

Laseroptische Methoden zur Untersuchung von intra-
und extrazellulären Eisbildungsprozessen im Hinblick
auf Schädigungsmechanismen bei der
Kryokonservierung therapeutisch relevanter Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Ingenieurwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Daniel Dörr

Saarbrücken

12. November 2014

Tag des Kolloquiums: 14. April 2015

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre

Berichterstatter: Prof. Dr. Heiko Zimmermann
Prof. Dr. Marc Schneider

Vorsitz: Prof. Dr. Gregor Jung

Akad. Mitarbeiter: Dr. Michael Schmitt

Zusammenfassung

Nahezu sämtliche experimentellen Verfahren der Zellbiologie sind auf die flüssige Umgebung ihrer Proben angewiesen und im gefrorenen Probenzustand nicht anwendbar. Im Vergleich zur Biologie verfügt die Kryobiologie daher über ein eingeschränktes Instrumentarium. Im Rahmen dieser Arbeit sollen speziell zur Klärung der chemischen Randbedingungen sowie der mikroskopischen Prozesse während des Einfrierens Multiphotonenmikroskopie und konfokale Ramanmikroskopie in die Kryobiologie eingeführt werden.

Diese Techniken ermöglichen es erstmals, die Probe während des Kryokonservierungsprozess mikroskopisch zu beobachten. Auf Basis von ramanmikroskopischen Daten zur Zusammensetzung der zellulären Umgebung und des Zellinneren wurden an Stammzellen des Nabelschnurbluts vereinfachte Modellvorstellungen zu osmotischen Prozessen während des Einfrierens überprüft. Weiterhin wurden die experimentellen Daten zur systematischen Optimierung von Biobankingprotokollen genutzt. Erstmals konnte durch die Ramanmikroskopie gezeigt werden, dass bei der DMSO-basierten Kryokonservierung von Zellen das Zytoplasma amorph erstarrt.

Ausgehend von der spektroskopischen Unterscheidbarkeit kristallinen und amorphen Wassers wurde eine Technik zur Kontrolle von vitrifizierten Proben auf Devitrifikation – der vollständigen Kristallisation und somit Zerstörung der Probe – bei tiefkalten Lagerbedingungen am verschlossenen Gebinde entworfen und demonstriert.

Summary

Almost all experimental methods for cell biology research are dependent on the fluid environment of their samples and therefore, they are not applicable in the frozen state of the samples. Compared to biology, cryobiology has a limited amount of research instruments. In this study the multiphoton microscopy and the confocal Raman microscopy shall be introduced into cryobiology, especially to clarify the chemical boundary conditions and the microscopic processes during the freezing step.

These techniques allow for the first time, to observe the sample by a microscope during the cryopreservation process. Based on Raman microscopic data, the composition of the cellular environment and the cell interior were investigated and a simplified model regarding osmotic processes while freezing stem cells of umbilical cord blood was reviewed. Furthermore, the experimental data were used for the systematic optimization of protocols for biobanking. It could be shown for the first time by the Raman microscopy that in the DMSO-based cryopreservation cytoplasm solidifies amorphously.

Based on the spectroscopic distinguishability of crystalline and amorphous water, a technique for the control of vitrified samples based on devitrification - the complete crystallization and thus destruction of the sample – was designed and demonstrated at cryogenic storage conditions in on the sealed container.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
2	Grundlagen	6
2.1	Stammzellen	6
2.1.1	Differenzierung von Zellen	8
2.2	Kryobiologie und Kryokonservierung	8
2.2.1	Phasenverhalten von wässrigen Lösungen bei der Kryokonservierung	9
2.2.2	Der zelluläre Wasserhaushalt bei der Kryokonservierung	11
2.2.3	Zellschäden durch intra- und extrazelluläre Eisbildungsprozesse	15
2.2.4	Konservierungsstrategien	17
2.2.5	Einfluss der Kryoprotektiva	17
2.3	Spektroskopische Bildgebung	19
2.3.1	Physikalische Wechselwirkungen zwischen Photonen und Molekülen	19
2.3.2	Laser-Scanning-Mikroskopie	21
2.3.3	Bildaufbau in der Laser-Scanning-Mikroskopie	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Protokolle für biologische Proben	24
3.1.1	Protokolle zur Zellkultivierung	24
3.1.2	Probenpräparation zur Mikroskopie	25
3.1.3	Probenpräparation zur Lebend-/Tod-Färbung	25
3.2	Tiefemperatur Laser-Scanning-Mikroskopie	26
3.2.1	Aufbau und Funktion	26
3.2.2	Bildauswertung LSM	27
3.3	Tiefemperatur Raman-Spektroskopie und Scanning-Raman-Mikroskopie	27
3.3.1	Setup	27
3.3.2	Methoden zur Auswertung	30
3.3.3	Quantitative Auswertung der Raman-Daten	36
3.4	Dynamische Tiefemperatur Differenzkalorimetrie	38
3.4.1	Aufbau	38
3.4.2	Methoden zur Auswertung	39

4	Ergebnisse	41
4.1	Untersuchungen zum Phasenverhalten von DMSO-haltigen Kryomedien . . .	41
4.1.1	Phasenverhalten wässriger und DMSO-haltiger Kryomedien	41
4.1.2	Intra- und extrazelluläres Erstarren beim Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen	45
4.1.3	Devitrifikation - Kristallisation amorpher Phasen	46
4.1.4	Phasenverhalten DMSO-haltiger Kryomedien unter Einfluss von Druck	51
4.2	Untersuchungen des Volumens suspendierter Zellen während des langsamen Einfrierens	54
4.2.1	Simulation der osmotischen Dehydratisierung für hMSC	54
4.2.2	Zelluläre Volumenänderung durch osmotische Dehydratisierung	61
4.2.3	Osmotische Dehydratisierung in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration	66
4.2.4	Dehydrationsbedingte Anreicherung von DMSO	69
4.3	Spezifische Schädigungsmechanismen bei der oberflächenbasierten Kryokonservierung	71
4.3.1	Oberflächenbasierte Kryokonservierung von hMSC	72
4.3.2	Oberflächenbasierte Kryokonservierung in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration	74
4.3.3	Oberflächenbasierte Kryokonservierung mit verschiedenen Abkühlgeschwindigkeiten	79
4.3.4	Membranpermeabilisierung nach der Kryokonservierung	80
5	Diskussion	84
6	Anhang	101
	Abbildungsverzeichnis	110
	Literaturverzeichnis	110

Abkürzungsverzeichnis

CPA	Kryoprotektiva
IEKB	Intrazelluläre Eiskristallbildung
LSM	Laser Scanning Mikroskop(ie)
CLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie
MPLSM	Multiphotonen Laser Scanning Mikroskopie
1PA	Einphotonenabsorption
2PA	Mehrphotonenabsorption
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
PMT	Photomultiplier
DMSO	Dimethylsulfoxid (C_2H_6OS)
EG	Ethylenglycol ($C_2H_6O_2$)
GLY	Glycerin ($C_3H_8O_3$)
c_x	Stoffkonzentration
T_E	Temperatur Eutektikum
T_S	Schmelzpunkt
T_G	Glaspunkt
OAV	Osmotisch aktives Volumen
OIV, V_b	Osmotisch inaktives Volumen
W_B	gebundenes Wasser
W_F	freies Wasser
OAV	Osmotisch aktives Volumen
OIV, V_b	Osmotisch inaktives Volumen
V_x^0	stoffabhängiges Volumen zum Startpunkt
V_x	stoffabhängiges Volumen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
hESC	human Embryonic Stem Cells
PMEF	Primary Mouse Embryo Fibroblast
hMSC	human Mesenchymal Stem Cells
ISIS	IBMT Spectral Imaging Software
DNA	Desoxyribunukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure

Kapitel 1

Einleitung

Seit nun mehr als 30 Jahren befinden sich die Biobanken in einem stetigen Wachstum [1]. Sie bilden heute eine wesentliche Voraussetzung für die moderne medizinische Forschung und dienen als wichtige Ressource für diagnostische Ansätze. Sie verbinden stoffliche Sammlungen aus pflanzlichen, tierischen und menschlichen Proben mit den zugeordneten Daten, um damit zu einem beliebigen Zeitpunkt einen spezifischen Einsatz zu ermöglichen. Durch die steigende Nachfrage nach dieser Technologie hat nicht nur die Anzahl der Biobanken zugenommen, sondern auch das Anwendungsspektrum der Kryokonservierungstechnik [2]. Die Kryokonservierung ist eine Aufbewahrungsmethode für biologische Proben in flüssigem Stickstoff und ist derzeit die einzige bekannte Methode zur lebens- und funktionserhaltenden Lagerung [3]. Im medizinischen und diagnostischen Bereich finden gegenwärtig vermehrt die Konservierung und Langzeitlagerung von personalisierten zellulären Proben für therapeutische Anwendungen ihren Einsatz [4] [5] [6]. Diese Proben sind meist sehr empfindlich, nur in begrenzter Menge vorhanden und dementsprechend wertvoll [7]. Das Einsatzziel der revitalisierten Zellen ist die Behandlung des menschlichen Organismus. Dies erfordert nicht nur ein Überleben der Zellen, sondern auch deren uneingeschränkte Funktionstüchtigkeit [8] [9], besonders bei Stammzellen [10] [11]. Diese neuen Anwendungs- und Einsatzgebiete setzen auch neue Maßstäbe an die Anforderungen der Lagermedien (Kryomedien), wie den Verzicht auf tierische Zusatzstoffe [12], die standardmäßig in der *in vitro* Zellkultur verwendet werden [13] [14]. Gleichermaßen erfordern sie die Substitution, beziehungsweise Reduktion der teilweise toxisch wirkenden Kryoprotektiva (CPA) oder sogar den gänzlichen Verzicht auf diese [15]. Besonders die Lagerung von medizinisch interessanten sowie therapeutisch relevanten Zellen ist sehr anspruchsvoll und Gegenstand der heutigen Forschung. Durch die Kryokonservierung von Einzelzellen ist man heute in der Lage, die meisten Zellarten verlustarm über einen längeren Zeitraum zu lagern. Die Wahl des geeigneten Kryomediums ist neben der Wahl der Einfrierprozedur einer der wichtigsten Schritte bei der Überführung der Zellen zur Lagertemperatur. Die Zusammensetzung solcher Einfriermedien erfordert zellspezifisch die Addition von kryoprotektiven Substanzen, um eine möglichst hohe Überlebensrate zu gewährleisten. Sie beeinflussen den extra- und intrazellulären Gefrierpunkt sowie den Wasserhaushalt der Zellen und verhindern eine tödliche Kristallisation von intrazellulä-

rem Wasser [16]. Die Notwendigkeit dieser kryoprotektiven Substanzen wurde schon in den 50er Jahren bei der Kryokonservierung von Spermien erkannt und fand dort erste Anwendung [17]. Ein CPA, dessen Anwendung weit verbreitet ist, ist Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Eignung dieses CPA wurde 1959 von Lovelock und Bishop entdeckt [18]. Bis heute finden eine Vielzahl weiterer CPA in der Kryokonservierung humaner Proben ihre Anwendung. Ein weiterer, wichtiger Aspekt bei der Kryokonservierung der Zellen ist die Wahl der Einfrierprozedur, speziell die Wahl der zellspezifisch geeigneten Abkühlrate. Die systematische Ermittlung der optimalen Kühlrate wurde in den 70er Jahren durch die Entwicklung von regelbaren Einfrierautomaten ermöglicht [19]. Durch diese technische Entwicklung wurde die Voraussetzung zur Erforschung der geeigneten Abkühlrate geschaffen. Die Untersuchung der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Kühlrate zeigte, dass es einen optimalen Bereich der Abkühlgeschwindigkeit gibt, bei dem die Überlebenswahrscheinlichkeit maximal ist. Die Erklärungsansätze von Mazur beschreiben die Zellschädigung bei langsamen Kühlraten durch eine Dehydratisierung der Zelle und bei der Anwendung von hohen Abkühlraten durch eine intrazelluläre Eiskristallbildung [20]. Aus diesen Experimenten leitet er die "Zwei-Faktor-Hypothese" ab, die heute noch weitestgehend die etablierte Lehrmeinung zusammenfassend beschreibt [21]. Solche Erklärungs- oder Interpretationsansätze liefern weder eine Aussage über die zellspezifische Überlebensrate, noch können sie den Erfolg einer Kryokonservierungsprozedur voraussagen. Ferner bezieht sich diese Hypothese nur auf die Überlebensrate und liefert keine Aufklärung über die kausalen Zusammenhänge der Schädigungsmechanismen oder, ob die biologische Funktionalität (Differenzierbarkeit, Expressionsmuster) der Zellen weiter gewährleistet ist. Gerade im Kontext von therapeutisch relevanten Zellen ist dies ein maßgebliches Kriterium für den Erfolg einer Kryokonservierungsprozedur. Nicht zuletzt auch wenn es um die Reduktion oder Substitution von CPA wie beispielsweise DMSO geht, muss man die zu Grunde liegenden Prozesse verstehen.

Um diesen steigenden Ansprüchen an den Kryokonservierungsprozess gerecht zu werden, bedarf es der Entwicklung optimierter Methoden (Protokolle) für Einfrier-, Auftau- und Lagerprozesse (Kryoprotokoll) sowie Techniken zu deren Beobachtung und Untersuchung. Bislang ist das Vorgehen zur Evaluierung eines Einfrierens und Auftauens der Proben ein iteratives Verfahren [22] [23]. Der Erfolg dieses Prozesses wird empirisch nach durchlaufener Kryokonservierung anhand des vitalen Anteils der Ausgangszahl konservierter Zellen bestimmt [24]. Dieses ressourcenintensive Vorgehen bei der Entwicklung eines Kryoprotokolles ist gerade bei der Konservierung therapeutischer Zellen, die nicht in großer Anzahl verfügbar sind, höchst problematisch [25]. In der modernen Kryobiologie versucht man daher von der bisherigen iterativen Handlungsweise zu einem verständnisgetriebenen Vorgehen bei der Entwicklung von Einfrierprotokollen überzugehen.

Zur Untersuchung des Kryokonservierungsprozesses gibt es bislang als Beobachtungsmethode nur die optische Durchlicht-Kryomikroskopie (Transmission). Diese ermöglicht die Beobachtung von Zellen während des Kryokonservierungsprozesses in einer Tieftemperatur-Kammer (Kryokammer). Zur Bildgebung können Verfahren wie Transmissions- und Weitfeld-Fluoreszenz genutzt werden. Der heutige Stand der Entwicklung spiegelt noch immer die Methodik

der 80er Jahre wieder und erlaubt beispielsweise auch aufgrund der Lichtstreuung an Eiskristallen nur einen beschränkten Zugang zur gefrorenen Probe [26] [15]. Mit dieser Technologie kann die Zellmorphologie ansatzweise untersucht werden, jedoch liegen die intrazellulären, physikochemischen Prozesse weitestgehend im Dunkeln. Bei anspruchsvolleren Proben ist es heute nicht mehr ausreichend, nur morphologische Darstellungen zu interpretieren oder die Entwicklung eines Kryoprotokolls an einer finalen empirischen Messung und Betrachtung der Reanimations- oder Funktionalitätsraten festzumachen [27] [15].

Zielsetzung dieser Arbeit war es, zur Untersuchung solcher komplexer Systeme und Prozesse ein Verfahren zu schaffen, welches es ermöglicht, kausale Zusammenhänge durch bildgebende Darstellung der Messgrößen zu beschreiben. Diese Technologie sollte eine direkte Betrachtung der biologischen und chemischen Vorgänge während der Kryokonservierung erlauben und diese im Hinblick auf die mit der Kryokonservierung einhergehenden Schädigungsmechanismen in Beziehung zu setzen. Ein enormes Potential zur Darstellung solcher Prozesse durch funktionale biologische Kontraste und die Visualisierung morphologischer und chemischer Informationen bietet die Laser Scanning Mikroskopie. Bei diesem optischen Verfahren wird die Probe mittels fokussierter Laserstrahlung punktweise abgerastert und aus der detektierten Strahlung der Probe ein digitales Bild erzeugt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Raman Streuung und verschiedene Fluoreszenz-Effekte zur Bildgebung genutzt werden, mit dem Ziel, morphologische, physikalische und chemische Informationen der Probe zu erhalten. Die Darstellung der Zellmorphologie und funktioneller Informationen sowie der intra- und extrazellulären Chemie sind von außergewöhnlichem Interesse, da durch Phasenübergänge sowohl im Kulturmedium als auch im Intrazellularraum die chemischen Randbedingungen während des Einfrierens drastisch verändert werden. Es soll in dieser Arbeit beurteilt werden, ob diese Beobachtungsmöglichkeit aus einer funktionell-morphologischen Multiphotonenmikroskopie und einer bildgebenden Raman Spektroskopie helfen kann, diese Prozesse und ihre Bedeutung für die Zellschädigung während der Konservierung erstmals deutlich zu machen. Hierzu wird im ersten Teil der Arbeit mit der entwickelten Technologie das Phasenverhalten von DMSO-haltigen Kryomedien mit spektroskopischen Methoden untersucht. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Phasenzusammensetzung während des Einfrierprozesses zu analysieren. Der Fokus lag in diesem Bereich auf der Phasentrennung nach dem Gefrieren und der quantitativen Entwicklung der DMSO Konzentration in der eutektischen Phase. Ferner soll mit dieser Methode der intrazelluläre Phasenzustand bei kryogenen Temperaturen untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit werden die spektroskopischen Untersuchungsansätze auf suspendierte Zellen übertragen. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Dehydratisierung der Zellen, die Anreicherung von DMSO und die physikochemische Zusammensetzung mit Hilfe der Raman Spektroskopie zu analysieren. Diese Ergebnisse werden den morphologischen Untersuchungen und der Laser Scanning Mikroskopie gegenübergestellt und mit bekannten Modellen abgeglichen und optimiert. Im dritten Teil der Arbeit werden die gewonnenen Erkenntnisse auf die Kryokonservierung adhärenter Zellen angewandt. Hierzu werden mehrere DMSO Reihen an humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) untersucht, um ein Verständnis für die Abhängigkeit der DMSO-Konzentration von den beobachteten Schädigungs-

gungsmechanismen zu entwickeln. Bei diesen Experimenten werden die mit der adhärenen Kryokonservierung einhergehenden Mechanismen diskutiert und eine Optimierungsstrategie zur Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung entwickelt.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Stammzellen

Eine Zelle ist die kleinste, lebensfähige Einheit. Sie tritt bei Einzellern als selbstständig lebendes Individuum auf oder bildet bei Mehrzellern (Eukaryoten) große Verbände und ist Baustein einer übergeordneten Struktur, dem Organismus. In einem Organismus treten viele verschiedene Zellen auf, die trotz ihrer spezialisierten Entwicklung viele gemeinsame Bestandteile haben [28]. Die eukaryotische Zelle ist ein membranumschlossenes Gebilde, welches im Inneren das Zytoplasma (in Abbildung: 2.1 blau), den Zellkern und zahlreiche Organellen enthält. Zellen können in suspendierte und adhärente Zellen unterschieden werden. Suspendierte Zellen (siehe Abbildung 2.1 a)) findet man überwiegend im Blutkreislauf, adhärente Zellen hingegen in Gewebe und Zellverbänden. Der wesentliche Unterschied besteht in der Ausbildung eines Zytoskletts (siehe Abbildung 2.1 b)), welches aus Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli besteht. Die Organellen der morphologisch unterschiedlichen Erscheinungsbilder sind weitestgehend identisch. Sie sind strukturell durch eine Membran abgeschlossene Bereiche, die spezifische Funktionen erfüllen. Sie bestehen im Wesentlichen aus Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, Lysosomen und Vesikeln. Die meisten Organellen können heute durch spezifische Farbstoffe für verschiedene Mikroskopieverfahren sichtbar gemacht werden. Der Zellkern (siehe Abbildung 2.1 in a) und b)) ist von der Kernmembran umschlossen, welche sogenannte Kernporen enthält. Der Zellkern (Nukleus) besteht aus dem Kernsaft (Karyolymphe), dem Chromatingerüst und den Kernkörperchen (Nukleolus). Das Chromatin beinhaltet die erblichen Informationen in der Desoxyribonukleinsäure (DNS), wobei die Kernkörperchen hingegen die Ribonukleinsäure (RNS) enthalten, welche die erblichen Information der DNS überbringt. Um den Zellkern liegt das endoplasmatische Retikulum (siehe Abbildung 2.1 2) und breitet sich von dort in der Zelle aus. Es besteht aus flachen Membrankompartimenten, deren Innenräume (Zisternen) miteinander verbunden sind. Die vom ER gebildeten Proteine werden über abgespaltene Bläschen (Vesikel) zum Golgi-Apparat, der sich an das ER anlagert, transportiert. Der Golgi-Apparat (siehe Abbildung 2.1 3) in a) und b)) besteht aus gestapelten Membrankompartimenten, in denen die Vesikel aufgenommen werden können und weiterverarbeitet werden. Von dort werden

kleinere Kompartimente abgeschnürt und abtransportiert. Die Lysosome ermöglichen den Proteintransport und entstammen meist dem Golgi-Apparat oder dem ER. Weiterhin dienen sie der Ausscheidung Zell-unverdaulicher Bestandteile, die durch diese an die Membran transportiert und ausgeschieden werden. Die Mitochondrien (siehe Abbildung 2.1 8) in a) und b)) sind von einer äußeren Membran begrenzte Organellen. Im Inneren befindet sich ein weiteres Membrankompartiment, das zur Vergrößerung der Oberfläche mehrfach gestapelt ist. In ihnen finden die zur Energieproduktion und Verstoffwechslung notwendigen Oxidationsprozesse statt. Die im Zellinneren vorhandene Flüssigkeit wird Zytoplasma genannt. Die Abgrenzung zwischen Zellinnerem und Extrazellularraum bildet die Zellmembran (siehe Abbildung:2.1 4) in a) und b); detailliertere, schematische Darstellung in c)). Sie besteht aus einer Lipid-Doppelschicht mit hydrophilen Kopfregionen und hydrophoben Schwanzregionen. In ihr eingelagert sind Proteine, die entweder transmembran (siehe Abb 2.1 5)), innen oder außen eingelagert werden können. Transmembrane Proteine dienen beispielsweise der Zelladhäsion (z.B. fokale Adhäsionspunkte) an Oberflächen, den Zell-Zell-Kontakten (z.B. Tight- und Gap-Junctions) sowie aktive (HICC-Kanäle, Natrium Kalium Pumpe) und passive Proteine (Aquaporine) zur Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts.

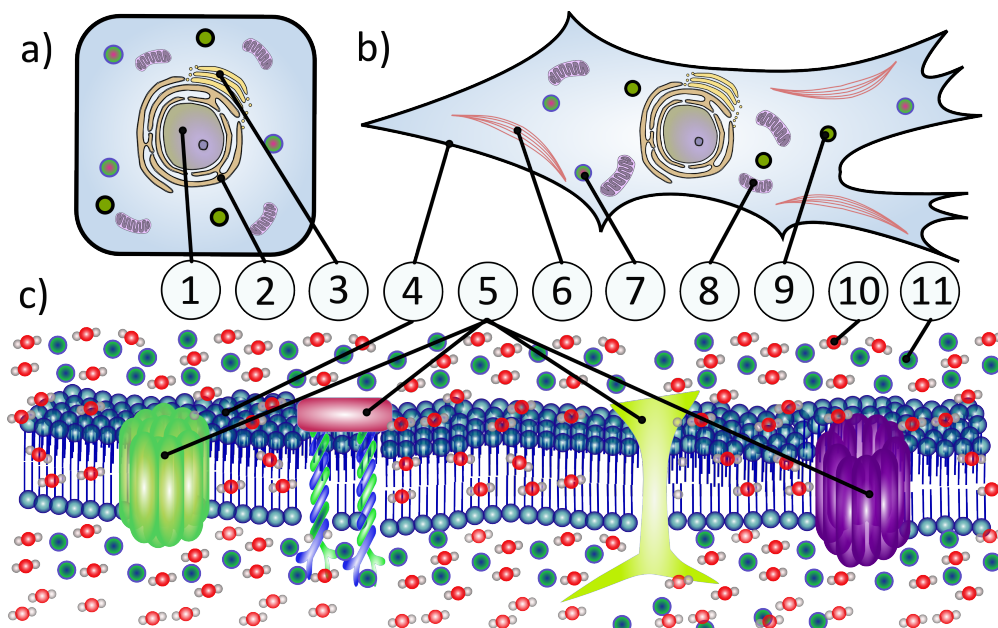


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Zelle und deren Morphologie am Beispiel einer suspendierten Zelle (a) und einer adhärenen Zelle (b). Beide sind umgeben von einer Zellmembran (c) und beinhalten zelluläre Bestandteile wie: 1) Nukleus; 2) Golgi-Apparat; 3) endoplasmatisches Retikulum; 4) Zellmembran; 5) transmembrane Proteine; 6) Zytoskelett; 7) Vesikel; 8) Mitochondrien; 9) Lysosome; 10) Wasser; 11) nicht membrangängige Osmolyte.

Die Membran ist permeabel für Wasser (Abbildung: 2.1 10)), jedoch nicht für extrazelluläre Osmolyte (Ionen, siehe Abbildung: 2.1 11)). Der Austausch nichtmembrangängiger Stoffe wird aktiv vom zellulären Metabolismus gesteuert.

2.1.1 Differenzierung von Zellen

Alle Zellen eines Organismus entstehen durch die Zellteilung (Mitose) einer befruchteten Eizelle (Zygote). Bei der Differenzierung werden weniger spezialisierte Zellen zu spezialisierten Zelltypen. Während der Entwicklung eines Organismus wird aus einer einzelnen Zygote ein komplexes System aus vielen verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Spezialisierungen (Differenzierung). Differenzierte Zellen besitzen die gesamten genetischen Informationen, jedoch wird nur noch ein für ihre Bestimmung notwendiger Teil von der Zelle genutzt. Bei der Differenzierung von Zellen aus einer Zygote unterscheidet man verschiedene Entwicklungsstadien (Differenzierungsstadien) [29]:

- *Totipotenz*: Die Bildung eines kompletten Individuums und die Bildung aller Zellarten; Beispiel: Humane, embryonale Stammzellen (hESC) bis zum 8-Zell-Stadium
- *Omnipotenz*: Die Bildung aller Zellarten ist möglich, jedoch nicht die Bildung eines kompletten Individuums; Beispiel: Humane embryonale Stammzellen (hESC) ab dem 8-Zell-Stadium
- *Pluripotenz/Multipotenz*: Die Bildung vieler Zellarten ist möglich, jedoch nicht aller; Beispiel: Hämatopoetische (HSC), Mesenchymale (MSC) und Epitheliale Stammzellen

Die Differenzierung spielt jedoch nicht nur bei der Entwicklung eines Organismus sondern auch im adulten Stadium eine große Rolle. Eine wichtige Aufgabe wird den adulten Stammzellen bei der Reparatur von Gewebe oder der Zellerneuerung zuteil. Einen besonderen Stellenwert besitzen hierbei die *pluripotenten* Stammzellen des Knochenmarks, die *HSC* und *MSC*. Die *HSC* spielen bei der Bildung von Blutzellen (Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten) und die *MSC* bei der Erneuerung von Gewebe eine wichtige Rolle. Durch die Verfügbarkeit, leichte Kultivierbarkeit und mögliche Differenzierbarkeit der *MSC* sind diese zu einem idealen Zelltyp für therapeutische Anwendungen geworden. Die klinische und therapeutische Anwendung mesenchymaler Stammzellen geht zurück auf den Entdecker Friedenstein [30] [31]. Die erste Gewinnung dieser Zellen erfolgte aus Knochenmarksproben Mitte der 70er Jahre. Heute werden die mesenchymalen Stammzellen aus weiteren Teilen des Körpers wie Plazenta, Leber, Lunge, Fettgewebe und Nabelschnurblut gewonnen. Sie können in Knochen, Fett und Knorpelzellen differenziert werden. Die ursprüngliche, therapeutische Anwendung dieser Zellen lag wegen der guten Differenzierbarkeit in Knorpel- und Knochenzellen im orthopädischen Bereich. Durch das vielseitige Differenzierungspotential der *MSC* sind diese nicht nur für therapeutische Anwendungen, sondern auch für die Forschung von großem Interesse und stellen eine Alternative zu den ethisch bedenklicheren hESC dar [32].

2.2 Kryobiologie und Kryokonservierung

Die Kryobiologie beschäftigt sich mit den Auswirkungen niedriger Temperatur auf Lebewesen, Gewebe und Zellen. Gegenstand der Studien ist hierbei die Erforschung von biologi-

schem Material oder Systemen weit außerhalb physiologischer Temperaturen. Das Temperaturfenster, das für diesen Wissenschaftszweig von Interesse ist, reicht von hypothermen bis kryogenen Temperaturen. Angewandt werden diese Erkenntnisse der Kryobiologie unter anderem in der Kryokonservierung. Dieses Teilgebiet der Kryobiologie beschäftigt sich mit dem Einfrieren und der Lagerung von biologischen Proben bei tiefen Temperaturen. Lebewesen Material ist unter diesen Bedingungen nur bedingt überlebensfähig. Um die Vitalität der Proben zu gewährleisten, bedarf es der Zugabe verschiedener Zusätze und der Anwendung definierter Abkühlstrategien, um die kryogene Toleranz der Zellen zu steigern. Während des Kryokonservierungsprozesses durchlaufen die Zellen mehrere Phasen: 1.) die Addition von überlebenssteigernden Zusätzen (wie z.B. Kryoprotektiva (CPA)), 2.) die Phase des Abkühlens, 3.) die tiefgefrorene Lagerung ($T = -80^\circ\text{C}$ bis $T \ll -130^\circ\text{C}$) und 4.) die Phase des Auftauens. Zur Überführung der Zellen zu niederen Temperaturen kommen zwei Strategien zur Anwendung. Zum einen können die Proben durch einen Gleichgewichtsprozess langsam zu ihrer Lagertemperatur überführt werden (langsames Einfrieren), zum anderen bietet sich die Möglichkeit, kleine Probenvolumina über einen nicht-Gleichgewichtsprozess sehr schnell in einen metastabilen Zustand zu überführen (Vitrifikation). Die Optimierung dieser Prozesse im Hinblick auf die zelluläre Vitalität und Funktionalität ist Gegenstand der aktuellen Forschung in der Kryokonservierung.

2.2.1 Phasenverhalten von wässrigen Lösungen bei der Kryokonservierung

Zur grundlegenden Erklärung der Vorgänge im Medium bei der Kryokonservierung wird in diesem Kapitel auf das Phasenverhalten wässriger Lösungen eingegangen. Gängige Zellkulturmedien bestehen hauptsächlich aus Wasser, Nährstoffen, zellspezifischen Zusatzstoffen und anorganischen Salzen. Das Phasenverhalten dieser wässrigen Lösungen entspricht dem eines eutektischen Systems [33] (Schema Abbildung:2.2). Kühlt man eine Lösung dieses Systems unter ihre Gleichgewichtserstarrungstemperatur (Schmelzpunkt, T_S) ab, ohne dass sie kristallisiert, befindet sie sich in einem metastabilen Zustand. Mit weiterem Abkühlen steigt die Instabilität dieses thermodynamisch verbotenen Zustandes und somit die Wahrscheinlichkeit der Nukleation (Eiskristallbildung). Die gespeicherte Kristallisationswärme wird spontan freigesetzt und führt durch die freiwerdende Energie zu einer temporären Erwärmung der Lösung bis zum Schmelzpunkt. Durch diesen Phasenübergang bildet sich ein binäres System, bei dem es sich um eine Suspension von Eiskristallen in einer Flüssigkeit handelt. Die Eiskristalle bestehen aus reinem Wasser und die nicht gefrorene Flüssigphase (Restschmelze) aus einer wässrigen Lösung mit angereicherten Stoffen der Ausgangslösung (Solute). Dieser Restschmelze wird mit sinkender Temperatur Wasser entzogen und an die Eiskristalle angelagert. Dadurch steigt die Konzentration von Soluten in der Restschmelze stetig an. Der Konzentrationsverlauf dieser Restschmelze folgt mit abnehmender Temperatur der Liquiduslinie des Phasendiagramms (siehe Abbildung:2.2).

Die Eiskristalle entziehen der Restschmelze (verbleibende Flüssigphase) bis zum Schnitt-

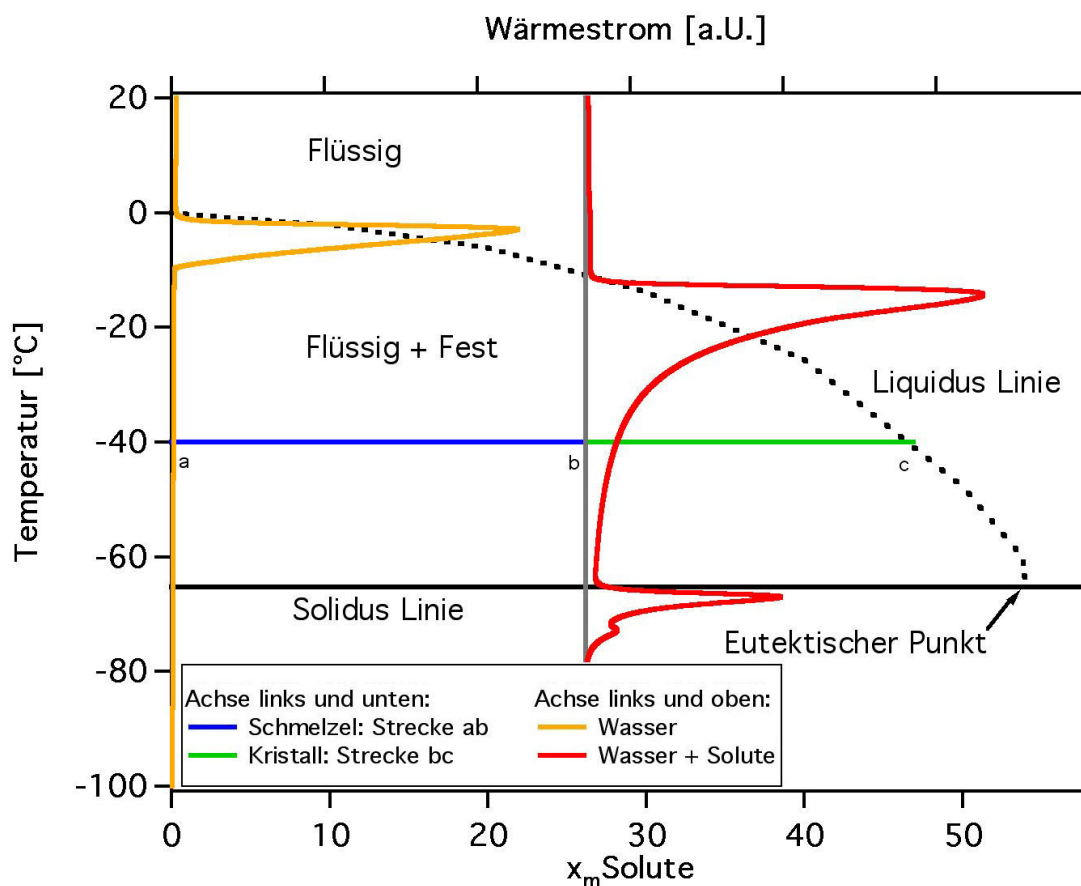


Abb. 2.2: Schematisches Phasendiagramm für Systeme mit vollkommener Löslichkeit im flüssigen und vollkommener Unlöslichkeit im festen Zustand; überlagert mit exemplarischen DSC-Messkurven von Wasser (gelb) und einer NaCl-Lösung (rot).

punkt der Liquidus- mit der Soliduslinie stetig Wasser. Somit wachsen die Eiskristalle kontinuierlich bis zur eutektischen Temperatur (T_E). Außerhalb der Kristalle werden die Solute bis zum Erreichen der eutektischen Temperatur aufkonzentriert. Analog verhält es sich beim Auftauen. Hierbei kommt es beim Erwärmen zum Schmelzen der eutektischen Phase oberhalb der Soliduslinie (T_E). Beispiel für eine PBS-Lösung, gezeigt in Abbildung: 2.2 rote Kurve (Schmelzwärme Soliduslinie), und schließlich das Schmelzen der reinen Eiskristalle (Schmelzwärme Liquiduslinie). Im Vergleich hierzu gibt es bei homogenen Stoffen wie Wasser (siehe Abbildung:2.2 orange Kurve) nur einen Schmelzpunkt. Die der jeweiligen Temperatur entsprechende Phasenzusammensetzung des Mehrphasensystems kann aus dem Phasendiagramm (siehe Abbildung:2.2) anhand des Hebelgesetzes durch die Quotienten aus den Hebel \overline{ab} (Abbildung:2.2 blau) und \overline{bc} (Abbildung:2.2 grün) individuell berechnet werden [34]. Unter Ungleichgewichtsbedingungen abgekühlte Lösungen können bei extrem hohen Kühlraten oder hohen CPA-Anteilen in einen metastabilen, amorphen Zustand übergehen. Die Moleküle gehen hierbei nicht in einen kristallinen Festkörper mit regelmäßigem Kristallgitter über. Sie befinden sich in einem vollkommen ungeordneten Zustand, vergleichbar einer immobili-

sierten Flüssigphase. Die Formation eines Kristallgitters wird dabei unterbunden und durch die ausbleibende Kristallisation wird ein Aufkonzentrieren der Solute verhindert.

2.2.2 Der zelluläre Wasserhaushalt bei der Kryokonservierung

Der zelluläre Wasserhaushalt (siehe Abbildung 2.3) bei der Kryokonservierung wird hier durch ein vereinfachtes Schema zur Erklärung des transmembranen Wasserflusses beim Einfrieren von Zellen in wässrigen Medien erklärt. Die Zelle befindet sich beim Abkühlen in einer wässrigen Elektrolytlösung [35] [36]. Diese wirken, wenn sie die Zellmembran nicht passieren können, als Osmolyte. Neben den Osmolyten (siehe Abbildung 2.3) können diese Lösungen auch weitere Additive wie kryoprotektive Substanzen enthalten. In der schematischen Betrachtung wird der Intrazellularraum in osmotisch aktives Volumen (OAV) und osmotisch inaktives Volumen (OIV) aufgeteilt [36] [37]. Das osmotisch inaktive Volumen (siehe Abbildung 2.3, blau) beinhaltet die zellulären Bestandteile (Nukleus, Mitochondrien und weitere Organellen). Diesem OIV wird ebenso das gebundene Wasser (W_b) der Hydrathüllen zugeordnet. Das osmotisch aktive Volumen (siehe Abbildung 2.3, rot) besteht aus freiem Wasser (W_f), membrangängigen Stoffen und nicht membrangängigen, intrazellulären Osmolyten [37]. Das OIV und das OAV sind durch die Zellmembran vom extrazellulären Medium getrennt. Diese Zellmembranen sind für Wasser und einige niedermolekulare Stoffe permeabel.

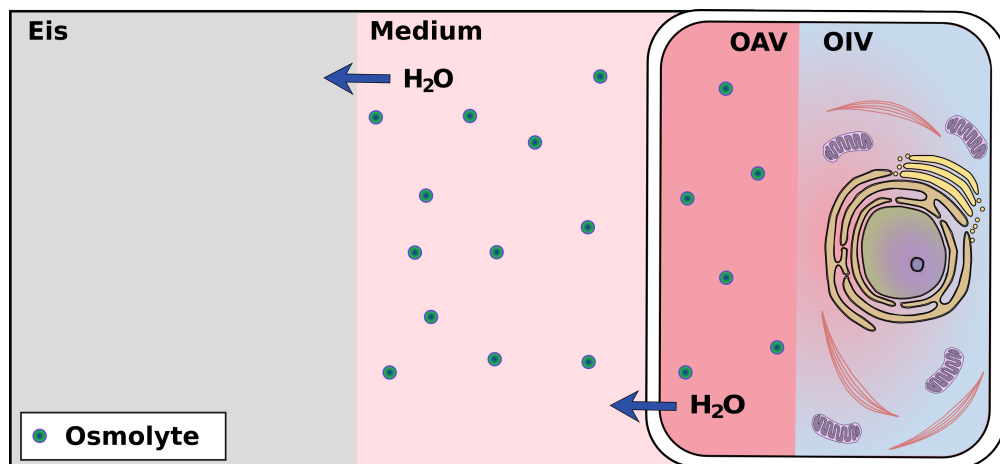


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Diffusion von Wasser aus dem osmotisch aktiven Volumen (OAV) einer Zelle durch die Bildung von Eiskristallen.

Daher verhält sich das OAV ähnlich einem Osmometer [38] [39]. Im Gleichgewichtszustand ist die Konzentration der Osmolyte intrazellulär und extrazellulär gleich. Wird aber dem Medium beim Abkühlprozess durch die extrazelluläre Kristallisation Wasser entzogen, so führt dies zu einer extrazellulären Anreicherung von Osmolyten. Durch diese Veränderung wird ein osmotischer Gradient erzeugt. Dieser wird durch einen transmembranen Wasserfluss ausgeglichen und führt zu einer Reduktion des Zellvolumens. Dieser Mechanismus wird mit der/dem Boyle-van't-Hoff Gleichung/Plot beschrieben (Abbildung 2.4).

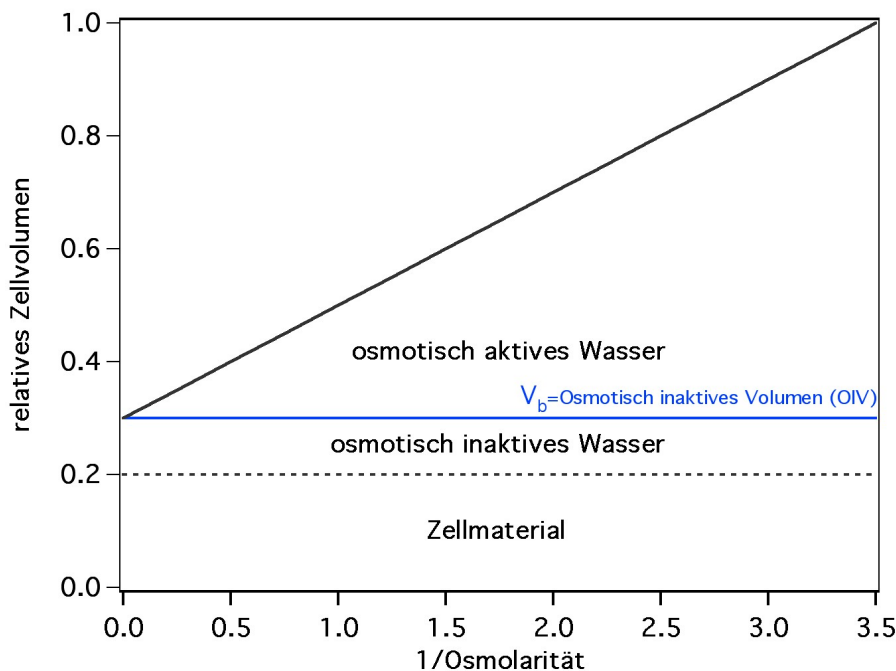


Abb. 2.4: Boyle-van't-Hoff Plot: Schematische Ideal-Beschreibung des relativen Zellvolumens als Funktion der reziproken Osmolarität. Das Zellvolumen setzt sich aus drei Kompartimenten zusammen: osmotisch aktives Wasser (osmotisch aktives Volumen (OAV)), osmotisch inaktives Wasser und Zellmaterial. Die Summe aus osmotisch inaktivem Wasser und Zellmaterial wird als V_b (osmotisch inaktives Volumen (OIV)) zusammengefasst [40].

Die Linearität dieser Gleichung basiert auf der Annahme, dass ungebundenes Wasser frei über die Membran diffundieren kann und die Menge des gebundenen Wassers des osmotisch inaktiven Volumens (Abbildung 2.4) eine unveränderliche Größe darstellt. Dieser Anteil wird daher in der Boyle-van't-Hoff Gleichung als konstant angesehen. Experimente haben jedoch gezeigt, dass bei stark abweichenden Osmolaritäten vom isotonen Zustand eine lineare Abhängigkeit nicht mehr zutreffend ist, da die Menge dieses gebundenen Wassers nicht als konstant betrachtet werden kann. Mazur zeigte, dass für einen Maus-Embryo im 8-Zellstadium der lineare Bereich von halber bis doppelter Konzentration der isotonen Osmolarität liegt [41]. Die Konsequenzen der osmotischen Dehydratisierung von Zellen für die Kryokonservierung wurde von Pegg beschrieben und vereinfacht modelliert [37]:

- Solute sind nur im OAV lösbar.
- Verhältnis von intra- zu extrazellulärer Osmolarität bleibt konstant.
- Verhältnis von intrazellulären Osmolyten zu DMSO bleibt konstant, intrazelluläre DMSO-Konzentration wird nur durch Wasserausfluss erhöht.
- Menge von DMSO und osmotisch inaktivem Volumen bleiben unverändert.

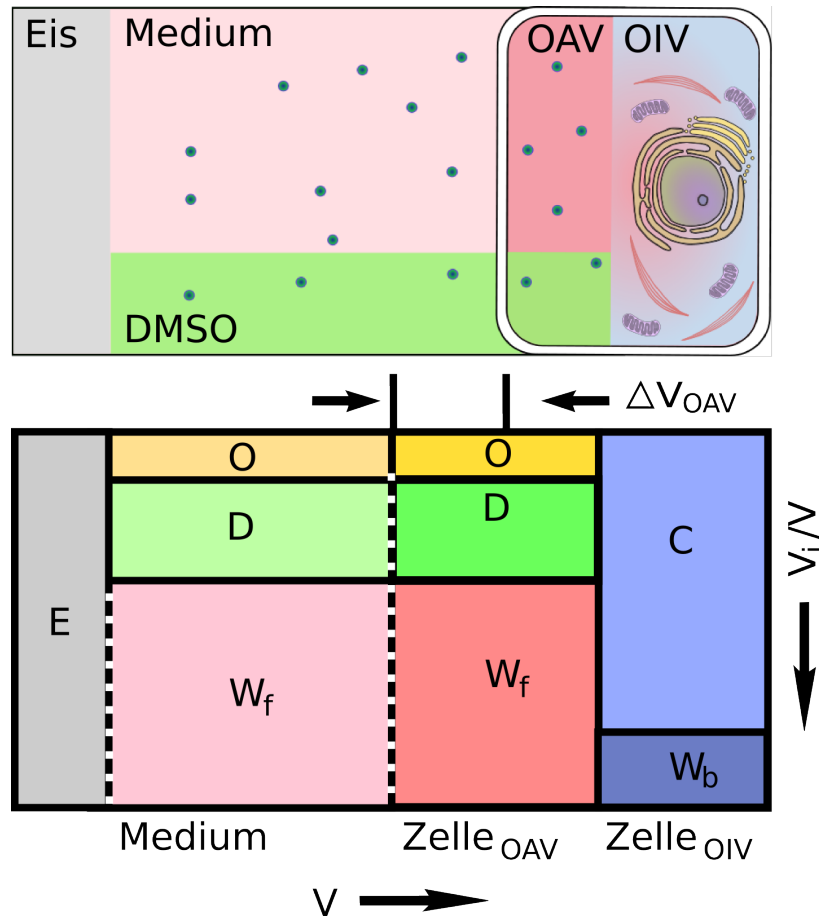


Abb. 2.5: Schematische Erklärung der osmotischen Dehydratisierung bei der DMSO basierten Kryokonservierung: Dieses Modell beinhaltet eine vom Medium und Eiskristallen umgebene Zelle. Diese bestehend aus OIV mit den zellulären Bestandteilen (C) und deren Hydrathülle (gebundenes Wasser (W_b)) sowie dem OAV, welches aus den Osmolyten (O), dem DMSO und dem freien Wasser (W_f)) besteht. Umgeben ist die Zelle vom Medium, welches aus freiem Wasser (W_f), DMSO (D), Osmolyten (O) und Eis (E) besteht. Auf der horizontalen Achse wird das Volumen und auf der vertikalen die Konzentration dargestellt.

Zur Erklärung wird ein Schema in Abbildung 2.5 eingeführt. Dieses reduziert die Zelle auf zwei Kompartimente: OIV ($Zelle_{OIV}$) und OAV ($Zelle_{OAV}$). Das OIV besteht aus zellulären Bestandteilen (z.B. Organellen (C)) und dem gebundenen Wasser (W_b).

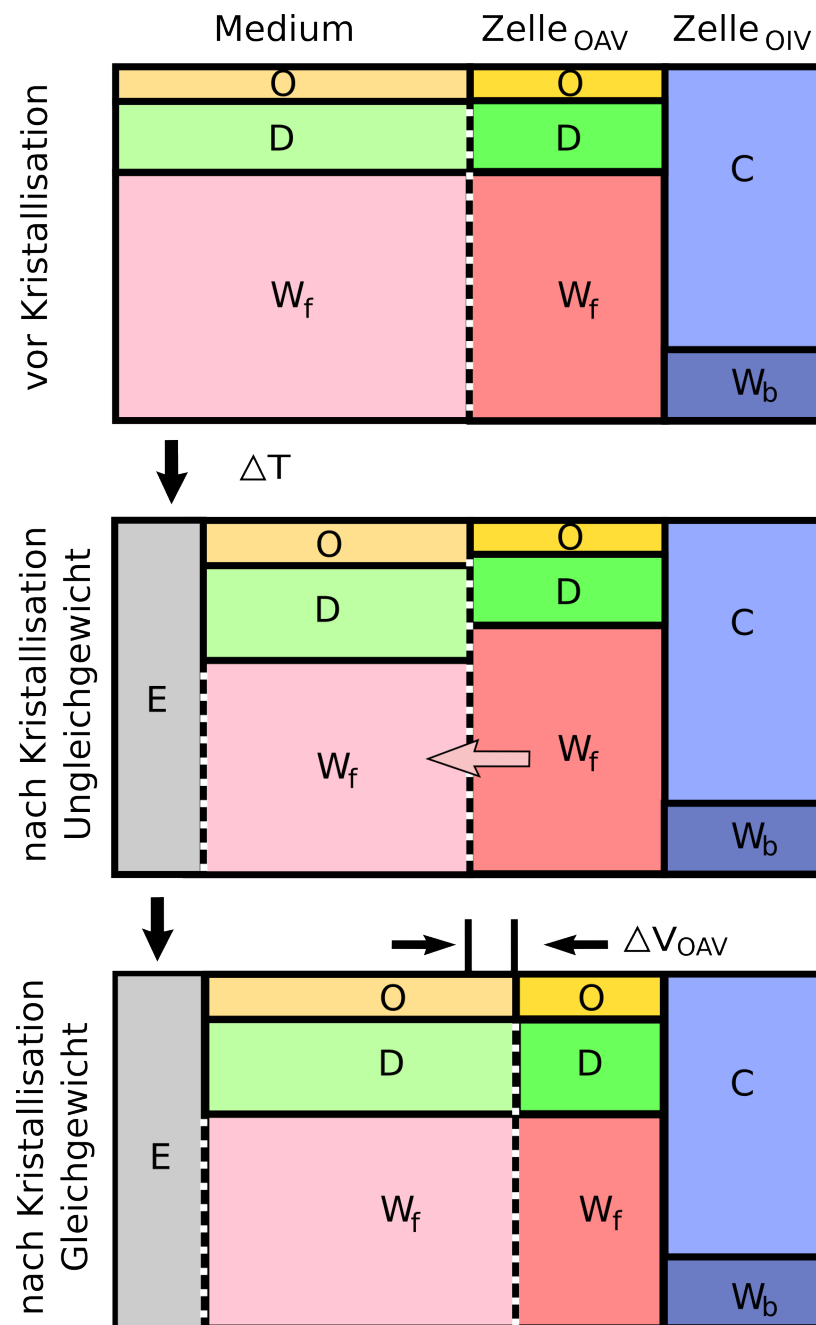


Abb. 2.6: Osmotische Dehydratisierung während der Kryokonservierung von Zellen: vor der Kristallisation sind OAV und Medium im Gleichgewicht. Bedingt durch die mit der Temperaturniedrigung einhergehende extrazelluläre Kristallisation entsteht ein Ungleichgewicht. Dieses wird durch einen zellulären Wasserverlust (Volumenverlust) ausgeglichen und so ein Gleichgewichtszustand herbeigeführt.

Dem Modell zu Folge wird dieses Volumen während des Kryokonservierungsprozesses nicht verändert. Das OAV besteht aus freiem Wasser (W_f), Osmolyten (O) und DMSO (D). Das Medium besteht ebenfalls aus freiem Wasser (W_f), Osmolyten (O) und DMSO (D). Die semipermeable Membran der Zelle erlaubt einen selektiven Stofftransport für DMSO (D) und

Wasser (W_f). Selektive Transportmöglichkeiten für Stoffe sind in dem Schema durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. In diesem Schema werden auf der Abszisse die Volumina (V) der Zellkompartimente aufgetragen und auf der Ordinate der Volumenanteil der Komponenten (V_i/V). Während des Kryokonservierungsprozesses steht das OAV bei langsamer Abkühlgeschwindigkeit stets im Gleichgewicht mit dem extrazellulären Medium (siehe Abbildung 2.6, vor Kristallisation). Eine Temperaturniedrigung unter deren Schmelzpunkt führt zu einer Kristallisation Lösung, idealerweise nur im Extrazellularraum. Dadurch kommt es, wie zuvor beschrieben, zu einer Anreicherung der Osmolyte. Die Differenz der extrazellulären und der intrazellulären Osmolarität erzeugt einen osmotischen Gradienten und resultiert in einem Ungleichgewichtszustand (siehe Abbildung 2.6, nach Kristallisation Ungleichgewicht). Dieser wird durch einen transmembranen Wasserfluss ausgeglichen. Hierbei diffundiert das freie Wasser (W_F ; Abbildung 2.6 rot) über die semipermeable Membran (gestrichelte Linie) ins Medium. Dadurch verliert die Zelle an Volumen (Abbildung 2.5 Abszisse ΔV_{OAV}). Durch diesen Volumenverlust wird die intrazelluläre Konzentration an Osmolyten (O) gesteigert (siehe Ordinate V_i/V). Dieser Prozess wird bis zum Erreichen des eutektischen Punkts T_E fortgesetzt, an dem die Suspension erstarbt. Das OIV der Zelle sowie die intrazelluläre Osmolyt- und DMSO-Menge bleiben bis zum Erstarren konstant.

2.2.3 Zellschäden durch intra- und extrazelluläre Eisbildungsprozesse

Die Kryokonservierung von Zellen ist kein natürlicher Prozess. Es bedarf der Anwendung definierter Prozeduren und Zusätze, um die Kryotoleranz der Proben zu gewährleisten. Daher unterliegt die zelluläre Vitalität nach der Kryokonservierung, abhängig von der Zelllinie und Protokoll, starken Schwankungen. Diese hängen unter anderem von den verwendeten Kryoprotektiva (CPA) und der Abkühl- und Erwärmungsrate ab. Die Mechanismen, die während der Kryokonservierung zu letalen Schäden führen, sind weitestgehend ungeklärt. Die bekanntesten Mechanismen sind die Schädigungen durch eine intrazelluläre Eiskristallbildung und die Lösungseffekte [42] [43] [44]. Unter den Lösungseffekten versteht man die Anreicherung von Soluten nach der Kristallisation in der verbleibenden Flüssigphase (Abbildung: 2.3). Dieser Konzentrationsanstieg, der mit einer zellulären Dehydratisierung einhergeht, kann zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen führen. Der Schädigungsmechanismus der Lösungseffekte ist somit chemisch und osmotisch begründet. Erstmals wurde er von Lovelock prognostiziert [45]. Er begründet die letalen Folgen als Konsequenz der hohen Salzkonzentration, die die Zellmembran permeabel für Natrium-Ionen macht. Dadurch wird das zelluläre Elektrolytgleichgewicht verändert, was nach der Kryokonservierung zur Zellyse führen kann [45]. Ferner führt eine Hypertonizität der extrazellulären Lösung, wie auch Meryman belegt hat, zur Schädigung durch osmotische Dehydratisierung [46]. Eine zu starke Volumenreduktion kann zu einer Denaturierung von Proteinen und zu einer Dehydratisierung von zellulären Membranen und Organellen führen. Bei Proteinen kann dies zu einem Auflösen der α -Helix Struktur und zu einer Erweiterung der β -Faltblätter führen [47] [48]. Dadurch

denaturieren die Proteine irreversibel. Bei Membranen führt eine zu starke Dehydratisierung zu einem irreversiblen Verlust der Struktur und Funktionalität [49]. Ferner verlieren sie ihre Flexibilität und werden anfälliger für mechanischen Stress [50] [51] [52]. Die zelluläre Dehydratisierung und der damit einhergehende Volumenverlust sind zeitabhängig und werden durch die hydraulische Leitfähigkeit der Membran (L_p) bestimmt. Die hydraulische Leitfähigkeit (Membranpermeabilität), welche von der Temperatur abhängig ist, nimmt mit sinkender Temperatur ab [53]. Sie erfordert daher eine optimale Anpassung der Kühlrate. Dadurch ist das Ausmaß der Dehydratisierung wiederum abhängig von der Abkühlgeschwindigkeit. Hierbei kann jedoch die Verwendung zu hoher Abkühlraten zu einer zu hohen intrazellulären Wasserkonzentration führen. Der Ausgleich dieses Ungleichgewichts geht mit einer Kristallisation von intrazellulärem Wasser einher. Dieser unerwünschte Prozess führt wiederum zum zweiten Schädigungsmechanismus: der letalen intrazellulären Eiskristallbildung. Somit spielt also sowohl bei der intrazellulären Eiskristallbildung wie auch bei den Lösungseffekten der transmembrane Wasserfluss die zentrale Rolle. Die Abhängigkeit dieser Schädigungsprozesse von der gewählten Kühlrate (siehe Abbildung: 2.7) wird von Mazur in seiner Zwei-Faktor-Hypothese beschrieben [21].

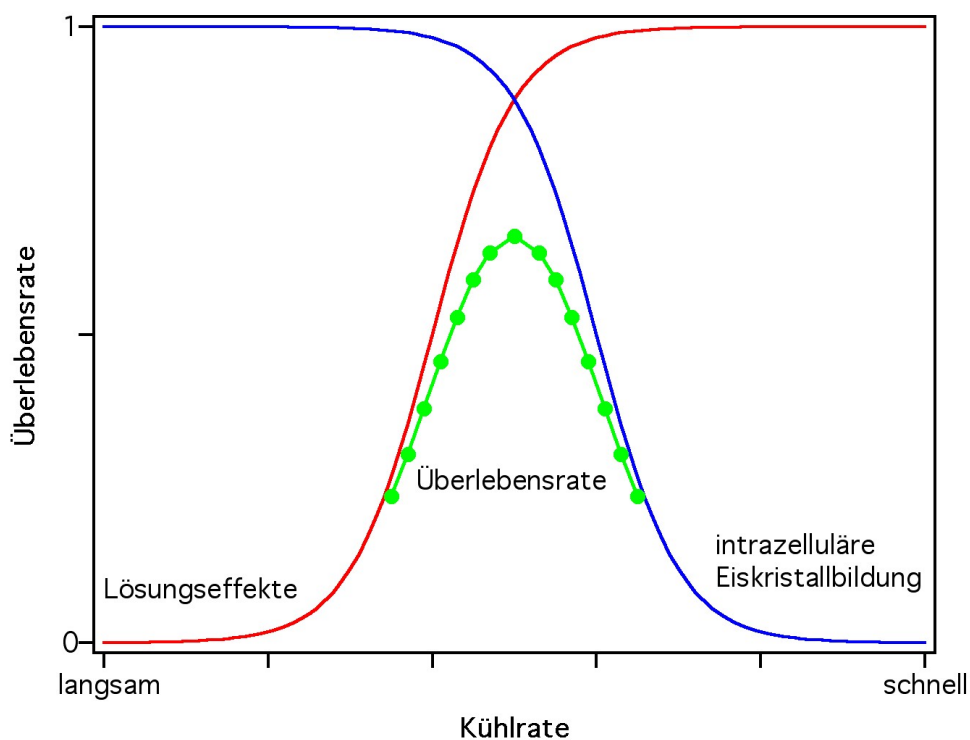


Abb. 2.7: Resultierende Überlebensrate durch Überlagerung der Schädigungsmechanismen bei der Kryokonservierung: bei langsamen Kühlraten (Lösungseffekte) und bei hohen Kühlraten (intrazelluläre Eiskristallbildung) [54] [40].

Diese Hypothese (Abbildung:2.7) beschreibt die letale Wirkung der beiden Mechanismen in Abhängigkeit von der Kühlrate. Die optimalen Bedingungen für eine große Überlebenswahrscheinlichkeit ist demnach die Wahl der idealen Abkühlrate. Diese optimale Abkühlgeschwindigkeit muss individuell für jede Probe bei der Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung evaluiert werden.

2.2.4 Konservierungsstrategien

Zur Überführung zellulärer Proben zur Lagertemperatur bedient man sich zweier verschiedener Strategien: dem Einfrieren unter Gleichgewichts- und Ungleichgewichtsbedingungen. Beim Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen wird durch die Zugabe von CPA der Schmelzpunkt der Zelle herabgesetzt und Zellwasser substituiert. Der kristallisationsbedingte Konzentrationsanstieg bewirkt einen transmembranen Wasserfluss. Durch den Wasserentzug wird die Zelle dehydratisiert und intrazellulär die Viskosität durch Anreicherung der Osmolyte erhöht, bis sie bei T_E erstarrt. Die zelluläre Dehydratisierung soll hierbei helfen, eine intrazelluläre Kristallisation von Wasser möglichst zu umgehen. Neben dem Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen können biologische Proben auch erfolgreich in einem Ungleichgewichtsprozess (Vitrifikation) kryokonserviert werden. Die erfolgreiche Anwendung dieses Verfahrens erfordert die Verwendung hoher CPA-Konzentrationen und Kühlraten. Hierbei ist das Ziel, ein amorphes Erstarren (metastabiler Zustand) der Probe zu erreichen. Dies ist jedoch nur mit sehr kleinen Probenvolumina technisch zu realisieren. Diese werden mit hohen Konzentrationen von kryoprotektiven Substanzen versetzt, um den Gefrierpunkt der Lösungen stark zu erniedrigen und die Viskosität zu steigern. Diese Zusätze (z.B. DMSO und Ethylenglykol) ermöglichen eine Überführung der Probe in einen amorphen Zustand. Um diesen metastabilen Zustand über längere Zeit aufrecht zu erhalten, ist eine Lagerung der Probe unterhalb des Glaspunktes (T_G) erforderlich. Eine Erwärmung der Probe auf Temperaturen oberhalb von T_G kann dazu führen, dass die Probe von einem metastabilen in einen stabilen Zustand übergeht. Mit diesem Übergang geht die Kristallisation der Probe aus dem amorphen Zustand einher (Devitrifikation). Dieser irreversible Vorgang führt ebenfalls zu einer letalen Schädigung der Probe. Daher ist die Wahl der entsprechenden Auftaurate bei der Kryokonservierung ebenfalls ein erfolgsbeeinflussender Faktor. Diese sollte so hoch wie möglich gewählt werden, um ein verlustarmes Überführen der Probe ohne Devitrifikation zu physiologischen Bedingungen zu gewährleisten [55]. Wird diese zu gering gewählt und die Probe somit zu langsam erwärmt, kann die hochviskose, glasartig erstarrte, metastabile Phase sowohl extra- als auch intrazellulär kristallisieren. Dies führt wiederum zu einer irreversiblen Schädigung der Probe beim Auftauen.

2.2.5 Einfluss der Kryoprotektiva

Durch die Zugabe von kryoprotektiven Substanzen kann die Kryotoleranz von biologischen Proben maßgeblich verbessert werden. Die Zugabe dieser Gefrierschutzmittel wirkt sich auf

den Wassertransport, die Nukleation und auf das Kristallwachstum aus [56]. Hierdurch werden die zuvor beschriebenen Schädigungsmechanismen ebenfalls beeinflusst [36] [57]. Die Kryoprotektiva lassen sich in zwei verschiedene Klassen einteilen. Man unterscheidet hierbei zwischen intra- und extrazellulär wirkenden CPA. Extrazellulär wirkende Protektiva wie Sucrose und Trehalose können nicht durch die Membran diffundieren. Ihre Wirkungsweise wird den kolligativen Eigenschaften zugeschrieben. Zudem wird der Trehalose auch eine Membran stabilisierende Wirkung zugesprochen, da es sich über Wasserstoffbrückenbindungen an die Membran bindet [52]. Intrazellulär wirkende Kryoprotektiva wie Ethylenglycol (EG, $T_E \approx -55^\circ\text{C}$, $c_{EG}(T_E) \approx 65\%(\text{v/v})$), Glycerin (Gly, $T_E \approx -47^\circ\text{C}$, $c_{Gly}(T_E) \approx 67\%(\text{v/v})$) und Dimethylsulfoxid (DMSO, $T_E \approx -63^\circ\text{C}$, $c_{DMSO}(T_E) \approx 57\%(\text{v/v})$) [58] können aufgrund ihres niederen Molekulargewichts durch die Membran diffundieren. Die besondere Wirkungsweise von DMSO ist auf seine polare, kleine und kompakte Struktur zurückzuführen. Die Zugabe von DMSO führt ebenfalls zu einer Erhöhung der hydraulischen Leitfähigkeit [59]. Dies ermöglicht die Anwendung schnellerer Kühlraten [60], da der zelluläre Wasserausfluss weniger gehemmt wird. Weiterhin besitzt es die Fähigkeit, eingeschränkt Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen und kann somit an Wasser, Proteine, Nukleinsäuren und andere Substanzen angelagert werden [61]. Von vorrangiger Bedeutung für das Verständnis der Wirkungsweise ist auch, dass DMSO die Fähigkeit besitzt, einen Teil der Wassermoleküle, die mit zellulären Bestandteilen verbunden sind, zu ersetzen und starke Wechselwirkungen mit dem Wasser einzugehen [61]. Dadurch wird Wasser im OAV ersetzt [37] und der Schmelzpunkt der Zelle erniedrigt. Dies mindert das Risiko einer intrazellulären Eiskristallbildung. Ferner ist die Wirkungsweise wie auch die des Glycerins konzentrationsabhängig. Mit steigender Anfangskonzentration wird nach der Kristallisation der Anteil der verbleibenden Flüssigphase (Restschmelze) erhöht. Hierdurch steigt der Phasenanteil der Restschmelze, in dem sich Osmolyte lösen können [37]. Ein höherer Anteil an Restschmelze führt somit zu einer Reduktion der Osmolytkonzentration in der verbleibenden Flüssigphase [60] [45] [18]. Der Anteil der verbleibenden Flüssigphase steht in direkter Abhängigkeit zu der Startkonzentration von DMSO. Die Anreicherung von DMSO folgt bei der individuellen Temperatur entlang der Soliduslinie des Phasendiagramms. Somit wird auch mit steigender Anfangskonzentration von DMSO die Konzentration der gelösten Salze in der Restschmelze reduziert. Zum Einfrieren zellulärer Proben unter Gleichgewichtsbedingungen zeigt DMSO die besseren physikalischen Eigenschaften. Im Vergleich zum Ethylenglykol ($c_{EG}(T_E) \approx 65\%(\text{v/v})$ bei T_E) und Glycerin ($c_{Gly}(T_E) \approx 67\%(\text{v/v})$ bei T_E) wird das Dimethylsulfoxid während des Abkühlvorgangs bis T_E weniger stark aufkonzentriert $c_{DMSO}(T_E) \approx 57\%(\text{v/v})$. Weiterhin ist die eutektische Erstarrungstemperatur bei DMSO ($T_E \approx -63^\circ\text{C}$) auch am niedrigsten. Dies bedeutet, dass bei der Verwendung von DMSO die Anreicherung der extrazellulären Osmolyte über einen größeren Temperaturbereich stattfindet. Dadurch wird der Anstieg der extrazellulären Osmolytkonzentration über einen längeren Zeitraum hingezogen und weniger starke osmotische Gradienten erzeugt. Nachteilig bei DMSO ist jedoch seine gegenüber Ethylenglykol und Glycerin erhöhte Toxizität, die unter anderem auch von der Inkubationszeit abhängt [62]. Negative Effekte wie verschlechterte Schlupfraten bei Embryos treten beispielsweise bei Konzentrationen $>$

10% und Inkubationszeiten > 10 min auf [63].

2.3 Spektroskopische Bildgebung

In diesem Kapitel werden die grundlegenden physikalischen Wechselwirkungen zur spektroskopischen Bildgebung beschrieben. Anschließend werden die Kontrastmechanismen, die im Rahmen der Arbeit zur Bildgebung verwendet wurden, vorgestellt. Dabei wird auf die Raman Streuung und Fluoreszenz genauer eingegangen. Vorgestellt wird weiterhin die Laser-Scanning-Mikroskopie als bildgebendes, spektroskopisches Verfahren zur Untersuchung biologischer Proben. Letztendlich wird die zwei- und dreidimensionale Bildgebung anhand der beiden Kontrastmechanismen vorgestellt.

2.3.1 Physikalische Wechselwirkungen zwischen Photonen und Molekülen

Das Zusammentreffen von Licht (Photonen) mit Molekülen kann verschiedene Wechselwirkungen hervorrufen. Entspricht die Photonenenergie einem Übergang zwischen zwei Energiezuständen des Moleküls, kann die Lichtenergie absorbiert werden. Eine genauere quantenmechanische Beschreibung der Ein- und Mehrphotonenabsorption findet sich in [64], [65] und [66]. Bei der Absorption ist die Energie der elektromagnetischen Welle (Photon) gleich dem Energieunterschied des Grundzustands (S_0) gegenüber des angeregten Zustands (S_1) Abbildung 2.8. Die zur Anregung notwendige Energie kann durch die Absorption eines einzelnen Photons (Einphotonenabsorption) oder durch die simultane Absorption von zwei oder mehr Photonen (Multiphotonenabsorption) eingebracht werden. Die Multiphotonenabsorption (MPA) ist ein nichtlinearer Vorgang in einem Molekül [67], der durch die simultane Absorption von zwei oder mehreren Photonen angeregt wird [68]. Dabei werden die Photonen [69] innerhalb von $t < 10^{-16}$ s absorbiert [70]. Die Gesamtenergie entspricht hierbei der Summe der einzelnen Energien, wobei die einzelnen Photonen nicht die gleiche Energie besitzen müssen.

Dieser Effekt wurde bereits 1931 von der deutschen Physikerin Maria Göppert-Mayer, basierend auf quantenmechanischen Rechnungen vorhergesagt [69]. Der experimentelle Beweis für diesen nichtlinearen Effekt konnte erst nach der Erfindung des Lasers erbracht werden. Grund hierfür ist die Anforderung der zur Wechselwirkung notwendigen Photonendichten ($5 \cdot 10^{15}$ Photonen/s) [70].

Nach der Absorption relaxiert das Elektron in einem Zeitfenster von 10^{-14} s bis 10^{-11} s [71]. Hierbei geht es aus einem vibronisch höheren Zustand v_n in den v_0 des angeregten Zustand S_1 über. Diesen Vorgang nennt man thermische Relaxation. Hierbei wird die überschüssige Energie in Form von Wärme abgegeben. Aus diesem Zustand relaxiert das Elektron dann auf ein beliebiges, vibronisches Niveau des Grundzustands zurück. Dieser Übergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand kann entweder strahlungslos oder strahlend (Fluoreszenz) erfolgen (siehe Abbildung 2.8). Im Folgenden wird eine kurze Einführung zu den

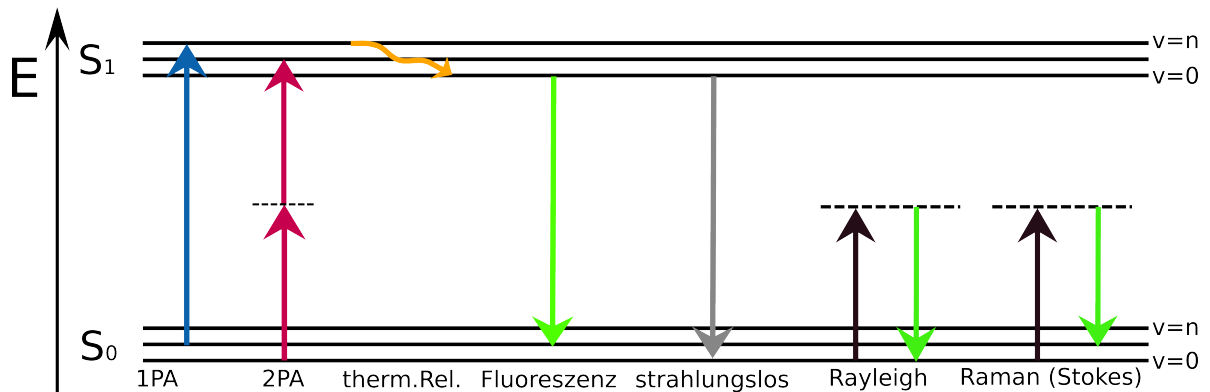


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Absorption anhand der Ein- (1PA) und Zwei- (2PA) Photonenabsorption, thermische Relaxation (therm.Rel), Fluoreszenz, strahlungslose Prozesse, Rayleigh-Streuung, Stokes-Streuung (Raman), Grundzustand (S_0), angeregter Zustand (S_1) und vibronische Niveaus ($v = 0$ bis $v = n$).

physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz gegeben; detaillierte Darstellungen sind in der Literatur zu finden [72]. Unter Fluoreszenz versteht man die spontane Emission eines Photons, das durch den Übergang eines Elektrons von einem elektronisch angeregten Zustand (S_1) in den Grundzustand (S_0) entsteht. Die Wellenlänge des emittierten Photons hängt hierbei von der energetischen Differenz der Zustände S_0 und S_1 ab. Durch die thermische Relaxation im angeregten Zustand ist das Fluoreszenzlicht energieärmer. Die Differenz aus spektralem Maximum der Fluoreszenz und der Absorption wird als Stokes Shift bezeichnet [73]. Wird ein Photon nicht absorbiert, so kann es elastisch oder inelastisch gestreut werden. Elastische Streuprozesse, bei denen die Frequenz der Photonen unverändert bleibt, nennt man Rayleigh-Streuung [74]. Ein geringer Teil des Lichtes kann jedoch inelastisch gestreut werden. Hierbei wird die Energie auf die Schwingungsmoden des Moleküls übertragen. Die Frequenz des gestreuten Lichts ist um die molekulare Schwingungsfrequenz reduziert. Dies ist die sogenannte Raman Streuung. Das Spektrum des inelastisch gestreuten Lichts der Probe ist ein Abbild der molekularen Schwingungsfrequenzen und stoffspezifisch [75] [76]. Wasser verfügt durch seine OH-Bindung und die Wasserstoffbrückenbindungen über ramanaktive Schwingungsbanden, die als Kontrast für die Raman Mikroskopie genutzt werden kann [77]. Durch die Wasserstoffbrückenbindungen in flüssigem Wasser kommt es zu einer starken inhomogenen Verbreiterung der OH-Streckschwingungen ($\nu_{OH} \approx 3000\text{cm}^{-1}$ bis 3600cm^{-1}) im Raman-Spektrum. Durch den Phasenübergang vom flüssigen in den kristallinen Zustand kommt es zu einer geordneten, molekularen Struktur der Wasseratome im Kristallgitter. Im Bereich der Streckschwingungen kommt es zur Ausbildung einer dominierenden Bande im niederfrequenten Bereich der OH-Schwingung mit einem Maximum bei $\nu_{OH} \approx 3150\text{cm}^{-1}$. Durch diesen charakteristischen Unterschied ist es mit der Raman-Spektroskopie möglich, Eis von flüssigem Wasser zu unterscheiden. Das Dimethylsulfoxid (DMSO, C_2H_6OS) verfügt über mehrere charakteristische ramanaktive Schwingungsbanden. Die CH_3 Gruppe hat eine symmetrische Streckschwingung mit einem Maximum zwischen $\nu_{CH_3} \approx 2913\text{cm}^{-1}$ bis 2925cm^{-1})

und eine asymmetrische bei $\nu_{CH_3} \approx 2997cm^{-1}$ bis $3012cm^{-1}$) [78]. Ferner verfügt DMSO über eine charakteristische ramanaktive C-S-Schwingungsbande zwischen $\nu_{C-S} \approx 650cm^{-1}$ bis $\nu_{C-S} \approx 750cm^{-1}$.

2.3.2 Laser-Scanning-Mikroskopie

Die optische Mikroskopie basiert auf Wechselwirkungen zwischen Licht und Materie. Zur Bildgenerierung werden hier verschiedenste physikalische Effekte wie Reflexion, Phasenverschiebung, Fluoreszenz oder Raman-Streuung verwendet. Hierfür kann die Probe gänzlich mit einer Lichtquelle beleuchtet werden (Weitfeld) oder mit einer punktförmigen Lichtquelle (Laser) abgerastert und das Bild rekonstruiert werden. Dieses Verfahren bezeichnet man als Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM). Bei der Weitfeld-Mikroskopie wird die ganze Probe mit einer divergenten Lichtquelle beleuchtet. Hingegen wird bei der Laser-Scanning-Messung das Anregungslicht in die Probe fokussiert. Dies ermöglicht die Visualisierung kleinster Volumina. Die Laser-Scanning-Mikroskopie ist inzwischen eine weitverbreitete Methode zur Untersuchung verschiedenster Proben auf sub- μm Basis [79]. Dieses nichtinvasive Bildgebungsverfahren wird in verschiedenen Forschungsbereichen zur *in vivo* und *in vitro* Beobachtung biologischer Proben eingesetzt.

In der Laser-Scanning-Mikroskopie unterscheidet man mehrere in Anregung und Detektion technisch unterschiedliche Verfahren wie beispielsweise die Transmissions-, die konfokale-(CLSM) und die nichtlineare Multiphotonen-LSM (MPLSM). Die konfokale und nichtlineare MPLSM verfügen über ein dreidimensionales Auflösungsvermögen. Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) wird die dreidimensionale Auflösung durch eine Begrenzung des Abbildungsvolumens im Detektionsstrahlengang umgesetzt [80]. Die nichtlineare Multiphotonen LSM hingegen setzt diese anregungsseitig durch ein begrenztes Anregungsvolumen um. Die Auflösung wird bei der konfokalen LSM lateral durch die beugungsbegrenzte Fokussierung (Ernst Abbe 1937) der Lichtquelle definiert. Zur dreidimensionalen Auflösung wird bei der konfokalen LSM das beugungsbegrenzt angeregte Fokalvolumen in einer Zwischenbildebene auf einer konfokalen Blende abgebildet (siehe Abbildung: 2.9). Diese blendet die Photonen aus, die außerhalb des abzubildenden Volumens aufgesammelt wurden. Dementsprechend werden nur Photonen aus dem Fokus von dem Detektor (PMT) detektiert (siehe Abbildung: 2.9). Die verstellbare Lochblende ermöglicht also eine Ausblendung von Objektpunkten ober- und unterhalb der Fokalebene. Bei der nichtlinearen LS-Mikroskopie hingegen wird die optische Schichtdicke durch die nichtlinearen Absorptionsprozesse bestimmt. Die axiale und laterale Ausdehnung dieses nichtlinearen Anregungsvolumen wurde näherungsweise von *Zipfel et al.* beschrieben [70]. Außerhalb dieses Volumens ist, bei passenden Absorbieren, nur eine lineare Absorption möglich, die in der Regel nicht zur Signalgenerierung beiträgt. Die räumlich begrenzte, nichtlineare Anregung erlaubt detektionsseitig den Verzicht auf eine Lochblende (siehe Abbildung: 2.9 b)). Somit können alle gesammelten Photonen zur Signalerzeugung beitragen, da ihr Ursprungsort nur im Anregungsvolumen liegen kann.

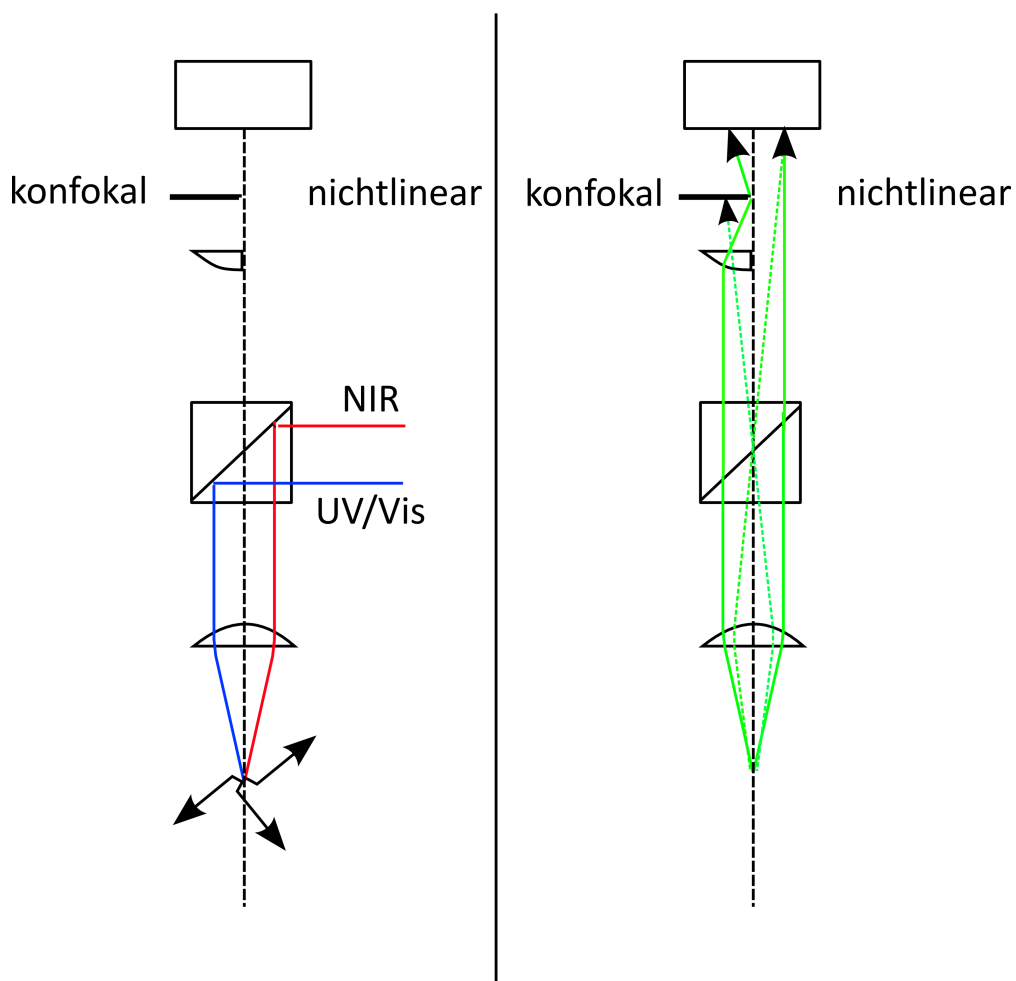


Abb. 2.9: Schematische Darstellung eines Laser Scanningmikroskops mit: a) Anregungs- und b) Detektionsstrahlengang für konfokale und nichtlineare Mikroskopie. Die konfokale Anordnung beinhaltet eine Lochblende und Linse zur Fokussierung des Detektionslichtes auf die Lochblende.

2.3.3 Bildaufbau in der Laser-Scanning-Mikroskopie

Zum Bildaufbau wird die zu untersuchende Probe punktwise mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert. Dies kann prinzipiell auf zwei unterschiedliche Arten umgesetzt werden. Zum einen kann der Fokus relativ zur Probe über zwei Scanspiegel (beam scanning) in x- und y-Richtung ausgelenkt werden, zum anderen kann auch die Probe relativ zum Fokus (sample scanning) bewegt werden. Beide Verfahren basieren auf einer punktwisen Abrasterung und simultanen Detektion der probenseitigen Wechselwirkungen (Fluoreszenz, Streulicht). Die durch die Wechselwirkung mit der Probe frequenzverschobene Strahlung wird durch geeignete Filter vom Anregungslicht (Primärlicht) getrennt.

Die pixelweise zu detektierende Strahlung wird entweder spektral aufgelöst von einem Spektrometer oder als Intensitätssignal von einem Photomultiplier (PMT) gemessen. Die Visualisierung der Messdaten der Fokalebene erfolgt bei der Intensitätsmessung durch pixelbezogene

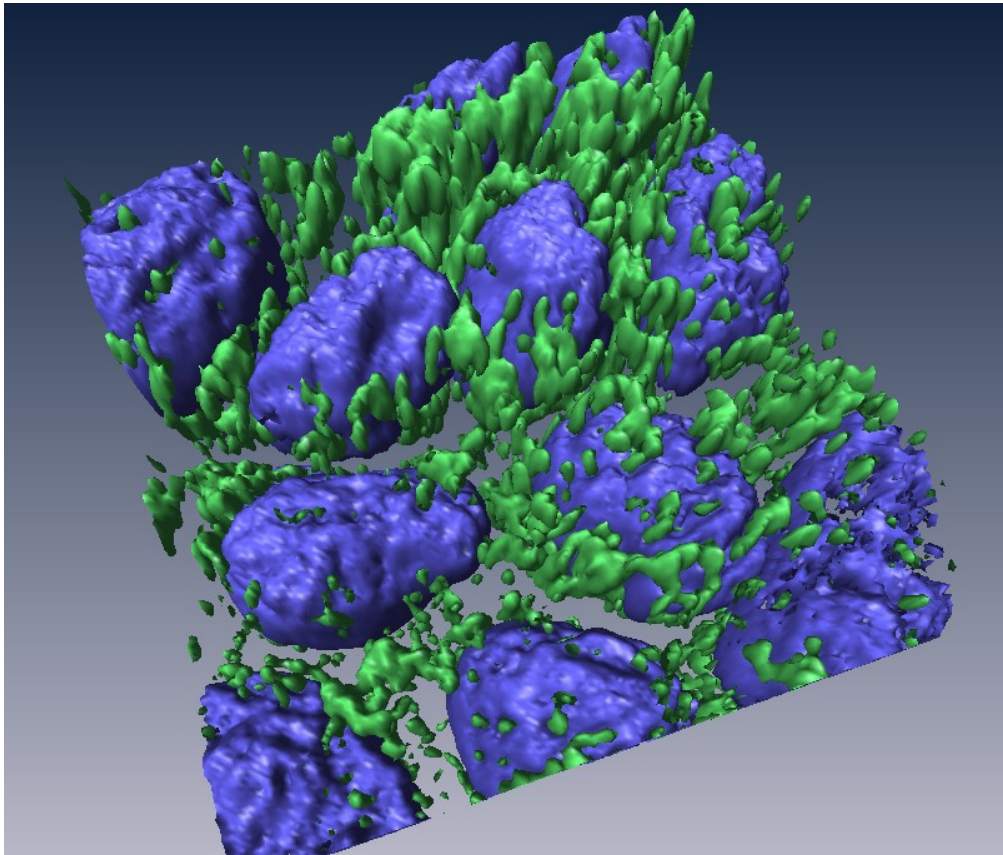


Abb. 2.10: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie: isometrische Ansicht einer Rekonstruktion (Amira) von CaCo-2 Zellen (blauer Nukleus (Hoechst) und grünen Mitochondrien (Rhodamine 123)).

Ausgabe digitalisierte Intensitätsdaten in einer 2D Bild-Matrix. Aufgrund des axial begrenzten Anregungs- (MPLSM) bzw. Abbildungsvolumens (CLSM) bieten diese Verfahren die Möglichkeit, optische Schnitte definierter Schichtdicke anzufertigen. Somit ist es möglich, in einer dickeren Probe eine einzelne Bildebene abzubilden. Kombiniert man diese Abbildungen mit einer Bewegung des Fokus entlang der optischen Achse, erhält man eine Vielzahl optischer Schnitte. Aus diesen kann mittels geeigneter Software (Amira, Image J, Zeiss Image Browser, Voxx) die dreidimensionale Struktur der Probe (siehe Abbildung: 2.10) rekonstruiert werden. Die Qualität dieser Rekonstruktionen hängt von der Schnittdicke der Ebene und der Auflösung entlang der optischen Achse ab.

Kapitel 3

Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die im Laufe der Arbeit verwendeten Probenpräparationen, die verwendeten Geräte und entwickelten experimentellen Aufbauten beschrieben. Im ersten Teil des Kapitels werden die für die Zellkultur und Probenpräparation nötigen Abläufe erläutert. Im zweiten Teil wird auf das zur Multiphotonenkryomikroskopie weiterentwickelte Basismikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena) und die zur Weiterentwicklung verwendeten Bauteile eingegangen. Dieses Mikroskop soll einen optischen Zugang zur Morphologie der kryokonservierten Proben und der Diagnose potentieller Schädigungsmechanismen eröffnen. Im dritten Teil dieses Kapitels wird schließlich auf die Entwicklung und den Aufbau des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Raman-Mikroskops und der dazugehörigen Softwareschnittstelle mit Datenaufnahme und Auswertung eingegangen. Dieser neuartige Ansatz soll es ermöglichen, kryobiologische Proben markerfrei abzubilden und anhand von chemischen Kontrasten neue Messparameter zu evaluieren, die Antworten auf kryobiologische Fragestellungen liefern sollen.

3.1 Protokolle für biologische Proben

3.1.1 Protokolle zur Zellkultivierung

Als Kulturmedium für die hMSC wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F12 verwendet. Dieses besteht zu 450 ml aus DMEM F-12, welches mit 50 ml steril filtriertem Fetal Bovine Serum (FBS) versetzt wurde. Dann wurden dem Medium ein 5 ml Penicillin- und Streptomycin-Gemisch sowie 250 μl einer bFGF (basic fibroblast growth factor, Stocklösung 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beigelegt. Zum Passagieren der Zellen (3x pro Woche) wurde Phosphate Buffered Saline (PBS (-/-)), Medium und Trypsin 15 min auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde das überschüssige Medium aus der zu passagierenden Zellkulturflasche (25 ml) abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 5 ml PBS (-/-) gewaschen und das PBS wieder abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 2 ml Trypsin suspendiert und 1 ml wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Dann wurden 10 Tropfen der Lösung in eine

neue Zellkulturflasche pipettiert und mit 5 ml Kulturmedium aufgefüllt und zur Kultivierung in den Brutschrank gestellt.

3.1.2 Probenpräparation zur Mikroskopie

Zur Mikroskopie suspendierter Zellen wurden diese aus der Kulturflasche mit Trypsin abgelöst. Hierzu wurde das Trypsin EDTA auf 37 °C vorgewärmt. Dann wurde in der Zellkulturflasche das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS (-/-) gewaschen und überschüssiges PBS abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin inkubiert. Zur Inkubation wurde die Zellkulturflasche für 5 min in den Inkubator gestellt. Danach wurden die Zellen mit 5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde je 1 ml der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Diese wurden für 5 min bei 500 min^{-1} abzentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Mediumsüberstand abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Kryomedium (Zusammensetzung unterschiedlich) resuspendiert. Etwa 8-10 μl der Zellsuspension wurden auf ein Deckglas gegeben und dieses mit einem weiteren Deckglas abgedeckt. Daraufhin wurde die präparierte Probe in die Mikroskopiekammer transferiert. Für die Mikroskopie adhärenter Zellen wurden die auf Deckgläsern kultivierten Zellen aus dem Kulturmedium genommen und in 2 ml PBS (-/-) gewaschen. Dann wurde das Deckglas mit 8-10 μl Kryomedium benetzt. Anschließend wurden sie auch mit einem weiteren Deckglas abgedeckt und in die auf 4 °C vorgekühlte Mikroskopiekammer transferiert. Diese hESC-Zellen (H9, WiCell, Madison, WI, USA; 18. und 44. Genehmigung des Robert Koch Instituts (§6 StZG)) wurden zum Erhalt ihres Differenzierungspotentials in Kokultur mit PMEF-Zellen (CF-1 Stamm, Millipore Schwalbach) kultiviert (siehe Abbildung 5.7 a) PMEF links, hESC-Kolonie rechts). Die PMEF wurden inaktiviert und mit einer Dichte von $0.17 \cdot 10^6$ Zellen pro Well auf Collagen beschichteten Deckgläsern ausgesät. Einen Tag später wurden die Koloniefragmente hinzugefügt und für sechs bis sieben Tage kultiviert und anschließend gemessen. Zur Kontrastierung wurden die Zellen mit $2 \mu\text{l/ml}$ Calcein AM (Zytosol) und $2 \mu\text{l/ml}$ Hoechst (Nukleus) markiert. Die Farbstoffe wurden in das Kulturmedium pipettiert und für 20 min inkubiert.

3.1.3 Probenpräparation zur Lebend-/Tod-Färbung

Hier wurden die hMSC mit konstanter Zelldichte von $5 \cdot 10^4$ auf einem *ibidi* Substrat ausgesät. Vor der Kryokonservierung wurden sie mit einem xenofreien Kryomedium mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 K/min auf -80 °C abgekühlt und für 24h in einen Kryotank eingelagert. Zum Auftauen der Proben wurden diese für 2 min bei -37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Tropfenweise erfolgte die Zugabe von 2ml Kulturmedium und die anschließende Abnahme des Überstandes. Daraufhin wurden die Zellen mit 2ml PBS(-/-) gewaschen und es erfolgte die Zugabe der Färbelösung (Calcein, Fluoresceindiacetat (FDA), Ethidiumbromid, Ethidiumhomodimer). Nach 5 min Inkubation wurde die Färbelösung abgesaugt und wieder PBS (-/-) hinzugegeben.

3.2 Tieftemperatur Laser-Scanning-Mikroskopie

3.2.1 Aufbau und Funktion

Das in meiner Master-Arbeit *Neue Anwendungen für Ultrakurzpuls Laser in der Biotechnologie: Intragel Nanostrukturierung und Tieftemperatur Multiphotonenmikroskopie* evaluierte Verfahren zur Multiphotonen Kryomikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem neuen Setup integriert. Die Basis zur Mikroskopie war hier ein kommerziell erhältliches Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta-NLO. Dieses besteht aus einem inversen Stativ mit einer Quecksilberdampfampe zur Epi-Fluoreszenzmikroskopie. An dieses Stativ ist eine Scanner- und Filtereinheit, die so genannte Meta-Einheit, zur Laser-Scanning-Mikroskopie adaptiert. Die Meta-Einheit enthält diverse Strahlteiler zur Anregung verschiedener Spektralbereiche sowie die zugehörigen Filtersätze. Zur Signaldetektion in Reflexionsrichtung ist das Mikroskop mit zwei Photomultiplier, einem 32 Kanal Detektor zum Spectral Imaging und einem Faserausgang ausgestattet. In Transmissionsrichtung verfügt es über einen weiteren PMT. Als Strahlquelle zur Multiphotonenmikroskopie diente ein von 680-1080nm durchstimmbarer Ti:Saphir Femtosekunden-Laser (Coherent Chameleon). Als interne Laser zur Fluoreszenzmikroskopie stehen bei diesem System ein Ar-Ionen Laser mit mehreren Argon-Linien (458nm, 488nm und 514nm) und zwei HeNe-Laser (543nm und 633nm) zur Verfügung. Zur Kontrolle der Laserleistung verfügt das System über zwei Akusto-Optische-Modulatoren. Zur Strahlfokussierung wurde ein Zeiss 40x 1.3NA Objektiv verwendet.

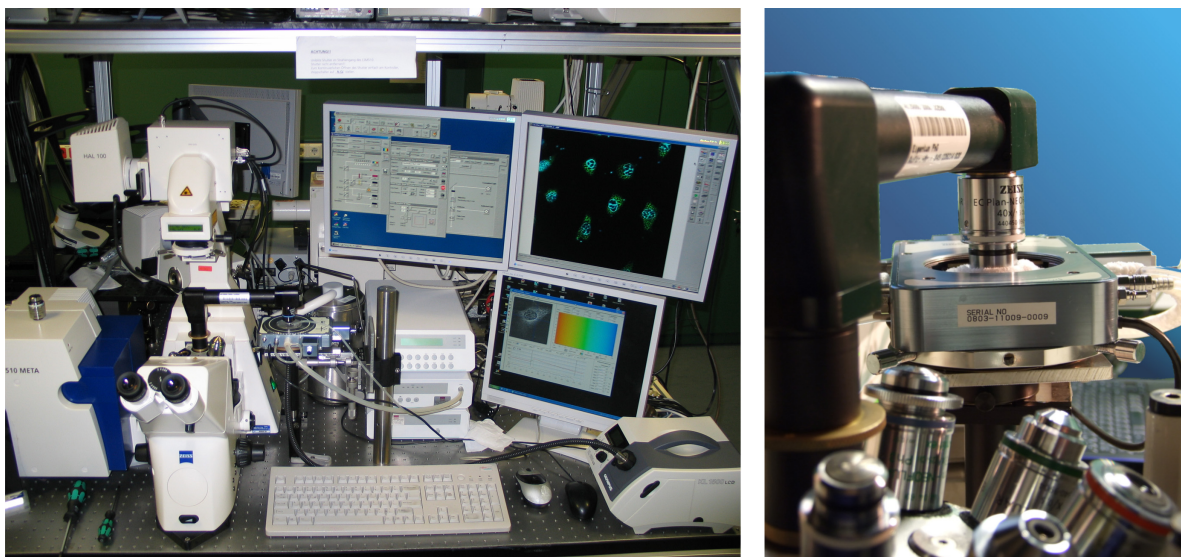


Abb. 3.1: Tieftemperatur-Laser-Scanning-Mikroskopie: a) Setup zur Multiphotonen Laser Scanning Mikroskopie b) Detailaufnahme Objektivinverter (LSM-Technologies) mit angekoppeltem Kryotisch (Linkam Scientific)

Zum Abkühlen der Proben wurde die Kryokammer Linkam MDS 600 genutzt. Der Probenhalter ist ein mit flüssigem Stickstoff durchspülter Silberblock, welcher mit einer Kühlrate von bis zu $130\text{ K}/\text{min}$ auf flüssig Stickstoff Temperatur abgekühlt werden kann. Die Tempera-

tur wird hierbei von einem in den Silberblock implementierten Sensor online gemessen. Zur Verwendung dieser bauartbedingt nur aufrecht einsetzbaren Tieftemperaturkammer wurde ein Objektivinverter (LSMTech, USA) verwendet (siehe Abbildung: 3.1 b)). Hierbei handelt es sich um eine Strahlführungseinheit, die es erlaubt, in einer um 180° gedrehten Ebene eine konjugierte Bildebene zu erzeugen. Somit wird aus einem inversen Mikroskop ein aufrechtes Stativ, das den Betrieb des LSM 510 NLO in Kombination mit der Linkam Kammer ermöglicht.

3.2.2 Bildauswertung LSM

Zur Bildauswertung wurde die von Zeiss mitgelieferte Software LSM Imagebrowser verwendet. Zum Hervorheben morphologischer Kontraste wurden zur Verbesserung der Druckqualität der Kontrast und die Helligkeit, welche standardmäßig auf 50 Prozent stehen, einheitlich für alle Bilder auf jeweils 70 Prozent des Ausgangsbildes der Rohdaten hochgesetzt. Die weitere Datenanalyse und Visualisierung wurde in ImageJ und Igor Wavemetrics durchgeführt. Hierfür wurden die Rohdaten im ASCII-Format exportiert und in Igor Wavemetrics zur Weiterverarbeitung importiert.

3.3 Tieftemperatur Raman-Spektroskopie und Scanning-Raman-Mikroskopie

3.3.1 Setup

Hierzu wurde ein Laser-Scanning-Mikroskop entwickelt und aufgebaut, welches eine breite Palette an spektralen Informationen detektieren kann. Zur Raman-Spektroskopie wurden zwei Laser integriert. Ein Coherent Compass 315m (150 W) mit einer zentralen Emissionswellenlänge von 532 nm und ein NIR-Laser der Toptica Xtra (500 W) mit einer Wellenlänge von 785 nm. Diese zwei Strahlquellen wurden in ein aufrechtes Eclipse LV100-UDM-Mikroskopstativ mit zusätzlicher Transmissionsbeleuchtung eingekoppelt. Das Mikroskop wurde zur Strahlführung mit einem Nikon Epi-Illuminator 2 ausgestattet, aus dem die werksseitig montierten Optiken entfernt wurden. Hierfür wurden die Strahlen der Wellenlänge 532 nm und 785 nm in einem Strahl überlagert. Um die Laserstrahlen in einem Strahlengang zu vereinen, wurde der 785 nm Laserstrahl von einem Spiegel reflektiert und dann mittels eines dichroitischen Strahlteilers überlagert (siehe Abbildung: 3.2). Zur Strahlaufweitung wurden zwei Linsen mit einer Brennweite von $f=30$ mm und $f=100$ mm verwendet. Hieraus ergibt sich eine Aufweitung im Verhältnis 3:1.

Zum Anschluss einer CCD-Kamera und eines Spektrometers im Reflexionsstrahlengang wurde zusätzlich noch eine Ebene (Y-IDP Double-Port; Nikon Instruments, Japan) integriert. Da der Detektionsbereich dieses Setups ein Spektrum von 532 nm bis ca. 1100 nm abdeckt, konnte keine achromatische Fokalebene der Kamera mit der Strahlaufweitung für alle Laser gewährleistet werden. Um die wellenlängenabhängigen Brechungsindizes des Strahlauf-

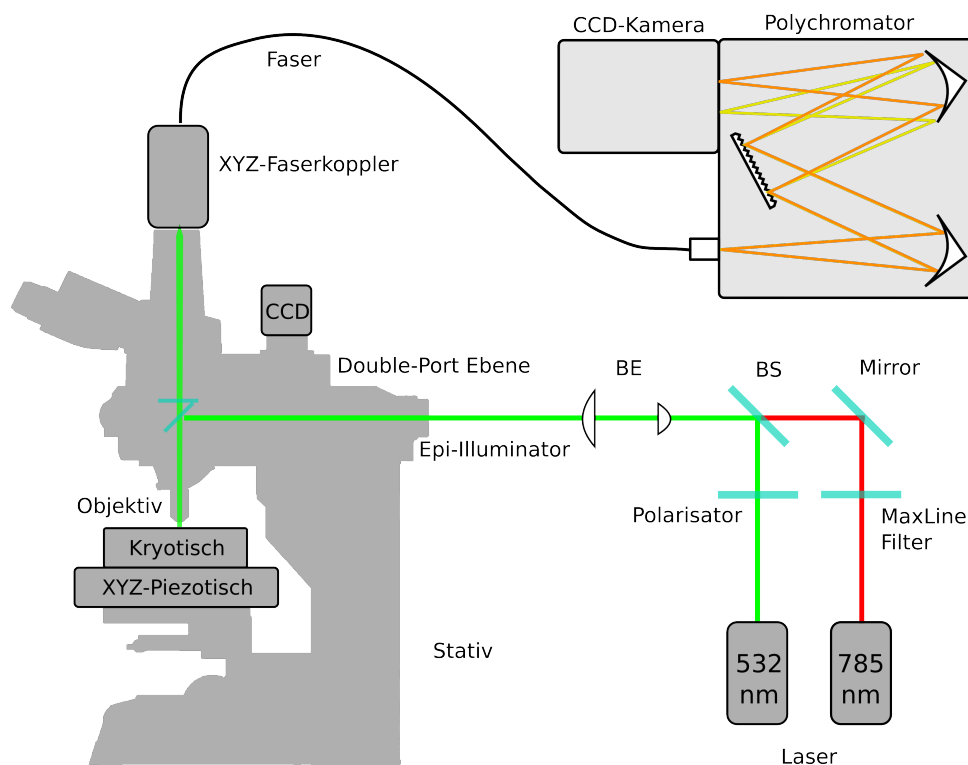


Abb. 3.2: Prinzipskizze des entwickelten Mikroskops zur bildgebenden Tieftemperatur-Raman-Spektroskopie basierend auf einem Nikon Mikroskop mit eingebauten Strahlengang für den Anregungslaser und dem Detektionsstrahlengang mit angekoppeltem Spektrometer (Polychromator und CCD-Kamera).

weitere zu kompensieren, wurde eine lineare Verfahrmöglichkeit einer Aufweitungslinse in axialer Strahlrichtung implementiert. Mit deren Hilfe können die einzelnen Fokalebene auf die Kamera oder das Okular abgestimmt werden. Das Stativ verfügt über zwei auf die jeweiligen Laser abgestimmten Filterwürfel, welche die individuellen Laserwellenlängen reflektieren. Die zu detektierenden Signale werden anschließend durch einen Langpassfilter vom Streulicht des Lasers getrennt. Danach wird das Signal mit einem Freistrahl-Faser-Koppler in eine $50\ \mu\text{m}$ Multimode Faser, die gleichzeitig als Lochblende fungiert, eingekoppelt. Diese führt zur Detektionseinheit, die aus einem Shamrock 303i Polychromator und einer i-Dus Zeilenkamera mit $1024 \times 128\ \text{Pixel}^2$ besteht. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses kann der Dunkelstrom des CCD Sensors reduziert werden, indem man selbigen durch eine thermoelektrische Kühlung bis auf $-65\ ^\circ\text{C}$ abkühlt. Je nach Anregungslaser kann der Lichtwellenleiter justagefrei ausgetauscht werden. Um sich das konfokale spektrale Signal der Probe auch bildgebend zunutze zu machen, wurde ein Scanner in das Setup integriert. Da erste Messungen mit einem akzeptablen Signal-zu-Rausch Verhältnissen eine Aquisitionszeit von 50 ms und mehr erforderten, wurde hier ein Sample Scanner integriert, der stabil mehrere Millisekunden auf einer Position verweilen kann. Dieser bewegt die Probe relativ zum fokussierten Laserstrahl. Das Sample-Scanning bietet zudem den Vorteil, dass die potentiellen Abbildungsfehler wie sphärische Aberration, Astigmatismus und Koma, die beim

Beam-Scanning auftreten, vermieden werden. Zum lateralen und axialen Scannen der Probe wurde der Scantisch mit drei achsunabhängigen Piezo-E-621 Servocontrollern in das Stativ integriert. Die Ansteuerung der Piezo-Servocontroller erfolgt hierbei digital, wobei eine individuelle Anpassung an das Probengewicht über die einzelnen PID-Regler manuell erfolgte. Die in diesem Setup realisierte Kombinationsmöglichkeit der konfokalen spektralen Detektion mit einer durch den Probenscanner implementierten, orts aufgelösten Datenaufzeichnung ermöglicht somit die Akquisition bildgebender Informationen aus allen drei Raumrichtungen der Probe.

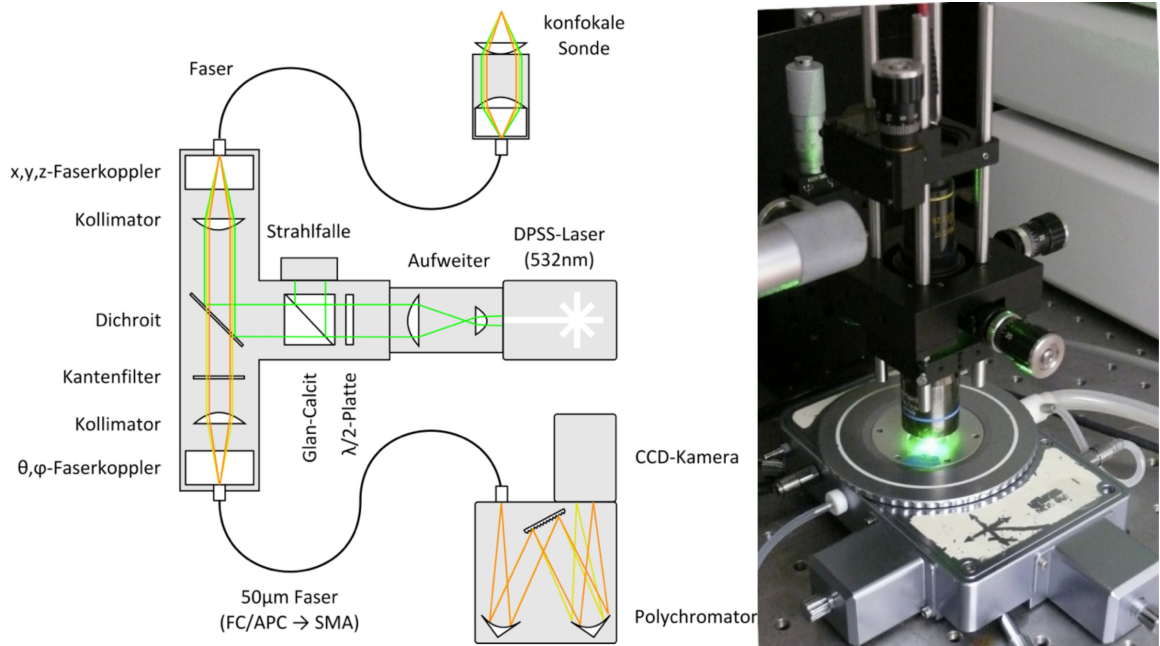


Abb. 3.3: Fasersetup zur Raman-Spektroskopie mit einer konfokalen Sonde: a) technisches Schema des Laboraufbaus b) Detailaufnahme der konfokalen Sonde im Einsatz an der Linkam Kryokammer.

Ausgehend von diesem Gerät wurde eine vereinfachte Variante zur Punktmessung in kompakter Bauweise aufgebaut (Abbildung: 3.3). Für dieses Setup wurde ebenfalls der Coherent Compass 315M genutzt. In der zentralen Strahlweiche wurde durch die Kombination einer $\lambda/2$ -Platte mit einem Glan-Calcit-Würfel eine Leistungsregulierung für den aufgeweiteten Strahl realisiert. Der Strahl wurde über einen dichroitischen Strahlteiler in einen Faserkoppler umgelenkt und in einen Lichtwellenleiter eingekoppelt. Bei dem Lichtwellenleiter, welcher das Anregungslicht zur Sonde und das emittierte Licht zurück in die Strahlweiche führt, musste ein geeigneter Kompromiss zwischen effizienter Optik sowie spektraler und räumlicher Auflösung gefunden werden. Die konfokale Sonde besteht aus einem SMA Faserkoppler mit Kollimations- und Fokussieroptik. Von der anfänglichen Verwendung von $50\ \mu\text{m}$ musste während des Entwicklungsstadiums dieses Setups Abstand genommen werden: Bei diesen Fasern hatte sich gezeigt, dass fluoreszierende Verunreinigungen im Fasermantel zu bisweilen inakzeptablen Hintergrundsignalen geführt hatten. Daher wurde eine $1000\ \mu\text{m}$ Faser verwendet, da nur diese eine fluoreszenzfreie Datenaquisition gewährleistete. Der anfänglich erwartete

Einfluss der Raman-Streuung in der Beleuchtungsfaser, welcher durch ein Referenzspektrum rechnerisch hätte eliminiert werden können, stellte sich als vernachlässigbar heraus. Für die Verbindung zwischen der Strahlweiche und dem Spektrometer wurde eine $50\ \mu\text{m}$ FC/APC Faser verwendet, da das Laserlicht vom Langpassfilter zurückgehalten wird und nur das frequenzverschobene Probensignal in die Faser gekoppelt wurde. Diese Faser wurde mit einem SMA-Stecker an den zuvor beschriebenen Shamrock 303i-Polychromator gekoppelt.

3.3.2 Methoden zur Auswertung

Um die Bedienung der breiten Anwendungsmöglichkeiten der entwickelten Mikroskopieplattform in eine möglichst benutzerfreundliche Umgebung einzubinden, wurde eine entsprechende graphische Benutzeroberfläche (Graphic-User-Interface, GUI) programmiert. Als Softwareumgebung wurde hierfür die Entwicklungsumgebung Labview (National Instruments, USA) verwendet. Die Entwicklungsumgebung LabView bietet den Vorteil, dass die von den Herstellern mitgelieferten bzw. auch kommerziell erhältlichen Zusatztreiber (ActiveX-Steuerelemente) zur Ansteuerung der Geräte in die Umgebung importiert werden können. Sie ermöglichen somit einen Zugriff auf alle optionalen Einstellungsmöglichkeiten des Polychromators der CCD-Kamera und des Piezo-Scanners.

Das programmierte GUI besteht aus acht Gruppen mit verschiedenen Unterfunktionen (siehe Abbildung: 3.4 a)-h)). Im ersten Feld (siehe Abbildung: 3.4 a)) werden die an den Rechner angeschlossenen Peripheriegeräte initialisiert. Diese bestehen aus den drei Piezo-Servocontrollern (x,y,z), dem Polychromator (Shamrock) und der CCD-Kamera (iDus). Die Rückmeldung über die erfolgreiche Initialisierung wird ebenfalls in diesem Feld durch das Aufleuchten der entsprechenden Kontrolllampen signalisiert. Das Aufleuchten der Kontrolllampe *Idle* (siehe Abbildung: 3.4 a)) zeigt, dass vom Benutzer gestartete Prozesse abgeschlossen sind und dass neue gestartet werden können. Die am Polychromator aktuell eingestellten Gitterpositionen (Dispersionsbereich) werden im darunter liegenden Feld (siehe Abbildung: 3.4 b)) angezeigt (minimal, mittlere und maximal detektierte Wellenlänge) und können bei Bedarf über Polychromator Settings modifiziert werden. Die Funktion *Polychromator Settings* ermöglicht die Veränderung der Einstellungen des Spektrometers in einem Unterprogramm. Hierfür wurden die von Andor erhältlichen Active-X Steuerelemente zur softwareseitigen Einstellung des Spektrometers in die Labview-Software integriert und für unsere Anwendungen optimiert. Dieses Unterprogramm erlaubt im Menü *Gratings* (siehe Abbildung: 3.5) die Auswahl der verschiedenen Gitter (300 lines/mm Blaze 500, 1200 lines/mm Blaze 500 und 300 lines/mm Blaze 1000) zur spektralen Aufweitung und die Feinjustage des Detektors. Im Untermenü *Wavelength* (siehe Abbildung: 3.5) kann der Dispersionsbereich, der von der CCD-Kamera des Spektrometers detektiert werden soll, gewählt werden. Im Untermenü *Shutter* (siehe Abbildung: 3.5) kann der hardwareseitig installierte Shutter geöffnet und geschlossen werden. Der Button *EXIT* schließt das Unterprogramm *Polychromator Settings* und der Anwender befindet sich wieder im Hauptprogramm. Dort kann mit der Option *Set CCD Temp.* die Temperatur des CCD-Zeilendetektors eingestellt werden. Die im Rahmen der Arbeit verwendete

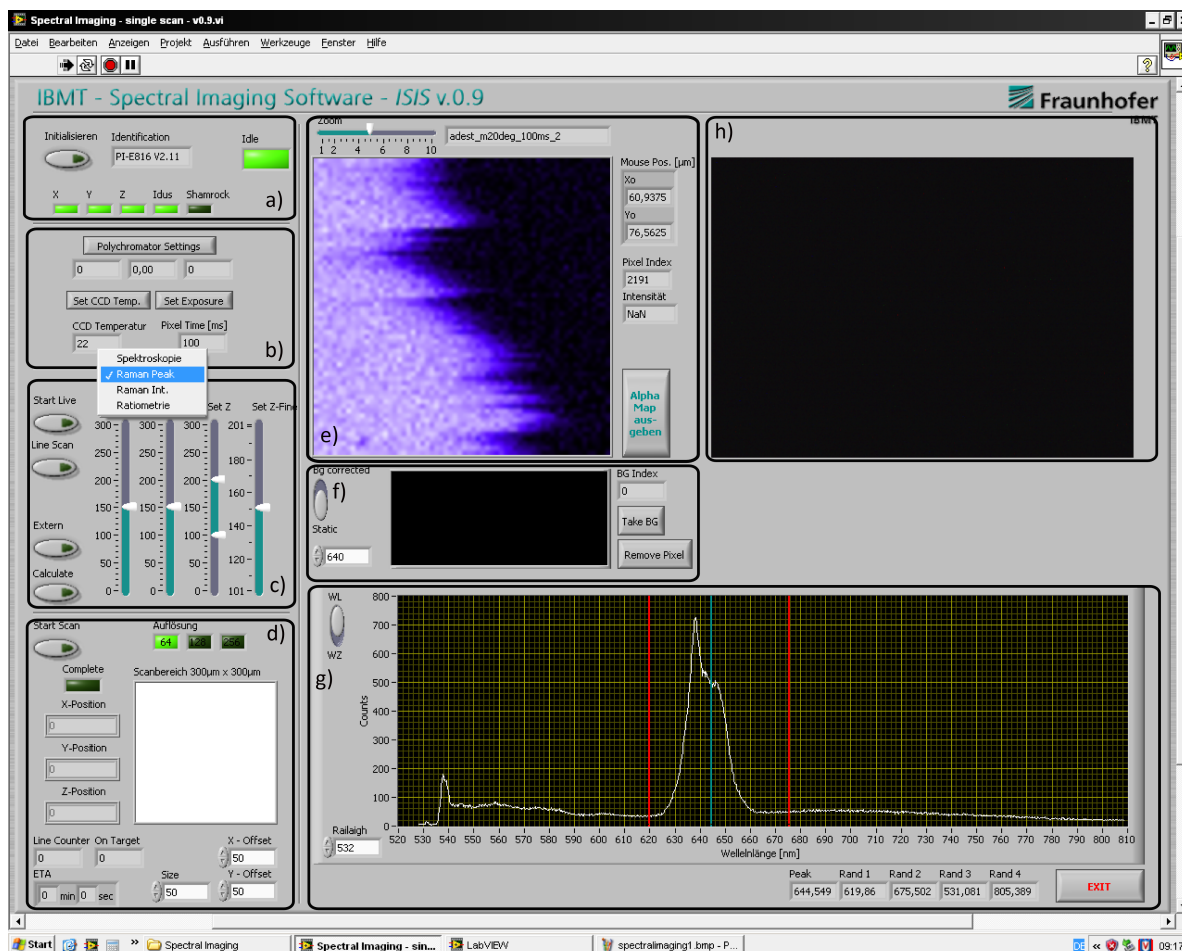


Abb. 3.4: Graphic-User-Interface der entwickelten Software IBMT-Spectral Imaging Software (ISIS) zur Ansteuerung und Bildakquisition mit dem Tieftemperatur Raman-Mikroskop.

Temperatur betrug $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$. *Set Exposure* erlaubt die Änderung der Akquisitionszeit für die einzelnen Spektren [ms]. Im Menüblock (siehe Abbildung: 3.4 c)) kann durch die ersten beiden Schieberegler *Set x* und *Set y* die xy-Position des Fokus eingestellt werden. Zum genauen Verfahren der Z-Position wird diese im Bereichs-Auswahl-Fenster *Set z-Fine* eingestellt. Das in dieser Option angezeigte obere und untere Limit wird in *Set z* festgelegt. Der *Start Live*-Button startet die Darstellung der fokalen Spektren im Ausgabefenster in Abbildung: 3.4 g) mit den in Abbildung: 3.4 b) definierten Einstellungen. Ferner bietet die Software eine *Line-Scan* Option. Diese summiert die Einzelspektren der Linie in x-Richtung zu einem Gesamtspektrum auf und gibt es im Ausgabefenster aus. Auf die weiteren Funktionen dieses Blocks *Extern* und *Calculate* wird später eingegangen.

Die Definition des quadratischen Scanfeldes und seiner Auflösung (64^2 , 128^2 und 256^2 Pixel^2) erfolgen im nächsten Eingabeblock von Abbildung 3.4 d). Im Eingabefeld *Size* wird die Größe des Scanfeldes in μm eingegeben. Die genaue Position des Scanfeldes wird in *x-Offset* und *y-Offset* definiert. *Start Scan* startet den Scanprozess. In einem Eingabefenster wird der Anwender aufgefordert den Speicherort und Dateinamen einzugeben. Die Felder *x-Position*,

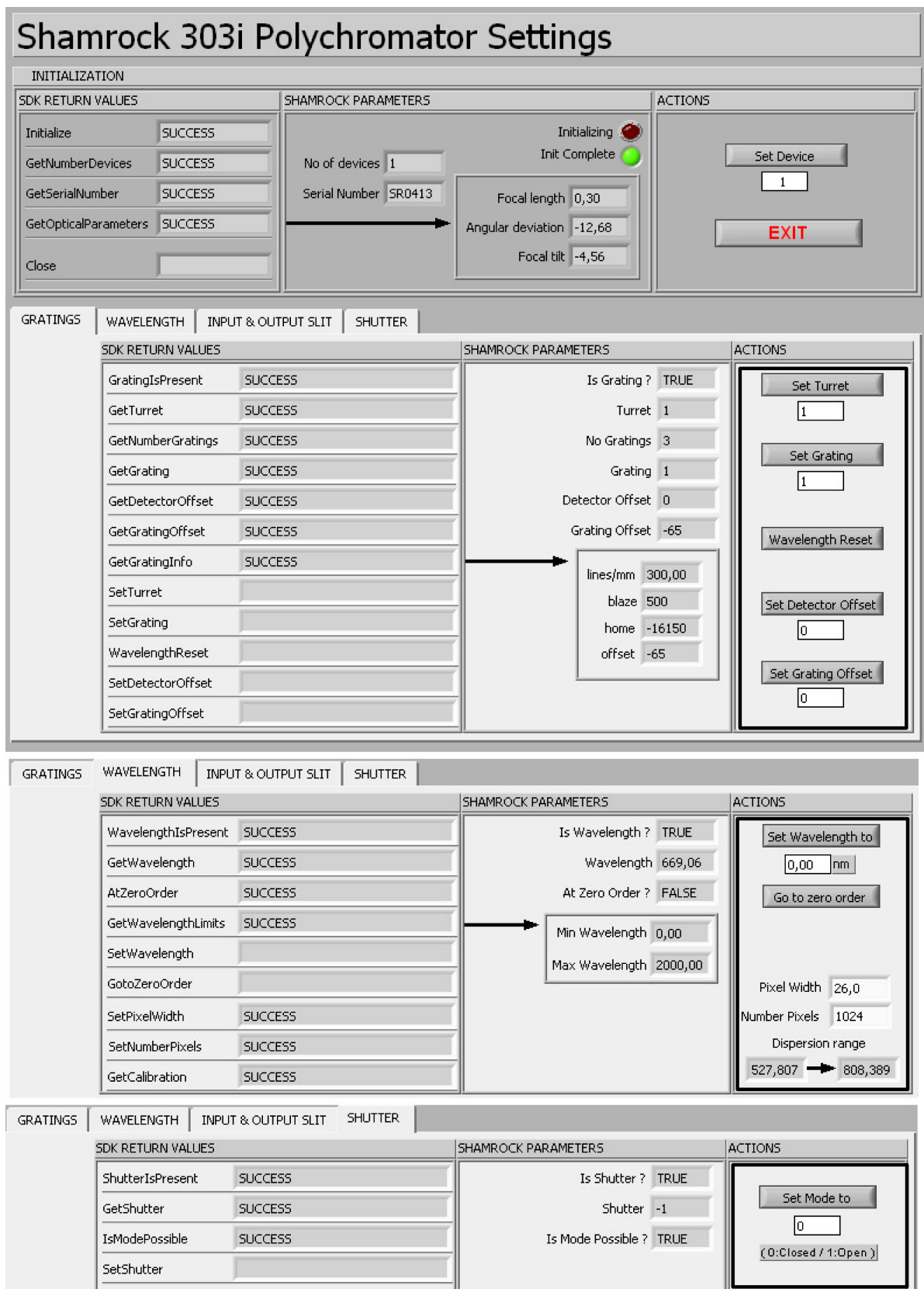


Abb. 3.5: Graphic-User-Interface der Software zur Ansteuerung des Polychromators.

y-Position und *z-Position* geben die aktuelle Position während des Scanvorgangs an. Der *Linecounter* zählt die Anzahl der gescannten Linien und visualisiert deren Anzahl. Die Anzeige *On target* gibt Aufschluss, wie gut die elektronischen Hoch- und Tiefpass-Filter der x-Achse auf die vom Scantisch zu bewegende Masse eingestellt sind. Die Werte hierfür sollten sich zwischen 0 bis 10 bewegen (Justage auf kleiner 2). Im Ausgabefeld *ETA* (siehe Abbildung: 3.4 d)) wird nach Ablauf der ersten Zeile die aktuell verbleibende Scanzeit angezeigt. Die aktuelle Position wird im Ausgabefenster des Blockes graphisch angezeigt. *Complete* signalisiert dem Benutzer den abgeschlossenen Scanprozess und das erfolgreiche Speichern der Messdaten. Die automatische Auswertung der Messdaten (Integral über den gesamten Dispersionsbereich) wird in Abbildung: 3.4 e) graphisch automatisch dargestellt. Der *Zoom* Slider ermöglicht ein Skalieren des Bildes. In dem Textfeld daneben wird der Name der gespeicherten Datei dargestellt. Ein Bewegen der Maus mit einem Drücken der linken Maustaste über dieses Bild aktualisiert pixelbezogen die jeweiligen, den Pixel zugehörigen Spektren im Ausgabefenster von 3.4 g). In *Mouse Pos.[μm]* wird die aktuelle Position der Maus in den Bildkoordinaten in x- und y-Richtung dargestellt. Der *Pixelindex* ist der Index für das jeweilige Spektrum in der Speicherdatei. In dieser werden die Spektren in einer Matrix mit 1024 Zeilen und 64^2 , 128^2 und 256^2 Spalten (je nach Auflösung) abgelegt. *Intensität* zeigt den Intensitätswert des jeweiligen Pixels auf dem sich der Mouse Cursor befindet. *Alpha-Map ausgeben* ermöglicht das Speichern der Intensitätsmatrix in einer TXT-Datei. Dem Anwender stehen zur weiteren Ausgabe solcher Alpha-Maps mehrere Auswerteverfahren zur Verfügung. Diese können im Drop Down Menü von 3.4 c) ausgewählt werden. Eine genaue Beschreibung der zugrundeliegenden Algorithmen erfolgt im Ende dieses Kapitels. Zur partiellen Auswertung der Spektren bietet diese Software die Möglichkeit, durch Schieberegler im Ausgabefenster 3.4 g) virtuelle Filter zu setzen. Die Auswertung erfolgt in dem Bereich zwischen den Filtern nach der Auswahl der im Drop-Down-Menü gewählten Methode. Das Betätigen von *Discard* 3.4 g) und von *Calculate* 3.4 c) berechnet das Bild, anhand der in 3.4 h) gesetzten, virtuellen Filter und der in 3.4 c) gewählten Methode, neu. Zusätzlich kann im Postprocessing noch ein homogener Hintergrund (Abbildung: 3.4 f)) eingegeben werden. Ferner bietet sich auch die Möglichkeit ein Hintergrund-Spektrum (Background) abzuziehen. Dieses wird mit dem Maus-Cursor im Bild ausgewählt und durch *Take Background* als zu subtrahierender Hintergrund ausgewählt. Die Option in Abbildung 3.4 f) *BG corrected* aktiviert die Subtraktion des gewählten Hintergrundes für jedes Pixel bei der nächsten Neuberechnung des Bildes über *Calculate* (Abbildung: 3.4 c)). Einzelne Spektren können auch durch *Save Spec.* in einer TXT-Datei gespeichert werden. Zur optischen Kontrolle der Probenposition bietet die Software die optionale Anschlussmöglichkeit einer Kamera in Transmissionsrichtung. Die Darstellung des Live-Bildes erfolgt in 3.4 h).

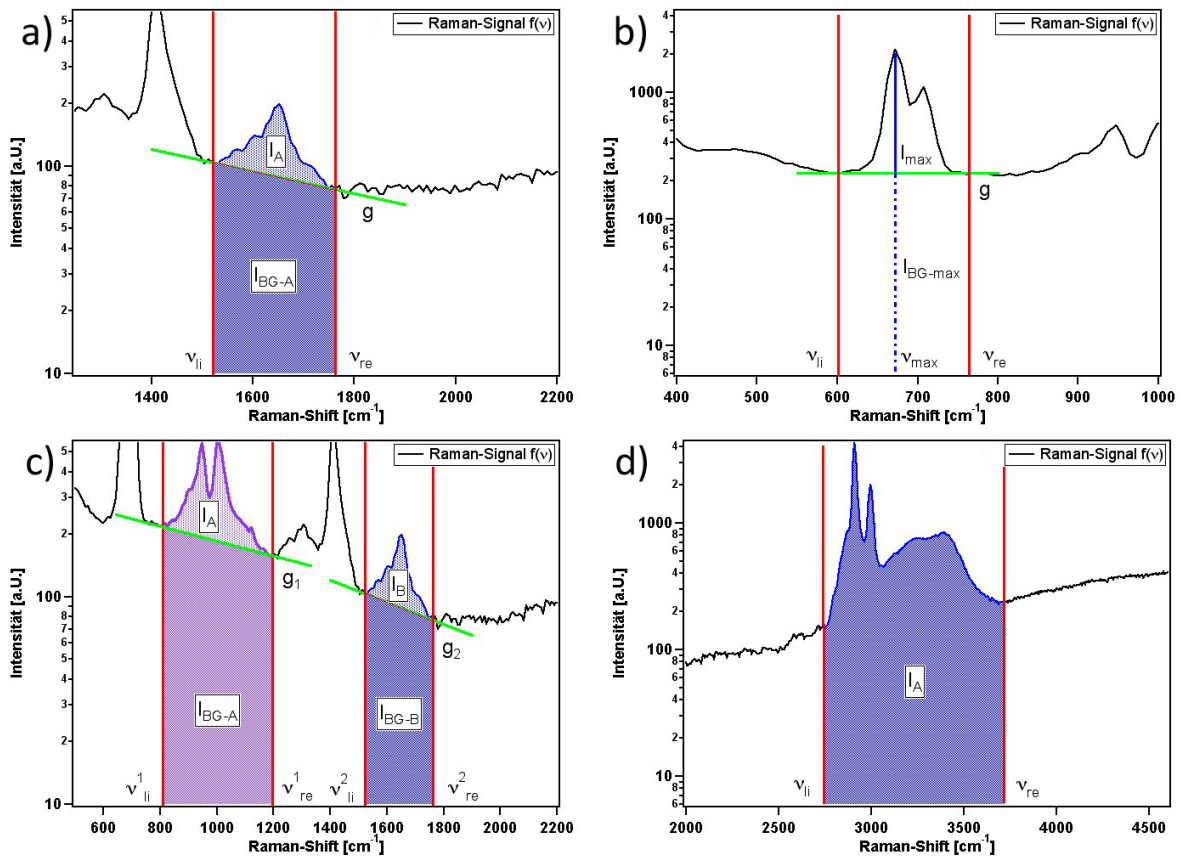


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der vier Auswertalgorithmen der entwickelten Software ISIS a) Raman Integral b) Raman Band c) Ratiometrie und d) Spektrometrie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Option jedoch nicht genutzt, da durch die Verwendung des Kühlblocks eine Probenbeleuchtung in Transmissionsrichtung nicht möglich war. Um den Anforderungen an eine bildgebende Auswertung für die verschiedenen spektroskopischen Untersuchungsmöglichkeiten gerecht zu werden, wurden vier unterschiedliche Auswertungsmöglichkeiten mit verschiedenen Kontrastmechanismen in das Programm integriert (siehe Abbildung: 3.4 c)). Zur Verfügung stehen hier (siehe Abbildung: 3.4 c)) die Methoden *Raman Integral*, *Raman Band*, *Ratiometrie* und *Spektrometrie*, welche im Auswahlfeld von Abbildung: 3.4 c) gewählt werden können. Die Raman-Mikroskopie beruht auf der ortsaufgelösten Abbildung der Intensitäten einer spezifischen Raman-Bande. Die Schwingungsamplitude ist proportional zur Konzentration des Stoffes ($f(\nu) \propto c_x$). Die Auswertung erfordert eine Extraktion der Bande aus dem Spektrum mit zugehöriger Intensität oder zugehörigem Integral. Die Frequenzverschiebung (Raman-Shift [ν]) des gestreuten Lichts wird hierbei immer in Wellenzahlen ν [cm^{-1}], relativ zur Rayleigh Wellenlänge des Anregungslichtes, über die Intensität $f(\nu)$ aufgetragen. Da bei Proben die Raman-Banden von Fluoreszenz-, Mediums- oder Substrat-Hintergründen überlagert werden können, müssen diese subtrahiert werden, um eine frequenzspezifische Intensitätsberechnung der Raman-Bande zu gewährleisten. Hierfür können die einzelnen Schwingungsbanden in der Software durch die individuelle Positionierung der Begrenzungscursor ν_{li} und ν_{re} definiert werden. Für diesen Zweck bietet die *Raman In-*

tegral Methode (siehe Abbildung: 3.6 a)) eine bandenspezifische Integrationsmöglichkeit mit Hintergrundunterdrückung. In dem zugrundeliegenden Algorithmus wird über einen durch ν_{li} und ν_{re} definierten Bereich des Spektrums ($f(\nu)$) integriert.

$$I_{RamanInt} = I_A - I_{BG-A} = \int_{\nu_{li}}^{\nu_{re}} f(\nu) d\nu - \int_{\nu_{li}}^{\nu_{re}} g(\nu) d\nu \quad (3.1)$$

Zur Berechnung der Intensität der Raman-Bande $I_{RamanInt}$ (I_A) wird hierbei zuerst das Integral zwischen den Begrenzungen ν_{li} und ν_{re} gebildet (siehe Gleichung:3.1). Von diesem wird der zum Hintergrund gehörende Teil I_{BG-A} des Integrals subtrahiert. Dieser wird durch Fläche I_{BG-A} unterhalb der Geraden $g(\nu)$, die durch die Schnittpunkte des Spektrums ($f(\nu)$) mit den Begrenzungslinien ν_{li} und ν_{re} bestimmt ist, definiert. Die errechneten Intensitätswerte $I_{RamanInt}$ der ausgewählten Frequenzbereiche stellen in der bildgebenden Auswertung die Helligkeitswerte der Pixels in der Bildmatrix dar. Bei den im Bild dargestellten Helligkeitswerten bildet das untere Helligkeitslimit den niedrigsten Messwert der Bildmatrix und der Maximalwert den höchsten. Die Kontrastierung kann nachträglich angepasst werden. Da sich die Schwingungsbanden verschiedenster im Fokalvolumen befindlicher Stoffe in ihrer Frequenz überlagern können, wurde zur Analyse eine weitere Methodik, die *Raman Band* Auswertung, implementiert. Hierbei werden ebenfalls die einzelnen Schwingungsbanden durch die Begrenzungs-Cursor ν_{li} und ν_{re} limitiert.

$$I_{RamanBand} = I_{Band} = f(\nu_{max}) - g(\nu_{max}) \quad (3.2)$$

Durch einen dritten Cursor ν_{max} wird die Frequenz maximaler Amplitude einer Schwingungsbande ausgewählt und nur die Intensität bei der definierten Schwingungsfrequenz ($f(\nu_{max})$) extrahiert. Zur Unterdrückung des Hintergrundes wird der Funktionswert $f(\nu_{max})$ auf der Schnittgeraden $g(\nu)$, die durch die Schnittpunkte mit ν_{li} und ν_{re} definiert ist, berechnet. Dieser wird dann von $f(\nu_{max})$ und von der Gesamtintensität abgezogen. Die daraus resultierenden Werte $I_{RamanBand}$ beschreiben die Intensität einer spezifischen Schwingungsfrequenz eines ausgewählten Frequenzbandes (siehe Gleichung: 3.2). Diese wird ebenfalls zur bildgebenden Auswertung dem Helligkeitswert eines Pixels zugeordnet. Da zur Auswertung von Versuchen oftmals mehrere Messgrößen relevant sind, bedarf es hierbei einer ratiometrischen Betrachtung der Größen. Diese Betrachtungsart ermöglicht die äußeren Einflüsse wie Streuung und Absorption der Anregungsstrahlung auf das Gesamtspektrum, die zu Artefakten führen können, anzugleichen. Der für diese Analysemethode, die Ratiometrie, implementierte Auswertalgorithmus (siehe Abbildung: 3.6 c)) setzt die Integrale zweier begrenzter Schwingungsbanden ins Verhältnis.

$$I_{RatioAB} = \frac{I_A}{I_B} = \frac{\int_{\nu_{li}^1}^{\nu_{re}^1} f(\nu) d\nu - \int_{\nu_{li}^1}^{\nu_{re}^1} g_1(\nu) d\nu}{\int_{\nu_{li}^2}^{\nu_{re}^2} f(\nu) d\nu - \int_{\nu_{li}^2}^{\nu_{re}^2} g_2(\nu) d\nu} \quad (3.3)$$

$$I_{RatioBA} = \frac{I_B}{I_A} = \frac{\int_{\nu_{li}^2}^{\nu_{re}^2} f(\nu) d\nu - \int_{\nu_{li}^2}^{\nu_{re}^2} g_2(\nu) d\nu}{\int_{\nu_{li}^1}^{\nu_{re}^1} f(\nu) d\nu - \int_{\nu_{li}^1}^{\nu_{re}^1} g_1(\nu) d\nu} \quad (3.4)$$

Anschließend wird wahlweise der Quotient aus I_A/I_B oder I_B/I_A gebildet (siehe Gleichung: 3.3 oder 3.4). Der errechnete Quotient bildet, analog zu den zuvor beschriebenen Methoden, den Helligkeitswert eines Pixels in der Bildmatrix. Zur Auswertung von Fluoreszenzaufnahmen wurde noch der Spektroskopiemodus eingebunden. Bei dieser Auswertemethode kann zum einen über das komplette Spektrum $\nu_{li} = \nu_{min}$ und $\nu_{re} = \nu_{max}$ integriert werden, zum anderen können virtuelle Bandpassfilter (siehe Abbildung: 3.6 d)) durch die individuelle Anordnung von ν_{li} und ν_{re} gesetzt werden. Die berechneten Intensitätsintegrale (siehe Gleichung: 3.6) werden über das gewichtete arithmetische Mittel (siehe Gleichung: 3.5) anschließend im Bereich des sichtbaren Spektrums farbcodiert in einer RGB Bild-Matrix visualisiert.

$$\bar{\lambda}_{gewArith} = \frac{\sum_{i=\nu_{li}}^{\nu_{re}} f(\nu_i) \cdot \nu_i}{\sum_{i=\nu_{li}}^{\nu_{re}} \nu_i} \quad (3.5)$$

$$I_{Spec} = \int_{\nu_{li}}^{\nu_{re}} f(\nu) d\nu \quad (3.6)$$

3.3.3 Quantitative Auswertung der Raman-Daten

Zur Analyse der zellulären Mikrochemie werden ratiometrische Raman-Messungen (siehe Gleichung: 3.3) zur Untersuchung von Nettoströmen (ΔV_i) über die Zellmembran genutzt. Durch diese Methode hat man die Möglichkeit, eine unbekannte Größe aus dem Verhältnis zu einer bekannten Größe zu berechnen. Ferner bietet diese Berechnung den Vorteil, dass man Signalfuktuationen durch Beleuchtungs- und Detektionsschwankungen ausschließen kann. Die Spektralen Messewerte I (I_A , I_B) sind nach Gleichung 3.3 hintergrundkorrigiert und werden als proportional zur Stoffmenge der Komponenten (Ramanintensität \propto Konzentration) im Fokalvolumen betrachtet. Die zu untersuchende Zelle mit einem temperaturabhängigen Volumen (V_Z) wird im sogenannten Grundzustand ($Zustand_1$) vor der Kryokonservierung

spektroskopisch vermessen. Dieser Zustand wird als Bezugspunkt ($Zustand_1$), für eine beliebige Anzahl n an Folgemessungen während der Kryokonservierung ($Zustand_{1+n}$), verwendet. Es wird eine homogene Verteilung der betrachteten Stoffe in der Zelle angenommen sowie veränderliche Partialvolumina verschiedener intrazellulärer Komponenten. Betrachtet werden die Messgrößen der ramanaktiven Stoffe Wasser (W), DMSO (D) und die zelluläre Bestandteile (O). Die konstante Größe in dem betrachteten System ist die Menge der zellulären Bestandteile (O), die die Membran nicht passieren (siehe Tabelle: 3.1). Wegen der zellulären Dehydratisierung wird ihre Konzentration als veränderliche Größe betrachtet. Durch äußere Veränderungen (wie ein Ansteigen der extrazellulären Osmolarität) geht ein Nettostrom (ΔV_i), der aus membranpermeablen Stoffen besteht, über die Membran in den Extrazellularraum. Daher werden die Mengen von Wasser und DMSO in der Zelle als veränderliche Größe angesehen. Zur quantitativen Bestimmung des Nettostromes wird die ratiometrische Messung in der Zelle während der Kryokonservierung ($Zustand_{1+n}$) ins Verhältnis zur Messung vor der Kryokonservierung ($Zustand_1$) gesetzt. Im Folgenden wird eine Analysemethodik zur Untersuchung der Nettoströme über die Membran hergeleitet.

	spektrale Messwerte	Menge in Probe	Stoffe
Menge \neq const.	A	i	Wasser (W), DMSO (D)
Menge = const.	B	j	zelluläre Bestandteile (O)

Tab. 3.1: Erläuterung der Indizes für quantitative Auswertung der Raman-Messungen.

Im Grundzustand ($Zustand_1$, Gleichung 3.7) ist der ratiometrische Faktor der Quotient aus den spezifischen Raman-Messungen (I_A, I_B , siehe Gleichung: 3.3). Diese sind in der Zelle (V_Z) gleich der stoffabhängigen Menge (n_i, n_j), beziehungsweise dem Volumen (V_i, V_j). Die Variable a_{ij} ist eine Proportionalitätskonstante für die individuellen Raman-Banden der betrachteten Komponenten. Die Indizes i und j stehen für die veränderlichen und unveränderlichen Mengen in der Probe. Dabei sind die veränderlichen zellulären Volumina V_i und die unveränderlichen Volumen V_j .

vor der Kryokonservierung:

$$Zustand_1 : R_{ij} = \frac{I_A}{I_B} = \frac{n_i/V_Z}{n_j/V_Z} = \frac{V_i/V_Z}{V_j/V_Z} = a_{ij} \cdot \frac{V_i}{V_j} \quad (3.7)$$

Während der Kryokonservierung ($Zustand_{1+n}$, Gleichung 3.8) ist der ratiometrische Faktor durch R'_{ij} beschrieben. Dieser ist der Quotient aus den veränderten Volumina (V'_i, V'_j). Diese Volumina V' sind die um den Nettostrom ($\Delta V_i, \Delta V_j$) reduzierten Anfangsvolumina (V_i, V_j). Dabei wird, wie in Tabelle 3.1 beschrieben, V_j als konstant betrachtet und in Gleichung 3.8 der Nettostrom $\Delta V_j = 0$ gesetzt.

während der Kryokonservierung:

$$\text{Zustand}_{1+n} : R'_{ij} = \frac{I'_A}{I'_B} = a_{ij} \cdot \frac{V'_i}{V'_j} = a_{ij} \cdot \frac{V_i - \Delta V_i}{V_j - \Delta V_j} \quad | \quad \Delta V_j = 0 \quad (3.8)$$

Ersetzt man in der Gleichung 3.8 den Term $a_{ij} \cdot V_i/V_j$ durch R_{ij} (siehe Gleichung: 3.7) und formt die Gleichung nach ΔV_i um so erhält man für die Berechnung des Nettostroms:

$$\Delta V_i = V_i \cdot \left(1 - \frac{R'_{ij}}{R_{ij}} \right) \quad (3.9)$$

Basierend auf der Gleichung 3.9 werden im Kapitel 4 zur Betrachtung der zellulären Mikrochemie die Nettoströme von Wasser und DMSO berechnet. Ein positives Vorzeichen zeigt einen Netto-Ausfluss und ein negatives Vorzeichen einen Netto-Einstrom.

3.4 Dynamische Tieftemperatur Differenzkalorimetrie

Zur Bestimmung der Schmelz- und Glasübergangstemperaturen der verwendeten Kryomedien wurde die dynamische Differenzkalorimetrie verwendet. Die dynamische Differenzkalorimetrie (engl: Differential Scanning Calorimetry, DSC) bietet die Möglichkeit zur Quantifizierung der abgegebenen und aufgenommenen Wärmemenge bei isothermer Aufheizung und Abkühlung der Probe. Das Messprinzip dieses thermischen Analyseverfahrens beruht auf der Detektion exo- und endothermer Prozesse, die mit den Phasenänderungen einhergehen. Hierbei werden zwei luftdicht verschlossene Alu-Probenkammern (Tiegel) in den Analyserraum (Ofen) des Geräts gestellt. Ein Tiegel (siehe Abbildung: 3.7 c)) enthält die zu analysierende Probe mit einem Volumen von 0.5-50 μl , der andere ist ein leerer Referenztiegel zum Vergleich der durch die Probenkammer aufgenommenen und abgegebenen Wärmemenge. Anschließend werden die Proben abgekühlt oder aufgeheizt und die zum isothermen Prozessverlauf notwendigen Wärmeenergien werden als Funktion über die Temperatur oder Zeit detektiert und aufgetragen.

3.4.1 Aufbau

Für die DSC-Messungen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Hyper DSC 8500 (Perkin Elmer, USA) mit Autosampler und integriertem Flüssigstickstoffkühler (Liquid Nitrogen Cooler, Perkin Elmer, USA) verwendet (siehe Abbildung: 3.7 a)). Die DSC 8500 verfügt über ein 2-Ofen-System. Hierbei handelt es sich um zwei unabhängige Kammern (siehe Abbildung: 3.7 b)) für Referenz und zu messende Probe. Die Messung des Wärmeflusses erfolgt durch das Leistungs-Kompensationsprinzip. Die beiden Platin-Öfen haben eine geringe thermische

Masse, wodurch sie sehr sensitiv auf thermische Änderungen reagieren, was kurze Reaktionszeiten und schnelle Kühlraten ermöglicht. Die Kühlrate dieses Systems ist abhängig von der voreingestellten Temperatur des Kühlelementes und kann bei isothermer Kühlung bis $750\text{ K}/\text{min}$ betragen. Optional verfügt das System über eine ballistische Kühlung (nicht isotherm), bei der Abkühlraten bis zu $2100\text{ K}/\text{min}$ erreicht werden können. Zur Verhinderung eines Vereisens der Ofenkammer wird diese während der Experimente kontinuierlich mit Stickstoff gespült. Der Messkopf hingegen wird mit Helium Gas gespült, da die Verwendung von Stickstoff in einem Temperaturbereich unter -100 °C zu Messfehlern führt. Das Gerät wurde im Rahmen der Messungen mit einer Betriebstemperatur von -160 °C gekühlt. Zur Kalibration des Systems wurden Indium und deionisiertes Wasser verwendet. Zur Vermeidung systematischer Messfehler, die durch die Probenpositionierung im Ofen hervorgerufen werden können, wurde zum Einlegen der Proben in die Öfen stets der Autosampler verwendet.

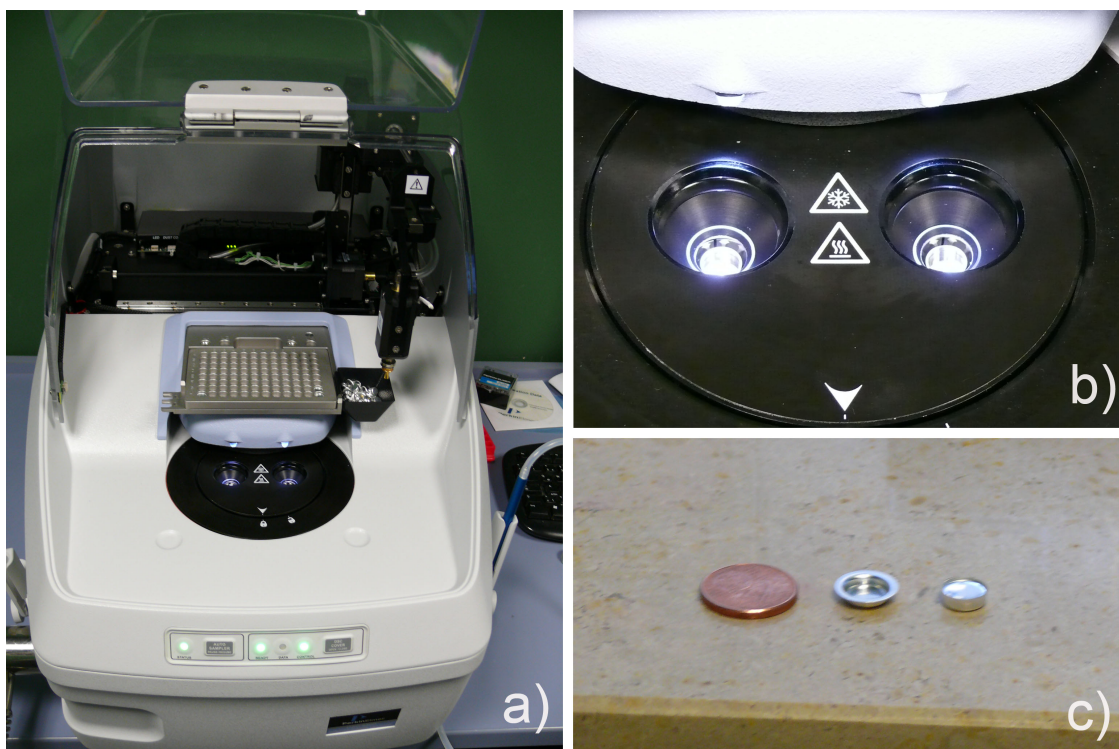


Abb. 3.7: Dynamisches Differenzkalorimeter: a) Perkin Elmer Hyper DSC 8500 mit Autosampler für 96 Tiegel; b) patentiertes 2 Ofensystem Perkin Elmer; c) $50\text{ }\mu\text{l}$ Proben-tiegel Unterschale (Mitte) verschlossene Ober- und Unterschale (links) im Vergleich zu 2-Cent-Stück (rechts).

3.4.2 Methoden zur Auswertung

In einer kalorimetrischen Messkurve (siehe Abbildung: 3.8 a)) wird der Temperaturverlauf in $^{\circ}\text{C}$ (Abszisse) über den Wärmestrom in mW (Ordinate) aufgetragen. Die Wärmestromgröße definiert sich durch die Abweichung der Probe gegenüber der Referenz. Da Phasenübergänge

endotherme bzw. exotherme Reaktionen sind, führen diese bei einem isothermen Verlauf zu einer Wärmeaufnahme oder Wärmeabgabe, die sich in einem Peak im Kurvenverlauf widerspiegelt. Zur Auswertung der kalorimetrischen Messkurven (siehe Abbildung: 3.8) wurde die von Perkin Elmer mitgelieferte Software Pyris Thermal Analysis Version 10.1.0.0412 (Perkin Elmer Inc., USA) verwendet.

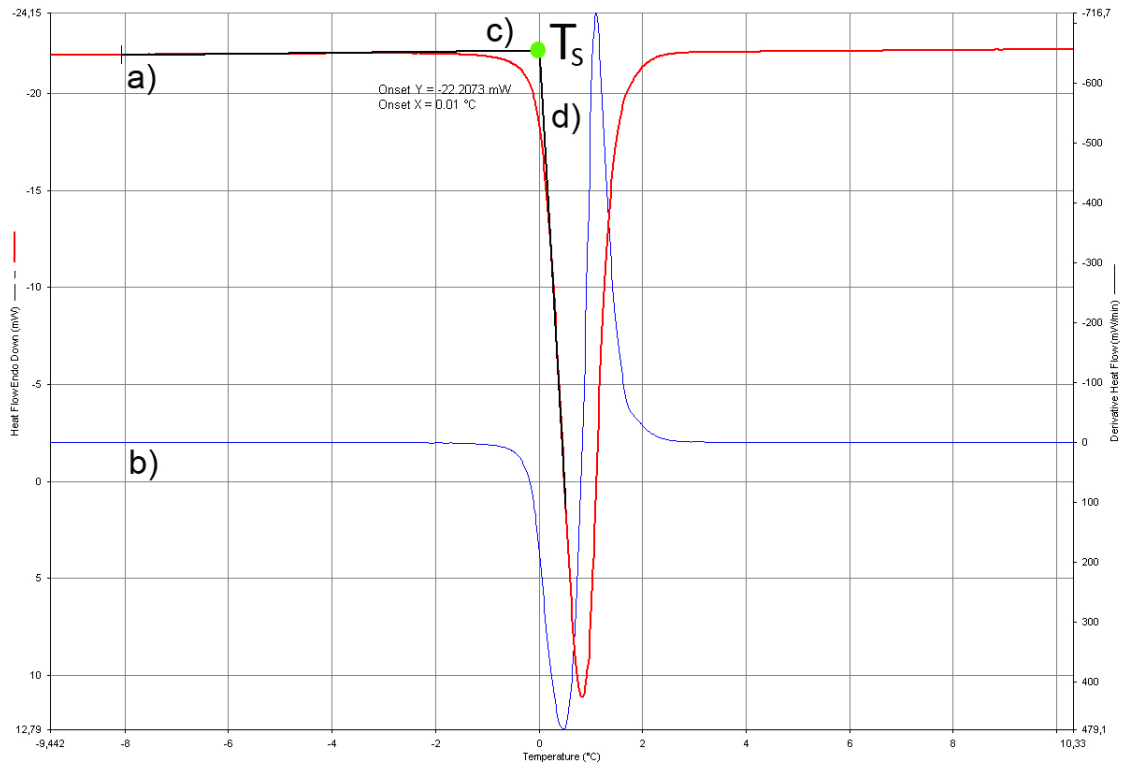


Abb. 3.8: Auswerteverfahren der Pyris-Software zur Bestimmung des Schmelzpunktes am Beispiel von Wasser: a) DSC-Messkurve (rot); b) 1. Ableitung der Messkurve (blau); c) 1. Onset-Tangente (schwarz); d) 2. Onset-Tangente (schwarz). Schmelzpunkt liegt am Schnittpunkt der Onset-Tangenten.

Die Bestimmung der Gefrier- und Schmelzpunkte der von dem Gerät aufgezeichneten Messkurven (siehe Abbildung: 3.8 a)) führte über die erste Ableitung (siehe Abbildung: 3.8 b)) der Messkurve. Da am Wendepunkt der Messkurve die erste Ableitung maximal ist, wird an dem Maximum der ansteigenden Flanke des endothermen Phasenübergangs beim Schmelzen eine Onset-Tangente (siehe Abbildung: 3.8 d)) angelegt. An dem linear verlaufenden Teil vor dem Schmelzpunkt wurde eine weitere Tangente (siehe Abbildung: 3.8 c)) angelegt. Der Schnittpunkt (siehe Abbildung: 3.8 grün) dieser beiden Onset-Tangenten definiert den Schmelzpunkt (T_S) der Probe.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Phasenverhalten von DMSO-haltigen Kryomedien

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Verfahrensevaluation zur Raman-Mikroskopie von Einfrierprozessen vorgestellt. Das Testsystem für die Anwendung der spektroskopischen Methoden zur Untersuchung des Phasenverhaltens sind wässrige und DMSO-haltige Lösungen. Ziel ist es, durch die Intensitäten charakteristischer Raman-Banden im Fokolvolumen eine orts aufgelöste Probenzusammensetzung vor und nach dem Phasenübergang zu messen und bildgebend darzustellen.

4.1.1 Phasenverhalten wässriger und DMSO-haltiger Kryomedien

Zur Evaluierung dieses in der Kryobiologie neuartigen Verfahrens und des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Raman-Mikroskops wurde eine Probe aus destilliertem Wasser eingefroren und langsam wieder aufgetaut. Am Schmelzpunkt wurde die Temperatur konstant gehalten, sodass im Untersuchungsbereich sowohl Eis als auch flüssiges Wasser enthalten waren. Anschließend wurde die Probe gemessen und die einzelnen Spektren anhand der beschriebenen Methode bildgebend ausgewertet (Abbildung: 4.1 b). Eine Gegenüberstellung der Spektren zeigt die in den Grundlagen (Kapitel 2.3.1) beschriebene Verlagerung der maximalen Schwingungsamplitude der OH-Schwingungen nach Phasenübergang zu niederen Frequenzen. Die niederfrequente Schwingungsbande ist eine charakteristische Schwingungsbande für hexagonales Eis und zeigt hier ein Maximum der OH-Schwingung bei $\nu_{OH} \approx 3150\text{cm}^{-1}$ [77]. Die Überlagerung der Spektren in Abbildung 4.1 (a) von flüssigem Wasser (blau) und kristallinem Wasser (Eis, rot) zeigt, dass bei einer Frequenz von $\nu_{OH} \approx 3300\text{cm}^{-1}$ beide Phasen einen gemeinsamen Schnittpunkt besitzen. Dort haben beide Phasenzustände die gleiche Schwingungsintensität. In folgenden Messungen wurde die Schwingungsintensität von Wasser bei dieser Frequenz abgelesen und zur Auswertung genutzt.

Zur Kontrastbildung des gefrorenen Wassers wurde die zuvor beschriebene Schwingungsbande für Eis verwendet. Durch die Ausnutzung dieser phasenspezifischen Schwingungseigen-

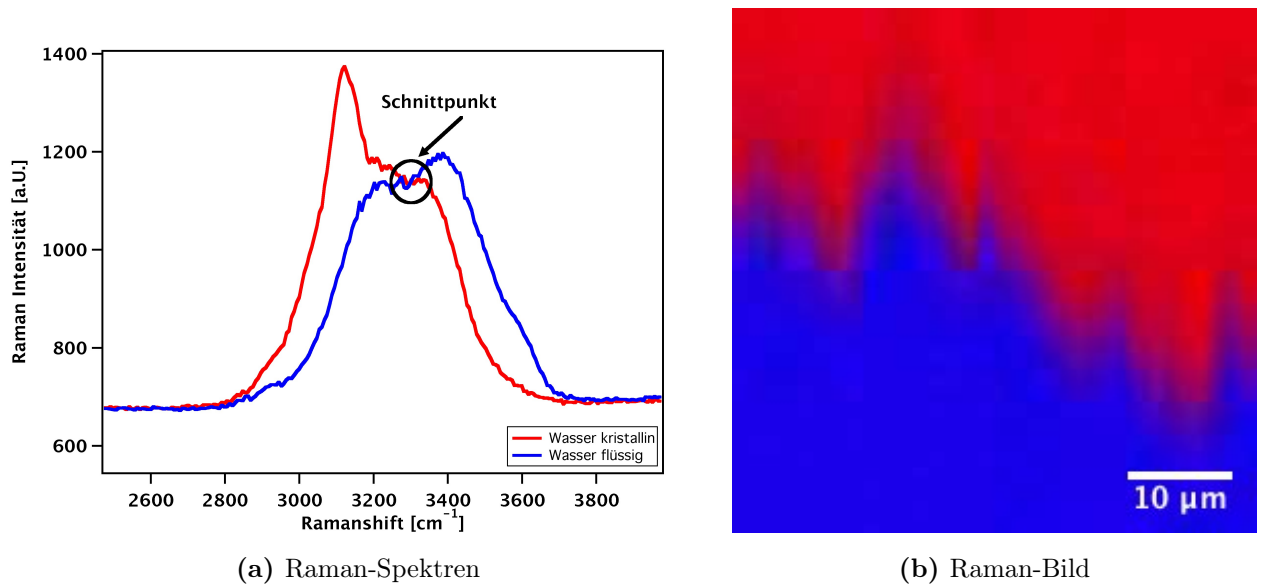


Abb. 4.1: Schnittpunkt von flüssigem und gefrorenem Wasser, aufgenommen während eines langsamen Schmelzvorgangs: Raman-Spektren Wasser flüssig und gefroren (rot=Eis; blau=flüssiges Wasser), zugehöriges Raman-Bild mit flüssiger (blau) und kristalliner Phase (rot).

schaften des Wassers bietet die Raman-Spektroskopie ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zwischen flüssigem und kristallinem Wasser. Zur bildgebenden Auswertung werden die Amplitudenbilder der charakteristischen Banden farblich kodiert und überlagert. So zeigt die graphische Auswertung der Phasenzustände in Abbildung 4.1 b) destilliertes Wasser im gefrorenen Zustand (rot) und im flüssigen Zustand (blau). Durch dieses Differenzierungspotential eröffnet die Raman-Spektroskopie ein vielversprechendes Analysewerkzeug zur Untersuchung von Eisbildungsprozessen bei der Kryokonservierung. Da zur erfolgreichen Kryokonservierung von Zellen bis heute die Verwendung von kryoprotektiven Substanzen unverzichtbar ist, wurde der Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit auf das weit verbreitetste Kryoprotektiv Dimethylsulfoxid gerichtet. Die für DMSO charakteristischen Schwingungsbanden (Kapitel 2.3.1) unterscheiden sich deutlich von den OH-Schwingungsbanden des Wassers, wodurch sich ein vielversprechendes Untersuchungspotential der Raman-Spektroskopie für wässrige DMSO-Lösungen ergeben sollte.

Die Raman-Spektroskopie bietet, wie fast alle spektroskopischen Methoden, eine quantitative Analysemöglichkeit. Daher soll im folgenden Versuch die Methodik zur Bestimmung der DMSO-Konzentration im Wasser genutzt werden. Hierfür wurden zehn Lösungen mit destilliertem Wasser und unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen spektroskopisch untersucht. Die Spektren wurden über die DMSO-Konzentration in Abbildung 4.2 aufgetragen. Um einen von äußeren Einflüssen unabhängigen Faktor zu erhalten, wurde das Verhältnis aus den hintergrundkorrigierten Schwingungsamplituden der C-S-Bande und der OH-Bande berechnet. Dieser Quotient wird im Folgenden als $R_{D/W}$ bezeichnet. Die lineare Abhängigkeit

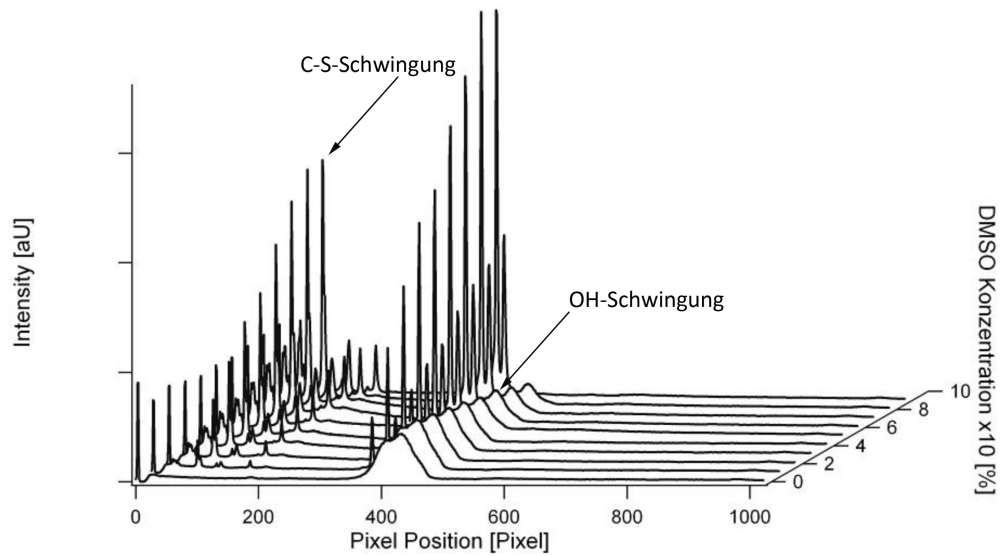


Abb. 4.2: Raman-Spektren einer Konzentrationsreihe eines DMSO-Wasser Gemisches mit steigender DMSO-Konzentration, gemessen bei Raumtemperatur.

dieser Amplitudenverhältnisse der Raman-Schwingungen gegenüber des Konzentrationsverhältnisses der DMSO-Wasser-Lösung ist in Abbildung 4.3 aufgetragen (rote Punkte). Ein linearer Fit der Messwerte zeigt, dass die Werte mit einem $R^2 = 0.999$ an eine Gerade angepasst werden können und somit eine lineare Abhängigkeit besitzen.

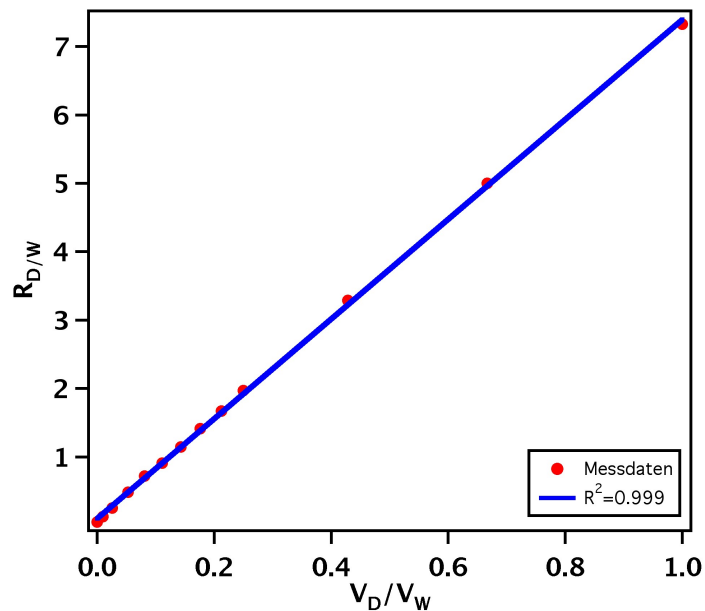


Abb. 4.3: Korrelation Intensitätsquotienten $R_{D/W}$ und dem Volumenquotienten zum Nachweis einer linearen Abhängigkeit der Raman-Intensität von der DMSO-Konzentration.

Zur Berechnung der DMSO-Konzentration aus dem ratiometrischen Verhältnis der stoffspe-

zifischen Raman-Banden wurde aus den Messdaten eine Formel aufgestellt. Die Basis der Funktion war der Quotient zweier Geradengleichungen, der an die Messwerte mit einem Fit angepasst wurde (nicht lineares System). Hieraus ergab sich folgende Gleichung zur Berechnung der DMSO-Konzentration % (v/v) in Abhängigkeit des Amplitudenverhältnisses der C-S- und OH-Schwingung ($R_{D/W}$) in % (v/v):

$$c_{DMSO} \%(v/v) \approx \frac{107.68 \cdot (R_{D/W} - 0.028)}{4.65 + R_{D/W}} \quad (4.1)$$

Wie die vorherigen Experimente gezeigt haben, besitzt die Raman-Mikroskopie ein großes Potential zur Untersuchung von DMSO-Konzentrationen und Phasenzuständen bei Wasser. Diese Eigenschaften sind bei der Kryokonservierung biologischer Proben von großem Interesse, da diese Technik es erstmals ermöglicht, nicht invasiv einen Abkühlvorgang biologischer Proben hochaufgelöst zu untersuchen. Um die Entwicklung der DMSO-Konzentration in der Zelle während des Einfrierens zu analysieren, wurde ein exemplarisches Zellexperiment durchgeführt. Hierfür diente als Kryomedium eine PBS Lösung, die mit 5%(v/v) DMSO versetzt wurde. Dieses wurde dann als Kryomedium zu den suspendierten hMSC gegeben, anschließend wurden $10 \mu\text{l}$ der Zellsuspension eingefroren. Als Referenz wurde die Probe vor dem Abkühlen bei $+4^\circ\text{C}$ gemessen (Abbildung 4.4 (a)).

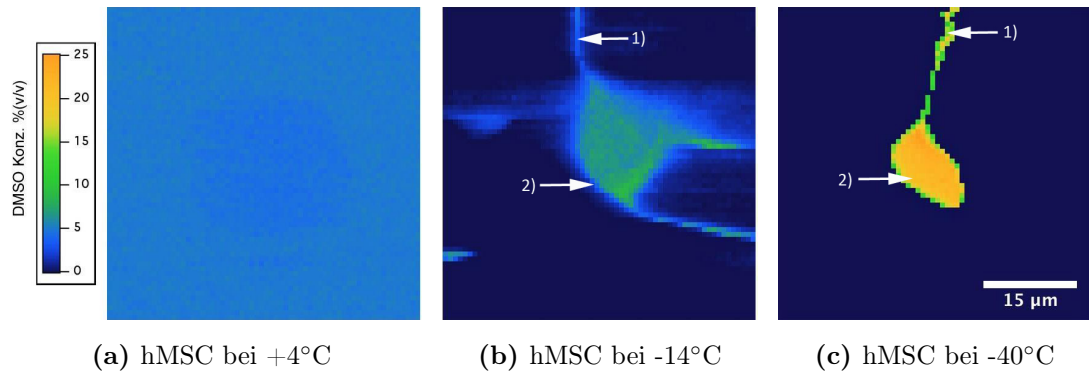


Abb. 4.4: Intra- (2) und extrazelluläre (1) Anreicherung von DMSO in hMSC bei der Kryokonservierung; DMSO-Konzentration der Bildpunkte berechnet mit Gleichung 4.1 und farblich codiert mit Farbskala (siehe links).

Zur Auswertung der DMSO-Konzentration wurde das zuvor beschriebene Verhältnis $R_{D/W}$ gebildet. Mit dieser Datenmatrix (64×64) wurde unter Verwendung der Gleichung 4.1 die pixelbezogene DMSO-Konzentration im Zellwasser berechnet. Diese zeigt zunächst bei der Messung von $+4^\circ\text{C}$ eine recht homogene Verteilung in der Probe. Diese Zelle befindet sich mittig im Bild und ist in dieser Auswertemethodik kaum sichtbar. Der flüssige Zustand bleibt durch die Unterkühlung des Mediums bis weit unter den Schmelzpunkt aufrecht erhalten. Unmittelbar nach dem Phasenübergang wurde die Probe bei -14°C (Abbildung 4.4 (b)) erneut gemessen. Diese Messung zeigt, dass es bei dem flüssigen PBS-DMSO-Gemisch zur

Bildung einer DMSO freien Eisphase kommt. In der verbleibenden Flüssigphase (Pfeil 1)), in der sich die Zelle (Pfeil 2)) befindet, werden die gelösten Stoffe (beispielsweise Osmolyte und DMSO) aufkonzentriert. Die analog zur $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ Messung durchgeführte Datenauswertung zeigt einen deutlichen Anstieg der DMSO-Konzentration - sowohl in der verbleibenden Flüssigphase als auch intrazellulär (Zelle Bildmitte, Abbildung 4.4 b)). Eine weitere Messung der identischen Probe bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abbildung 4.4 (c)) zeigt einen weiteren messbaren Anstieg der DMSO-Konzentration in der Zelle und den dendritischen Kanälen. Dieser sukzessive Anstieg zeigt, dass durch die Addition von DMSO der Gefrierpunkt in der Zelle deutlich herabgesetzt und mit sinkender Temperatur stetig zu niedrigeren Temperaturen verschoben wird. Der Schmelzpunkt der Zelle folgt also mit sinkender Temperatur der Liquiduslinie des Phasendiagramms und führt somit zu einem intrazellulären Liquidus-Tracking, ähnlich dem, wie es von Pegg et al. beschrieben wurde [81]. Durch diese Untersuchung lässt sich zeigen, dass aus der Literatur bekannte Vorgänge wie Liquidus-Tracking mit dieser Technik direkt beobachtbar sind. Somit ist beim Abkühlen unter Gleichgewichtsbedingungen die intra- nahezu gleich der extrazellulären DMSO-Konzentration. Dies zeigt auch, dass bei den untersuchten Temperaturen die Membran permeabel ist. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Raman-Spektroskopie eine bildgebende Möglichkeit zur Messung der DMSO-Konzentration bietet, die auf verschiedenste kryobiologische Fragestellungen angewendet werden kann. Die Eignung dieser Methodik und des Verfahrens wird durch Arbeiten, die von *Dong et al.* durchgeführt wurden, unterstrichen [82]. Diese zeigen ebenfalls bei Versuchen, dass die Raman-Spektroskopie im Tieftemperaturbereich zur Messung von DMSO-Konzentrationen Anwendung finden kann.

4.1.2 Intra- und extrazelluläres Erstarren beim Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen

Die zuvor in den Grundlagen beim Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen beschriebene Anreicherung von Stoffen in der verbleibenden Flüssigphase führt, der Hypothese von Mazur nach, zur Dehydratisierung der Zellen [54]. Die Dehydratisierung soll dazu führen, dass die Zelle intrazellulär nicht kristallisiert, da durch den Wasserentzug die Viskosität des Zytoplasmas ansteigt. Wie diese verbleibende Flüssigphase erstarrt, hängt jedoch von dem verwendeten Kryomedium ab. So haben Han und Bischof am Beispiel vom PBS ein eutektisches Ausfrieren der verbleibenden Flüssigphase beobachtet [33]. Da es beim Einfrieren wässriger DMSO-Lösungen nach dem Phasenübergang zu einer Phasentrennung kommt, werden die gelösten Bestandteile in der verbleibenden Flüssigphase aufkonzentriert. Der Anteil der verbleibenden Flüssigphase ist von der Startkonzentration abhängig. Die in der Flüssigphase enthaltenen Salze und CPA werden, in Abhängigkeit zur Anfangskonzentration, unterschiedlich stark aufkonzentriert. Im folgenden Experiment wurden Zellen der hMSC auf ihren intrazellulären Phasenstatus nach dem eutektischen Erstarren des Kryomediums untersucht. Die Zelle wurde mit einer PBS 10% (v/v) DMSO-Lösung mit $1\text{ K}/\text{min}$ eingefroren. Nach dem Abkühlen auf $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Zelle mit dem Raman-Mikroskop aufgenommen.

In der Auswertung wurde als Kontrast für die Zelle die maximale Amplitude der zellulären Bestandteile zwischen $\nu \approx 1600\text{cm}^{-1}$ bis 1700cm^{-1} ausgewertet und in Abbildung 4.5 (a) bildgebend dargestellt. Für die Visualisierung der DMSO-Verteilung wurde in Abbildung 4.5 (b) die maximale Amplitude der C-S Schwingung verwendet. Die Darstellung der kristallinen Wasserphase erfolgte durch die bildgebende Auswertung der Eis-Bande in Abbildung 4.5 (c). In dieser Abbildung zeigt sich, dass es keine Überschneidung der kristallinen Wasser-Phase (Abbildung 4.5 (c)) mit der Zelle (4.5 (a)) und der DMSO-Lösung (4.5 (b)) gibt. Somit erstarrt die Zelle unterhalb von T_E amorph und bleibt bei diesem Kryomedium eisfrei. Die von Mazur beschriebene zelluläre Dehydratisierung, die eine intrazelluläre Kristallisation von Wasser verhindert, konnte durch dieses Experiment direkt beobachtet und bestätigt werden. Auch in zahlreichen weiteren Versuchen ($n \gg 3$) konnte bei der Verwendung von 5% und 10% (v/v) DMSO Lösungen beim Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen keine intrazelluläre Präsenz einer kristallinen Wasserphase beim Einfrieren mit $1\text{K}/\text{min}$ beobachtet werden. Durch diese nicht-invasive Technik ist es möglich, die Zelle während des Einfrierens zu beobachten und den physikochemischen Zustand zu überwachen. Die eisfrei abgekühlte Zelle könnte nun in einen geeigneten Kryotank überführt und eingelagert werden.

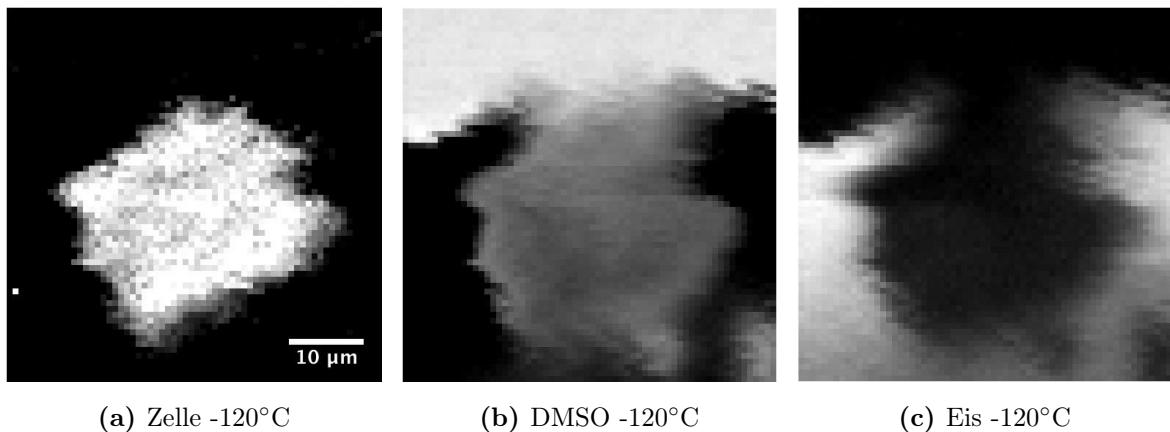


Abb. 4.5: Raman-Mikroskopie Intensitätsbilder der charakteristischen Schwingungsbanden der Hauptbestandteile einer kryokonservierten hMSC bei -120°C eingefroren mit $1\text{K}/\text{min}$ in PBS mit 10% (v/v) DMSO, verändert nach [83]; a) Zelle b) DMSO und c) Eis.

4.1.3 Devitrifikation - Kristallisation amorpher Phasen

Das in Kapitel 4.1.2 gezeigte intrazelluläre, amorphe Erstarren unter Gleichgewichtsbedingungen kann auch durch das schnelle Abkühlen der Probe bei Ungleichgewichtsbedingungen, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, erreicht werden [27]. Die Überführung einer Zellsuspension unter Ungleichgewichtsbedingungen in einen glasartigen Zustand, ohne dass eine Eiskristallisation innerhalb der Probe ausgelöst wird, erfordert nicht nur hohe CPA Konzentrationen, sondern auch eine hohe Abkühlrate. Durch diese Einfriermethodik werden zellschädigende

Mechanismen wie mechanische und chemisch-osmotische Belastungen durch die kristallisationsbedingte Entmischung verhindert. Der Nachweis zur Vitrifizierbarkeit des verwendeten Mediums, bestehend aus einer PBS basierten 20%(v/v) DMSO und 20%(v/v) Ethylenglykol und 300mM Sorbitol Lösung, erfolgte mittels der dynamischen Differenzkalorimetrie. Hierzu wurde eine Probe zur Vitrifikation mit einem Volumen von $45 \mu\text{l}$ mit einer Abkühlrate von $\Delta T \gg 100 \text{ K}/\text{min}$ auf -145°C abgekühlt. Die Probe wurde in einem weiteren Experiment mit $\Delta T = 5 \text{ K}/\text{min}$ abgekühlt.

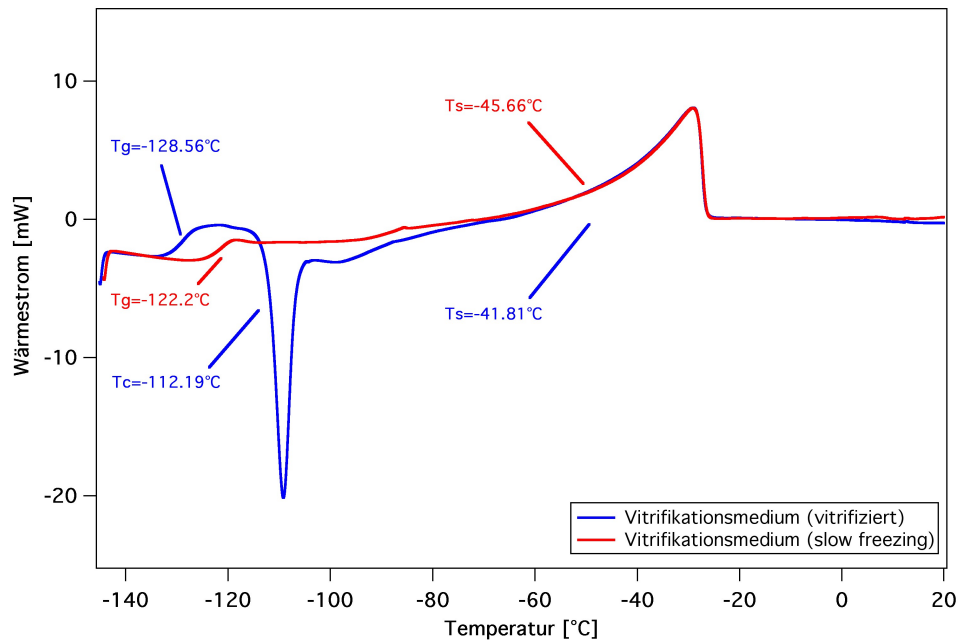


Abb. 4.6: Dynamische Differenzkalorimetrie: Auftaukurven eines Vitrifikationsmediums, welches aus dem amorphen Zustand (blau) und aus dem kristallinen Zustand (rot) erwärmt wird.

Zum Vergleich wurden beide Proben mit einer Rate von $\Delta T = 5 \text{ K}/\text{min}$ erwärmt. Bei der vitrifizierten Probe zeigt sich beim Erwärmen der Glaspunkt bei einer Temperatur von $T_G = -128.6^\circ\text{C}$. Beim weiteren Erwärmen der Probe kann es in einem Temperaturbereich oberhalb von T_G und unterhalb von T_S zu einer spontanen Kristallisation der amorphen Phase beim Erwärmen kommen. Die Wärmeentwicklung in der Messkurve der vitrifizierten Probe bei $T_C = -112.19^\circ\text{C}$ zeigt, dass die amorphe Phase kristallisiert (Abbildung 4.6, blaue Messkurve). Beim weiteren Erwärmen der Probe kommt es zu einem Schmelzen der kristallisierten Phase. Im Vergleich hierzu zeigt die identische Probe, die langsam eingefroren wurde und schon beim Abkühlen kristallisiert ist, keine Kristallisationswärme beim Auftauen. Durch die Kristallisation kommt es durch die Phasentrennung zu einer Anreicherung löslicher Stoffe in der verbleibenden Flüssigphase. Diese flüssige Restphase erstarrt dann durch die angereicherten Solute amorph und verschiebt den Glaspunkt zu höheren Temperaturen. Dies zeigt sich bei einer Glasübergangstemperatur von $T_G = -122.2^\circ\text{C}$ der mit $\Delta T = 5 \text{ K}/\text{min}$ abgekühlten Probe (Abbildung 4.6 rote Messkurve) im Vergleich zu der vitrifizierten Probe.

Da schon die Erwärmung einer vitrifizierten Probe über $T > -112^{\circ}\text{C}$ zu einer Kristallisation, die als zellschädigend angesehen wird [54], führen kann, ist bei einer Langzeitlagerung solcher metastabiler Proben in Kryotanks eine stabile Kühlung erforderlich. Da bei der Lagerung von zahlreichen Proben in Kryotanks eine stringente, stabile Lagertemperatur nicht immer realisierbar ist, wäre eine nicht-invasive Untersuchungsmethode zur Überprüfung des Phasenzustands der einzelnen Proben wünschenswert. Da konventionelle Verfahren zur Untersuchung von Phasenzuständen wie DSC und Elektronenmikroskopie keine zerstörungsfreie Untersuchungsmöglichkeiten zur Analyse des Phasenzustand einer Kryoprobe bieten, soll im folgenden Ansatz eine optisch-spektroskopische Technik genutzt werden, um eine erfolgreiche/bestehende Vitrifikation der Kryomedien nachweisen zu können. Diese Technik soll ein nicht-invasives Auslesen der relevanten Parameter ermöglichen, ohne die Probe zu zerstören oder sie aufzutauen. Die Raman-Spektroskopie bietet ein nicht-invasives, optisches Verfahren zur Untersuchung des Phasenzustands ohne zugesetzte, optische Sonden auch an bereits gefrorenen Proben. Zur Evaluierung diese Untersuchungsverfahrens wurde selbiges Vitrifikationsmedium mit spektroskopischen Methoden in dem Mikroskopieaufbau untersucht. Die Lösung wurde vitrifiziert und von Stickstofftemperatur auf -135°C erwärmt. Die amorph erstarrte Probe wurde anschließend mit einer Rate von $\Delta T = 1 \text{ K/min}$ auf $T = -100^{\circ}\text{C}$ erwärmt und kontinuierlich spektroskopisch überwacht. Die kontinuierlich aufgezeichneten Spektren zeigen in Abbildung 4.7 (a) zwischen -120°C und -110°C einen Übergang vom amorphen zum kristallinen Zustand. Dies zeigt sich an einer kontinuierlichen Steigerung der Schwingungsamplitude der Eis-Bande im niederfrequenteren Bereich der OH-Schwingung zwischen $\nu_{\text{OH}} = 3100 \text{ 1/cm}$ und $\nu_{\text{OH}} = 3200 \text{ 1/cm}$. Die spektroskopische Analysemöglichkeit bietet nicht nur eine Identifikationsmöglichkeit der Phasenzustände, sondern ermöglicht es auch, Kristallisationsprozesse im tiefkalten Zustand abzubilden. Dieser *proof of concept* unterstreicht nochmals das Einsatzpotential der Raman-Spektroskopie im Bereich der Kryobiologie und bietet auch ein Untersuchungspotential im Bereich des Biobankings für bereits eingefrorene Proben.

Um den Ansprüchen zur Untersuchung bereits eingelagerter Proben gerecht zu werden, wurde ein neuartiges Untersuchungskonzept entwickelt. Hierzu wurde ein faserbasiertes Setup (siehe Abbildung 3.3) zur Messung der kryokonservierten Probe entwickelt. Zur Beurteilung der vorgeschlagenen Technologie wurde eine Probenentnahme in einem Entnahmeturm (Asktion C-Line) unter realen Bedingungen messtechnisch erfasst. Der Entnahmeturm befindet sich auf einem Stickstoffbehälter (Abbildung 4.8 (a)). Der Stickstoffbehälter teilt sich in vier Quadranten zur Probenaufnahme (Racks, siehe Abbildung 4.8 (b)). Jedes dieser Probenracks kann bei einer Probenentnahme oder Einlagerung automatisiert aus dem Tank angehoben werden. Ein Rack besitzt mehrere Ebenen, in denen die einzelnen Proben gelagert werden. Die jeweiligen Ebenen können mittels einer Schwenkvorrichtung zur Probenentnahme ausgefahren werden (siehe Abbildung 4.8 (b)). Eine Ebene besitzt mehrere Ports, in denen die Container mit den einzelnen Probenröhrchen adaptiert werden. Der Entnahmeturm wurde zur Entnahme/Einlagerung auf $T = -100^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Auf der obersten Ebene wurden vier Permacryo-Röhrchen mit einem Thermoelement (Typ T) versehen, um die Temperatur-

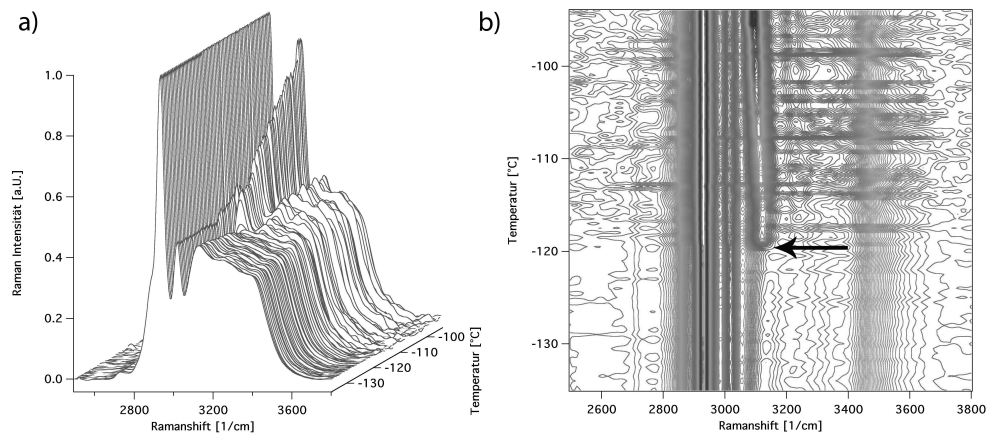


Abb. 4.7: Raman-Spektroskopie: Zeitserie von Raman-Spektren bei der Kristallisation eines Vitrifikationsmediums mit 20 %DMSO, 20% Ethylenglykol und 300mM Sucrose aus der amorphen Phase, normiert auf die DMSO-Bande bei $\nu=2930 \text{ 1/cm}$: a) Wasserfall-Diagramm der Probe von $T=-135\text{C}$ bis $T=-95\text{C}$, erwärmt mit $d \Delta T=1 \text{ K/min}$, mit Auftreten der charakteristischen Schwingungsbande des Eises bei $\nu=3100 \text{ 1/cm}$ b) Konturplot des Vitrifikationsmediums mit entstehender Eis-Bande (Pfeil).

entwicklung bei einer simulierten Probenentnahme zu erfassen. Das Rack wurde maximal ausgefahren, um einen Zugriff auf die unterste Ebene zu simulieren.

Während des Ausfahrvorgangs wurde die Temperatur einmal pro Sekunde gemessen und aufgezeichnet. Die Messwerte, die durch die Thermoelemente erfasst wurden, zeigten die in Abbildung 4.8 (c) dargestellten Temperaturverläufe. Die gemessene Lagertemperatur im Tank betrug $T=-143.6\text{ }^\circ\text{C}$. Beim Ausfahren des Racks wurde die maximale Erwärmung von Sensor 1 registriert. Diese betrug im ausgefahrenen Zustand des Racks $T_{S1}=-111.6\text{ }^\circ\text{C}$ (restliche maximale Sensortemperaturen im $T_{S2}=-120.5\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{S3}=-125.2\text{ }^\circ\text{C}$ und $T_{S4}=-117.5\text{ }^\circ\text{C}$). Da Sensor 1 durch seine Maximaltemperatur die kritischste Probenentemperatur für eine Kristallisation erreicht hatte, wurde die Simulation an den Temperaturverlauf dieses Sensors angelehnt (siehe Abbildung 4.8 c)). Zur Bewertung der vorgeschlagenen Technologie wurde die unter realen Bedingungen gemessene Entnahme in einer Kryomikroskopiekammer nachgestellt. Dieser wurde von einer Ausgangstemperatur von $-141\text{ }^\circ\text{C}$ mit 2 K/min erwärmt. Während der Erwärmungsphase wurde die Probe durch eine Punktmessung überwacht. Als Vitrifikationsmedium wurde eine Lösung aus dem vorherigen Versuch (siehe Abbildung 4.7) verwendet. Von der Lösung wurden $2 \mu\text{l}$ vitrifiziert. Anschließend wurde die Probe von Stickstofftemperatur auf eine Starttemperatur von $-141\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Während der Erwärmung wurde die Probe spektroskopisch überwacht. In Abbildung 4.9 wird ein Amplitudenbild (Konturplot) der Raman-Spektren zwischen $\nu=2750 \text{ 1/cm}$ bis $\nu=3750 \text{ 1/cm}$ (linke Achse) über eine Messzeit von 1200 s gezeigt. Auf der rechten Achse wurde die Probenentemperatur $[\text{ }^\circ\text{C}]$ über die Messzeit [s] aufgetragen. Bis zu einer Temperatur von $-127\text{ }^\circ\text{C}$ zeigt die Probe einen unveränderten amorphen Zustand. Anschließend kristallisierte die Probe zwischen $-127\text{ }^\circ\text{C}$ (schwarzer Pfeil in Abbildung 4.9) und $-122\text{ }^\circ\text{C}$. Dies zeigt sich an einem Anstieg der Schwingungsamplitude

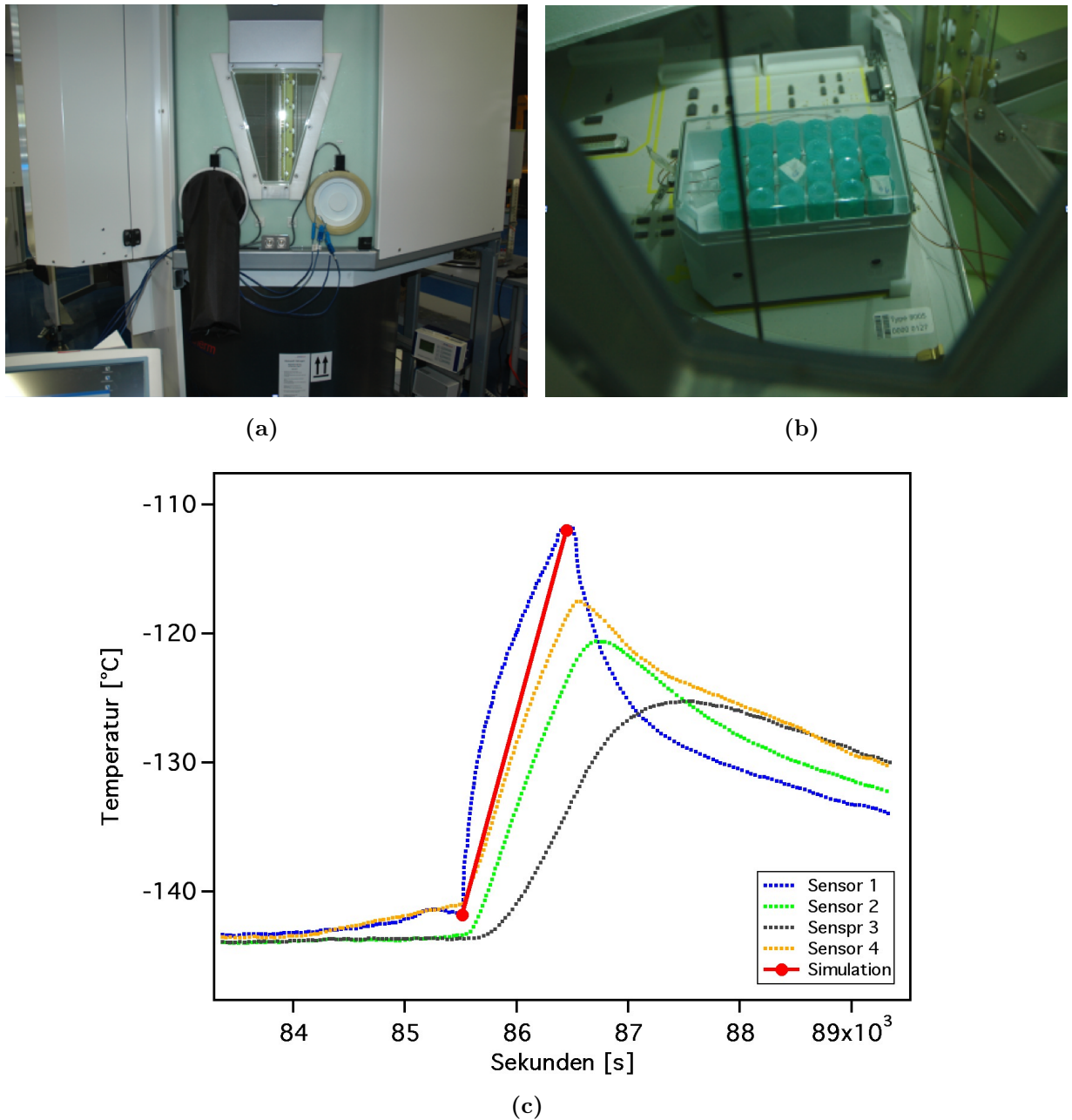


Abb. 4.8: Aufnahme eines Entnahmeturms (a) mit Kryokontainer und Permacryo Röhren (b) mit zugehöriger Messkurve des Temperaturverlaufs (c) der Sensoren in den Röhren bei einer simulierten Probenentnahme mit anschließender Einlagerung.

der OH-Schwingung oberhalb von $\nu=3000\text{ 1/cm}$. Bis zum Erwärmen der Probe auf die Endtemperatur von -100 °C waren spektroskopisch keine weiteren Veränderungen erkennbar. Die beschriebenen Experimente zeigen, dass die Raman-Spektroskopie eine nicht invasive Untersuchungsmöglichkeit zur Analyse und zeitlichen Dokumentation der Phasenzustände gefrorener Proben ermöglicht. Durch den Vergleich der Spektren vor und nach der Kristallisation kann der Prozess auch nachträglich detektiert und nachgewiesen werden. Dieses

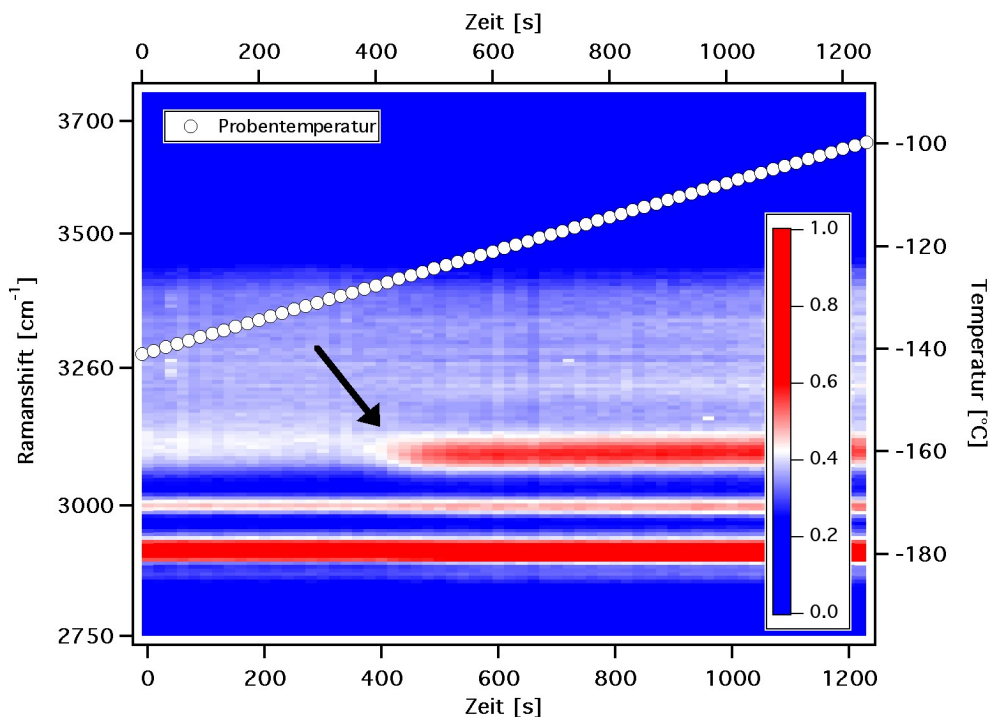


Abb. 4.9: Raman-Spektroskopie: Zeitserie von Raman-Spektren einer simulierten Probenentnahme aus einem Askion Turm; die miniaturisierte Probe wurde von $-141\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt, einsetzende Devitrifikation bei $-127\text{ }^{\circ}\text{C}$, adaptiert aus [83].

Verfahren erlaubt es somit, auch bei bereits eingelagerten vitrifizierten Langzeitproben eine nicht-invasive Analyse der Probe auf eine mögliche Eiskristallbildung durchzuführen und somit Rückschlüsse auf die Probenqualität zu ziehen, da unter Ungleichgewichtsbedingungen erstarrte Proben, die später kristallisiert sind, als irreversibel geschädigt gelten.

4.1.4 Phasenverhalten DMSO-haltiger Kryomedien unter Einfluss von Druck

Gefrierpunktniedrigungen wässriger Lösungen können nicht nur chemisch durch Addition von Kryoprotektiva erzielt werden, sondern auch physikalisch durch die Änderung des Umgebungsdruckes. Diese Eigenschaft ist auf den als Dichteanomalie bezeichneten Effekt zurückzuführen. Eine Folge dieses Effektes ist die Eigenschaft der Druckaufschmelzung von Wasser. Diese führt dazu, dass man durch die Erhöhung des Druckes den Schmelzpunkt von Wasser um $0,0077\text{ K}/\text{bar}$ herabsetzen kann [84]. Um diesen Effekt auch auf seine Gültigkeit in der Präsenz von DMSO zu überprüfen, wurde der Schmelzpunkt verschiedener DMSO Lösungen in Abhängigkeit des Druckes gemessen. Für diese Untersuchung wurde die am IBMT entwickelte temperierbare-Mikroskopie-Druckkammer (Abbildung 4.10 (a)) auf dem Raman-Mikroskop 4.10 (b)) installiert. Durch eine Handpumpe kann der Druck in der Mikroskopiekammer variabel zwischen 1.013 bar und 2000 bar eingestellt werden. Da sich

in einem geschlossenen System durch die Kristallisation von Wasser der Druck erhöht und wiederum durch das Schmelzen der Lösung gesenkt wird, musste in dem Versuchsaufbau diese Druckschwankung ausgeglichen werden. Dazu wurde die verwendete Druckkammer mit einem By-Pass System ausgestattet, welches den angelegten Druck bei Schwankungen oder Änderungen konstant hält (siehe Abbildung 4.10 (b)). Dies ist beispielsweise erforderlich, um einem Absinken des Druckes beim Schmelzen durch die Dichteänderung entgegenzuwirken.

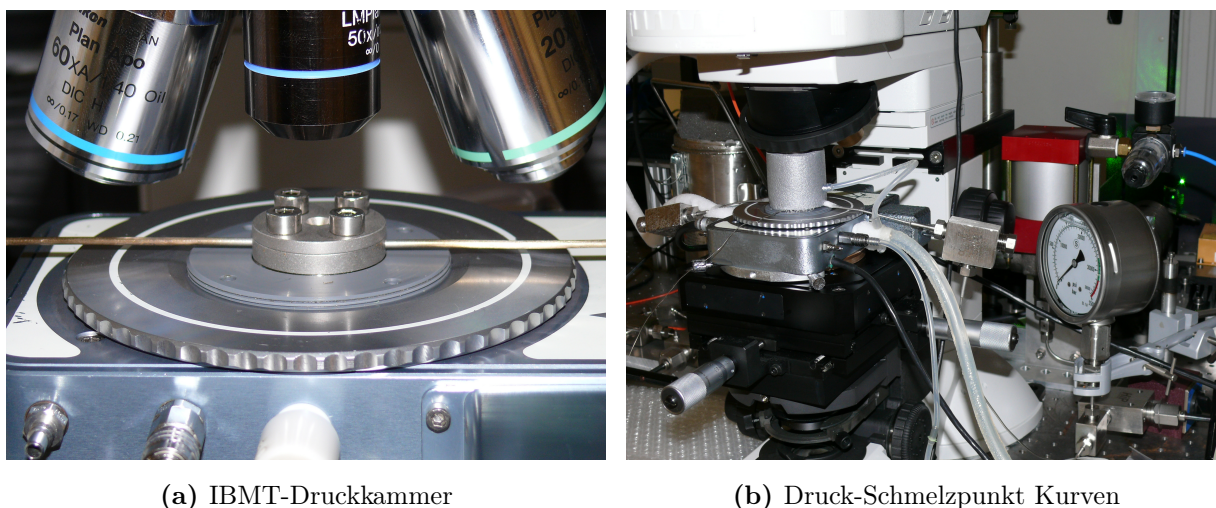


Abb. 4.10: (a) IBMT Druckkammer in Linkam-Kammer adaptiert (b) IBMT-Druckkammer mit zugehöriger Peripherie auf Raman-Mikroskop adaptiert.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Schmelztemperatur verschiedener DMSO-Konzentrationen vom Druck wurden 0,025M, 0,05M und 0,1M DMSO-Wasser Lösungen spektroskopisch gemessen. Diese wurden bis zum Gefrieren der Lösung abgekühlt und wieder erwärmt. Beim Erwärmen der Probe mit $1\text{ K}/\text{min}$ wurde kontinuierlich die Eis-Bande im Raman-Spektrum mit einem Luftobjektiv (Olympus 50x LMPFL) aufgenommen und überwacht. Der Rückgang der Schwingungsamplitude der Eis-Bande bei $\nu_{OH} \approx 3150\text{ cm}^{-1}$ wurde als Indikator für das Schmelzen der unter Druck gesetzten Lösung genommen. Die so gemessenen Schmelzpunkte wurden in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration und des anliegenden Druckes in Abbildung 4.11 ausgewertet. Der Schmelzpunkt von Wasser hängt vom Druck ab; diese Abhängigkeit kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$T_S(P) = \frac{\Delta T}{\Delta P} \cdot P - T_S \quad (4.2)$$

Die gemessenen Schmelzpunkte wurden für die individuellen Konzentrationen der Geradengleichung $T_S(P)$ angepasst. Die Korrelation der Messdaten mit der Fit-Geraden ergab in allen Messkurven ein $R^2 > 0.988$. Somit besitzen die gemessenen Schmelzpunkte der verschiedenen DMSO-Lösungen ebenso wie reines Wasser eine lineare Abhängigkeit vom Druck. Der Parameter $\Delta T/\Delta P$ der Geradengleichung beschreibt die Druckaufschmelzung der Lösung in $^\circ\text{C}/\text{bar}$. Dieser Faktor beträgt in allen gemessenen DMSO-Wasser Lösungen $0.008\text{ }^\circ\text{C}/\text{bar}$ und ist somit

vergleichbar mit dem Faktor von $0.0077\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{bar}$ ($\approx 0.008\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{bar}$) aus der Clapeyron-Gleichung für Wasser [84].

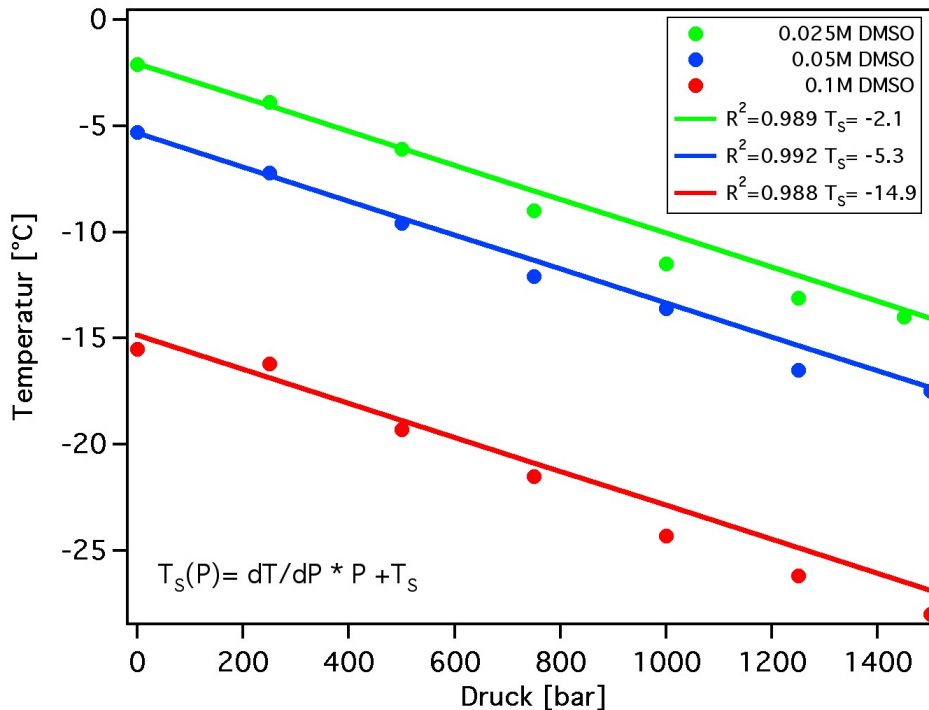


Abb. 4.11: Druckabhängige Schmelzpunktkurve in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration.

Der Substraktor T_S der Gleichung beschreibt den Gefrierpunkt der Lösung bei Atmosphärendruck. Die aus der Funktion berechneten Schmelzpunkte ergeben annähernd die selben Werte wie die aus dem Phasendiagramm beschriebenen Schmelzpunkte für DMSO-Wasser-Lösungen [58]. Somit konnte durch dieses neue Verfahren auch für DMSO-Wasser-Lösungen in dem untersuchten Druckbereich von 1.013 bar bis 1500 bar eine lineare Abhängigkeit des Schmelzpunktes vom Druck nachgewiesen werden.

	T_S Phasendiagramm	T_S Fit
0,025M DMSO	-2,5	-2,1
0,05M DMSO	-5,6	-5,3
0,1M DMSO	-15,4	-14,9

Tab. 4.1: Schmelztemperaturen für DMSO aus Phasendiagramm [58] und Schmelztemperaturen aus Fitfunktion.

Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass die Raman-Spektroskopie als Untersuchungstechnik nicht nur in einer der temperierbaren Kammer möglich ist, sondern auch Messungen in Druckbereichen fernab des atmosphärischen Druckes möglich sind.

4.2 Untersuchungen des Volumens suspendierter Zellen während des langsamen Einfrierens

In diesem Kapitel wird die Volumenentwicklung und die Zytosolzusammensetzung während des Einfrierens unter Gleichgewichtsbedingungen mit den Mitteln der Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Es soll überprüft werden, ob sich diese in den Rahmen etablierter Modellvorstellungen einfügen lassen oder verfeinerte Modelle erfordern.

4.2.1 Simulation der osmotischen Dehydratisierung für hMSC

Wie in Kapitel 4.1 gezeigt, lassen sich mit der Raman-Mikroskopie die zellulären Proben im gefrorenen Zustand analysieren. Durch den Phasenübergang von Wasser zu Eis ändern sich stetig die extra- und intrazellulären Konzentrationen von zellulären Bestandteilen, Wasser und DMSO. Für diese Bestandteile wird hier eine Simulationsrechnung für die verwendete hMSC-Linie aufgestellt. Dies soll dazu dienen, ein Verständnis für die Vorgänge bei der Kryokonservierung zu schaffen und einen Erwartungswert für die darauf folgenden Raman-Messungen zu generieren. Die Basis für diese Betrachtung ist die in *Pegg et al.* [37] beschriebene vereinfachte Arbeitshypothese zellulärer Volumenentwicklung bei der Kryokonservierung. Diese reduziert sich auf die Betrachtung des osmotisch inaktiven Volumens (OIV, V_b) und des osmotisch aktiven Volumens (OAV). Bei diesem beinhaltet das OIV das zelluläre Material (V_O), das als nicht permeabel angesehen wird, sowie das davon gebundene Wasser (V_{Wb}). Dieser Teil des Zellvolumens steht nicht im Gleichgewicht mit dem OAV, bleibt daher konstant und trägt weder zur Osmose bei noch löst es Osmolyte oder andere Stoffe wie Kryoprotektiva. Das OAV hingegen besteht aus freiem Wasser (V_{Wf}), intrazellulären Osmolyten und membranpermeablen Kryoprotektiva (V_D). Dieser Teil steht im permanenten Gleichgewicht mit dem Medium ($mOsm_{Medium} = mOsm_{OAV}$), wodurch das osmotisch aktive Volumen (1-OIV) als ideales Osmometer angesehen werden kann. Zur experimentellen Bestimmung des osmotisch inaktiven Volumens (V_b) der zu untersuchenden hMSC-Linie wurden die Zellen verschiedenen hypo- und hypertonen Osmolaritäten ausgesetzt und ihr Volumen vermessen. Hierzu wurden im DMEM-Medium die verschiedenen Osmolaritäten durch die Addition von Mannitol eingestellt und die Zellen hinzugegeben. Anschließend wurden die Lösungen in einen Coulter Vi-Cell XR gegeben und je 150-200 Zellen vermessen und ausgewertet. Die Zellen wurden vom hypotonen über den isotonen bis in den hypertonen Bereich (202, 301, 362, 396, 445, 513 und 983 mOsm) vermessen. Aus den von dem Vi-Cell gemessenen Zelldurchmessern wurde das idealisierte Zellvolumen errechnet. Diese Volumina wurden auf das isotone Volumen normalisiert und gegen die reziproke Osmolarität in Abbildung 4.12 aufgetragen. Zur Bestimmung des osmotisch inaktiven Volumens wurde aus der Messdatenauswertung ein Boyle van't Hoff Plot angefertigt.

Durch die Extrapolation einer Geraden durch die gemessenen osmolaritätsabhängigen Volumina erhält man durch einen Schnittpunkt mit der Ordinate das osmotisch inaktive Volumen. Hierbei ergab eine Extrapolation aller Messwerte (202, 301, 362, 396, 445, 513 und

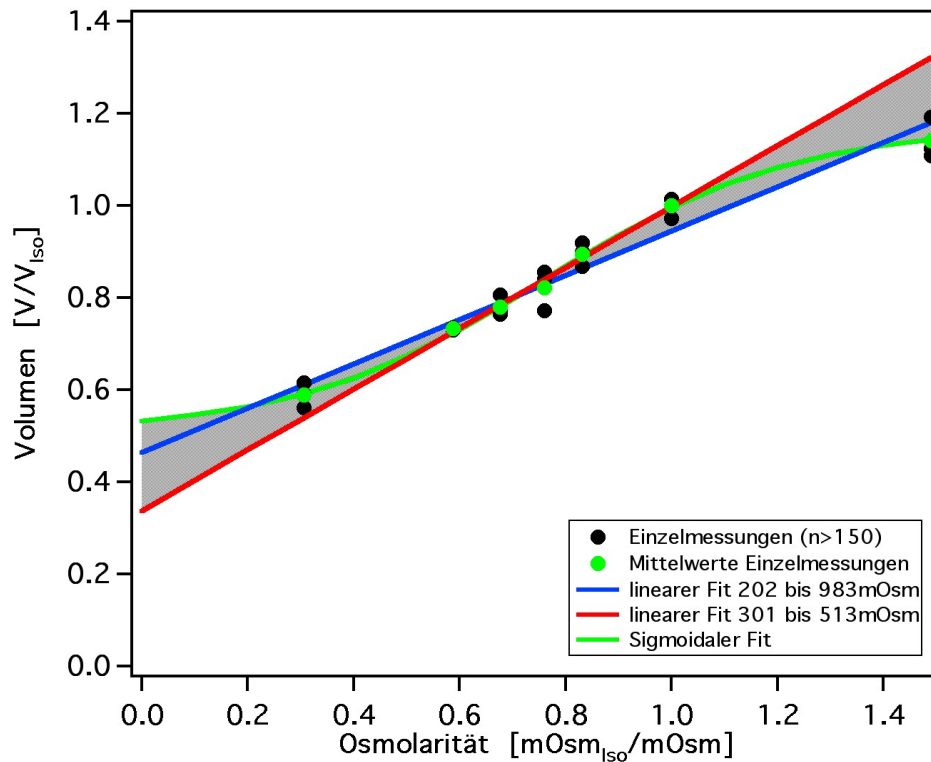


Abb. 4.12: Boyle Van't Hoff Plot zur Bestimmung des osmotisch inaktiven Volumens der UC-MSCLinie; osmolaritätsabhängige Zellvolumina aufgenommen mit Beckman Coulter Vi-Cell XR.

983mOsm) ein $V_b=0.463\approx 0.45$ des Gesamtvolumens (siehe Abbildung 4.12). Da die zelluläre Volumenänderung im stark hyper- bis isotonen Bereichen kein lineares, sondern ein asymptotisches Verhalten zeigen, wurde eine weitere Gerade durch die Messwerte von 301 mOsm bis 513 mOsm extrapoliert. Eine Extrapolation dieser Geraden ergab ein $V_b=0.337$. Diese unterschiedlichen Auswertansätze zeigen, dass das extrapolierte V_b nicht eindeutig quantifiziert werden kann, da nur das osmotisch aktive Volumen als ideales Osmometer angesehen werden kann und die dem Modell zu Grunde liegende scharfe Grenze zwischen osmotisch inaktivem und aktivem Volumen nicht existiert. Die Verwendung einer Geraden ist eine in erster Näherung taugliche Beschreibung, jedoch zeigt sich bei Experimenten [41] in stark hypo- und hyperosmolaren Bereichen ein Abweichen von dieser Geraden. Im hypoosmolaren Bereich wird, wie die Messwerte in Abbildung 4.12 zeigen, weniger Wasser aufgenommen, als die Beschreibung durch eine Gerade voraussagt. Entgegengesetzt verhält es sich in stark hyperosmolaren Bereichen, dort wird nicht mehr so viel Wasser entzogen, wie es die Geradengleichung erwarten ließe. Daher wurden die Messwerte noch durch einen sigmoidalen Fit beschrieben, um die Abweichungen in den stark hypo- und hyperosmolaren Bereichen besser zu beschreiben (siehe Abbildung 4.12). Der klassische Ansatz ist jedoch eine Gerade und wird durch die Boyle-van't-Hoff'sche Gleichung des Zellvolumens V_Z folgendermaßen beschrieben:

$$V_Z = V_b + (1 - V_b) \cdot \frac{mOsm_{iso}}{mOsm} \quad (4.3)$$

Bei der Kristallisation im Extrazellularraum werden alle in der verbleibenden Flüssigphase gelösten Stoffe aufkonzentriert. Durch den osmotischen Gradienten dehydratisiert die Zelle und es werden membranpermeable Solute in gleichem Maße im OAV angereichert. Die Anreicherung nicht permeabler Solute im Medium führt zu einer osmotischen Kontraktion des OAV. Diese ist jedoch abhängig von der verwendeten Startkonzentration an CPA. Die Phasenzusammensetzung und das Phasenverhältnis in typischen biologischen Proben wird vom CPA dominiert; typische Medienbestandteile spielen eine in erster Näherung zu vernachlässigende Rolle. Ihre Berücksichtigung würde zu sehr komplexen Phasenräumen führen [85]. Daher wird die Zusammensetzung des flüssigen Mediums näherungsweise aus dem binären Phasendiagramm (DMSO-Wasser) bestimmt.

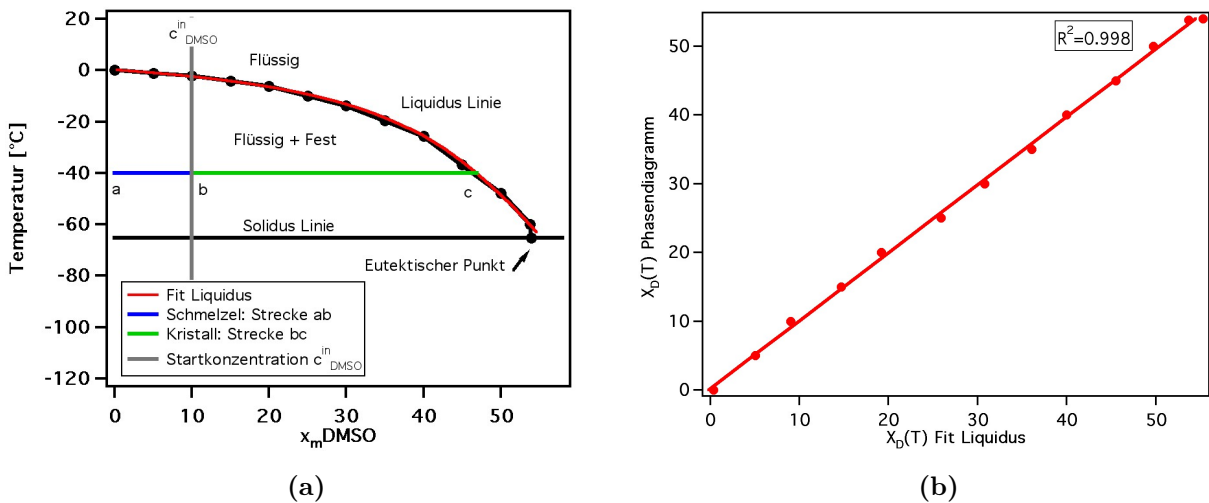


Abb. 4.13: a) Schmelzpunkte für DMSO-Wasser-Lösung übernommen aus Phasendiagramm Rasmussen [58], überlagert mit dem Graph (Fit Liquidus) der aufgestellten Funktion; b) Korrelation der temperaturabhängigen Konzentration aus dem Phasendiagramm und den berechneten Werten zum Nachweis der Eignung der aufgestellten Funktion zur Beschreibung der DMSO-Konzentration.

Hierfür wurde aus dem Phasendiagramm für DMSO-Wasser nach Rasmussen [58] die temperaturabhängigen DMSO-Konzentrationen adaptiert (siehe Abbildung 4.13 (a)). Der Verlauf der Liquiduslinie wurde mit einer Funktion in Abbildung 4.13 (a) *Fit Liquidus* angepasst. Die daraus hergeleitete Funktion zur Berechnung der temperaturabhängigen DMSO-Konzentration ($X_D(T)$) beschreibt sich wie folgt:

$$X_D(T) = \frac{21247.2 * (T - 0.07366)}{T^2 + 380.178 * T - 4552.82} \cdot 10^{-2} \quad T \in [T_s; T_{Eu}] \quad (4.4)$$

Eine Korrelation der aus dem Phasendiagramm adaptierten Werte mit den aus Gleichung 4.4 berechneten DMSO-Anteilen ist in Abbildung 4.13 (b) gezeigt ($R^2 = 0.998$). Unter

Verwendung der Gleichung 4.4 und des Hebelgesetzes für Phasendiagramme [34] lässt sich durch folgende Gleichung zur Berechnung der temperaturabhängigen Anteil der Schmelze $X_S(T)$ in Abhängigkeit der DMSO-Startkonzentration (X_D^0) berechnen:

$$X_S(T, X_D^0) = \frac{0.004707 \cdot X_D^0 \cdot (T^2 + 380.178 \cdot T - 4552.82)}{T - 0.07366} \quad (4.5)$$

Der Anteil der kristallinen Phase ist somit $1 - X_S(T)$. Die temperaturabhängige Entwicklung der verbleibenden Flüssig- und Kristallinen-Phase ist in Abbildung 4.14 dargestellt. In dieser wird gezeigt, wie mit steigender DMSO-Konzentration der Anteil der verbleibenden Flüssigphase (Schmelze) zunimmt.

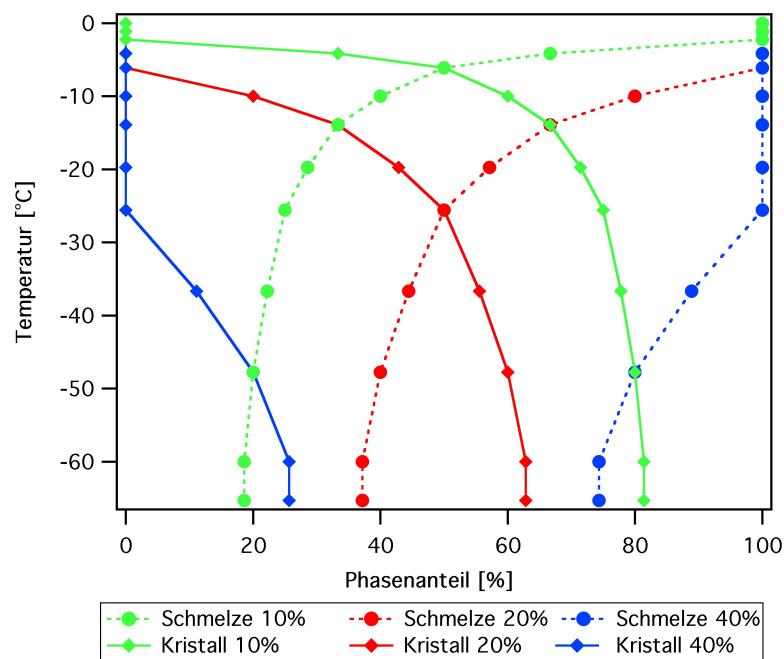


Abb. 4.14: Graphische Darstellung der temperaturabhängigen Phasenanteile von kristalliner Phase ($1 - X_S(T)$) und Flüssigphase ($X_S(T)$) in Abhängigkeit von der DMSO Startkonzentration (X_D^0): 10% grün; 20% rot; 40% blau.

Der Anteil dieser Schmelze, der durch die Startkonzentration (X_D^0) temperaturabhängige Massenanteile $X_S(T)$ besitzt, ist direkt proportional zur extrazellulären Osmolarität, da alle gelösten Osmolyte extrazellulär in der verbleibenden Flüssigphase aufkonzentriert werden und dem System nur Wasser entzogen wird. Somit kann man, indem man den temperaturabhängigen Anteil der Schmelze $X_S(T, X_D^0)$ mit der Osmolarität ins Verhältnis setzt, die resultierende extrazelluläre Osmolarität $mOsmol$ in Abhängigkeit von der Temperatur T , der Startkonzentration X_D^0 und der isotonen bzw. der Ausgangsmolarität des Mediums $mOsm_{iso}$ folgendermaßen berechnen:

$$mOsm(T, X_D^0, mOsm_{iso}) = \frac{21247.2 \cdot mOsm_{iso} \cdot (T - 0.07366)}{X_D^0 \cdot (T^2 + 380.178 \cdot T - 4552.82)} \quad (4.6)$$

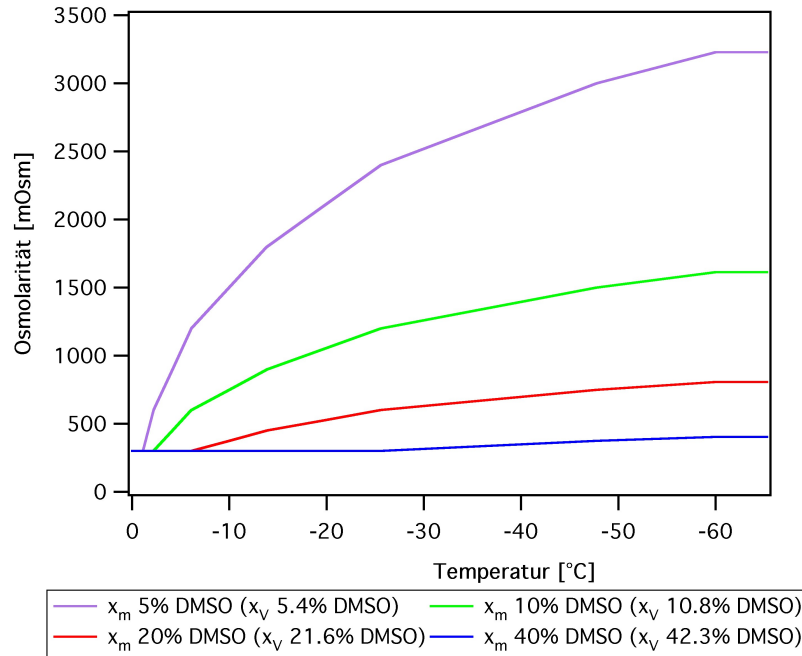


Abb. 4.15: Graphische Darstellung der temperaturabhängigen extrazellulären Osmolarität ($mOsm$) in der verbleibenden Flüssigphase ($X_S(T)$) in Abhängigkeit von der DMSO Startkonzentration (X_D^0) und der Osmolarität des Mediums ($mOsm_{iso}$): 5% lila; 10% grün; 20% rot; 40% blau

Durch diese Gleichung wird die temperaturabhängige Osmolarität für den Kryokonservierungsvorgang berechenbar und kann nun in Gleichung 4.3 zur Berechnung des temperaturabhängigen Zellvolumens ($V_Z(T)$) eingesetzt werden. Daraus ergibt sich für die Berechnung des $V_Z(T)$ folgende Gleichung:

$$V_Z(T, X_D^0, mOsm_{iso}) = OIV + (1 - OIV) \cdot \left(\frac{mOsm_{iso}}{mOsm(T, X_D^0, mOsm_{iso})} \right) \quad (4.7)$$

Der Modellvorstellung nach mischen sich DMSO und Wasser nur im OAV, daher lässt sich der Anteil an DMSO $V_D(OAV)$ unter Zuhilfenahme von Gl. 4.7 und Gl. 4.4 folgendermaßen berechnen:

$$\begin{aligned} V_D &= [V_Z(T, X_D^0, mOsm_{iso}) - OIV] \cdot X_S(x) \\ &= X_D^0 \cdot (1 - OIV) \end{aligned} \quad (4.8)$$

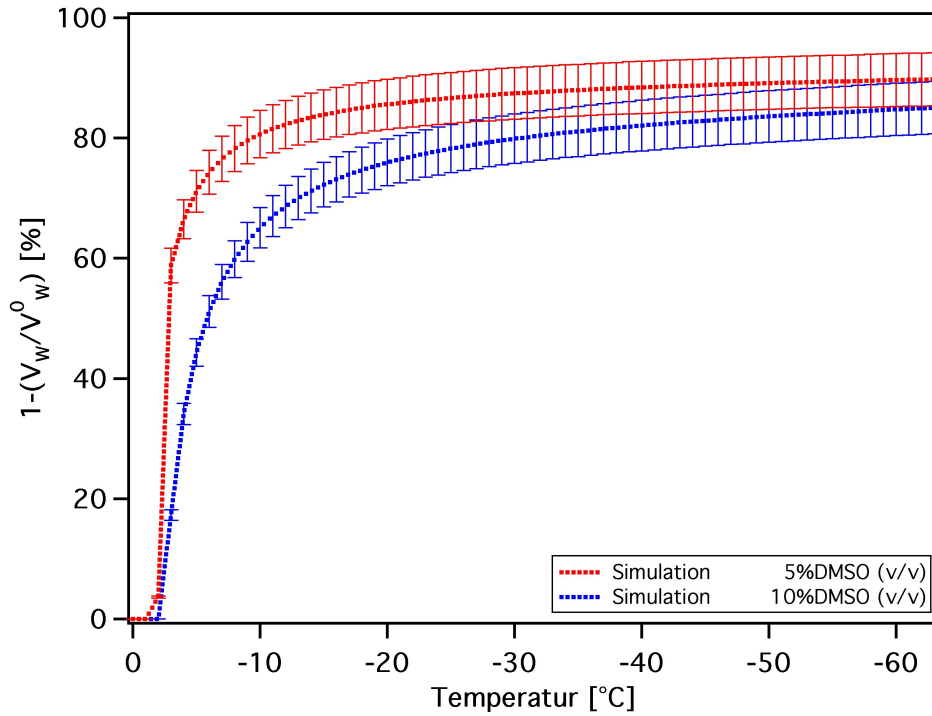


Abb. 4.16: Graphische Auswertung charakteristischer Raman-Banden: Zelluläre Dehydratisierung für hMSC nach Pegg Modell berechnet aus den aufgestellten Gleichungen.

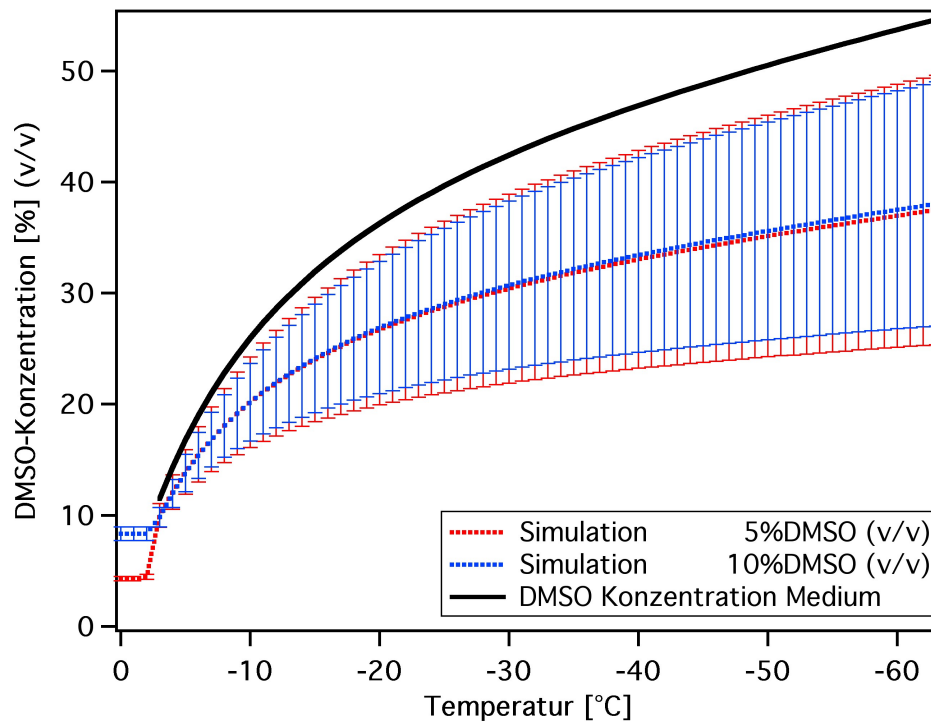
Daraus ergibt sich eine konstante intrazelluläre DMSO-Menge (V_D), die nur von der Anfangskonzentration X_D^0 und dem osmotisch inaktiven Volumen (OIV) abhängt. Ferner wird die Menge des osmotisch inaktiven Volumens als konstant betrachtet, woraus sich eine unveränderliche Menge an gebundenem Wasser und organischen Bestandteilen ergibt ($OIV = V_{Wb} + V_C$). Da das OIV und V_D konstant bleiben, stellt sich das Zellvolumen und die intrazelluläre DMSO-Konzentration einzig und allein durch die osmotisch bedingte Dehydratisierung ein. Die veränderliche Größe während der Kryokonservierung ist somit das freie Wasser (V_{Wf}), welches sich wie folgt berechnet:

$$V_{Wf}(T, X_D^0, mOsm_{iso}) = (1 - X_D(T)) \cdot (1 - OIV) \cdot \frac{mOsm_{iso}}{mOsm(T, X_D^0, mOsm_{iso})} \quad (4.9)$$

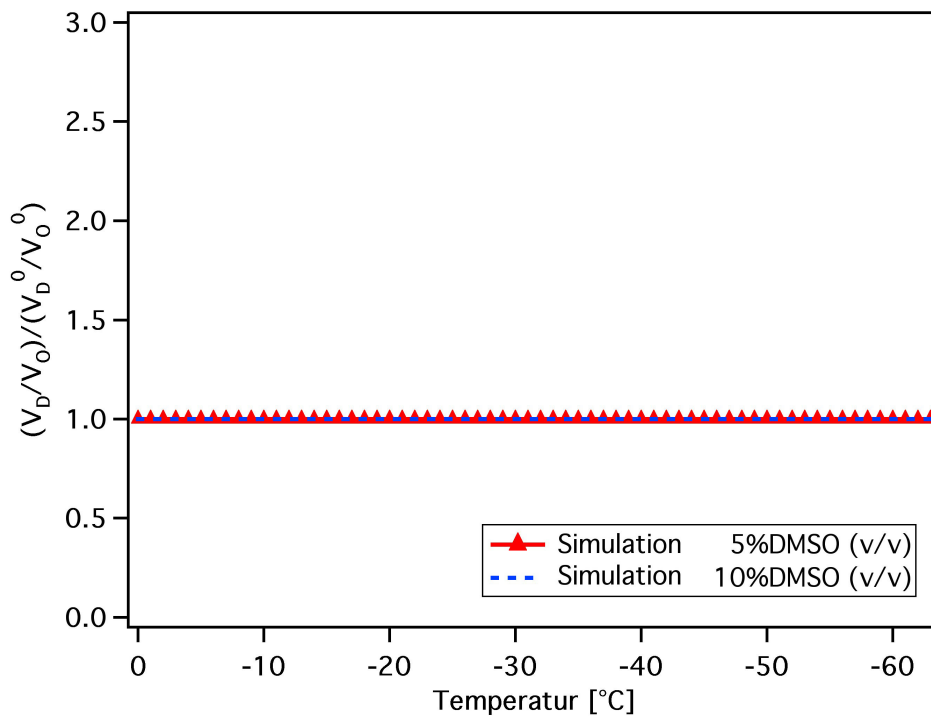
Das gesamte zelluläre Wasservolumen setzt sich aus freiem (W_f) und gebundenem Wasser (W_b) zusammen. Daher berechnet sich das gesamte Wasservolumen (V_W) aus:

$$V_W = V_{Wf} + V_{Wb} \quad (4.10)$$

Um nun mit Hilfe dieses Modells den zellulären Wasserhaushalt der hMSC Linie quantifizieren zu können, wurde folgende Berechnung unter Verwendung der experimentell ermittelten Daten für $V_b = 0.45$ durchgeführt. Zur Berücksichtigung des gebundenen Wassers im zellulären Wasservolumen wurden Literaturwerte von [40] genommen, die besagen, dass sich der Anteil des gebundenen Wassers auf 12.5% des gesamten Wassers beläuft.



(a)



(b)

Abb. 4.17: Theoretische Anreicherung von DMSO: (a) Intrazelluläre DMSO-Konzentration und (b) Intrazelluläres Partialvolumen für DMSO für hMSC während der Kryokonservierung mit 5% (v/v) und 10% (v/v) DMSO als Startkonzentration berechnet aus den aufgestellten Gleichungen.

Berechnet man den temperaturabhängigen Wasseranteil V_W und setzt diesen nach der Formel $1 - v_w/v_w^0$ [%] ins Verhältnis zum Startvolumen (V_W^0), so kann man den prozentualen Wasserverlust graphisch darstellen. Der Einfluss des näherungsweise betrachteten gebundenen Wasservolumens spiegelt sich in der Streuung der Simulationskurven wieder. Dieser Streuung liegt ein gebundenes Wasservolumen von 0% - 12.5% (V_{Wb}) zu Grunde. Der Wasserverlust wurde für hMSC in Abhängigkeit von der Startkonzentration für 5% und 10% (v/v) DMSO berechnet und in Abbildung 4.16 aufgetragen. Die Berechnung der Wasserverluste für hMSC zeigt, dass beim Erreichen der eutektischen Temperatur von DMSO ein zellulärer Wasserverlust von mehr als 75% zu erwarten ist. Die Zelle, die mit der niederen DMSO-Konzentration kryokonserviert wird, lässt einen höheren Wasserverlust erwarten. Durch diese Dehydratisierung erhöht sich die DMSO-Konzentration in der Zelle. Zur Berechnung der temperaturabhängigen, intrazellulären DMSO-Konzentration wird der Quotient aus DMSO (V_D) zu Wasser (V_W) gebildet und die Konzentration berechnet. In Abbildung 4.17 (a) sind die intrazellulären Konzentrationsverläufe für 5% und 10% simuliert. Die intrazelluläre DMSO Konzentration am Eutektikum ist niedriger als es das Phasendiagramm erwarten ließe [82], was auch hier mitunter dem gebundenen Wasser geschuldet ist. Auch in dieser Betrachtung ist in der Streuung ein gebundener Wasseranteil von 0% - 12.5% berücksichtigt. Da bei den Raman-Messungen nicht zwischen freiem und gebundenem Wasser unterschieden werden kann, wurden die intrazellulären Konzentrationen mit den Volumina DMSO zu Gesamtwasser gebildet. Bei den Zellen, die mit weniger DMSO abgekühlt werden, ist die finale Konzentration etwas niedriger. Betrachtet man die Entwicklung von Volumen DMSO (V_D) zu organischem Zellmaterial (V_O), so zeigt die Gegenüberstellung der berechneten Quotienten, dass das Verhältnis (siehe Abbildung 4.17 b)) über den gesamten Prozessverlauf erwartungsgemäß konstant bleibt. Da das Verhältnis von DMSO zu Soluten, welche für die Zellmembran impermeabel sind, konstant bleibt, ist demzufolge zu erwarten, dass auch das Verhältnis von DMSO zu organischem Zellmaterial konstant bleiben muss. Diese Simulationen werden im Rahmen der folgenden Experimente auf ihre Sinnhaftigkeit überprüft und die Ergebnisse diskutiert.

4.2.2 Zelluläre Volumenänderung durch osmotische Dehydratisierung

Beim Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen dehydratisiert die Zelle und erstarrt ohne die Kristallisation von intrazellulärem Wasser (Kapitel 4.1.2). Diese Dehydratisierung ist osmotisch und wird durch die extrazelluläre Anreicherung von Osmolyten in der verbleibenden Flüssigphase hervorgerufen. Demzufolge ist das Zellvolumen näherungsweise abhängig von der verbleibenden Flüssigphase.

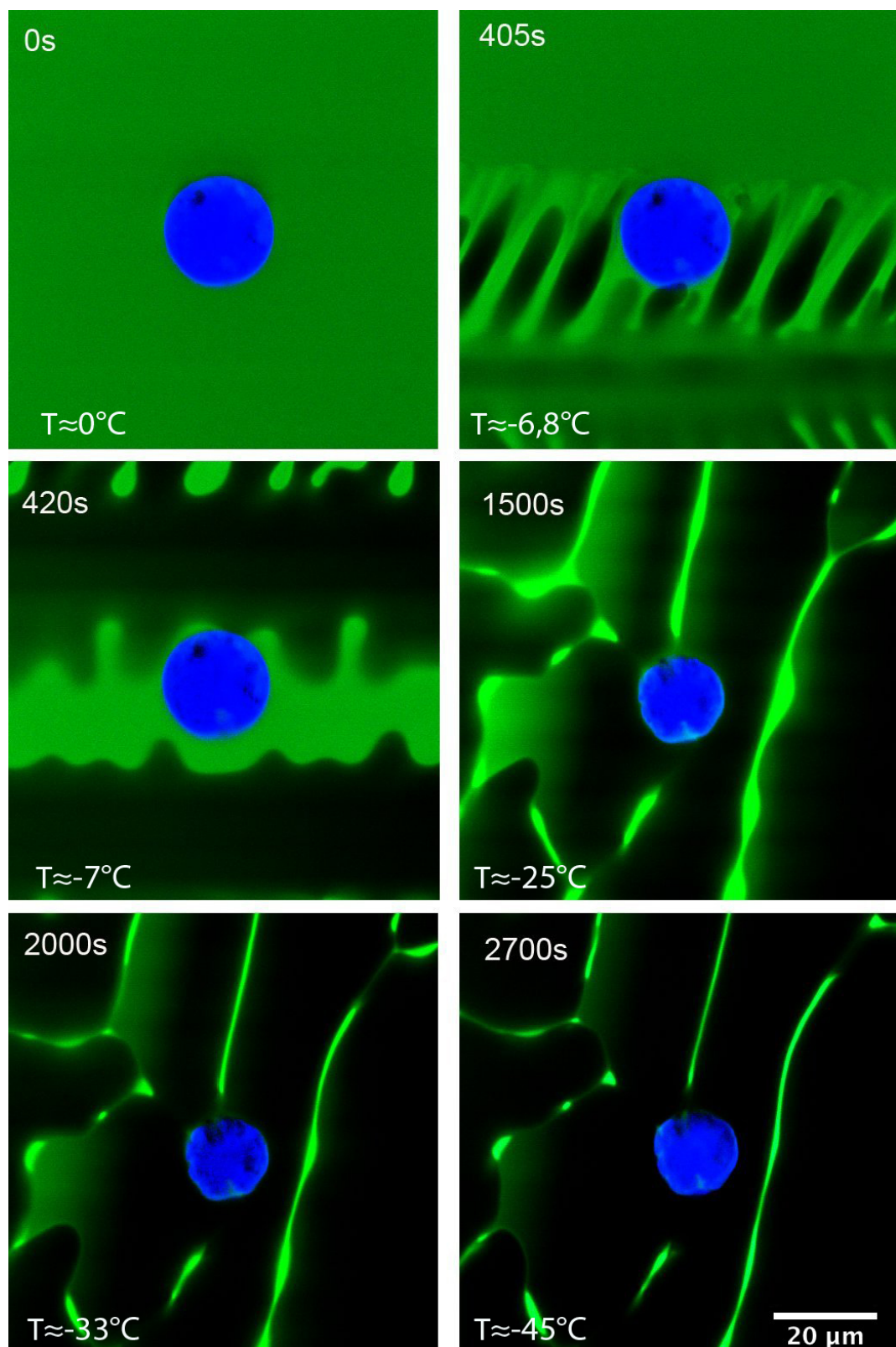


Abb. 4.18: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie: Exemplarische Darstellung einer Zeitserie mesenchymaler Stammzellen während der Kryokonservierung; separierte Detektion von Zelle (blau) und Medium (grün); Start der Sequenz bei 0°C .

In den folgenden Versuchen soll durch die direkte Messung (MPLSM) der Zelle während des Einfrierens das Zellvolumen und die verbleibende Flüssigphase gemessen und korreliert werden. Um die zelluläre Reaktion auf den Phasenübergang untersuchen zu können, wurden die Zellen während des Einfriervorgangs mittels Laser-Scanning-Mikroskopie vermessen. Die Zellen wurden mit der in der Kryokonservierung üblichen Konzentration 10%(v/v) DMSO im Kryomedium konserviert. Zur separierten Detektion von Zelle und Medium wurden diese durch geeignete Farbstoffe fluoreszenzmarkiert. Das Volumen der Schmelze (Flüssigphase) ist, da dieser nur Wasser entzogen wird, näherungsweise antiproportional zur Osmolarität. Diese Abhängigkeit soll in den folgenden Versuchen nachgewiesen werden. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die Zellen 15 min mit Calcein Blue (Invitrogen) inkubiert ($2\mu\text{l/ml}$). Zur Visualisierung der Flüssigphase wurde das Kryomedium ($IBMT^{STEM}$) mit 5% (v/v) 1mM Fluoresceinlösung versetzt. Vor der Kryokonservierung wurden die Zellen 5 min im Kryomedium inkubiert. Anschließend wurden $8\mu\text{l}$ Zellsuspension zwischen zwei Deckgläsern in die auf 4°C vorgekühlte Kryokammer gegeben und mit 1K/min eingefroren. Die Probe wurde kontinuierlich mit 1K/min auf -45°C abgekühlt und alle 15 s eine Messung aufgezeichnet. In Abbildung 4.18 wird eine repräsentative Messung des Kryokonservierungsprozesses abgebildet. Die vermessenen Zellen zeigen bis zum Phasenübergang nach 405 s des Kryomediums ein nahezu konstantes Volumen.

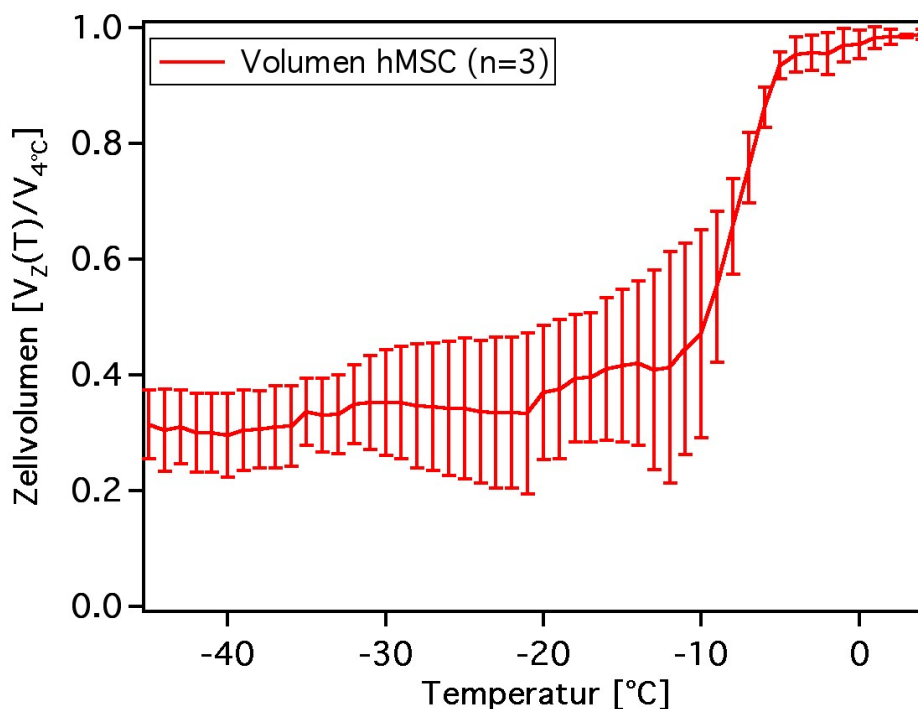


Abb. 4.19: Volumenentwicklung Mesenchymaler Stammzellen während der Einfrierphase, $IBMT^{STEM}$ mit 10%DMSO, abgekühlt mit 1K/min ($n=3$).

Eindeutig sichtbar ist hier auch, dass das Dendritenwachstum (Dendrit im Bild schwarz) durch die Zellmembran gestoppt wird und der Eiskristall sein Wachstum nicht transmembran fortsetzt. Nach 420 s beginnt sich schon die typische Dendritstruktur aufzulösen (Rekristallisation) und es bilden sich einzelne, größere Eiskristalle in einer Restschmelze. Die Zelle befindet sich nach der Kristallisation, umhüllt vom Medium in den dendritischen Kanälen, in der verbleibenden Flüssigphase. Die dendritischen Kanäle zeigen einen dynamischen Formwandel in Größe und Verlauf, da ihnen systematisch mit absinkender Temperatur Wasser entzogen wird und sie dadurch an Volumen verlieren. Zur Bestimmung des Zellvolumens wurden die Messdaten des 1. Kanals (Abbildung 4.18, blau) in *Image J* importiert und die Querschnittfläche der Zelle bestimmt. Aus dieser wurde dann die Zelle als Kreis idealisiert und daraus der Durchmesser errechnet, mit dem dann das Volumen der idealisiert kugeligen Zelle berechnet wurde. Anschließend wurde die zeitliche Entwicklung dieses berechneten Volumens über die Temperatur aufgetragen. Dieser Dehydrationsverlauf zeigt, dass die Zelle bis zum Gefrierpunkt ihr Volumen nicht maßgeblich verändert. Nach dem Phasenübergang jedoch dehydratisiert die Zelle und das Volumen nimmt ab. Bis zum Erreichen einer Temperatur von -20°C hat die Zelle ihr Volumen halbiert (siehe Abbildung 4.19). Mit fortschreitender Abkühlung dehydratisiert die Zelle weiter.

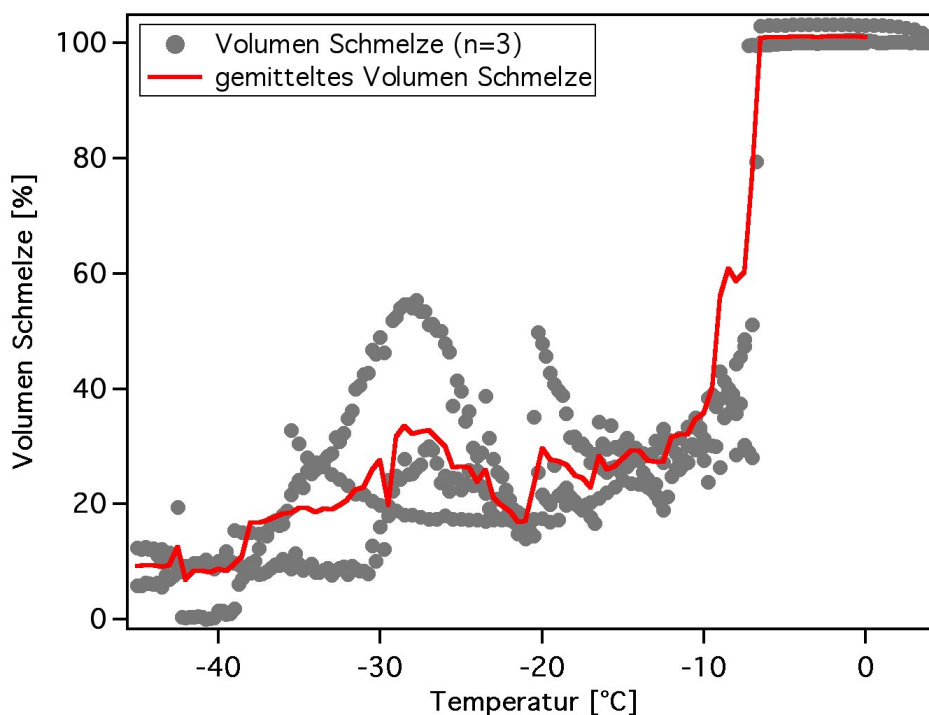


Abb. 4.20: Anteil der Flüssigphase während des Einfriervorgangs mit *IBMT^{STEM}* mit 10%DMSO, abgekühlt mit $1\text{ K}/\text{min}$ ($n=3$).

Um diese Auswertung mit dem Phasenverhalten des Extrazellularraums zu vergleichen, wurden zur Berechnung des Anteils der Flüssigphase die Messungen des 2. Kanals (grün, Abbildung 4.18) ausgewertet. Dies dient dazu, eine Volumenabhängigkeit der Zelle von der verbleibenden Flüssigphase nachzuweisen. Die Reduktion der verbleibenden Flüssigphase ist näherungsweise antiproportional zur Osmolarität, da dieser nur Wasser entzogen wird und die Osmolyte aufkonzentriert werden und die Zelle dadurch Wasser verliert. Wie in Abbildung 4.18 zu erkennen, wird auch das Volumen der Flüssigphase durch das kontinuierliche extrazelluläre Eiskristallwachstum stetig kleiner. Betrachtet man nun den Verlauf der Flüssigphase in Abbildung 4.20, so zeigt sich auch hier, dass diese zwischen dem Phasenübergang und -20°C die größte Reduktion zeigt. Diese rapide Abnahme der Flüssigphase ist durch die Kristallisation des unterkühlten Mediums bedingt. Ihr wird durch das Kristallwachstum schlagartig Wasser entzogen, wodurch zeitgleich die Osmolyte im verbleibenden Medium stark angereichert werden und zu der beschriebenen zellulären Volumenreduktion führen. Somit zeigt sich eine signifikante Abhängigkeit der Reduktion des Zellvolumens mit der Volumenentwicklung der Flüssigphase. Um eine direkte Abhängigkeit der beiden Volumina voneinander nachzuweisen, wurde eine Korrelation zwischen dem temperaturabhängigen Volumen der Zelle und der Schmelze gemacht. In Abbildung 4.21 ist die Korrelation der temperaturabhängigen Volumina aufgetragen. Die Korrelation dieser mit einer Geraden ergibt ein $R^2 = 0.971$ und zeigt somit die direkte Abhängigkeit der Volumina voneinander.

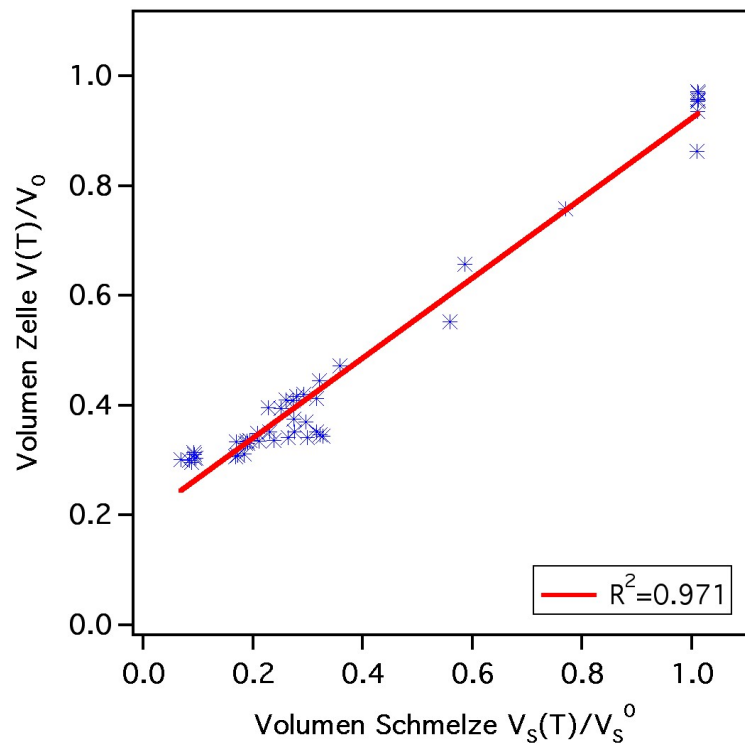


Abb. 4.21: Korrelationsgerade für Zellvolumen und Volumen der Flüssigphase zum Nachweis einer linearen Abhängigkeit des Zellvolumens vom Volumen der Flüssigphase.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine direkte Proportionalität zwischen dem Zellvolumen und dem Volumen der Flüssigphase besteht. Das angewendete Verfahren bietet eine hervorragende morphologische Analysemöglichkeit von Kryokonservierungsprozessen. Jedoch ist eine morphologische Betrachtung des Zellvolumens und der Flüssigphase nicht ausreichend, um die intra- und extrazelluläre Mikrochemie zu analysieren. Gerade diese sind für das Verständnis der Prozesse von großer Wichtigkeit. Denn ebenso wie die Konzentration der Osmolyte sich während des Prozesses verändert, so verändert sich auch die Konzentration weiterer Bestandteile wie CPA's. Wie jedoch dieser Anstieg der CPA Konzentration im Extrazellularraum die intrazelluläre Mikrochemie und den Wasserhaushalt beeinflusst, kann nur mit einem spektroskopischen Verfahren direkt untersucht werden. Um diesen Prozess auch in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration zu analysieren, wird in folgenden Experimenten der Kryokonservierungsprozess mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Raman-Mikroskop abgebildet. Dieses bietet, wie in den zuvor gezeigten Experimenten, eine quantitative Analysemöglichkeit der zellulären Mikrochemie (siehe Abbildung 4.5).

4.2.3 Osmotische Dehydratisierung in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration

Die Dehydratisierung der Zelle wird vom temperaturabhängigen Volumen der Flüssigphase beeinflusst (Kapitel 4.2.2). Dieses Volumen ist wiederum abhängig von der verwendeten Startkonzentration an CPA. Durch eine höhere Startkonzentration an CPA wird das Volumen der Flüssigphase bei den individuellen Temperaturen erhöht. Die Osmolarität steigt hierbei nicht so hoch an wie bei geringeren Einsatzmengen. Somit sollte die Dehydratisierung der Zelle durch die Startkonzentration von CPA beeinflussbar sein. Zur Untersuchung des Einflusses der DMSO-Startkonzentration auf die Dehydratationsvorgänge werden in der folgenden Versuchsreihe suspendierte hMSC in PBS (-/-) mit $1\text{ K}/\text{min}$ mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen (5% und 10% (v/v) DMSO) eingefroren und mit dem Raman-Mikroskop gemessen. Die Messungen wurden in jedem Versuch an verschiedenen Temperaturstufen $+4\text{ }^\circ\text{C}$, $-12\text{ }^\circ\text{C}$ oder $-14\text{ }^\circ\text{C}$, $-40\text{ }^\circ\text{C}$, $-50\text{ }^\circ\text{C}$ und nach dem eutektischen Erstarren [58] bei $-75\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Es wurde in jedem Kryokonservierungsvorgang ($n=3$) nur eine Zelle vermessen. Eine Zelle besteht aus einer Vielzahl einzelner Messpunkte ($n \gg 20$), über die der Mittelwert für die repräsentativen Zellen gebildet wird. Für die Dauer der Messung wird die Temperatur konstant gehalten. Für eine stoffspezifische Auswertung wurden die Amplitudenbilder (Auflösung 64^2 Pixel^2) charakteristischer Schwingungsbanden erstellt. Zur Kontrastierung des Wassers wurden die Banden der OH-Schwingung bei ($\nu \approx 3300\text{ cm}^{-1}$) und für den organischen Anteil die maximale Amplitude der zellulären Bestandteile zwischen $\nu \approx 1600\text{ cm}^{-1}$ bis 1700 cm^{-1} gebildet. Zur Visualisierung der DMSO-Verteilung wird die maximale Amplitude der C-S Schwingung als charakteristische Schwingungsbande für DMSO ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen eines Konservierungsprozesses für hMSC mit 5% (v/v) DMSO sind in Abbildung 4.22 gezeigt.

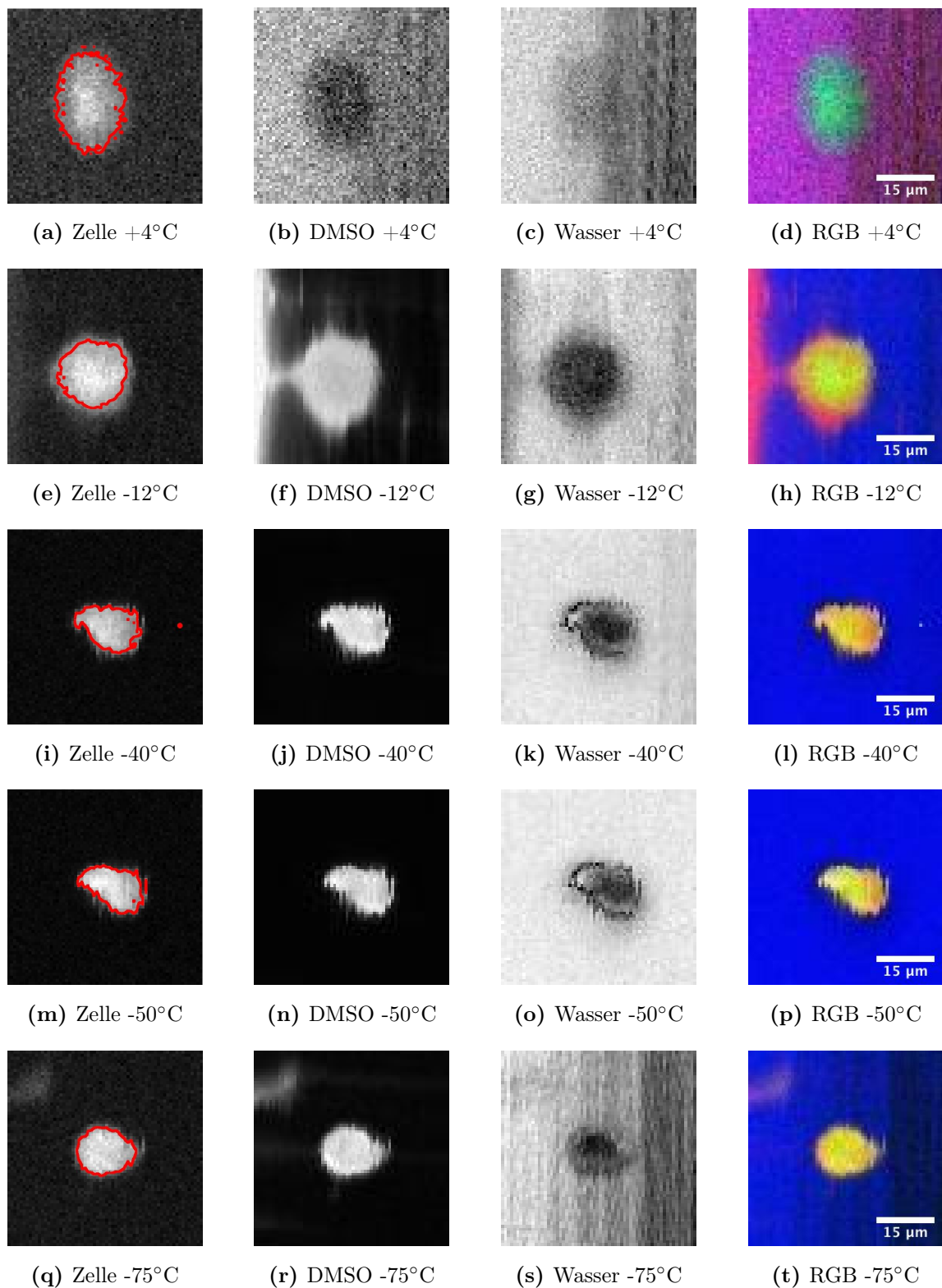


Abb. 4.22: Raman-Spektroskopie: Repräsentative Raman-Bilder der hMSC Linie bei der Kryokonservierung: 1. Spalte: Kontrast hMSC Zelle (zelluläre Bestandteile (O)) bei individueller Temperatur, Auswertungsbereich für die intrazellulären Messwerte rot umrandet, 2. Spalte Kontrast DMSO (D), 3. Spalte Kontrast Wasser (W) und 4. Spalte Falschfarben RGB-Bild mit rot=DMSO, grün=Zelle und blau=Wasser.

In Abbildung 4.22 (a) erscheint der Extrazellularraum lila, da dieser sowohl Wasser als auch DMSO enthält. Nach dem Phasenübergang sieht man die Trennung im Extrazellularraum - gefrorenes Wasser erscheint blau, enthält kein DMSO und die extrazelluläre DMSO-Wasserphase erscheint magentafarben, da ihr Wasser entzogen wurde. Diese Dehydratisierung ist auch in Abbildung 4.22 (g) zu sehen, wo die Zelle dunkler erscheint. Mit weiterem Abkühlen wird auch der Zelle immer mehr Wasser entzogen und DMSO angereichert. Zur quantitativen Analyse der zellulären Dehydratisierung werden die hintergrundkorrigierten Schwingungsamplituden in den rot abgegrenzten Bereichen in der Zelle ausgewertet. Hierfür wird der über die Zelle gemittelte ratiometrische Faktor $R_{W,O}$ (nach Gleichung 3.3) aus der charakteristischen Schwingungsbande für Wasser (wie in Abbildung 4.1 gezeigt) und für den organischen Anteil die maximale Amplitude der zellulären Bestandteile gebildet.

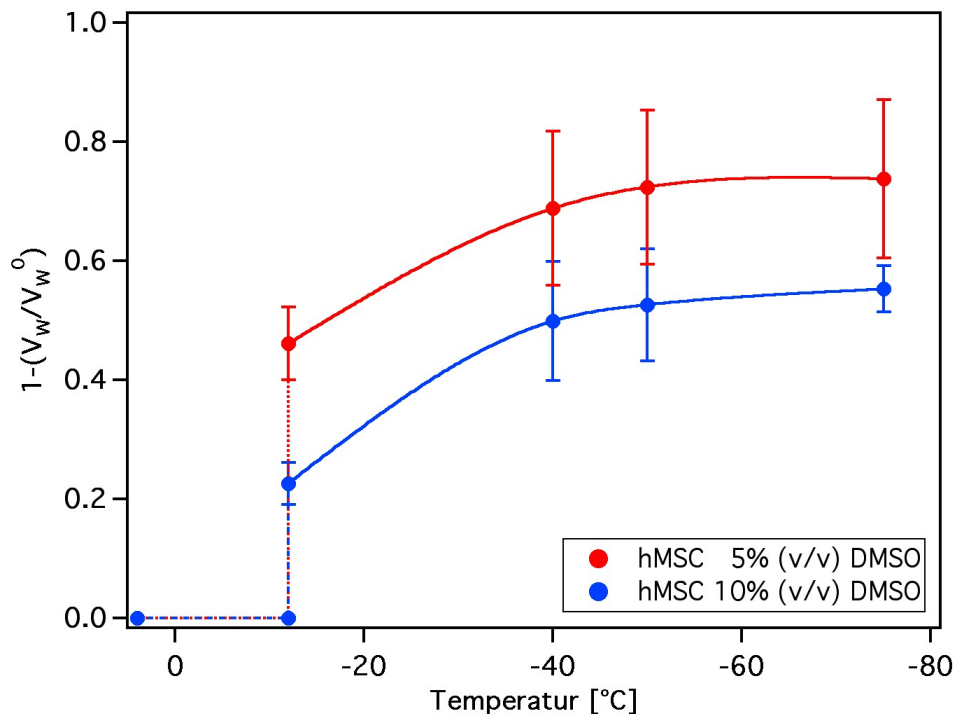


Abb. 4.23: Graphische Auswertung charakteristischer Raman-Banden: Intrazelluläre Dehydratisierung von hMSC bei der Kryokonservierung mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen ($n=3$); gezeigt wird der prozentuale Nettoausfluss an Wasser (Startvolumen Wasser V_W^0 und temperaturabhängiges Wasservolumen V_W).

Zur quantitativen Analyse des Nettoausstromes von Wasser werden die nach 3.3 berechneten Faktoren für Wasser und zelluläre Bestandteile nach Formel 3.9 ausgewertet. Anschließend wird der Wasserausfluss über die Temperatur in Abbildung 4.23 aufgetragen. Die Abbildung zeigt den jeweiligen zellulären Wasserverlust für die verschiedenen DMSO-Konzentrationen bei den individuellen Temperaturen. Der bei 4°C gemessene Wert wird bis kurz vor den Phasenübergang bei -14°C extrapoliert und durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Durch die mit der Kristallisation ansteigende Osmolarität wird die Zelle unmittelbar nach

der Nukleation dehydratisiert. Der Verlust an Zellwasser beträgt kurz nach der Kristallisation bei der mit 10% DMSO etwa 22% und bei 5% DMSO bereits 46%. Beim weiteren Abkühlen steigt der Wasserausfluss bei den Messungen von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ weiter an. Der Kurvenverlauf in Abbildung 4.23 zeigt beim Erreichen der Endtemperatur einen erwartungsgemäß höheren Wasserausfluss bei den Zellen, die in dem schwächer konzentrierten Medium eingefroren wurden. Die Zellen, welche mit 10% DMSO eingefroren wurden, zeigen eine Reduktion von $\Delta V_W = 0.55$ und die mit 5% DMSO eingefroren wurden ein $\Delta V_W = 0.74$. Durch diese Analyse kann also gezeigt werden, dass die zelluläre Dehydratisierung quantitativ messbar ist und durch die DMSO-Startkonzentration maßgeblich beeinflusst werden kann. Auch hier ließ sich wieder beobachten, dass durch diese systematische Dehydratisierung ein intrazelluläres Ausfrieren von Wasser bei beiden Startkonzentrationen erfolgreich verhindert wurde.

4.2.4 Dehydrationsbedingte Anreicherung von DMSO

Durch die Dehydratisierung wird nicht nur die intrazelluläre Osmolarität der extrazellulären angepasst (Kapitel 4.2.2 und 4.2.3), sondern es wird auch die intrazelluläre DMSO-Konzentration erhöht. Das Volumen an intrazellulärem DMSO sollte hierbei, nach Pegg [37] und der Simulation zufolge, unverändert bleiben. Zur Untersuchung des intrazellulären DMSO-Volumens während der Kryokonservierung wird nach Gleichung 3.3 das Verhältnis $R_{D,O}$ bei den individuellen Temperaturen ausgewertet. Die temperaturabhängigen Quotienten (V_D/V_O) werden ins Verhältnis zum Startwert (V_D^0/V_O^0) gesetzt, um das DMSO-Volumen zu analysieren. Ein Sinken des Faktors zeigt einen DMSO-Ausfluss und ein Ansteigen einen Einfluss. Der Kurvenverlauf des DMSO-Volumens in Abhängigkeit von der Temperatur wird in Abbildung 4.24 gezeigt. Unmittelbar nach der extrazellulären Nukleation zeigt sich bei beiden Startkonzentrationen, dass das intrazelluläre DMSO-Volumen ansteigt. Das Volumen an DMSO in der Zelle wird um einen Faktor von 1.4 bei 5%(v/v) DMSO und um 1.5 bei 10%(v/v) DMSO erhöht. Mit sinkender Temperatur wird das intrazelluläre DMSO-Volumen kontinuierlich gesteigert, bis es final bei einer Proben temperatur von $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ sein Anfangsvolumen um einen Faktor von 2.66 bei 5%(v/v) DMSO und um 2.54 bei 10%(v/v) DMSO gesteigert hat. Somit kann durch diese Messreihe gezeigt werden, dass das DMSO-Volumen in der Zelle während der Kryokonservierung nicht konstant bleibt, sondern sukzessiv mit sinkender Temperatur DMSO über die Membran in die Zelle diffundiert. Dies bedeutet, dass die Zellmembran, auch bei tiefkalten Temperaturen zwischen $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht nur für Wasser, sondern auch für DMSO permeabel ist. Die separierte Betrachtung der intrazellulären Wasser- und DMSO-Volumen hat gezeigt, dass die Verwendung niederkonzentrierter DMSO-Lösungen zu einer stärkeren Dehydrierung führt, aber in der Zelle weniger DMSO angereichert wird. Im Vergleich hierzu führen höhere Startkonzentrationen von CPA zu einem größeren DMSO-Volumen in der Zelle und einem geringeren Wasserverlust.

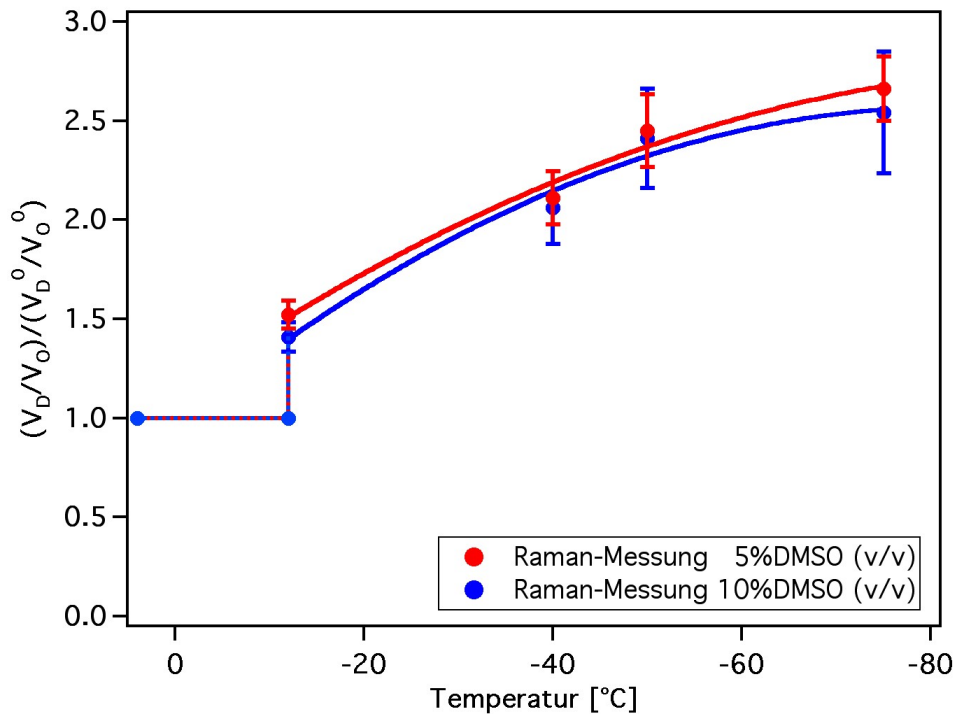


Abb. 4.24: Graphische Auswertung charakteristischer Raman-Banden: Temperaturabhängiges intrazelluläres DMSO-Volumen relativ betrachtet zum Startvolumen in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration (n=3).

Wie sich nun die tatsächliche intrazelluläre DMSO-Konzentration, die durch das Verhältnis von Wasser- zu DMSO-Volumen beschrieben wird, entwickelt, wird in folgender Analyse genauer untersucht. Zur Analyse der intrazellulären DMSO-Konzentration wurden der ratiometrische Faktor $R_{D/W}$ für das Volumenverhältnis von V_D (Volumen DMSO) zu V_W (Volumen gesamt Wasser) analog zu Dong et al. [82] gebildet. Aus diesen wird dann unter Verwendung der in Kapitel 4.1.1 hergeleiteten Gleichung 4.1 die intrazelluläre DMSO-Konzentration berechnet. Die daraus kalkultierten Konzentrationen sind in Abbildung 4.25 über die Temperatur aufgetragen. Die bei -4°C gemessenen intrazellulären DMSO-Konzentrationen liegen mit 3.65% bei 5%(v/v) DMSO und 8.1% bei 10%(v/v) DMSO. Die gemessenen Konzentrationen liegen somit unter der eingesetzten DMSO-Konzentration im Kryomedium. Eine mögliche Ursache für das Abweichen kann das von der Zelle gebundene Wasser im osmotisch inaktiven Volumen (V_b) sein, das mit zum Signal beiträgt. Dieses soll nach Pegg et al. [37] nicht mit DMSO interagieren. Dadurch verschieben sich die über die gesamte Zelle gemittelten Messwerte zu niedrigeren Konzentrationen. Wie in Abbildung 4.25 gezeigt, steigt die DMSO-Konzentration direkt nach dem Phasenübergang an. Beim weiteren Abkühlen steigt die DMSO-Konzentration intrazellulär weiter an und erreicht bei -75°C eine Endkonzentration von 39% (Startkonzentration 10%) und 33.5% (bei Startkonzentration 5%). Die DMSO-Konzentration der Startlösung mit 5%(v/v) DMSO ist im Vergleich zu der Startlösung mit 10%(v/v) DMSO trotz verstärkter Dehydratisierung stets niedriger.

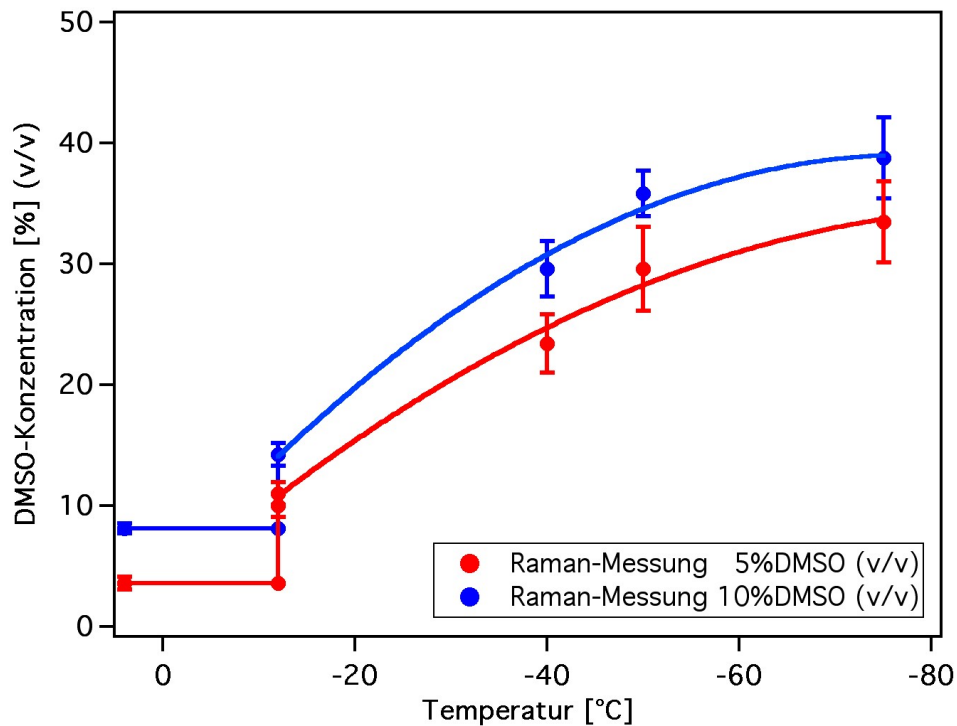


Abb. 4.25: Intrazelluläre DMSO-Konzentration bei der Kryokonservierung in Abhängigkeit von der DMSO-Startkonzentration

4.3 Spezifische Schädigungsmechanismen bei der oberflächenbasierten Kryokonservierung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Laser-Scanning-Mikroskopie in Bezug auf die spezifischen Schädigungsmechanismen bei Kryokonservierung adhärenter Zellen während des Einfrierens vorgestellt. Hierbei wird die natürliche Umgebung der therapeutisch relevanten hMSC-Zellen wie Zelladhäsion und Differenzierungsstatus beibehalten. Die oberflächenbasierte Kryokonservierung stellt im Vergleich zur Konservierung suspendierter Zellen gehobene Ansprüche an den Konservierungsprozess. Isolierte Zellen in Suspension zeigen überwiegend gute Konservierungs- und Lagereigenschaften, jedoch zeigen sie nach dem Auftauen verschlechterte Migrations- und Adhäsionseigenschaften. Die adhärenter Zellen erfahren durch die Dehydratisierung einen Scherstress [86], der Zellen in suspendierter Form weitestgehend erspart bleibt. Im Hinblick auf einen späteren therapeutischen Einsatz kommt ein hauseigenes, xenofreies, chemisch voll definiertes Kryomedium IBMT^{STEM} zum Einsatz [15]. An diesem Zellmodell sollen die im vorherigen Kapitel durch die Raman-Mikroskopie untersuchten physikochemischen Vorgänge und Auswirkungen bei der Kryokonservierung zellulärer Proben auf dieses Modellsystem übertragen werden. Da die Raman-Mikroskopie es aufgrund der langen Bildakquisitionszeiten nicht ermöglicht, reale Einfrierprozesse zu simulieren und hochaufgelöst abzubilden, kommt eine weitere in der Biologie bereits etablierte Mikroskop-

Technologie in einem neuen Anwendungsgebiet zum Einsatz: die Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie. Diese soll es ermöglichen, die untersuchten physikochemischen Vorgänge bei der Kryokonservierung in reale Einfrierprotokolle zu übertragen und hochaufgelöst den Prozess in Echtzeit abzubilden. Die hochaufgelöste Abbildung ist zum Verständnis der verschiedenen Schädigungsmechanismen, die mit der Kryokonservierung einhergehen, unerlässlich, da für eine Optimierung der Kryoprotokolle die intra- und extrazellulären Vorgänge morphologisch hochaufgelöst abgebildet werden müssen, um eine zeitliche Einordnung der Schädigungsmechanismen zu ermöglichen. Es soll spezifisch überprüft werden, ob sich die mit der Raman-Mikroskopie evaluierten Prinzipien in einem realen Einfrierprozess wiederfinden lassen. Hierfür wird im Rahmen dieses Kapitels das Potential dieses nicht-invasiven Verfahrens zur morphologischen Identifikation der Schädigungsmechanismen beurteilt. Für diese Anwendung wurde die Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (MPLSM) mit einem gezielten Markieren der adhärennten Proben erstmals evaluiert. Um das Potential der Prozessoptimierung und Visualisierung bei der MPLSM zu verdeutlichen, wurde mit dem Zellmodell hMSC zunächst das konservative Vorgehen (Stand der Technik) zur Evaluierung eines Kryokonservierungsprozesses abgebildet.

4.3.1 Oberflächenbasierte Kryokonservierung von hMSC

Die etablierte Beurteilungsmethodik zur Evaluierung eines Kryokonservierungsprozesses ist die Auswertung anhand einer Vitalitätsfärbung nach der Kryokonservierung. Die Vitalität der Zellen kann durch eine Lebend-Tod-Färbung bestimmt werden. Zur Positiv-Kontrolle (überlebende Zelle) wird hierbei das zunächst membrangängige unpolare Fluoresceindiacetat (FDA) oder Calcein AM (Fluoresceinderivat) von einem aktiven Metabolismus intrazellulär durch Esterasen umgesetzt. Nach dieser Verstoffwechslung ist es nicht mehr membrangängig und fluoresziert im grünen Spektralbereich. Während des Kryokonservierungsprozesses permeabilisierte Plasmamembrane erlauben keine stabile Färbung der Zelle mit FDA und zeigen keine Fluoreszenz im grünen Spektralbereich. Als Negativkontrolle wird der nicht membrangängige Farbstoff (Ethidiumbromid, Ethidiumhomodimer) verwendet. Dieser kann nur in Zellen mit zerstörter, permeabilisierter Membran eindringen und seine fluoreszierende Eigenschaft durch Binden an die DNA entwickeln. Zellen mit zerstörter Membran zeigen daher eine rote Fluoreszenz im Zellkern. Diese Zellen werden als nicht überlebend angesehen. Eine exemplarische Auswertung einer solchen Vitalitätsfärbung an hMSC nach der einer 24h Lagerung im Kryotank mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen (0, 2, 5, 10%) wird exemplarisch in Abbildung 4.26 gezeigt. Hierbei sind in der Abbildung 4.26 die Zellen vor (a) und nach (b) der Kryokonservierung gegenübergestellt. Nach der Kryokonservierung sind deutliche Unterschiede in der Überlebensrate und in der Zelldichte erkennbar.

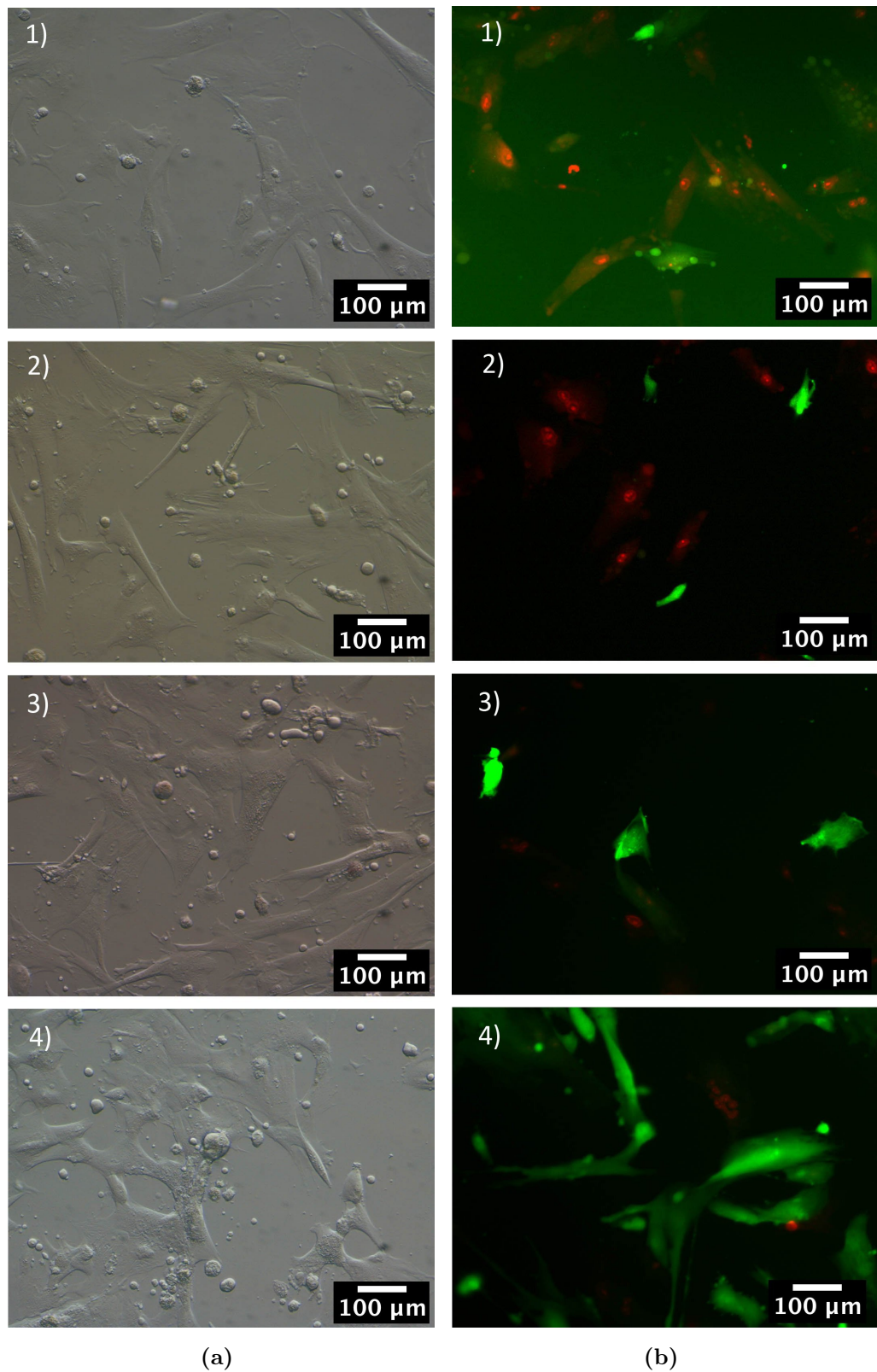


Abb. 4.26: Transmissionsbilder von hMSC vor der Kryokonservierung a 1) bis a 4) und Fluoreszenzbilder des Life Dead Tests nach der Kryokonservierung; eingefroren mit $1\text{ K}/\text{min}$ und einer 24h Lagerung im Kryotank b 1) bis b 4), eingefroren mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen: 0% (Index 1), 2% (Index 2), 5% (Index 3) und 10% DMSO (Index 4).

Die Zellen in der Abbildung 4.26, die mit 10% DMSO eingefroren wurden, zeigen die beste Überlebensrate und die Versuche mit 0% und 2% DMSO die schlechtere. Durch die Auswertung einer signifikanten Anzahl von Zellen bietet diese Methode die Möglichkeit, die zelluläre Vitalität nach der Kryokonservierung prozentual zu bestimmen. Dem in Abbildung 4.26 gezeigten Versuch nach wäre das Einfrieren mit 10% DMSO die ideale Methode. Dieses Vorgehen bietet jedoch nicht ansatzweise die Identifikationsmöglichkeit der mit der Kryokonservierung einhergehenden Schädigungsmechanismen, die der individuellen, zellulären Vitalität und Zelldichte zugrunde liegen, sowie deren zeitliche Einordnung in den Kryokonservierungsprozess. Ferner vermag es diese Technik nicht, potentielle Schädigungsmechanismen mit prozessbeeinflussenden Faktoren in Beziehung zu setzen.

4.3.2 Oberflächenbasierte Kryokonservierung in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration

In diesem Kapitel soll das Potential der Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie zur Bewertung eines simulierten Echtzeit-Kryokonservierungsprozess analysiert werden. Diese Technik soll es ermöglichen, die Schädigungsprozesse morphologisch zu analysieren und sie zeitlich einzuordnen. Hierfür werden vergleichende Untersuchungen zur Kryokonservierung mit hMSC (HCV-MSC) Stammzellen gemacht. Ziel der Versuchsreihe ist es, die Schädigungseffekte, die bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen hervorgerufen werden, zeitlich im Prozess einzuordnen, um ein Verständnis für die Vorgänge während des Abkühlprozesses und der damit einhergehenden Eiskristallbildung zu entwickeln. Hierfür wurden an den hMSC jeweils ($n=3$) verschiedene Kryomedien mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen 0%, 2%, 5% und 10% (v/v) analysiert. Als Basis-Kryomedium wurde das xenofreie (frei von tierischen Zusatzstoffen) IBMT^{STEM} verwendet. Die auf sterilisierten Deckgläsern kultivierten hMSC wurden nach 5 min Inkubation des Kryomediums unverzüglich in die Mikroskopiekammer befördert und mit $1\text{ K}/\text{min}$ auf -80 °C abgekühlt. Während des Einfrierprozesses wurden die Proben kontinuierlich beobachtet und bei 4 °C , 0 °C und dann in 10 °C Schritten bis -80 °C gemessen. Die Zellen wurden zur oberflächenbasierten Kryokonservierung in einem adhärenen Zustand eingefroren. Beim Abkühlen der Zellen lässt sich bis zur Kristallisation des Mediums keine signifikante Änderung in der zellulären Morphologie beobachten. Die gemessenen Proben kristallisierten nach der Unterkühlung des Mediums, unabhängig von der DMSO-Konzentration, zwischen -10 °C und -20 °C . Nach der Kristallisation lassen sich bei den getesteten DMSO-Konzentrationen bereits signifikante Änderungen in der zellulären Morphologie beobachten. Die Proben, die in dem xenofreien IBMT^{STEM} ohne den Zusatz von DMSO eingefroren wurden, zeigen immer eine intrazelluläre Eiskristallbildung (Pfeile, Abbildung 4.27 b)) nach der extrazellulären Kristallisation. Diese intrazelluläre Kristallisation von Wasser ist eine Entmischung des Zytosols und konzentriert es intrazellulär auf. Die Kristalle sind mikroskopisch eindeutig erkennbar, da es durch die Kristallisation zur Ausbildung von nicht fluoreszierenden, asymmetrischen Domänen im Zellinneren (siehe Abbildung 4.27 b)) kommt. Die Eiskristalle können sowohl extra- (Pfeil in Abbildung 4.27 b)+c)) als auch intra-

nuklear (Pfeil* Abbildung 4.27 b) +c)) vorkommen. Ein Wachstum dieser Kristalle bei der DMSO-freien Kryokonservierung ließ sich nach der -30°C Messung nicht mehr beobachten. Nach dem Auftauen zeigte sie in Abbildung 4.27 d) (Pfeil*) eine sichtbare Schädigung durch den geschmolzenen Eiskristall. Die Verwendung von niederkonzentrierteren DMSO-Lösungen mit 2% DMSO führte in mehreren Versuchen ebenfalls zu einer Eiskristallbildung. Zellen, die bei dieser Konzentration keine intrazellulären Eiskristalle aufwiesen, zeigten jedoch eine starke Dehydratisierung (siehe Pfeile in Abbildung 4.27 f),g)). Durch die geringe Startmenge an DMSO werden die Osmolyte stark aufkonzentriert [87] [58]. Die Zellen dehydratisieren so stark, dass sie, wie in in Abbildung 4.27 f),g) zu sehen, ihren morphologischen Ursprungszustand (Abbildung 4.27 e) gänzlich verändern. Nach der Kryokonservierung zeigen diese Zellen in 4.27 h) eine dem Ursprungszustand 4.27 e) vergleichbare Morphologie, jedoch ist auch bei diesen ein Zytosolaustritt durch den Verlust der Intensität im grünen Spektralbereich zu verzeichnen. Selbiges lässt sich auch bei der Kryokonservierung mit 5% DMSO zu beobachten. Diese Änderung ist auch hier zu sehen, exemplarisch gezeigt an der markierten Zelle in Abbildung 4.27 j) bei -30°C . Diese morphologischen Änderungen sind auf die Dehydratisierung zurückzuführen. Dieser Volumenverlust und die Deformation nehmen mit weiterem Abkühlen bis zum Erreichen der Endtemperatur von -80°C zu. Dadurch reduziert sich auch die Adhäsionsfläche der Zelle. Es lässt sich somit ein dehydrationsbedingtes Ablösen der Zellen (exemplarisch in Abbildung 4.27 (g)) beobachten. Nach der Analyse der Zellen bei der Lagertemperatur von -80°C wurden die Zellen mit $60\text{ K}/\text{min}$ auf 4°C erwärmt. Die finale Messung beim Erreichen von 4°C zeigt, dass die Zellen wieder durch die sinkende Osmolarität rehydratisiert werden und an Volumen zunehmen. Beim Auftauen ist, abhängig von der DMSO-Konzentration, ein Zytosolaustritt zu erkennen. Dieser Verlust zeigt sich durch eine Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz und deutet auf eine permeabilisierte Zellmembran hin (4.27 d)). Diese Ereignisse lassen sich auch bei einer anderen untersuchten hMSC-Linie (hMSC-AT) beobachten. Die aus dem Fettgewebe extrahierten Zellen der hMSC-AT-Linie wurden ebenfalls zur Kryokonservierung mit dem xenofreien IBMT^{STEM} mit verschiedenen Konzentrationen von CPA nach selbigem Protokoll gefärbt und eingefroren. Hierbei zeigten auch diese Zellen bei der DMSO-freien Kryokonservierung in Abbildung 4.28 (a) bis (d) ein vergleichbares Verhalten wie die zuvor untersuchten Zellen. Beim Abkühlen der hMSC-AT konnte von 4°C auf -10°C ebenfalls keine Änderung der zellulären Morphologie beobachtet werden. Die Proben gingen unabhängig von der verwendeten DMSO-Konzentration zwischen -10°C und -20°C in einen kristallinen Phasenzustand über. Die Proben mit 2% und 5% zeigen eine intrazelluläre Eiskristallbildung (Abbildung 4.28 c)). Durch die intrazelluläre Eiskristallbildung kommt es zu einer Aufkonzentrierung des Zytosols [26]. Das mit sinkender Temperatur voranschreitende Wachstum der Kristalle führt nicht nur zu einer steigenden Dehydratisierung des Zytosols, sondern auch zu einer Dislokation der Zellorganellen. Dieses Verhalten zeigt sich in Abbildung 4.28 (b) bis (c) (Pfeil).

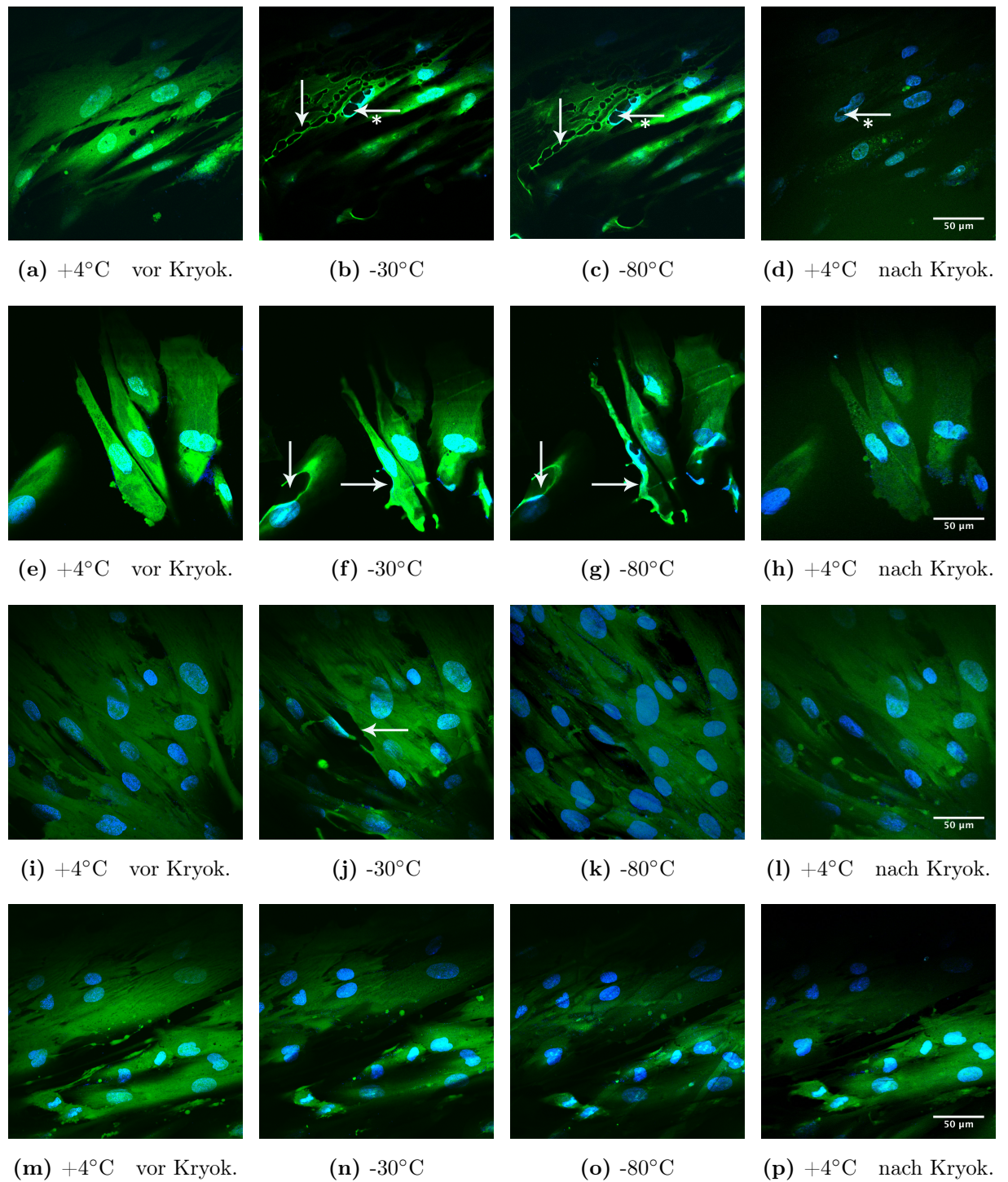


Abb. 4.27: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie von HCV-MSC, eingefroren in *IBMT^{STEM}* mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen, gemessen vor der Kryokonservierung bei 4°C; im gefrorenen Zustand bei -30°C, -80°C; sowie nach der Konservierung bei 4°C: (a)-(d) ohne DMSO; (e) bis (h) mit 2% DMSO; (i) bis (l) mit 5% DMSO; (m) bis (p) mit 10% DMSO.

Die Verwendung von niederkonzentrierten DMSO-Kryomedien (2% DMSO) führte auch bei diesen Zellen zu einer intrazellulären Eiskristallbildung und zur Dehydratisierung beim Abkühlen auf die Lagertemperatur. Diese Dehydratisierung ist auch bei den Zellen zu beobachten, die mit 5% (v/v) DMSO kryokonserviert wurden. Bei beiden Proben zeigt sich durch den Volumenverlust ein Ablösen der Zellen vom Substrat. Dies verdeutlicht sich an dem Verschwinden einiger Zellen aus dem Bildausschnitt. Die Präsenz der Zellkerne (* blauer Nukleus) in den Bildern 4.28 (f),(g) bei 2% und 4.28 (j), (k) bei 5% zeigt, dass die Fokalebene beibehalten wurde, sich jedoch einige Zellen vom Substrat abgelöst haben. Nach dem Erwärmen der Probe mit 60 K/min auf 4 °C ist festzustellen, dass nur noch wenige Zellen an dem Substrat adhären und diese eine permeabilisierte Membran aufweisen, da die Zytosolfärbung deutlich abgenommen hat. Dieses erschließt sich aus Abbildung 4.28 (d), da der strukturelle Erhalt der Zellen nicht mehr gegeben ist und die Probe den Prozess nicht überstanden hat. Die Kryokonservierung mit 10% brachte auch bei der hMSC-AT Linie (repräsentative Abbildung 4.28 (m) - (p)) die besten Erfolge. Die Zellen zeigten keine intrazelluläre Eiskristallbildung und keine ausgeprägte Deformation. Auch nach der Kryokonservierung konnte kein Zytosolaustritt durch permeabilisierte Membranen beobachtet werden. Durch die Verwendung der MPLSM lassen sich die Beobachtungen aus Abbildung 4.26 nachvollziehen und auch Erklärungsansätze zu den vorliegenden Schädigungsmechanismen herleiten. So konnte gezeigt werden, dass bei der DMSO-freien Kryokonservierung und der mit niederen DMSO-Konzentrationen (2% DMSO) die als tödlich für die Zelle angesehene intrazelluläre Eiskristallbildung [16] beobachtet werden konnte. Diese setzt bei beiden Konzentrationen direkt nach dem extrazellulären Phasenübergang auch intrazellulär ein. Demzufolge sind niedere DMSO-Konzentrationen nicht ausreichend, um eine intrazelluläre Eiskristallbildung gänzlich zu verhindern. Die Zellen, bei denen eine intrazelluläre Eiskristallbildung beobachtet wurde, zeigten auch, durch den Verlust der Fluoreszenz, einen Zytosolaustritt, der auf permeabilisierte Membranen schließen lässt. Zellen, die einen Zytosolaustritt zeigten, wiesen nicht zwangsläufig eine intrazelluläre Eiskristallbildung auf. Bei höheren DMSO-Konzentrationen (5% DMSO) ließ sich in den Experimenten keine intrazelluläre Eiskristallbildung beobachten. Bei diesen Experimenten ließ sich eine starke Dehydratisierung, die ebenfalls in Kapitel 4.2.3 beschrieben wurde, beobachten. Diese ist in gewissen Bereichen so ausgeprägt, dass die adhärenente Zelle sich vom Substrat ablöst (Abbildung 4.28 i-l). Eine Konzentration von 10% DMSO zeigte die besten Ergebnisse, wie auch die Studie von Zeissberger et al. [16] belegt. Bei dieser Konzentration wurde keine intrazelluläre Eiskristallbildung beobachtet und die Dehydratisierung ist, wie in Kapitel 4.2.3 analysiert wurde, weniger ausgeprägt als bei niederen Konzentrationen. Somit ist bei der DMSO-freien und bei niederen DMSO-Konzentrationen die intrazelluläre Eiskristallbildung als Schädigungsmechanismus anzusehen. Bei gesteigerten DMSO-Konzentrationen ist es die zelluläre Dehydratisierung, die sich mit steigender DMSO-Konzentration reduziert.

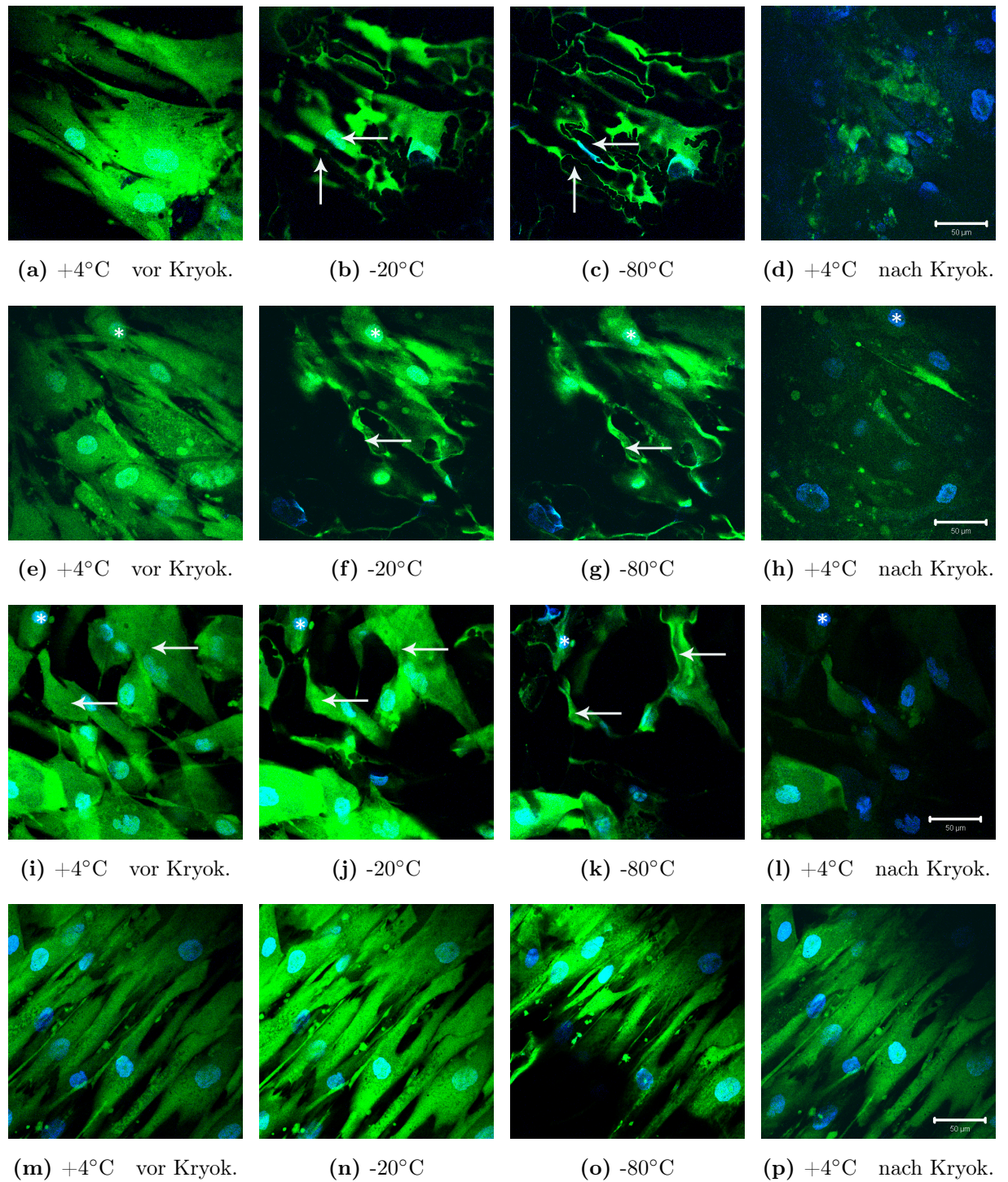


Abb. 4.28: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie von MSC-AT, eingefroren in $IBMT^{STEM}$ mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen, gemessen vor der Kryokonservierung bei 4°C; im gefrorenen Zustand bei -20°C, -80°C; sowie nach der Konservierung bei 4°C: (a)-(d) ohne DMSO; (e) bis (h) mit 2% DMSO; (i) bis (l) mit 5% DMSO; (m) bis (p) mit 10% DMSO, adaptiert aus [15].

4.3.3 Oberflächenbasierte Kryokonservierung mit verschiedenen Abkühlgeschwindigkeiten

Wie von Mazur beschrieben, hängt die zelluläre Dehydratisierung nicht nur von der verwendeten DMSO-Konzentration, sondern auch von der angelegten Kühlrate ab (siehe Kapitel: 2.2.3) [35]. Durch Abkühlgeschwindigkeit kann ebenfalls die zelluläre Dehydratisierung maßgeblich beeinflusst werden. Beim Einfrieren unter Gleichgewichtsbedingungen wird der Zelle nach der extrazellulären Nukleation so viel Wasser entzogen, bis ein Gleichgewichtszustand intra- zu extrazellulär eingestellt ist. Wird jedoch die Abkühlrate erhöht, wird das Einstellen dieses Gleichgewichtes verhindert und es verbleibt zu viel Wasser in der Zelle. Somit kann zwar durch die Wahl einer hohen Abkühlrate die zelluläre Dehydratisierung reduziert werden, jedoch besteht das Risiko, dass zu viel Wasser in der Zelle verbleibt und spontan intrazellulär kristallisiert.

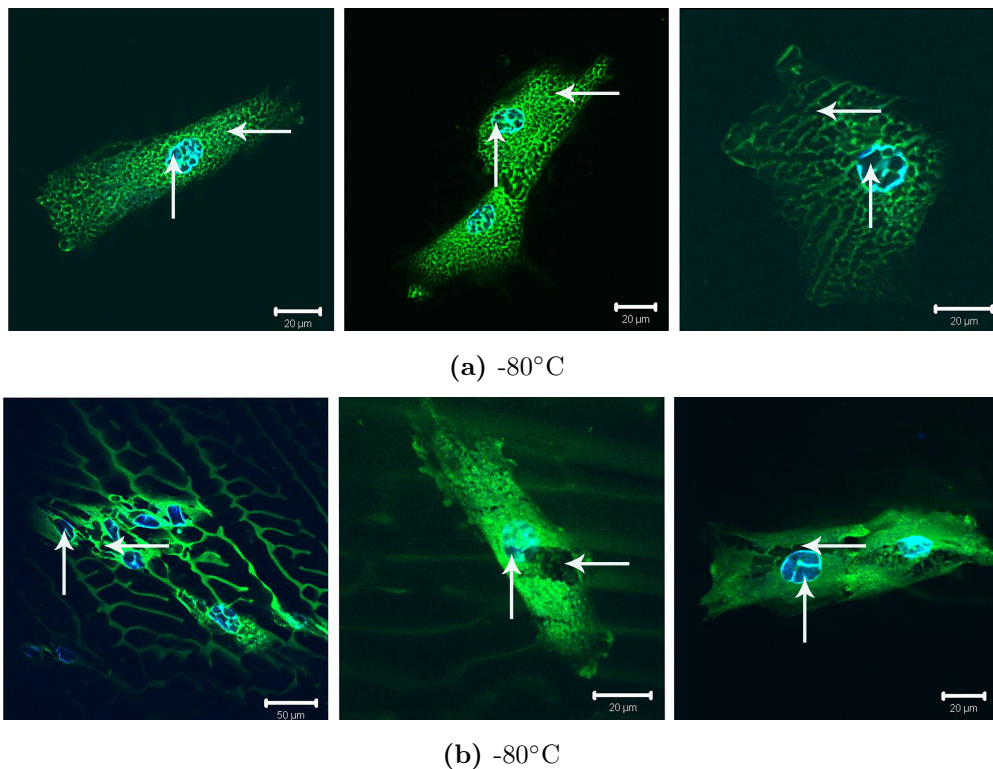


Abb. 4.29: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie: Kryokonservierung adhärenter Zellen in Abhängigkeit von der Kühlrate und die Entstehung von intrazellulären Eiskristallen bei der Verwendung höherer Kühlraten: hMSC in 10% DMSO-Kryomedium, abgekühlt mit a) 100 K/min und b) 10 K/min .

Dieser Prozess führt zu einer irreversiblen Schädigung und geht mit einem Vitalitätsverlust der Proben einher. Zur Untersuchung des Einflusses der Abkühlgeschwindigkeit bei der oberflächenbasierten Kryokonservierung wurden die hMSC (wie in Kapitel 4.3.2) verwendet. Ziel dieser Versuchsreihe war es, bei der zuvor ermittelten idealen DMSO-Konzentration von 10% zu überprüfen, ob sich bei der Anwendung höherer Kühlraten ebenfalls eine intrazelluläre

Eiskristallbildung vermeiden lässt. Daher wurden die Zellen nach selbigem Vorgehen kultiviert und für die Kryokonservierung vorbereitet. Die Zellen für diese Versuchsreihe wurden in einem Kryomedium mit 10% DMSO inkubiert und anschließend abgekühlt. Die Präparation der Proben erfolgte wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben. Da die mesenchymalen Stammzellen, wie in den Versuchen 4.27 (m)-(p) und 4.28 (m)-(p) in Kapitel 4.3.2 beschrieben, keine intrazelluläre Eiskristallbildung bei hohen DMSO-Konzentrationen zeigten, wird in dieser Untersuchung geprüft, ob sich die Ergebnisse von Kapitel 4.3.2 bei der Anwendung höherer Kühlraten reproduzieren lassen. Die hMSC wurden mit dem identischen Kryoprotektiv aus 4.27 (m)-(p) und einer Kühlrate von $100\text{ K}/\text{min}$ eingefroren. Nach der Abkühlung auf -80 °C wurden die Zellen gemessen. In mehreren unabhängigen Experimenten ($n > 3$) wurde eine intrazelluläre Eiskristallbildung festgestellt. Abbildung 4.29 a) zeigt repräsentative Messungen der Zellen die mit $100\text{ K}/\text{min}$ abgekühlt wurden. Die horizontalen Pfeile markieren die intrazellulär und die vertikalen die intranuklear präsenten Eiskristalle. Bei der Zelle in Abbildung 4.29 a) rechts zeigten sich im Zellkern Eiskristallgrößen von $7\text{ }\mu\text{m}^2$ bis $43\text{ }\mu\text{m}^2$. Die Eiskristalle nehmen im Zellkern 40% der Querschnittsfläche ein. Im Zytosol konnten bei dieser Zelle Eiskristalle bis $206\text{ }\mu\text{m}^2$ Größe gefunden werden. Hierbei nehmen einzelne Kristalle sogar eine Fläche von 5% des Zytosols ein. Da durch die Wahl der Kühlrate mit $100\text{ K}/\text{min}$ die intrazelluläre Eiskristallbildung nicht verhindert werden konnte, wurde diese für die folgenden Experimente auf $10\text{ K}/\text{min}$ reduziert. Die hMSC wurden identisch präpariert und ebenfalls auf -80 °C abgekühlt. Auch diese Zellen zeigten in den Experimenten ($n > 3$) eine signifikante intrazelluläre Eiskristallbildung (Abbildung: 4.29 b)). Die Präsenz der Eiskristalle in der Zelle war auch bei diesen Versuchen intra- als auch extranuklear. Somit konnte auch für die hMSC gezeigt werden, dass bei der Anwendung von Kühlraten die größer $10\text{ K}/\text{min}$ betragen, eine intrazelluläre Eiskristallbildung zu erwarten ist. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die L929 Linie nachgewiesen [26].

4.3.4 Membranpermeabilisierung nach der Kryokonservierung

Wie in den vorherigen Experimenten beobachtet wurde (Abbildungen: 4.26, 4.27, 4.28), zeigten einzelne Zellen nach der Kryokonservierung einen Verlust der Färbung des Zytosols. Dieser Verlust deutet auf eine Permeabilisierung der Membran hin. Diese Permeabilität wird sich bei der Lebend-Tod-Färbung zu Nutze gemacht, da der Farbstoff zum Markieren der Zellen, die nicht überlebt haben, nur durch eine defekte Membran ins Zellinnere gelangt. Mit dieser Methode werden die Zellen nach der Kryokonservierung (Abbildung 4.26) analysiert. Aussagen über die Membranintegrität vor der Kryokonservierung können mit dieser Methode jedoch nicht getroffen werden. Dies ermöglicht jedoch die Untersuchung mit dem Multiphotonen Mikroskop. Die Zellen (siehe Abbildungen: 4.27, 4.28) zeigen bei der Färbung mit Calcein eine intakte Membran vor der Konservierung und den Verlust der Membranintegrität nach dem Auftauen durch einen Verlust der Zytosolfärbung. Bei diesen Untersuchungen wurde demonstriert, dass das Zytosol aus dem Zellinneren ins Medium diffundiert. Im Rahmen der folgenden Experimente soll eine alternative Herangehensweise und die Untersu-

chung der Diffusionsrichtung bei der Membranpermeabilisierung untersucht werden. Hierzu wird der Extrazellularraum mit Farbstoffmolekülen unterschiedlicher Größe angefärbt. Es wurden zwei verschiedene Farbstoffe mit unterschiedlichem Molekulargewicht dem Medium zugegeben, die bei intakter Membran diese nicht permeieren können.

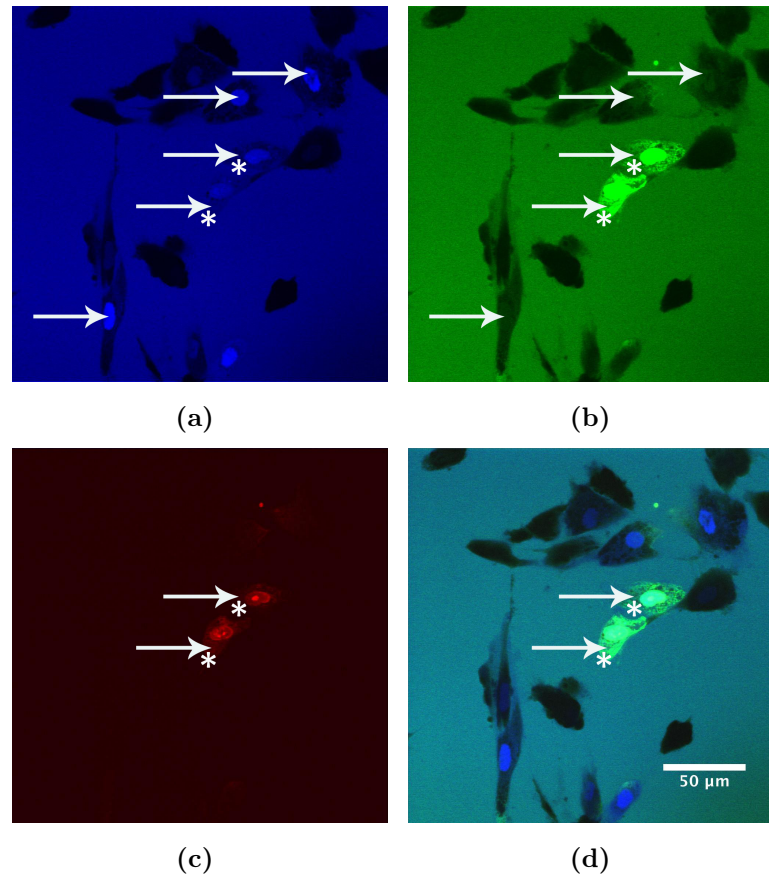


Abb. 4.30: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie: Membranpermeabilisierung nach der Kryokonservierung: a) Eindringen von Cascade Blue in Zellen; b) Eindringen von FITC-Dextran in Zellen c) Totfärbung von Zellen d) Überlagerung von a)-c) zum Nachweis, dass nur FITC-Dextran in die toten Zellen aus Abbildung c) eindringt.

In folgenden Experimenten wurden die Farbstoffe Cascade Blue (Acetyl Azide Trisodium Salt; $M_W = 607.424 \text{ g/mol}$, Invitrogen C2284, $\lambda_{em} = 396\text{-}410 \text{ nm}$) und Fluorescein-Isothiocyanate-Dextran (FITC-Dextran), $M_W = 150000 \text{ g/mol}$, Sigma Aldrich 46946, $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$) ins Medium gemischt. Die FITC-Konzentration im Medium betrug 0.22 mg/ml . Für diese Experimente wurden die hMSC auf Deckgläsern kultiviert, mit $IBMT^{Stem}$ -Cascade Blue-FITC und 2% DMSO inkubiert, anschließend mit 100 K/min auf -40 °C abgekühlt und mit 60 K/min wieder auf 4 °C erwärmt. Zur Überprüfung der Membranintegrität in Verbindung mit dem Eindringen der Farbstoffe wurde der Farbstoff Ethidiumhomodimer mit einer Konzentration von $2 \mu\text{l/ml}$ dem verwendeten Kryomedium zugesetzt. Dieser Farbstoff dringt nur durch permeabilisierte Membranen ein und führt zu einer Färbung des Zellkerns mit einer Fluoreszenz im roten Spektralbereich. Für diesen Versuch wurde wieder ein Kryomedium aus $780 \mu\text{l}$

IBMT^{STEM}, 200 μl FITC-Stammlösung und 20 μl DMSO verwendet. Zusätzlich wurden dem Kryomedium 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Cascade Blue und 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Ethidiumhomodimer zugesetzt.

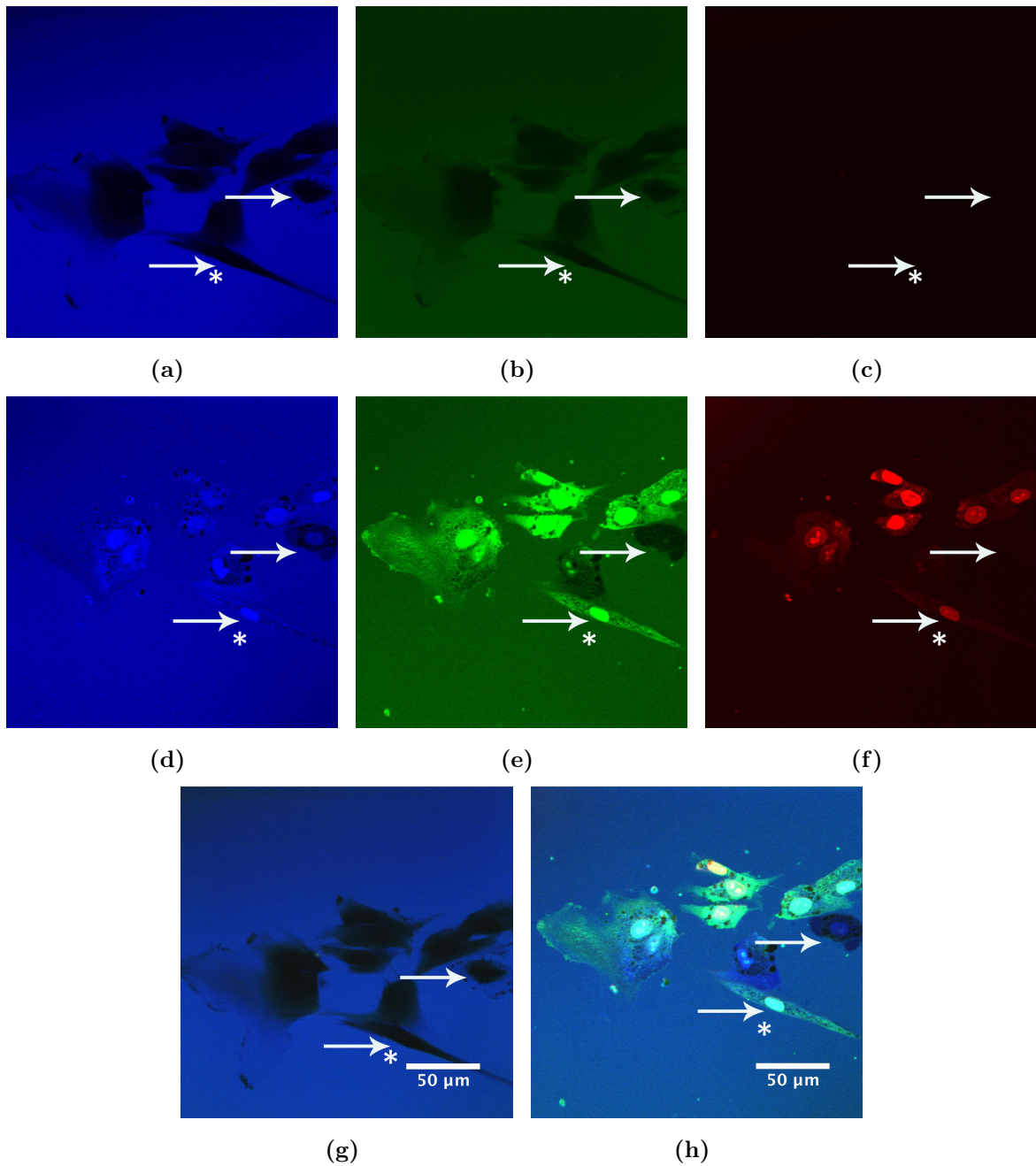


Abb. 4.31: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie: hMSC bei 4 °C vor und nach der Kryokonservierung: bei a)-c) und g) vor der Kryokonservierung: a) Cascade Blue, b) Fluorescein Dextran, c) Fluoreszenzkanal für Totfärbung (kein Signal) und g) Überlagerung von a), b) und c); d)-f) und h) nach der Kryokonservierung: d) Cascade Blue dringt in Zellen ein, e) Fluorescein Dextran dringt in Zellen ein, f) Totfärbung der Zellen und h) Überlagerung von Cascade Blue und Fluorescein Dextran und der Totfärbung.

Die Zellen wurden abgekühlt und wieder erwärmt. Nach dem Erwärmen zeigen die Zellen in Abbildung 4.30 a) (Pfeil) ein Eindringen des niedermolekularen Cascade Blue im Zellkern. In dem selben Bildausschnitt lassen zwei Zellen 4.30 a) (Pfeil*) die Präsenz des blauen Farbstoffes im Extranuklearraum erkennen. Selbige Zellen weisen zudem ein Eindringen des höhermolekularen FITC auf 4.30 b) (Pfeil *). Bei der Betrachtung des Ethidiumhomodimers zeigen diese Zellen ebenfalls eine Fluoreszenz im roten Spektralbereich. Dies bestätigt, dass die Membran permeabilisiert wurde. Somit geht das Eindringen des nieder-molekularen Farbstoffes Cascade-Blue nicht zwangsläufig mit dem Eindringen des Ethidiumhomodimers einher. Ferner lassen diese Zellen (Pfeile) eine Anreicherung des Farbstoffes im Zellkern und keine homogene Verteilung (Pfeil*) über die Zelle erkennen, was auf eine temporäre Durchlässigkeit für den Farbstoff schließen lässt. Das Eindringen des höher-molekularen Farbstoffs in Abbildung 4.30 b) und c) geht mit einer offensichtlichen Membranpermeabilisierung einher. Die Zellen, die eine intrazelluläre Anreicherung des Farbstoffes zeigen, haben ebenfalls eine Fluoreszenz des Ethidiumhomodimer (856.77 g/mol). In einem weiteren Versuch mit identischem Kryoprotokoll wurde die Probe vor dem Einfrieren analysiert. Die Zellen zeigen in Abbildung 4.31 a) keine intrazelluläre Fluoreszenz von Cascade Blue, 4.31 b) keine von FITC und 4.31 c) keine von Ethidiumhomodimer. Abbildung 4.31 g) zeigt die Überlagerung der Kanäle. Um eine dem Kryokonservierungsprozess vorhergehende Zellschädigung auszuschließen, wurde in diesem Experiment die Probe an der selben Stelle vor und nach dem Prozess betrachtet. Der Probenausschnitt zeigt keine intrazelluläre Präsenz von Cascade Blue in Abbildung 4.31 a), noch von FITC in Abbildung 4.31 b) und keine positive Fluoreszenz des Ethidiumhomodimers in Abbildung 4.31 c). Abbildung 4.31 g) zeigt die Überlagerung der Kanäle. Nach dem Abkühlen zeigt sich hier in Abbildung 4.31 d) eine intrazelluläre Präsenz des Cascade Blue in allen Zellen. Ebenso lassen die Zellen in Abbildung 4.31 e) überwiegend das Eindringen des FITC erkennen, mit Ausnahme einer Zelle (Pfeil). Die Zellen, die eine eindeutige intrazelluläre Präsenz von FITC aufweisen, zeigen auch eine positive Kernfärbung (Pfeil*) des Ethidiumhomodimers in 4.31 e). Abbildung 4.31 h) zeigt die Überlagerung der Kanäle. Somit konnte hier demonstriert werden, dass die verwendeten Farbstoffe erst nach der Kryokonservierung eine intrazelluläre Fluoreszenz aufweisen und dies auf eine Schädigung der Membran zurückzuführen ist.

Kapitel 5

Diskussion

Dehydration und Zytosolzusammensetzung - Simulation und Messungen im Vergleich

Der von *Pegg et al.* [37] beschriebene Einfluss der DMSO-Konzentration auf die osmotische Dehydratisierung von Zellen während der Kryokonservierung konnte im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. Es soll nun die Simulation den Zellexperimenten gegenübergestellt werden. Die qualitativen Annahmen bezüglich der Dehydratisierung konnten durch die repräsentative Messreihe an der hMSC Linie experimentell nachvollzogen und auch überprüft werden. In quantitativer Hinsicht konnte die Simulation nicht bestätigt werden; die Begründungen und Verbesserungen werden im Folgenden vorgestellt und diskutiert. Wie in Kapitel 4.2.2 gezeigt wurde, ist das Zellvolumen und somit die zelluläre Hydratisierung von dem Volumen der verbleibenden Flüssigphase abhängig. Begründet wird dies durch die antiproportionale Abhängigkeit der zellulären Hydratisierung von der Osmolarität. Diese ist wiederum abhängig von der DMSO-Konzentration, die je nach Einsatzmenge (Abbildung 4.14) das Volumen der verbleibenden Flüssigphase beeinflusst. Somit lässt sich die ausgeprägtere Dehydratisierung für niedrigere DMSO-Konzentrationen erwarten und ein niedriger Wasserverlust für höhere DMSO-Konzentrationen. Diese konnten durch die Raman-Messungen (Abb. 5.1) eindeutig experimentell belegt werden. In Abbildung 5.1 wird der anhand der aufgestellten Simulation (siehe Kapitel 4.2.1) berechnete Wasserverlust für hMSC, für einen Kryokonservierungsprozess mit 5% (v/v) DMSO und 10% (v/v) DMSO beschrieben. Dem gegenübergestellt werden die gemessenen mittleren Wasserverluste der Zellen in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration. Eine Gegenüberstellung zeigt eine qualitative Übereinstimmung zwischen der Theorie (gestrichelte Linie) und den experimentellen Daten (durchgezogene Linie). Diese begründet sich dadurch, dass die gemessenen Wasserverluste dem prinzipiellen Trend der berechneten Werte folgen und dass der Wasserverlust bei niederkonzentrierteren DMSO ausgeprägter ist.

Da die experimentellen Ergebnisse (durchgezogene Linie) bei beiden Konzentrationen jedoch deutlich unter den aus der Simulation berechneten Werten (gestrichelt) liegen, ist eine

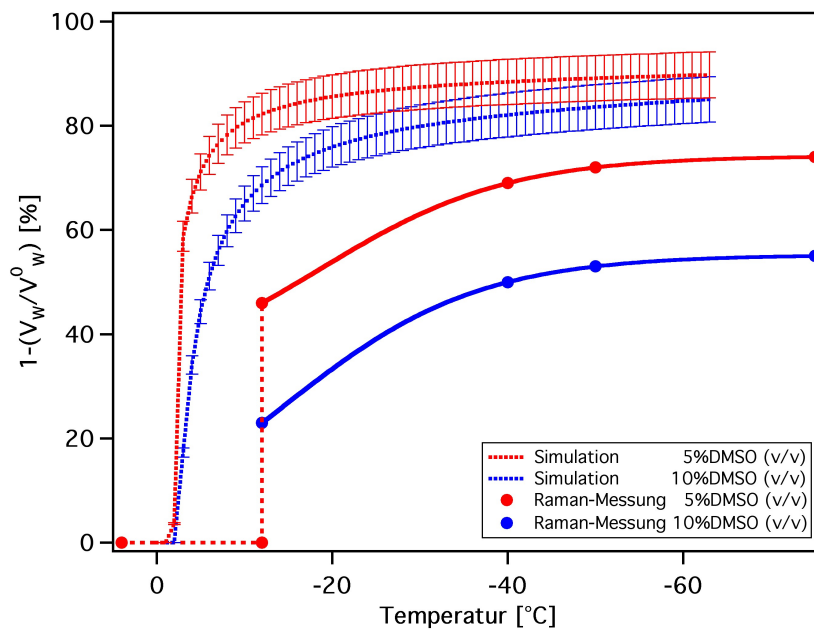
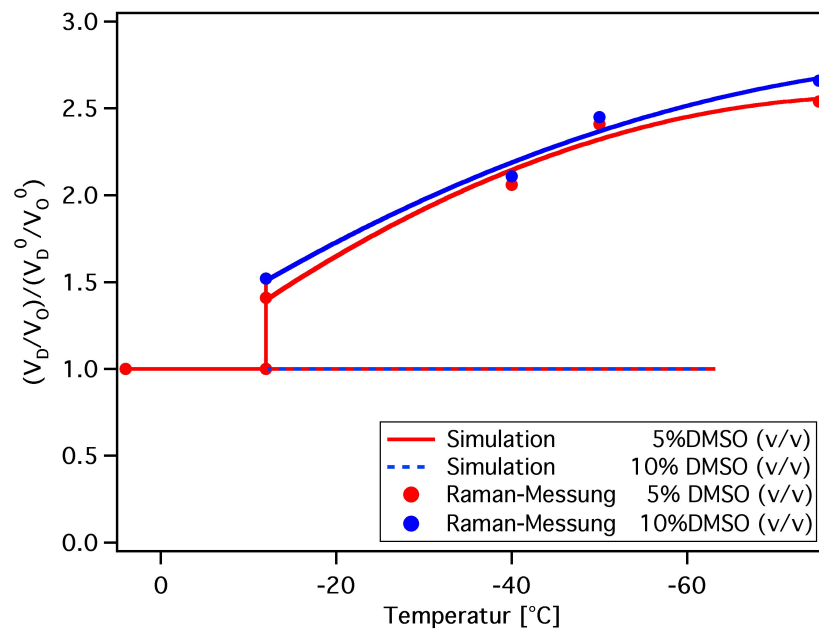


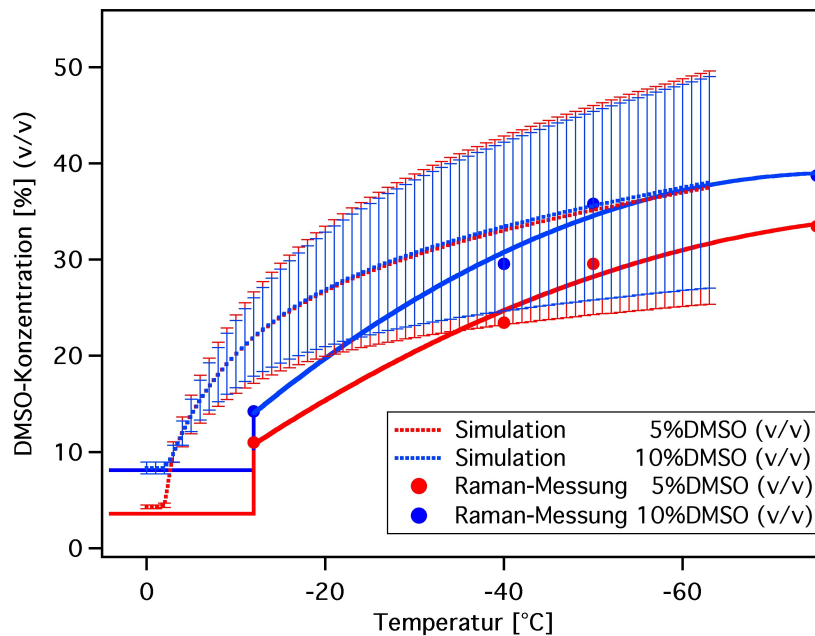
Abb. 5.1: Graphische Gegenüberstellung des experimentell bestimmten relativen Wasserverlusts (durchgezogene Linie) während der Kryokonservierung von hMSC mit $1\text{ K}/\text{min}$ im Vergleich zu den aus der Simulation (gestrichelte Linie) berechneten Werten für MSC, bei verschiedenen DMSO (rot und blau).

quantitative Übereinstimmung nicht festzustellen. Der Simulation zufolge würde bei der Verwendung eines Kryomediums mit 5% (v/v) DMSO der Wasserverlust am Eutektikum T_E über 85% liegen. Der gemessene Wasserverlust liegt allerdings bei 74%. Die Verwendung bei der 10% Lösung hingegen zeigt einen Verlust von 55% anstatt der erwarteten Dehydratisierung $> 80\%$. Ein Erklärungsansatz zu dieser Abweichung kann bei der Betrachtung der intrazellulären DMSO-Menge gefunden werden. *Pegg et al.* beschreiben, dass DMSO nur mit dem freien Wasser des OAV wechselwirkt und dass das Verhältnis von DMSO zu Osmolyten konstant bleibt (siehe Kapitel 2.2.2). Diese Aussage impliziert, dass das Verhältnis von DMSO zu zellulären Bestandteilen ebenfalls konstant bleiben muss und das Volumen nicht verändert wird. Erwartungsgemäß dürfte sich dieser Quotient aus den Volumen DMSO zu zellulärem Material mit sinkender Temperatur nicht verändern und müsste konstant bleiben. Eine Gegenüberstellung der Messwerte (durchgezogene Fit-Linie) von DMSO und organischem Zellmaterial mit den berechneten Werten zeigt in Abbildung 5.2 (a) eine deutliche Abweichung von der Simulation.

Der Theorie zu Folge wird die intrazelluläre Menge an DMSO durch den Anteil des OAV vom Zellvolumen und die extrazelluläre DMSO-Konzentration bestimmt (siehe Grundlagen) und sollte durch den osmotischen Wasserentzug nicht verändert werden. Diese Annahme spiegelt sich auch in den berechneten Werten aus der Simulation für die verwendeten Konzentrationen wieder. Bei diesen bleibt das Verhältnis aus DMSO und zellulären Bestandteilen über den gesamten Prozessverlauf konstant. Die Messdaten (durchgezogene Fit-Linie) zeigen jedoch einen signifikanten DMSO Anstieg nach dem Phasenübergang (Abbildung 5.2 (a)). Da



(a)



(b)

Abb. 5.2: Graphische Gegenüberstellung des experimentell bestimmten, relativen Verhältnisses (durchgezogene Linie) von DMSO zu Zellmaterial während der Kryokonservierung von hMSC mit 1 K/min im Vergleich zu den aus der Simulation berechneten Werten (gestrichelte Linie) bei verschiedenen DMSO (rot und blau).

die Partialvolumina der zellulären Bestandteile konstant sind, kann eine Veränderung dieses Quotienten nur auf eine veränderte Menge von DMSO zurückgeführt werden. Ein Ansteigen des Quotienten, wie in Abbildung 5.2 (a) zu sehen ist, lässt auf eine Diffusion von DMSO in

die Zelle nach dem extrazellulären Phasenübergang schließen. Da DMSO über die Membran in die Zelle diffundiert, muss davon ausgegangen werden, dass das gebundene Wasser nicht konstant ist und in Lösung gehen oder mit dem OAV wechselwirken kann. Die Betrachtung der intrazellulären DMSO-Konzentration in Abbildung 5.2 (b) zeigt den erwarteten Anstieg der DMSO-Konzentration. Hier wurde die in den Experimenten gemessene und aus der Simulation berechnete DMSO-Konzentration in Abhängigkeit von der Temperatur für die beiden Startkonzentrationen 5% (v/v) und 10% (v/v) aufgetragen. Diese steigt in der Versuchsreihe direkt nach der Kristallisation des Mediums intrazellulär an. Die finale DMSO-Konzentration, gemessen bei -75 °C unterhalb des eutektischen Erstarrens der Lösung, zeigt bei beiden Lösungen innerhalb der Zelle eine im Rahmen der Streuung verlaufende Konzentrationsentwicklung. Die finale intrazelluläre DMSO-Konzentration unterhalb des Eutektikums beträgt ca. 39%. Vergleichbare Untersuchungen wurden mit 1xPBS, 10% DMSO und ebenfalls einer Kühlrate von $1\text{ K}/\text{min}$, von *Dong, J. et al* [82] an Säugetierzellen mit vergleichbarem Ergebnis gemacht. In seiner Messreihe betrug bei -50 °C die in drei Messreihen gemittelte, intrazelluläre DMSO-Konzentration 39.5% (v/v).

Bezüglich der Modellannahmen der Simulation konnte eine qualitative Übereinstimmung der Dehydratisierung und DMSO-Konzentrationsentwicklung nachgewiesen werden. Die Modellannahmen waren jedoch hinsichtlich einer konstanten Menge an intrazellulärem DMSO fehlerhaft. Eine Anpassung des Modells wird in Abbildung 5.3 vorgestellt. Diese zeigt im oberen Teil der Abbildung das konservative Modell und im unteren Teil die im Rahmen dieser Experimente erarbeitete angepasste Version des Modells. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Varianten besteht darin, dass im angepassten Modell das OIV der Zelle als veränderliche Größe betrachtet wird. Das OIV besteht aus den zellulären Bestandteilen (C) und dem gebundenen Wasser (W_b). Hierbei wird jedoch das gebundene Wasser nicht mehr als konstant angesehen. Seine Fähigkeit mit dem freien Zellwasser (W_f) des OAV zu interagieren wird durch die gestrichelte Trennlinie der beiden Fraktionen gekennzeichnet. Dieser Ansatz wird von Pegg bereits erwähnt und findet auch in der Literatur Beachtung [88] [37] [89]. Neben den zellulären Bestandteilen (C) werden auch im angepassten Modell die Osmolyte (O) im OAV als unveränderliche Größe betrachtet. Dies wird im Modell durch eine durchgezogene Trennlinie zwischen den Fraktionen symbolisiert. Da durch die Kristallisation von Wasser zu Eis (E) dem Medium freies Wasser (W_f) entzogen wird, steigt die Osmolytkonzentration im Medium an.

Diese Diffusion findet während des Kryokonservierungsprozesses auch noch unterhalb von -50 °C statt, wie die Daten aus den Experimenten der hMSC-Linie belegen. Durch diesen Nettostrom von DMSO über die Membran verändert sich das intrazelluläre Verhältnis zwischen DMSO und Osmolyten. Diese Verschiebung wird in Abbildung 5.4 in einem ternären Phasendiagramm illustriert. Die grüne Linie (Abbildung 5.4) zeigt den theoretischen Verlauf einer 10% DMSO (v/v) Lösung mit einem NaCl von 0.9%. Wenn beim Abkühlen dem System nur Wasser entzogen wird, folgt der Weg durchs Phasendiagramm einer Geraden [87]. Da intrazellulär DMSO angereichert wird, erfolgt der Verlauf jedoch nicht mehr linear. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis von Osmolyten zu DMSO und die Konzentrationskurve

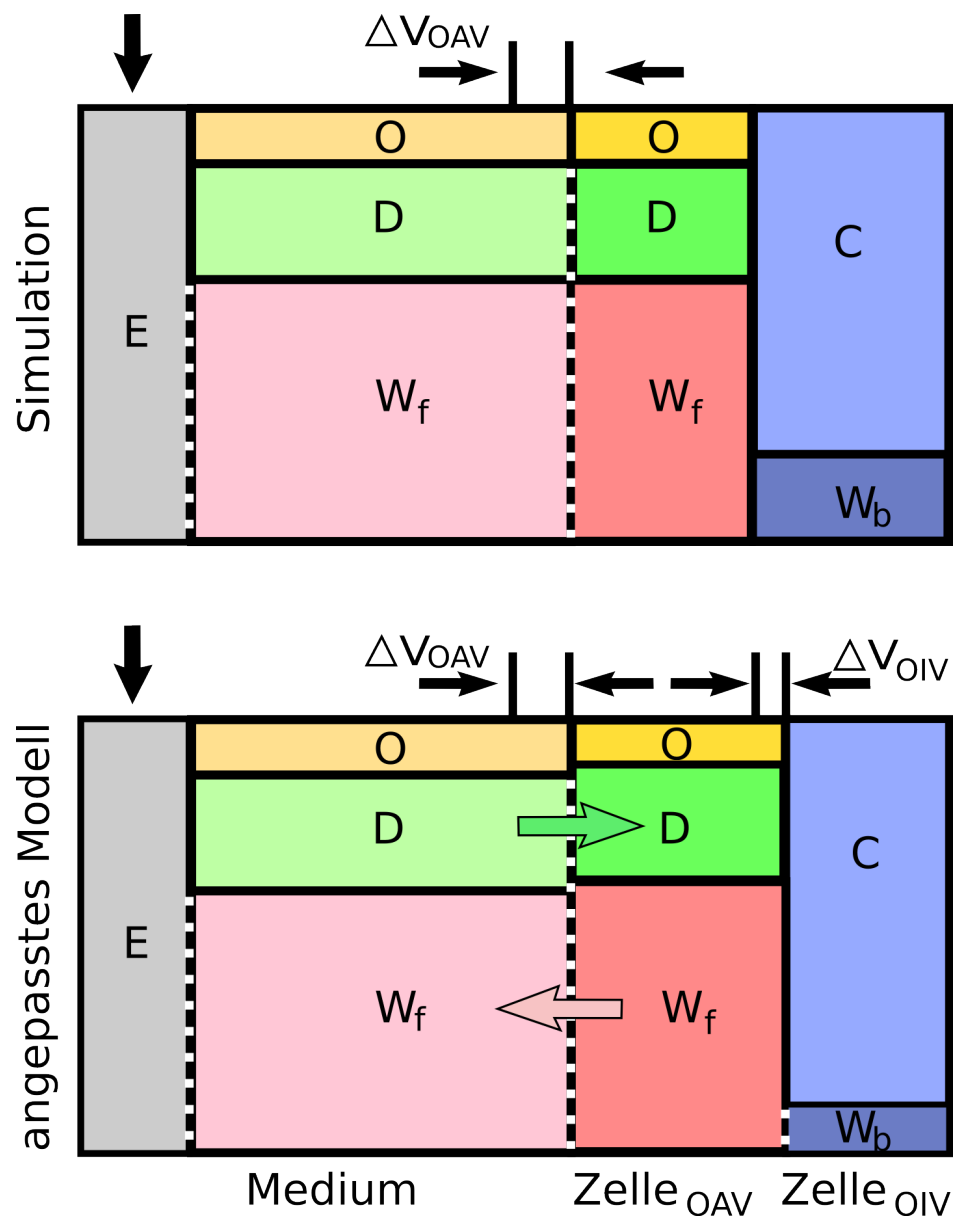


Abb. 5.3: Schematische Darstellung des Modells zur osmotisch bedingten Dehydratierung während der Kryokonservierung; oben: Pegg-Modell mit veränderlichem OAV, unten: aus Experimenten hergeleitetes und angepasstes Modell mit veränderlichem OAV und OIV.

wird durch die violette Linie (Abbildung 5.4) beschrieben. Durch diese Erkenntnisse wird die Modellierung der intrazellulären Prozesse bei der Kryokonservierung beliebig kompliziert und hängt sehr stark von den zellspezifischen Parametern ab. Aus diesen Experimenten lässt sich jedoch folgern, dass das osmotisch inaktive Volumen bei der Kryokonservierung nicht konstant bleibt.

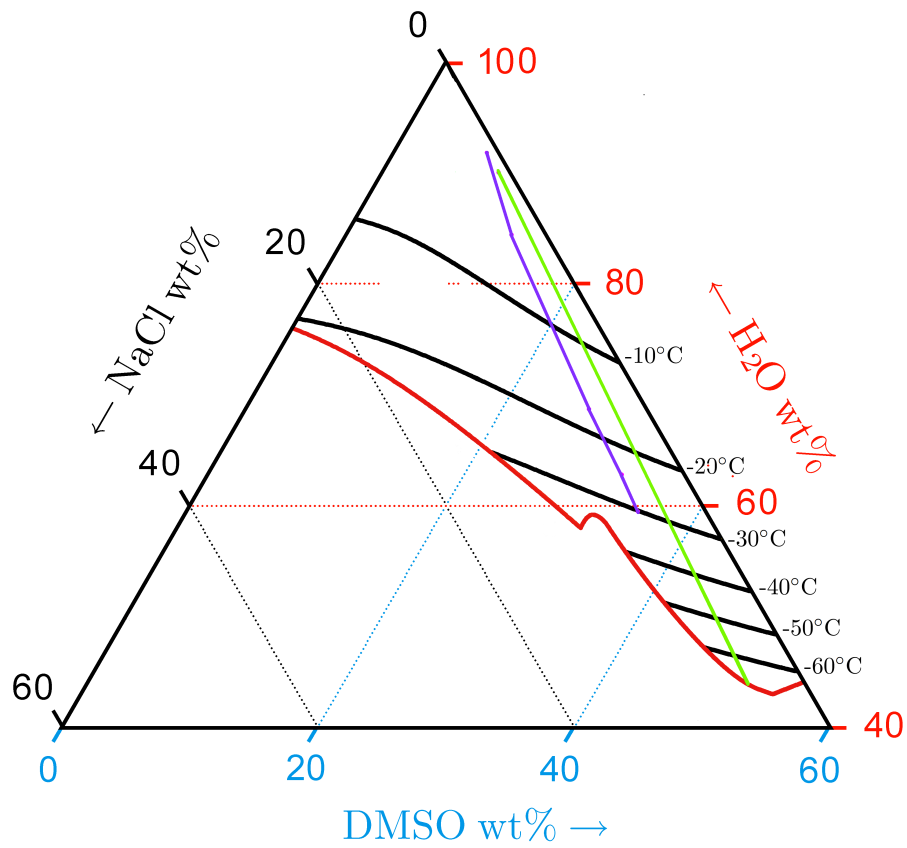


Abb. 5.4: Tenäres-Phasendiagramm (adaptiert und verändert aus [90]) mit theoretischem, extrazellulären Verlauf (grün) und aus den Experimenten hergeleitetem, intrazellulären Verlauf (violett).

Optimierung eines Kryoprotokolls zur oberflächenbasierten Kryokonservierung

Aus den zuvor beschriebenen Resultaten mit der hMSC-Zelllinie und den beschriebenen Schädigungsmechanismen wurde ein Algorithmus (Handlungsvorschrift zur Problemlösung) zur online-Evaluierung eines Kryoprotokolls entwickelt. Im ersten Schritt werden die Zellen von ihrer physiologischen Umgebung bei einer Temperatur von 7°C mit der gewählten Konzentration an CPA inkubiert. Im zweiten Schritt wird anschließend die Probe mit einer gewählten Abkühlrate ($\Delta T^{K/min}$) unter stetiger Beobachtung bis zur Kristallisation des Mediums abgekühlt. Ein wichtiger Moment zur Entwicklung eines erfolgreichen Kryoprotokolls liegt unmittelbar nach der extrazellulären Kristallisation. Geht mit dieser eine intrazelluläre Eiskristallbildung (IEKB) einher, so ist die Wahl der CPA Konzentration oder die Abkühlrate optimierungsbedürftig. Wie in den hMSC Versuchen gezeigt wurde, führt eine zu niedrige Konzentration an CPA zu einer intrazellulären Eiskristallbildung direkt nach der extrazellulären Nukleation. Diese IEKB kann mehrere Ursachen haben: Entweder war die gewählte Abkühlrate zu hoch (siehe Abbildung: 4.29) oder die DMSO-Konzentration zu niedrig (siehe Abbildung: b)) oder eine Kombination aus beidem. Wurde die Probe mit niedrigeren Abkühlraten (ca. 1 K/min) eingefroren, empfiehlt es sich, die CPA-Konzentration zu erhöhen. Bei höheren Abkühlraten (ca. 10 K/min) sollte diese reduziert werden. Da, wie bei der IEKB (in Abb. 4.29) gezeigt wurde, diese in Abhängigkeit von der Abkühlgeschwindigkeit ist. Hat die Probe den extrazellulären Phasenübergang ohne schädigende IEKB überstanden, so wird die Probe weiter abgekühlt. In dem Temperaturbereich zwischen extrazellulärer Nukleation und dem Erreichen der Lagertemperatur kann es durch die mit sinkender Temperatur zunehmende Dehydratisierung (siehe Abbildung 4.27 f), g)) zum Beispiel auch zum Ablösen der Zellen (siehe Abbildung 4.28 i) - k)) vom Substrat kommen. Dieser Dehydratisierung kann zum einen durch eine höhere Abkühlrate entgegengewirkt werden, da durch ein schnelleres Einfrieren der Zelle weniger Zeit für einen Wasserausfluss zur Verfügung steht. Andererseits kann durch eine Erhöhung der CPA-Konzentration ebenfalls die Dehydratisierung gemindert werden (siehe Abbildung 4.23). Wirkt man dieser durch eine Erhöhung der Abkühlrate entgegen, so erhöht man das Risiko einer Zellschädigung durch eine IEKB. Beim Auftreten einer IEKB muss in einem nächsten Iterationsschritt mit einer Absenkung der gewählten Einfrierrate oder eine Erhöhung der CPA Konzentration entgegengewirkt werden. Nach dem unbeschadeten Erreichen der gewünschten Lagertemperatur kann die Probe wieder erwärmt werden. Zeigen die Zellen nach dem Erwärmen eine inakzeptable Anzahl von permeabilisierten Membranen, so empfiehlt es sich, den Prozess mit veränderten Parametern zu wiederholen. Zur Optimierung empfiehlt es sich, bei niedrigen Konzentrationen von CPA (DMSO kleiner 5%) die Konzentrationen zu erhöhen, wenn keine IEKB festzustellen war. Die Ursache der Schädigung wäre dann eine zu starke Dehydratisierung, der durch höhere DMSO-Konzentrationen entgegengewirkt werden kann. Die Optimierung der Abkühlrate kann an dieser Stelle auch betrachtet werden, kann jedoch nur empirisch erfolgen. Etwaige Verbesserungen sind im Folgeversuch visuell zu begutachten. Haben die Zellen den Konservierungsvorgang

mit einer akzeptablen Überlebensrate überstanden, können die Zellen in Kulturbedingungen überführt werden. Diese Handlungsvorschriften sind in dem Algorithmus in Abbildung 5.5 zusammengefasst dargestellt.

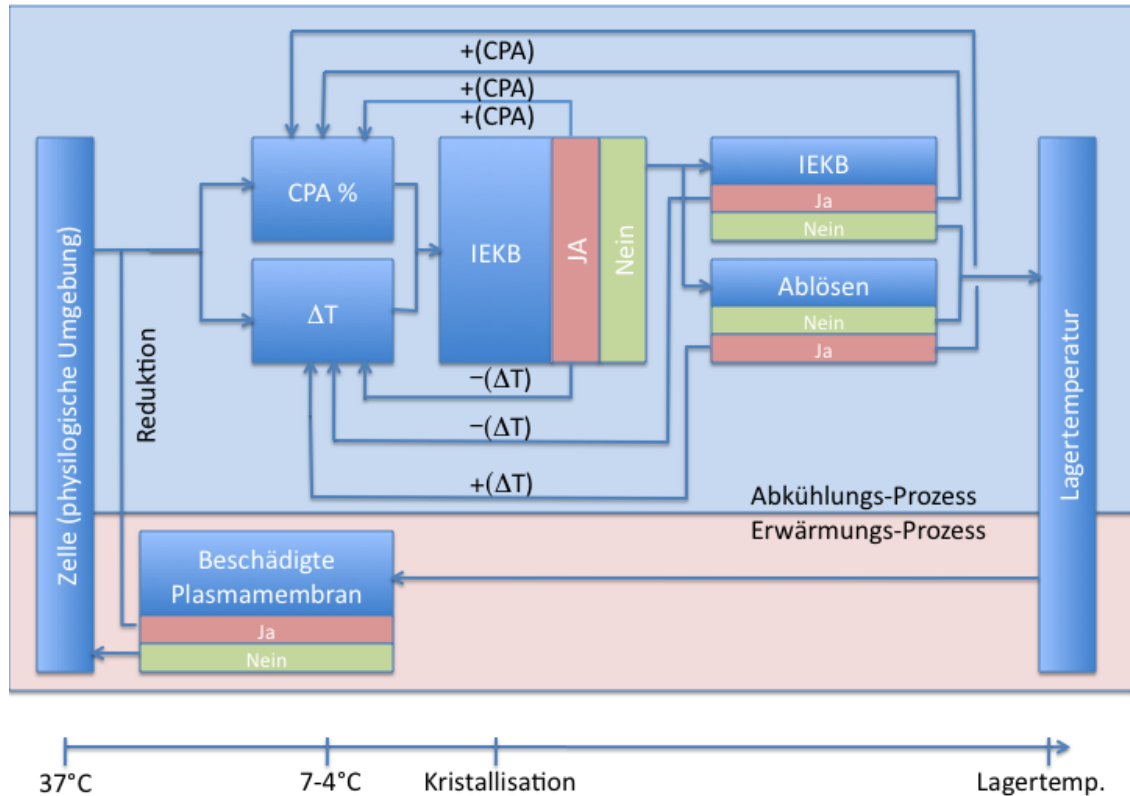


Abb. 5.5: Algorithmus zur online-Evaluierung eines Kryoprotokolls: Verfahrensschema zur Änderung der Kühlraten und DMSO-Konzentrationen in Abhängigkeit von potentiellen Schädigungsmechanismen, die während der Kryokonservierung eintreten.

Zur exemplarischen Evaluierung eines Kryoprotokolls anhand des Optimierungsalgorithmus von Abbildung 5.5 wurde die hESC-Linie verwendet. Die Zellen wurden für 5 min in den individuellen Kryomedien bei 4°C inkubiert und zunächst mit 1 K/min abgekühlt. Als Start-Kryomedium wurde das im Rahmen der hMSC etablierte Kryomedium *IBMT^{Stem}* mit 10% DMSO gewählt. Die Zellen wurden in die auf +4°C gekühlte Linkam-Kryokammer transferiert und mit einem LSM beobachtet. Abbildung 5.6 a) zeigt einen repräsentativen Kolonieausschnitt der hESC-Zellen nach der Inkubation mit dem Kryomedium bei +4°C. Die Zellen verfügen über eine kompakte Struktur mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten. Die Zellen wurden anschließend mit einer beim langsamen Einfrieren etablierten Kühlrate von 1 K/min abgekühlt. Nach der Nukleation zeigt sich in der Kolonie (Abbildung 5.6 b)) eine interzelluläre Eiskristallbildung. Durch die kristallisationsbedingte Anreicherung von CPA und Osmolyten dehydratisieren die Zellen. Durch diesen Volumenverlust werden zahlreiche Zellzwischenräume hervorgerufen, wodurch die Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte, die für den zellulären Ionentransport notwendig sind, nicht erhalten können. Die fortschreitende Temperaturerniedrigung führt zu einer weiteren Dehydratisierung der Zellen. Dadurch vergrößern

sich die Zellzwischenräume und es werden weitere Zell-Zell-Kontakte zerstört. Abbildung 5.6 c) zeigt die Kolonie bei Erreichen der Endtemperatur von -75°C . Anschließend wurde die Probe mit $60\text{ K}/\text{min}$ auf $+4^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die Abbildung der Kolonie (Abbildung 5.6 d)) zeigt am Intensitätsverlust der grünen Fluoreszenz, dass die Zellen im Kolonieverband das angefärbte Zytosol aufgrund einer Membranpermeabilisierung verloren haben. Die PMEF (oben links) hingegen zeigen diesen Verlust nicht. Erklärungsansatz für diesen Effekt ist die osmotisch bedingte Dehydratisierung. Unmittelbar nach der extrazellulären Nukleation kommt es durch die Reduktion der Flüssigphase zu einem schlagartigen Anstieg der extrazellulären Osmolarität. Bedingt dadurch kommt es zu einer Dehydratisierung der Zellen. Durch diese Dehydratisierung bilden sich in der Kolonie Eiskristalle, die mit sinkender Temperatur wachsen.

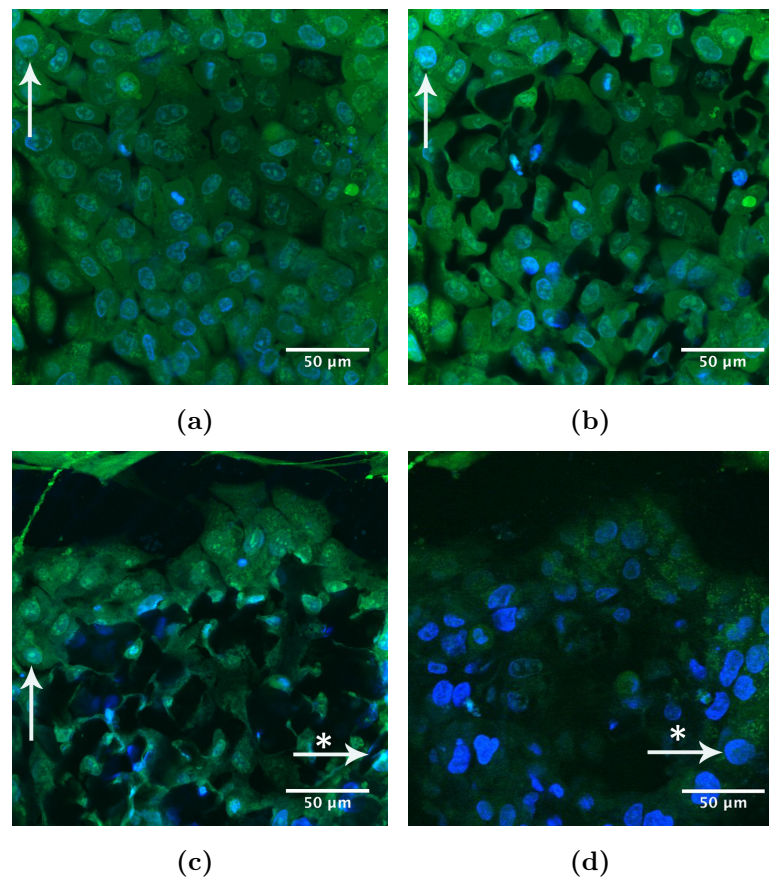


Abb. 5.6: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie von hESC in Kokultur mit PMEF: 1. Evaluationsschritt Kryomedium $IBMT^{Stem}$ mit 10 % DMSO, a) $+4^{\circ}\text{C}$, b) -20°C , c) -75°C , d) $+4^{\circ}\text{C}$ nach der Kryokonservierung.

Um den zellulären Volumenverlust zu reduzieren, wird im 2. Evaluierungsschritt die DMSO-Konzentration verdoppelt, mit dem Ziel, einen zu starken Anstieg der Osmolytkonzentration im Extrazellularraum und somit der zellulären Dehydratisierung entgegenzuwirken. Die neue Probe wurde nach identischem Protokoll markiert und mit dem xenofreien Kryomedium $IBMT^{Stem}$ mit 20 % DMSO inkubiert und in die Kryokammer transferiert. Abbildung 5.7 a)

zeigt einen Kolonieausschnitt (rechts) und PMEF-Zellen (links). Die Probe wurde ebenfalls mit $1\text{ K}/\text{min}$ abgekühlt. Nach dem Phasenübergang im Extrazellulärraum zeigt die Probe bei -20 °C in Abbildung 5.7 b) keine ausgeprägte interzelluläre Eiskristallbildung.

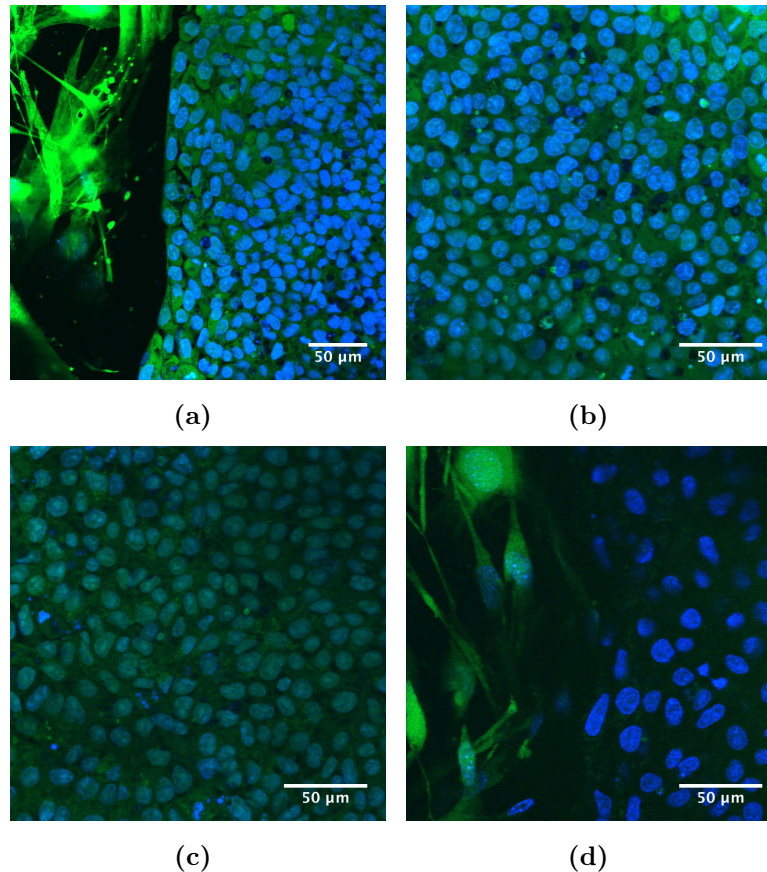


Abb. 5.7: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie von hESC in Kokultur mit PMEF: 2. Evaluationsschritt: Kryomedium $IBMT^{Stem}$ mit 20% DMSO, a) $+4\text{ °C}$, b) -20 °C , c) -75 °C , d) $+4\text{ °C}$ nach der Kryokonservierung.

Auch beim weiteren Abkühlen auf -75 °C kann diese nicht nachgewiesen werden. Die damit einhergehende Auflösung der Zell-Zell-Kontakte ist ebenfalls nicht nachzuweisen. Somit ist bezüglich der interzellulären Eiskristallbildung bei erhöhter DMSO-Konzentration auch beim Erreichen der Lagertemperatur von -75 °C eine deutliche Verbesserung nachzuweisen. Nach dem Erwärmen der Probe mit $60\text{ K}/\text{min}$ auf $+4\text{ °C}$ zeigen die hESC in der Kolonie gegenüber den PMEF eine deutlich geringere intrazelluläre Fluoreszenz. Dies spricht für eine permeabilisierte Membran. Da DMSO-Konzentrationen größer 10% als zelltoxisch gelten, wurde im 3. Evaluationsschritt die DMSO-Konzentration wieder reduziert und durch Ethylenglykol substituiert. Ferner wurde zur Membranstabilisierung Trehalose hinzugefügt. Das Kryomedium setzt sich somit aus je 8% DMSO und Ethylenglykol sowie $IBMT^{Stem}$ mit 50% 300 mOsm Trehalose zusammen. Die Probe wurde nach identischem Protokoll wie in den vorherigen Versuchen inkubiert und abgekühlt. Abbildung 5.8 a) zeigt einen hESC Kolonieausschnitt mit zusammenhängender Zell-Struktur und den PMEF-Zellen. Beim weiteren Abkühlen zeigt

sich in Abbildung 5.8 b) wieder eine signifikante interzelluläre Eiskristallbildung, die zum Lösen der Zell-Zell-Kontakte führt. Die Reduktion des CPA-Anteils hat sich auf die interzelluläre Eiskristallbildung negativ ausgewirkt. Bedingt durch die Reduktion der CPA ist die extrazelluläre Osmolarität höher als im 2. Evaluationsschritt und die Zellen dehydratisieren stärker. Nach dem Erwärmen der Probe mit $60\text{ K}/\text{min}$ auf $+4\text{ °C}$ zeigt sich in Abbildung 5.8 c), dass zahlreiche Zellen keine permeabilisierte Membran aufweisen. Aufgrund dessen wird im 4. Evaluierungsschritt im Kryomedium die Trehalose beibehalten. Die DMSO-Konzentration wurde aufgrund der in Abbildung 5.8 b) vorliegenden intrazellulären Eiskristalle wieder auf 10% erhöht.

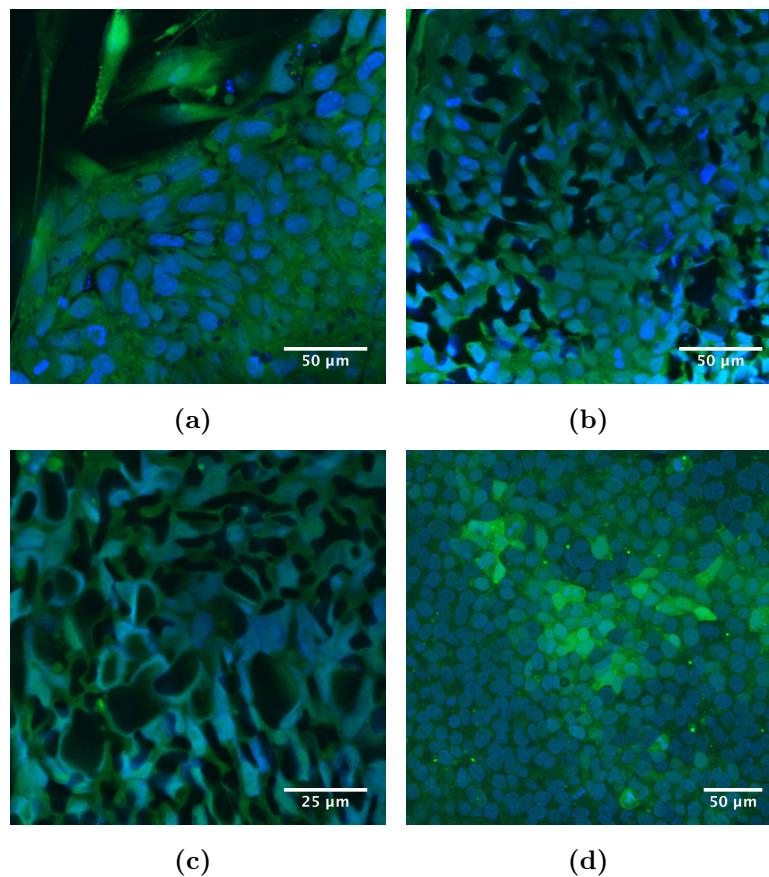


Abb. 5.8: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie von hESC in Kokultur mit PMEF: 3. Evaluationsschritt *IBMT^{Stem}* mit Trehalose sowie 8% DMSO und 8% Ethylenglycol, a) $+4\text{ °C}$, b) -20 °C , c) -33 °C , d) $+4\text{ °C}$ nach der Kryokonservierung.

Zusätzlich wurden 6% Glycerin hinzugeben. Glycerin gilt, ebenso wie Ethylenglykol, als kaum toxisch [91] [92] [93]. Das Kryomedium für diesen Evaluationsschritt bestand aus 10% DMSO, 6% Ethylenglykol und 4% Glycerin in *IBMT^{Stem}* mit 25% 300 mOsm Trehalose. Die Inkubation und die Kryokonservierung wurden nach identischem Protokoll durchgeführt. Nach dem Transfer der Probe in die Kryokammer zeigt die Probe in Abbildung 5.9 a) eine zusammenhängende Koloniestruktur bei $+4\text{ °C}$. Nach dem Abkühlen mit $1\text{ K}/\text{min}$ auf -20 °C ist im Randbereich der Kolonie (siehe Abbildung 5.9 b)) die kompakte Struktur von Abbil-

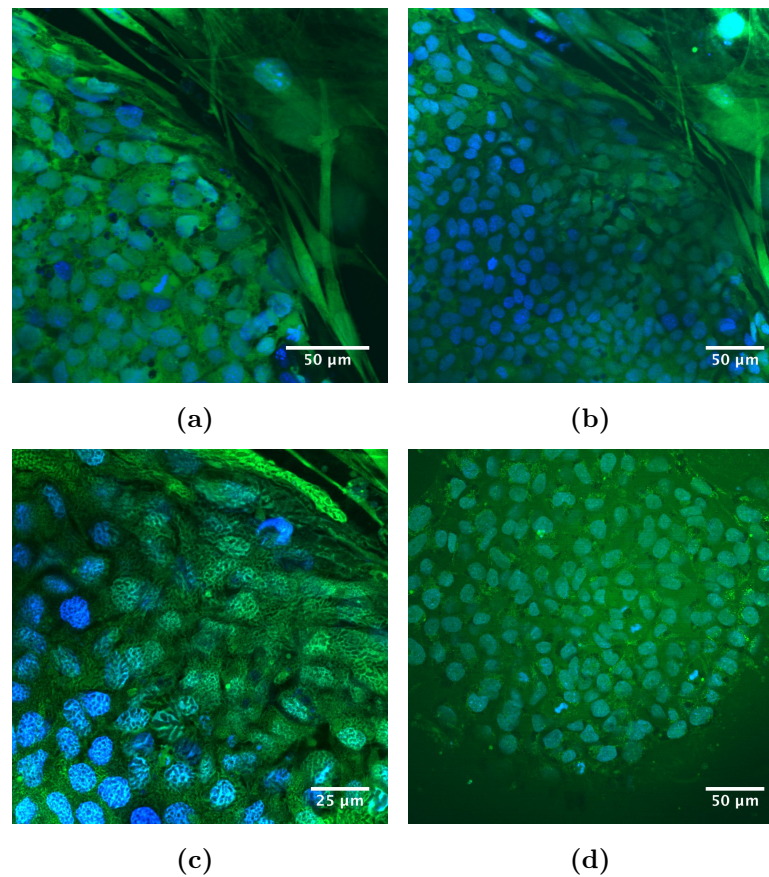


Abb. 5.9: Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie von hESC in Kokultur mit PMEF: 4. Evaluationsschritt $IBMT^{Stem}$ mit 10% DMSO, 6% Ethylenglycol und 4% Glycerin, a) +4 °C, b) -20 °C, c) -80 °C, d) +4 °C.

derung a) erhalten geblieben. Das Wachstum der interzellulären Kristalle soll hier nun nicht durch eine Erhöhung der CPA-Konzentration, sondern durch eine Erhöhung der Kühlrate unterbunden werden. Da in dem Temperaturbereich von -20 °C bis -80 °C auch interzelluläre Eiskristalle entstehen, wird in diesem Schritt versucht, dies durch eine Erhöhung der Kühlrate zu umgehen. Daher wurde die Probe mit 100 K/min auf die Lagertemperatur von -80 °C abgekühlt. Der Randausschnitt der Kolonie (Abbildung 5.9 c)) zeigt eine signifikante intrazelluläre Eiskristallbildung. Durch die hohe Kühlrate konnten die Zellen nicht genügend dehydratisiert werden, um eine intrazelluläre Kristallisation zu vermeiden. Auch diese Zellen zeigten nach dem Auftauen einen Verlust des Zytosols aufgrund permeabilisierter Membranen. Somit hatte der in Abbildung 5.8 gezeigte Evaluationsschritt zu besseren Resultaten geführt und könnte die Basis für weitere Schritte bilden. Der Vorteil dieser Optimierungsmethode im Vergleich zu dem in Abbildung 4.26 gezeigten Vorgehen zur Evaluierung eines Kryokonservierungsprotokolls besteht darin, dass während des Prozesses die Schädigungsmechanismen wie intra- und interzelluläre Eiskristallbildung sowie Ablösen vom Substrat oder Dehydratisierung direkt identifiziert werden können. Somit ist die Ursache der Schädigung zu erkennen und es kann eine gezielte Optimierung eingeleitet und umgesetzt werden.

Anwendungspotential zur Überwachung von Langzeit Proben in Biobanken

Der Bedarf für das Biobanking in der regenerativen Medizin, dem Tissue Engineering der Stammzellforschung und pharmazeutischen Forschung unterliegt einem rapiden Wachstum. Langzeit kryokonservierte Proben stellen hohe Anforderungen an die Lagerung. Zahlreiche Proben werden für diese Anwendung durch eine Vitrifikation in einen metastabilen Zustand überführt. Diese Proben sind sehr anfällig für äußere Störfaktoren wie Erschütterung oder Temperaturschwankungen [94], die zur Schädigung der Probe führen können. Durch diese Einflussfaktoren können die Proben vom metastabilen, amorphen Zustand in einen stabilen kristallinen übergehen. Eine Erwärmung vitrifizierter Proben über den Glaspunkt (T_g) der Vitrifikationslösung bietet das potentielle Risiko einer Kristallisation der Probe. Dieser irreversible Prozess führt zur Schädigung der Probe [95] [96]. Gerade klinische Proben können oftmals vor ihrer Anwendung nicht auf ihre physiologische und genetische Unversehrtheit getestet werden. Daher besteht die Forderung nach Qualitätskontrollen, die nach Möglichkeit nicht invasiv und im gefrorenen Zustand anwendbar sein sollen [97]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Lösungsweg evaluiert, der es erlaubt, den Kristallisationsprozess im tiefkalten Zustand zu beobachten und den vorliegenden Zustand zu untersuchen (Abbildung 4.9). Zur Untersuchung wurde sich der Raman-Spektroskopie bedient, die es erlaubt, anhand von lokalen Schwingungsspektren von Wasser den Phasenzustand der Probe zu untersuchen (angemeldet zum Patent). Diese Beobachtungsmöglichkeit erlaubt es zum einen direkt den Kristallisationsprozess abzubilden (siehe Abbildung 4.9), zum anderen aber bietet sie die Möglichkeit durch stochastische Messungen - beispielsweise nach einer bestimmten Zeit oder einem Transportprozess - die Probe auf Veränderungen in ihrer Kristallisationsstruktur zu untersuchen (siehe Abbildung 5.10) [98].

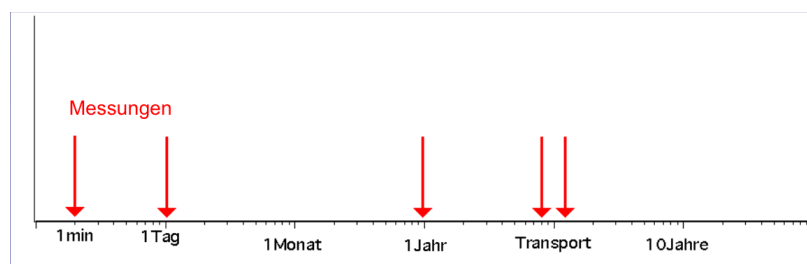


Abb. 5.10: Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten zur Applikation einer Qualitätskontrolle der Probe.

Dadurch können Änderungen detektiert werden, die Rückschlüsse auf die Probenqualität erlauben. Die Anwendung dieser Technik ermöglicht ein Verfahren, welches eine retrospektive Analyse von bereits eingelagerten, vitrifizierten Langzeitproben erlaubt. Dies kann seine Anwendung bei Proben finden, die durch eine Vitrifikation zur Lagertemperatur überführt wurden. Der wesentliche Vorteil der Methode besteht darin, dass die Technik im tiefkalten Zustand anwendbar ist und die Probe zur Untersuchung nicht aufgetaut werden muss [99].

Ermöglicht wird dies durch ein faseroptisches Setup im Endoskop-Stil (siehe Abbildung 3.3). Weitere Anwendungsmöglichkeiten dieses faseroptischen Aufbaus liegen in der Analyse von verwendeten CPA's sowie der angewendeten Kryokonservierungsstrategie, wie langsames Einfrieren oder Vitrifikation. Die Implementierung dieses technischen Konzepts könnte zukünftig für eine automatisierte Untersuchungstechnik der Proben im gefrorenen Zustand angewendet werden. Dadurch könnten einzelne Spektren katalogisiert werden, die als Referenz genutzt werden können. Der Vergleich mit katalogisierten Raman Spektren erlaubt dann auch eine retrospektive Analyse der Proben. Somit stellt diese Technik einen vielversprechenden Ansatz für ein zukünftiges Qualitätsmanagement dar [83].

Welche Anforderungen müssten an einen DMSO-Ersatz gestellt werden?

Als kryoprotektive Substanzen werden Saccharide [100] [101], Proteine [102], chemische Zusätze [103] oder die Kombination aus beiden [104] eingesetzt. Neben ihrer schützenden Wirkung bei der Kryokonservierung können sie die Zellen auch schädigen [105]. Bei chemischen, intrazellulär wirkenden CPA ist der Schädigungsmechanismus in der osmotisch bedingten Dehydratisierung und in der Toxizität zu finden [63]. Die im Rahmen dieser Arbeit für DMSO untersuchte osmotische Dehydratisierung bringt bei der Kryokonservierung von Stammzellen in Abhängigkeit von der Startkonzentration einige Nachteile mit sich: Bei zu geringen Startkonzentrationen konnte dehydrationsbedingt in Kapitel 4.3.2 das Ablösen der Zellen vom Substrat bei hMSC beobachtet werden sowie eine interzelluläre Eiskristallbildung bei hESC. Diese Schädigungen konnten bei höheren Startkonzentrationen nicht mehr beobachtet werden. Eine Erhöhung der Startkonzentration ist jedoch wegen der Toxizität bei DMSO nicht beliebig umsetzbar [63]. Somit wäre bei verschiedenen Anwendungen in der Kryokonservierung ein Ersatz von DMSO mit angepassten physikalischen Eigenschaften wünschenswert. Ein potentieller Ersatz für DMSO sollte zunächst über die positiven Eigenschaften des DMSO verfügen. Diese liegen beispielsweise in seiner gefrierpunktniedrigenden Eigenschaft und der Fähigkeit, die Membran bis zum Eutektikum zu passieren. Somit wäre es bei einem Ersatz von DMSO ebenso vorteilhaft, wenn es durch die Membran permeieren könnte, um die intrazelluläre Präsenz dieses CPA zu gewährleisten. Dies bedeutet, dass der potentielle Ersatz intrazellulär Wasser substituieren und den Gefrierpunkt senken würde. Nach Möglichkeit sollte es sich so gestalten, dass bei der verwendeten Einsatzmenge der intrazelluläre unterhalb des extrazellulären Gefrierpunkts liegt. Im Falle einer extrazellulären Nukleation würde dies bedeuten, dass durch die entstehende kristalline Wasserphase zusätzlich Osmolyte anreichert werden, die die Zelle dehydrieren und somit das Risiko einer intrazellulären Eiskristallbildung zusätzlich reduzieren. Ferner sollte es den Phasenübergang der Membran unterbinden und diese bis zum Erreichen des Eutektikums für den DMSO-Ersatz (im Folgenden IBMT CPA-Future genannt) und Wasser permeabel halten. Das fiktive IBMT CPA-X sollte einer zu starken Dehydrierung der Zelle entgegenwirken, die beispielsweise ein Ablösen

der Zellen vom Substrat bewirken kann, wie in Abbildung 4.28 j-k) gezeigt wurde.

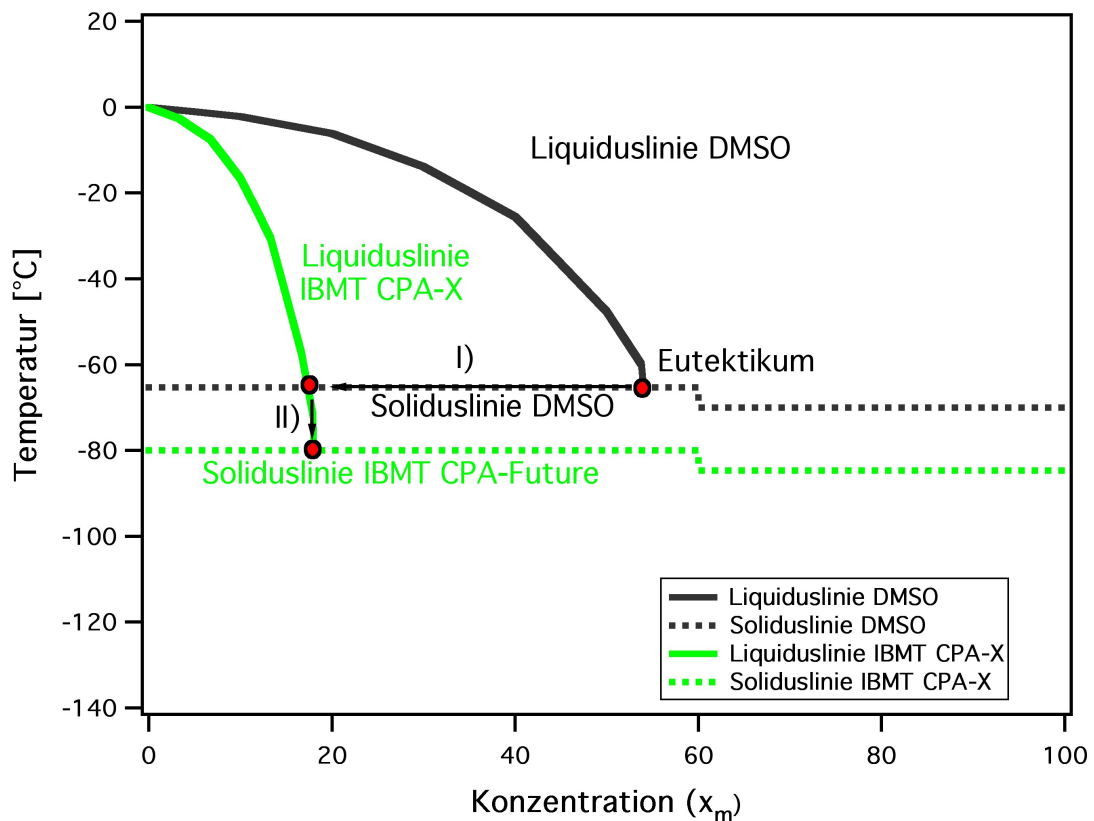


Abb. 5.11: Exemplarische physikalische Anforderungen an einen DMSO-Ersatz.

Dies könnte beispielsweise durch eine Verschiebung des Eutektikums zu niedrigeren Konzentrationen bewirkt werden, wie in Abbildung 5.11 Pfeil I) gezeigt wird. Die dadurch reduzierte Konzentration des IBMT CPA-X am Eutektikum hätte zur Folge, dass bei identischer Startkonzentration die finale xtrazelluläre Osmolarität deutlich niedriger ausfallen würde. Überträgt man diesen Ansatz auf den Osmolaritätsverlauf, ähnlich wie es auch von Pegg unter anderem in [40] beschrieben wird, so lässt sich dieser als Funktion der Temperatur, wie in Abbildung 5.12 gezeigt, beschreiben. Durch die Verschiebung des Eutektikums zu geringeren Konzentrationen (siehe Abbildung: 5.11 Pfeil I)) würde sich, analog zur Abbildung 4.13 a) der Anteil der kristallinen Phase reduzieren. Die dadurch erhöhte Restschmelze würde somit mehr Volumen für die gelösten Osmolyte bieten und bei vergleichbaren Temperaturen zu einer deutlich verringerten Osmolarität führen. Die dadurch reduzierte Dehydratisierung der Zelle sollte sich unter anderem positiv auf ihr Adhäsionsverhalten während der Kryokonservierung auswirken.

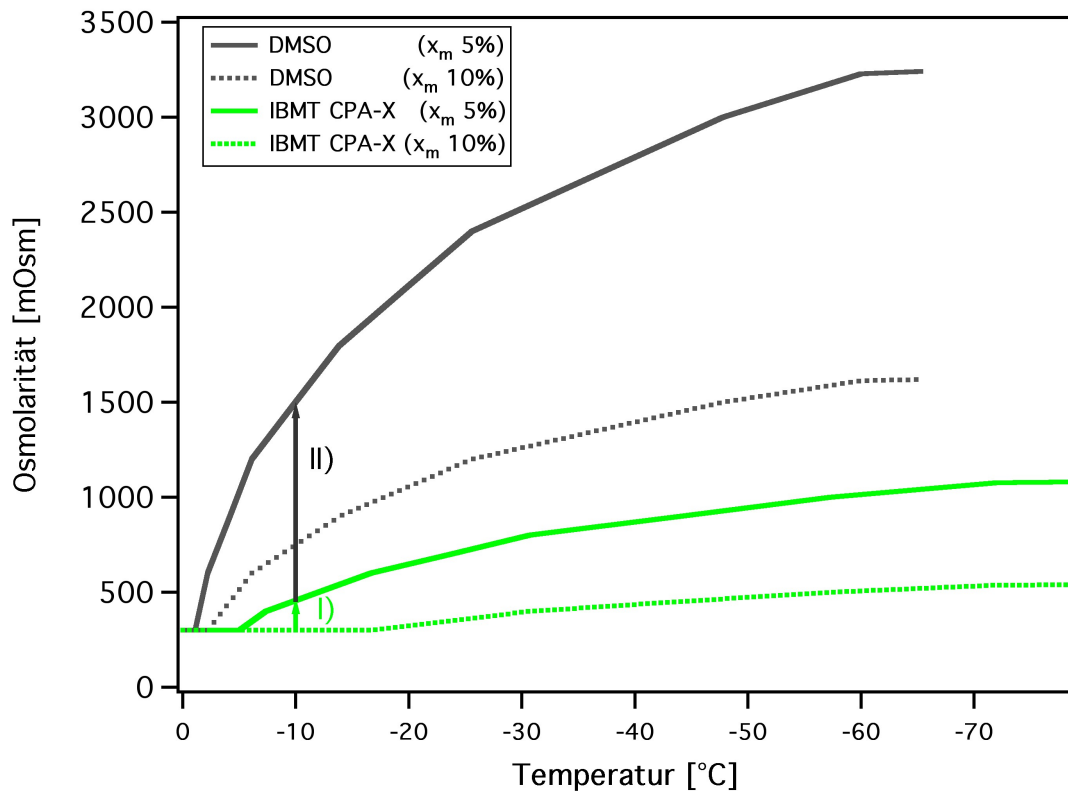


Abb. 5.12: Anforderungen an einen DMSO-Ersatz.

Würde man die Entwicklung von IBMT CPA-X dahingehend forcieren, dass man bei reduzierter Startkonzentration eine gegenüber dem DMSO deutlich niedrigere, finale Osmolarität am Eutektikum anstrebt, könnte man die Dehydratisierung wirkungsvoll reduzieren. Dies wäre auch bei der Konservierung von hESC vorteilhaft, da man Effekten wie interzellulären Eiskristallen gezeigt in Abbildung 5.6 entgegenwirken würde. Dadurch läge das Potential von IBMT CPA-X darin, dass man mit einer deutlich reduzierten Konzentration vergleichbare Ergebnisse von Abbildung 5.7 erwarten könnte, die mit 20% DMSO abgekühlt wurden. Um dies zu ermöglichen, müsste die eutektische Konzentration von IBMT-CPA-X etwa um den Faktor 3 reduziert werden, wie es in Abbildung 5.11 durch die grüne Liquidus Linie schematisch gezeigt wird. Um auch bei höheren Startkonzentrationen einen ausreichend großen Temperaturbereich für die Dehydratisierung zur Verfügung zu haben, wäre es weiterhin denkbar, die Solduslinie auf eine Temperatur von -80 °C herabzusetzen, wie es in Abbildung 5.11 durch Pfeil II) gezeigt wird. Durch diese sich ergebende Liquiduslinie würden sich die in Abbildung 5.12 beschriebenen Osmolaritätskurven für IBMT CPA-X ergeben. Diese ließen bei einer Konzentration von 5% und 10% eine Osmolarität von 540 mOsm beziehungsweise 1080 mOsm erwarten. Die Reduktion der Startkonzentration würde sich weiterhin auch positiv auf eine potentielle Unterkühlung auswirken, da der osmotische Schock, dem die Zellen bei der Nukleation ausgesetzt sind, reduziert würde. Durch das Erniedrigen der Temperatur am Eutektikum wird das Temperaturfenster zwischen physiologischer Umgebung und Phasenübergang vergrößert. Die in Abbildung 5.11 durch die Pfeile I) und II) beschriebene

ne Verschiebung des Eutektikums würde ferner den Vorteil mit sich bringen, dass man die Abkühlgeschwindigkeit etwas erhöhen könnte. Durch die Wahl der Abkühlgeschwindigkeit wird beim Abkühlen der Proben eine gewisse Konzentrationserhöhung der Osmolyte in der verbleibenden Flüssigphase pro Zeit vorgegeben. Reduziert sich die Konzentration des CPA am Eutektikum, so muss zum Erreichen eines intra- und extrazellulären Gleichgewichts die Zelle weniger dehydratisieren. Dies würde die Anwendung höherer Kühlraten ermöglichen, ohne die Probe dem in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Risiko einer intrazellulären Eiskristallbildung auszusetzen. Der Vorteil des fiktiven Kryomediums läge also darin, dass man die potentiellen Risiken der Kryokonservierung wie Dehydratisierung, intra- und interzelluläre Eiskristallbildung bei reduzierter Konzentration, gegenüber der bei DMSO notwendigen, minimieren würde. Zudem könnte eine höhere Abkühlrate ermöglicht werden, die die Dauer der Einfrierprotokolle verkürzen würde. Wäre dieses CPA final noch weniger zelltoxisch, so wäre dies auch ein weiterer nennenswerter Vorteil. Bei einer gegenüber dem DMSO vergleichbaren Toxizität wäre das CPA-X dennoch vorteilhaft, da bei den beschriebenen Eigenschaften sich die Startmenge deutlich reduzieren würde.

Kapitel 6

Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Zimmermann, Instituts- und Hauptabteilungsleiter Kryobiophysik und Kryotechnologie des Fraunhofer IBMT, für die Bereitstellung des spannenden Themas und für seine stetige Unterstützung. Ferner danke ich ihm für seine motivierenden Gespräche, kreativen Ideen und anregende sowie kritische Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Marc Schneider, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps Universität Marburg, danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Fuhr, Institutsleiter des Fraunhofer IBMT, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am IBMT durchführen zu können und die interdisziplinären Doktorandenseminare.

Mein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe Biomedizinische Optik am IBMT, besonders Herrn Dr. Frank Stracke, für seine inspirierenden und hilfreichen Diskussionen. Herrn Dipl.-Phys. Martin Schwarz und Daniel Sauer danke ich für ihre Unterstützung, besonders bei der LabView Programmierung. Herrn Dr. Ronan Le Harzic, M.Sc. Asger Kreiner-Möller und Frau Dr. Iris Riemann danke ich für ihre Unterstützung und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. Robert Johann danke ich für die Entwicklung und den Bau der Hochdruckkammer für die Tieftemperaturmikroskopie sowie für seine technische Unterstützung. Herrn Uwe Schön danke ich für seine Messungen an den Askion-Cryotanks.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. Ina Meiser, Frau Dr. Julia Neubauer, Herrn Dipl.-Biol. Axel F. Beier, Herrn M.Sc. Michael Gepp, Frau M.Sc. Hannah Lorig, Herrn Dipl.-Biol. Patrick Stumpf, Herrn Dipl.-Biol. Florian Groeber, Frau M.Sc. Isabelle Sebastien sowie Frau Sybille Richter und Susan Zöllner für die Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Frank Wehner und Jens Christmann danke ich für die Unterstützung und Durchführung von Experimenten am Max Planck Institut für molekulare Physiologie.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie, besonders aber bei Karolin für ihre Unterstützung und den Rückhalt bedanken.

Veröffentlichte Arbeiten

Peer Reviewed:

Beier, A.F.J., Schulz, J.C., Dörr D., Katsen-Globa A., Zimmermann H.: „Effective Surface based Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells by Vitrification” *Cryobiology*, 63(3), 2011

Dörr, D., Stark, M., Ehrhart, F., Zimmermann, H., Stracke, F.: „Multiphoton Microscopy for the In Situ Investigation of Cellular Processes and Integrity in Cryopreservation”. *Biotechnol. J.*, Vol: 4 (2009)

Dörr, D., Stracke, F. Zimmermann, H.: „Noninvasive Quality Control of Cryopreserved Samples”. *Biopreservation and Biobanking*, 10(6): 529-531 (2012)

Epple, M., Neumeier, M., Dörr, D., LeHarzic, R., Sauer, D., Stracke, F., Zimmermann, H.: „Electrophoretic Deposition of Calcium Phosphate Nanoparticles on a Nanostructured Silicon Surface” *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 42(1):50-54(2011)

Le Harzic, R., Dörr, D., Sauer, D., Neumeier, M., Epple, M., Zimmermann, H., Stracke, F.: „Large Area uniform high Spatial Frequency Ripples performed on Silicon using Nanjoule Femtosecond Laser Pulses at High Repetition Rate“. *Optics Letters* 36(2):229-231(2011)

Le Harzic, R., Dörr, D., Sauer, D., Stracke, F., Zimmermann H.: „Generation of High-spatial Frequency Ripples on Silicon under Ultrashort Laser Pulses Irradiation “. *Applied Physics Letters* 98:211905-1-3(2011)

Neumeier, M., Dörr, D., LeHarzic, R., Stracke, F., Zimmermann, H., Epple, M., „Elektrophoretische Beschichtung von nanostrukturierten Oberflächen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln”, *Biomaterialien* 11 (2010) 183

Wallat, K., Dörr, D., Le Harzic, R., Stracke, F., Sauer, D., Neumeier, M., Kovtun, A., Zimmermann, H., Epple, M.: „Cellular Reactions towards nanostructured silicon surfaces created by laser ablation“. *Journal of Laser Applications* 2012

Zeisberger, S.M., Schulz, J. C., Mairhofer, M., Ponsaerts, P., Dörr, D., Katsen-Globa, A., Ehrbar, M., Heschler, J., Hoerstrup, S. P., Zisch A.H., Kolbus, A., Zimmermann H.: „Biological and physicochemical Characterization of a Serum- and Xeno-free Chemically fully defined Cryopreservation Procedure for Adult Progenitor CellsCell Transplantation 20(7):1241-1257 (2011)

Vorträge, Proceedings

Christmann J., Azer, L. Dörr, D., Wehner F.: „Quantification of Water Transport and Volume Regulation by Means of Acoustic Microscopy, Fluorescence Correlation Spectroscopy and Raman Microscopy“. Cell Volume Regulation Meeting 2011, Tübingen

Ehrhart, F., Dörr, D., Stark, M., König, K., Zimmermann, H.: „Laser-assisted Processing of Cross-linked Alginate Hydrogel“. Vortrag anlässlich der LIM München 2007, Messe München in München (Bayern), 17.–22.06.2007

LeHarzic, R., Dörr, D., Sauer, D., Neumeier, M., Epple, M., Zimmermann H., Stracke F.: „Formation of Periodic Nanoripples on Silicon and Germanium induced by Femtosecond Laser Pulses“. Physics Procedia 12, 29-36(2011)

Neumeier, M., Dörr, D., Le Harzic, R., Sauer, D., Stracke, F., Zimmermann, H. Epple, M.: „Electrophoretic Deposition of Calcium Phosphate Nanoparticles on a nanostructured Silicon Surface“. Proceedings anlässlich des Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology in Beregove (Ukraine), 06.-10.09.2010

Dörr D., Kreiner-Möller A., Stracke F., Zimmermann H.: „Laser Scanning Imaging and Spectroscopy for cryogenic applications“. International Congress on Biophotonics ICOB, 2012 Jena (Germany)

Riemann, I., Beier, A., Schwarz, M., Dörr, D., Stracke, F., Zimmermann, H.: „Evaluation of Cryo-preserved Skin Tissues using Two-Photon Microscopy“. SPIE Proceedings (2010), 7548

Riemann, I., Beier, A., Schwarz, M., Dörr, D., Stracke, F., Zimmermann, H.: „Evaluation of Cryo-preserved Skin Tissues using Two-Photon Microscopy“. Vortrag anlässlich der Photonics West 2010 in San Francisco (USA), 23.01.-29.01.2010

Schulz, J. C., Dörr, D., Sebastien, I., Beier, A. F. J., Zimmermann, H.: „A New Optical Method for Analysing Effects of Ice Formation on the Cryopreservation Success of Human Stem Cells“. Posterbeitrag anlässlich des Combined Meeting 2009 of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT in Hannover (Niedersachsen), 20. – 25.11.2009

Schulz, J. C., Beier A.F.J., Dörr, D., Katsen-Globa, A., Gepp, M.M., Ihmig, F., Schön, U., Wouters, G., Mairhofer, M., Zeisberger, S., Zimmermann, H.: „Xeno-free Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical and Therapeutic Applications“, Symposium StemCells: Hopes, Fears and Reality, Berlin 2010

Stark, M., Dörr, D., Ehlers, A., Sauer, D., Bückle, R., Martin, S., Ehrhart, F., Baunach,

J., Katsen-Globa, A., Zimmermann, H., König, K.: „Multiphoton Imaging and Fluorescence Lifetime Studies on Unstained Cells and Tissue at Cryogenic Conditions“. SPIE-Proceedings 6628 (2007)

Stark, M., Dörr, D., EHLERS, A., Ehrhart, F., Schulz, J. C. Baunach, J. J. S., Katsen-Globa, A., König, K., Zimmermann, H.: „Multiphoton Fluorescence Imaging at Cryogenic Conditions“. Posterbeitrag anlässlich der Microscopy Conference in Saarbrücken (Saarland), 02.–07.09.2007

Wählich, F., Dörr, D., Zimmermann, H., Eggert, H.: „Active and Passive Rheology with the Photonic Force Microscope“. Posterbeitrag anlässlich des 1st international Symposiums of Optical Tweezers in Live Sciences in Berlin (Berlin), 15.05.2008

Patentanmeldung:

Fuhr, G.R., Zimmermann, H., Stracke, F., Dörr D.: Verfahren und Vorrichtung zur Überwachung einer kryokonservierten biologischen Probe. Patentanmeldung: 102010052434.4, Prioritätsantrag: 24.11.2010, 10F51502

Lebenslauf

Name: Dörr Daniel
Geburtsdatum: 30.03.1979
Geburtsort: Saarbrücken
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familiennstatus: verheiratet

Beruflicher Werdegang

Mai 2014 - heute: Nematik Dillingen GmbH, Dillingen
Prozessoptimierung Kernmacherei und Gießerei
Nov 2012 - Mai 2014: Nematik Dillingen GmbH, Dillingen
technische Assistenz
Feb 2008 - Nov 2012: Fraunhofer Institut Biomedizinische Technik, St. Ingbert
wissenschaftlicher Mitarbeiter
Mai 2006 - Jan 2008: Fraunhofer Institut Biomedizinische Technik, St. Ingbert
Hilfswissenschaftler
Apr 2004 - Okt 2005: MTU Aero Engines, München
Praktikant und Diplomand

Studium

Nov 2010 - heute: Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Promotionsstudium
Okt 2005 - Nov 2007: HTW des Saarlandes, Saarbrücken
Master of Engineering
Okt 2001 - Okt 2005: HTW des Saarlandes, Saarbrücken
Diplom Maschinenbau - Konstruktion

Schulbildung

Jun 1989 - Jul 2000: Geschwister Scholl Gymnasium, Lebach
allgemeine Hochschulreife

Auszeichnung

2009: Auszeichnung der Masterarbeit mit dem Wirtschaftspreis
Saar-Pfalz Moselle
2009: Poster Award - Cell Volume Regulation Meeting, Tübingen
Christmann J., Azer, L. Dörr, D., Wehner F.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, den

(Daniel Dörr)

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung einer Zelle	7
2.2	Schematisches Phasendiagramm	10
2.3	Schematische Darstellung der zellulären Dehydratisierung	11
2.4	Boyle-van't-Hoff Plot	12
2.5	Schematische Erklärung der osmotischen Dehydratisierung	13
2.6	Osmotische Dehydratisierung während der Kryokonservierung von Zellen . .	14
2.7	Resultierende Überlebensrate durch Überlagerung der Schädigungsmechanis- men bei der Kryokonservierung	16
2.8	Schematische Darstellung der Anregungs-, Relaxations- und Streuprozesse .	20
2.9	Anregungs- und Detektionsprinzip LSM	22
2.10	Rekonstruktion MPLSM Messung CaCo ₂	23
3.1	Tiefemperatur-MPLSM Aufbau	26
3.2	Prinzipskizze des Tiefemperatur Raman-Mikroskops	28
3.3	Fasersetup mit konfokaler Sonde	29
3.4	Benutzeroberfläche ISIS	31
3.5	Benutzeroberfläche zur Ansteuerung des Spektrometers	32
3.6	Schematische Darstellung der ISIS-Auswertelgorithmen	34
3.7	Dynamisches Differenzkalorimeter Perkin Elmer Hyper DSC 8500	39
3.8	Pyris Auswertung	40
4.1	Raman-Spektroskopie von Wasser	42
4.2	Raman-Spektroskopie einer DMSO-Konzentrationsreihe	43
4.3	Korrelation Intensitäts- und Volumenquotient	43
4.4	Anreicherung von DMSO während der Kryokonservierung	44
4.5	Intrazelluläres Erstarren bei hMSC mit mit 10% (v/v) DMSO	46
4.6	Dynamische Differenzkalorimetrie: Auftaukurven eines Vitrifikationsmediums	47
4.7	Raman-Spektroskopie: Kristallisation eines vitrifizierten Mediums	49
4.8	Askion C-Line	50
4.9	Zeitreihe einer simulierten Probenentnahme	51
4.10	Raman-Spektroskopie in einer Tiefemperatur Druckkammer	52
4.11	Druckabhängige Schmelzpunkte	53

4.12	Boyle Van't Hoff Plot	55
4.13	Schmelzpunkte und Fit-Korrelation für DMSO-Wasser Lösung	56
4.14	Temperaturabhängige Phasenanteile	57
4.15	Temperaturabhängige Osmolarität	58
4.16	Berechnete temperaturabhängige zelluläre Dehydratisierung	59
4.17	Berechnete temperaturabhängige DMSO-Konzentration und Partialvolumen	60
4.18	Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie: Zeitserie einer hMSC während der Kryokonservierung	62
4.19	Volumenentwicklung während der Kryokonservierung	63
4.20	Anteil der flüssig Phase während der Kryokonservierung	64
4.21	Korrelationsgerade für Zellvolumen und Volumen der Flüssigphase	65
4.22	Raman-Spektroskopie: Raman-Messung von hMSC bei der Kryokonservierung	67
4.23	Intrazelluläre Dehydratisierung bei der Kryokonservierung	68
4.24	Intrazelluläres DMSO-Volumen	70
4.25	Intrazelluläre DMSO-Konzentration	71
4.26	hMSC vor und nach der Kryokonservierung mit DMSO	73
4.27	Kryokonservierung von HCV-MSC in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration	76
4.28	Kryokonservierung von MSC-AT in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration	78
4.29	Kryokonservierung adhärenter Zellen in Abhängigkeit von der Kühlrate . . .	79
4.30	Membranpermeabilisierung nach der Kryokonservierung	81
4.31	Membranpermeabilisierung nach der Kryokonservierung	82
5.1	Dehydratisierung - Modell und Experiment im Vergleich	85
5.2	Anreicherung DMSO - Modell und Experiment	86
5.3	Angepasste Darstellung des Modells zur osmotisch bedingten Dehydratisierung	88
5.4	Konzentrationsverlauf im Tenären-Phasendiagramm	89
5.5	Algorithmus zur online-Evaluierung eines Kryoprotokolls	91
5.6	1. Evaluationsschritt Kryokonservierung hESC in Kokultur mit PMEF . . .	92
5.7	2. Evaluationsschritt Kryokonservierung hESC in Kokultur mit PMEF . . .	93
5.8	3. Evaluationsschritt Kryokonservierung hESC in Kokultur mit PMEF . . .	94
5.9	4. Evaluationsschritt Kryokonservierung hESC in Kokultur mit PMEF . . .	95
5.10	Applikation einer Qualitätskontrolle	96
5.11	Phasendiagramm idealisiertes CPA	98
5.12	Anforderungen an einen DMSO-Ersatz	99

Tabellenverzeichnis

3.1	Variablen quantitative Auswertung der Raman-Daten	37
4.1	Schmelzpunkte DMSO-Wasserlösung	53

Literaturverzeichnis

- [1] Y. De Souza und J. Greenspan, Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits, *AIDS* **27**, 303–312 (2013).
- [2] T. Li, C. Zhou, C. Liu, Q. Mai und G. Zhuang, Bulk vitrification of human embryonic stem cells, *Hum Reprod* **23**, 358–364 (2008).
- [3] V. Mirabet, M. Alvarez, P. Solves, D. Ocete und C. Gimeno, Use of liquid nitrogen during storage in a cell and tissue bank: contamination risk and effect on the detectability of potential viral contaminants, *Cryobiology* **64**, 121–123 (2012).
- [4] J. C. Davila, G. G. Cezar, M. Thiede, S. Strom, T. Miki und J. Trosko, Use and application of stem cells in toxicology, *Toxicol Sci* **79**, 214–223 (2004).
- [5] V. Ramakrishna, P. B. Janardhan und L. Sudarsanareddy, Stem cell and regenerative medicine - a review, *Annu Rev Res Biol* **1**, 79–110 (2011).
- [6] N. Ninagawa, R. Murakami, E. Isobe, Y. Tanaka, H. Nakagawa und S. Torihashi, Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits, *Differentiation* **82**, 153–164 (2011).
- [7] S. Schneider und H. H. Klein, Preserved insulin secretion capacity and graft function of cryostored encapsulated rat islets, *Regul Pept* **166**, 135–138 (2011).
- [8] J. C. Schulz, A. Germann, B. Kemp-Kamke, A. Mazzotta, H. von Briesen und H. Zimmermann, Towards a xeno-free and fully chemically defined cryopreservation medium for maintaining viability, recovery, and antigen-specific functionality of PBMC during long-term storage, *Journal of Immunological Methods* **382**, 24–31 (2012).
- [9] E. T. Donnelly, N. McClure und S. E. Lewis, Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity, *Fertil Steril* **76**, 892–900 (2001).
- [10] Y. J. Lou und X. G. Liang, Embryonic stem cell application in drug discovery, *Acta Pharmacol Sin* **32**, 152–159 (2011).
- [11] M. Rao, Stem cell and regenerative medicine - a review, *Stem Cell Res Ther* **4**, 27 (2012).

- [12] F. Holm, S. Strom, J. Inzunza, D. Baker, A. M. Stromberg, B. Rozell, A. Feki, R. Bergstrom und O. Hovatta, An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells, *Hum Reprod* **25**, 1271–1279 (2010).
- [13] M. Mairhofer, J. C. Schulz, M. Parth, U. Beer, H. Zimmermann und A. Kolbus, Evaluation of a xeno-free protocol for long-term cryopreservation of cord blood cells, *Cell Transplant* **22**, 1087–1099 (2012).
- [14] A. Germann, J. C. Schulz, B. Kemp-Kanke, H. Zimmermann und H. von Briesen, Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium, *Biopreserv Biobank* **9**, 229–236 (2011).
- [15] S. Zeisberger, J. Schulz, M. Mairhofer, P. Ponsaerts, G. Wouters, D. Doerr, A. Katsen-Globa, M. Ehrbar, J. Hescheler, S. Hoerstrup, A. Zisch, A. Kolbus und H. Zimmermann, Biological and physicochemical characterization of serum and xeno free chemically defined cryopreservation procedure of human progenitor cells, *Cell Transplant* **20**, 1241–1257 (2011).
- [16] P. Mazur, P. I.L. und F. Kleinhans, Zeiss in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling, *Cryobiology* **55**, 158–166 (2007).
- [17] C. Polge, A. Smith und P. A.S., Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature* **164**, 666 (1949).
- [18] J. Lovelock und M. Bishop, Prevention of freezing damage due to living cells by dimethylsulfoxide, *Nature* **183**, 1394–1395 (1959).
- [19] K. Diller und E. Cravalho, A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells, *Cryobiology* **7**, 191–9 (1970).
- [20] S. P. Leibo und P. Mazur, The role of cooling rates in low-temperature preservation, *Cryobiology* **8**, 447–452 (1971).
- [21] P. Mazur, S. Leibo und E. Chu, A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells, *Exp Cell Res* **71**, 345–55 (1972).
- [22] D. F. McGinnity, M. G. Soars, R. A. Urbanowicz und R. J. Riley, An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells, *Drug Metab Dispos* **32**, 1247–1253 (2004).
- [23] B. E. Reubinoff, M. F. Pera, G. Vajta und A. O. Trounson, Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method, *Hum Reprod* **16**, 2187–2194 (2001).

- [24] F. Ehrhart, J. C. Schulz, A. Katsen-Globa, S. G. Shirley, D. Reuter, F. Bach, U. Zimmermann und H. Zimmermann, A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours, *Cryobiology* **58**, 119–127 (2009).
- [25] K. Oktay, A. P. Cil und H. Bang, Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis, *Fertil Steril* **86**, 70–80 (2006).
- [26] D. Doerr, M. Stark, F. Stracke und H. Zimmermann, Multiphoton Microscopy for the in situ investigation of cellular processes and integrity in cryopreservation, *Biotechnology J* **4**, 1215–1220 (2009).
- [27] A. Beier, J. Schulz, D. Doerr, A. KatsenGloba, A. Sachindis, J. Hescheler und H. Zimmermann, Effective surface based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification, *Cryobiology* **63**, 175–185 (2011).
- [28] R. Klinke, H. Pape, A. Kurtz und S. Silbernagel (Hg.), *Physiologie*, Thieme, ISBN-10: 3-13-1-796006-1 (2009).
- [29] H. Denker, Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources, *J Med Ethics* **32**, 665–671 (2006).
- [30] B. Afanasyev und Z. A. Elstner, E.E., A.J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept, *Cell Ther Transplant* **1**, 35–38 (2009).
- [31] B. Jaganathan und D. Bonnet, Human mesenchymal stromal cells senesce with exogenous OCT4, *Cytotherapy* **14**, 1054–1063 (2009).
- [32] D. Simpson, N. Boyd, S. Kaushal, S. Stice und S. Dudley, Use of human embryonic stem cell derived-mesenchymal cells for cardiac repair, *Biotechnol Bioeng* **109**, 274–283 (2012).
- [33] B. Han und J. Bischof, Direct Cell injury associated with eutectic crystallization during freezing, *Cryobiology* **48**, 8–21 (2004).
- [34] W. Domke (Hg.), *Werkstoffkunde und Werkstoffprüfung*, Cornelsen, 10 Aufl. (1998).
- [35] P. Mazur, Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing, *J Gen Physiol* **47**, 347–69 (1963).
- [36] C. Mueller Eckhardt und V. Kiefel (Hg.), *Transfusionsmedizin: Grundlagen - Therapie - Methodik*, Springer Berlin, 4 Aufl. (2010).
- [37] D. Pegg, C. Hunt und L. Fong, Osmotic properties of the rabbit corneal endothelium and their relevance to cryopreservation, *Cell Biophys* **10**, 169–189 (1987).
- [38] P. Nobel, The Boyle van't Hoff Relation, *J Theoret Biol* **23**, 375–379 (1969).

- [39] F. Wehner und H. Tinel, Osmolyte and Na⁺ transport balances of rat hepatocytes as a function of hypertonic stress, *Pflugers Arch* **441**, 12–24 (2001).
- [40] B. Fuller, N. Lane und E. Benson (Hg.), *Life in the Frozen State*, CRC Press, ISBN: 0415247004 (2004).
- [41] P. Mazur und U. Schneider, Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications, *Cell Biophys* **8**, 259–85 (1986).
- [42] M. Toner, E. G. Cravalho, M. Karel und D. R. Armant, Cryomicroscopic analysis of intracellular ice formation during freezing of mouse oocytes without cryoadditives, *Cryobiology* **36**, 55–71 (1991).
- [43] M. P., The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology* **6**, 251–72 (1977).
- [44] K. Muldrew und L. E. McGann, The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury, *Biophys J* **66**, 532–41 (1994).
- [45] J. Lovelock, The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing, *Biochim Biophys Acta* **10**, 414–426 (1953).
- [46] H. Meryman, Osmotic stress as a mechanism of freezing injury, *Cryobiology* **8**, 489–500 (1971).
- [47] J. Bischof, W. Wolkers, N. Tsvetkova, A. Oliver und J. Crowe, Lipid and Protein changes due to freezing in Dunning AT-1 cells, *Cryobiology* **45**, 22–32 (2002).
- [48] W. Wolkers, S. Looper, A. McKleman, N. Tsvetkova, F. Tablin und J. Crowe, Membrane and Protein properties of freeze dried mouse platelets, *Mol Membr Biol* **19**, 201–210 (2002).
- [49] L. Crowe, J. Crowe und D. Chapman, Hydration-dependent hexagonal phase lipid in a biological membrane, *Arch Biochem Biophys* **217**, 582–587 (1982).
- [50] J. Wolfe und G. Bryant, Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems, *Cryobiology* **39**, 103–129 (1999).
- [51] J. Wolfe, Z. Yan und J. Pope, Hydration forces and membrane stresses: cryobiological implications and a new technique for measurement, *Biophys Chem* **49**, 51–58 (1994).
- [52] J. Crowe, L. Crowe und D. Chapman, Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose, *Science* **223**, 701–703 (1984).
- [53] J. O. Karlsson, E. G. Cravalho, I. H. Borel Rinkes, M. L. Tompkins, R. G. Yarmush und M. Toner, Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide, *Biophys J* **65**, 2524–36 (1993).

- [54] P. Mazur, Freezing of living cells: mechanisms and implications, *Am J Physiol* **247**, C125–142 (1984).
- [55] J. Wolfe und G. Bryant, Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects, *Int J Refrig* **24**, 438–450 (2001).
- [56] D. Gao und J. K. Critser, Mechanisms of cryoinjury in living cells, *ILAR J* **41**, 187–196 (2000).
- [57] S. Leibo, J. Farrant, P. Mazur, M. Hanna und L. Smith, Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol, *Cryobiology* **6**, 315–323 (1976).
- [58] D. Rasmussen und A. Mackenzie, Phase Diagram for the System Water-Dimethylsulfoxide, *Nature* **5174**, 1315–1317 (1968).
- [59] R. Pfaff, J. Liu, D. Gao, A. Peter, T. Li und J. Critser, Water and DMSO membrane permeability characteristics of in-vivo and in-vitro-derived and cultured murine oocytes and embryos, *Mol Hum Reprod* **4**, 51–59 (1998).
- [60] P. Mazur, Cryobiology: the freezing of biological systems, *Science* **168**, 939–949 (1970).
- [61] H. Szmant, Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems, *Ann N Y Acad Sci* **243**, 20–23 (1975).
- [62] N. M. Jomha, A. D. Weiss, J. Fraser Forbes, G. K. Law, J. A. Elliott und L. E. McGann, Cryoprotectant agent toxicity in porcine articular chondrocytes, *Cryobiology* **61**, 297–302 (2010).
- [63] F. Lin, Q. H. Liu, Z. Z. Xiao, D. Y. Ma, S. H. Xu, Y. S. Xiao und J. Li, Study on permeability of DMSO in embryos of red seabream (*Pagrus major*) by capillary electrophoresis, *Cryo Letters* **32**, 339–348 (2011).
- [64] O. Nakamura, Fundamentals of two-photon microscopy, *Micros Res Tech* S. 165–171 (1999).
- [65] W. Demtröder (Hg.), *Molekülphysik; Technische Grundlagen und experimentelle Methoden*, Oldenburg, ISBN: 9783486249743 (2003).
- [66] H. u. W. H. Haken, Molekülphysik und Quantenchemie, *Springer* **3. Auflage** (1998).
- [67] P. Moulton, Ti-doped Sapphire: Tunable Solid-state Laser, *Opt News* **8**, 9–13 (1982).
- [68] A. Diaspro, P. Bianchini, G. Vicidomini, M. Faretta, P. Ramonio und C. Usai, Multi-photon excitation microscopy, *Biomed Eng online* **5** (2006).
- [69] M. Goeppert-Mayer, Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen, *Ann Phys* **9**, 273–294 (1931).

- [70] W. R. Zipfel, R. M. Williams und W. W. Webb, Nonlinear magic: multiphoton microscopy in biological sciences, *Nat Biotechnol* **21**, 1369–1377 (2003).
- [71] S. Denicke (Hg.), *Zeit- und polarisationsaufgelöste Multiphotonenmikroskopie*, Fakultät der Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (2010).
- [72] J. Lakowicz (Hg.), *Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 4 Aufl. (2006).
- [73] T. Kogure, H. Kawano, Y. Abe und A. Miyawaki, Fluorescence Imaging using a fluorescent protein with a large stokes shift, *Methods* **45**, 223–226 (2008).
- [74] A. E. El-Taher, P. Harper, S. A. Babin, D. V. Churkin, E. V. Podivilov, J. D. Ania-Castanon und S. K. Turitsyn, Effect of Rayleigh-scattering distributed feedback on multiwavelength Raman fiber laser generation, *Opt Lett* **36**, 130–132 (2011).
- [75] T. Dieing, O. Hollrichter und Toporski (Hg.), *Confocal Raman Microscopy*, Springer Series in Optical Sciences, 1 Aufl. (2011).
- [76] Y. Zhang, H. Hong und W. Cai, Imaging with Raman spectroscopy, *Curr Pharm Biotechnol* **11**, 654–661 (2010).
- [77] S. Glushkov, I. Panchishin und V. Fadeev, Raman Scattering Spectra recorded in the course of water-ice phase transition and laser diagnostics of heterophase water systems, *Sov J Quantum Electron* **19**, 549–555 (1989).
- [78] S.-L. Ouyang, N.-N. Wu, J.-J. Liu, C.-L. Sun und Z.-W. Li, Investigation of hydrogen bonding in neat dimethyl sulfoxide and binary mixture (dimethyl sulfoxide + water) by concentration dependent Raman study and ab initio calculation, *Chin Phys B* **19**, 123101–7 (2010).
- [79] M. van Zandvoort, W. Engels, K. Douma, L. Beckers, M. Oude Egbrink, M. Daemen und D. Slaaf, Two-Photon Microscopy for imaging of the (atherosclerotic) vascular wall: a proof of concept study, *J Vasc Res* **41**, 54–63 (2004).
- [80] P. Davidovits und M. Egger, Scanning laser microscope, *Proc Natl Acad Sci USA* **223**, 831 (1969).
- [81] D. Pegg, L. Wang und D. Vaughan, Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: the liquidus-tracking method, *Cryobiology* **52**, 360–368 (2006).
- [82] J. Dong, J. Malsa, J. Bischof, A. Hubel und A. Aksan, Spatial distribution of the state of water in frozen mammalian cells, *Biophys J* **99**, 2453–2459 (2010).
- [83] D. Doerr, F. Stracke und H. Zimmermann, Noninvasive Quality Control of Cryopreserved Samples, *Biopreserv Biobank* **06**, 529–531 (2012).

- [84] P. A. Rock (Hg.), *Chemical Thermodynamics*, Univ. Science Books, ISBN-10: 1-891389-32-7 (2003).
- [85] F. Kleinhans und P. Mazur, Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest, *Cryobiology* **54**, 212–222 (2007).
- [86] J. Hornung, T. Mueller und G. Fuhr, Cryopreservation of anchorage-dependent mammalian cells fixed to structured glass and silicon substrates, *Cryobiology* **33**, 260–270 (1996).
- [87] M. Shepard, C. Goldston und F. Cocks, The H₂O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology, *Cryobiology* **13**, 9–23 (1976).
- [88] R. Spindler, B. Rosenhahn, N. Hofman und B. Glasmacher, Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation, *Cryobiology* **64**, 250–260 (2012).
- [89] J. Wolfe, G. Bryant und K. G., What is 'unfreezable' water, how unfreezable is it and how much is there, *Cryo Letters* **23**, 157–166 (2002).
- [90] A. Kreiner-Moeller, F. Stracke und H. Zimmermann, Confocal Raman Microscopy as a noninvasive tool to investigate the phase composition of frozen complex cryopreservation media, *Cryo Letters* **34**, 248–260 (2013).
- [91] H. Meryman, Cryoprotective agents, *Cryobiology* **8**, 173–183 (1971).
- [92] A. Mahmoudzadeh, A. Van Soom, I. Van Vlaenderen und A. De Kruif, A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos, *Theriogenology* **39**, 1291–1302 (1993).
- [93] S. Cseh, J. Corselli, S. Nehlsen-Cannarella, L. Bailey und A. Szalay, The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages, *Theriogenology* **48**, 43–50 (1997).
- [94] A. Germann, Y. J. Oh, T. Schmidt, U. Schoen, H. Zimmermann und H. von Briesen, Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function, *Cryobiology* **67**, 193–200 (2013).
- [95] J. O. Karlsson, A theoretical model of intracellular devitrification, *Cryobiology* **42**, 154–169 (2001).
- [96] D. Pegg, The role of vitrification techniques in cryopreservation in reproductive medicine, *Hum Fertil (Camb)* **8**, 231–239 (2005).
- [97] C. S., L. Valverde, A. Odriozola, X. Elcoroaristizabal und M. de Pancorbo, Quality standards in Biobanking: authentication by genetic profiling of blood spots from donor's original sample, *Eur J Hum Genet* **18**, 848–851 (2010).

- [98] D. Klug, M. O. und E. Whalley, Raman spectrum of high-density amorphous ice, *Physica B+C* **139-140**, 475–478 (1986).
- [99] J. Dong, A. Hubel, J. Bischof und A. Aksan, Freezing induced phase separation and spatial microheterogeneity in protein solutions, *J Phys Chem B* **113**, 10081–10087 (2009).
- [100] C. F. Wu, H. C. Tsung, W. J. Zhang, Y. Wang, J. H. Lu, Z. Y. Tang, Y. P. Kuang, W. Jin, L. Cui, W. Liu und Y. L. Cao, Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose, *Reprod Biomed Online* **6**, 733–739 (2005).
- [101] M. Halberstadt, M. Bohnke, S. Athmann und M. Hagenah, Cryopreservation of human donor corneas with dextran, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 5110–5115 (2003).
- [102] D. Lagneaux, M. Huthinen, E. Koskinen und E. Palmer, Effect of anti-freeze protein (AFP) on the cooling and freezing of equine embryos as measured by DAPI-staining, *Equine Vet J Suppl S.* 85–87 (1997).
- [103] A. P. Rodrigues, C. A. Amorim, S. H. Costa, M. H. Matos, R. R. Santos, C. M. Lucci, S. N. Bao, O. M. Ohashi und J. R. Figueiredo, Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol, *Theriogenology* **61**, 1009–1024 (2004).
- [104] A. Makarevich, E. Kubivicova, M. Popelkova, D. Fabian, S. Cikos, J. Pivko und P. Chrenek, Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant, *Zygote* **18**, 145–153 (2010).
- [105] J. Benson, K. A.J. und A. Higgins, Mathematical optimization of procedures for cryoprotectant equilibration using a toxicity cost function, *Cryobiology* **64**, 144–151 (2012).