiffusion zu erreichen.

Die Methode zur PCLS Herstellung wurde mittlerweile teilweise standardisiert. Der Prozess führt zu reproduzierbaren, einheitlichen Schnitten, die in einer Vielzahl von ex-vivo-Experimenten Anwendung finden. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde postuliert, dass die PCLS über einen Zeitraum von maximal drei Tagen ihre Viabilität und Funktionalität in Kultur erhalten können. Gerade aber bei der Agaroseinjektion gibt es einige Punkte zu beachten, so sollte der Injektionsdruck minimiert werden. Die Menge des instillierten Agarosegels ist ebenso entscheidend, da bei Überschreiten der totalen Lungenkapazität ein Barotrauma des Gewebes ausgelöst werden kann, einhergehend mit eingeschränkter Viabilität (Sanderson 2011).

Viabilität beeinflussende Faktoren
Dicke der Gewebeschnitte
Agarose Injektion
Kulturmedium
Inkubationssystem

Tab. 2: Zusammenfassung der Viabilität beeinflussenden Faktoren der PCLS nach (Graaf und Koster 2003).

Durch PCLS können verschiedene Regionen der Lunge untersucht werden. Es finden sich alle Zelltypen, die von Interesse sind im Gewebe wieder und spiegeln die Veränderungen bei Krankheit auch in der extrazellulären Matrix genau wider (Liu et al. 2019).

Ein wichtiger Vorteil in der Verwendung der PCLS ist der Erhalt der Lungenarchitektur (Lyons-Cohen et al. 2017). Im Gegensatz dazu führt die Verwendung von isolierten Zellen in Kultur zu einem Verlust von differenzierten Funktionen, da keine Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen mehr vorhanden sind (Freeman und O'Neil 1984).

Ein weiterer Vorteil der PCLS liegt in der potenziellen Reduktion der Tierversuche. Die Ausbeute aus z. B. einem Lungenlappen der Maus liegt bei ungefähr 20 PCLS, dadurch ist es möglich die Zahl der Tiere, die für ein einzelnes Experiment benötigt werden zu minimieren (Lyons-Cohen et al. 2017). Studien an Tieren sind unumgänglich, da das humane Material, gerade für toxikologische Studien, limitiert ist. Durch die Gewebeschnitte wird ein Speziesvergleich ermöglicht, da die Produktion der Schnitte sich nicht unterscheidet. Die Ergebnisse an tierischen PCLS können direkt mit humanen PCLS verglichen und auf diese übertragen werden (Gandolfi et al. 1995).

Zusammenfassung Vorteile der PCLS
Erhalt der wesentlichen Organstruktur
In-vitro-Methode, die das in-vivo-System widerspiegelt
Vorhandensein von multiplen Zelltypen sowie Erhalt der Zellkommunikationen
Reduktion von Tierversuchen

Tab. 3: Vorteile der PCLS.

Einleitung

PCLS fanden bereits in der Forschung zahlreicher klinisch relevanter Krankheitsbilder Verwendung, so wurden sie „zu Studien von Asthma, COPD, Idiopathischer Lungenfibrose, Allergien, Infektionen und pharmakologischen Studien verwendet“ (Liu et al. 2019).

Im Folgenden soll kurz auf die wichtigsten Forschungsergebnisse eingegangen werden, die zur Etablierung der PCLS als in-vitro-Forschungsmodell geführt haben, sowie auf den aktuellen Stand der Forschungsmöglichkeiten anhand der PCLS.

1994 zeigten Fisher et al. an humanen PCLS, dass diese ein funktionierendes in-vitro-Modell für toxikologische Lungenforschung darstellen. Die PCLS wurden in den lungentoxischen Substanzen Acrolein und Nitrofurantoin kultiviert. Die Vitalität der exponierten Schnitte und der Kontrollschnitte wurde anhand der Proteinsynthese und des Gehaltes an Sulfhydrylgruppen verglichen. Dabei konnte eine eindeutig verringerte Vitalität der PCLS festgestellt werden, die den lungentoxischen Substanzen ausgesetzt waren (Fisher et al. 1994).

Zwei Jahre später, 1996, konnte Martin et al. durch videomikroskopische Beobachtung der Bronchokonstriktion in PCLS den Nutzen dieser in pharmakologischen und funktionellen Studien bekunden. Es wurde der bronchokonstriktorische Effekt von Methacholin untersucht. Die Ergebnisse entsprachen den Erwartungen, eine Konstriktion der Atemwege zu beobachten, die mit zunehmender Methacholinkonzentration verstärkt wurde. Somit wurde gezeigt, dass PCLS ein nützliches Modell in Studien zur Bronchokonstriktion darstellen. Die Ergebnisse waren präzise und konnten mehrfach reproduziert werden. Es wurde auch gezeigt, dass kleinere Atemwege sensitiver auf Methacholin reagieren als im Durchmesser größere (Martin et al. 1996).

Die Möglichkeit der Beobachtung der Bronchokonstriktion wurde im Folgenden vor allem in Bezug auf die Pathophysiologie von Asthma bronchiale genutzt (Wohlsen et al. 2001). 2009 wurde in einer Publikation von Wohlsen et al. eine weitere Möglichkeit über den Gebrauch von PCLS in der Erforschung von pulmonalen Erkrankungen veröffentlicht. Bei respiratorischen Erkrankungen, wie Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und Lungenfibrose ist durch eine Beeinträchtigung des respiratorischen Flimmerepithels die mukoziliäre Clearance reduziert. Die Regulation des Flimmerepithels wird hauptsächlich von cAMP beeinflusst, sodass Substanzen, die dessen Bildung beeinflussen, wie z. B. Terbutalin oder Roflumilast, untersucht wurden.

An den behandelten PCLS wurde anschließend die Zilienschlagfrequenz gemessen und videomikroskopisch beobachtet. Die Ergebnisse demonstrierten eine gute Einsetzbarkeit der getesteten Medikamente, da eine konzentrationsabhängige Zunahme des ziliären

Einleitung

Flimmerepithelschlags beobachtet werden konnte (Wohlsen et al. 2010).

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist als chronische interstitielle Lungenerkrankung mit einer hohen Morbidität verbunden. PCLS wurden als ex-vivo-Modell in der Medikamentenforschung bereits verwendet. Die Produktion von PCLS explantierter IPF Lungen ist möglich, diese sind jedoch selten verfügbar und repräsentieren das Organ in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. 2017 wurde in einer Publikation veröffentlicht, dass anhand von PCLS frühe pulmonale fibrotische Veränderungen untersucht werden können. Es wurden PCLS von gesunden Spenderlungen erstellt und diese mit profibrotischen Faktoren inkubiert. Die fibrotischen Veränderungen wurden histologisch und mittels Immunfluoreszenz anhand der Umstrukturierung des Alveolarepithels und der Reduktion von Surfactant Protein C gezeigt. Somit wurde ein ex-vivo-Modell entwickelt, das es ermöglicht den Pathomechanismus der frühen IPF zu studieren. Dennoch stellt dieses Modell nur einen Anteil der IPF-Veränderungen im Gewebe dar und imitiert nicht komplett den Status der frühen IPF. Es ist daher in großem Interesse dieses Modell zukünftig weiter auszuarbeiten (Alsafadi et al. 2017).

Auch in Bezug auf infektiologische Erkrankungen, wie Infektionen mit Adenoviren, Influenzaviren, Respiratory Syncytial Virus oder Chlamydomphila pneumoniae wurden Lungengewebschnitte verwendet, um die respiratorische Pathogenese und den Replikationszyklus dieser zu untersuchen (Rosales Gerpe et al. 2018). Ein limitierender Faktor aller Untersuchungen an PCLS stellt die zeitlich begrenzte Viabilität in Kultur dar.

1.6.3 Kryokonservierung von PCLS

Wie zuvor bereits beschrieben sind PCLS in Kultur nur zeitlich beschränkt vital. Ein weiterer Fortschritt in der Benutzung der PCLS wurde durch die Kryokonservierung und der damit einhergehenden Möglichkeit einer späteren Nutzung hervorgerufen (Liu et al. 2019). Speziell für pharmakologische und toxikologische Untersuchungen ist es von großem Interesse humanes Material zu verwenden. Dafür ist jedoch eine geeignete Lagerung notwendig, die das optimale Nutzen von dem gering zur Verfügung stehenden Material gewährleistet. Auch sind oftmals wiederholte Versuche mit gewissem Zeitabstand an Gewebeschnitten des gleichen Ursprungs notwendig. Dies verdeutlicht die Bedeutsamkeit, die Kryokonservierung von Gewebeschnitten zu perfektionieren (Glöckner et al. 1998). Ein weiterer Vorteil der Kryokonservierung von Gewebeschnitten ist, dass übrig gebliebene Schnitte weggefroren werden können, um diese zu einem späteren Zeitpunkt zu verwenden. Oftmals werden aus einer gerade verfügbaren Lunge mehr Schnitte produziert als für das Experiment benötigt werden (Graaf und Koster 2003).

Die Kryokonservierung von Gewebeschnitten kann als erfolgreich betrachtet werden, wenn die Schnitte nach dem Auftauen eine funktionelle Viabilität für eine suffiziente Zeitperiode aufweisen. Zur Überprüfung dieser Viabilität wurden einige Verfahren getestet. Zu den in Publikationen regelmäßig verwendeten Parametern gehören die Messungen der Aktivität von metabolischen Enzymen, wie die Bestimmung von 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) und Parameter, die die generelle Zelltoxizität widerspiegeln, wie die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) (Maas et al. 2000a).

Die Viabilität kryokonservierter muriner Lungengewebschnitte wurde bereits vielfach untersucht, in Bezug auf humane Schnitte ist das Wissen jedoch noch beschränkt. Im Folgenden soll auf wichtige aktuelle Ergebnisse der Forschung an kryokonservierten PCLS eingegangen werden.

Die Anwendung von kryokonservierten PCLS wurde im Jahre 2014 von Rosner et al. beurteilt. Es wurde demonstriert, dass die Möglichkeit besteht, murine PCLS zu kryokonservieren und letztendlich wieder aufzutauen sowie zu einem späteren Zeitpunkt für Untersuchungen der Atemwegsreaktivität zu verwenden. Rosner et al. kam zu dem Ergebnis, dass Kryokonservierung zu keinem steigenden Zelltod oder Beschädigungen der Gewebestruktur führt, ebenso beeinflusst der Prozess nicht die Atemwegskontraktilität auf Methacholin sowie die Relaxation auf Chloroquin. Der LDH-Assay wurde zur Messung der Zellzytotoxizität angewandt, hier

Einleitung

konnte kein signifikanter Unterschied zwischen gefrorenen und ungefrorenen PCLS festgestellt werden. Mittels MTT Assay konnte eine Reduktion der enzymatischen Aktivität gezeigt werden.

Erstmalig konnte also veranschaulicht werden, dass es ein Verfahren gibt murine PCLS einzufrieren und wieder aufzutauen und dabei eine unveränderte Reaktion auf Methacholin und Chloroquin aufrechtzuerhalten (Rosner et al. 2014).

Wie zuvor beschrieben wurde bereits im Jahre 1994 durch Fisher et al. gezeigt, dass PCLS für toxikologische Untersuchungen geeignet sind. Hieran wurde angeknüpft und die Brauchbarkeit an kryokonservierten PCLS getestet.

Als zu testendes Toxin wurde Zinkchlorid ($ZnCl_2$) verwendet, eine Chemikalie, die bekannt ist für ihre Lungentoxizität. Zum Vergleich wurden auch zwei Zelllinien verwendet, die bereits in toxikologischen Untersuchungen getestet wurden, ebenso fand eine in-vivo-Kontrolle durch intratracheale $ZnCl_2$ Instillation und anschließende bronchoalveoläre Lavage statt. Zur Evaluation der metabolischen Aktivität wurde auch der MTT Assay verwendet, ebenso fand eine Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate assay (TMRE) statt. TMRE akkumuliert in aktiven Mitochondrien, sodass beschädigte Mitochondrien ein schwächeres Fluoreszenzsignal produzieren. Des Weiteren fand eine Bestimmung von Cytochrom p450 statt, um eine Aussage über die metabolische Kompetenz zu treffen. Die Induktion von oxidativem Stress wurde anhand der Glutathion S-Transferase (GST), einem wichtigen Antioxidans, ermittelt. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied sowohl der Cytochrom p450 Level des mitochondrialen Membranpotentials als auch der Glutathion Konzentration zwischen frischen und kryokonservierten PCLS. Beide Gruppen wiesen jedoch eine ähnliche Antwort auf $ZnCl_2$ auf, auch in Hinblick auf die Inkubation in steigenden $ZnCl_2$ Konzentrationen. Die Ergebnisse der Zelllinien lieferten vergleichbare Aussagen. Auch die in-vivo-Daten zeigten eine $ZnCl_2$ dosisabhängige Lungenschädigung und Glutathion Reduktion, wie im ex- vivo PCLS Experiment beobachtet. Die Autoren schlossen daher darauf, dass kryokonservierte PCLS als ein realisierbares Modell zur Anwendung in der toxikologischen Forschung geeignet sind (Watson et al. 2016).

Einleitung

2016 wurde von Bai et al. veröffentlicht, dass eine Biobank von kryokonservierten humanen PCLS (hPCLS) eine stabile Möglichkeit für die Forschung der Lungenphysiologie und Lungenerkrankungen wiedergibt. Es wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Kryokonservierung nur einen geringen Einfluss auf die Zellviabilität und die Funktionen von Immunzellen (Phagozyten und T-Lymphozyten) hat. Auch wurde die Kontraktion und Relaxation der Atemwege nach Kryokonservierung untersucht. Diese zeigte keinen Unterschied bezüglich der Reaktion der frischen PCLS. Die Viabilität wurde anhand der freigesetzten LDH im Kulturmedium gemessen. Die Ergebnisse erbrachten, dass ein minimaler Zelltod bzw. Apoptoseinduktion nach dem Auftauen stattfindet, jedoch konnten mikroskopisch keine strukturellen Parenchymveränderungen und Veränderungen des Zilienschlages im Epithel der Atemwege beobachtet werden. Es gelang auch erstmals die Aktivität der Phagozyten in hPCLS zu demonstrieren. Die spezifische Antwort einzelner Zelltypen stellt ein besseres Kriterium für die erhaltenen Zellfunktionen dar. Da die Funktion der Immunzellen eine wichtige Rolle in der Abwehr hat wurde hierauf ein Fokus gelegt. Die hPCLS wurden mit fluoreszierend markierten Escherichia coli inkubiert, anschließend konnte in den kryokonservierten hPCLS aktive Phagozytose durch intrazellulär fluoreszierende Partikel in den Phagozyten beobachtet werden (Bai et al. 2016) .

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus auch die Differenzierung der Pneumozyten Typ II sowie deren Surfactant Produktion nach Kryokonservierung untersucht. Allgemein hat Surfactant zwei wesentliche Aufgaben. Zum einen verringert es die Oberflächenspannung und zum anderen spielt es eine Rolle in der Immunabwehr der Lunge. Surfactant besteht zu 90 % aus Lipiden und zu 10 % aus Proteinen. Es gibt vier Surfactant spezifische Proteine: Surfactant Protein (SP) A, SP-B, SP-C, SP-D (Dobbs 1989). In dieser Arbeit wurden SP-B und SP-C untersucht.

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine optimale Methode zur Kryokonservierung von murinen und humanen Lungengewebeschnitten herauszuarbeiten, um diese für Forschungszwecke auch über einen längeren Zeitraum verwenden zu können. Die zeitlich eingeschränkte Viabilität der PCLS stellt ein Problem dar, wie auch das begrenzt verfügbare humane Material, sodass Kryokonservierung eine Lösung der limitierten Verfügbarkeit und Viabilität sein könnte. Hierzu ist es notwendig eine Methode zu erforschen, die eine Lagerung über einen längeren Zeitraum ermöglicht und zugleich keine gravierenden negativen Auswirkungen auf die Zellen des Gewebes und deren Funktionen hat. Die Anwendung an murinen PCLS wurde zuvor schon zahlreich untersucht, während die Forschungen in Bezug auf humanes Gewebe noch beschränkt sind. Kryokonservierung wird bereits erfolgreich an verschiedenen Geweben verwendet, wie z. B. Spermien, Eizellen und Lebergewebe. Ein erstrebenswertes Ziel wäre es, dies auf Lungengewebe zu erweitern, um das verfügbare Material für Experimente optimal nutzen zu können. Diese Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten, indem verschiedene Medien zur Kryokonservierung muriner PCLS verglichen und diese bei humanen PCLS angewendet wurden, sowie die Viabilität der PCLS in Kultur über mehrere Tage beobachtet wurde. Es stellten sich die folgenden Fragen:

1. Inwieweit hat die Kryokonservierung von PCLS Einfluss auf deren Viabilität und die Surfactantproduktion?
2. Kann durch die Verwendung von Trehalose als Kryoprotektivum eine bessere Vitalität erzielt werden?
3. Wie reagiert humanes Lungengewebe auf die Kryokonservierung?

Die konkreten Ziele der Untersuchungen waren:

- Quantifizierung von Zelltod und Zellyse mit Hilfe der Messung der LDH-Aktivität.
- Messung der enzymatischen Zellaktivität.
- Detektierung lebender differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II.
- Immunologischer Nachweis Zelltod markierender Proteine (gespaltene Caspase 3) und Proteine des Surfactantsystems (Sp-B, Sp-C).

2. Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-Well Mikrotestplatte	Sarstedt
Apoptom	Zeiss
Biopsiestanze 6 mm	Miltex
Blot Papier: Whatmann 3 mm	GE Healthcare
Chemilumineszenz- Imager Intas Chemostar	Intas
Cryo-Pure Gefäß	Sarstedt
Deckglas	Engelbrecht
Elektrophoresis Power Supply EV231	Consort
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml-2 ml	Sarstedt
Falcon Gefäße 50 ml	Greiner Bio-One
Flüssigstickstoff	
Gefrierschränke (+4 °C, -20 °C, -80 °C)	Comfort
Gelelektrophorese Laufkammer Mini Protean	BIO-RAD
Glasplatten Gelelektrophorese Mini Protean 3 System	BIO-RAD
<ul style="list-style-type: none"> • Short Plates • Spacer Plates mit 1,5 mm Spacer 	
Heizblock	VLM
Homogenisator Precellys	Bertin
Inkubator	
<ul style="list-style-type: none"> • Heracell 150i • Function Line UT6 	Thermo Scientific Heraeus Instruments

Material und Methoden

Magnetrührer

- IKA RH basic 2 IKA Werke
- MR 2002 Heidolph

Mikrotiterplatten Reader

Tecan; infinite M200 pro

Mikrowelle 900 & Grill

Severin

Objektträger

Petrischale

Sarstedt

pH-Meter Seven Compact

Mettler Toledo

Pipetboy

Hirschmann

Pipetten 1000 - 100 - 10

Eppendorf

Pipettenspitzen 1000 μ l – 200 μ l – 10 μ l

Sarstedt

Rasierklingen

Wilkinson

RM5 Schüttler

Cat; Zipperer

Scalpel

Feather

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

BIO-RAD

Transfermembran 0,45 μ m Immobilin-P

Merck Millipore

Versiegelungsfolie für Mikrotiterplatte

Thermo Scientific

Vibrationsmikrotom HM 650 v

Thermo Scientific

Vortexer

- IKA Vibrax VXR IKA Werke
- Vortex Genie 2 scientific Industries

Waage

- AB 54 Mettler Toledo
- PB801 Mettler Toledo

Wasserbad TX 12

Julabo

Zellkulturflaschen

Greiner bio-one

Zellkulturplatten 96–24 Well

Sarstedt

Material und Methoden

Zellsieb Falcon 100 µm	Corning
Zentrifuge Mikro 200 R	Hettich

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Albumin Fraktion V	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
Bromphenolblau	Merck
Certified Low Melt Agarose	BIO-RAD
CO ₂ Independent Medium	Gibco
D (+) -Trehalose	Roth
Dimethylsulfoxid	Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	Gibco
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) with D-Glucose und Sodium Pyruvate	Lonza
EDTA	Merck
Fetales Kälber Serum (FKS)	Sigma Aldrich
Glycin	Roth
Immobilon Western (Chemiluminescent HRP Substrat)	Millipore
LysoTracker Green DND - 26	Thermo Scientific
Methanol	Sigma Aldrich
Milchpulver	Roth
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Sigma Aldrich
Page Ruler Prestained Ladder	Thermo Scientific

Material und Methoden

Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma Aldrich
Rotiphorese Gel 30	Roth
SDS- Pellets	Roth
Sodium deoxycholate	Sigma Aldrich
TEMED	Roth
Tricine Sample Buffer	BIO-RAD
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich

2.1.3 Verwendete Kits

Verwendete Kits	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
Halt Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells	Thermo Scientific
MTT cell Proliferation Assay	ATCC
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

Anti-beta Actin Antikörper, rabbit
polyclonal

Hersteller

abcam (ab8227)

Anti-Mature SP-C, rabbit polyclonal

Seven Hills
(WRAB-76694)

Anti-Pro + Mature Surfactant Protein B
antibody, rabbit polyclonal

abcam (ab40876)

Gespaltene Caspase-3, rabbit monoclonal

cellsignal (#9664)

Sekundärantikörper

Schwein anti-Kaninchen-IgG, HRP-
gekoppelt

Dako (P0217)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die Analyse des murinen Lungengewebes wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse gleicher Anzahl des Zuchtstammes C57 BL/6N verwendet, die zum Zeitpunkt der Experimente 12 Wochen alt waren. Diese wurden über die Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH in Sulzfeld, bezogen.

Die Genehmigung für die Tierversuche wurde durch das Regierungspräsidium Gießen eingeholt und ist unter dem Aktenzeichen Gi20/10- A53/2012 einsehbar.

2.2.2 Humanes Lungengewebe

Für die Analyse des humanen Lungengewebes wurden explantierte Lungen von Patienten des Europäischen IPF Registers verwendet. Diese stehen dem UGMLC durch eine Kooperation mit dem Universitätsklinikum Wien (Thoraxchirurgie, Prof. Dr.med. Walter Klepetko) zur Verfügung. Es wurde präferentiell Gewebe von Donorlungen (verfügbar wegen atypischer Resektionen zur Größenanpassung) untersucht.

Die Untersuchungen des Lungengewebes sind durch das entsprechende Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen abgedeckt und unter dem Aktenzeichen Nr.111/08, Europäisches IPF Register (eurIPFreg) einsehbar.

2.2.3 Präparation der Mäuse

Zur Gewinnung des murinen Lungengewebes wurden die Mäuse zuerst mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Sowohl das Abdomen als auch der Thorax wurden mit einer Präparationsschere eröffnet und freipräpariert. Zunächst wurde ein Hautschnitt von Larynxhöhe bis zum Beckenbereich gesetzt und eine Sternotomie vorgenommen. Anschließend wurde die Vena cava inferior durchtrennt, sodass die Maus ausblutete. Damit die Lunge zum weiteren Gebrauch blutleer ist, wurde diese über das rechte Herz mit 37 °C vorgewärmter Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gespült. Dazu wurde eine 20 ml Spritze mit einer 20 G Kanüle in den rechten Ventrikel eingebracht. Es wurde ein Faden unter der Trachea durchgezogen und leicht verknötet. Anschließend konnte ein 20 G Venenverweilkatheter mit einer 1 ml Spritze in die Trachea vorgeschoben werden. Über diesen Zugang wurde die Lunge mit 1,5 % Certified Low Melt Agarose, die in DPBS und CO₂ Independent Medium zuvor aufgekocht und dann auf 37 °C gewärmt wurde, befüllt. Das Volumen einer Mauslunge

beträgt ungefähr 1 ml, deshalb wurde darauf geachtet, nicht mehr Agarose in die Lunge zu füllen, um das Gewebe nicht zu beschädigen. Der Knoten um die Trachea wurde festgezogen, damit die Agarose nicht mehr entweichen konnte und die Lunge vorsichtig aus dem Situs herausgeschnitten und in eiskaltes DPBS überführt.

Die Handhabung der Versuchstiere sowie die Präparation der Mäuselungen erfolgte durch die Tierärztin Dr. med. vet. Ingrid Henneke sowie die Medizinisch-technische Assistentin Stefanie Hezel.

2.2.4 Herstellung von Präzisionsschnitten der Lunge (PCLS)

Die mit 1,5 % Certified Low Melt Agarose gefüllte Lunge wurde zunächst in einem Falcon Gefäß in DPBS auf Eis gelagert, damit die Agarose hart wurde.

Anschließend wurde jeder einzelne Lungenlappen abpräpariert und auf dem Vibratom (Mikrom HM 650 V) positioniert. Es wurden murine Lungengewebschnitte mit einer Dicke von 250 μm und humane Lungengewebschnitte von 500 μm hergestellt. Anschließend wurden die PCLS in CO_2 Independent Medium, versetzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin, für 2 h 30 min auf einem Schüttler im Inkubator bei 37 °C gelagert, wobei nach einer Stunde ein Mediumwechsel stattfand. Die Inkubation war notwendig, um die in den PCLS gebundene Agarose wieder zu lösen.

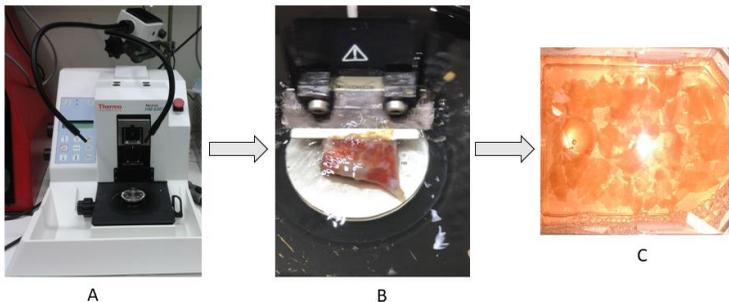


Abb. 8: Herstellung der Lungengewebschnitte mittels Vibratom. A: Vibratom (Mikrom HM 650 V) von Thermo Scientific, B: Lungenlappen positioniert zum Schneiden, C: PCLS in CO_2 Independent Medium, versetzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin zum Lösen der Agarose.

2.2.5 Kultivierung der PCLS

Zur Kultivierung der PCLS wurde je ein Schnitt in einem Well einer 24-Well Zellkulturplatte mit 1 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum (FKS) in einem Zellinkubator bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 95 % O₂ inkubiert. Für die Inkubation der humanen Lungengewebschnitte wurde anstatt FKS 10 % humanes Serum (HS) verwendet.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 24 h. Die PCLS wurden über 5 Zeitpunkte untersucht, nach 2 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in Kultur nach Herstellung der Präzisionsschnitte bzw. nach Auftauen und anschließender Kultur.

2.2.6 Kryokonservierungs- und Auftaustrategie der PCLS

Zur Kryokonservierung der murinen Lungengewebschnitte wurden vier verschiedene Medien getestet:

Medium 1: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS

Medium 2: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 %
Dimethylsulfoxid (DMSO)

Medium 3: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 %FKS + 10 %
DMSO + 50 mmol/l Trehalose

Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 %FKS + 10 %
DMSO + 200 mmol/l Trehalose

Die Kryokonservierung der humanen PCLS erfolgte lediglich mit einem Medium, da hierfür nur eine begrenzte Materialanzahl vorhanden war.

Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 %
DMSO + 200 mmol/l Trehalose

Es wurden je 5 PCLS in einem Kryogefäß mit 2 ml des entsprechenden Mediums platziert. Es wurde eine langsame Einfrieremethode angewandt. Die Kryogefäße wurden zuerst für 30 min auf Eis bei 0 °C gelagert und anschließend bei -80 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden diese dann in flüssigen Stickstoff bei -196 °C zur Lagerung für eine Woche überführt.

Am Tag des Experimentes wurde jedes Kryogefäß mit den PCLS schnell in einem Wasserbad

bei 37 °C aufgetaut. Die PCLS wurden anschließend vorsichtig in ein 50 ml Falcon Gefäß überführt und zweimal für 10 min mit DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen, um das DMSO und die verwendete Trehalose zu lösen.

2.2.7 Bestimmung der Zytotoxizität mittels Lactatdehydrogenase (LDH) Detection Kit

Zur Quantifizierung von Zelltod und Zellyse ist der Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche verwendet worden. Dieser basiert auf einer kalorimetrischen Messung der LDH-Aktivität, die aus dem Zytosol der geschädigten Zellen in den Mediumüberstand freigesetzt wird. LDH ist ein Enzym, das in dem Zytoplasma aller Zellen vorkommt und bei einer Störung der Zellmembranintegrität freigesetzt wird und daher in den Zellkulturüberstand gelangt. Die Menge der Enzymaktivität, die im Überstand der PCLS detektiert wurde, korreliert proportional mit den lysierten Zellen. LDH ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorkommt. Im ersten Schritt reduziert LDH NAD^+ zu NADH^+ und H^+ durch die Oxidation von Lactat zu Pyruvat. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden zwei Wasserstoffatome mithilfe eines Katalysator (Diaphorase) von NADH^+ und H^+ auf das gelbe Tetrazoliumsalz übertragen, welches dadurch zu rotem Formazan Salz reduziert wird, dieses wird kalorimetrisch mittels Elisa Reader erfasst (Kumar et al. 2018).

Zur Durchführung des Experimentes wurden sowohl ungefrorene PCLS als Kontrolle als auch PCLS, die für eine Woche kryokonserviert und anschließend aufgetaut wurden, untersucht. Dazu wurden PCLS mit allen vier oben beschriebenen Medien getestet.

Diese wurden wie bereits beschrieben schnell in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und anschließend zweimal für 10 min mit DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen. Je ein PCLS wurde dann in 1 ml DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS in einem Well einer 24-Well Zellkulturplatte platziert und im Zellkulturschrank kultiviert. Untersucht wurde das LDH-Gehalt im Überstand nach 2 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in Kultur. Hierzu wurde jeweils 1 ml Medium des PCLS abpipettiert und bei -80 °C weggefroren, zu jedem PCLS wurde erneut 1 ml frisches Medium gegeben. Dies wurde zu allen Zeitpunkten wiederholt. Nach 96 h in Kultur wurde zusätzlich zu dem abpipettierten Überstand der PCLS in 1 ml DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 1 % Triton X-100 überführt, um den Schnitt vollständig abzutöten und das verbliebene LDH des Schnittes in den Überstand freizusetzen. Das LDH-Gehalt im Überstand des gelösten PCLS (Pellet) diente zur Normierung der einzelnen PCLS. Die Ergebnisse wurden somit als Prozentsatz des gesamten LDH- Gehalts dargestellt, welches aus dem mit Triton X-100 lysierten PCLS berechnet wurde. Zur Messung

der LDH Aktivität wurden die jeweiligen Überstände aufgetaut, gevortext und je 100 µl auf eine Elisaplatte pipettiert. Es wurde je 100 µl Reaktionsgemisch dazu pipettiert und die Platte bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 10 min inkubiert. Zur Kontrolle der Hintergrundaktivität im Medium wurde ebenfalls der LDH Gehalt im Kultivierungsmedium gemessen, der anschließend von den Proben subtrahiert wurde. Die Absorption der Proben wurde mit 490 nm bei einer Referenzwellenlänge von 600 nm mittels Mikrotiterplattenleser (TECAN infinite 200M) bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$\text{LDH-Überstand (t}_1\text{)} / (\text{LDH-Überstand (t}_1\text{)} + (\text{LDH-Pellet (t}_1\text{)}))$$

Um die gesamte LDH Freisetzung zu berechnen, wurde die Menge der Zeitpunkte jeweils addiert. ($t_1 = t_1$; $t_2 = t_1 + t_2$; ...; $t_5 = t_1 + t_2 + t_3 + t_4 + t_5$). Die LDH Freisetzung ist proportional zur Beeinträchtigung der Membranstabilität und daher auch mit der Viabilität der PCLS. Die Vitalitätsbestimmung über 96 h erfolgte, um einen Überblick darüber zu erlangen, wie lange die Lungengewebsschnitte kultiviert werden können.

Die Gruppengröße betrug jeweils 5 PCLS und das Experiment wurde an 3 Mäusen unabhängig voneinander durchgeführt.

Analog erfolgte der Versuch jeweils an 5 humanen PCLS und wurde an 3 verschiedenen Spenderlungen unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.8 Bestimmung der enzymatischen Zellaktivität mittels MTT Assay

Die Messung der enzymatischen Zellaktivität wurde mit einem MTT Cell Proliferation Assay von ATCC durchgeführt. Der Versuch wurde analog der Produktinformation des Herstellers durchgeführt. Er wurde 1980 zum Goldstandard um Zellviabilität und Proliferation zu bestimmen, seitdem er von Mosmann entwickelt wurde (Mosmann 1983). Das gelbe Tetrazolium MTT wird durch metabolisch aktive Zellen durch die Wirkung von mitochondrialen Dehydrogenase Enzymen reduziert, sodass sich intrazellulär lilanes Formazan bildet, welches spektrophotometrisch quantifiziert werden kann.

Für die Durchführung des Experimentes wurden sowohl ungefrorene PCLS als auch kryokonservierte PCLS mit den zuvor beschriebenen Medien verwendet, und für jeweils 2 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in DMEM/F-12+1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS kultiviert. Die Schnitte wurden mit einer Biopsiestanze auf einen Durchmesser von 6 mm normiert und anschließend jeder Schnitt auf einer 96-Well Zellkulturplatte in 100 µl DPBS, welches 500 ng/ml MTT enthielt, für 2 h 30 min bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die PCLS in 200 μ l 100 % DMSO überführt und solange gevortext, bis sich das Formazan vollständig aus dem PCLS gelöst und sich somit dieser entfärbt hatte.

Es wurden je 100 μ l der Lösung auf eine Mikrotiterplatte gegeben und die Menge des gelösten Formazan bei einer Absorption von 570 nm gemessen.

Zur Hintergrundkontrolle wurde ebenso nur die Absorption von 100 % DMSO gemessen.

Die Gruppengröße betrug jeweils 4 PCLS und das Experiment wurde an 3 Mäusen unabhängig voneinander durchgeführt. Für die humanen Lungengewebsschnitte wurden wieder je 5 PCLS von 3 verschiedenen Spenderlungen verwendet, sodass sich eine Gruppengröße von insgesamt 15 PCLS je untersuchter Entität ergab.

Alle Gruppen wurden untereinander mit dem T-Test verglichen und die Ergebnisse mittels Bonferroni Korrektur angepasst. Der Versuch wurde ebenso über einen Zeitraum von 96 h durchgeführt.

2.2.9 Lebend-/Totfluoreszenzfärbung

Zur Bestimmung der Viabilität wurde der LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells* von Thermo Scientific verwendet. Er beinhaltet Calcein-AM und Ethidium homodimer-1. Mit diesem Assay konnte mithilfe einer zwei-Farben-Fluoreszenzfärbung die Viabilität der PCLS dargestellt werden. Es wurde die intrazelluläre Esteraseaktivität gemessen und die Plasmamembranintegrität dargestellt. Lebende Zellen zeichnen sich durch intrazelluläre Esteraseaktivität aus, die das nicht fluoreszierende Calcein-AM in intensiv fluoreszierendes Calcein umwandelt, welches eine grüne Fluoreszenz (~ 495 nm) erzeugt. Ethidium homodimer-1 tritt in Zellen mit einer beschädigten Plasmamembran ein und bindet an Nukleinsäuren im Zellkern, wodurch eine leuchtend rote Fluoreszenz (~ 530 nm) produziert wird (Merdassi et al. 2011).

Die Lungenpräzisionsschnitte wurden nach der jeweiligen Kultivierungszeit (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) auf einer 24-Well-Zellkulturplatte in 1 ml DPBS mit 1 μ M Calcein-AM und 2 μ M Ethidium homodimer-1 für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden diese 2-mal für 5 min in DPBS gewaschen und auf einem Objektträger platziert. Die Schnitte wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops mit 10-facher Vergrößerung fotografiert. Es wurden die Reflektoren GFP für grün und DsRed für rot verwendet. Das Experiment wurde an je 3 PCLS und 3 verschiedenen Mäusen pro Versuchsansatz unabhängig voneinander durchgeführt und an je 3 humanen PCLS und 3 verschiedenen Donorlungen.

2.2.10 Fluoreszenzfärbung mit LysoTracker Green zur Markierung differenzierter Pneumozyten Typ II

LysoTracker Green DND-26 von ThermoFisher Scientific ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der in Zellen saure Kompartimente anfärbt. Er akkumuliert in Lamellarkörpern der Typ-II-Pneumozyten und markiert somit lebende differenzierte Alveolarepithelzellen Typ II (van der Velden et al. 2013). Es wurde gezeigt, dass er sich selektiv in den sauren Lamellarkörpern von Alveolarepithelzellen Typ II (AEC II) konzentriert und diese daher mikroskopisch detektiert werden können. Lamellarkörperchen sind sekretorische Organellen, die sowohl in der Lunge in Alveolarepithelzellen Typ II vorkommen als auch in Keratozyten der Haut (Andreeva et al. 2007). Alveolarepithelzellen Typ II sind spezialisierte Epithelzellen, die in der Lunge wesentlich für die Surfactant Produktion und Sekretion verantwortlich sind (van der Velden et al. 2013). Surfactant wird durch Exozytose der Lamellarkörpern von AEC Typ II sekretiert. Mittels LysoTracker Green, der sich in den sauren Lamellarkörpern anreichern konnte so diese Exozytose detektiert werden, was für eine noch vorhandene Surfactantproduktion spricht (Ashino et al. 2000).

Zur Versuchsdurchführung wurde je ein PCLS in einer 24-Well Zellkulturplatte in 1 ml DPBS mit 100 nM LysoTracker Green DND-26 für 30 min bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert und anschließend in DPBS für 5 min gewaschen. Die Schnitte wurden mittels Fluoreszenzmikroskop auf einem Objektträger bei einem Emissionsmaximum von 511 nm in 10-facher Vergrößerung betrachtet. Es wurden ebenso PCLS nach 5 Kultivierungszeiträumen (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) untersucht. Die Gruppengröße betrug je 3 PCLS und wurde an 3 verschiedenen Mäusen und 3 verschiedenen humanen Spenderlungen unabhängig voneinander durchgeführt. Mittels ImageJ wurden die AEC Typ II anschließend quantifiziert.

2.2.11 Proteinisolation aus den Präzisionsschnitten der Lunge

Für die Proteinisolation aus den PCLS wurden je 3 murine PCLS, bzw. 3 humane PCLS, mit 200 µl Lysispuffer versetzt und ein Protease- und Phosphatase-Inhibitor Single-Use Cocktail in einer Konzentration von 1:100 hinzugegeben. Der Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Mix diente dazu die Proteine während des Extraktionsvorganges zu schützen.

Chemikalie	Konzentration
Tris	50 mM
Natriumchlorid	50 mM
EDTA	5 mM
Triton X-100	1,00 %
Natriumdeoxycholat	0,50 %

Tab. 4: Zusammensetzung des Protein Lysispuffers

Die PCLS wurden dann mit dem Homogenisator Precellys zerkleinert und für 1 h auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde die Lösung für 10 Minuten bei 5000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut auf Eis gestellt, das Zellpellet wurde verworfen.

2.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Als Grundlage für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Dieser Assay beruht auf der Biuret-Methode, bei der es mittels eines Komplexes aus Bicinchoninsäure (BCA) und Cu^+ zu einem violetten Reaktionsprodukt kommt, das kalorimetrisch gemessen werden kann. Die in der Probe vorhandenen Proteine reduzieren in einem alkalischen Medium Cu^{2+} zu Cu^+ , welches daraufhin einen Komplex mit BCA bildet. Das violette Reaktionsprodukt, welches sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat, wird aus zwei Molekülen BCA und einem Molekül Cu^+ gebildet. Diese Methode der Proteinbestimmung wurde von P. K. Smith im Jahre 1985 veröffentlicht (Smith et al. 1985). Die Absorption verhält sich annähernd linear zu der vorhandenen Proteinkonzentration, sodass anhand einer Standardreihe, die aus Rinderserumalbumin mit bekannter Proteinkonzentration hergestellt wird, die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden konnte. Die Standardreihe wurde aus 2 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin) hergestellt, wobei die Konzentrationen 0 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml die Standardkurve bilden.

Material und Methoden

Eppi	Lysispuffer (µl)	BSA (µl)	BSA Konzentration (mg/ml)
1	0	300	2000
2	125	375	1500
3	325	325	1000
4	175	175 von Lösung aus Eppi 2	750
5	325	325 von Lösung aus Eppi 3	500
6	325	325 von Lösung aus Eppi 4	250
7	325	325 von Lösung aus Eppi 5	125
8	400	100 von Lösung aus Eppi 6	25
9	400	0	0

Tab. 5: Vorbereitung der Albumin Standardreihe

Es wurde im Doppelansatz gearbeitet. Auf einer 96-Well Mikrotiterplatte wurde je 25 µl pro Konzentration aufgetragen. Von den zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls je 25 µl in Doppelbestimmung pipettiert. Danach wurde jeweils 200 µl der Reaktionslösung des Kits in jedes Well dazu pipettiert. Die Reaktionslösung bestand aus 6 ml Reagenz A, das die Bicinchoninsäure enthält, und 125 µl Reagenz B, welches 4 % Kupfersulfat enthält. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie verschlossen und für 30 min bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend konnte mit einem Mikrotiterplattenleser (TECAN infinitepro 200M) die Absorption bei 562 nm gemessen werden und somit die Proteinkonzentration jeder einzelnen Probe ermittelt werden.

2.2.13 Vorbereitung der Proben

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 3:1 mit 4-fach SDS Probenpuffer, der ebenso 10 mM β -Mercaptoethanol enthält, versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, dadurch wurde eine Denaturierung der Proteine erreicht. Durch das SDS wurden die Ladungsverhältnisse angeglichen und daher eine Auftrennung im elektrischen Feld anhand der Proteingröße ermöglicht.

Chemikalie	Konzentration
SDS	5 %
Tris/HCL	25 %, 0,625 M, pH 6,8
Glycerol	40 %
Bromphenolblau	2 %
β -Mercaptoethanol	5 %

Tab. 6: Zusammensetzung des 4-fachen SDS Probenpuffers

2.2.14 SDS - Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Diese Methode wurde erstmals von Lämmli 1970 beschrieben (Brunelle und Green 2014). Mittels der Methode nach Lämmli wurde die Gelelektrophorese in dieser Arbeit in einer vertikalen Gelapparatur durchgeführt. Hierbei wandern die negativ geladenen Proteine auf Grund eines elektrischen Feldes durch Poren in einem Polyacrylamidgel in Richtung Anode. Die Porengröße des Gels steigt mit der Abnahme der Gelkonzentration, daher wurde die Konzentration an die zu untersuchende Proteingröße angepasst.

Tabelle 7 zeigt, welche SDS-Gel Konzentration für welche Proteingrößen genutzt wurde.

12 %	15 %
10 kDa–60 kDa	3 kDa–50 kDa

Tab. 7: SDS - Gelkonzentration in Abhängigkeit der Proteingröße

Das SDS-Polyacrylamidgel setzt sich aus zwei verschiedenen Komponenten zusammen. Zum einen aus dem Sammelgel, in welchem die Proteine bei einem neutralen pH-Wert fokussiert werden. Zum anderen aus einem Trenngel, welches bei einem basischen pH-Wert für die eigentliche Auftrennung der Proteine sorgt. Es wurden 4 % Sammelgele, und 12 % sowie 15 %

Material und Methoden

Trenngele verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden vertikale Gelapparaturen der Firma Biometra eingesetzt.

Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
1,125 M Tris/HCL, pH 8,8 30 % Saccharose	0,625 M Tris/HCL, pH 6,8

Tab. 8: Zusammensetzung von Trenngel- und Sammelgelpuffer

Trenngel			Sammelgel
12 %	15 %		4 %
8 ml	10 ml	Rotiphorese	1,33 ml
5,06 ml	3,06 ml	H₂O dest.	6,57 ml
6,66 ml	6,66 ml	Trenn-/ Sammelgelpuffer	2 ml
200 µl	200 µl	10 % SDS	100 µl
100 µl	100 µl	10 % APS	100 µl
20 µl	20 µl	Temed	10 µl

Tab. 9: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Die Gele wurden anschließend in eine Laufkammer der Firma BIO-RAD eingespannt und die Kammer mit einem SDS-PAGE Laufpuffer befüllt.

Chemikalie	Konzentration
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
10 % SDS	0,10 %

Tab.10: Zusammensetzung des SDS-PAGE Laufpuffers

Jedes Gel wurde mit einem Proteingrößenstandard der Firma Thermo Scientific (Page Ruler Prestaines Ladder) beladen, anhand dessen die Proteingröße bestimmt werden konnte. Es wurden jeweils 10 µg Protein der zu untersuchenden Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde dann bei konstanten 100 V für etwa zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.15 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot Methodik

Der Western- Blot wurde durchgeführt in Anlehnung an die 1984 beschriebene Methodik von J. Kyhse- Andersen (Kyhse-Andersen 1984). Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden beim Western Blot auf eine PVDF Membran transferiert. Hierbei wurde ein Halbtrockenblotverfahren in einer Transferzelle von Bio-Rad angewendet. Der Transfer der Proteine auf eine Membran war notwendig, um im Nachhinein die gewünschten Proteine bzw. Antigene mittels eines spezifischen Primär- und Sekundärantikörpers zu detektieren. Die PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und anschließend für 1 Minute in 100 % Methanol aktiviert, bevor sie in Transferpuffer zur weiteren Verwendung überführt wurde. Die Gele wurden ebenfalls in Transferpuffer für 10 Minuten equilibriert, ebenso wie auf die Größe der Gele angepasstes Blot Papier.

Chemikalie	Konzentration
Tris	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20 %

Tab.11: Zusammensetzung der Transferpuffer

Es wurde ein Transferstapel auf der Graphitanode der Transferapparatur aufgebaut. Hierfür wurden zuerst 3 Blot Papiere (Whatmann 3 mm) auf die Anode gelegt, darauf die Membran, möglichst luftblasenfrei, und dann wurde ebenfalls luftblasenfrei das Gel aufgebracht und zum Schluss noch einmal 3 Blätter Blot Papier. Der Stapel wurde mit der Graphitkathode bedeckt und die Transferzelle geschlossen. Der Proteintransfer wurde konstant bei 75 mA pro Gel in der Apparatur für 1 Stunde und 30 Minuten durchgeführt (Eslami und Lujan 2010).

2.2.16 Antikörperinkubation und Entwicklung

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran, wurde diese aus der Apparatur entnommen und in einer Lösung aus TBST und 5 % BSA für 45 Minuten geblockt, dies diente dazu, unspezifische Bindungsstellen auf der Membran für den Primärantikörper zu reduzieren.

Chemikalie	Konzentration
Tris/HCL	20 mM, pH 7,5
NaCl	50 mM
Tween 20	0,50 %

Tab.12: Zusammensetzung von TBST

Anschließend konnte die Membran in einer 5 % BSA Lösung mit dem in der spezifischen Konzentration angesetzten Primärantikörper bei 4 °C, unter Schütteln über Nacht inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden die Membranen zunächst dreimal für je 10 Minuten in TBST gewaschen und danach für eine Stunde in einem, gegen den Primärantikörper gerichteten Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

Dieser wurde in einer Konzentration von 1:1000 in einer 5 % BSA Lösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und auf dem Schüttler. Es wurde in Bezug auf den Primärantikörper ein gegen Kaninchen- IgG (hergestellt im Schwein) gerichteter Sekundärantikörper verwendet. Dieser bindet den Primärantikörper und konnte somit eine Brücke zwischen Primärantikörper und dem Rezeptorenzym bilden, das zur Darstellung gebraucht wurde.

Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers wurden die Membranen wieder dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen.

Im Folgenden war es möglich die Zielproteine auf der Membran darzustellen, dies erfolgte mittels Chemilumineszenz-Imager.

Die Membran wurde lichtabgeschirmt für 5 Minuten mit der Enhanced- Chemilumineszenz (ECL) Entwicklerlösung inkubiert und anschließend mit dem Intas Imager visualisiert. Die ECL Entwicklerlösung reagiert mit der im Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase, daher wird das in der ECL Lösung vorhandene Luminol oxidiert, wenn dieses in seinen Grundzustand zurückkehrt wird Licht emittiert, welches dann aufgenommen werden kann.

2.2.17 Verwendete Primärantikörper

Gespaltene Caspase 3

Caspase-3 stellt ein Enzym dar, welches an einem wesentlichen Schritt der Apoptose beteiligt ist. Während der Apoptose wird Caspase-3 in eine gespaltene (aktivierte) Caspase-3 überführt. Die Spaltung der Caspase-3 kann gemessen werden, um dann eine Aussage über die Apoptose mittels Western Blot-Methodik zu treffen. Der Mechanismus der Apoptose ist sehr komplex. Es gibt zwei Hauptwege, einen extrinsischen und intrinsischen. Beide Wege initiieren die Spaltung der Caspase-3, die im Folgenden die DNA Fragmentierung und den Abbau des Zytoskeletts einleitet (Elmore 2007).

Matures Sp-B

Surfactant Protein B gehört zu den hydrophoben Proteinen und wird in Alveolarepithelzellen Typ II und in Clara-Zellen exprimiert. Neben der Surfactantbildung hat SP-B auch Funktion in der Immunabwehr, indem es an bakterielle Lipopolysaccharide binden kann (Haagsman und Diemel 2001).

Matures Sp-C

Surfactant Protein (SP) C wird als Proprotein ausschließlich in Alveolarepithelzellen Typ II produziert. Mit nur 33 bis 35 Aminosäuren ist es das kleinste und hydrophobste Surfactant Protein. Die Funktion von SP-C ist im Wesentlichen identisch mit der von SP-B (Haagsman und Diemel 2001).

2.2.18 Densitometrische Auswertung der Immunoblots

Die densitometrische Auswertung der Immunoblots erfolgte mit der Computer Software ImageJ.

2.2.19 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware Graph Pad Prism 8.4.3 und der Statistiksoftware SAS University Edition. Zur Prüfung der Normalverteilung der Daten wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Die überprüfte Normalverteilung der Daten, erlaubte in allen Analysen eine Anwendung des Zweistichproben T-Test. Die Ergebnisse wurden mittels Bonferroni Korrektur angepasst. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet. Die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit wurde wie folgt in den Abbildungen dargestellt.

- p-Wert < 0,05: Irrtumswahrscheinlichkeit liegt unter 5 %, gekennzeichnet durch einen Stern (*)
- p-Wert < 0,01: Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 1 %, gekennzeichnet durch zwei Sterne (**)
- p-Wert < 0,001: Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 1 ‰, gekennzeichnet durch drei Sterne (***)

Mit der Statistiksoftware SAS wurde die Prozedur MIXED für eine repeated measures analysis (wiederholte Messungen) angewandt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Die Bilder aus der Fluoreszenzfärbung, Lyotracker Green Färbung sowie die Western Blots wurden mit „Microsoft PowerPoint“ von Microsoft bearbeitet. Es erfolgte zunächst eine densitometrische Auswertung der Bandenintensität mittels der Software ImageJ. Die somit erhaltenen Intensitätswerte wurden als Diagramme dargestellt und statistisch ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Zytotoxizität mittels LDH Detection Kit

3.1.1 Murine PCLS

Mit Hilfe der prozentualen LDH Freisetzung aus den PCLS wurde der Umfang des Zelltodes in Abhängigkeit des Kryopräservierungsmedium ermittelt. Folgende Medien wurden getestet: Medium 1: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS, Medium 2: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, Medium 3: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose.

Es konnte zwischen der Kontrollgruppe und den kryokonservierten murinen PCLS zu allen gemessenen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der LDH Freisetzung nach Kryokonservierung festgestellt werden (siehe Abb.9). Die höchste LDH Freisetzung (%) wiesen Lungengewebschnitte auf, die mit Medium 1 kryokonserviert wurden (18,5 % nach 2 h Inkubationszeit), die niedrigsten Werte konnten mit Medium 4 (10,8 % nach 2 h Inkubationszeit) erzielt werden. Im Vergleich hierzu zeigten die frischen PCLS nach 2 h Inkubationszeit nur eine LDH Freisetzung von 2,4 %. Nach 24 h Inkubation konnte bereits eine LDH Freisetzung der frischen PCLS von 11 % festgestellt werden, nach Kryokonservierung mit Medium 4 sogar ein fast doppelt so hoher Anstieg auf 20 %.

Darüber hinaus zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Medien 1 und 2. Ebenso verhielt es sich für Medium 1 und 3, mit der Ausnahme zum Zeitpunkt 24 h, da sich hier eine signifikant geringere LDH Freisetzung der Gruppe von Medium 3 zeigte. Für Medium 2 und 3 prägten sich ähnliche Ergebnisse aus, auch hier bestand lediglich zum Zeitpunkt 24 h eine signifikant niedrigere LDH Freisetzung der Gruppe von Medium 3. Für Medium 4 konnten differente Ergebnisse ermittelt werden, hier zeigte sich zu allen Zeitpunkten und im Vergleich mit allen anderen Einfriermedien ein signifikanter Unterschied. Die LDH Freisetzung war bei diesem Medium (4) geringer.

Mittels Prozedur mixed für repeated measure analysis des Statistikprogrammes SAS wurde gezeigt, dass sich die verschiedenen Gruppen, also die unterschiedlichen Medien, signifikant unterscheiden. Auch wurde festgestellt, dass eine signifikante zeitliche Dynamik besteht und der

Ergebnisse

LDH Gehalt über den untersuchten Zeitraum signifikant ansteigt. Jedoch ergab sich aus der Verknüpfung aus Zeit und Gruppe kein signifikantes Ergebnis. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die untersuchten Gruppen mit der Zeit nicht auseinander verändern und die Dynamik der LDH Zunahme unabhängig vom Medium gleich verläuft. Die Ergebnisse der zugehörigen p- Werte sind in Tab. 13 dargestellt.

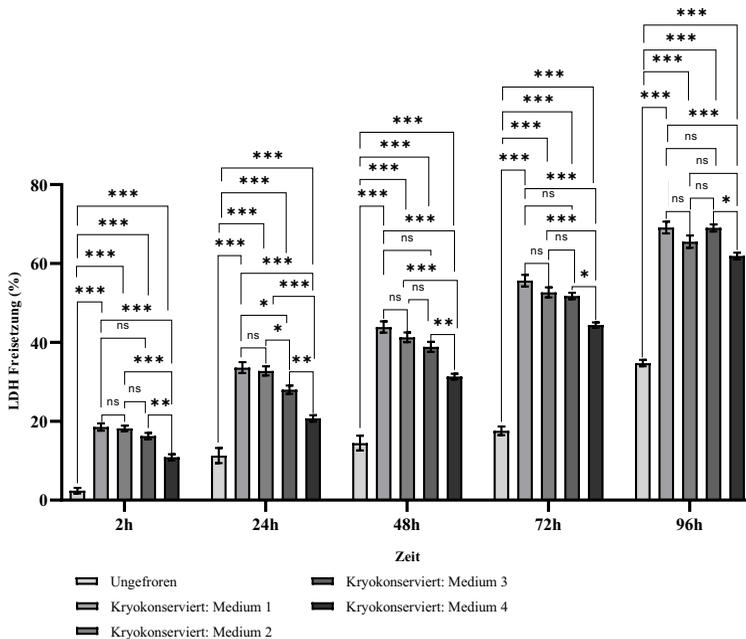


Abb. 9: LDH Freisetzung von PCLS von gesunden Mäusen ungefroren und kryokonserviert über einen Beobachtungszeitraum von 96 h in Kultur. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz des gesamten LDH- Gehalts des PCLS, berechnet aus in Triton X-100 lysiertem PCLS. Darstellung der Viabilität als relative LDH Freisetzung im Überstand nach Inkubation. Kryokonserviert: **Medium 1:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS, **Medium 2:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, **Medium 3:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, **Medium 4:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Kryokonservierung erhöht signifikant die LDH Freisetzung zu allen Zeitpunkten. Signifikant niedrigere LDH Werte für Medium 4 im Vergleich zu den Medien 1-3. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Medien 1, 2 und 3, mit der Ausnahme zum Zeitpunkt 24 h, hier signifikant höhere LDH Ausschüttung für Medium 1 und 2 im Vergleich zu Medium 3. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Statistische Auswertung erfolgte mittels Zweistichproben T- Test mit dem Bonferroni- Test:

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. n = 15 PCLS aus 3 verschiedenen Lungen in jeder Gruppe.

Ergebnisse

Effekt	p- Wert
Gruppe	<0,0001
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,0932

Tab. 13: Repeated measures analysis mittels SAS, LDH Assay von murinen PCLS ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die verschiedenen Medien 1-4 dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, sowie eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied.

3.1.2 Humane PCLS

Gegenüber der frischen humanen PCLS zeigte sich bei den mit Medium 4 kryokonservierten PCLS eine signifikant erhöhte LDH Freisetzung zu allen gemessenen Zeitpunkten. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt. Nach 2 h Inkubationszeit zeigte sich auch bei den humanen PCLS mit 6 % eine geringe LDH Freisetzung, nach Kryokonservierung war diese mit knapp 20 % jedoch bereits mehr als doppelt so viel angestiegen. Insgesamt zeigt sich ein Anstieg nach 96 h Inkubation bis auf 54 % der frischen versus 68 % der kryokonservierten PCLS. Die LDH-Freisetzung zeigt in beiden Gruppen (Ungefroren und Kryokonserviert) einen signifikanten Anstieg über die Zeit.

Ergebnisse

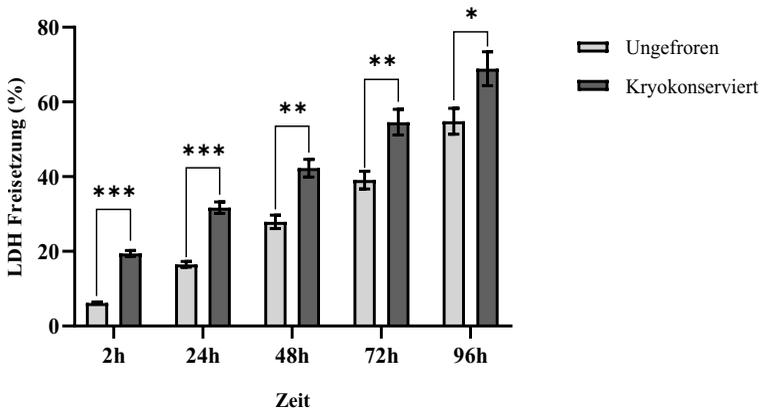


Abb. 10: LDH Freisetzung von PCLS von gesunden humanen Spendern ungefroren und kryokonserviert über einen Beobachtungszeitraum von 96 h in Kultur. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz des gesamten LDH- Gehalts des PCLS, berechnet aus in Triton X-100 lysiertem PCLS. Darstellung der Viabilität als relative LDH Freisetzung im Überstand nach Inkubation. Kryokonserviert: **Medium 4** (DMEM/F-12 + 1 % Penicillin / Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose). Im LDH Assay ließ sich eine signifikant höhere LDH-Freisetzung (%) der kryokonservierten PCLS erkennen gegenüber der ungefrorenen Kontrolle. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Statistische Auswertung erfolgte mittels Zweistichproben T- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Kryokonserviert versus Ungefroren. $n = 15$ PCLS aus 3 verschiedenen Spenderlungen in jeder Gruppe.

Analog der murinen PCLS zeigte auch hier die SAS Prozedur Mixed für repeated measures analysis sowohl einen signifikanten Unterschied der Gruppen als auch eine signifikante Veränderung der LDH Freisetzung über die Zeit. Die zeitliche Dynamik der untersuchten Entitäten unterscheidet sich jedoch mit einem p- Wert von 0,79 nicht signifikant (Tab. 14).

Ergebnisse

Effekt	p- Wert
Gruppe	<0,0001
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,7903

Tab. 14: Repeated measures analysis mittels SAS, LDH Assay von humanen PCLS ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die ungefrorenen und kryokonservierten PCLS dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, sowie eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied.

3.2 Bestimmung der Zellaktivität mittels MTT-Assay

3.2.1 Murine PCLS

Es wurde der Einfluss der Kryokonservierung, sowie der verschiedenen Einfriermedien auf die enzymatische Zellaktivität mittels MTT-Assay untersucht. Wie beim LDH- Assay wurden die Medien 1-4 getestet. Für Medium 1 konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt auswertbare Daten erhoben werden.

Es zeigte sich zu den Zeitpunkten 2 h und 24 h jeweils eine signifikant höhere enzymatische Zellaktivität der frischen im Vergleich zu den kryokonservierten PCLS. Für die weiteren Zeitpunkte traf dies nur für Medium 2 und 3 zu. Zum Zeitpunkt 72 h konnte weder für die ungefrorenen PCLS versus kryokonservierte PCLS noch für die verschiedenen Medien untereinander ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Für Medium 3 und 4 zeigte sich ebenso zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Differenz der Zellaktivität, während sich auch keine signifikante höhere Enzymaktivität für ungefrorene PCLS und PCLS kryokonserviert mit Medium 4 nachweisen ließ. PCLS, die mit Medium 4 kryokonserviert wurden, erbrachten somit noch am ehesten eine der ungefrorenen Lungengewebschnitte ähnlich hohe mitochondriale Stoffwechselaktivität.

Die repeated measures analysis erbrachte einen signifikanten Unterschied der Gruppen sowie eine signifikante Veränderung der enzymatischen Zellaktivität über die Zeit. Mit einem p Wert von 0,0064 erwies sich auch die zeitliche Dynamik der verschiedenen Gruppen als signifikant verschieden (Tab. 15).

Ergebnisse

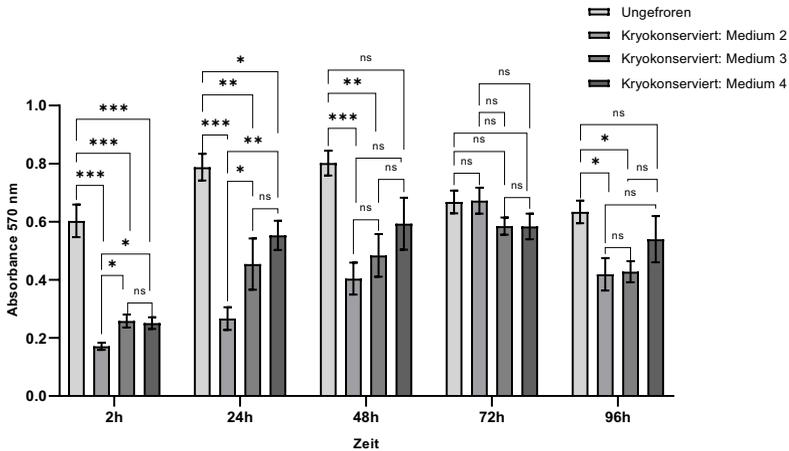


Abb. 11: Enzymatische Zellaktivität spektrophotometrisch gemessen (Absorbance 570 nm) von PCLS von gesunden Mäusen, ungefroren und kryokonserviert über einen Beobachtungszeitraum von 96 h, in Kultur. Kryokonserviert: Medium 2: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, **Medium 3:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50mmol/l Trehalose, **Medium 4:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Statistische Auswertung mittels Zweistichproben T- Test mit dem Bonferroni- Test. Kryokonservierung senkt signifikant die enzymatische Zellaktivität für PCLS, kryokonserviert mit Medium 2 und 3 zu allen Zeitpunkten und für Medium 4 zum Zeitpunkt 2 h und 24 h. Nach 48 h keine signifikante Differenz zwischen Ungefroren und Medium 4. Kein signifikanter Unterschied für Medium 3 und 4. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 12$ PCLS aus 3 verschiedenen Lungen in jeder Gruppe.

Effekt	p- Wert
Gruppe	<0,0001
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,0064

Tab. 15: Repeated measures analysis mittels SAS, MTT Assay von murinen PCLS ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die verschiedenen Einfriermedien dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, sowie eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab ebenso einen signifikanten Unterschied.

3.2.2 Humane PCLS

Analog der murinen Lungengewebschnitte wurde der MTT-Assay an humanen Schnitten durchgeführt. Hierzu wurden ebenso frische PCLS und kryokonservierte Schnitte eingefroren und mit folgendem Medium verglichen. Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose.

Nach 2 h in Kultur zeigte sich mittels T- Test kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die gemessene mitochondriale Zellaktivität der ungefrorenen versus der kryokonservierten humanen Lungengewebschnitte (siehe Abb.12). Zu den übrigen Zeitpunkten fiel jedoch eine signifikant höhere Zellaktivität der ungefrorenen PCLS auf. Für die ungefrorenen Schnitte konnte ein Anstieg der enzymatischen Aktivität bis zu 72 h in Kultur beobachtet werden, während die Zellaktivität der kryokonservierten Schnitte bereits nach 24 h in Kultur wieder abnahm.

Auch hier konnte, wie zuvor bei den murinen PCLS beschrieben mittels repeated measures analysis eine signifikante Differenz der Gruppen als auch eine statistisch signifikante zeitliche Dynamik der Reduktion der enzymatischen Stoffwechselaktivität über die untersuchten Zeitpunkte festgestellt werden. Jedoch zeigte sich im Unterschied zu den murinen PCLS hier kein signifikantes Ergebnis bezüglich der Verknüpfung aus den zwei Gruppen und der Zeit. Dies bedeutet, dass die enzymatische Stoffwechselaktivität der Gruppen ungefrorene und kryokonservierte PCLS sich über die Zeit gleich verändert.

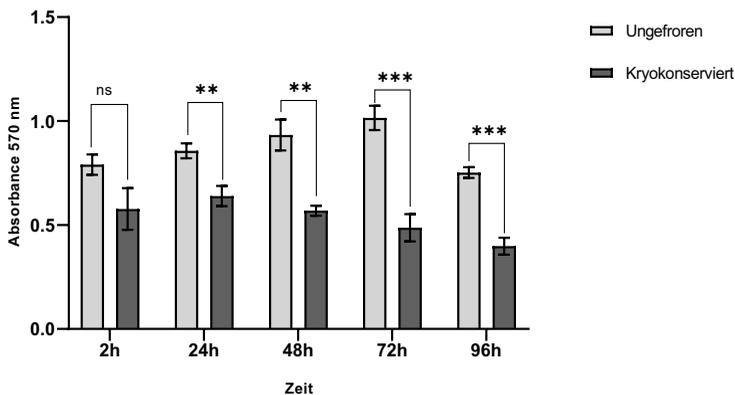


Abb. 12: Enzymatische Zellaktivität spektrophotometrisch gemessen (Absorbance 570 nm) von Lungengewebschnitten von gesunden humanen Spendern ungefroren und kryokonserviert über einen Beobachtungszeitraum von 96 h in Kultur. Kryokonserviert: Medium 4 (DMEM/F-12 + 1 %

Ergebnisse

Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose). Keine signifikante Differenz im Zweistichproben T- Test zum Zeitpunkt 2 h, nach 24 h, 48 h, und 96 h signifikant höhere enzymatische Zellaktivität der ungefrorenen Lungengewebschnitte. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Kryokonserviert versus Ungefroren. $n = 15$ PCLS aus 3 verschiedenen Spenderlungen in jeder Gruppe.

Effekt	p- Wert
Gruppe	<0,0001
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,0523

Tab 16: Repeated measures analysis mittels SAS, MTT Assay von humanen Lungengewebschnitten ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die ungefrorenen und kryokonservierten PCLS dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, sowie eine signifikante zeitliche Dynamik und die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe.

3.3 Lebend-/ Totfluoreszenzfärbung

3.3.1 Murine PCLS

In der Abbildung 13 sind repräsentative Ausschnitte aus gefärbten PCLS von gesunden Mäusen gezeigt. Die intrazelluläre Esteraseaktivität, repräsentativ für die Plasmamembranintegrität lebender Zellen, wird durch das grün fluoreszierende Calcein dargestellt, während die Nukleinsäuren des Zellkernes beschädigter Zellen durch das rot fluoreszierende Ethidium-1-homodimer gekennzeichnet sind.

Es wurden je frische Lungengewebschnitte (A) über einen Zeitraum von 96 h in Kultur untersucht, sowie kryokonservierte Lungengewebschnitte (B-E) verschiedener Medien und abgestorbene Lungengewebschnitte (F) als Negativkontrolle, die zuvor mit Triton-x-100 behandelt wurden.

In den nicht kryokonservierten Lungengewebschnitten (A) ließen sich 2 h nach Herstellung der Schnitte nur vereinzelte rote Zellkerne nachweisen, die vermutlich beschädigten Zellen durch den Schneidprozess selbst entsprechen. Ein relevanter Anstieg beschädigter Zellen zeigte sich erst nach 48 h in Kultur. Nach 96 h konnte eine Auflösung der Plasmamembran beobachtet werden.

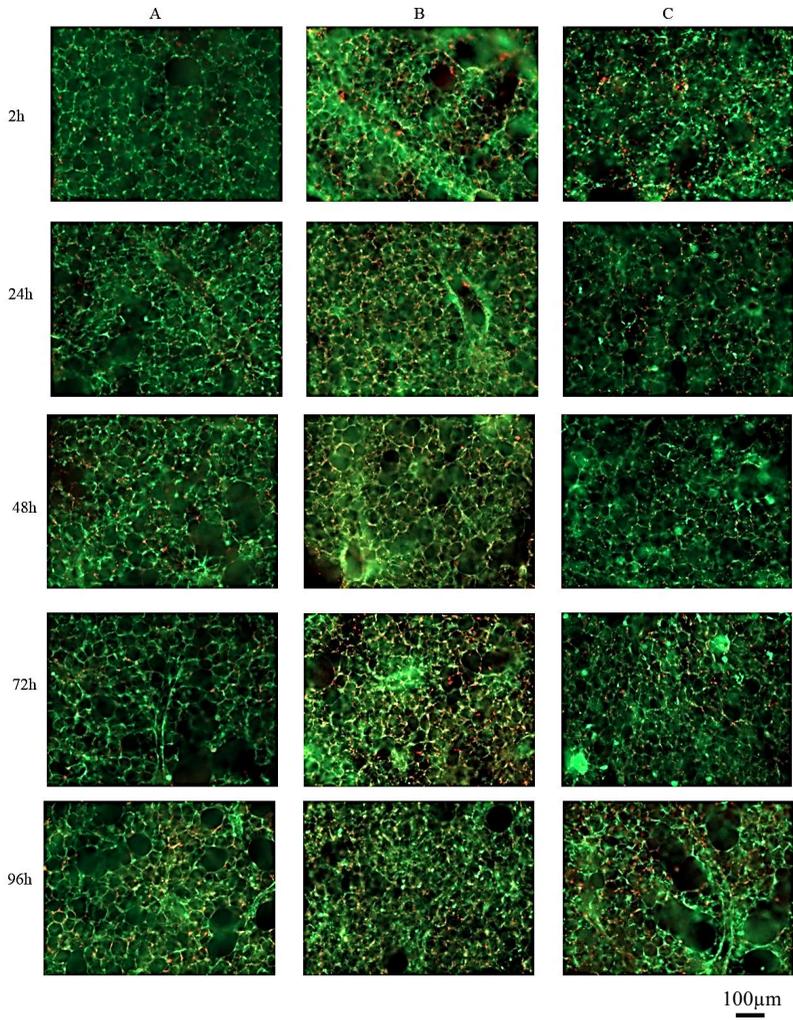
Ergebnisse

Bei den kryokonservierten PCLS erwies sich eine Differenz zwischen den verschiedenen Medien. Schnitte, die mit dem Medium 1 (B) kryokonserviert wurden, enthielten nach Auftauen bereits nach 2 h eine hohe Zahl beschädigter Zellen, ebenso konnte keine scharf abgrenzbare Plasmamembran verifiziert werden. Es konnte eine Zunahme der toten Zellen über 96 h in Kultur beobachtet werden. Die PCLS, kryokonserviert mit den Medien 2 (C), 3 (D), 4 (E), ließen sowohl untereinander als auch in Bezug auf die nicht kryokonservierten PCLS bezüglich der intrazellulären Esteraseaktivität ein ähnliches Verhalten erkennen. So konnte über den Zeitraum von 96 h eine kontinuierliche Abnahme der Plasmamembranintegrität festgestellt werden. Hingegen zeigten die unterschiedlichen Medien unterschiedliche Resultate in Hinblick auf die beschädigten Zellen. Es konnte eine annähernd gleiche Anzahl beschädigter Zellen für das Medium 4 (E) und der nicht kryokonservierten PCLS (A) dargelegt werden. Die Schnitte der Medien 2 (C) und 3 (D) legten ein ähnliches Bild an toten Zellen dar.

Die in Triton-x-100 behandelten Lungengewebschnitte (F) wiesen keine intrazelluläre Esteraseaktivität mehr auf und zeigten ein durchgängiges Bild geschädigter Zellen.

In allen untersuchten Entitäten konnte eine Zunahme beschädigter Zellen und eine Abnahme der intrazellulären Esteraseaktivität über die Kulturzeit von 96 h beobachtet werden. Des Weiteren verdeutlichte sich, dass die PCLS des Mediums 4 (E) im Vergleich zu den anderen Einfriermedien die besten Ergebnisse in Bezug auf die zelluläre Integrität aufwiesen. Zudem konnte beobachtet werden, dass geschädigte Zellen bevorzugt am Epithel der Atemwege, sowie am Rande der PCLS lokalisiert waren.

Ergebnisse



Ergebnisse

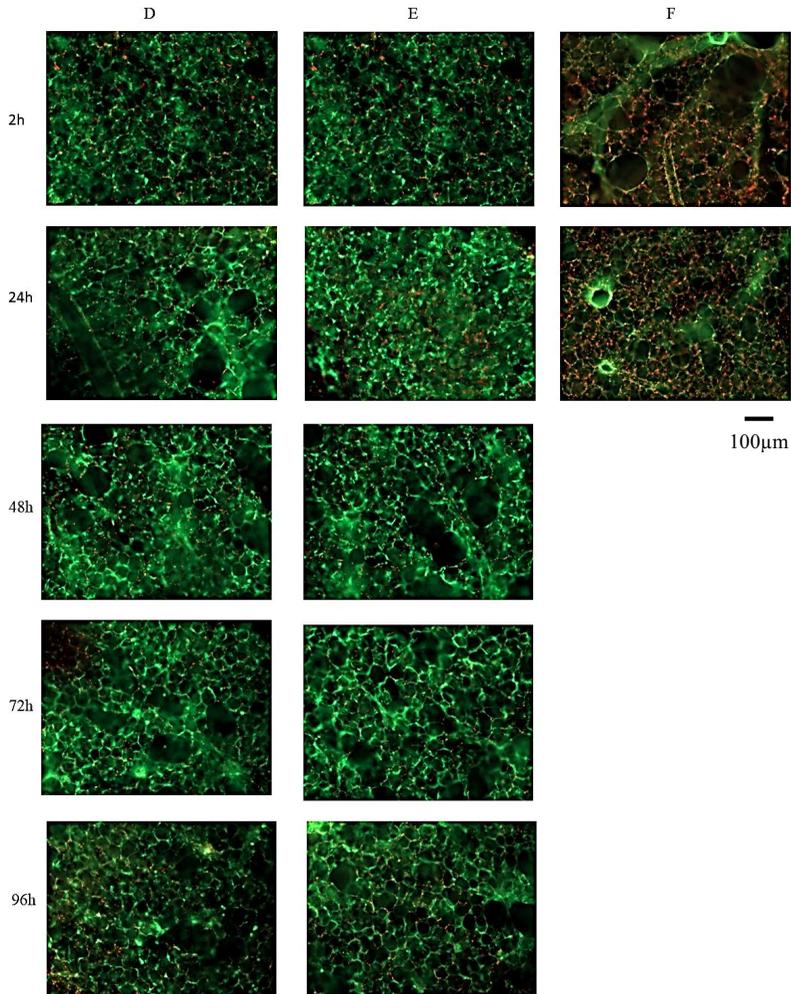


Abbildung 13: Lebend-/Totfluoreszenzfärbung mit Calcein-AM und Ethidium homodimer-1 bei PCLS von Mäusen nicht kryokonserviert und nach Kryokonservierung über einen Zeitraum von 96 h in Kultur. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Fluoreszenzfärbungen mit Calcein-AM und Ethidium homodimer-1 von PCLS gesunder Mäuse. **A:** nicht kryokonserviert, **B:** kryokonserviert mit dem Medium 1: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS, **C:** kryokonserviert mit dem Medium 2: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, **D:** kryokonserviert mit dem Medium 3: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, **E:** kryokonserviert mit dem Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose, **F:** mit Triton-X-100 behandelt. Der Maßstab entspricht 100 μm.

3.3.2 Humane PCLS

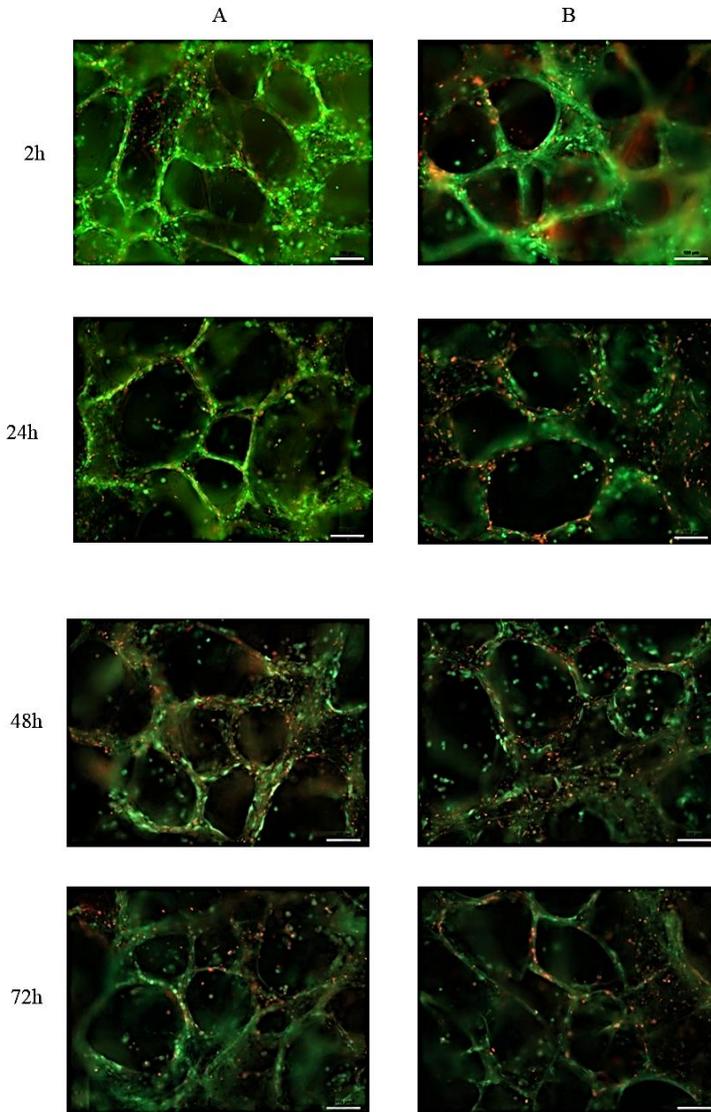
Parallel zu den murinen Lungengewebschnitten wurde eine Fluoreszenzfärbung mit Calcein-AM und Ethidium homodimer-1 an humanen Lungengewebschnitten von gesunden Spenderlungen durchgeführt. Hierbei wurde aufgrund der limitierten Anzahl an verfügbarem Material lediglich eine Färbung an nicht kryokonservierten Schnitten (A) und kryokonservierten Schnitten mit dem Medium 4 (B) durchgeführt.

Die nicht kryokonservierten Lungengewebschnitten (A) zeigten bereits nach 2 h in Kultur vereinzelte rote Zellkerne, auch hier ist dies erklärbar durch den Schneideprozess selbst, wie auch durch die Transportzeit der Explantate. Ab 48 h in Kultur konnte eine deutliche Zunahme der beschädigten Zellen festgestellt werden und eine sichtbare Abnahme der Esteraseaktivität, nach 96 h in Kultur zeigte sich eine fast vollständig aufgelöste Plasmamembran.

Bei den kryokonservierten Lungengewebschnitten (B) manifestierten sich im Vergleich zu den nicht kryokonservierten Schnitten (A) eine höhere Anzahl geschädigter Zellen nach 2 h, ebenso konnte bereits nach 24 h in Kultur nach Auftauen eine reduzierte Esteraseaktivität beobachtet werden.

Nach 48 h in Kultur konnte keine relevante Differenz zwischen den beiden untersuchten Entitäten beobachtet werden. Auch bei den humanen PCLS konnten, wie bei den murinen bereits erwähnt, tote Zellen vor allem entlang der Atemwege und am Rand der PCLS beobachtet werden.

Ergebnisse



96h

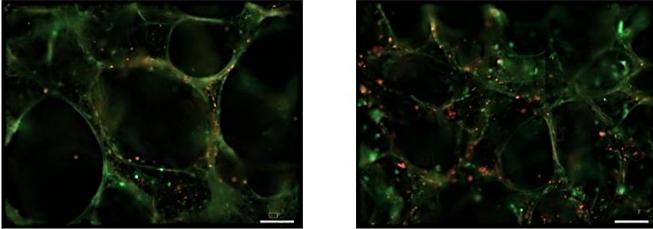


Abb. 14: Lebend-/Totfluoreszenzfärbung mit Calcein-AM und Ethidium homodimer-1 bei Lungengewebsschnitten von gesunden humanen Spendern nicht kryokonserviert und nach Kryokonservierung über einen Zeitraum von 96 h in Kultur. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Fluoreszenzfärbungen mit Calcein-AM und Ethidium homodimer-1 von Lungengewebsschnitten von gesunden humanen Spenderlungen. **A:** nicht kryokonserviert, **B:** kryokonserviert mit dem Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Der Maßstab entspricht 100 μm .

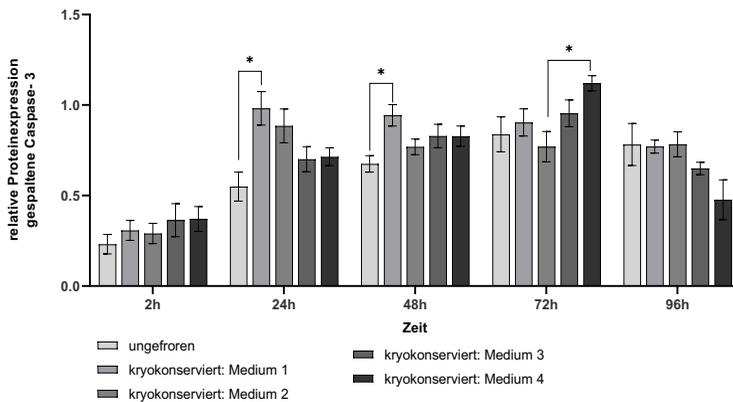
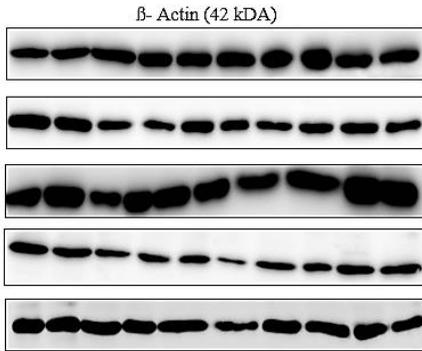
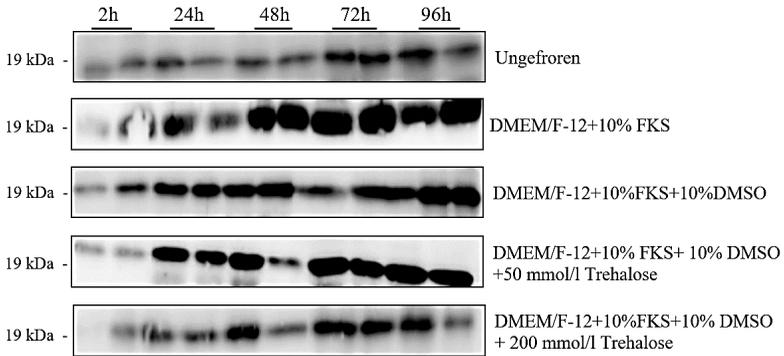
3.4. Gespaltene Caspase-3 Gehalt in Lungengewebsschnitten mittels Western Blot

3.4.1 Gespaltene Caspase-3 Gehalt in murinen PCLS

Die Proteinexpression von gespaltener Caspase-3 als Apoptosemarker wurde per Western Blot überprüft. Für die Normalisierung wurde Beta-Actin bestimmt. In der densitometrischen Auswertung zeigten sich lediglich für Medium 1 versus Ungefroren zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h signifikante Veränderungen der Proteinexpression. In Abb. 15 sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse der Immunoblots graphisch dargestellt, sowie je ein repräsentativer Immunoblot für jedes verwendete Medium. Insgesamt zeigte sich über die Dauer der PCLS in Kultur eine signifikante Zunahme der Caspase-3 Expression in allen Gruppen, was auf die zunehmende Apoptose der Schnitte in Kultur schließen lässt. Auch wird die gespaltene Caspase-3 bei Schnitten nach Kryokonservierung höher exprimiert als bei der ungefrorenen Kontrollgruppe.

Die statistische Auswertung der repeated measures analysis mittels SAS wies keinen signifikanten Unterschied der verschiedenen Medien auf. Jedoch konnte aufgezeigt werden, dass sich über den Untersuchungszeitraum die Proteinexpression der gespaltenen Caspase 3 signifikant verändert, was auf die zunehmende Apoptose über den Zeitraum in Kultur hindeutet. Diese zeitliche Dynamik ist in Bezug auf die verschiedenen Medien jedoch signifikant verschieden.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abb. 15: Gespaltene Caspase-3 in murinen PCLS ungefroren und kryokonserviert mittels Western Blot Methodik. Es sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse graphisch dargestellt, sowie ein exemplarischer Immunoblot je verwendetem Medium. Im Western Blot und nach densitometrischer Quantifizierung zeigte sich eine tendenziell höhere Expression von gespaltener Caspase-3 der kryokonservierten PCLS als in der ungefrorenen Kontrollgruppe. Kryokonserviert: **Medium 1:** DMEM/F-12 + 10 % FKS. **Medium 2:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, **Medium 3:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, **Medium 4:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Eine signifikante Differenz im Zweistichproben T- Test konnte nur für den Zeitpunkt 24 h und 48 h zwischen den ungefrorenen und den mit Medium 1 kryokonservierten PCLS festgestellt werden. Beta-Actin wurde zur Kontrolle der Proteinladung benutzt und densitometrisch zur Normierung der Blots verwendet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 6$, * $p < 0,05$.

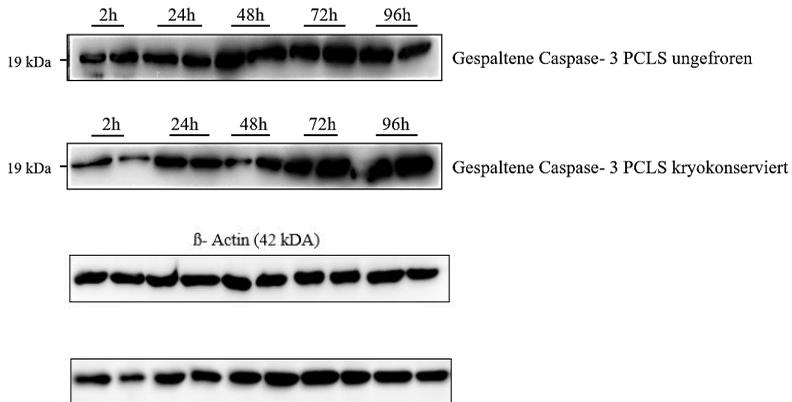
Effekt	p- Wert
Gruppe	0,1628
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,0016

Tab.17: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression gespaltene Caspase 3 von murinen Lungengewebsschnitten ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die verschiedenen Medien dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab ebenso ein signifikantes Ergebnis.

3.4.2 Gespaltene Caspase-3 Gehalt in humanen PCLS

Analog der murinen PCLS wurde mit den humanen Proben verfahren. Sowohl die ungefrorenen als auch die kryokonservierten PCLS zeigten eine deutliche Expression der gespaltenen Caspase-3. Es konnte mittels densitometrischer Quantifizierung zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen ungefrorenen und kryokonservierten PCLS aufgezeigt werden. Es konnte jedoch eine eindeutige Zunahme der Expression über den Zeitraum von 96 h in Kultur beobachtet werden.

Mittels SAS repeated measures wurde bewiesen, dass sich die zwei Gruppen ungefroren und kryokonserviert signifikant unterscheiden und die Expression der gespaltenen Caspase 3 signifikant über den Kultivierungszeitraum zunimmt. Die Gruppen verändern sich über die Zeit gleich und zeigen die gleiche Dynamik auf (Tab. 18).



Ergebnisse

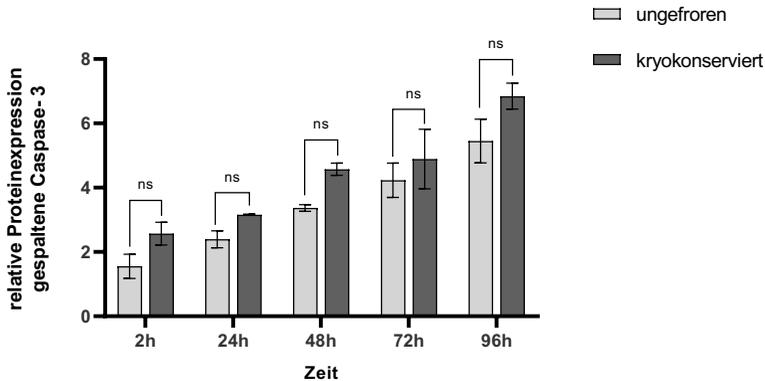


Abb. 16: Gespaltene Caspase-3 in humanen PCLS ungefroren und kryokonserviert (Medium 4 DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose) **mittels Western Blot Methodik**. Es sind ein exemplarischer Immunoblot (oben) sowie die densitometrisch ermittelten Ergebnisse (unten) graphisch dargestellt. Es zeigte sich mittels Zweistichproben T-Test kein signifikanter Unterschied der relativen Proteinexpression zwischen ungefrorenen und kryokonservierten PCLS. Beta-Actin wurde zur Kontrolle der Proteinladung benutzt und densitometrisch zur Normierung der Blots verwendet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 6$, ns = nicht signifikant.

Effekt	p- Wert
Gruppe	<0,0001
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,2451

Tab.18: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression gespaltene Caspase 3 von humanen Lungengewebsschnitten ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab kein signifikantes Ergebnis.

3.5 Fluoreszenzfärbung mit LysoTracker Green zur Markierung differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II

3.5.1 Murine PCLS

In der Abbildung 18 sind repräsentative Ausschnitte aus gefärbten Lungengewebschnitten von gesunden Mäusen dargestellt. Es erfolgte eine Bearbeitung mittels ImageJ, sodass anschließend aus den repräsentativen Ausschnitten der PCLS die absolute Anzahl an Alveolarepithelzellen Typ II bestimmt werden konnte.

Die Färbung wurde mit LysoTracker Green durchgeführt, hierdurch wurden lebende, differenzierte Alveolarepithelzellen Typ II markiert.

Es wurden je frische Lungengewebschnitte (A) über einen Zeitraum von 96 h in Kultur untersucht, sowie kryokonservierte Lungengewebschnitte (B-E) verschiedener Medien.

Schnitte, die mit dem Medium 1 (B) kryokonserviert wurden, zeigten nur noch vereinzelte differenzierten Alveolarepithelzellen. Im Vergleich zu allen anderen Gruppen zeigte sich zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Für die kryokonservierten Schnitte der Medien 2 (C) und 3 (D) ermittelte der T-Test eine signifikante Reduktion der Anzahl AEC II im Vergleich zu den ungefrorenen PCLS. Hingegen zeigte sich für Medium 4 (E) nur für die Zeitpunkte 2 h, 72 h und 96 h eine signifikante Verminderung.

Insgesamt konnte auch bei diesem Versuchsansatz gezeigt werden, dass die Lungengewebschnitte, die mit Medium 4 (E) kryokonserviert wurden sich am wenigsten von den ungefrorenen Schnitten differenzierten.

Die SAS repeated measures analysis ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen, auch wurde deutlich, dass eine signifikante zeitliche Dynamik über den Untersuchungszeitraum vorhanden ist und somit die differenzierten Alveolarepithelzellen Typ II mit der Zeit in Kultur signifikant abnehmen. Die zeitliche Dynamik unterschied sich allerdings zwischen den Gruppen auch signifikant. In Tab. 19 sind die zugehörigen p- Werte dargestellt.

Ergebnisse

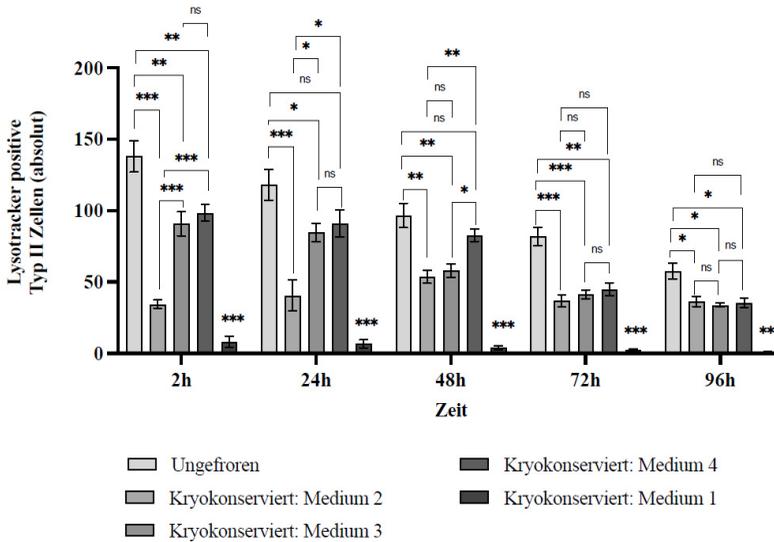
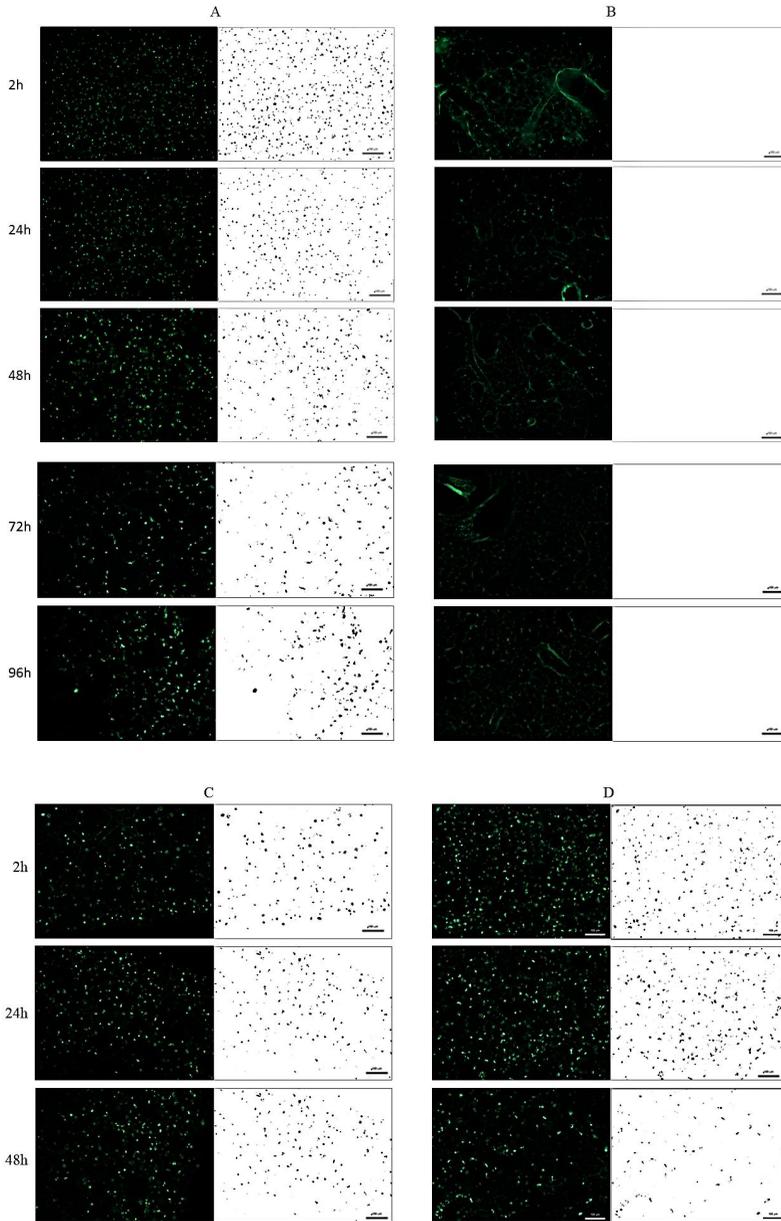


Abb. 17: Quantifizierung der LysoTracker green positiven Alveolarepithelzellen Typ II in Lungengewebsschnitten von Mäusen (nicht kryokonserviert und nach Kryokonservierung über einen Zeitraum von 96 h in Kultur). Die Quantifizierung liegen die in Abb. 18 dargestellten Bildern zugrunde. Statistische Auswertung mittels T-Test und Bonferroni- Korrektur. Ungefroren versus Kryokonserviert: Kryokonserviert: **Medium 1:** DMEM/F-12 + 10 % FKS. Kryokonserviert, **Medium 2:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, kryokonserviert, **Medium 3:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, kryokonserviert, **Medium 4:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 9$ PCLS aus 3 verschiedenen Lungen in jeder Gruppe.

Effekt	p- Wert
Gruppe	<0,0001
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	<0,0001

Tab.19: Repeated measures analysis mittels SAS, LysoTracker green von murinen Lungengewebsschnitten ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p-Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die verschiedenen Medien dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen sowie eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab ebenso ein signifikantes Ergebnis.

Ergebnisse



Ergebnisse

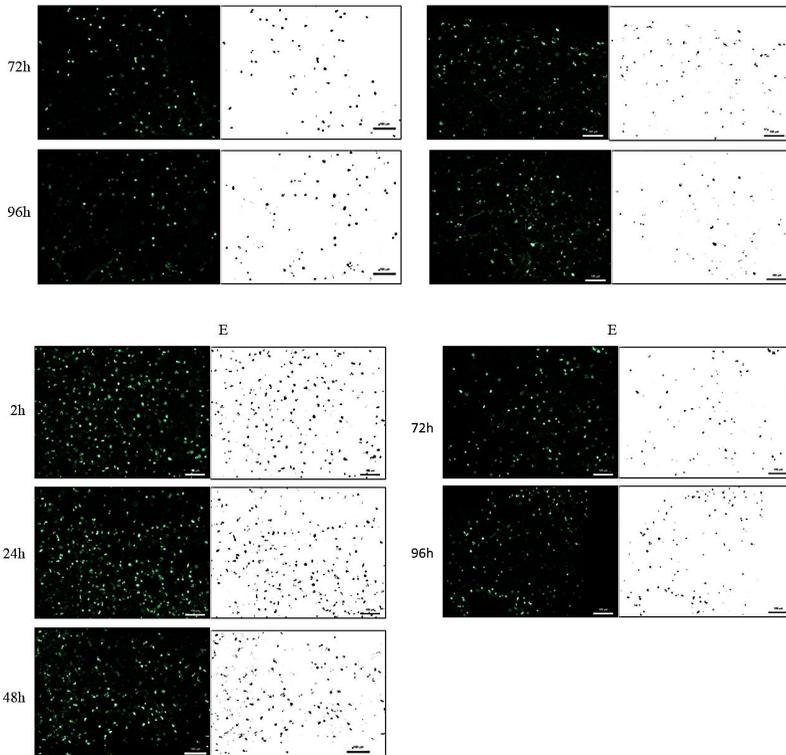


Abb. 18: Färbung lebender differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II mit LysoTracker Green bei Lungengewebsschnitten von Mäusen (ungefroren und nach Kryokonservierung über einen Zeitraum von 96 h in Kultur). Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Fluoreszenzfärbungen mit LysoTracker Green von gesunden Mäusen, sowie die entsprechenden mit ImageJ bearbeiteten Ausschnitte. **A:** Ungefroren, **B:** Kryokonserviert mit dem Medium 1: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS, **C:** Kryokonserviert mit dem **Medium 2:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, **D:** Kryokonserviert mit dem Medium 3: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, **E:** Kryokonserviert mit dem Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Es zeigte sich in allen Gruppen eine Abnahme der markierten Typ II Alveolarepithelzellen über den Beobachtungszeitraum von 96 h. In Abbildung B konnten keine differenzierten Alveolarepithelzellen Typ II mehr nachgewiesen werden. Der Maßstab entspricht 100µm.

3.5.2 Humane PCLS

Auch an den humanen Lungengewebschnitten wurde eine Färbung mit LysoTracker Green durchgeführt, um differenzierte Alveolarepithelzellen Typ II zu detektieren. Es erfolgte eine Bearbeitung mittels ImageJ, sodass anschließend aus den repräsentativen Ausschnitten der PCLS die absolute Anzahl an Alveolarepithelzellen Typ II bestimmt werden konnte. Zur statistischen Auswertung wurde bei Normalverteilung der Zweistichproben T-Test angewendet sowie eine repeated measures analysis mittels SAS durchgeführt.

In der Abbildung 20 sind repräsentative Ausschnitte aus gefärbten Lungengewebschnitten von gesunden Spendern, sowie die bearbeiteten Ausschnitte dargestellt, die als Grundlage der statistischen Auswertung dienen.

Es wurde eine Färbung an nicht kryokonservierten Schnitten und kryokonservierten Schnitten mit dem Medium 4 durchgeführt.

Lediglich zum Zeitpunkt 48 h prägte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der differenzierten Alveolarepithelzellen Typ II. Zu den übrigen Zeitpunkten konnte keine signifikante Differenz zwischen ungefrorenen und kryokonservierten Schnitten dargelegt werden. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Abnahme zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb beider untersuchten Gruppen.

Bei den ungefrorenen PCLS zeigte sich zwischen 2 h und 24 h in Kultur ein Anstieg der LysoTracker positiven AEC II, bevor eine Abnahme über den Zeitraum erfolgte. Bei den kryokonservierten Schnitten hingegen stellte sich die maximale Anzahl bereits 2 h nach Auftauen dar.

Die repeated measure analysis demonstrierte, wie auch bei den murinen PCLS, dass die zwei Gruppen sich signifikant unterscheiden und auch die zeitliche Dynamik der Veränderung der Zahl der Typ II Zellen verschieden ist (Tab. 18).

Ergebnisse

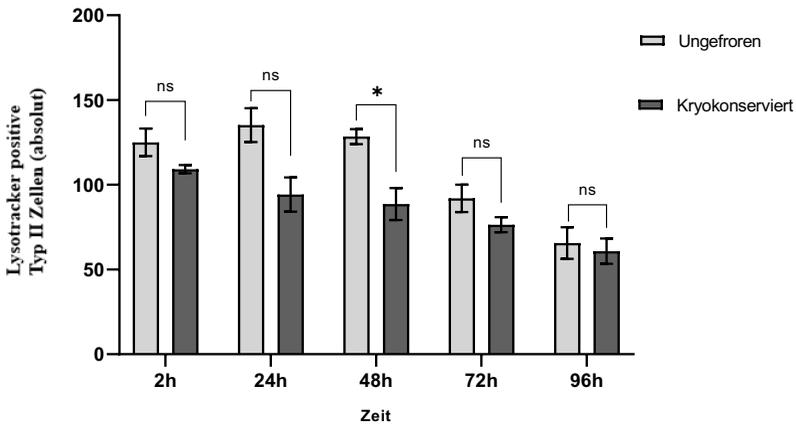


Abb. 19: Quantifizierung der LysoTracker green positiven Alveolarepithelzellen Typ II in Lungengewebschnitten von gesunden humanen Spendern (ungefroren und nach Kryokonservierung über einen Zeitraum von 96 h in Kultur). Kryokonserviert: Medium 4 DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Die Quantifizierung liegen die in Abb. 20 dargestellten Bildern zugrunde. Kein signifikanter Unterschied im Zweistichproben T-Test in der Anzahl der LysoTracker positiven Alveolarepithelzellen Typ II von ungefrorenen und kryokonservierten PCLS mit Ausnahme zum Zeitpunkt 48 h. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 9$ PCLS aus 3 verschiedenen Lungen in jeder Gruppe.

Effekt	p- Wert
Gruppe	0,0003
Zeit	0,0217
Gruppe*Zeit	0,0003

Tab.20: Repeated measures analysis mittels SAS, LysoTracker green von humanen Lungengewebschnitten ungefroren und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen sowie eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab ebenso ein signifikantes Ergebnis.

Ergebnisse

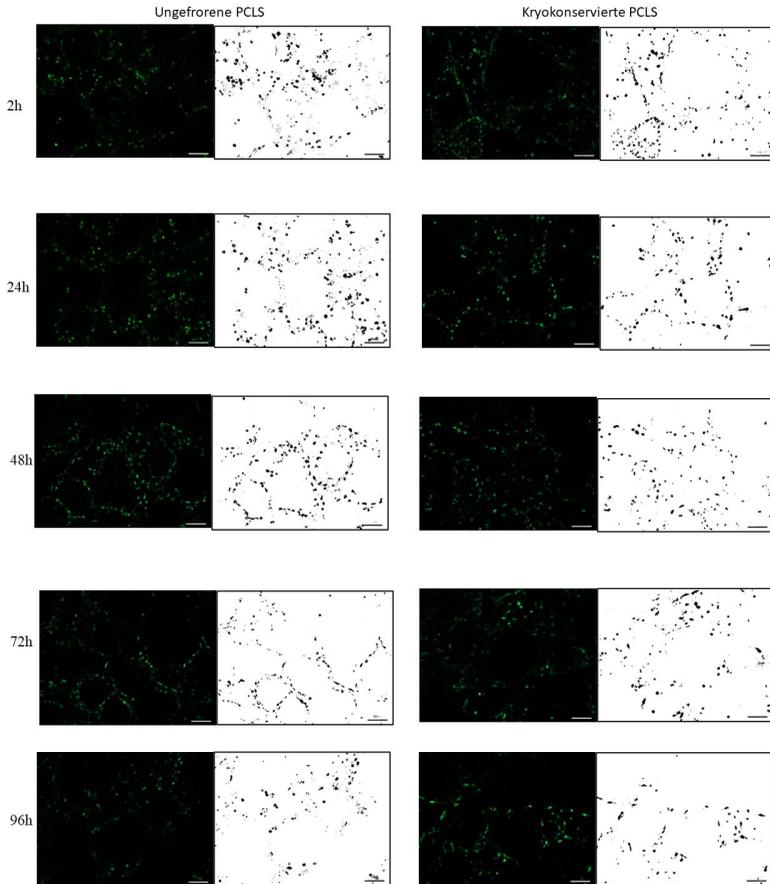


Abb. 20: Färbung Alveolarepithelzellen Typ II mit LysoTracker Green bei Lungengewebsschnitten von gesunden humanen Spendern (ungefroren und nach Kryokonservierung über einen Zeitraum von 96 h in Kultur). Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Lungengewebsschnitten gefärbt mit LysoTracker Green von gesunden humanen Spenderlungen, sowie die mit ImageJ entsprechend bearbeiteten Ausschnitte. **Ungefroren** versus **Kryokonserviert** mit dem Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Der Maßstab entspricht 100 μ m.

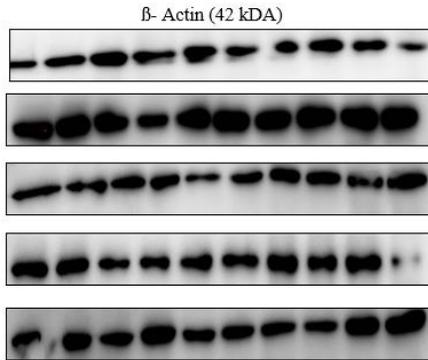
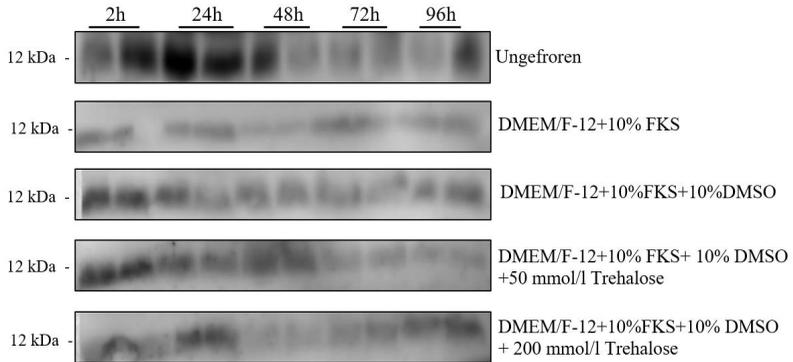
3.6. Matures SP-B Gehalt in Lungengewebschnitten mittels Western Blot

3.6.1 Gehalt an Maturem SP-B in murinen PCLS

Um den Einfluss der Kryokonservierung auf die Surfactantproduktion zu untersuchen, wurde mittels Western Blot Methodik die Expression von maturem SP-B (mSP-B) bestimmt. Dieses wird in Alveolarepithelzellen Typ II produziert, die im vorherigen Versuch bereits mittels LysoTracker Green Fluoreszenzfärbung detektiert werden konnten. Es wurden erneut PCLS kryokonserviert mit verschiedenen Medien getestet. Als Normierung diente die Beta-Actin Bestimmung. In Abb. 21 ist ein exemplarischer Immunoblot je Medium dargestellt sowie die densitometrische Quantifizierung.

Es konnte zu keinem Zeitpunkt in Kultur nach Kryokonservierung versus ungefrorene Schnitte eine signifikante Differenz der mSP-B Expression detektiert werden. Lediglich zwischen Medium 1 und 4 sowie Medium 3 und 4 zeigte sich zum 2 h Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Es zeigte sich insgesamt eine gering höhere SP-B Expression der ungefrorenen PCLS. Mittels SAS repeated measures wurde bewiesen, dass sich die untersuchten Gruppen signifikant unterscheiden und die Expression von mSP-B eine signifikante zeitliche Dynamik aufweist. Diese zeitliche Dynamik unterscheidet sich zwischen den Gruppen jedoch nicht signifikant (Tab. 21).

Ergebnisse



Ergebnisse

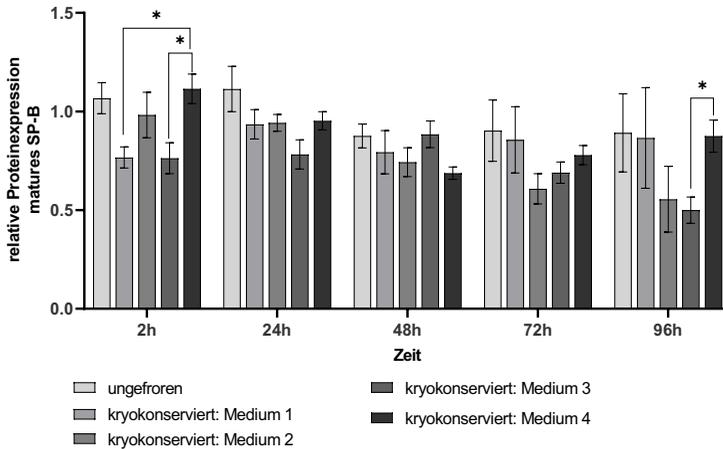


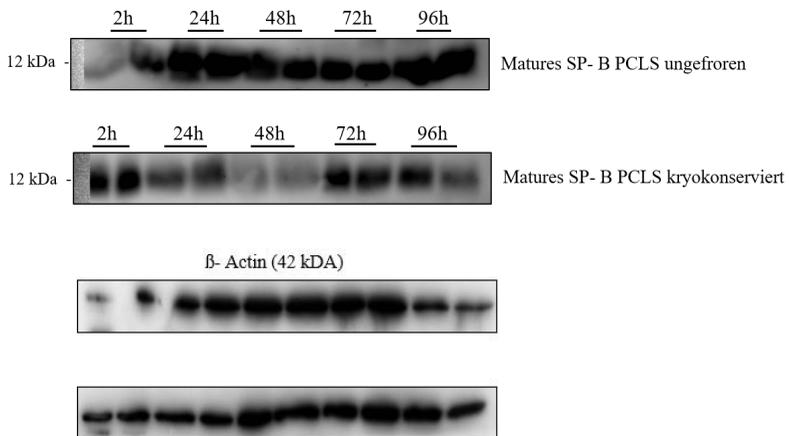
Abb. 21: Matures SP-B Gehalt in murinen PCLS ungefrozen und kryokonserviert mittels Western Blot Methodik. Es sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse graphisch dargestellt, sowie ein exemplarischer Immunoblot je verwendetes Medium. Kryokonserviert: **Medium 1:** DMEM/F-12 + 10 % FKS, **Medium 2:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, **Medium 3:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, **Medium 4:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Beta-Actin wurde zur Kontrolle der Proteinladung benutzt und densitometrisch zur Normierung der Blots verwendet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 6$. Im Vergleich aller Gruppen untereinander ermittelte der Zweistichproben T-Test keine signifikanten Ergebnisse mit Ausnahme zum Zeitpunkt 2 h zwischen den Medien 1 und 3 zu Medium 4. Im Immunoblot lässt sich zum Zeitpunkt 24 h eine höhere Proteinexpression der ungefrozenen PCLS erkennen. * $p < 0,05$.

Effekt	p- Wert
Gruppe	0,0087
Zeit	0,0009
Gruppe*Zeit	0,1649

Tab.21: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-B von murinen PCLS ungefrozen und kryokonserviert mit Medium 1-4 über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die verschiedenen Einfriermedien dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab kein signifikantes Ergebnis.

3.6.2 Gehalt an maturem SP-B in humanen PCLS

Mit der Proteinbestimmung der humanen PCLS wurde ebenso verfahren wie mit den murinen Schnitten. Abb. 22 zeigt einen repräsentativen Immunoblot sowie die densitometrisch ermittelten Werte. Zur Normierung der mSP-B Expression wurde die Beta-Actin Bestimmung verwendet. In der densitometrischen Analyse fanden sich keine signifikanten Unterschiede, obwohl in der Tendenz eine höhere Expression von mSP-B in der Gruppe der ungefrorenen PCLS zu detektieren war. Ebenso zeigte sich eine Abnahme der Expression über die Dauer in Kultur. Mittels wiederholter Messungen konnte ein signifikanter Unterschied der ungefrorenen und kryokonservierten PCLS bezüglich Ihrer mSP-B Expression in Kultur demonstriert werden, auch zeigte sich eine signifikante zeitliche Dynamik über den Untersuchungszeitraum. Die Veränderung der zwei Gruppen verhält sich jedoch gleich und wies kein signifikantes Ergebnis auf. Die entsprechenden p- Werte der repeated measures analysis sind in Tabelle 22 dargestellt.



Ergebnisse

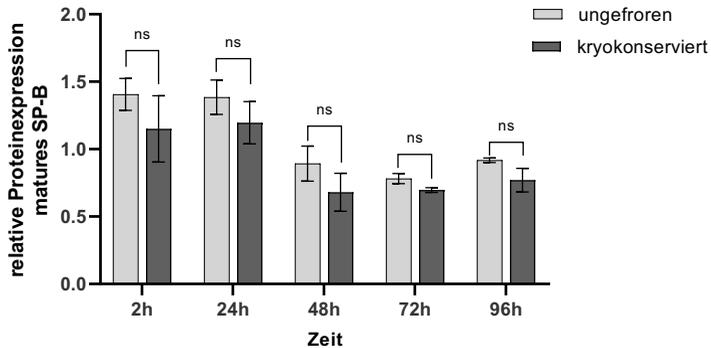


Abb. 22: Matures SP-B Gehalt in humanen PCLS ungefrozen und kryokonserviert (Medium 4: DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose) **mittels Western Blot Methodik.** Es sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse graphisch dargestellt, sowie ein exemplarischer Immunoblot. Beta-Actin wurde zur Kontrolle der Proteinladung benutzt und densitometrisch zur Normierung der Blots verwendet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 6$. Mittels zweistichproben T-Test wurden keine signifikanten Ergebnisse zwischen ungefrozenen und kryokonservierten PCLS ermittelt.

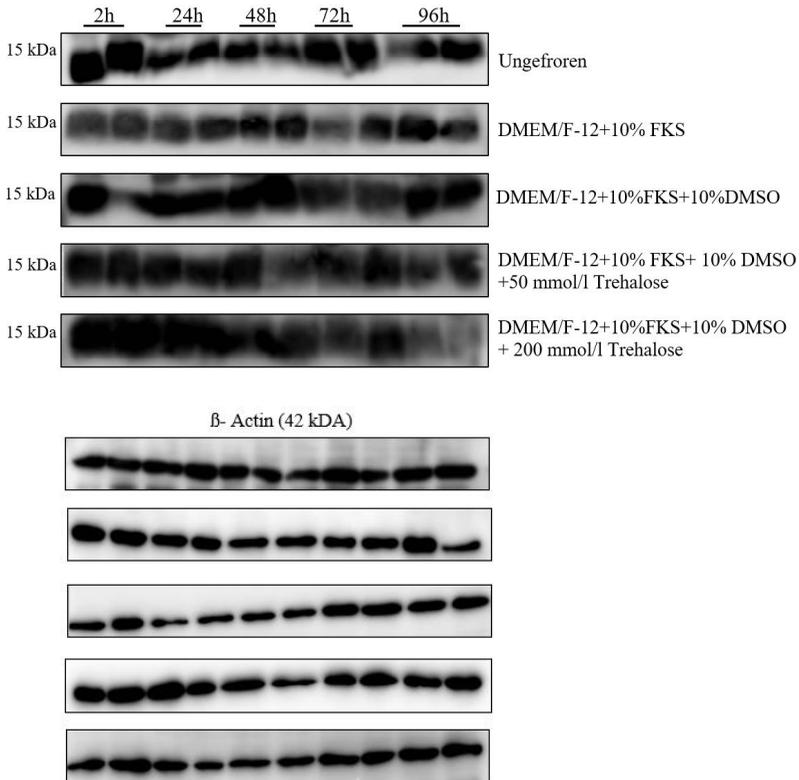
Effekt	p- Wert
Gruppe	0,0009
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,7592

Tab.22: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-B von humanen Lungengewebschnitten ungefrozen und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab kein signifikantes Ergebnis.

3.7. Matures SP-C Gehalt in Lungengewebschnitten mittels Western Blot

3.7.1 Gehalt an maturem SP-C in murinen PCLS

Das Proteinexpressionsprofil von mSP-C der kryokonservierten und ungefrorenen PCLS wurde im Western Blot überprüft. Für die Normalisierung wurde ein Antikörper gegen Beta-Actin verwendet. Gegenüber der ungefrorenen Kontrolle zeigte sich in den kryokonservierten PCLS bei der densitometrischen Auswertung keine signifikant erniedrigte Expression von mSP-C. Mittels wiederholter Messungen konnte ein signifikanter Unterschied der untersuchten Gruppen bezüglich Ihrer mSP-C Expression in Kultur demonstriert werden, auch zeigte sich eine signifikante zeitliche Dynamik über den Untersuchungszeitraum. Die Veränderung der zwei Gruppen verhält sich jedoch gleich und wies kein signifikantes Ergebnis auf (Tab. 23).



Ergebnisse

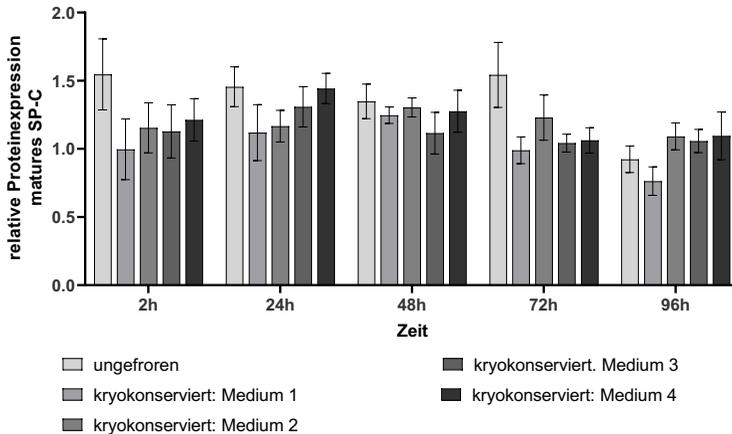


Abb. 23: Matures SP-C Gehalt in murinen PCLS ungefroren und kryokonserviert mittels Western Blot Methodik. Es sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse graphisch dargestellt, sowie ein exemplarischer Immunoblot je verwendetem Medium. Kryokonserviert: **Medium 1:** DMEM/F-12 + 10 % FKS, **Medium 2:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO, **Medium 3:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 50 mmol/l Trehalose, **Medium 4:** DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose. Beta-Actin wurde zur Kontrolle der Proteinladung benutzt und densitometrisch zur Normierung der Blots verwendet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 6$. Nach densitometrischer Quantifizierung zeigte sich im Zweistichproben T- Test keine signifikante höhere Expression von mSP-C in den kryokonservierten gegenüber der ungefrorenen Kontrollsnitte.

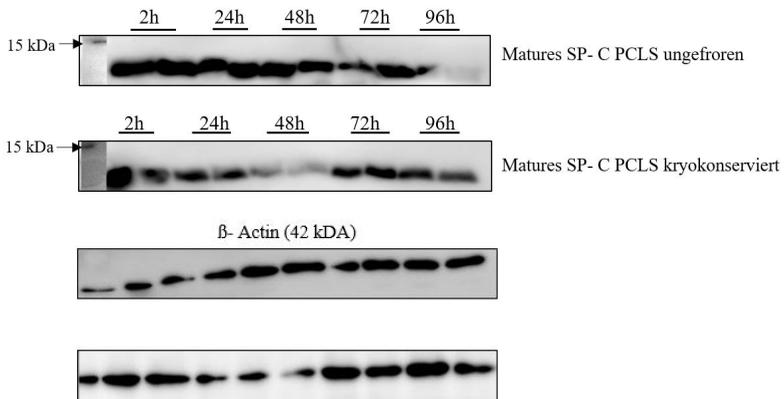
Effekt	p- Wert
Gruppe	0,0151
Zeit	0,0012
Gruppe*Zeit	0,5713

Tab.23: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-C von murinen Lungengewebschnitten ungefroren und kryokonserviert mit Medium 1-4 über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Die Gruppen stellen die verschiedenen Einfriermedien dar. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und eine signifikante zeitliche Dynamik. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab kein signifikantes Ergebnis.

3.7.2 Gehalt an maturem SP-C in humanen PCLS

Gleichermaßen wie bei den murinen PCLS wurde eine Proteinexpression des SP-C mittels Western Blot bei den humanen PCLS durchgeführt. Auch hier konnte sich nach densitometrischer Quantifizierung keine signifikanten Differenzen der beiden Gruppen ermitteln lassen. Es zeigte sich anhand der Immunoblots jedoch ein Rückgang der mSP-C Expression nach 24 h in Kultur. Zur Normierung wurde erneut die Beta-Actin Bestimmung verwendet.

Mittels SAS repeated measures analysis konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied der ungefrorenen und kryokonservierten PCLS in Bezug auf Ihre mSP-C Expression besteht. Ein signifikantes Ergebnis konnte für die zeitliche Dynamik aufgezeigt werden, sodass über den Zeitraum von 96 h die relative Proteinexpression von SP-C signifikant abnimmt. Die zeitliche Veränderung verhält sich jedoch signifikant verschieden innerhalb der untersuchten Entitäten.



Ergebnisse

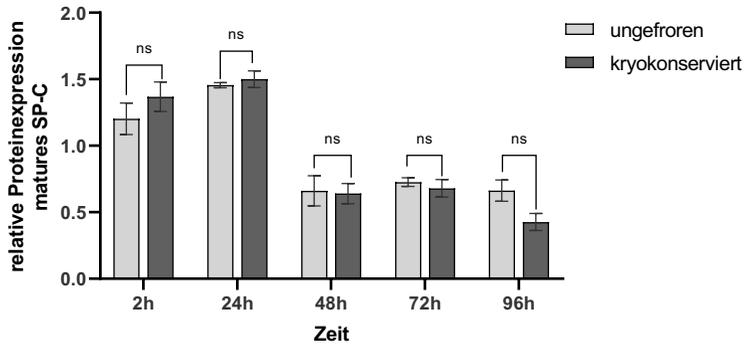


Abb. 24: Matures SP-C Gehalt in humanen PCLS ungefrozen und kryokonserviert (Medium 4: DMEM/F-12+ 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % HS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose) **mittels Western Blot Methodik.** Es sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse graphisch dargestellt, sowie ein exemplarischer Immunoblot. Beta-Actin wurde zur Kontrolle der Proteinladung benutzt und densitometrisch zur Normierung der Blots verwendet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 6$. Mittels T-Test sind ungefrozene versus kryokonservierte PCLS verglichen worden, wobei sich kein signifikantes Ergebnis zeigte.

Effekt	p- Wert
Gruppe	0,7810
Zeit	<0,0001
Gruppe*Zeit	0,0045

Tab.24: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-C von humanen PCLS ungefrozen und kryokonserviert über einen Zeitraum von 96 h. Dargestellt sind die p- Werte der 3 untersuchten Effekte Gruppe, Zeit und Gruppe*Zeit. Signifikanzniveau * $p < 0,05$. Die statistische Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch eine signifikante zeitliche Dynamik über den Untersuchungszeitraum von 96 h. Die Verknüpfung aus Zeit und Gruppe ergab ebenso signifikantes Ergebnis mit $p 0,0045$.

4. Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war die Wirkung der Kryokonservierung auf die Viabilität von PCLS zu untersuchen, sowie eine optimale Einfrieremethode zu etablieren, die den entstehenden Kryoschaden möglichst geringhält. Hierfür wurde zum einen ein Tiermodell mit murinem Lungengewebe, zum anderen humanes Lungengewebe verwendet. Der Gedanke hinter der experimentellen Planung war, die Ergebnisse der murinen Untersuchungen auf das in geringerem Umfang verfügbare humane Material zu übertragen. Die Grundlage für diese Arbeit stellte die Arbeit von Rosner et al. (2014) dar, in der gezeigt werden konnte, dass es möglich ist murine PCLS zu kryokonservieren und dabei die bronchokonstriktorische Reaktion auf Methacholin und Chloroquin unverändert zu erhalten, obwohl die Stoffwechselaktivität reduziert ist. Diese Untersuchungen fanden nur im Tiermodell an murinem Gewebe statt. In dieser Arbeit sollten Untersuchungen auf das humane Material erweitert und verglichen werden. Es wurden unterschiedliche Medien für die Kryokonservierung getestet, um so eine höhere Überlebensrate des Gewebes zu erreichen.

4.1 Beurteilung der Methode zur Herstellung und Kultivierung der PCLS

Die Methode zur Herstellung der PCLS basierte auf Krumdiecks Tissue slicer aus dem Jahre 1980 (Krumdieck et al. 1980). Es wurde ein Vibratom verwendet. Für die Auswertung der Versuchsergebnisse muss beachtet werden, dass nicht jeder PCLS unter optimalen Schneidebedingungen produziert werden konnte. Gute Schneideergebnisse konnten erzielt werden, wenn das Gewebe ausreichend gut mit Agarose befüllt und diese ausgehärtet war, sowie der Gewebeblock bindegewebs- und gefäßarme Anteile hatte. Ebenso konnte das Gewebe besser geschnitten werden, wenn ein Bronchus zentral und nicht peripher lokalisiert war. Es konnte passieren, dass die Bronchialwände ausrissen oder sich der Gewebeblock von der Schneidefläche löste und daher unbrauchbare Schnitte produziert wurden. Dieses Problem konnte verringert werden, wenn eine möglichst geringe Schneidegeschwindigkeit gewählt wurde. Dadurch konnte größtenteils das Lösen des Gewebeblocks und damit einhergehende Scherkräfte auf das Gewebe verhindert werden.

Der Auffangbehälter des Vibratom wurde mit DPBS gefüllt. Nach Produktion eines PCLS wurde dieser in DPBS erneut auf Eis gestellt, bis zum Ende des Schneidevorgangs.

Die Schnitte wurden erst nachdem die komplette Lunge geschnitten und genügend PCLS

vorhanden waren zum Auswaschen der Agarose in CO² Independent Medium überführt. Es ist anzunehmen, dass ein größerer Stress der Schnitte durch die zum Teil längere Verweildauer in gekühltem DPBS hervorgerufen wurde. Hierbei ist anzumerken, dass dieser Prozess nicht standardisiert erfolgte, da je nach vorhandenem Material und Volumen der Lunge der Schneidevorgang zeitlich variierte. Dies könnte ein Einflussfaktor auf die später gemessenen Standardfehler der verschiedenen Versuche sein. Nach Literaturrecherche wurde zur Kultivierung der PCLS DMEM/F12 verwendet. Anhand mehrerer Vorversuche konnte mit diesem Kultivierungsmedium eine stabile Viabilität anhand des LDH Assays ermittelt werden, sodass für die folgenden Versuche dieses Kultivierungsmedium beibehalten wurde. Dies steht in Übereinstimmung mit verschiedenen Studien, in welchen sich DMEM/F12 als gut verwendbares Kultivierungsmedium herauskristallisiert hat (Rosner et al. 2014; Herbert et al. 2017). So konnten beispielsweise Henjakovic et al. mit DMEM/F12 als Medium zum Kultivieren eine geringe relative LDH Freisetzung von 33 % im Mediumüberstand nach 48 h Inkubationszeit der PCLS erreichen. Das Ergebnis bezieht sich als Prozentsatz auf die gesamte LDH- Menge, berechnet aus dem in Triton X- 100 lysierten PCLS (Henjakovic et al. 2008b). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Dissertation sowohl für die ungefrorenen murinen als auch die ungefrorenen humanen PCLS überein.

Probandenmaterial

Des Weiteren ist zur Präparation und Herstellung der PCLS anzumerken, dass die Verarbeitung des humanen Lungengewebes nicht standardisiert werden konnte. Betreffendes ist darauf zurückzuführen, dass der Zeitraum vor Eintreffen der Donorlungen am UKGM Gießen unbekannt war. Somit bestand möglicherweise eine unterschiedliche Transportzeit und damit einhergehend auch die Kühlung auf Eis. Auch inwieweit der Prozess der Explantation der Lunge traumatisch oder atraumatisch stattfand, ist unbekannt. Darüber hinaus ist auch anzunehmen, dass das Alter des Spenders sowie der Zustand der Lunge nach Explantation eine Rolle auf die Versuchsergebnisse spielt. Ein positiver Aspekt dieser Gegebenheiten besteht jedoch darin, dass so die Brauchbarkeit der PCLS nach Kryokonservierung die verschiedenen Bedingungen widerspiegelt und eine allgemeingültigere Aussage zulässt. Im Vergleich dazu bestand bei dem murinen Lungengewebe eine einheitliche Verarbeitung des frischen Lungengewebes, die Mäuse stammten vom gleichen Zuchtstamm und waren zum Zeitpunkt der Verarbeitung 12 Wochen alt.

Agaroseinstillation

Das Lungengewebe stellt ein sehr weiches Gewebe dar, weshalb ein wichtiger Schritt im Prozess der Herstellung der PCLS die Befüllung der Lunge mit Agarose war. Hierdurch konnte eine für den Schneidprozess nötige Stabilisierung des Gewebes erzielt werden. Bei der Maus ist dies problemlos über die Trachea durchzuführen. Die Befüllung der humanen Lunge mit Agarose hingegen stellte ein Problem dar, da dies nur über freiliegende Bronchien möglich ist und durch mehrfaches Abklemmen der Schnittflächen ein Herausfließen der Agarose verhindert werden musste. Es konnte demzufolge keine ausreichende Stabilität des kompletten Lungengewebes erreicht werden, sodass jeweils nur ein Teil des befüllten Lungengewebes zum Verbrauch genutzt werden konnte. Die Randsegmente ließen sich gut mit Agarose befüllen, jedoch konnte hier makroskopisch häufig ein Emphysem erkannt werden, sodass dieser Bereich für den weiteren Gebrauch ausgeschlossen wurde. Laut Martin et al. konnte durch Befüllen der Lunge mit Agarose keine Gewebeschäden festgestellt werden, dabei ist es jedoch wichtig, das natürliche Lungenvolumen nicht zu überschreiten, da sonst ein Trauma des Gewebes entsteht (Martin et al. 1996). In Anlehnung an Placke et al. wurde ein Agarose/Mediumgemisch verwendet anstatt eine in Aqua dest. gelöste Agarose, da dies den Nährstoff- und Gasaustausch innerhalb eines Schnittes verbessern sollte und daher zu einer verbesserten Vitalität beiträgt. Die Instillation von Agarose in Wasser (3 % Aqua dest.) führte in Studien zu verminderter Vitalität, was zum einen auf das Fehlen von Nährstoffen und zum anderen auf den hypotonen Charakter der Agaroselösung zurückgeführt werden konnte (Placke und Fisher 1987; Martin et al. 1996).

4.2 Beurteilung der Methode der Kryokonservierung der PCLS

In dieser Arbeit wurden zur Kryokonservierung eine langsame Einfrieremethode und ein schneller Auftauvorgang gewählt, da dies bereits in mehreren Studien zu erfolgreichen Ergebnissen geführt hat (Watson et al. 2016; Rosner et al. 2014; Bai et al. 2016). Ein wesentlicher Unterschied zu vorangegangenen Studien besteht darin, dass Trehalose als Kryoprotektivum in unterschiedlichen Konzentrationen dem Medium hinzugefügt wurde. Es konnten basierend darauf unterschiedliche Überlebensraten je nach Medium festgestellt werden. Durch Kombination des penetrierenden Kryoprotektivums DMSO (10 %) und des nicht-penetrierenden Kryoprotektivums Trehalose, konnten in dieser Arbeit die besten Viabilitätsraten erfasst werden. In der Vergangenheit hatten bereits einige Autoren darüber berichtet, dass durch die Zugabe von Trehalose zu DMSO eine Verbesserung des kryoprotektiven Effekt des Mediums herbeigeführt

werden kann (Limaye und Kale 2001; Beattie et al. 1997; Lee et al. 2013). Beattie et al. konnten zeigen, dass durch die Zugabe von Trehalose zu DMSO das Überleben von kryokonservierten humanen Pankreasinseln mit 300 mmol/l Trehalose von 58 % auf 92 % gesteigert werden konnte (Beattie et al. 1997). Wir konnten durch das Beifügen von 200 mmol/l Trehalose eine Reduktion der Zelltoxizität nach 2 h in Kultur der PCLS von 18 % auf 10 % erreichen. Lee et al. präsentierte im Jahre 2013, dass die Kryokonservierung von spermatogonialen Stammzellen in einem Einfriermedium mit DMSO und 200 mmol/l Trehalose eine effiziente Methode der Kryokonservierung darstellt. Allerdings resultierte das Hinzufügen von 200 mmol/l Trehalose nicht in einer Verbesserung der Zellviabilität. Es zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Proliferationsaktivität, sowie eine signifikant geringere Prozentzahl an apoptotischen Zellen verglichen mit DMSO. Das Kryokonservieren mit 50 mmol/l Trehalose zeigte dafür eine höhere Zellviabilität im Gegensatz zu DMSO alleine (Lee et al. 2013). Hingegen konnten in dieser Arbeit einheitliche Ergebnisse sowohl für Zellviabilität und enzymatische Zellaktivität als auch für die Proteinexpression mit dem Zusatz von 200 mmol/l Trehalose erbracht werden. Es konnte auch für den Zusatz von 50 mmol/l Trehalose bereits verbesserte Ergebnisse aufgezeigt werden. Kritisch betrachtet werden sollte in Bezug auf die Methode der Kryokonservierung der PCLS noch, dass je 5 PCLS in einem Cryo-Pure Gefäß deponiert wurden. Im Vergleich dazu wurde in der Arbeit von Bai et al. nur 3 PCLS pro Kryogefäß und bei Rosner et al. sowie bei Watson et al. sogar jeder einzelne PCLS in einem individuellen Kryogefäß gelagert (Bai et al. 2016; Watson et al. 2016; Rosner et al. 2014). Diese Vorgehensweise verhindert, dass durch zu viele eng aneinander liegende PCLS die Diffusion des Mediums in das Gewebe behindert wird. Um dadurch entstehende mögliche Auswirkungen auf die Vitalität der PCLS zu verifizieren, sollte dies in künftigen Studien noch berücksichtigt werden.

4.3 Zellviabilität und metabolische Aktivität von frischen und kryokonservierten PCLS

Die Bestimmung der Zellvitalität ist sehr wichtig, um die Brauchbarkeit der PCLS für weitere Versuche einschätzen zu können.

Sie wurde anhand mehrerer Tests bestimmt, zum einen durch den LDH-Assay, aber auch durch den MTT-Assay und die Fluoreszenzfärbungen mit Calcein AM und Ethidiumbromid-homodimer-1. Worle- Knirsch et al. stellten in ihrem Paper "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays" dar, dass die Vitalitätsbestimmung durch verschiedene Versuche als notwendig erscheint, da sich in unterschiedlichen Versuchen zum Teil keine Toxizität

zeigte und alle Zellen überlebten, wenn die Vitalität mittels LDH-Assay oder WST-1 Assay bestimmt wurde, hingegen die Vitalität von humanen Lungenepithelzellen anhand des MTT-Assay um die Hälfte abgenommen hatte (Worle-Knirsch et al. 2006). Valide Aussagen können somit nur getroffen werden, wenn mehr als ein Vitalitätstest angewendet wird. Wie bereits erwähnt wurde in dieser Arbeit zum einen der LDH-Assay, der die möglichen Zellmembranschäden erfasst, als auch der MTT-Assay zur Beurteilung der mitochondrialen Aktivität der Zellen, eingesetzt. Ein visueller Eindruck konnte mittels der Fluoreszenzfärbung des Zellgerüsts und der Quantifizierung der toten Zellen erlangt werden.

4.3.1 Beurteilung der Ergebnisse des LDH-Assay

Die LDH Freisetzung der ungefrorenen murinen Kontrollschnitte lag nach 2h Inkubationszeit bei lediglich 2,4 %, nach 24 h bei 11 %. Die der ungefrorenen humanen PCLS nach 2 h Inkubation bei 6 % und nach 24 h bei 16 %. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen von Wohlsen et al. veröffentlichten Werten. In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass die LDH Freisetzung in den ersten 24 h Inkubationszeit unter 10 % blieb.

Nach 72 h Inkubation konnte kein LDH Anstieg über 15 % verzeichnet werden (Wohlsen et al. 2003). Auch Henjakovic et al. erzielten eine vergleichbare LDH Ausschüttung nach 4-stündiger Inkubation (Henjakovic et al. 2008a). Es konnte in allen Studien ein fast linearer Anstieg beobachtet werden. In dieser Arbeit zeigten sich nur minimal schlechtere Ergebnisse mit einem Anstieg bis 17 % nach 72 h der murinen Proben. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit kam es zu einer Verdopplung der LDH Freisetzung, was zeigte, dass über einen Zeitraum von 72 h hinaus die Vitalität stark abnimmt und sich die PCLS möglicherweise für den weiteren validen Gebrauch nicht mehr eignen. In den Versuchen der humanen Lungengewebschnitte zeigte sich im Vergleich zu Wohlsen et al., der ebenso humanes Material verwendete, jedoch eine schlechtere Viabilität, da die LDH-Freisetzung nach 48 h bereits 27 % und nach 72 h 39 % erreichte. Ein relevanter Unterschied der beiden Studien, der zu den differenten Ergebnissen beitragen könnte, liegt in der Schnittdicke der PCLS. Wohlsen et al. produzierten humane PCLS mit einer Dicke von 250 µm, während in dieser Arbeit humane Schnitte mit einer Dicke von 500 µm hergestellt wurden. Die geringere Schnittdicke resultiert in einer besseren Penetration des Kultivierungsmediums in das Gewebe und damit einer besseren Versorgung mit Nährstoffen über einen längeren Zeitraum.

Auch Ressmeyer et al. demonstrierten, dass PCLS für mindestens 3 Tage in Kultur vital bleiben. Es wurden PCLS aus Meerschweinchenlungen verwendet und damit vergleichbare Werte

erzeugt mit einer LDH Freisetzung $< 10\%$ nach 24 h. Ressmeyer et al. untersuchte ebenso den Unterschied auf die Viabilität mit und ohne Mediumwechsel nach je 24 h und konnte nach 72 h mit Mediumwechsel eine deutlich verbesserte Viabilität der PCLS belegen (Ressmeyer et al. 2006). Auch muss beachtet werden, dass die Stabilität von LDH begrenzt ist, LDH ist für etwa 24 h stabil. Umachandran et al. legte in seinen Arbeiten dar, dass das LDH in den Überständen der PCLS nur bis zu 24 h die Zytotoxizität widerspiegelte und es nach einem längeren Zeitraum zur Akkumulation von LDH in den Überständen kommt, rückführend auf die begrenzte LDH Stabilität (Umachandran et al. 2004; Umachandran und Ioannides 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde das Kultivierungsmedium alle 24 h gewechselt, um der Instabilität des LDH vorzubeugen. So konnte alle 24 h die LDH Freisetzung bestimmt werden, ohne dass ein sprunghafter Rückgang der Freisetzung stattfand. Ein weiterer Punkt, der kritisch in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der unterschiedlichen Studien anzubringen ist, stellt die unterschiedliche Methode dar. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielsweise jedes einzelne PCLS auf einer 24-Well Zellkulturplatte in 1 ml Medium kultiviert. In der Arbeit von Rössmeyer et al jedoch je 3 PCLS pro 1 ml Medium, ebenso verfuhr Wohlsen et al. in seiner Arbeit. Es wäre zu erwarten, dass bei einer höheren verfügbaren Mediummenge je PCLS eine höhere Viabilität resultiert. Dies müsste jedoch erneut unter standardisierten Bedingungen verifiziert werden, sodass die hier aufgeführten übereinstimmenden Versuchsergebnisse nicht präzise verglichen werden können.

Resümierend kann gesagt werden, dass die Kryokonservierung durchaus einen negativen Einfluss auf die Viabilität der PCLS hat, der durch Zugabe von zwei verschiedenen Kryoprotektiva DMSO und Trehalose nicht komplett geblockt werden kann. Dennoch zeigten sich v. a. die murinen Lungenschnitte bis zu 48 h in Kultur nach dem Auftauen noch vital. Es ist in Zusammenschau der Versuchsergebnisse anzunehmen, dass nekrotische Prozesse in den PCLS während der Kryokonservierung ablaufen, diese sich jedoch anschließend wieder kultivieren lassen, trotz des zuvor entstandenen Zellschadens. Wäre dies nicht möglich, wäre eine deutlich höhere LDH Freisetzung bereits nach 2 h in Kultur zu erwarten.

Die positiven Ergebnisse, die Rosner et al. in ihrer Arbeit veröffentlichte, konnten in dieser Arbeit nicht verifiziert werden. So wurde gezeigt, dass nach Kryokonservierung von murinen PCLS die Zellzytotoxizität ähnlich der frischen PCLS nach 18 h Kultivierung bei ca. 1 % lag. Rosner et al. verwendete eine vergleichbare Methode, es wurde ebenso ein Einfriermedium mit 10 % DMSO benutzt, je ein PCLS in einem Kryogefäß deponiert, eine langsame Einfrieremethode sowie eine schnelle Auftaumethode im Wasserbad gewählt. Die starke Abweichung lässt sich folglich daraus nicht erklären (Rosner et al. 2014). In einer Studie von Bai et al. wurden

für humane kryokonservierte PCLS in Anlehnung an die Daten von Rosner et al. ähnliche Ergebnisse erzielt. Es wurde veröffentlicht, dass die LDH Freisetzung in humanen kryokonservierten PCLS über einen Zeitraum von 10 Tagen gering blieb und dadurch die geringe Zellodrate und Viabilität bestätigt wurde. Auch diese Aussage konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es ist hierbei anzumerken, dass in der Studie von Bai et al. keine Kontrollgruppe von ungefrorenen humanen PCLS untersucht wurde und die Gruppengröße des LDH Assay $n = 3$ Schnitte von je 2 humanen Lungen betrug. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde $n = 15$ Schnitte gewählt von 3 verschiedenen humanen Lungen. Es konnten auch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Methoden identifiziert werden (Bai et al. 2016).

Für die Viabilitätsbestimmung mittels LDH-Assay konnte bezüglich kryokonservierten PCLS in der Literatur keine weiteren zu vergleichenden Daten gefunden werden.

4.3.2 Beurteilung der Ergebnisse des MTT-Assay

Eine weitere aussagekräftige Untersuchung stellt die Messung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay dar (Mosmann 1983). Mit dem Assay konnte gezeigt werden, dass die nicht kryokonservierten PCLS über einen Zeitraum von 92 h vital blieben, hierbei zeigte sich nach 24 h in Kultur zunächst ein Anstieg der mitochondrialen Stoffwechselaktivität, die nach einer Kultivierungsdauer von 48 h wieder abnahm. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die PCLS nach dem Schneidevorgang und dem Aufbewahren im kalten Schneidemedium zunächst eine gewisse Zeit in Kultur benötigen, um ihre Stoffwechselaktivität wieder aufzunehmen. Diese Regenerationsphase wurde auch von anderen Autoren beschrieben, die eine Verbesserung der metabolischen Aktivität mit der Kultivierungszeit beobachteten (Temann et al. 2016). Bei den humanen PCLS konnte sogar erst nach 72 h in Kultur die höchste Vitalität gemessen werden. Nach diesem Zeitpunkt kam es jedoch zu einem raschen Abfall der gemessenen Aktivität. In den kryokonservierten Lungengewebschnitten konnte ebenfalls eine Vitalität anhand des Assay nachgewiesen werden, diese Werte lagen jedoch sowohl bei den murinen als auch bei den humanen Schnitten deutlich unter denen der frischen Schnitte. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des zuvor diskutierten LDH-Assays konnten auch hier signifikante Unterschiede der gemessenen Stoffwechselaktivität in Abhängigkeit des Kryokonservierungsmediums festgestellt werden. Die höchste Vitalität wurde erneut für das Medium mit dem Zusatz 10 % DMSO und 200 mmol/l Trehalose bestimmt. Nach Kryokonservierung zeigten die murinen PCLS nach 48 h ihr Aktivitätsmaximum, die humanen Schnitte bereits nach 24 h bevor es zu einem Abfall der Vitalität kam. Dies signalisiert erneut, dass die PCLS eine gewisse „Erholungszeit“ unter

Kultivierungsbedingungen benötigen, bevor das Gewebe wieder eine gute Stoffwechselaktivität erreicht.

Die Versuchsergebnisse der murinen Schnitte zum Zeitpunkt 72 h sind kritisch zu bewerten, da sich hier zum einzigen Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied, sowohl unter den verschiedenen Medien, aber auch zu den frischen PCLS, nachweisen ließ. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Werte der gefrorenen Schnitte deutlich unter denen der frischen lagen, dennoch auch nach Kryokonservierung noch eine messbare Vitalität bzw. Stoffwechselaktivität nachweisbar war. Die bessere Vitalität der murinen PCLS im Vergleich zu den humanen könnte mit der besseren Diffusion der Medien in das Gewebe zusammenhängen, da diese in einer geringeren Schnittdicke produziert wurden.

Ein weiterer Punkt, der im Zusammenhang mit den Ergebnissen des MTT Test noch beachtet werden sollte, ist, dass durch die Schädigung des Gewebes es zusätzlich zu einer NADP(H) Freisetzung in das Medium kommen kann und es dadurch zu einer Reaktion mit der MTT Lösung kommt. Um zu überprüfen, ob die gemessenen Werte tatsächlich der Vitalität entsprechen, sollte ein weiterer Test zur Überprüfung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität angewendet werden, dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Auf Grund der Vitalitätsbestimmung anhand mehrerer anderer Assays ist dennoch davon auszugehen, dass die hier gemessene Aktivität der mitochondrialen Vitalität der PCLS entspricht. Die metabolische Aktivität nach Kryokonservierung der PCLS wurde bereits in anderen Studien mehrfach untersucht. Sowohl Watson et al. als auch Rosner et al. konnten genau wie in dieser Arbeit zeigen, dass die kryokonservierten PCLS eine signifikant geringere metabolische Aktivität aufwiesen als die frischen Gewebeschnitte (Watson et al. 2016; Rosner et al. 2014). Wie zuvor bei den Ergebnissen des LDH-Assay beschrieben konnte Lambermont et al. auch mittels MTT-Assay zeigen, dass PCLS von Schafen ebenso für mindestens 3 Tage vital bleiben. Es wurde in dieser Studie aufgeführt, dass die Absorbance über drei Tage stabil blieb, es zeigte sich jedoch nicht wie in anderen Arbeiten, so wie auch in dieser, ein Abfall der metabolischen Aktivität über diesen Zeitraum. Jedoch wurden für die Messungen nur PCLS verwendet, die schlagende Zilien sowie eine intakte und entspannte glatte Atemwegsmuskulatur hatten. Diese Selektion wurde bei anderen Studien nicht durchgeführt, was die stabile Stoffwechselaktivität in Kultur hervorrufen könnte (Lambermont et al. 2014). Bereits 1996 wendete Martin et al. den MTT-Assay, als einen Index für die mitochondriale Aktivität nach dem Protokoll von Mosmann (Mosmann 1983) an und konnte ebenso darstellen, dass PCLS über einen Zeitraum von 72 h vital erschienen (Martin et al. 1996).

Die hier dargestellten Differenzen der frischen und gefrorenen PCLS, als auch die von Rosner

und Watson gemessene Stoffwechselaktivität korrespondieren mit dem für bereits anderes kryokonserviertes Gewebe gemessene Bereiche, wie z. B. von kolorektalem Gewebe, der Leber oder Fettransplantaten (McGowan et al. 2012; Maas et al. 2000b; MacRae et al. 2004).

4.3.3 Strukturelle Schädigung der PCLS durch Kryokonservierung

Die zuvor diskutierten Vitalitätstests ergaben, dass die Lungengewebeschnitte, sowohl die murinen als auch die humanen, unter den verwendeten Kultivierungs- und Kryokonservierungsmethoden noch über einen gewissen Zeitraum vital sind. Es wurde festgestellt, dass zwar die Stoffwechselaktivität nach Kryokonservierung reduziert wird, aber ein Teil der Zellen eines Schnittes dennoch vital sind. Für die optimale Nutzung der Schnitte ist aber nicht allein die Energieversorgung und Stoffwechselaktivität ausreichend. Einen nicht zu vernachlässigen Aspekt spielt auch die Intaktheit der strukturellen Gegebenheiten innerhalb des PCLS. Zur Verdeutlichung der strukturellen Schäden wurde eine Färbung mit Calcein AM und Ethidiumhomodimer-1 durchgeführt. Es zeigte sich erneut, dass über einen Zeitraum von 72 h in Kultur, die PCLS eine gut darstellbare Plasmamembran aufwiesen und sich nur eine geringe Anzahl an toten Zellen zeigten. Es konnte somit anhand von drei verschiedenen Versuchen die Vitalität der PCLS bestimmt werden. In den Schnitten beider verwendeter Entitäten konnte festgestellt werden, dass sich die Plasmamembran über einen längeren Zeitraum langsam auflöste, dies war an humanen PCLS deutlicher ausgeprägt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen des Gewebes nach Kryokonservierung deutlicher waren, jedoch nur eine geringe Beeinflussung auf die Gewebeintegrität ausgeübt wurde. Es war zu erwarten, dass während der Kryokonservierung ein größerer Stress auf die PCLS entsteht als lediglich der Schneidevorgang. Die verminderte Versorgung des Gewebes mit wichtigen Nährstoffen während des Einfrier- und Auftauvorgangs trägt auch zur Veränderung der Gewebestruktur bei. Eine weitere Arbeitsgruppe beschrieb anhand der Fluoreszenzfärbung mit Calcein-AM und Ethidiumhomodimer-1 die strukturelle Intaktheit des Lungenparenchym, der Blutgefäße und Atemwege. Es wurde wiedergegeben, dass der Zelltod minimal war und vor allem entlang des Epithels der Atemwege und der Ränder der PCLS lokalisiert war (Rosner et al. 2014). Auch in der Arbeit von Ressmeyer et al. wurden ihre zuvor ermittelten Ergebnisse des LDH-Assay anhand der Färbung mit Calcein AM und Ethidiumhomodimer-1 bestätigt. Die mikroskopische Auswertung lebender Zellen ergab weniger als 10 % toter Zellen. Die Zahl der toten Zellen blieb beständig über einen Zeitraum von 72 h. Ein täglicher Mediumwechsel war auch hier effektiv für die Erhaltung der lebenden Zellen (Ressmeyer et al. 2006). Die Ergebnisse stehen nicht

vollständig in Einklang mit den hier gezeigten Abbildungen (Abb.13, Abb.14). Für die murinen PCLS, sowohl die frischen als auch die kryokonservierten mit dem Medium mit Zusatz von 10 % DMSO und 50 bzw. 200 mmol/l Trehalose zeigte sich ein vergleichbares Bild. Auch hier schienen die rot gefärbten, toten Zellen konstant zu bleiben. Für das humane Gewebe zeigte sich jedoch bereits für beide Gruppen (frisch vs. kryokonserviert) nach 24 h in Kultur ein deutlicher Anstieg der toten Zellen und eine schwächere Darstellung der Plasmamembran. Jedoch spiegelt dies die auch zuvor minimal schlechteren Ergebnisse der humanen Schnitte im Vergleich zu den murinen wider. Eine Limitierung des hier vorgestellten Versuchsaufbaus bestand darin, dass nicht dieselben PCLS über den gesamten Zeitraum beobachtet werden konnten, sondern zu jedem Zeitpunkt neue Schnitte mikroskopiert wurden. Nach der Färbung waren die Schnitte nicht erneut für eine weitere Färbung brauchbar, da zum einen die lange Inkubationsdauer zu einer nicht mehr auswertbaren Fluoreszenz führen würde und zum anderen der Prozess des Mikroskopierens und der Färbung an sich Stress auf das Gewebe ausübt und somit eine höhere Anzahl an toten Zellen resultieren würde.

Daher konnte nicht beurteilt werden wie sich ein individueller Schnitt über den gewissen Zeitraum bzw. nach Kryokonservierung verändert. Um dennoch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde zur Auswertung der Bilder je 3 PCLS drei unterschiedlicher Mäuse und 3 humane PCLS von drei verschiedenen Donorlungen betrachtet.

4.4 Bewertung der Markierung differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II mittels LysoTracker Green

In den zuvor beschriebenen Versuchen wurde die Vitalität der PCLS ausführlich diskutiert. Hierbei wurde jedoch immer der ganze Gewebeschnitt betrachtet. Es ist allerdings auch wichtig zu überprüfen, ob die Funktion einzelner Zelltypen innerhalb des PCLS noch funktionstüchtig sind. Es wurde LysoTracker Green verwendet, um differenzierte Alveolarepithelzellen Typ II zu markieren. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich LysoTracker Green selektiv in Lamellarkörpern von alveolären Typ II Zellen in der Lunge abgelagert (Wemhöner et al. 2006). Die Fluoreszenzfärbung mit LysoTracker Green wurde als relevante Methode zur mikroskopischen Identifizierung der Differenzierung von Alveolarepithelzellen Typ II in Zellkulturen erkannt (van der Velden et al. 2013). Funktionstüchtige Alveolarepithelzellen Typ II spielen eine entscheidende Rolle, da sie für die Produktion von Surfactant verantwortlich sind. Surfactant reduziert die alveoläre Oberflächenspannung und ermöglicht ein Offenhalten der Alveolen,

wodurch ein effektiver pulmonaler Gasaustausch ermöglicht wird. Es wurde mehrfach veröffentlicht, dass eine Schädigung der Alveolarepithelzellen Typ II durch die reduzierte Surfactant Produktion auch eine Rolle in der Entstehung der Idiopathischen Lungenfibrose spielt (Wasnick et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einbau von LysoTracker in die Alveolarepithelzellen Typ II verwendet, um die Surfactant produzierenden Anteile darzustellen. Es zeigte sich sowohl bei den murinen als auch bei den humanen PCLS eine Abnahme des LysoTracker Signals über den Beobachtungszeitraum. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch diese Ergebnisse in Einklang mit den vorangegangenen Vitalitätstest stehen. Es zeigten sich nach Kryokonservierung der PCLS noch differenzierte Alveolarepithelzellen Typ II, woraus zu schließen ist, dass in den PCLS noch eine Surfactant Produktion stattfindet, jedoch reduziert im Vergleich zu den frischen Lungengewebeschnitten. Auch die kontinuierliche Abnahme des Signals der LysoTracker Färbung über einen Zeitraum von 96 h spiegelt die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Vitalitätsuntersuchungen wider. Die Anzahl der markierten AEC II der humanen Gewebeschnitte waren auch in der Gruppe der kryokonservierten PCLS geringer als bei den frischen Schnitten, jedoch zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Surfactantexozytose auch nach Kryokonservierung der PCLS noch vorhanden ist. Nach 24 h und 72 h in Kultur der PCLS zeigte sich in der Anzahl der fluoreszierenden Lamellarkörper kein signifikanter Unterschied zwischen frischen PCLS und denen, die mit Medium 4 kryokonserviert wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass Kryokonservierung mit dem beschriebenen Medium die Exozytose von Surfactant aus Lamellarkörpern der AEC II nicht beeinflusst. Wie bei der Fluoreszenzfärbung mit Calcein AM und Ethidiumbromid-homodimer-1 lag bei diesem Versuch die gleichen limitierenden Gegebenheiten vor. So musste auch hier zu jedem Mikroskopiezeitpunkt ein neuer individueller Gewebeschnitt verwendet werden, sodass der direkte Vergleich der Veränderung der surfactantproduzierenden Zellen über den Zeitraum in Kultur oder nach Kryokonservierung nicht dargelegt werden konnte. In der Literatur konnten keine vergleichbaren Daten gefunden werden.

4.5 Bewertung der Vitalität der PCLS auf Proteinebene

Zur weiteren Bewertung der Ergebnisse wurde mittels Western Blot Methodik die Vitalität und Funktionstüchtigkeit der PCLS auf Proteinebene untersucht. Ausgewählt wurden zum einen die Messung der Caspase-3 Aktivität, als Marker der Apoptose, zum anderen die Bestimmung der

Proteine mSP-B und mSP-C. Beide Proteine sind für die Herabsetzung der alveolären Oberflächenspannung von Wichtigkeit, da sie neben Phospholipiden Bestandteil des Surfactant darstellen (Wasnick et al. 2019).

Gespaltene Caspase-3 Aktivität

Zur Beurteilung der Apoptoserate wurde die Quantifizierung der aktivierten Caspase 3 verwendet. Caspase-3 gilt als eine Haupteffektorcaspase der apoptotischen Abläufe in einer Zelle, deren Aktivierung als Apoptosemarker verwendet werden kann (Gown und Willingham 2002). In einer Publikation konnte bei frischen murinen PCLS eine Hochregulation der gespaltenen Caspase-3 im Vergleich von 48 h zu 92 h in Kultur aufgezeigt werden (Ruigrok et al. 2019). Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten sowohl für die murinen als auch die humanen PCLS keinen signifikanten Unterschied zwischen ungefrorenen und kryokonservierten Schnitten in Bezug auf die Expression der gespaltenen Caspase 3. Daraus lässt sich schließen, dass Kryokonservierung nicht wesentlich dazu beiträgt ein Zelltodprogramm wie Apoptose auszulösen. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass über den Kultivierungszeitraum die Expression der gespaltenen Caspase 3 in den einzelnen untersuchten Entitäten signifikant ansteigt, sodass man von einer Apoptoseinduktion mit steigender Kultivierungsdauer der PCLS ausgehen kann. Es konnte keine vergleichende Veröffentlichung bezüglich der Apoptosebestimmung mittels Caspase-3 für kryokonservierte PCLS in der Literatur gefunden werden.

Matures SP-B und Matures SP-C

Typ II Pneumozyten wurden bereits durch die LysoTracker Green Färbung sichtbar gemacht. Durch die Western Blot Methodik wurde auf Proteinebene anhand der Expression von mSP-B und mSP-C die alveolären Epithelzellen Typ II identifiziert. Sowohl matures SP-B als auch matures SP-C konnten in dieser Arbeit in murinen und humanen PCLS vor und nach Kryokonservierung nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Fähigkeit der Synthese und Prozessierung der primären Translationsprodukte (pro SP-B; pro SP-C) sowohl in frischen als auch kryokonservierten PCLS erhalten bleibt. Die Proteine der ungefrorenen PCLS wurden jedoch jeweils geringgradig höher exprimiert. Für den SP-B Gehalt der murinen PCLS konnte für alle Gruppen nur ein sehr schwaches Signal erzeugt werden. Zusammenfassend konnte durch diese Proteinbestimmung jedoch die Funktionstüchtigkeit der Alveolarepithelzellen auch nach Kryokonservierung dargestellt werden. Ein signifikanter Unterscheid der untersuchten Gruppen konnte nicht aufgezeigt werden, woraus sich schließen lässt, dass Kryokonservierung die Surfactantproduktion nicht wesentlich beeinflusst. Lediglich die statistische Auswertung

Diskussion

der humanen SP-C Expression erbrachte innerhalb der Gruppen der ungefrorenen und gefrorenen PCLS eine signifikante Reduktion über den Untersuchungszeitraum von 96 h in Kultur. Daraus lässt sich wie in den zuvor durchgeführten Versuchen schließen, dass die PCLS nur bis zu einem gewissen Zeitpunkt vital kultiviert werden können und die Möglichkeit der Surfactantproduktion über die Zeit abnimmt. In zwei weiteren Publikationen wurde auch anhand der SP-B und SP-C Expression über die Identifizierung von Typ II Pneumozyten nach Kryokonservierung von Lungengewebe berichtet (Annalaura et al. 2012; Baatz et al. 2014).

Eine allgemeine Problematik der Western Blot Methodik stellte die Proteinbestimmung dar. So konnte nicht für jede Probe die gleiche Proteinmenge hergestellt werden, da nicht jedes einzelne PCLS denselben Anteil hatte. Es stellte sich heraus, dass trotz angepasster Proteinladungsmenge in der β -Actin Probe keine einheitliche Expression dessen erzeugt werden konnte. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass beobachtet wurde, dass gerade bei den Proteinproben der humanen PCLS, diese oftmals keine homogene Lösung darstellten. Aus diesem Grund wurden die Molekulargewichte und Expressionsniveaus der untersuchten Proteine (gespaltene Caspase-3, SP-B, SP-C) durch eine Normalisierung auf die β -Actinexpression normiert. In weiteren Versuchen sollte dieser Problematik mehr Beachtung gewidmet werden. Ein Lösungsansatz wäre, anstatt der hier verwendeten 3 PCLS je Probe die Anzahl zu reduzieren oder die Menge der Homogenisatorlösung zu erhöhen.

4.6 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte anhand der gewonnenen Ergebnisse aufgezeigt werden, dass es möglich ist, Lungenpräzisionsschnitte (PCLS) zu kryokonservieren und wieder aufzutauen. Dabei konnte das Gewebe vital erhalten werden. Es wurde beobachtet, dass die PCLS durch den Einfrierprozess an sich einen gewissen Schaden erleiden (siehe Ergebnisse LDH- Assay, MTT- Assay und Fluoreszenzfärbungen), dennoch sich anschließend entsprechend der frischen PCLS weiterkultivieren lassen und keine signifikant höhere Apoptoseinduktion der zuvor gefrorenen Schnitte stattfindet. Insbesondere durch die Fluoreszenzfärbungen wurde deutlich, dass die kryokonservierten Schnitte nach dem Auftauvorgang mehr tote Zellkerne enthalten als die Frischen, jedoch wurde durch z.B den MTT- Test aufgezeigt, dass in der anschließenden Kultur die Schnitte sich auf Stoffwechselebene erholen und keine signifikant geringere Anzahl an differenzierten Alveolarepithelzellen Typ II aufweisen. Mittels verschiedener Versuchssysteme konnte die zelluläre Intaktheit, die mitochondriale Stoffwechselaktivität sowie die Funktionalität spezifischer Zellen ermittelt werden. Insgesamt zeigte sich jedoch ein Einfluss der Kryokonservierung auf das Gewebe. Obwohl das Gewebe vital erhalten werden konnte, musste dennoch festgestellt werden, dass nach dem Auftauprozess signifikante Unterschiede zu den nicht kryokonservierten Lungengewebeschnitten bestanden. So konnte gezeigt werden, dass z. B. die mitochondriale Stoffwechselaktivität nach Kryokonservierung verringert ist. Die Fluoreszenzfärbungen hingegen machten deutlich, dass die strukturelle Beschaffenheit des Gewebes auch nach Kryokonservierung noch erhalten ist. Ein vielfach verwendeter Marker der Vitalität stellte in zahlreichen Publikationen die noch erhaltene Bronchokonstriktion dar (Bai et al. 2016; Rosner et al. 2014; Wohlsen et al. 2003; Lambermont et al. 2014). In dieser Studie wurde das Augenmerk auf einen noch weniger erforschten Bereich gerichtet. Es wurde die Differenzierung der Pneumozyten Typ II untersucht sowie deren Surfactant Produktion. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Kryokonservierung nur einen geringen Einfluss auf die Funktion dieser wichtigen Zellen der Lunge hat. Auch auf Proteinebene, anhand der Messung von SP-B und SP-C, ließ sich beweisen, dass in kryokonservierten PCLS noch eine Surfactantproduktion stattfindet. Diese Feststellung stellt einen wichtigen Aspekt in der Nutzung der PCLS dar, da Surfactant eine wichtige Rolle in der Lungenfunktion darstellt (Wasnick et al. 2019).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal auch der Unterschied der Kryomedien auf die PCLS mit dem Zusatz von Trehalose untersucht. Es ließen sich positive Effekte in allen Versuchsergebnisse mit dem Zusatz von 200 mmol/l Trehalose aufzeigen. Auch konnte gezeigt werden, dass zwischen dem vielfach untersuchten murinen Gewebe und den hier untersuchten humanen

Diskussion

Schnitten nur ein geringer Unterschied bestand. Das Einfrieren und Auftauen v. a. auch humaner PCLS erscheint daher als relevantes und interessantes, neues ex-vivo-Modell. Es erscheint dennoch notwendig weitere Untersuchungen in Bezug auf humanes Material durchzuführen. Auch der Einfluss der Trehalose sollte in zukünftige Studien weiter ausgearbeitet werden. Es wurden in dieser Arbeit beispielweise nur zwei unterschiedliche Konzentrationen gewählt. Es könnten also möglicherweise noch bessere Ergebnisse mit einer optimaleren Trehalose Konzentration erzielt werden. Ein weiterer Punkt wäre, dass in dieser Arbeit zwar eine langsame Einfriermethode verwendet wurde, jedoch die PCLS zuerst auf Eis gestellt wurden und dann in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ überführt wurden. Die genaue Rate der Senkung der Temperaturen war somit nicht bekannt. Es gibt jedoch Gefrierautomaten die eine kontinuierliche Temperatursenkung von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ erzeugen ("controlled freezing"). Diese wurden in anderen Publikationen verwendet, sodass es interessant wäre den Einfluss dieser Methodendifferenz noch genauer zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kryokonservierung von murinen und auch humanen PCLS ein aussichtsreiches ex-vivo-Modell darstellt. Durch die Kryokonservierung des Gewebes wird eine Durchführung von Experimenten unabhängig von dem Zeitpunkt des verfügbaren Materials und der Herstellung der Gewebeschnitte ermöglicht, ebenso wie eine Erforschung an humanem Gewebe, das gerade für pharmakologische Studien wichtig erscheint, um keine spezialrelevante Differenz zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Kryokonservierung ist ein Vorgang, der es ermöglicht Zellen, Organellen und Gewebe durch die Kühlung auf sehr niedrige Temperaturen über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Kryokonservierung und verschiedener Einfriermedien auf Vitalität, Differenzierung und Strukturerhalt von Präzisionsschnitten (PCLS) von Lungengewebe zu untersuchen. Die zeitliche Limitierung der PCLS in Kultur für Studien erfordert eine Möglichkeit diese über einen längeren Zeitraum zu lagern, ohne dabei die Funktionalität zu beeinflussen. Zur Kryokonservierung wurden Medien getestet, die als Kryoprotektiva DMSO und Trehalose unterschiedlicher Konzentrationen erhielten. So konnte nach Etablierung der optimalen Einfriermethode an murinen PCLS diese auf das humane Gewebe übertragen werden. Die Vitalität wurde anhand der LDH-Freisetzung, des MTT-Tests sowie einer Lebend-/Totfluoreszenzfärbung bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass das Medium einen Einfluss auf die Vitalität ausübt, die beste Vitalität konnte mit DMEM/F-12 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l Trehalose erzielt werden. Der Vergleich zwischen den frischen und kryokonservierten PCLS zeigte, dass sowohl die Viabilität als auch die metabolische Aktivität nach Kryokonservierung reduziert war. Auch die strukturelle Intaktheit der PCLS demonstrierte eine negative Veränderung nach Kryokonservierung. Auf Proteinebene konnte jedoch keine signifikant erhöhte Expression der gespaltenen Caspase-3 festgestellt werden, die als Marker der Apoptoseinduktion eingesetzt wurde.

In einem weiteren Schritt wurde die Surfactantproduktion der PCLS in Abhängigkeit der Medien und der Kryofixierung untersucht. Hierzu wurde eine Fluoreszenzfärbung mit LysoTracker Green sowie eine Messung der Surfactant produzierenden Proteine B und C mittels Western Blot Methodik durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass auch kryokonservierte PCLS noch differenzierte Alveolarepithelzellen Typ II besitzen und in gewissem Maße SP-B und SP-C noch nachweisbar ist, jedoch bestand eine Reduktion im Vergleich zu ungefrorenen PCLS. Die gewonnenen Ergebnisse legen dar, dass Kryokonservierung und die Langzeitlagerung von PCLS prinzipiell eine aussichtsreiche Lösung der limitierten Vitalität der PCLS in Kultur darstellt. Es wurde demonstriert, dass sowohl murines als auch humanes Lungengewebe vital kryokonserviert werden kann. Allerdings erscheint es sinnvoll weitere Studien durchzuführen, um die Vitalität nach Kryokonservierung zu verbessern und die PCLS noch effektiver vor Schäden zu bewahren.

6. Summary

Cryopreservation is a process that allows cells, organelles, and tissues to be preserved over a longer period of time by cooling to exceptionally low temperatures. The aim of this study was to investigate the influence of cryopreservation and various freezing media on vitality, differentiation and structural preservation of precision incisions (PCLS) of lung tissue. The temporal limitation of PCLS requires a possibility to store them over a longer period without affecting functionality. The usability of PCLS after cryopreservation was verified by various vitality tests. For cryopreservation, freezing media were tested, which received the cryoprotective agents DMSO and trehalose at different concentrations. After establishing the optimal freezing method on murine PCLS, this was transferred to human tissue. Vitality was determined by LDH release, MTT-Assay, and live/dead fluorescence staining. The results showed that the freezing medium exerts an influence on vitality, the best vitality could be achieved with DMEM/F-12 + 1 % penicillin/streptomycin + 10 % FKS + 10 % DMSO + 200 mmol/l trehalose.

The comparison between fresh and cryopreserved PCLS showed that both, viability and metabolic activity, were reduced after cryopreservation. The structural integrity of the PCLS also demonstrated a negative change after cryopreservation and at the protein level no increased expression of the cleaved caspase-3 was observed, which was used as a marker of apoptosis induction. In a further step, the surfactant production of PCLS as a function of the media and cryofixation was investigated. For this purpose, fluorescence staining with LysoTracker Green and a measurement of the surfactant producing proteins B and C were performed using Western blot methods. It was found that cryopreserved PCLS still have differentiated alveolar epithelial cells type II and to some extent SP-B and SP-C are still detectable, but there was a reduction compared to unfrozen PCLS.

The results show that cryopreservation and long-term storage of PCLS are principally a promising solution to the limited viability of PCLS in culture. It has been demonstrated that both murine and human lung tissue can be vitally cryopreserved. However, it seems useful to carry out further studies to improve the viability after cryopreservation and to protect the PCLS even more effectively from damage.

7. Abkürzungsverzeichnis

AEC II	Alveolar epithelial cells Typ II
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CPAs	cryoprotectant agents
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Calcein-AM	Calcein-Acetoxyethyl
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ⁺	Kupfer
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
GST	Glutathion-S Transferase
H ⁺	Wasserstoff
HCL	Chlorwasserstoff
hPCLS	humane Precision cut lung slices
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	humanes Serum
H ₂ O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
IPF	idiopathische Lungenfibrose
LDH	Lactatdehydrogenase
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mm	Millimeter

Abkürzungsverzeichnis

mM	Millimolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
nM	Nanomolar
O ₂	Sauerstoff
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCLS	Precision cut lung slices
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPM	revolutions per minute
RSV	Respiratory-Syncitial-Virus
SEM	Standardfehler
SP-B/C/D	surfactant protein B/C/D
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBST	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UGMLC	Universities of Giessen and Marburg-Lung-Center
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
vs.	versus
WST	water soluble tetrazolium
z. B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1 : Schematische Darstellung der physikalischen Ereignisse während des Einfrierens einer Zelle, erstellt in Anlehnung an (Mazur 1977) und (Jang et al. 2017)

Abb. 2: Zwei- Faktoren Hypothese nach Mazur et al., erstellt in Anlehnung an (Karlsson und Toner 1996)

Abb. 3: Schematische Darstellung der Vitrifikation

Abb. 4: Strukturformel Dimethylsulfoxid

Abb. 5: Strukturformel Trehalose

Abb. 6: Mikrotom aus dem Jahr 1980 nach (Krumdieck et al. 1980)

Abb. 7: Gebrauch von Gewebeschnitten nach Ländern, modifiziert nach (Vickers und Fisher 2005)

Abb. 8: Herstellung der Lungengewebschnitte mittels Vibratom

Abb. 9: LDH Freisetzung (%) von Lungengewebschnitten von gesunden Mäusen ungefroren und kryokonserviert

Abb. 10: LDH Freisetzung (%) von Lungengewebschnitten von gesunden humanen Spendern ungefroren und kryokonserviert

Abb. 11: Enzymatische Zellaktivität spektrophotometrisch gemessen (Absorbance 570 nm) von Lungengewebschnitten von gesunden Mäusen ungefroren und kryokonserviert

Abb. 12: Enzymatische Zellaktivität spektrophotometrisch gemessen (Absorbance 570 nm) von Lungengewebschnitten von gesunden humanen Spendern ungefroren und kryokonserviert

Abb. 13: Lebend- /Totfluoreszenzfärbung mit Calcein-AM und Ethidium homodimer-1 bei Lungengewebschnitten von Mäusen nicht kryokonserviert und nach Kryokonservierung

Abb. 14: Lebend- /Totfluoreszenzfärbung mit Calcein-AM und Ethidium homodimer-1 bei Lungengewebschnitten von gesunden humanen Spendern nicht kryokonserviert und nach Kryokonservierung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 15: Gespaltene Caspase-3 in murinen PCLS ungefroren und kryokonserviert mittels Western Blot Methodik

Abb. 16: Gespaltene Caspase-3 in humanen PCLS ungefroren und kryokonserviert

Abb. 17: Färbung lebender differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II mit LysoTracker Green bei Lungengewebschnitten von Mäusen nicht kryokonserviert und nach Kryokonservierung

Abb. 18: Färbung lebender differenzierter Alveolarepithelzellen Typ II mit LysoTracker Green bei Lungengewebschnitten von Mäusen nicht kryokonserviert und nach Kryokonservierung

Abb. 19: Färbung Alveolarepithelzellen Typ II mit LysoTracker Green bei Lungengewebschnitten von gesunden humanen Spendern ungefroren und nach Kryokonservierung

Abb. 20: Färbung Alveolarepithelzellen Typ II mit LysoTracker Green bei Lungengewebschnitten von gesunden humanen Spendern ungefroren und nach Kryokonservierung

Abb. 21: Matures SP-B Gehalt in murinen PCLS ungefroren und kryokonserviert mittels Western Blot Methodik

Abb. 22: Matures SP-B Gehalt in humanen PCLS ungefroren und kryokonserviert

Abb. 23: Matures SP-C Gehalt in murinen PCLS ungefroren und kryokonserviert mittels Western Blot Methodik

Abb. 24: Matures SP-C Gehalt in humanen PCLS ungefroren und kryokonserviert

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Beispiele für penetrierende und nicht- penetrierende Kryoprotektiva.

Tabelle 2: Zusammenfassung Viabilität beeinflussende Faktoren der PCLS nach (Graaf und Koster 2003)

Tabelle 3: Vorteile der PCLS

Tabelle 4: Zusammensetzung des Protein Lysispuffer

Tabelle 5: Vorbereitung der Albumin Standardreihe

Tabelle 6: Zusammensetzung 4-facher SDS Probenpuffer

Tabelle 7: SDS-Gelkonzentration in Abhängigkeit der Proteingröße

Tabelle 8: Zusammensetzung Trenngel- und Sammelgelpuffer

Tabelle 9: Zusammensetzung der Polyacrylamidgel

Tabelle 10: Zusammensetzung SDS-PAGE Laufpuffer

Tabelle 11: Zusammensetzung Transferpuffer

Tabelle 12: Zusammensetzung TBST

Tabelle 13: Repeated measures analysis mittels SAS, LDH Assay von murinen Lungen gewebsschnitten

Tabelle 14: Repeated measures analysis mittels SAS, LDH Assay von humanen Lungengewebsschnitten

Tabelle 15: Repeated measures analysis mittels SAS, MTT Assay von murinen Lungengewebsschnitten

Tabelle 16: Repeated measures analysis mittels SAS, MTT Assay von humanen Lungengewebsschnitten

Tabelle 17: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression gesplattene

Tabellenverzeichnis

Caspase 3 von murinen Lungengewebschnitten

Tabelle 18: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression gespaltene Caspase 3 von humanen lungengewebschnitten

Tabelle 19: Repeated measures analysis mittels SAS,Lysotracker green von murinen Lungengewebschnitten

Tabelle 20: Repeated measures analysis mittels SAS,Lysotracker green von humanen Lungengewebschnitten

Tabelle 21: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-B von murinen Lungengewebschnitten

Tabelle 22: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-B von humanen Lungengewebschnitten

Tabelle 23: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-C von murinen Lungengewebschnitten

Tabelle 24: Repeated measures analysis mittels SAS, relative Proteinexpression matures SP-C von humanen Lungengewebschnitten

10. Literaturverzeichnis

- Acker, J. P.; Elliott, J. A.; McGann, L. E. (2001): Intercellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores. In: *Biophysical journal* 81 (3), S. 1389–1397. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75794-3.
- Acker, J. P.; McGann, L. E. (2000): Cell-cell contact affects membrane integrity after intracellular freezing. In: *Cryobiology* 40 (1), S. 54–63. DOI: 10.1006/cryo.1999.2221.
- Alsafadi, Hani N.; Staab-Weijnitz, Claudia A.; Lehmann, Mareike; Lindner, Michael; Peschel, Britta; Königshoff, Melanie; Wagner, Darcy E. (2017): An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 312 (6), L896-L902. DOI: 10.1152/ajplung.00084.2017.
- Andreeva, Alexandra V.; Kutuzov, Mikhail A.; Voyno-Yasenetskaya, Tatyana A. (2007): Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293 (2), L259-71. DOI: 10.1152/ajplung.00112.2007.
- Annalaura, Mancia; Spyropoulos, Demetri D.; McFee, Wayne E.; Newton, Danforth A.; Baatz, John E. (2012): Cryopreservation and in vitro culture of primary cell types from lung tissue of a stranded pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*). In: *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 155 (1), S. 136–142. DOI: 10.1016/j.cbpc.2011.04.002.
- Arav, A. (2014): Cryopreservation of oocytes and embryos. In: *Theriogenology* 81 (1), S. 96–102. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.011.
- Argyle, Catrin E.; Harper, Joyce C.; Davies, Melanie C. (2016): Oocyte cryopreservation: where are we now? In: *Human reproduction update* 22 (4), S. 440–449. DOI: 10.1093/humupd/dmw007.
- Ashino, Y.; Ying, X.; Dobbs, L. G.; Bhattacharya, J. (2000): Ca²⁺(i) oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279 (1), L5-13. DOI: 10.1152/ajplung.2000.279.1.L5.
- Ashwood-Smith, M. J. (1967): Radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 141 (1), S. 45–62.

DOI: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb34865.x.

Baatz, John E.; Newton, Danforth A.; Riemer, Ellen C.; Denlinger, Chadrick E.; Jones, E. Ellen; Drake, Richard R.; Spyropoulos, Demetri D. (2014): Cryopreservation of viable human lung tissue for versatile post-thaw analyses and culture. In: *In vivo (Athens, Greece)* 28 (4), S. 411–423.

Bai, Yan; Krishnamoorthy, Nandini; Patel, Kruti R.; Rosas, Ivan; Sanderson, Michael J.; Ai, Xingbin (2016): Cryopreserved Human Precision-Cut Lung Slices as a Bioassay for Live Tissue Banking. A Viability Study of Bronchodilation with Bitter-Taste Receptor Agonists. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 54 (5), S. 656–663. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0290MA.

Beattie, G. M.; Crowe, J. H.; Lopez, A. D.; Cirulli, V.; Ricordi, C.; Hayek, A. (1997): Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. In: *Diabetes* 46 (3), S. 519–523. DOI: 10.2337/diab.46.3.519.

Benson, James D.; Kearsley, Anthony J.; Higgins, Adam Z. (2012): Mathematical optimization of procedures for cryoprotectant equilibration using a toxicity cost function. In: *Cryobiology* 64 (3), S. 144–151. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.01.001.

Best, Benjamin P. (2015): Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. In: *Rejuvenation research* 18 (5), S. 422–436. DOI: 10.1089/rej.2014.1656.

Chen, C. (1986): Pregnancy after human oocyte cryopreservation. In: *Lancet (London, England)* 1 (8486), S. 884–886. DOI: 10.1016/s0140-6736(86)90989-x.

Chen, Shee-Uan; Yang, Yu-Shih (2009): Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. In: *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* 48 (1), S. 15–22. DOI: 10.1016/S1028-4559(09)60030-9.

Coppola, Luigi; Cianflone, Alessandra; Grimaldi, Anna Maria; Incoronato, Mariarosaria; Bevilacqua, Paolo; Messina, Francesco et al. (2019): Biobanking in health care: evolution and future directions. In: *Journal of translational medicine* 17 (1), S. 172. DOI: 10.1186/s12967-019-1922-3.

Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A.; Crowe, L. M. (1992): Anhydrobiosis. In: *Annual review of physiology* 54, S. 579–599. DOI: 10.1146/annurev.ph.54.030192.003051.

Dobbs, L. G. (1989): Pulmonary surfactant. In: *Annual review of medicine* 40, S. 431–446. DOI: 10.1146/annurev.me.40.020189.002243.

- Elliott, Gloria D.; Wang, Shangping; Fuller, Barry J. (2017): Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. In: *Cryobiology* 76, S. 74–91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004.
- Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- Eslami, Anna; Lujan, Jesse (2010): Western blotting: sample preparation to detection. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (44). DOI: 10.3791/2359.
- Farrant, J.; Walter, C. A.; Lee, H.; Morris, G. J.; Clarke, K. J. (1977): Structural and functional aspects of biological freezing techniques. In: *Journal of microscopy* 111 (1), S. 17–34.
- Fisher, R. L.; Smith, M. S.; Hasal, S. J.; Hasal, K. S.; Gandolfi, A. J.; Brendel, K. (1994): The use of human lung slices in toxicology. In: *Human & experimental toxicology* 13 (7), S. 466–471. DOI: 10.1177/096032719401300703.
- Freeman, B. A.; O'Neil, J. J. (1984): Tissue slices in the study of lung metabolism and toxicology. In: *Environmental health perspectives* 56, S. 51–60. DOI: 10.1289/ehp.845651.
- Friedler, S.; Giudice, L. C.; Lamb, E. J. (1988): Cryopreservation of embryos and ova. In: *Fertility and sterility* 49 (5), S. 743–764. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)59879-3.
- Gandolfi, A. J.; Brendel, K.; Fisher, R. L.; Michaud, J. P. (1995): Use of tissue slices in chemical mixture toxicology and interspecies investigations. In: *Toxicology* 105 (2-3), S. 285–290.
- Gao, D.; Critser, J. K. (2000): Mechanisms of cryoinjury in living cells. In: *ILAR journal* 41 (4), S. 187–196. DOI: 10.1093/ilar.41.4.187.
- Giwa, Sebastian; Lewis, Jedediah K.; Alvarez, Luis; Langer, Robert; Roth, Alvin E.; Church, George M. et al. (2017): The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. In: *Nature biotechnology* 35 (6), S. 530–542. DOI: 10.1038/nbt.3889.
- Glöckner, R.; Steinmetzer, P.; Drobner, C.; Müller, D. (1998): Application of cryopreserved precision-cut liver slices in pharmacotoxicology--principles, literature data and own investigations with special reference to CYP1A1-mRNA induction. In: *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 50 (4-6), S. 440–449. DOI: 10.1016/S0940-2993(98)80031-6.
- Gown, Allen M.; Willingham, Mark C. (2002): Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. In: *The*

journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 50 (4), S. 449–454. DOI: 10.1177/002215540205000401.

Graaf, I. A. M. de; Koster, H. J. (2003): Cryopreservation of precision-cut tissue slices for application in drug metabolism research. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 17 (1), S. 1–17.

Haagsman, H. P.; Diemel, R. V. (2001): Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. In: *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 129 (1), S. 91–108.

Han, Bumsoo; Bischof, John C. (2004): Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. In: *Cryobiology* 48 (1), S. 8–21. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2003.11.002.

Hara, Jared; Tottori, Jordan; Anders, Megan; Dadhwal, Smritee; Asuri, Prashanth; Mobed-Miremadi, Maryam (2017): Trehalose effectiveness as a cryoprotectant in 2D and 3D cell cultures of human embryonic kidney cells. In: *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 45 (3), S. 609–616. DOI: 10.3109/21691401.2016.1167698.

Henjakovic, M.; Martin, C.; Hoymann, H. G.; Sewald, K.; Ressmeyer, A. R.; Dassow, C. et al. (2008a): Ex vivo lung function measurements in precision-cut lung slices (PCLS) from chemical allergen-sensitized mice represent a suitable alternative to in vivo studies. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 106 (2), S. 444–453. DOI: 10.1093/toxsci/kfn178.

Henjakovic, M.; Sewald, K.; Switalla, S.; Kaiser, D.; Müller, M.; Veres, T. Z. et al. (2008b): Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. In: *Toxicology and applied pharmacology* 231 (1), S. 68–76. DOI: 10.1016/j.taap.2008.04.003.

Herbert, Julia; Thiermann, Horst; Worek, Franz; Wille, Timo (2017): Precision cut lung slices as test system for candidate therapeutics in organophosphate poisoning. In: *Toxicology* 389, S. 94–100. DOI: 10.1016/j.tox.2017.07.011.

Hunt, Charles J. (2011): Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. In: *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 38 (2), S. 107–123. DOI: 10.1159/000326623.

Hunt, Charles J. (2019): Technical Considerations in the Freezing, Low-Temperature Storage and Thawing of Stem Cells for Cellular Therapies. In: *Transfusion medicine and*

hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie 46 (3), S. 134–150. DOI: 10.1159/000497289.

Iussig, Benedetta; Maggiulli, Roberta; Fabozzi, Gemma; Bertelle, Sara; Vaiarelli, Alberto; Cimadomo, Danilo et al. (2019): A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. In: *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 98 (5), S. 550–558. DOI: 10.1111/aogs.13569.

Izutsu, Ken-ichi; Aoyagi, Nobuo; Kojima, Shigeo (2004): Protection of protein secondary structure by saccharides of different molecular weights during freeze-drying. In: *Chemical & pharmaceutical bulletin* 52 (2), S. 199–203. DOI: 10.1248/cpb.52.199.

Jain, John K.; Paulson, Richard J. (2006): Oocyte cryopreservation. In: *Fertility and sterility* 86 (4 Suppl), S. 1037–1046. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.07.1478.

Jang, Tae Hoon; Park, Sung Choel; Yang, Ji Hyun; Kim, Jung Yoon; Seok, Jae Hong; Park, Ui Seo et al. (2017): Cryopreservation and its clinical applications. In: *Integrative medicine research* 6 (1), S. 12–18. DOI: 10.1016/j.imr.2016.12.001.

Jashari, R.; van Hoeck, B.; Ngakam, R.; Goffin, Y.; Fan, Y. (2013): Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels. In: *Cell and tissue banking* 14 (4), S. 589–599. DOI: 10.1007/s10561-012-9359-4.

Kader, Amr A.; Choi, Audrey; Orrief, Yasser; Agarwal, Ashok (2009): Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. In: *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 7, S. 99. DOI: 10.1186/1477-7827-7-99.

Karlsson, J. O.; Toner, M. (1996): Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. In: *Biomaterials* 17 (3), S. 243–256.

Khalili, Mohammad Ali; Shahedi, Abbas; Ashourzadeh, Sareh; Nottola, Stefania Annarita; Macchiarelli, Guido; Palmerini, Maria Grazia (2017): Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. In: *Journal of assisted reproduction and genetics* 34 (11), S. 1413–1426. DOI: 10.1007/s10815-017-1005-4.

Kim, S. I.; Choi, H. K.; Son, J. S.; Yun, J. H.; Jang, M. S.; Kim, H. R. et al. (2001): Cryopreservation of *Taxus chinensis* suspension cell cultures. In: *Cryo letters* 22 (1), S. 43–50.

Kinkorová, Judita; Topolčan, Ondřej (2018): Biobanks in Horizon 2020: sustainability and attractive perspectives. In: *The EPMA journal* 9 (4), S. 345–353. DOI: 10.1007/s13167-018-0153-7.

- Korniski, B.; Darr, T. B.; Hubel, A. (1999): Subzero osmotic characteristics of intact and disaggregated hepatocyte spheroids. In: *Cryobiology* 38 (4), S. 339–352. DOI: 10.1006/cryo.1999.2177.
- Koshimoto, Chihiro; Mazur, Peter (2002): Effects of warming rate, temperature, and anti-freeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. In: *Cryobiology* 45 (1), S. 49–59.
- Krumdieck, C. L.; dos Santos, J. E.; Ho, K. J. (1980): A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. In: *Analytical Biochemistry* 104 (1), S. 118–123. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90284-5.
- Kumar, Priti; Nagarajan, Arvindhan; Uchil, Pradeep D. (2018): Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2018 (6). DOI: 10.1101/pdb.prot095497.
- Kyhse-Andersen, Jan (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. In: *Journal of biochemical and biophysical methods* 10 (3-4), S. 203–209. DOI: 10.1016/0165-022x(84)90040-x.
- Lambermont, Verena A.; Schleputz, Marco; Dassow, Constanze; Konig, Peter; Zimmermann, Luc J.; Uhlig, Stefan et al. (2014): Comparison of airway responses in sheep of different age in precision-cut lung slices (PCLS). In: *PloS one* 9 (9), e97610. DOI: 10.1371/journal.pone.0097610.
- Lee, Yong-An; Kim, Yong-Hee; Kim, Bang-Jin; Kim, Byung-Gak; Kim, Ki-Jung; Auh, Joong-Hyuck et al. (2013): Cryopreservation in Trehalose Preserves Functional Capacity of Murine Spermatogonial Stem Cells. In: *PloS one* 8 (1). DOI: 10.1371/journal.pone.0054889.
- Lillford, Peter J.; Holt, Chris B. (2002): In vitro uses of biological cryoprotectants. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357 (1423), S. 945–951. DOI: 10.1098/rstb.2002.1083.
- Limaye, L. S.; Kale, V. P. (2001): Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. In: *Journal of hematology & stem cell research* 10 (5), S. 709–718. DOI: 10.1089/152581601753193931.
- Liu, Guanghui; Betts, Catherine; Cunoosamy, Danan M.; Åberg, Per M.; Hornberg, Jorrit J.;

Literaturverzeichnis

- Sivars, Kinga Balogh; Cohen, Taylor S. (2019): Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. In: *Respiratory research* 20 (1), S. 162. DOI: 10.1186/s12931-019-1131-x.
- Loft, S.; Poulsen, H. E. (1996): Cancer risk and oxidative DNA damage in man. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 74 (6), S. 297–312.
- Luyet, B. J.; Thoennes, G. (1938): THE SURVIVAL OF PLANT CELLS IMMERSSED IN LIQUID AIR. In: *Science (New York, N.Y.)* 88 (2282), S. 284–285. DOI: 10.1126/science.88.2282.284.
- Lyons-Cohen, Miranda R.; Thomas, Seddon Y.; Cook, Donald N.; Nakano, Hideki (2017): Precision-cut Mouse Lung Slices to Visualize Live Pulmonary Dendritic Cells. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (122). DOI: 10.3791/55465.
- Maas, W. J.; Graaf, I. A. de; Schoen, E. D.; Koster, H. J.; van de Sandt, J. J.; Groten, J. P. (2000a): Assessment of some critical factors in the freezing technique for the cryopreservation of precision-cut rat liver slices. In: *Cryobiology* 40 (3), S. 250–263. DOI: 10.1006/cryo.2000.2246.
- Maas, W.J.M; Leeman, W.R; Groten, J.P; van de Sandt, J.J.M (2000b): Cryopreservation of precision-cut rat liver slices using a computer-controlled freezer. In: *Toxicology in Vitro* 14 (6), S. 523–530. DOI: 10.1016/S0887-2333(00)00042-4.
- MacRae, Julia W.; Tholpady, Sunil S.; Ogle, Roy C.; Morgan, Raymond F. (2004): Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. In: *Annals of plastic surgery* 52 (3), 281-2; discussion 283. DOI: 10.1097/01.sap.0000110559.58945.2e.
- Martin, C.; Uhlig, S.; Ullrich, V. (1996): Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. In: *The European respiratory journal* 9 (12), S. 2479–2487.
- Mazur, P. (1977): The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. In: *Cryobiology* 14 (3), S. 251–272.
- Mazur, P. (1984): Freezing of living cells: mechanisms and implications. In: *The American journal of physiology* 247 (3 Pt 1), C125-42. DOI: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
- Mazur, P. (1988): Stopping biological time. The freezing of living cells. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 541, S. 514–531. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb22288.x.

- McGowan, Ian; Tanner, Karen; Elliott, Julie; Ibarrondo, Javier; Khanukhova, Elena; McDonald, Charina et al. (2012): Nonreproducibility of "snap-frozen" rectal biopsies for later use in ex vivo explant infectibility studies. In: *AIDS research and human retroviruses* 28 (11), S. 1509–1512. DOI: 10.1089/AID.2012.0062.
- Merdassi, Ghaya; Mazoyer, Claire; Guerin, Jean F.; Saad, Ali; Salle, Bruno; Lornage, Jacqueline (2011): Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. In: *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 9, S. 78. DOI: 10.1186/1477-7827-9-78.
- Meryman, H. T. (1974): Freezing injury and its prevention in living cells. In: *Annual review of biophysics and bioengineering* 3 (0), S. 341–363. DOI: 10.1146/annurev.bb.03.060174.002013.
- Meryman, H. T.; Howard, J. (1977): Cryopreservation of granulocytes. In: *Progress in clinical and biological research* 13, S. 193–201.
- Misch, D. W.; Misch, M. S. (1967): Dimethyl sulfoxide: activation of lysosomes in vitro. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (6), S. 2462–2467. DOI: 10.1073/pnas.58.6.2462.
- Mosmann, Tim (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of immunological methods* 65 (1-2), S. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Olsson, Christoffer; Jansson, Helén; Swenson, Jan (2016): The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins. In: *The journal of physical chemistry. B* 120 (20), S. 4723–4731. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b02517.
- Parrish, A. R.; Gandolfi, A. J.; Brendel, K. (1995): Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. In: *Life sciences* 57 (21), S. 1887–1901.
- Pegg, D. E. (2001): The current status of tissue cryopreservation. In: *Cryo letters* 22 (2), S. 105–114.
- Pegg, D. E. (2002): The history and principles of cryopreservation. In: *Seminars in reproductive medicine* 20 (1), S. 5–13. DOI: 10.1055/s-2002-23515.
- Pegg, David E. (2007): Principles of cryopreservation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 368, S. 39–57. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_3.

- Placke, M. E.; Fisher, G. L. (1987): Adult peripheral lung organ culture--a model for respiratory tract toxicology. In: *Toxicology and applied pharmacology* 90 (2), S. 284–298. DOI: 10.1016/0041-008x(87)90336-x.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. In: *Nature* 164 (4172), S. 666. DOI: 10.1038/164666a0.
- Rajan, Robin; Matsumura, Kazuaki (2018): Development and Application of Cryoprotectants. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1081, S. 339–354. DOI: 10.1007/978-981-13-1244-1_18.
- Resau, J. H.; Sakamoto, K.; Cottrell, J. R.; Hudson, E. A.; Meltzer, S. J. (1991): Explant organ culture: a review. In: *Cytotechnology* 7 (3), S. 137–149. DOI: 10.1007/bf00365924.
- Ressmeyer, A. R.; Larsson, A. K.; Vollmer, E.; Dahlen, S. E.; Uhlig, S.; Martin, C. (2006): Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. In: *The European respiratory journal* 28 (3), S. 603–611. DOI: 10.1183/09031936.06.00004206.
- Rosales Gerpe, María C.; van Vloten, Jacob P.; Santry, Lisa A.; Jong, Jondavid de; Mould, Robert C.; Pelin, Adrian et al. (2018): Use of Precision-Cut Lung Slices as an Ex Vivo Tool for Evaluating Viruses and Viral Vectors for Gene and Oncolytic Therapy. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 10, S. 245–256. DOI: 10.1016/j.omtm.2018.07.010.
- Rosner, Sonia R.; Ram-Mohan, Sumati; Paez-Cortez, Jesus R.; Lavoie, Tera L.; Dowell, Maria L.; Yuan, Lei et al. (2014): Airway contractility in the precision-cut lung slice after cryopreservation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50 (5), S. 876–881. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0166MA.
- Royere, D.; Barthelemy, C.; Hamamah, S.; Lansac, J. (1996): Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. In: *Human reproduction update* 2 (6), S. 553–559. DOI: 10.1093/humupd/2.6.553.
- Ruigrok, Mitchel J. R.; Tomar, Jasmine; Frijlink, Henderik W.; Melgert, Barbro N.; Hinrichs, Wouter L. J.; Olinga, Peter (2019): The effects of oxygen concentration on cell death, anti-oxidant transcription, acute inflammation, and cell proliferation in precision-cut lung slices. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 16239. DOI: 10.1038/s41598-019-52813-2.
- Sanderson, Michael J. (2011): Exploring lung physiology in health and disease with lung slices. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24 (5), S. 452–465. DOI: 10.1016/j.pupt.2011.05.001.

- Shaw, J. M.; Jones, G. M. (2003): Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. In: *Human reproduction update* 9 (6), S. 583–605. DOI: 10.1093/humupd/dmg041.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical Biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- SMITH, A. U. (1950): Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells. In: *Lancet (London, England)* 2 (6644), S. 910–911. DOI: 10.1016/s0140-6736(50)91861-7.
- Solocinski, Jason; Osgood, Quinn; Wang, Mian; Connolly, Aaron; Menze, Michael A.; Chakraborty, Nilay (2017): Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. In: *Cryobiology*. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.01.001.
- Stribos, Elisabeth G. D.; Hillebrands, Jan-Luuk; Olinga, Peter; Mutsaers, Henricus A. M. (2016): Renal fibrosis in precision-cut kidney slices. In: *European journal of pharmacology* 790, S. 57–61. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.06.057.
- Taylor, Michael J.; Weegman, Bradley P.; Baicu, Simona C.; Giwa, Sebastian E. (2019): New Approaches to Cryopreservation of Cells, Tissues, and Organs. In: *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 46 (3), S. 197–215. DOI: 10.1159/000499453.
- Temann, Angela; Golovina, Tatiana; Neuhaus, Vanessa; Thompson, Carolann; Chichester, Jessica A.; Braun, Armin; Yusibov, Vidadi (2016): Evaluation of inflammatory and immune responses in long-term cultured human precision-cut lung slices. In: *Human vaccines & immunotherapeutics*, S. 0. DOI: 10.1080/21645515.2017.1264794.
- Umachandran, M.; Howarth, J.; Ioannides, C. (2004): Metabolic and structural viability of precision-cut rat lung slices in culture. In: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 34 (8), S. 771–780. DOI: 10.1080/00498250400000816.
- Umachandran, Meera; Ioannides, Costas (2006): Stability of cytochromes P450 and phase II conjugation systems in precision-cut rat lung slices cultured up to 72 h. In: *Toxicology* 224 (1-2), S. 14–21. DOI: 10.1016/j.tox.2006.03.020.
- Vajta, Gábor; Kuwayama, Masashige (2006): Improving cryopreservation systems. In:

Theriogenology 65 (1), S. 236–244. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.026.

van der Velden, Joanne L.; Bertoncetto, Ivan; McQualter, Jonathan L. (2013): LysoTracker is a marker of differentiated alveolar type II cells. In: *Respiratory research* 14, S. 123. DOI: 10.1186/1465-9921-14-123.

Vickers, Alison E. M.; Fisher, Robyn L. (2005): Precision-cut organ slices to investigate target organ injury. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 1 (4), S. 687–699. DOI: 10.1517/17425255.1.4.687.

Wasnick, R. M.; Korfei, M.; Piskulak, K.; Henneke, I.; Wilhelm, J.; Mahavadi, P. et al. (2019): Restored alveolar epithelial differentiation and reversed human lung fibrosis upon Notch inhibition (17).

Watson, Christa Y.; Damiani, Flavia; Ram-Mohan, Sumati; Rodrigues, Sylvia; Moura Queiroz, Priscila de; Donaghey, Thomas C. et al. (2016): Screening for Chemical Toxicity Using Cryopreserved Precision Cut Lung Slices. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 150 (1), S. 225–233. DOI: 10.1093/toxsci/kfv320.

Wemhöner, A.; Frick, M.; Dietl, P.; Jennings, P.; Haller, T. (2006): A fluorescent microplate assay for exocytosis in alveolar type II cells. In: *Journal of biomolecular screening* 11 (3), S. 286–295. DOI: 10.1177/1087057105285284.

Wohlsen, A.; Martin, C.; Vollmer, E.; Branscheid, D.; Magnussen, H.; Becker, W. M. et al. (2003): The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. In: *The European respiratory journal* 21 (6), S. 1024–1032.

Wohlsen, A.; Uhlig, S.; Martin, C. (2001): Immediate allergic response in small airways. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 163 (6), S. 1462–1469. DOI: 10.1164/ajrccm.163.6.2007138.

Wohlsen, Andrea; Hirrlinger, Andrea; Tenor, Hermann; Marx, Degenhard; Beume, Rolf (2010): Effect of cyclic AMP-elevating agents on airway ciliary beat frequency in central and lateral airways in rat precision-cut lung slices. In: *European journal of pharmacology* 635 (1-3), S. 177–183. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.03.005.

Woods, Erik J.; Benson, James D.; Agca, Yuksel; Critser, John K. (2004): Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. In: *Cryobiology* 48 (2), S. 146–156. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.03.002.

Worle-Knirsch, J. M.; Pulskamp, K.; Krug, H. F. (2006): Oops they did it again! Carbon

Literaturverzeichnis

nanotubes hoax scientists in viability assays. In: *Nano letters* 6 (6), S. 1261–1268. DOI: 10.1021/nl060177c.

Yokomise, H.; Inui, K.; Wada, H.; Hasegawa, S.; Ohno, N.; Hitomi, S. (1995): Reliable cryopreservation of trachea for one month in a new trehalose solution. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 110 (2), S. 382–385. DOI: 10.1016/S0022-5223(95)70234-2.

11. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagungen

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich unterstützt haben diese Arbeit zu verfassen.

Prof. Dr. Andreas Günther danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des Themas sowie die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herr Daniel van der Beck, der mir das wissenschaftliche Arbeiten lehrte, mir die labor- und computertechnischen Methoden beibrachte und mir immer als hilfsbereiter und geduldiger Ansprechpartner zur Seite stand.

Ich möchte auch Frau Dr. Martina Korfei für Ihre fachliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor danken.

Aus dem Tierlabor möchte ich Dr. med. vet. Ingrid Henneke sowie Stefanie Hezel und Ann-Kristin Beitel danken, besonders für Ihre Hilfe und Ihre Ratschläge.

Auch den technischen Assistenten sowie den weiteren Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe im BFS möchte ich für die große Hilfsbereitschaft, den wissenschaftlichen Austausch sowie das immer freundlichen Miteinander meinen Dank aussprechen.

Besonders möchte ich auch meiner Familie, vor allem meiner Mutter für die Unterstützung in allen Lebenslagen und den Rückhalt während meiner Ausbildung danken. Nicht zuletzt gilt mein Dank meinem Mann, der mich immer wieder ermutigt und vorangetrieben hat und für sein Interesse am Erfolg dieser Arbeit.

Auch danke ich meinen Freunden für die großartige Unterstützung während meinem Studium und Ihr Korrekturlesen.

13. Tabellarischer Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7086-1

