

Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Bedeutung der Vitrifikation für die Kryokonservierung und Kryofixierung

Jan Hübinger

11.03.2013

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

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Dortmund, 11.03.2013

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
1. EINLEITUNG	6
1.1 WASSER UNTERHALB VON 0°C.....	7
1.2 KRYOKONSERVIERUNG.....	10
1.2.1 Kryokonservierung mittels langsamen Einfrierens.....	12
1.2.2 Kryokonservierung durch Vitrifikation	13
1.3 KRYOFIXIERUNG FÜR BILDGEBENDE TECHNIKEN	17
1.4 KOMBINATION VON KRYOFIXIERUNG UND KRYOKONSERVIERUNG.....	20
2. FRAGESTELLUNG.....	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 VERWENDETE KRYOPROTEKTIVE MEDIEN.....	22
3.1.1 Dextran	22
3.1.2 EAFS.....	22
3.1.3 DES/DE	23
3.2. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	23
3.2.1 Kultivierung von Säugetierzelllinien	23
3.2.2 Kryokonservierung mittels open pulled straw (OPS).....	24
3.2.3 Kryokonservierung mittels cryotop.....	24
3.2.4 Kryokonservierung mittels french mini straw.....	24
3.2.5 Bestimmung der Anwachsrate von Säugetierzellen	25
3.2.6 Transfektion von HeLa-Zellen.....	26
3.2.7 Immunfluoreszenzfärbung von Tubulin in HeLa-Zellen.....	26
3.2.8 Fluoreszenzfärbung von mitochondrialem Ca ²⁺ in HeLa-Zellen.....	27
3.3 LICHTMIKROSKOPIE.....	27
3.3.1 Zeiss Axiovert	27
3.3.2 Olympus IX 81	27
3.3.3 Leica SP5.....	28
3.3.4 Bestimmung der Membranintegrität mittels PI-Färbung	28
3.3.5 Fluoreszenzmikroskopische Volumenbestimmung	28
3.4 ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND FIXIERUNGSMETHODEN	29
3.4.1 Hochdruckgefrieren (HPF).....	29
3.4.2 Plunge freezing adhärenter Zellen.....	29
3.4.3 Self-pressurized rapid freezing (SPRF).....	31
3.4.4 Gefriersubstitution.....	31
3.4.5 Chemische Fixierung.....	32
3.4.6 Anfertigung von Ultradünnschnitten.....	33
3.4.7 Elektronenmikroskopie (Raumtemperatur)	33
3.4.8 Kryo-Elektronenmikroskopie	33
3.4.9 Kryo-Elektronentomographie.....	34
3.5 RÖNTGENBEUGUNGSMESSUNGEN	34
3.6 MATHEMATISCHE METHODEN	35
3.6.1 Berechnung der Fehlerbalken in Diagrammen.....	35
3.6.2 Test auf statistische Signifikanz.....	35
4. ERGEBNISSE	36
4.1 SÄUGETIERZELLEN ÜBERLEBEN KRYOFIXIERUNG FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPIE NICHT	36
4.2 ADAPTION DES SPRF ZU UNGIFTIGEN BEDINGUNGEN	37
4.3 KRYOFIXIERUNG MITTELS SPRF FÜR DIE GEFRIERSUBSTITUTION	39
4.4 KRYO-FIXIERUNG MITTELS SPRF FÜR DIE KRYOELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	42
4.5 DER AUFTAUPROZESS LEBENDER ZELLEN IST SCHWIERIGER ALS DER EINFRIERPROZESS.....	43

4.6 ANPASSUNG DER KRYOPROTEKTIVA FÜHRT ZU HOHEN ÜBERLEBENS RATEN NACH SPRF UND HPF	44
4.7 EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN KRYOPROTEKTIVA	46
4.7.1 EAFS.....	46
4.7.2 DES/DE.....	54
4.7.3 Dextran	63
4.8 SPRF BRINGT VORTEILE GEGENÜBER ETABLIERTEN VITRIFIKATIONSTECHNIKEN.....	65
4.9 ÜBERLEBENS RATEN NACH SPRF SIND UNABHÄNGIG VOM DRUCKAUFBAU	69
4.11 EXTRA- UND INTRAZELLULÄRE EISKRYSTALLBILDUNG IST NICHT ZWINGEND LETAL FÜR ZELLEN.....	72
4.11.1 EAFS.....	78
4.11.2 Dextran.....	83
4.11.3 DES/DE.....	85
4.12 VITRIFIKATION IST NICHT DIREKT KORRELIERT MIT ÜBERLEBEN BEI KRYOPRESERVATION MITTELS OPS	87
5. DISKUSSION	89
5.1 IST VITRIFIKATION EINE HINREICHENDE UND NOTWENDIGE BEDINGUNG FÜR DAS ÜBERLEBEN NACH KRYOKONSERVIERUNG BEI SCHNELLEM EINFRIEREN?.....	89
5.2 WARUM STERBEN ZELLEN, DEREN ULTRA STRUKTUR PERFEKT DURCH KRYOFIXIERUNG ERHALTEN WURDE?	92
5.3 IST ES MÖGLICH ZELLEN UNTER ERHALTUNG IHRER ULTRA STRUKTUR REVERSIBEL DURCH KRYOBEDINGUNGEN ZU FIXIEREN?	96
5.4 KÖNNEN DIE TECHNISCHEN ERRUNGENSCHAFTEN FÜR DIE KRYOFIXIERUNG AUF DIE KRYOKONSERVIERUNG ÜBERTRAGEN WERDEN, UM DORT BESSERE ERGEBNISSE ZU ERZIELEN?... ..	98
6. ZUSAMMENFASSUNG	101
7. LITERATUR.....	103
8. DANKSAGUNG.....	115

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinder-Serum Albumin
CEMOVIS	<i>Cryo-electron microscopy of vitreous sections</i>
DE	Kryoprotektives Medium aus DMSO und Ethylenglykol (s. Kap. 3.1.3)
DES	Kryoprotektives Medium das DMSO, Ethylenglykol und Sucrose beinhaltet (s. Kap. 3.1.3)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAFS	Kryoprotektives Medium aus Ethylenglykol, Acetamid, Ficoll und Sucrose (s. Kap. 3.1.2)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
HPF	Hochdruckgefrieren (s. Kap. 3.4.1)
OPS	<i>open pulled straw</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
SPRF	<i>Self-pressurized rapid freezing</i> (s. Kap. 3.4.3)

1. Einleitung

Temperaturänderungen haben vielfältige Auswirkungen auf biologische Systeme. Dies hat zu enormen Anpassungen von Organismen an tages- und jahreszeitlich bedingte Temperaturwechsel geführt. Erwärmungen werden von homoiothermen Lebewesen, unter anderem also den Säugetieren inklusive uns Menschen, nur in geringem Maße toleriert. Wird die Körpertemperatur eines Menschen beispielsweise nur kurzfristig um 10°C erhöht, so führt dies bereits zum Tode. Dies gilt auch für isolierte Säugetierzellen. Dem Abkühlen gegenüber sind zumindest Zellen wesentlich toleranter. So würde zwar das Absenken der Körpertemperatur eines Menschen um 10°C ebenfalls zum Tode führen, isolierte Zellen können diesen Zustand jedoch zumindest kurzfristig tolerieren. Aufgrund dieser Toleranz kann das Abkühlen auf vielfältige Weise als nützliches Werkzeug in der Zellbiologie eingesetzt werden.

Abkühlungen oberhalb des Gefrierpunktes von Wasser führen dabei nur zu relativ geringen Veränderungen der physikalischen Umgebung. Dennoch können sie auf der zellbiologischen Ebene einige Veränderungen hervorrufen und somit auch als Werkzeug eingesetzt werden. Beispielsweise können spezifische zelluläre Änderungen, z.B. im Mikrotubuli-Zytoskelett oder in der Sekretion von Proteinen, hervorgerufen werden. Diese Effekte können bereits im Temperaturbereich von 10-25°C erzielt werden (Braulke, Hasilik, & Von Figura, 1988; Mottet, Tuffereau, & Roux, 1986; Snyder & McIntosh, 1976). Dies kann sehr nützlich sein, um zelluläre Vorgänge untersuchen zu können. Das Abkühlen hat des Weiteren den Effekt, dass viele zelluläre Prozesse verlangsamt werden. Zellen, Gewebe oder Organe können bei Temperaturen knapp oberhalb des Gefrierpunktes für relativ kurze Zeit überleben und aufbewahrt werden, beispielsweise für den Transport. Auch wird das Wachstum von vielen Mikroorganismen verlangsamt und so werden diese auch oft bei tiefen Temperaturen gehalten, wenn eine rapide Vermehrung nicht gewünscht ist.

Absenkungen der Temperatur unter den Gefrierpunkt von Wasser haben hingegen wesentlich drastischere Auswirkungen auf biologische Systeme. Physiologische Vorgänge finden normalerweise in einer wässrigen, flüssigen Phase statt. Durch die Absenkungen der

Temperatur unter den Gefrierpunkt wird diese in eine feste, oder wenigstens hoch viskose, Phase überführt. Dadurch kommt es zu einer Aushärtung des Materials, einhergehend mit einer drastischen Reduktion der Bewegung aller Komponenten und damit zu einem Arrest aller Lebensfunktionen.

Für die meisten Formen des Lebens ist dies eine sehr bedrohliche Situation. Unter gewissen Voraussetzungen kann dieser Zustand jedoch für die Kryokonservierung – also die Lagerung biologischen Materials unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser – genutzt werden.

Darüber hinaus wird dieser Zustand für biologische Präparationen genutzt. Die Aushärtung des Materials ermöglicht das Schneiden von biologischem Material, welches sich normalerweise in einer flüssigen Phase befindet, für Licht- und Elektronenmikroskopie. Durch das Anfertigen von Schnitten können Proben, die normalerweise zu dick und undurchdringlich für den Licht- oder Elektronenstrahl sind, untersucht werden. In der Lichtmikroskopie werden Kryoschnitte für histologische Untersuchungen als Alternative zur Anfertigung von Paraffineinbettungen benutzt. In der Elektronenmikroskopie wird der Effekt einerseits bei der Tokuyasu-Technik (Webster & Webster, 2007) und andererseits beim Anfertigen vitrifizierter Schnitte (CEMOVIS) ausgenutzt (Jacques Dubochet, 2012; Jacques Dubochet et al., 1988). Das Überführen in eine feste Phase und die damit verbundene drastische Verminderung der Diffusion sowie das Anhalten biologischer Prozesse werden des Weiteren für die Kryo-Fixierung genutzt. Kryo-Fixierung ist folglich ein Arrest des biologischen Materials ohne chemische Modifikation. Da sich die Moleküle unter geringer thermischer Energie kaum bewegen, spiegelt ein schnell genug abgekühltes Präparat sehr gut den nativen Zustand des Präparates wieder. Dieses kann in seinem arretierten Zustand praktisch unendlich lange untersucht werden. Während bei der Tokuyasu-Technik chemisch fixiertes Material nur ausgehärtet wird, um es besser schneiden zu können, dient das Abkühlen bei der Anfertigung von Kryoschnitten für die Lichtmikroskopie, bei CEMOVIS und weiteren kryo-elektromikroskopischen Methoden zusätzlich als Kryo-Fixierung.

1.1 Wasser unterhalb von 0°C

Für die Fixierungs- und Aushärtungsmethoden wird ein weiterer Temperaturbereich herangezogen. Kryoschnitte für die Lichtmikroskopie werden bei etwa -15°C bis -30°C durchgeführt.

Elektronenmikroskopische Schnitte nach der Tokuyasu-Technik werden bei -80°C bis -120°C angefertigt (Webster & Webster, 2007). Schnitte nach der CEMOVIS-Technik werden bei ca. -145°C angefertigt (Al-Amoudi, Norlen, & Dubochet, 2004; Bouchet-Marquis, Starkuviene, & Grabenbauer, 2008; Jacques Dubochet et al., 2007; Han, Huebinger, & Grabenbauer, 2012). Die Kryofixierung für diese und weitere kryo-elektronenmikroskopische Techniken findet bei noch tieferen Temperaturen statt. Wird flüssiges Ethan, gekühlt durch flüssigen Stickstoff, verwendet, so liegt die Fixierungstemperatur im Bereich von -170°C bis -183°C . Bei der Kühlung durch flüssigen Stickstoff selbst, liegt die Temperatur bei -196°C , bei flüssigem Helium sogar bei -269°C . Kryokonservierung findet in der Regel in flüssigem Stickstoff bei -196°C statt. In diesen Temperaturbereichen können Wasser und wässrige Lösungen verschiedene Zustände annehmen. Kühlt man Wasser unterhalb seines Schmelzpunktes von 0°C bei Normaldruck ab, so bleibt es normalerweise zunächst flüssig. Dieses unterkühlte Wasser ist allerdings metastabil. Sobald ein oder mehrere Nukleationskeime entstehen kristallisiert das komplette Wasser zu Eis. Eis ist die kristalline, feste Form des Wassers. Es gibt zumindest 16 verschiedene Kristallstrukturen von Eis. Eis I_h (hexagonales Eis), I_c (kubisches Eis) und Eis II – XV (Salzmann, Radaelli, Mayer, & Finney, 2009)(Abb. 1.1). Neben diesen kristallinen Formen kann Wasser jedoch auch amorph bleiben und durch eine sehr hohe Viskosität trotzdem die Eigenschaften eines Feststoffes annehmen (Jaques Dubochet et al., 1988; Loerting et al., 2011; Pegg, 2007; Wowk, 2010). Ein amorpher Festkörper ist ein Glas (latein: *vitrum*). Ab einer Viskosität von 10^{13} Poises spricht man nicht mehr von flüssigem Wasser sondern von vitrifiziertem Wasser oder auch von vitrifiziertem Eis (Angell, 2002; Pegg, 2007; Wowk, 2010). Der Begriff des vitrifizierten Eises ist jedoch missverständlich. Es handelt sich strenggenommen nicht um ein Eis, da keine Kristallstruktur vorhanden ist. Der Begriff der Eisbildung wird demzufolge in dieser Arbeit nur für kristallines Eis verwendet. Die Bildung vitrifizierten Wassers hingegen ist die Vitrifikation oder das Vitrifizieren. Genauso wie von kristallinem Eis, gibt es auch verschiedene feste, amorphe Formen von Wasser (Loerting et al., 2011). Bei Abkühlen unter Normaldruck kann Wasser jedoch nur drei feste Formen einnehmen: Es kann hexagonales oder kubisches Eis bilden oder vitrifizieren. Andere Eisformen und amorphe Phasen bilden sich nur bei Druck über 2000 bar (Abb. 1.1B) (Loerting et al., 2011; Salzmann et al., 2009). Ob sich beim Abkühlen hexagonales oder kubisches Eis bildet

oder das Wasser vitrifiziert, hängt von der Abkühlrate ab (Jaques Dubochet et al., 1988). Unter gewöhnlichen Abkühlbedingungen auf der Erde formt sich immer hexagonales Eis – die thermodynamische stabile Form des Wassers bei unter 0°C und Normaldruck – und somit ist praktisch alles natürlich vorkommende feste Wasser auf der Erde in dieser Konfiguration (Jaques Dubochet et al., 1988; Kohl, Mayer, & Hallbrucker, 2000; Wowk, 2010). Vitrifikation von purem Wasser findet nur bei extrem hohen Abkühlraten von >100000°C/s statt. Unter solch hohen Abkühlraten fehlt die Zeit für die Wassermoleküle, sich in einer geordneten Kristallstruktur einzufinden (Jaques Dubochet et al., 1988; Studer, Humbel, & Chiquet, 2008). Wichtig ist hierbei vor allem die extrem schnelle Durchquerung des „no-man’s-land“ zwischen der Temperatur der homogenen Eisnukleation und der Glasübergangstemperatur (vergleiche Abb.1.1). In diesem Bereich ist flüssiges Wasser so instabil, dass es bislang nicht direkt nachgewiesen werden konnte.

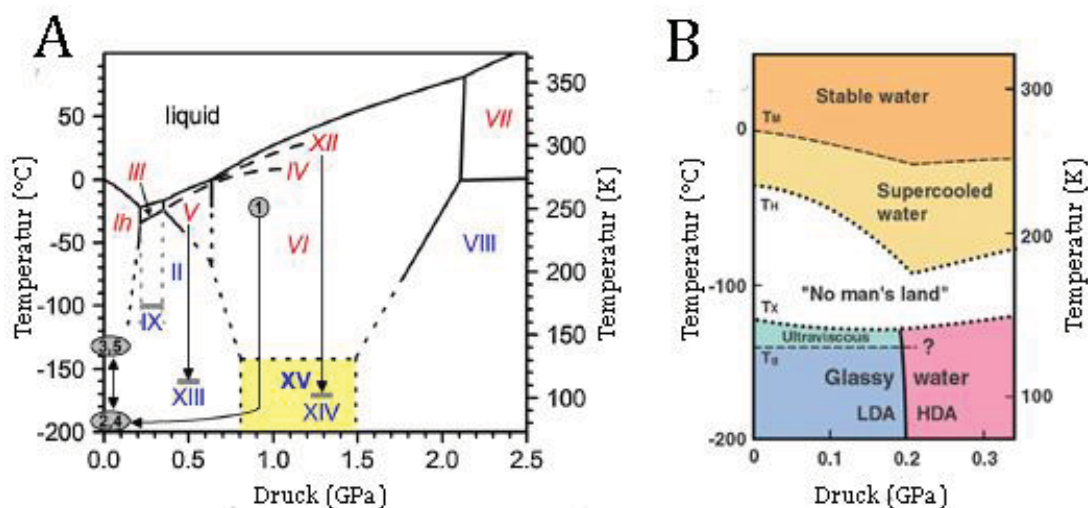


Abbildung 1.1: Phasendiagramme von Wasser

A Phasendiagramm der bekannten kristallinen Eisformen. Modifiziert von (Salzmann et al., 2009). Ih und II-XV: Eis Ih und Eis II-XV

B „Phasendiagramm“ der nicht-kristallinen, amorphen Phasen des Wassers modifiziert nach (Loerting et al., 2011). T_M : Schmelztemperatur; T_H : Temperatur der homogenen Eisnukleation; T_G : Glasübergangstemperatur; T_X : Kristallisationstemperatur (beim Aufwärmen vitrifizierten Eises); LDA: vitrifiziertes Wasser niederer Dichte; HDA: vitrifiziertes Wasser höherer Dichte

Kubisches Eis formt sich unter Abkühlraten, die knapp unterhalb der nötigen Abkühlrate für Vitrifikation liegen. Sowohl vitrifiziertes Wasser als auch kubisches Eis sind metastabil. Unter Energiezufuhr werden sie normalerweise in hexagonales Eis umgewandelt. Wird vitrifiziertes Wasser aufgewärmt, so geht es zunächst in eine hochviskose, flüssige Phase über (vergl. Abb 1.1B). Mit steigender Temperatur bekommen die Moleküle dann wieder die

Bewegungsfreiheit um Kristalle zu formen. Um eine Kristallisation zu vermeiden, muss die Aufwärmung besonders durch das „no man's land“ wieder extrem schnell verlaufen. Ebenso ist die Existenz mehrerer kleiner Kristalle energetisch unvorteilhaft. Sie vereinen sich deshalb zu einem großen Kristall, wenn Energie zugeführt wird.

1.2 Kryokonservierung

Bereits seit der Begründung der modernen Kryobiologie, in der ersten Hälfte des 20sten Jahrhunderts, ist die Kryokonservierung von lebendem Gewebe einer der zentralen Punkte der Kryobiologie. Unter Kryokonservierung versteht man ein reversibles Anhalten des Lebens bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser. Hierdurch wird eine Lagerung über sehr lange Zeiträume ermöglicht, ohne dass eine Alterung stattfindet. Nach dem Auftauen lebt die konservierte Probe im Optimalfall weiter, als wäre sie nie eingefroren worden. Seit ersten erfolgreichen Versuchen in den 1930er & 1940er Jahren an pflanzlichen (Luyet & Thoennes, 1938) und tierischen Zellen (Polge, Smith, & Parkes, 1949) wird Kryokonservierung bereits an vielen Zelltypen angewandt (z.B. Jain & Paulson, 2006; Lloyd, Orr, Skett, Berry, & Dennison, 2003; Morris, 2007; Muldrew et al., 2000; Pegg, 2002).

Die Ziele der Kryokonservierung sind in erster Linie medizinischer Natur. So könnten durch eine erfolgreichere Konservierung von etwa Blut oder Organen vorhandene Engpässe bei Empfängern von Blutspenden oder Transplantationen vermieden werden. Durch effektive Kryokonservierung von Stammzellen ist es auch denkbar, dass in Zukunft Patienten mit ihren eigenen Stammzellen therapiert werden, wenn entsprechende Stammzellbanken von Patienten angelegt werden bevor sie erkranken. Auch in der Reproduktionsmedizin und -biologie spielt die Kryokonservierung eine zentrale Rolle. Dies zeigt sich schon dadurch, dass bereits die ersten erfolgreich kryokonservierten tierischen Zellen Spermien waren (Polge et al., 1949). Für die Reproduktionsbiologie hat die Kryokonservierung den Vorteil, dass wertvolle Keimzellen praktisch unendlich lange aufbewahrt werden können. Hierbei kann es sich beispielsweise um Keimzellen von Tieren handeln, die für die Zucht besonders wertvoll sind. Oder auch um menschliche Keimzellen, die für künstliche Befruchtungen aufbewahrt werden. Besonders seit der Etablierung immortalisierter Zelllinien in den frühen 1950er Jahren (Gey, Coffmann, & Kubicek, 1952), ist die Kryokonservierung auch

für die Forschung in vielen biologischen und medizinischen Laboren unabdingbar. Nur durch die Kryokonservierung konnten und können verschiedenste Zelllinien über Jahrzehnte aufbewahrt werden und ihre Veränderungen durch Mutation, Selektion und genetische Drift, die bei der Kultivierung auftreten, in Grenzen gehalten werden. Zu guter Letzt kommt der Kryokonservierung – in einer Zeit, in der immer mehr Arten von Lebewesen vom Aussterben bedroht sind – auch eine entscheidende Bedeutung in der Erhaltung der Biodiversität zu. So hat man bereits begonnen Biobanken zur Erhaltung der Artenvielfalt anzulegen. Zum einen, um die Diversität der Natur zu bewahren, aber vor allem auch, um die Ernährungsgrundlagen der Menschen zu erhalten (Hagedorn et al., 2012; Hopkin, 2008; Roldan et al., 2006; Sawicka, Brzezińska, & Bednarczyk, 2011).

Obwohl die Kryobiologie bereits viel auf dem Feld der Kryokonservierung erreicht hat, gibt es doch immer noch großen Bedarf für Verbesserungen. Zellen mit relativ geringem Wassergehalt, wie z.B. Bakterien, eukaryotische Einzeller oder Pflanzensamen, sind in der Regel relativ einfach zu konservieren. Auf ihre Konservierung soll deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Die Kryokonservierung von Säugerzellen oder gar Geweben und Organen ist dagegen deutlich komplexer (Hopkin, 2008; Pegg, 2010). Die Kryokonservierung der meisten immortalisierten Zelllinien für Forschungszwecke ist heute standardisiert. Für viele dieser vergleichsweise robusten Zelllinien führt das zu ausreichend hohen Überlebensraten, um eine weitere Kultivierung der Zellen nach dem Auftauen zu ermöglichen. An einigen Stellen besteht auch in der Kryokonservierung für den Laboralltag noch Optimierungsbedarf, so ist z.B. das Einfrieren von Primärzellen oder Zellen, die sich nicht vereinzeln lassen, komplexer und auch Gegenstand der aktuellen Forschung (Ballarin & Peruffo, 2012; Beier et al., 2011; Dillon et al., 2012; Ji, de Pablo, & Palecek, 2004; Saliem et al., 2012). In vielen anderen Bereichen ergeben sich für die Kryokonservierung jedoch noch deutlich größere Probleme. Biobanken, die dem Erhalt der Biodiversität dienen, müssen sich der Herausforderung stellen, dass die Zellen verschiedener Spezies unterschiedliche Protokolle für die Kryokonservierung benötigen und diese Zellen teilweise sehr empfindlich sind (Hagedorn et al., 2012; Hopkin, 2008). Ähnliche Probleme ergeben sich auch bei medizinischen Anwendungen der Kryokonservierung. Hier sollen verschiedene Zelltypen und vor allem auch Organe und Gewebe konserviert werden. Die Probleme der Kryokonservierung sind dabei

so vielfältig, wie die Gewebe, Zellen und Lebewesen die eingefroren werden sollen (J. G. Day & Stacey, 2007; Pegg, 2010).

Um die Probleme, die sich bei der Kryokonservierung ergeben, zu lösen, ist es entscheidend, die grundlegenden Mechanismen zu verstehen. Zur Zeit gibt es zwei vorherrschende Strategien zur Kryokonservierung: Langsames Einfrieren unter Vermeidung intrazellulärer Eisbildung und Vitrifikation (Pegg, 2007). Mit beiden Strategien wurden schon Zellen erfolgreich kryokonserviert und es herrscht Uneinigkeit darüber, ob eine der beiden Strategien generelle Vorteile bringt (Jain & Paulson, 2006; Lloyd et al., 2003; Muldrew et al., 2000; Pegg, 2007; Polge et al., 1949; Sawicka et al., 2011; Shirazi et al., 2010).

1.2.1 Kryokonservierung mittels langsamen Einfrierens

Die seit längerem etablierte Methode ist das langsame Einfrieren von Zellen. Es wird in vielen Labors und Kryobanken routinemäßig angewandt und ist unter anderem die Standardmethode zur Konservierung immortalisierter Zelllinien (Morris, 2007). Langsames Einfrieren bedeutet in diesem Zusammenhang das Einfrieren mit Geschwindigkeiten von wenigen Grad Celsius pro Minute. Für tierische Zellen ist dieser Vorgang normalerweise letal, doch durch den Einsatz kryoprotektiver Substanzen können sie den Gefriervorgang überleben (Lovelock, 1953a, 1954; Polge et al., 1949). Das gebräuchlichste Kryoprotektivum ist heutzutage Dimethylsulfoxid (DMSO), aber auch Glycerol, Ethylenglykol und Propan-1,2-Diol werden häufig verwendet (Morris, 2007; Pegg, 2002). Diese Substanzen haben gemeinsam, dass sie in den einzusetzenden Konzentrationen eine relativ niedrige Toxizität aufweisen und dass sie zellpermeabel sind. Sowohl das passende Kryoprotektivum und seine ideale Konzentration als auch die optimale Kühlrate muss für jeden Zelltyp empirisch ermittelt werden, um möglichst hohe Überlebensraten zu erhalten (Hopkin, 2008; Morris, 2007). Beim langsamen Einfrieren folgt die Eisbildung im Wesentlichen dem thermodynamischen Gleichgewicht, folgerichtig bildet sich hexagonales Eis. Es kommt zu Eisnukleation und -wachstum im extrazellulären Raum (Dong, Malsam, Bischof, Hubel, & Aksan, 2010; Mazur, 1963; Pegg, 2007). Da Eiskristalle aus quasi reinem Wasser bestehen, konzentrieren sich die restlichen Bestandteile der Lösung, hauptsächlich Salze und Kryoprotektiva, auf (Lovelock, 1953b). Die erhöhte Konzentration an Salzen und

Kryoprotektiva sorgt für ein Absinken des Gefrierpunktes, so dass – anders als beim Einfrieren reinen Wassers – der Rest der Lösung in der flüssigen Phase verbleibt. Je niedriger die Temperatur wird, desto mehr Wasser gefriert und desto kleiner wird der Anteil der flüssigen Phase. Durch die sukzessive Aufkonzentrierung der Salze und den dadurch entstehenden osmotischen Druck, wird den Zellen, die sich in der flüssigen Phase befinden, immer mehr Wasser entzogen und sie schrumpfen immer weiter zusammen, bis schließlich die dehydrierte Zelle erstarrt (Mazur, 1963; Pegg, 2007). Bei ausreichend niedriger Wasserkonzentration bilden sich dann keine Eiskristalle mehr, sondern das Innere der Zelle erstarrt in seinem amorphen Zustand (Pegg, 2002). Auf diese Weise kann intrazelluläre Eisbildung vermieden werden, von der allgemein angenommen wird, dass sie tödlich für die Zellen ist (Pegg, 2002, 2007; Seki & Mazur, 2012). Die Kühlrate muss somit niedrig genug sein, damit das Wasser schnell genug aus der Zelle heraus diffundieren kann (Mazur, 1963; Morris, 2007; Pegg, 2002, 2007). Zellen sind demzufolge extremen Situationen ausgesetzt: Sie schrumpfen nicht nur drastisch, sie werden außerdem sehr hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt und gerade bei hoher Zellkonzentration können sie auch mechanischen Schaden durch extrazelluläres Eis nehmen (Lovelock, 1953a, 1953b, 1954; Mazur, 1984; Pegg, 2007). Diese Extrembedingungen werden durch viele vereinzeltbare Zellen gut überlebt, wenn das Einfrierprotokoll entsprechend angepasst ist. Probleme ergeben sich bei Zellen, für die Vereinzelung letal ist, da sie z.B. auf Zell-Zell-Kontakte angewiesen sind, bei großen Zellen mit sehr definierter Struktur wie z.B. Eizellen oder bei Geweben, Organen oder gar ganzen Organismen (Beier et al., 2011; Coopman, 2011; Pegg, 2010).

1.2.2 Kryokonservierung durch Vitrifikation

Die zweite Strategie zur Kryokonservierung, die Vitrifikation, ist vom generellen Konzept wesentlich weniger komplex: Eisbildung soll hier trotz tiefer Temperatur komplett vermieden werden (Pegg, 2002, 2007; Rall & Fahy, 1985; Wowk, 2010). Theoretisch können so alle genannten Faktoren, die das Überleben beim Abkühlen beeinträchtigen, umgangen werden. Bereits in den Anfangstagen der Kryobiologie nahm man an, dass Eiskristallbildung für das Überleben der Zellen während der Kryokonservierung verhindert werden muss. So hieß zum Beispiel der erste wissenschaftliche Beitrag in dem

Überleben von Säugerzellen gezeigt wurde: „*Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at low temperatures*“ (Polge et al., 1949). Allerdings kann Vitrifikation mit der damals erzielten Methode nicht erreicht werden (Pegg, 2002). Die verwendete Temperatur von -79°C war nicht tief genug um überhaupt Vitrifikation der wässrigen Lösung zu erreichen (Loerting et al., 2011) und auch die verwendeten Abkühlraten würden nach heutigen Erkenntnissen dafür nicht ausreichen. Die von Polge et al. gewonnenen Erkenntnisse ebneten viel mehr den Weg für die Kryokonservierung mittels langsamen Einfrierens (Pegg, 2002, 2007; Polge et al., 1949). Spricht man heute von Vitrifikation im Sinne der Kryobiologie, so versteht man darunter, dass sowohl extra- als auch intrazellulär jegliche Bildung von kristallinem Eis unterbunden wird (Pegg, 2007; Wowk, 2010). W.F. Rall und G.M. Fahy waren 1985 die ersten, die diesem Ansatz verfolgten und erfolgreiche Kryokonservierung publizierten (Rall & Fahy, 1985). Säugetierzellen müssen in Medien auf Wasserbasis gehalten werden. Wie in Kapitel 1.1 erläutert, ist Vitrifikation von Wasser nur unter sehr hohen Abkühlraten möglich. Die Volumina in denen dies realisiert wurde sind sehr gering (J. Dubochet & McDowall, 1981; Mayer & Brüggeller, 1980) und für die Kryokonservierung von Säugetierzellen ungeeignet. Größere Volumina lassen sich nicht vitrifizieren, da das Wasser selbst als Isolator wirkt und den schnellen Temperaturexchange der inneren Bereiche verhindert. Vitrifikation kann jedoch auf eine weitere Art erreicht werden. Manche Flüssigkeiten erstarren beim Abkühlen immer zu einem Glas, dies nennt man Gleichgewichtsvitrifikation. Dies gilt auch für einige Lösungen, die Wasser enthalten, z.B. Lösungen aus 80% Glycerol und 20% Wasser (Hopkins, Badeau, Warkentin, & Thorne, 2012; Pegg, 2007). Glycerol und andere kryoprotektive Substanzen setzen aber auch schon in geringeren Konzentrationen die für eine Vitrifikation notwendige Abkühlrate herab (Pegg, 2007). Heutige Vitrifikationsprotokolle bauen deshalb auf eine Kombination zweier Effekte: möglichst hohe Abkühlraten und zusätzlich Kryoprotektiva, die die Kristallisation des Wassers verlangsamen (Iwayama et al., 2004; Pegg, 2002, 2007; Rall & Fahy, 1985; Vajta et al., 1998). Die Kryoprotektiva müssen in der Regel in relativ hohen Konzentrationen zugegeben werden. Die Konzentrationen sind dabei höher als bei langsamen Einfrierprotokollen (Pegg, 2002). Dies kann wiederum zu einem Schrumpfen der Zellen führen (Kaidi, Donnay, Lambert, Dessy, & Massip, 2000; Rall, 1987), ein Stressfaktor der theoretisch umgangen

werden könnte. Noch wichtiger ist jedoch, dass viele Kryoprotektiva in den hohen Konzentrationen giftig für die Zellen sind (Pegg, 2007). Vitrifikation ist infolgedessen zwar theoretisch sehr simpel: Das zu kryokonservierende Material muss in der Kälte einfach nur erstarren, ohne zu kristallisieren. Die praktische Umsetzung hingegen ist wesentlich komplexer: Es ist schwierig, auf genügend hohe Temperaturänderungsraten zu kommen und die demzufolge benötigten hohen Konzentrationen an Kryoprotektiva sind oft giftig (Pegg, 2002, 2007). In der Praxis wird heute für Vitrifikationsansätze meist eine Mischung aus zellpermeablen und rein extrazellulären Kryoprotektiva benutzt. In der aktuellen Literatur wird häufig eine Mischung aus DMSO, Ethylenglykol und Sucrose benutzt (z.B. Beier et al., 2011; Berthelot, Martinat-Botté, Locatelli, Perreau, & Terqui, 2000; Coticchio et al., 2009; Gomis et al., 2013; Gualtieri et al., 2011; Hochi et al., 2004; Iwayama et al., 2004; Prentice-Biensch, Singh, Mapletoft, & Anzar, 2012), für die Kryokonservierung von Oozyten ist auch eine Mischung aus Ethylenglykol, Acetamid, Ficoll und Sucrose (EAFS) gebräuchlich (Mazur & Seki, 2011; Pedro et al., 1997; Seki & Mazur, 2009, 2012). Daneben werden fortwährend weitere Kombinationen von Kryoprotektiva für die Vitrifikation getestet, mit dem Ziel, optimale Mixturen für möglichst hohe Überlebensraten zu finden. Die notwendigen hohen Temperaturänderungsraten wurden in der Praxis zunächst dadurch erreicht, dass Plastikhalme mit einem relativ geringen Volumen in flüssigen Stickstoff getaucht wurden (Rall & Fahy, 1985). In den letzten Jahren wurden auch offene Systeme entwickelt, bei denen ein Teil der Probe in direkten Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff kommt, um eine noch höhere Kühlrate zu erhalten (Iwayama et al., 2004; Vajta et al., 1998). In diesen Systemen wird zudem ein noch geringeres Volumen eingefroren. Dies optimiert die Abkühlraten aus den bereits diskutierten Gründen, limitiert auf der anderen Seite die Anwendung jedoch auf entsprechend kleine Proben.

Seit der ersten Publikation aus dem Jahre 1985 (Rall & Fahy, 1985), sind viele, zumeist empirische Studien veröffentlicht worden, die mit ähnlichen Methoden hohe Überlebensraten für verschiedenste Zellen erzielen (z.B. Beier et al., 2011; Choi & Bischof, 2010; Kuleshova, MacFarlane, Trounson, & Shaw, 1999; Seki & Mazur, 2009, 2012). Die Korrelation zwischen tatsächlicher Vitrifikation und Überleben ist in den meisten Studien allerdings nur unzureichend untersucht. Viele Studien verwenden ein Medium von dem in Abwesenheit der Zellen gezeigt wird, dass es vitrifizieren kann (z.B. Choi & Bischof, 2010; Kuleshova et al., 1999; Rall & Fahy, 1985; Seki

& Mazur, 2009). Dies vernachlässigt einerseits den Verdünnungseffekt durch zelluläres Wasser. Viel wichtiger ist allerdings, dass auch wenn das Medium in Gegenwart der Zellen vitrifiziert, absolut keine Aussage über die Eisphase im Zellinneren getroffen werden kann. Das Zellinnere ist durch die selektiv permeable Plasmamembran vom extrazellulären Medium getrennt und hat somit eine andere Zusammensetzung und andere Vitrifikationseigenschaften als der extrazelluläre Raum. Meist wird die Vitrifikation des Mediums mit dynamischer Differenzkalorimetrie oder Differentialthermoanalyse bestimmt (z.B. Choi & Bischof, 2010; Kuleshova et al., 1999; Rall & Fahy, 1985; Seki & Mazur, 2009; Shaw, Kuleshova, MacFarlane, & Trounson, 1997; Wusteman, Pegg, Wang, & Robinson, 2003). Bei diesen Methoden wird die Vitrifikation indirekt, während dem relativ langsamen Auftauen der Probe, nachgewiesen. Wird während dem Auftauen eine für Devitrifikation spezifische Änderung der aufgenommenen Wärmemenge detektiert, geht man davon aus, dass die Probe vitrifiziert war (z.B. Kuleshova et al., 1999; Rall & Fahy, 1985; Seki & Mazur, 2009; Shaw et al., 1997; Wusteman et al., 2003). Die Differentialthermoanalyse liefert keinerlei quantitative Informationen. Die dynamische Differenzkalorimetrie kann im Prinzip quantitative Informationen liefern, sie wird aber in der Regel nicht quantitativ genutzt (z.B. Kuleshova et al., 1999; Rall & Fahy, 1985; Seki & Mazur, 2009; Shaw et al., 1997; Wusteman et al., 2003). Das bloße Auftreten eines Devitrifikationssignals zeigt eigentlich nur, dass zumindest ein Teil der Probe vitrifiziert war. Es gibt keine Informationen darüber, wie groß dieser Anteil ist. Würde man Lösungen mit Zellen testen, würde es auch keine Informationen darüber geben, ob Vitrifikation intra- oder extrazellulär auftritt. Im Unterschied zu den vorgenannten Methoden kann mittels Röntgendiffraktion Vitrifikation eindeutig und direkt nachgewiesen werden (Mayer & Brüggeller, 1980, 1982). Es können auch Mischformen aus kristallinem und vitrifiziertem Eis nachgewiesen werden (Mayer & Brüggeller, 1980, 1982). Die räumliche Auflösung ist allerdings nicht ausreichend, um intra- und extrazellulären Raum zu unterscheiden. Zudem wird diese Methode in der Kryobiologie kaum angewandt. Getestet wird in der Kryokonservierung zumeist nur die erfolgreiche Vitrifikation, also der Abkühlprozess. Aus theoretischen Überlegungen wurde gefolgert, dass mindestens genauso hohe Aufwärm- wie Abkühlraten notwendig sind, um ein Kristallisieren der metastabilen vitrifizierten Probe während des Auftauens zu verhindern (Pegg, 2007; Seki & Mazur, 2012). Eine Studie von Hopkins et al. kommt sogar zu dem Schluss, dass

Aufwärmraten um ein bis drei Größenordnungen schneller sein müssen als Abkühlraten, um eine Devitrifikation zu verhindern (Hopkins et al., 2012). Dennoch rückte erst in den letzten Jahren und parallel zu dieser Arbeit der Fokus der Forschung zusätzlich auf den Aufwärmprozess (Hopkins et al., 2012; Seki & Mazur, 2009, 2012). Möglicherweise ist der Aufwärmprozess weniger untersucht, da er schwieriger zu beobachten ist als der Abkühlprozess. Mit gängigen Methoden wie dynamischer Differenzkalorimetrie, Differentialthermoanalyse oder Röntgendiffraktion wird das vitrifizierte/gefrorene Endprodukt analysiert. Aufgrund der geringen thermischen Energie ist nach dem Frieren jegliches Eis, welches sich beim Abkühlen bildet noch vorhanden. Beim Auftauen ist dies nicht möglich, da das Endprodukt in jedem Fall flüssig ist, egal ob eine Kristallisation beim Auftauen stattgefunden hat oder nicht. Um die Dynamik einer möglichen Kristallisation während des rapiden Auftauprozesses direkt zu beobachten, ist die zeitliche Auflösung der Methoden nicht ausreichend.

1.3 Kryofixierung für bildgebende Techniken

Vitrifikation von Zellen und anderem biologischem Material wird aber nicht nur als Methode für die Kryokonservierung eingesetzt. Biologisches Material wird ebenso für die ultrastrukturelle Untersuchung im Elektronenmikroskop vitrifiziert (Jacques Dubochet, 2012). In der Elektronenmikroskopie biologischer Proben besteht seit ihrer Etablierung das Problem, dass alle Flüssigkeit aus einer Probe eliminiert werden muss, da sie im Vakuum des Elektronenmikroskops sofort verdampfen würde (Jacques Dubochet, 2012). Da Wasser der Hauptbestandteil so gut wie jeder biologischen Probe ist, haben Elektronenmikroskopiker eine große Bandbreite an Methoden der Fixierung und Einbettung entwickelt das Wasser aus Ihnen zu entziehen und trotzdem die Ultrastruktur des biologischen Materials möglichst exakt zu erhalten. Dieses Wissen füllt heute eine Vielzahl an Büchern und eine Vielzahl von ultrastrukturellen Untersuchungen konnte mit seiner Hilfe unternommen werden (z.B. Allen, 2008; Cavalier, Spohner, & Humbel, 2008; Plattner & Zingsheim, 1987). Dennoch birgt jegliche chemische Fixierung die Gefahr einer Artefaktbildung und es scheint ideal, das biologische Material im voll hydrierten – praktisch nativen – Zustand elektronenmikroskopisch untersuchen zu können (Jacques Dubochet, 2012). Einfrieren der biologischen Probe erschien die logische

Schlussfolgerung zur Eliminierung der Flüssigkeit. Es stellte sich jedoch zunächst heraus, dass die Bildung von Eis zu einer weitaus größeren Zerstörung der Ultrastruktur führt, als die chemische Fixierung (Jacques Dubochet, 2012). Die Begründung hierfür liegt in der Aufkonzentrierung aller in Wasser gelösten Substanzen in der flüssigen Phase, wenn das Wasser beim langsamen Abkühlen in zu Eis kristallisiert, wie in Kapitel 1.2.1 bereits diskutiert. Mitte der 1970er Jahre gab es jedoch erste erfolgreiche Versuche, biologische Proben im tiefgekühlten Zustand elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Die Autoren K. A. Taylor und R. M. Glaeser froren biologische Proben sehr schnell in flüssigem Stickstoff und konnten zeigen, dass es so möglich ist, sehr hohe elektronenmikroskopische Auflösung zu erzielen bei unerwartet hohem Kontrast, ohne dass weitreichende Zerstörungen des biologischen Materials stattfand (Jacques Dubochet, 2012; Taylor & Glaeser, 1974, 1976). In Folge dessen konnte aufgrund von Verbesserungen im Abkühlprozess die Vitrifizierung von reinem Wasser, sowie die Vitrifizierung von biologischen Proben nachgewiesen werden und somit Eiskristallbildung und damit verbundene Artefaktbildung gänzlich unterbunden werden. Es wurde auch schnell eine Technik entwickelt, mit der aus vitrifizierten biologischen Proben Ultradünnschnitte angefertigt werden konnten. Dies ermöglichte auch wesentlich dickere Proben zu untersuchen, die der Elektronenstrahl sonst nicht vollständig durchdringen kann (Chang et al., 1982; J. Dubochet & McDowall, 1981; McDowall et al., 1983). Schon früh musste man dabei feststellen, dass die Vitrifikation mit den damals verwendeten Methoden aber nur geringe Eindringtiefen von ca. 1µm in die Probe hat und es bei dickeren Proben starke Beschädigungen der Probe durch Eis gibt (Chang et al., 1982; McDowall et al., 1983). Bei diesen frühen Versuchen, wurden Proben entweder durch schnelles Eintauchen in flüssiges Ethan (*plunge freezing*) vitrifiziert (J. Dubochet & McDowall, 1981) oder durch Beschleunigen auf einen durch flüssiges Helium gekühlten Metalblock (*metal mirror freezing*), eine Technik die schon zuvor für Gefrierbruchstechniken entwickelt wurde (Heuser et al., 1979; McDowall et al., 1983). *Plunge freezing* ist noch heute die Standardmethode für die kryoelektronenmikroskopische *in vitro* Analyse kleiner Partikel, meist Proteine oder Viren (Orlova & Saibil, 2011). Die Dicke der so vitrifizierten Proben beträgt ca. 0,1-1µm und ist somit für Säugetierzellen oder gar Gewebe zu gering. Deshalb wurde auf eine weitere Entwicklung zurückgegriffen, die ursprünglich für die Gefrierbruchstechnik entwickelt wurde: das Hochdruckgefrieren

(HPF). Durch einen kurzen Druckpuls von ca. 2100bar während dem rapiden Kühlen wird hier die Vitrifikation dickerer Proben unterstützt (Moor, 1971). Dass eine Probe bei diesem Druck leichter vitrifiziert, kann man darauf zurück führen, dass bei diesem hohen Druck sowohl der Schmelzpunkt von Wasser, als auch der Punkt der homogenen Eis-Nukleation von Wasser deutlich sinken (vergl. Abb. 1.1). Kanno et al. konnten zeigen, dass die Temperatur der homogenen Eis-Nukleation von -38°C bei Normaldruck auf -92°C bei 2000 bar sinkt (Kanno, Speedy, & Angell, 1975). Erklärt werden kann dieser Vorgang durch das Prinzip des geringsten Zwanges (Le Chatelier/Braun-Prinzip). Das Prinzip besagt, dass wenn ein im thermodynamischen Gleichgewicht befindliches System einem äußeren Zwang ausgesetzt wird, sich das Gleichgewicht so verschiebt, dass der Zwang minimiert wird. Bei der Vitrifikation handelt es sich zwar nicht um ein im Gleichgewicht befindliches System, dennoch wird dieses Prinzip herangezogen, um zu erklären, warum bei einem angelegten Druck Wasser weniger leicht in Eis geringerer Dichte übergeht (Leunissen & Yi, 2009). Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass die Glasübergangstemperatur mit steigendem Druck in wässrigen Lösungen ansteigt (Miyata, Hayakawa, Kajiwara, & Kanno, 2012). Der Temperaturbereich zwischen unterkühltem Wasser und Glasübergangstemperatur – das sogenannte „no-man’s land“ (Abb. 1.1) (Loerting et al., 2011), was es möglichst schnell zu durchqueren gilt – wird so minimiert. Man nimmt an, dass die Vitrifikationstiefe durch den Druck beim HPF verzehnfacht wird (Studer et al., 2008), bzw. dass der Druck etwa 20% Kryoprotektiva ersetzt (Moor, Bellin, Sandri, & Akert, 1980). Trotzdem kann auch beim Hochdruckgefrieren der meisten Proben auf Kryoprotektiva nicht verzichtet werden. Als Standard hat sich heute die Verwendung von Dextran als Kryoprotektivum beim Hochdruckgefrieren für die Kryo-Elektronenmikroskopie durchgesetzt (z.B. Al-Amoudi et al., 2004; Bouchet-Marquis et al., 2008; Han et al., 2012; Han, Zuber, & Dubochet, 2008; Leis, Rockel, Andrees, & Baumeister, 2009). Vor Kurzem wurde zudem eine neue Methode eingeführt, die ebenfalls auf der Verwendung von Druck basieren soll, das *self-pressurized rapid freezing* (SPRF) (Leunissen & Yi, 2009). Die Autoren J. Leunissen & H. Yi zeigen gut erhaltene Ultrastrukturen von Mikroorganismen und Nematoden nach Frieren ohne Kryoprotektiva in geschlossenen Kupferröhrchen. Sie diskutieren, dass durch das Frieren des Wassers in einem abgeschlossenen Raum Druck aufgebaut wird, da Eiskristalle mehr Raum einnehmen als flüssiges Wasser. Der Druck sollte theoretisch 2100bar erreichen können und

der Rest der Lösung könnte dem zu Folge ähnlich dem Hochdruckgefrieren vitrifizieren (Leunissen & Yi, 2009).

Im Gegensatz zur Kryokonservierung ist die Vitrifikation nach Kryofixierung für die Kryo-Elektronenmikroskopie relativ einfach nachzuweisen. Im Elektronenmikroskop kann direkt am Präparat durch Elektronendiffraktion die Phase des Wassers direkt und mit hoher räumlicher Auflösung bestimmt werden.

1.4 Kombination von Kryofixierung und Kryokonservierung

Sowohl für Kryofixierung als auch Kryokonservierung von Zellen wird Vitrifikation angestrebt. Zum Erreichen der Vitrifikation werden dennoch verschiedene Methoden herangezogen. Während bei der Kryofixierung meist die Optimierung des Einfriervorgangs im Vordergrund stand, lag in der Kryokonservierung oft der Fokus auf der Entwicklung neuer kryoprotektiver Substanzen. Theoretisch könnten demzufolge beide Felder von einer Kombination der Methoden Nutzen ziehen. Für die Kryokonservierung könnten höhere Einfrierraten bedeuten, dass die notwendigen Konzentrationen an potentiell schädlichen Kryoprotektiva gesenkt werden können. Für die Kryofixierung wäre eine gleichzeitige Kryokonservierung einerseits der Nachweis der „nativen“ Erhaltung wichtiger zellulärer Strukturen. Andererseits könnten kryofixierte Proben im fixierten Zustand praktisch unbegrenzt lange untersucht werden und nach anschließendem Auftauen ihr weiteres Verhalten beobachtet werden.

Eine Kombination beider Methoden wurde jedoch bisher nicht untersucht. Eine Studie zeigt zwar, dass Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) das HPF überleben kann (Erk, Nicolas, Caroff, & Lepault, 1998). Über kultivierte Säugetierzellen gibt es jedoch keine veröffentlichten Studien. Vorversuche zu dieser Arbeit zeigten jedoch, dass HPF von Säugetierzellen nicht überlebt wird.

2. Fragestellung

Vitrifizierung ist - verglichen mit langsamen Einfrieremethoden - der direkte und theoretisch unkompliziertere Weg für die Kryokonservierung von lebenden Zellen. Die praktische Umsetzung jedoch ist sehr komplex.

Mit der Kryo-Fixierung von Proben für die Elektronenmikroskopie gibt es noch einen zweiten unabhängigen Anwendungsbereich, in dem Vitrifizierung von Zellen eingesetzt wird.

In der Kryo-Fixierung wird mit relativ hohem technischem Aufwand daran gearbeitet, biologische Proben in ihrem nativen Zustand zu fixieren. Auf das Überleben der Zellen nach dem Auftauen wird jedoch kaum geachtet, die bestmögliche morphologische Erhaltung der Ultrastruktur ist das Ziel.

Im Gegensatz dazu ist nicht bekannt, wie die genaue Ultrastruktur von Zellen während der Kryokonservierung mittels Vitrifikation aussieht. Hier steht das Überleben der Zellen im Vordergrund. Aufgrund theoretischer Überlegungen sind die physikalischen Parameter wie Geschwindigkeit des Abkühlens und Druck, für eine komplette Vitrifikation der Probe schlechter. Zudem ist die direkte Korrelation zwischen der Vitrifikation einer Zelle und deren Überleben nicht eindeutig bewiesen.

Daraus ergeben sich folgende Fragen für diese Arbeit:

- 1.) Warum überleben Zellen, deren Ultrastruktur perfekt durch Kryofixierung erhalten wurde, diesen Vorgang nicht? Wie ist dieses Paradoxon zu erklären?
- 2.) Ist es möglich, Zellen unter Erhaltung ihrer Ultrastruktur reversibel durch Kryobedingungen zu fixieren?
- 3.) Können die technischen Errungenschaften der Kryofixierung auf die Kryokonservierung übertragen werden, um dort bessere Ergebnisse zu erzielen?
- 4.) Ist Vitrifikation eine hinreichende und notwendige Bedingung für deren Überleben nach Kryokonservierung bei schnellem Einfrieren?

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete kryoprotektive Medien

An dieser Stelle sind nur die Zusammensetzungen der wichtigsten verwendeten kryoprotektiven Medien aufgeführt. Modifikationen sind in den entsprechenden Kapiteln erwähnt.

3.1.1 Dextran

Dextran ist ein Naturprodukt welches von *Leuconostoc*-Bakterien synthetisiert wird. Es handelt sich um ein Polymer aus Glukose, dass in vielen verschiedenen Größen vorkommt. Am wirkungsvollsten für die Kryofixierung erweisen sich hochmolekulare Varianten von Dextran. (Al-Amoudi et al., 2004; Bouchet-Marquis et al., 2008; Han et al., 2012; Leis et al., 2009; Sader, Studer, Zuber, Gnaegi, & Trinick, 2009). Dextran gilt als Standard für die Kryofixierung in der Elektronenmikroskopie und wird in der Regel mit 20-30% (w/v) eingesetzt (Al-Amoudi et al., 2004; Bouchet-Marquis et al., 2008; Han et al., 2012; Leis et al., 2009; Sader et al., 2009). In dieser Arbeit wurde Dextran mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 35000Da (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) eingesetzt und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst. Wenn nicht anders angegeben, wird hier 30% Dextran verwendet, da es im SPRF für eine durchgängige Vitrifizierung sorgt (vergl. Kap. 4.4).

3.1.2 EAFS

EAFS ist eine Mixtur verschiedener Kryoprotektiva, die für die Kryokonservierung von Oozyten entwickelt wurde (Pedro et al., 1997) und dort praktisch zum Standardmedium geworden ist (Mazur & Seki, 2011; Seki & Mazur, 2009, 2012). EAFS steht dabei als Abkürzung für die wichtigsten verwendeten Kryoprotektiva **E**thylenglykol, **A**cetamid, **F**icoll und **S**ucrose.

Das EAFS Medium wurde zubereitet, wie in der Literatur beschrieben (Seki & Mazur, 2009, 2012). Zunächst wurde PB1 Medium hergestellt: 3g/L BSA + 1g/L Glukose (beides Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) sowie 0,036g/L Natrium Pyruvat (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach) wurden in PBS gelöst. Dann wurden 30% (w/v) Ficoll PM 70 (GE Healthcare, München) und 0,5M Sucrose (Serva, Heidelberg)

in dem PB1 Medium gelöst. In dieser Lösung wurden dann wiederum 10% (v/v) Ethylenglykol (Serva, Heidelberg) und 10,7% (w/v) Acetamid (Acros Organics, Geel, Belgien) gelöst. Die endgültigen Konzentrationen der einzelnen Kryoprotektiva sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung von EAFS

* Da weitere Substanzen später hinzu gegeben werden ist die Konzentration nicht genau berechenbar

	Konzentration [M]	Konzentration [w/v]	Konzentration [v/v]
Ficoll 70*	~0,0039	~27%	
Sucrose*	~0,45	~17%	
Ethylenglykol	1,77		10%
Acetamid	1,81	10,70%	

3.1.3 DES/DE

Die verwendete Mischung aus DMSO, Ethylenglykol und Sucrose, wurde aus einer kürzlich veröffentlichten Studie zur Vitrifikation von Oozyten übernommen (Gualtieri et al., 2011). Die Kombination dieser drei Kryoprotektiva ist weit verbreitet in der Kryokonservierung (z.B. Beier et al., 2011; Berthelot et al., 2000; Coticchio et al., 2009; Gomis et al., 2013; Hocht et al., 2004; Iwayama et al., 2004; Prentice-Biensch et al., 2012).

Das hier verwendete Medium besteht aus 15% DMSO, 15% Ethylenglykol und 0,5M Sucrose (alles Serva, Heidelberg), gelöst in 20% FBS in PBS (Gualtieri et al., 2011). In Analogie zu EAFS wird in dieser Arbeit das Kürzel DES nach den Kryoprotektiva **D**MSO, **E**thylenglykol und **S**ucrose verwendet. In einigen Versuchen wurde das Medium ohne Sucrose verwendet, dann unter dem Kürzel DE.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Säugetierzelllinien

Die immortalisierten Säugetierzelllinien HeLa (ATCC Nr. CCL-185), MDCK (ATCC Nr. CCL-34) und Cos-7 (ATCC Nr. CRL-1651) wurden in T-75 Zellkulturflaschen in DMEM-Medium mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 1% nicht essentiellen Aminosäuren bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert. Die Zelllinien wurden stets in der logarithmischen

Wachstumsphase gehalten und passagiert, bevor sie die Konfluenz erreichten.

In einigen Versuchen wurden diese, eigentlich adhärent wachsenden, Zellen in Suspension verwendet. Nach Ablösen der Zellen durch Trypsin und Abstoppen der Reaktion durch FCS-haltiges Zellkulturmedium wurden die Zellen hierfür pelletiert und anschließend vor der Verwendung noch mit PBS gewaschen.

3.2.2 Kryokonservierung mittels *open pulled straw* (OPS)

Für die Kryokonservierung mittels OPS wurden aus einer Zellsuspension von $2,5 \times 10^7$ /mL ein $2 \mu\text{L}$ Tropfen vorgelegt. Dieser wurde umgehend durch Kapillarkräfte in einen OPS gesaugt. Der OPS wurde dann in flüssigen Stickstoff getaucht. Dabei wurde der OPS zunächst parallel zur Oberfläche des flüssigen Stickstoffs gehalten und mit einer rotierenden Bewegung eingetaucht. So wird die Spitze des OPS, die die Zellsuspension enthält, mit maximaler Geschwindigkeit in den Stickstoff getaucht. Zum Auftauen wurde die Spitze des OPS in $200 \mu\text{L}$ vorgewärmtes Medium (37°C) in einem $0,5 \text{mL}$ Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) getaucht. So wird der gesamte Bereich des OPS, der mit Zellsuspension gefüllt ist, mit Flüssigkeit bedeckt und ein optimaler Wärmeaustausch gewährleistet.

3.2.3 Kryokonservierung mittels *cryotop*

Für die Kryokonservierung mit dem *cryotop* wurden $0,5 \mu\text{L}$ Zellsuspension ($2,5 \times 10^7$ /mL) auf die Spitze des *cryotop* pipettiert. Der *cryotop* wurde auf dieselbe Weise wie der OPS in flüssigen Stickstoff getaucht. Zum Auftauen wurde die Spitze des *cryotop* in $200 \mu\text{L}$ vorgewärmtes Medium bei 37°C getaucht.

3.2.4 Kryokonservierung mittels *french mini straw*

Zur Kryokonservierung mittels des *french mini straw* wurde eine Anpassung des Protokolls von Vajta et al. vorgenommen (Vajta, Holm, Greve, & Callesen, 1995, 1996). Dieses Protokoll erlaubt es Zellen direkt nach dem Einfrieren zu rehydrieren. Hierfür wurden zunächst $146 \mu\text{L}$ Zellkulturmedium in den *straw* pipettiert. Anschließend wurden $4 \mu\text{L}$ Zellsuspension ($2,5 \times 10^7$ /mL) eingefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass beide Flüssigkeiten durch eine Luftblase getrennt blieben und sich nicht vermischten. Beide

Flüssigkeiten wurden durch leichtes kippen tiefer in den straw absinken gelassen. Das offene Ende des straw wurde durch eine über der Flamme erhitzte Pinzette zugeklemmt und so versiegelt. Der *straw* wurde mit Hilfe einer Pinzette horizontal in flüssigen Stickstoff getaucht. Zum Auftauen wurde der *straw* aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad transferiert, anschließend aufgeschnitten und die Zellsuspension in vorgewärmtes Medium transferiert.

3.2.5 Bestimmung der Anwachsrate von Säugetierzellen

Um die Anwachsrate von Zellen nach verschiedenen Behandlungen zu bestimmen, wurden die in Suspension befindlichen Zellen in einer definierten Menge Zellkulturmedium auf einer geeigneten Fläche ausgesät. Nach dem *self-pressurized rapid freezing* (SPRF) wurde der Inhalt eines Röhrchens in 200µL Medium in 8-Loch Lab-Tek Kammern (Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA) ausgesät. Nach Behandlung der Zellen mit Testmedien wurde 1-1,5µL der Lösung auf dieselbe Weise ausgesät. Nach Kryokonservierung mit OPS oder *cryotop* wurden die Zellen in 200µL Medium ebenfalls in 8-Loch Lab-Tek Kammern ausgesät. Nach HPF wurden die Aluminium Planchetten samt enthaltener Zellsuspension in 400µL Medium in 24-Loch Platten (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich) aufgetaut. Nach Kryokonservierung im french mini straw wurden die 150µL Zellsuspension in 24-Loch Platten ausgesät, in denen 250µL Zellkulturmedium vorgelegt war.

Nach mindestens vier Stunden Anwachszeit wurde die Adhärenz der Zellen bestimmt. Zuvor war mikroskopisch beobachtet worden, dass die Zelllinien nach spätestens drei Stunden komplett adhärent geworden waren. Zur Bestimmung der Adhärenz der Zellen wurde nach sanftem Auf- und Abpipettieren, wodurch keine adhärennten Zellen abgelöst aber lose Zellen aufgewirbelt werden, ein Aliquot entnommen und die Zellen im Überstand unverdünnt mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen, einmal ebenso vorsichtig mit PBS gewaschen und dann die Zellen mit der Hälfte der Mediummenge für wenige Minuten bei 37°C trypsinisiert. Die Reaktion des Trypsins wurde durch Zugabe der gleichen Menge an Medium abgestoppt. Anschließend wurden die, nun in Lösung befindlichen, ehemals adhärennten Zellen ebenso mittels Neubauerzählkammer ausgezählt. Da beide Auszählungen im gleichen Volumen stattfanden bildet das

Verhältnis der zweiten Auszählung zur Addition beider Auszählung direkt den Anteil adhärenter Zellen ab.

3.2.6 Transfektion von HeLa-Zellen

Für die Expression fluoreszenter Proteine wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Plasmiden transfiziert. Die Zellen wurden dafür auf Glasboden-Petrischalen (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) ausgesät. Nach 5-24std wurden die Zellen mit Fugene6 Reagenz (Roche Applied Science, Mannheim) transfiziert. Dafür wurden zunächst 2µL Fugene Reagenz in 100µL serum-freiem Medium gelöst, durchmischt und das Reaktionsgefäß kurz anzentrifugiert. Dann wurde 1µg Plasmid zugegeben und erneut durchmischt und anzentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 15min wurde der Reaktionsansatz in das Kulturmedium des MatTek gegeben. Die Mikroskopie erfolgte am darauffolgenden Tag.

Für die Transfektion mit zytoplasmatischem EGFP wurde der Vektor pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc., Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet.

Die Vektoren für tubulin-GFP und EB3-GFP Fusionsproteine waren eine freundliche Gabe von Dr. Leif Dehmelt (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund).

Die Mikroskopie der Proben erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Leica SP5.

3.2.7 Immunfluoreszenzfärbung von Tubulin in HeLa-Zellen

Nach Behandlung mit dem Testmedium oder PBS als Kontrolle, wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Proben in PFA (3% Paraformaldehyd in PBS) bei 37°C 20min fixiert. Danach wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und 5min in 0,5% TritonX100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Proben mit dem Primärantikörper gegen α -Tubulin (ab18251; Abcam plc, Cambridge, UK; 1:200 in 1% BSA in PBS) für 45min inkubiert. Daraufhin wurden die Proben wieder zweimal mit PBS gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa-488 fluorescent dye; Invitrogen, Paisley, UK) für 60min inkubiert. An diesen Sekundärantikörper ist der Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 gekoppelt, der später unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Nach zweimaligem Waschen wurde nun das Deckgläschen mit Hilfe eines

Eindeckmediums auf einen Objektträger montiert. Mindestens einen Tag später wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert; 63x Ölimmersionsobjektiv N.A.: 1,4) mikroskopiert.

3.2.8 Fluoreszenzfärbung von mitochondrialem Ca_2^+ in HeLa-Zellen

Zur Anfärbung der Mitochondrien wurde der membrangängige Farbstoff Rhod2-AM (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach) verwendet, der Ca_2^+ -Ionen in den Mitochondrien anfärbt (Hajnoczyk, Robb-Gaspers, Seitz, & Thomas, 1995; Perl et al., 2006).

Adhärente HeLa-Zellen wurden 15min in $1\mu\text{M}$ Rhod2-Am in PBS inkubiert. Danach wurde mit PBS gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Die Zellen wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mikroskopiert (Leica SP5; Leica Microsystems, Wetzlar).

3.3 Lichtmikroskopie

3.3.1 Zeiss Axiovert

Aufnahmen mit dem Zeiss Axiovert Epifluoreszenz- und Durchlicht-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Wetzlar) wurden mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv mit einer N.A. von 1,4 gemacht. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Metallhalogenidlampe und entsprechenden Filtern durchgeführt. Für grüne Fluoreszenz (EGFP, Alexa-488) wurde eine Anregungswellenlänge von 450-490nm gewählt und eine Detektionswellenlänge von 500-550nm. Für rote Fluoreszenz (PI) wurde mit Licht der Wellenlänge 540-552nm angeregt und Licht der Wellenlänge 575-640nm detektiert.

3.3.2 Olympus IX 81

Das Olympus IX 81 Epifluoreszenz- und Durchlicht-Mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) war mit einer Inkubationskammer ausgestattet, die für Experimente mit lebenden Zellen auf 37°C temperiert wurde. Die Aufnahmen wurden mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv (N.A. 1,35) gemacht. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Quecksilberdampfampe und entsprechenden Filtern durchgeführt. Für grüne Fluoreszenz (EGFP, Alexa488) wurde eine Anregungswellenlänge von 460-480nm gewählt und eine Detektionswellenlänge von 495-540nm. Für rote

Fluoreszenz (PI) wurde mit Licht der Wellenlänge 545-580nm angeregt und Licht von Wellenlängen >610nm detektiert.

3.3.3 Leica SP5

Beim Leica SP5 (Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) handelt es sich um ein konfokales *Laser-Scanning*-Mikroskop ausgestattet mit einer temperierbaren Inkubationskammer. Für Experimente mit lebenden Zellen wurde die Temperatur auf 37°C eingestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv (N.A. 1,4) durchgeführt. Für grüne Fluoreszenz (GFP/ EGFP) wurde die 488nm Laserlinie eines Argon-Ionen-Lasers zur Anregung verwendet. Für rote Fluoreszenz (Rhod2-AM) wurde ein DPSS-Laser (Diodengepumpter Festkörperlaser) bei 561nm verwendet. Die Detektionswellenlängen sind am Leica SP5 (Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) stufenlos einstellbar und es wurde jeweils ein Detektionsfenster oberhalb der Anregungswellenlänge eingestellt.

3.3.4 Bestimmung der Membranintegrität mittels PI-Färbung

Die Propidiumiodid (PI) Färbung wurde in einer PI Lösung von 12µg/mL in PBS durchgeführt.

Für die Quantifizierung toter Zellen nach Behandlung nicht-adhärenter Zellen, wurden die Zellen in eine Glas Boden Petrischale (MatTek Corporation, Ashland, USA) gegeben. Nach 5min Inkubationszeit wurden an mindestens 10 verschiedenen Stellen Durchlicht- und Fluoreszenzbilder an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert) aufgenommen. Die Gesamtzellzahl wurde anhand der Durchlichtbilder ermittelt und die Zahl der PI positiven Zellen anhand der Fluoreszenzbilder.

Für die Färbung der toten Zellen auf EM-Netzchen wurde das Kulturmedium in dem sich die Netzchen befanden durch PI Lösung ausgetauscht und die Netzchen nach ca. 5min mikroskopiert.

3.3.5 Fluoreszenzmikroskopische Volumenbestimmung

Für die Zellvolumenmessungen wurden konfokale Bilderserien von Zellen am Leica SP5 Mikroskop (Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) aufgenommen, die mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert waren. Während der Bilderserie wurde das Medium der

Zellen mit Hilfe eines Pumpsystems ausgetauscht, welches das Medium absaugt und gleichzeitig temperiertes Medium hinzuführt (Eigenbau von Jens Christmann und Prof. Dr. F. Wehner, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund). Die Temperatur konnte so konstant bei 37°C gehalten werden. Die Bilderserien wurden anschließend mit der Software ImageJ (ImageJ 1.43u; Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Hier wurde eine Maske über den Querschnitt der Zelle gelegt und die durchschnittliche Intensität in der Zelle für jedes Einzelbild bestimmt. Die durchschnittliche Intensität ist ein Maß für die Anzahl der Fluorophore im konfokalen Volumen. Bei einem Schrumpfen der Zelle steigt die Intensität an, da die gleiche Anzahl an Fluorophoren innerhalb der Zelle in einem kleineren Volumen aufkonzentriert wird. Schwillt die Zelle an, nimmt die Intensität ab.

3.4 Elektronenmikroskopie und Fixierungsmethoden

3.4.1 Hochdruckgefrieren (HPF)

Das Hochdruckgefrieren wurde mittels des HPM-100 Hochdruckgefrierers (Leica Microsystems, Wien, Österreich) durchgeführt. Zellen in Suspension wurden in Aluminium-Planchetten mit einem Durchmesser von 3mm und einer Höhe von 0,1 bis 0,3mm gefüllt (Engineering Office M. Wohlwend GmbH, Sennwald, Schweiz). Es wurde darauf geachtet, dass die Planchetten komplett gefüllt wurden. Als Deckel für die Planchetten wurde die flache Rückseite einer 0,3mm Planchette verwendet. Das so entstandene Sandwich wurde entsprechend der Herstelleranleitung in der Maschine eingefroren. Dabei wird von der HPM-100 flüssiger Stickstoff mit etwa 2000bar eingeschossen. Der Druck wird dabei innerhalb von 3-4ms aufgebaut. Etwa eine Millisekunde nachdem der Druck aufgebaut ist fällt die Temperatur unter 0°C, die Glasübergangstemperatur von -120°C wird 4-5ms später erreicht, was einer Abkühlrate von 20000 bis 25000°C/s in diesem kritischen Bereich entspricht.

3.4.2 *Plunge freezing* adhärenter Zellen

HeLa-Zellen wurden zunächst auf Elektronenmikroskopienetzchen aus Gold (300mesh) mit einem Quantifoil® R2/4 Film (PLANO GmbH, Wetzlar, Germany) kultiviert. Die Gold-Netzchen sind im Gegensatz

zu den oft verwendeten Kupfernetzchen nicht giftig für die Zellen und der Film bildet eine unterstützende Schicht für die Zellen und ermöglicht das Blotting von der Rückseite ohne Beschädigung der Zellen. Mehrere Netzchen wurden in eine 35mm Petrischale (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) gelegt. Um die Hydrophilie der Netzchen zu fördern, wurden sie vor der Benutzung zweimal 30s mit Plasma behandelt (Femto Niederdruck Plasmaanlage; Diener Plasma GmbH, Ebhausen). Eine Zellsuspension von ca. 2mL mit 2×10^5 Zellen wurde in die Petrischale gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, die Netzchen nicht aufzuschwimmen. Die Zellen konnten 6-8h anwachsen, dann wurde die Adhärenz und Zelldichte mikroskopisch bestimmt. Eine Zelldichte von durchschnittlich etwa einer Zelle je Quadrat auf dem Netzchen erwies sich als optimal. Sind zu viele Zellen auf dem Grid, gibt es zu wenig dünne Randbereiche, die elektronenmikroskopisch untersucht werden können. Die Netzchen wurden dann mit Hilfe des CP3 *plunge-freezers* (Gatan GmbH, München) geplunged. Dieser verfügt über eine Kammer mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit, um das Verdampfen von Flüssigkeit zu minimieren. Die Netzchen wurden zunächst in PBS gewaschen. Das PBS wurde mittels eines Filterpapiers wieder abgesaugt. Jeweils ein 4 μ L Tropfen des Testmediums wurde auf das Netzchen gegeben. Das Netzchen wurde in einer Pinzette in den CP3 *plunge freezer* montiert. Der Tropfen wurde nun mit einem Filterpapier (Whatman No. 4, Whatman GmbH, Datteln Germany) für eine kontrollierte Zeit geblottet, so dass nur ein sehr dünner Film Medium übrig blieb. Es wurde nur von der Rückseite per Hand geblottet, dies erwies sich als verlässlicher als die automatische *blotting* Funktion des CP3 *plunge freezers*. Aufgrund der verschiedenen Viskositäten der verwendeten Medien musste die *blotting*-Zeit für jedes Medium einzeln ermittelt werden. Für PBS waren dies 8-10s, für DE 12s, für Dextran und EAFS 25s. Nach der blotting Zeit wurden die Grids sofort in flüssiges Ethan bei -170°C *geplunged*.

Für manche Versuche wurden die Netzchen für 30s auf definierte Temperaturen aufgewärmt. Hierfür wurde die Kammer der automatischen Gefriersubstitutionsanlage (Leica EM AFS2; Leica Microsystems, Wien, Österreich) auf die definierte Temperatur jeweils voreingestellt. Die Netzchen wurden in flüssigem Stickstoff in die Kammer transferiert. Innerhalb der Kammer wurden sie 30s auf einen kleinen Metalblock gelegt, der die Temperatur der Kammer bereits angenommen hatte. Nach 30s wurde der Metalblock mitsamt dem Netzchen innerhalb der Kammer in den flüssigen Stickstoff transferiert. Der Metalblock diente hierbei nur dem Zweck der

einfacheren Handhabung. Die Netzchen sind sehr fragil und mit der Pinzette nur sehr schwer ohne Zeitverlust aufzunehmen, ohne sie dabei sehr stark zu beschädigen.

3.4.3 Self-pressurized rapid freezing (SPRF)

Das SPRF erfolgte im Wesentlichen wie beschrieben (Han et al., 2012; Leunissen & Yi, 2009). Kleine Metallröhrchen (Kupfer: Außendurchmesser (A.D.) 0,5mm; Innendurchmesser (I.D.) 0,22mm; Aluminium: A.D. 0,6mm; I.D. 0,3mm; beide Goodfellow GmbH, Bad Nauheim; Silber: A.D. 0,6mm; I.D. 0,3mm, Heimerle & Meule GmbH, Pforzheim) wurden als 1,5cm Stücke von Meterware geschnitten. Die kollabierten Enden wurden mit Hilfe einer Vorstechspitze geöffnet und entgratet. Die kurzen Röhrchen wurden auf abgeschnittene, weiße Pipettenspitzen montiert. epT.I.P.S. 0,1-10 μ L (Eppendorf AG, Hamburg) erwiesen sich aufgrund ihrer gerade zulaufenden Form als gut geeignet, um einen dichten Abschluss mit dem Röhrchen zu formen. In Abweichung zum Originalprotokoll wurden verschiedene Röhrchen und Einfriermedien getestet, die in den entsprechenden Abschnitten genannt werden. Die Pipettenspitze mit Röhrchen wurde auf eine geeignete Pipette montiert. Das freie Ende des Röhrchens wurde in die zu gefrierende Lösung getaucht und ca. 3-4 μ L wurden in das Röhrchen gesaugt. Um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, wurde einige Male auf- und abpipettiert. Dann wurde am Ende des Röhrchens ein Bereich von 1-2mm mit Hilfe einer Flachzange zgedrückt. Das Röhrchen wurde aus der Pipettenspitze genommen und die andere Seite des Röhrchens wurde auf dieselbe Art verschlossen. Das geschlossene Röhrchen wurde nun horizontal mit Hilfe eines *plunge-freezers* (EMBL work shop, Heidelberg) in flüssiges Ethan, gekühlt von flüssigem Stickstoff, versenkt.

3.4.4 Gefriersubstitution

Die Gefriersubstitution wurde in einem Gefriersubstitutionsautomaten durchgeführt, der zuvor einprogrammierte Temperaturverläufe automatisch abspielen kann (Leica EM AFS2; Leica Microsystems, Wien, Österreich).

Die Proben wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt in vorgekühltes Substitutionsmedium bei -90°C gegeben. Der Deckel der Planchetten aus dem Hochdruckgefrieren wurde hierfür vorher im flüssigen Stickstoff entfernt. Die Röhrchen aus dem SPRF wurden

mit einem speziellen Werkzeug (Leica Cryotool; Leica Microsystems, Wien, Österreich) in flüssigem Stickstoff in 1-2mm lange Stücke geschnitten. Das Substitutionsmedium bestand aus 0,1% Osmium Tetroxid, 0,1% Uranylacetat und 5% Wasser in Aceton. Dieses Medium führt zu einem verstärkten Membrankontrast (Buser and Walther 2008). Die Samples wurden in diesem Medium von -90°C bis 0°C in einem exponentiellen Temperaturverlauf über mindestens 16h erwärmt. Anschließend wurden sie 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde zweimal für 1h mit Aceton gewaschen. Danach wurden die Samples 2h in einem 1:1 Mix aus Epon 812 (Serva, Heidelberg) und Aceton, noch je 2h in reinem Epon bei Raumtemperatur und bei 37°C auf einer Heizplatte inkubiert. Das Epon wurde für mindestens 36h bei 60°C auspolymerisiert.

3.4.5 Chemische Fixierung

Adhärente HeLa-Zellen auf Glasboden-Petrischalen (MatTek Corporation, Ashland, USA) wurden nach der Behandlung mit dem entsprechenden Testmedium oder PBS als Kontrolle in 2% Glutaraldehyd in PBS bei 37°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden sie zusätzlich 30min auf Eis in 2% Osmium Tetroxid + 1,5% Kaliumhexacyanoferrat (II) in PBS inkubiert (Hayat, 2000; Karnovsky, 1971). Anschließend wurden sie dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 15min in 50% Ethanol inkubiert. Es folgte eine Blockkontrastierung mit 0.5% Uranylacetat in 70% Ethanol für 30min und eine aufsteigende Entwässerungsreihe mit 80%, 90%, 95% und 100% Ethanol für je 15min. Für die Einbettung in Epon 812 (Serva, Heidelberg) wurde zunächst ein Tropfen Epon 812 auf dem zentralen Glasboden platziert, dieser wurde für eine Stunde dort belassen. Anschließend wurde der erste Tropfen mit Hilfe eines Filterpapiere abgessaugt und noch ein zweiter Tropfen dort platziert, um ein vollständiges Durchdringen der Probe mit dem Kunstharz sicher zu stellen. Dann wurde ein PCR Reaktionsgefäß mit Epon 812 gefüllt und auf das Sample umgestülpt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Reaktionsgefäß gerade steht, damit das Epon nicht zur Seite heraus laufen kann. Das Epon wurde für mindestens 36h bei 60°C auspolymerisiert. Danach wurde der Glasboden der Petrischale mit Hilfe von Flusssäure abgelöst (Grabenbauer et al., 2005). Nach gründlichem Reinigen des Samples mit Kalziumcarbonat und Wasser, wurde das PCR Reaktionsgefäß entfernt, der Block angetrimmt und Ultradünnschnitte (50nm) von den adhärennten Zellen angefertigt.

3.4.6 Anfertigung von Ultradünnschnitten

Zum Anfertigen der Ultradünnschnitte wurde zunächst eine trapezförmige, glatte Fläche (Länge i.d.R. $\leq 1\text{mm}$) innerhalb des Eponblocks mit einer Rasierklinge zurechtgetrimmt. Von dem zurechtgetrimmten Eponblock wurde in einem Reichert Ultracut S Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) mit einem Diamantmesser (Diatome Ultra 35; DiS-Galetzka, Weinheim, Germany; Anstellwinkel: 6°) Ultradünnschnitte angefertigt. Hinter der Messerschneide befindet sich ein mit Wasser gefülltes Auffanggefäß. Die Schnitte gleiten auf die Wasseroberfläche und wurden von dort auf ein Elektronenmikroskopienetzchen aufgefangen. Die Dicke der Schnitte wurde auf 50nm eingestellt und anhand der Farbe der Reflektion konnte bestimmt werden, dass die Schnitte auch tatsächlich ungefähr diese Dicke hatten.

3.4.7 Elektronenmikroskopie (Raumtemperatur)

Die Elektronenmikroskopie bei Raumtemperatur wurde an einem JEM1400 Elektronenmikroskop (JEOL Germany, Eching) mit einer $2\times 2\text{k}$ oder $4\times 4\text{k}$ CCD Kamera (F-214FS oder F-416; TVIPS, Gauting) durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung betrug 120kV .

3.4.8 Kryo-Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopienetzchen müssen während dem Transfer in das Kryo-Elektronenmikroskop (JEM-3200FSC; JEOL Germany, Eching) ständig unterhalb der Devitrifikationstemperatur gehalten werden und vor Kontamination geschützt werden. Der Transfer wurde deshalb mit Hilfe einer speziellen Kryotransferstation (JEOL Germany, Eching) durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung der Elektronen wurde auf 200kV gesetzt. Ein Energiefilter wurde benutzt, um unelastisch gestreute Elektronen abzufangen und so den Kontrast des Bildes zu erhöhen. Ein *minimal dose system* wurde verwendet, um die Elektronendosis auf das empfindliche Präparat zu minimieren. Bilder und Diffraktogramme wurden digital mit einer $8\text{K}\times 8\text{K}$ TemCam-F816 CMOS Kamera (TVIPS, Gauting) aufgenommen.

3.4.9 Kryo-Elektronentomographie

Die Kryo-Elektronentomographie wurde ebenfalls mit dem JEM3200FSC Mikroskop durchgeführt. Die Kippserien wurden mit dem Programm eTomo (TVIPS, Gauting) aufgenommen. Die automatische Fokussierung und das automatische Tracking der Position für jedes einzelne Bild wurden so eingestellt, dass es neben dem eigentlichen Tomogramm stattfindet, so dass die Elektronendosis auf das Präparat an dieser Stelle minimiert wird und keine Strahlenschäden entstehen.

Die Rekonstruktion der Kippserien erfolgte mit dem Programm IMOD 4.3.7 (Boulder Laboratory for 3-D Electron microscopy of Cells; (Kremer, Mastronarde, & McIntosh, 1996; Mastronarde, 1997)). Die Seitenansicht des rekonstruierten Tomograms wurde mit dem Programm Chimera erzeugt (UCSF chimera package, Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco; Pettersen et al., 2004)).

3.5 Röntgenbeugungsmessungen

Hier wurden Röntgenbeugungsbilder von verschiedenen Medien aufgenommen, die in einem open pulled straw (OPS) (Vajta et al., 1998) gefroren wurden. Diese Bilder müssen unterhalb der Devitrifikationstemperatur von Wasser aufgenommen werden, da sonst metastabile Zustände wie vitrifiziertes oder kubisches Eis zu hexagonalem Eis (um-)kristallisieren können. Hierfür wurde die etwa 2cm lange Spitze von OPS auf den Halter für Röntgenkristallographie montiert, das jeweilige Medium in die Spitze gefüllt und durch schnelles Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Probe wurde unter flüssigem Stickstoff in den *cryostream* eines Röntgendiffraktometers gebracht (Bruker AXS MICRO Star; Bruker AXS GmbH, Karlsruhe). Der *cryostream* ist ein konstanter Fluss kalten, gasförmigen Stickstoffes, der die Probe bei 100K (-173,15°C) hält und so ein Devitrifizieren oder Kristallisieren der Probe verhindert. Die Röntgendiffraktogramme wurden mit 45kV, einem Detektorabstand von 150mm und einer Belichtungszeit von 30s aufgenommen.

3.6 Mathematische Methoden

3.6.1 Berechnung der Fehlerbalken in Diagrammen

Alle gezeigten Fehlerbalken in Diagrammen entsprechen der Standardabweichung (der Quadratwurzel aus der Varianz), berechnet durch das Programm Excel (Microsoft Excel 2008, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, U.S.A) aus allen vorhandenen Datenpunkten.

3.6.2 Test auf statistische Signifikanz

Zur Berechnung ob die Messwerte in zwei Gruppen statistisch signifikant unterschiedlich sind, wurde ein ungepaarter Studententests benutzt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Excel 2008, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, U.S.A) aus allen vorhandenen Datenpunkten. In den Diagrammen sind statistische Unterschiede wie folgt gekennzeichnet:
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4. Ergebnisse

4.1 Säugetierzellen überleben Kryofixierung für Elektronenmikroskopie nicht

Da es keine veröffentlichten Daten zum Überleben von Säugetierzellen nach Kryofixierung durch Hochdruckgefrieren (HPF) gibt, sollte dies zunächst quantifiziert werden.

Als Testsystem wurden hier und in den folgenden Versuchen HeLa-Zellen gewählt. Diese Zellen sind als sehr robust bekannt und in hoher Zahl kultivierbar. Da es in dieser Arbeit um die Aufklärung genereller Mechanismen geht, ist die Verwendung einer robusten Zelllinie sinnvoll, da sonst generelle Mechanismen durch spezielle Anforderungen der Zellen überdeckt werden können. Die relativ leichte Kultivierung zu hoher Zellzahl ist zudem vorteilhaft für eine verlässliche Quantifizierung des Überlebens der Zellen nach Behandlung.

HeLa-Zellen wurden hochdruckgefroren und nach anschließendem Auftauen in vorgewärmtem Kulturmedium weiterkultiviert. Dazu wurden sowohl Zellen ohne Kryoprotektiva als auch Zellen in Dextran, dem Standardkryoprotektivum für die Kryofixierung in der Kryo-Elektronenmikroskopie, getestet. Rekultivierung der Zellen ergab, dass nach keinem der verwendeten Protokolle Zellen adhärent wurden (Abb. 4.1). Da es sich bei HeLa-Zellen um eine adhärent wachsende Zellkulturlinie handelt, ist der Verlust der Fähigkeit zum Adhärenz gleichbedeutend mit dem Verlust der Vitalität. Aus den Kontrollen ist ersichtlich, dass von dem Kryoprotektivum Dextran keine entscheidende Toxizität ausgeht (Abb. 4.1).

Besonders interessant war in diesem Zusammenhang auch das kurz zuvor veröffentlichte Protokoll des *self-pressurized rapid freezing* (SPRF) (Leunissen & Yi, 2009). Es ist einerseits technisch nicht so aufwendig und somit als praktische Anwendung für die Kryokonservierung leichter umsetzbar, andererseits bestand die Hoffnung, dass der Druck in dem hier verwendeten geschlossenen Röhrchen erhalten bleibt und so auch beim Auftauen die Eisbildung verhindert wird. Allerdings erwies sich auch dieses Protokoll als letal für die Zellen (Abb. 4.1).

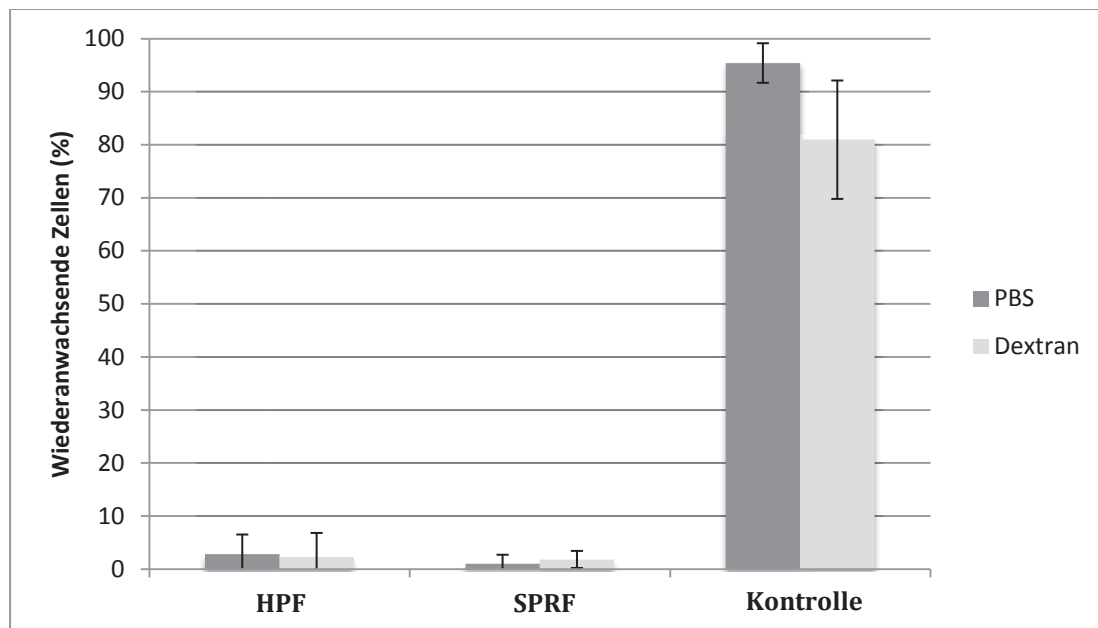


Abb. 4.1: Quantifizierung des Wiederanwachsens von HeLa-Zellen nach Kryofixierung

HeLa-Zellen in Suspension in PBS oder 30% Dextran in PBS wurden mittels HPF oder SPRF kryofixiert. Anschließend wurden die Zellen in 37°C warmem Kulturmedium (HPF) bzw. im 37°C warmem Wasserbad (SPRF) aufgetaut und weiterkultiviert. Die Anwachsrate nach vier Stunden wurde quantifiziert. Als Kontrolle wurden Zellen aus jeweils derselben Zellsuspension verwendet, die nicht kryofixiert wurden. Parallel wurde das Anwachsen in Kultur mikroskopisch beobachtet. Auch nach mehreren Tagen waren keine adhärenenten Zellen zu sehen. Nicht gefrorene Zellen in den entsprechenden Lösungen (Kontrolle) sind bereits nach spätestens drei Stunden zum größten Teil adhärenent. N=5

4.2 Adaption des SPRF zu ungiftigen Bedingungen

Aus dem Absterben der Zellen nach Kryofixierung ergibt sich die Frage, ob die Zellen an der Kryofixierung selbst sterben, oder an anderen Effekten wie etwa an der Verwendung giftiger Materialien. Beim Hochdruckgefrieren ist der Auftauprozess druckfrei und somit sehr unterschiedlich zum Einfrierprozess. Den HPF-Apparat so zu modifizieren, dass ein Auftauen unter Druck ermöglicht wird hätte durch aufwändige Neukonstruktionen die Zielsetzung dieser Studie weit überstiegen. Deswegen wurde im Folgenden das SPRF genauer untersucht, bei dem das Einfrieren und Auftauen sehr ähnlich verlaufen.

In dem veröffentlichten Protokoll zum SPRF werden Zellen für die Kryofixierung in Kupferröhrchen gefroren (Leunissen & Yi, 2009). Kupfer ist durch seine Ionen ein Zellgift und kann letal für Zellkulturen sein (Aston, Watt, Morton, Tanner, & Evans, 2000; Cao et al., 2012). Deshalb wurde überprüft, ob die kurze Zeit, in der sich die Zellen in dem Kupferröhrchen befanden, bereits letal für sie ist. Aus Abbildung 4.2A ist zu erkennen, dass bereits der Aufenthalt von 60s in einem Kupferröhrchen für verschiedene Säugerzelllinien absolut

letal ist, wenn sie sich in einer 30%igen Dextranlösung befinden. In Zellkulturmedium ist der Aufenthalt der Zellen in den Kupferröhrchen erst nach 3-5min zu 100% letal (Abb. 4.2B). Dextran selbst zeigte in diesen Versuchen keinerlei Zytotoxizität in diesem Zeitraum (Abb. 4.2C). Es handelt sich bei der niedrigeren Vitalität der Zellen in Dextran in Röhrchen also nicht um einen rein additiven Effekt beider Einflüsse. Um das Absterben der Zellen bereits vor dem Einfrieren zu verhindern, wurden Röhrchen aus Aluminium verwendet. In diesen Röhrchen konnte selbst in der Gegenwart von Dextran bei Raumtemperatur keinerlei Rückgang der Viabilität verzeichnet werden (Abb. 4.2).

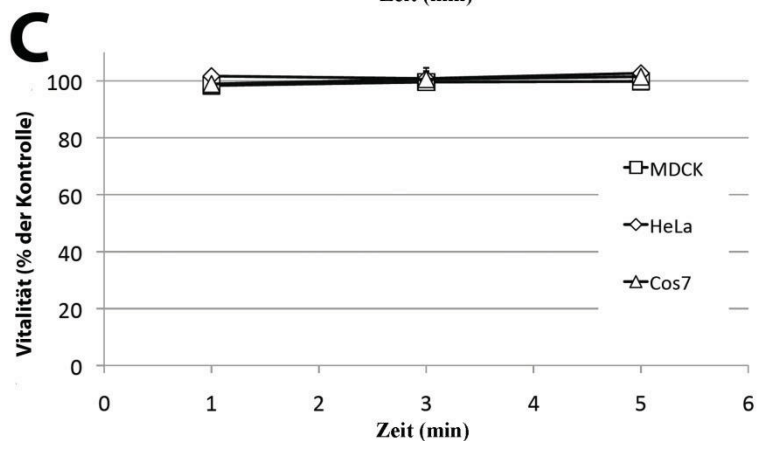
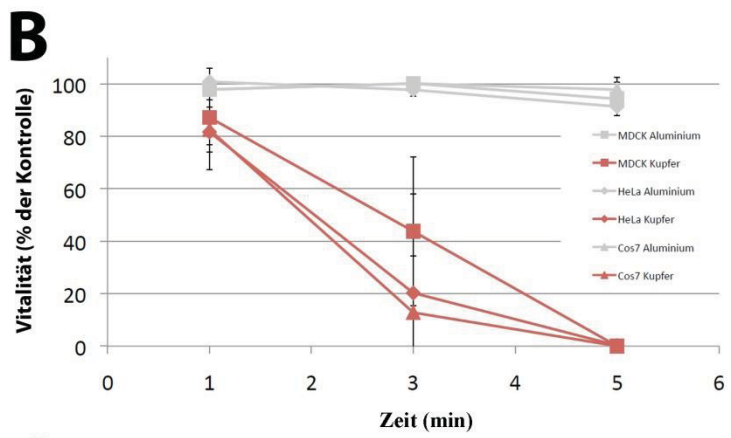
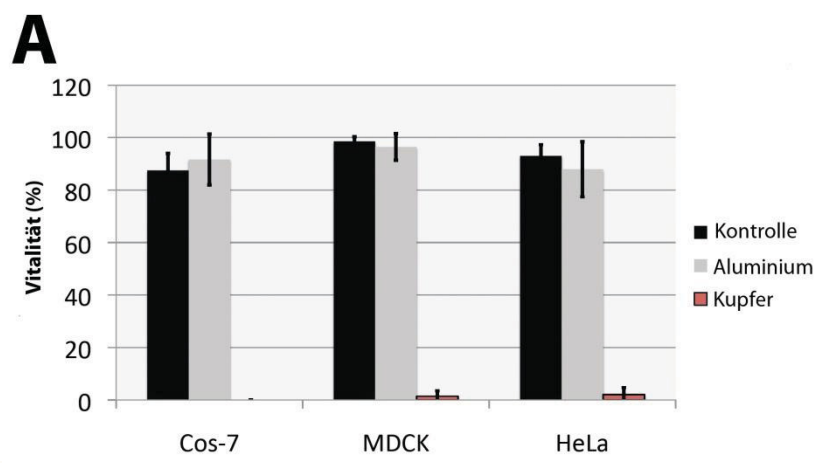


Abb. 4.2: Viabilität von Säugerzellen nach Aufenthalt in Kupfer- und Aluminiumröhrchen

Gezeigt sind Quantifizierungen des Überlebens von Zellen nach Kontakt mit verschiedenen Bestandteilen des SPRF Protokolls. Das Überleben wurde mit Hilfe der Rekultivierbarkeit der Zellen bestimmt. **A** verschiedene Zelllinien wurden in 30% Dextran in PBS für 60s in geschlossenen Aluminiumröhrchen (Innendurchmesser 0,3mm; Außendurchmesser 0,6mm; Länge 1,5cm) oder Kupferröhrchen (Innendurchmesser 0,22mm; Außendurchmesser 0,5mm; Länge 2cm) gehalten und anschließend rekultiviert. Kontrolle: Zellen aus den entsprechenden Zellsuspensionen. **B** Die verschiedenen Zelllinien wurden in Zellkulturmedium in die entsprechenden Röhrchen gefüllt und für angegebene Zeiten darin belassen. **C** Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen in Dextran-Lösung gegeben ohne in Röhrchen gefüllt zu werden. Die gezeigten Quantifizierungen der Vitalität stimmen mit mikroskopischen Beobachtungen in der Zellkultur überein.

Nach SPRF in Aluminiumröhrchen, in 30%iger Dextranlösung oder ohne Kryoprotektion in PBS, konnten dennoch keinerlei überlebende Zellen bei allen drei getesteten Zelllinien gefunden werden.

4.3 Kryofixierung mittels SPRF für die Gefriersubstitution

Da Zellen das SPRF – auch nach Eliminierung der toxischen Bestandteile – nicht überleben, wurde nun überprüft, ob durch das Protokoll wirklich, wie durch die Veröffentlichung impliziert wird (Leunissen & Yi, 2009), ein Teil der Probe vitrifiziert. Versuche mittels Gefriersubstitution an Bakterien (*E. coli*) und Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) bestätigten hierbei zunächst die Wirksamkeit des Protokolls für die Kryofixierung von Mikroorganismen (Abb. 4.3 & 4.4). Bei der Gefriersubstitution wird das Wasser der Probe bei tiefen Temperaturen, typischerweise -90°C , durch ein organisches Lösungsmittel, in diesem Fall Aceton, ersetzt und die Probe gleichzeitig fixiert und kontrastiert. Diese Methode wurde ebenfalls von Leunissen & Yi angewendet (Leunissen & Yi, 2009). Durch Optimierung des Protokolls konnte eine sehr hohe elektronenmikroskopische Auflösung erzielt werden. Trotz der hohen Auflösung war bei diesen Mikroorganismen, in einem Teil der Probe, keinerlei Segregationen sichtbar (Abb. 4.3 & 4.4). Segregationen entstehen während der Gefriersubstitution, da Eiskristalle aus reinem Wasser bestehen und das biologische Material verdrängen (J Dubochet, Booy, Freeman, Jones, & Walter, 1981). Nach der Gefriersubstitution erscheinen sie dann als helle, scheinbar leere Flecken (J Dubochet et al., 1981; Keene & McDonald, 1993). Diese Gefrierschäden wurden gefunden, aber nur in einem Teil der untersuchten Zellen. Die gute Erhaltung zellulärer Details wie Kernporen, Mitochondrien oder Einstülpungen der Plasmamembran in *S. cerevisiae* belegen zudem, dass durch das Frieren keine starken zellulären Veränderungen stattgefunden haben

(Abb. 4.4B & C). Ein Antrimmen der gefrorenen Röhrrchen unterhalb der Glasübergangstemperatur in einem Kryo-Ultramikrotom ergab allerdings, dass diese Proben aus kristallinem Eis bestanden. Vitrifizierte Bereiche konnten optisch nicht ausgemacht werden (Abb. 4.5). Die Mikroorganismen selbst sind in diesen Aufnahmen aufgrund ihrer geringen Größe nicht auszumachen, es ist möglich, dass sie selbst aufgrund ihres geringen Wassergehalts vitrifizieren, das sie umgebende Medium jedoch nicht. Alle diese Befunde waren für Aluminium- sowie Kupferröhrrchen gleich.

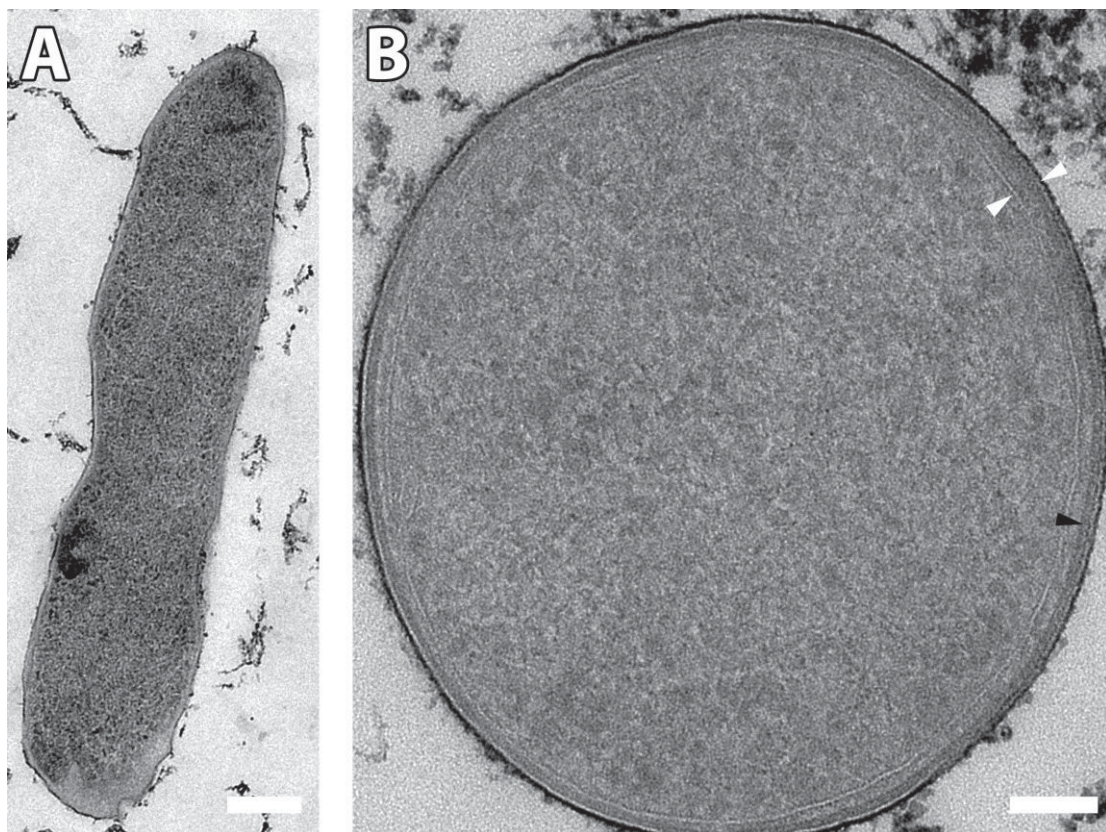


Abb. 4.3: *E. coli* Bakterien nach Kryo-Fixierung durch SPRF und anschließender Gefriersubstitution

Sagittal- (A) und Transversalschnitte (B) durch *E. coli* Bakterien. Die Bakterien wurden mit SPRF und anschließender Gefriersubstitution fixiert und danach in Kunstharz eingebettet. Die gute Qualität der Präparation ermöglicht die Differenzierung der inneren und äußeren Membran (weiße Pfeilspitzen) sowie der Peptidoglykanschicht (schwarze Pfeilspitze). Trotz der sehr hohen Auflösung sind keine Segregationen erkennbar. Maßstab: 300nm (A) und 80nm (B)

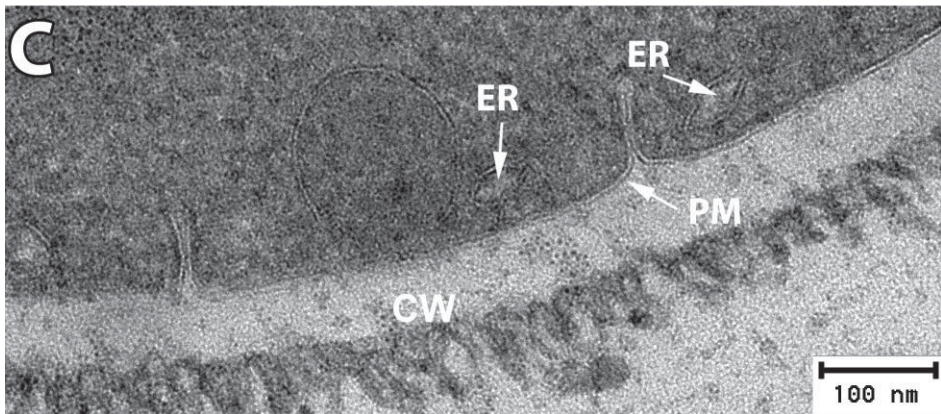
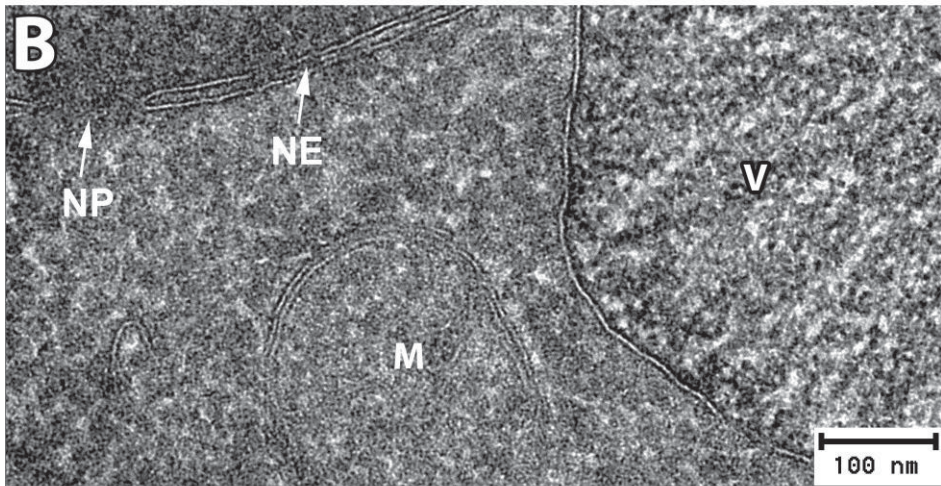
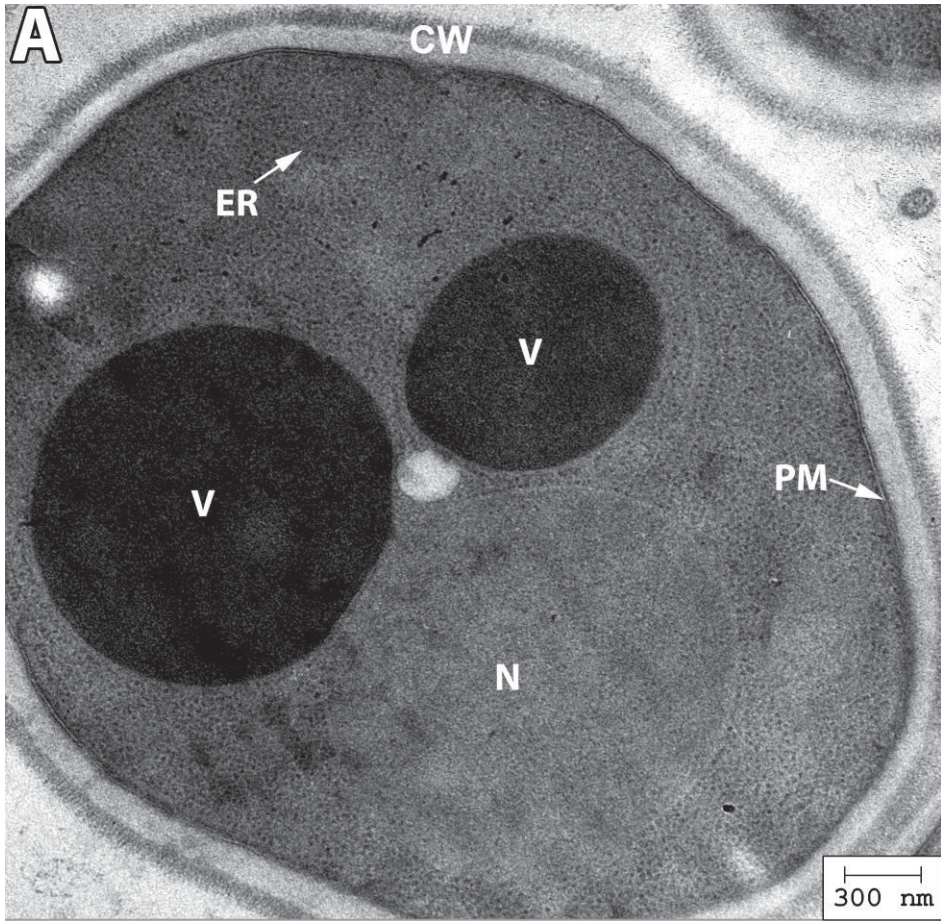


Abb. 4.4: *S. cerevisiae* Zellen nach Fixierung durch SPRF und anschließender Gefriersubstitution

Abbildung A zeigt eine komplette Hefezelle in der Übersicht, es sind keine Segregationen erkennbar, auch in höheren Vergrößerungen (B und C) sind diese nicht erkennbar. Durch die hohe Qualität der Präparation sind viele zelluläre Details erkennbar (B und C). ER: Endoplasmatisches Retikulum; KH: Kernhülle; KP: Kernpore; M: Mitochondrium; N: Nukleus ; PM: Plasmamembran; V: Vakuole; ZW: Zellwand

4.4 Kryo-Fixierung mittels SPRF für die Kryoelektronenmikroskopie

Aus Abbildung 4.5 ist erkennbar, dass Röhrchen die ohne Kryoprotektiva mit SPRF gefroren werden im Querschnitt weißlich erscheinen und kristalline Strukturen aufweisen. Das Frieren von Salzlösungen resultiert in undurchsichtigen, weißlichem Eis (Lovelock, 1953b), vitrifizierte Lösungen bleiben hingegen transparent.

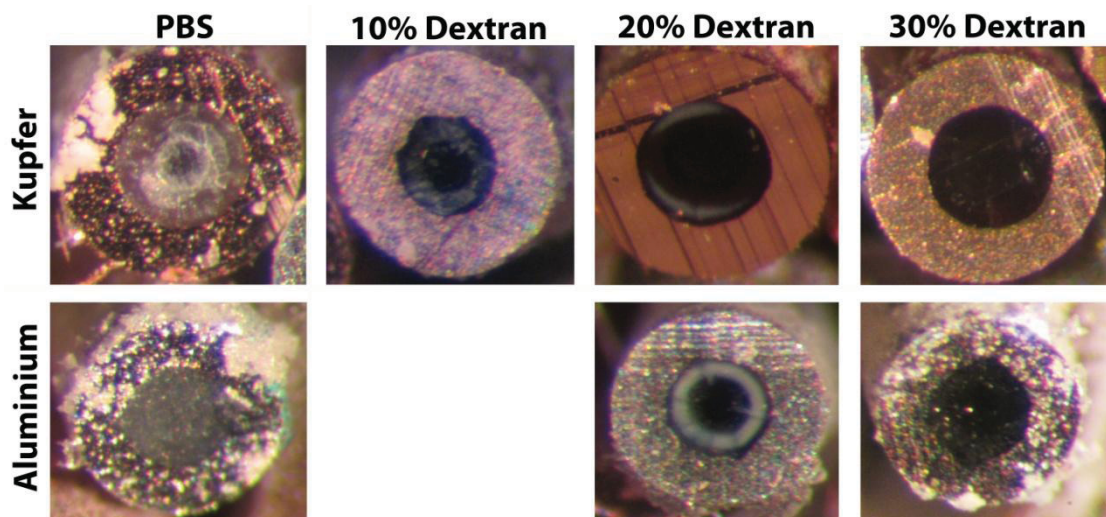


Abb. 4.5: Querschnitt angetrimmter Röhrchen nach SPRF mit verschiedenen Dextran-konzentrationen

Die Röhrchen wurden mit SPRF gefroren, unterhalb von -140°C aufbewahrt und im Kryo-Ultramikrotom angetrimmt. Weiße Bereiche sind Bereiche von kristallinem Eis, durchsichtige Bereiche, die hier schwarz erscheinen sind potentiell vitrifiziert. Kupfer: Außendurchmesser 0,5mm, Innendurchmesser 0,22mm; Aluminium: Außendurchmesser 0,6mm, Innendurchmesser 0,3mm

Um die Vitrifizierungseigenschaften der Lösung zu ermöglichen, wurde nun Dextran als Kryoprotektivum verwendet, da Dextran auch beim Hochdruckgefrieren erfolgreich eingesetzt wird. Wie in Abb 4.5 zu sehen ist, bildet sich durch die Verwendung von Dextran im Zentrum des Röhrchens ein transparenter Bereich, der mit steigender Dextrankonzentration größer wird. Bei 30% Dextran nimmt der transparente Bereich den kompletten Durchmesser des Röhrchens ein. Der transparente Bereich ist ein Indiz für eine

mögliche Vitrifikation, allerdings kein Beweis. In parallelen Experimenten in unserer Arbeitsgruppe konnte durch Dr. Hong-Mei Han mittels Elektronendiffraktion an vitrifizierten Schnitten bewiesen werden, dass zumindest ein Teil der Zellen und auch das umgebende Medium vitrifiziert sind (Han et al., 2012). Trotz der erreichten Vitrifikation überleben Zellen das SPRF in 30% Dextran jedoch nicht (vergl. Abb 4.1).

4.5 Der Auftauprozess lebender Zellen ist schwieriger als der Einfrierprozess

Betrachtet man die Vitrifikation von Zellen, so beschreibt dies nur den Abkühlprozess, da das abgekühlte Endprodukt betrachtet wird. Der ebenso wichtige Auftauprozess wird dabei nicht beachtet. Hier könnte Devitrifikation auftreten, wenn der Auftauprozess nicht schnell genug verläuft (Hopkins et al., 2012; Seki & Mazur, 2009, 2012). Das Auftauen lebender Zellen ist dadurch limitiert, dass Zellen nicht überhitzt werden dürfen, da sie sonst sterben. Des Weiteren werden Zellen oft nur bei Raumtemperatur oder noch tieferen Temperaturen aufgetaut, um toxische Effekte der kryoprotektiven Substanzen zu minimieren (Rall & Fahy, 1985; Seki & Mazur, 2009). Aus einem einfachen Experiment ist schnell ersichtlich, dass dies zu langsamerem Auftauen als Einfrieren führt, selbst wenn die anfängliche Temperaturänderungsrate sehr ähnlich ist. Kühlt man ein leicht isoliertes Thermoelement in flüssigem Stickstoff und wärmt es anschließend in einem Wasserbad wieder auf, so ist die Zeit in der kritischen Zone in der potentiell Eiswachstum stattfinden kann – dem Temperaturbereich zwischen Schmelzpunkt und Vitrifikationstemperatur – beim Aufwärmen mehr als doppelt so lang wie beim Kühlen (Abb. 4.6 A&B). Dies liegt daran, dass die Temperatur sich zunächst schnell mit annähernd konstanter Temperaturänderungsrate ändert, aber sich dann langsam der Umgebungstemperatur angleicht. Beim Aufwärmen ist die Endtemperatur deutlich näher an der kritischen Zone der potentiellen Eisbildung, so dass dieser Effekt einen deutlichen Einfluss hat. Das langsame Annähern an die Umgebungstemperatur wird in der jüngeren Literatur mit dem Schmelzen von Eis assoziiert (Koshimoto & Mazur, 2002; Peter Mazur & Seki, 2011). Um dies zu überprüfen, wurde ein Thermoelement in Abwesenheit von Wasser eingefroren und an der Luft aufgetaut (Abb. 4.6 C). Dieses Thermoelement zeigt eine deutlich langsamere Aufwärmrate, als jenes welches im Wasserbad aufgetaut wurde. Der prinzipielle

Verlauf hingegen ist der Gleiche. Anfänglich ändert sich die Temperatur relativ schnell und nähert sich dann immer langsamer an die Umgebungstemperatur an. Da hier kein Wasser involviert ist, kann es sich bei dem beobachteten Phänomen nicht um eine Auswirkung des Schmelzens von Eis handeln.

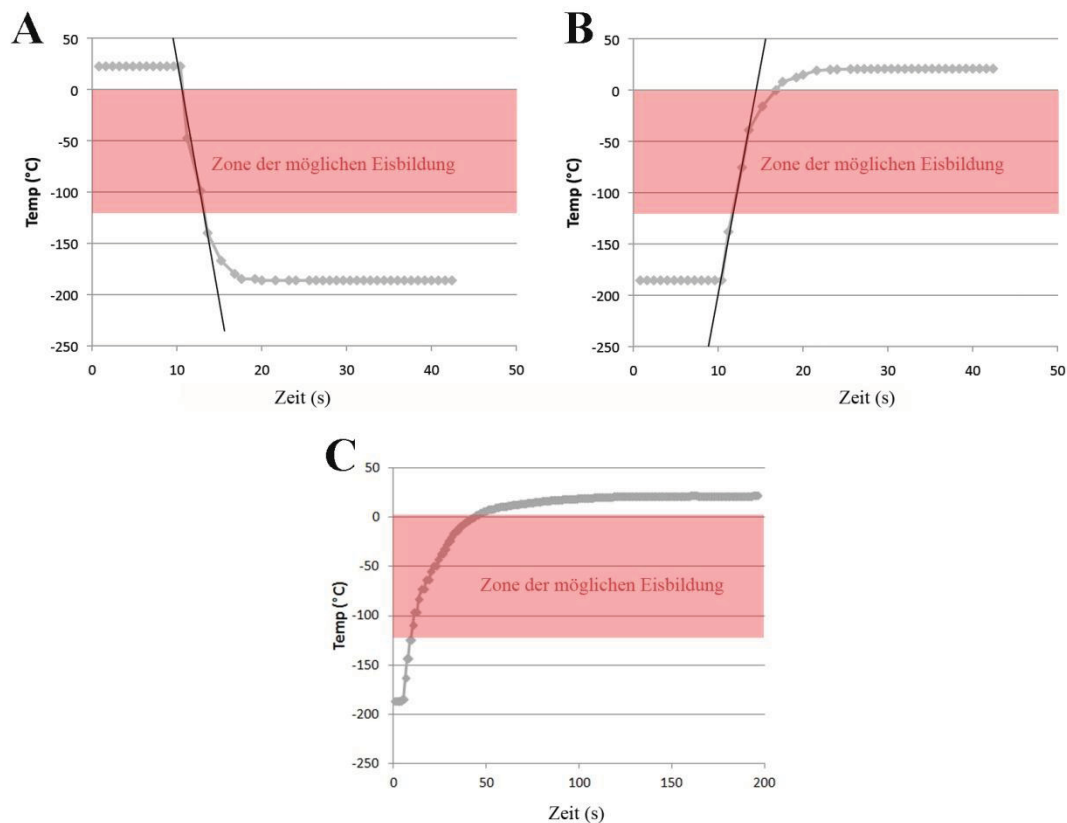


Abb 4.6: Temperaturverlauf beim Abkühlen und Aufwärmen eines Thermoelements
 Ein Thermoelement wurde mit Klebeband isoliert und der Temperaturverlauf aufgezeichnet. **A** Temperaturverlauf beim Transfer von Raumtemperatur in flüssigem Stickstoff; **B** Temperaturverlauf beim Transfer von flüssigem Stickstoff in ein Wasserbad bei Raumtemperatur; **C** Temperaturverlauf beim Transfer von flüssigem Stickstoff an die Luft (bei Raumtemperatur); grau: aufgezeichneter Temperaturverlauf; schwarz: Ausgleichsgerade der ersten 4,2s nach Transfer in oder aus dem Stickstoff; rot: Temperaturbereich zwischen Schmelz- und Vitrifikationstemperatur

4.6 Anpassung der Kryoprotektiva führt zu hohen Überlebensraten nach SPRF und HPF

Der Auftauprozess ist sehr kritisch und könnte der Grund für das Sterben der vitrifizierten Zellen sein. Dennoch gibt es Protokolle die zum Überleben von Zellen nach schnellem Einfrieren und Auftauen führen. In diesen werden allerdings andere kryoprotektive Medien verwendet. Dextran wird, trotz seiner offensichtlich vitrifikationsfördernden Eigenschaften, hier nicht eingesetzt. Aus diesem Grunde

wurden Medien getestet, mit denen in der Kryokonservierung mittels Vitrifizierung bereits Erfolge erzielt wurden. EAFS und DES sind Medien die häufig für die Kryokonservierung mittels Vitrifizierung eingesetzt werden. Diese beiden Mixturen sind nicht toxisch für die Zellen, auch nicht, wenn die Zellen dabei in Aluminium-Röhrchen gefüllt werden (Abb 4.7 A). Mit diesen Medien konnten nach SPRF und anschließendem Auftauen im Wasserbad hohe Überlebensraten der Zellen erzielt werden (Abb 4.7 B). Auch nach HPF in den genannten Medien wachsen Zellen wieder an (Abb 4.7 B).

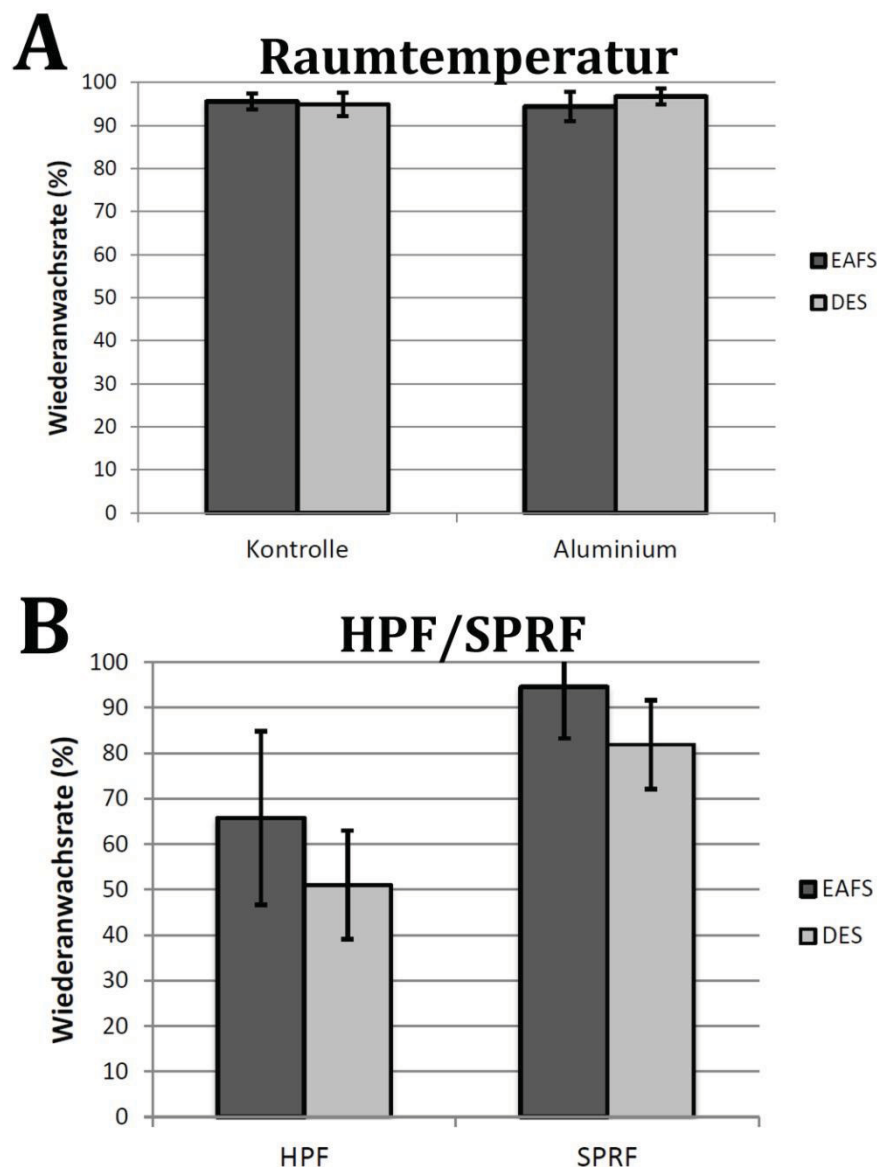


Abb 4.7: Überleben von HeLa-Zellen in Kryoprotektiva nach SPRF und HPF

A HeLa-Zellen wurden für eine Minute in den angegebenen Medien in geschlossenen Aluminium-Röhrchen gehalten und danach rekultiviert. Kontrolle: Zellen in angegebenen Medien, aber nicht in Röhrchen gefüllt. **B** HeLa-Zellen wurden in den angegebenen Medien mittels SPRF in Aluminiumröhrchen oder mittels HPF in Aluminiumplanchetten eingefroren. Röhrchen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, Planchetten in 300µL Zellkulturmedium und die Wiederanwachsrate der Zellen nach Rekultivierung wurde bestimmt.

Die gemessenen Anwachsrate für HPF sind hierbei deutlich niedriger als die bei SPRF. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Proben unterschiedlich aufgetaut wurden. Die geschlossenen SPRF Röhren wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die HPF Proben in nur 300µL Kulturmedium. Dies war nicht anders möglich, da die Zellen in den offenen Aluminium-Planchetten in einem größeren Volumen verloren gehen und anschließend nicht rekultiviert werden können. Es ist möglich, dass die HPF-Proben das umgebende Medium abkühlen und so die Aufwärmrate geringer ist.

4.7 Eigenschaften der verwendeten Kryoprotektiva

Das Überleben der Zellen nach SPRF hängt, wie nach allen Kryokonservierungsprotokollen, sehr stark von den verwendeten Kryoprotektiva ab. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, welchen Einfluss die Kryoprotektiva auf die Zellen haben. Hierbei sollte erstens ermittelt werden, welche Eigenschaften die Kryoprotektiva haben müssen, um für Zellüberleben geeignet zu sein. Die zweite Frage war, wie groß der Einfluss der Kryoprotektiva auf die (Ultra-) Struktur der Zellen ist. Wäre der Einfluss sehr gering, hätte dies den Vorteil, wäre mit diesem Medium eine gleichzeitige Kryofixierung und Kryokonservierung möglich. Zellen könnten dann im vitrifizierten Zustand beliebig lange untersucht und anschließend wieder aufgetaut werden um ihr weiteres Verhalten zu beobachten. Betrachtet werden sollen hier die beiden Medien EAFS und DES, mit denen hohe Überlebensraten nach SPRF erzielt werden konnten, sowie Dextran, was zwar zu Vitrifikation aber nicht zu Zellüberleben führte.

4.7.1 EAFS

4.7.1.1 Zusammensetzung des Mediums

Zunächst soll auf die Eigenschaften von EAFS eingegangen werden, da dieses Medium für sehr hohe Überlebensraten nach SPRF sorgte (Abb. 4.7). EAFS ist aus einer Kombination von rein extrazellulären und zellpermeablen Kryoprotektiva zusammengesetzt. Ficoll 70 und Sucrose sind Substanzen, die nicht in eine intakte Zelle eindringen können. Ethylenglykol und Acetamid hingegen sind zellpermeabel (Seki & Mazur, 2012). Um herauszufinden, ob beide Komponenten,

die zellpermeablen und die nicht-zellpermeablen, für eine erfolgreiche Kryokonservierung notwendig sind, wurden beide separat getestet. Wie in Abb. 4.8 zu erkennen, ist eine Kombination aus beiden Komponenten notwendig, ansonsten sind die Überlebensraten sehr gering (Ethylenglykol und Acetamid), bzw. es gibt keine überlebenden Zellen (Ficoll und Sucrose). Die Kombination beider Arten von Kryoprotektiva ist dabei deutlich besser als ein rein additiver Effekt.

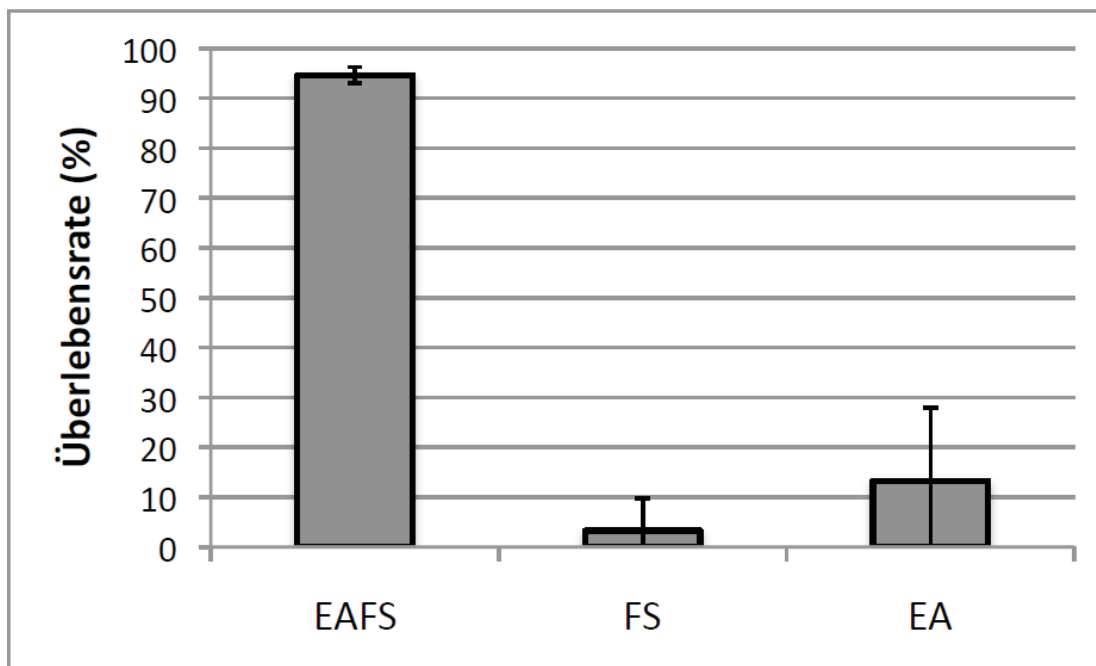


Abb 4.8: Überlebensraten von HeLa-Zellen nach SPRF in EAFS und seinen Komponenten
 Dargestellt sind die Überlebensraten von HeLa-Zellen nach SPRF in verschiedenen Medien. Das Überleben wurde durch Kultivierbarkeit nach dem Auftauen getestet. Die Buchstaben stehen für die einzelnen Komponenten, die in den jeweiligen Medien benutzt wurden. E: Ethylenglykol (10%); A: Acetamid (10,7%); F: Ficoll 70 (30%); S: Sucrose (0,5M); N=4

4.7.1.2 Effekte auf das Zellvolumen

Durch die Verwendung der Kryoprotektiva wird die Osmolarität des Mediums drastisch erhöht. Lichtmikroskopisch ist zu sehen, dass dies zu einer Formveränderung der Zellen führt und die Zellen ihre sphärische Form verlieren, die sie normalerweise haben, wenn sie nicht adhären sind (Abb. 4.9 A). Auch adhären Zellen verändern ihr Erscheinungsbild, der Umriss der Zellen bleibt dabei allerdings annähernd gleich (Abb. 4.9 B). Besonders das Erscheinungsbild der sphärischen Zellen legt nahe, dass es sich bei der Veränderung der Zellen um ein Schrumpfen handelt, eindeutig gezeigt werden kann dies jedoch nicht, da keine Informationen über die Höhe der Zelle vorhanden sind (Abb. 4.9 A). Eine Möglichkeit zur Quantifizierung

des Zellvolumens, ist die Bestimmung der Zellgröße mit Hilfe eines Zellzählers. Da Zellzähler den Durchmesser von Zellen anhand eines Kreises bestimmen, den sie um die Zelle legen, ist eine Größenbestimmung mittels Zellzähler jedoch bei nicht-sphärischen Zellen automatisch stark fehlerhaft (Abb 4.9 C).

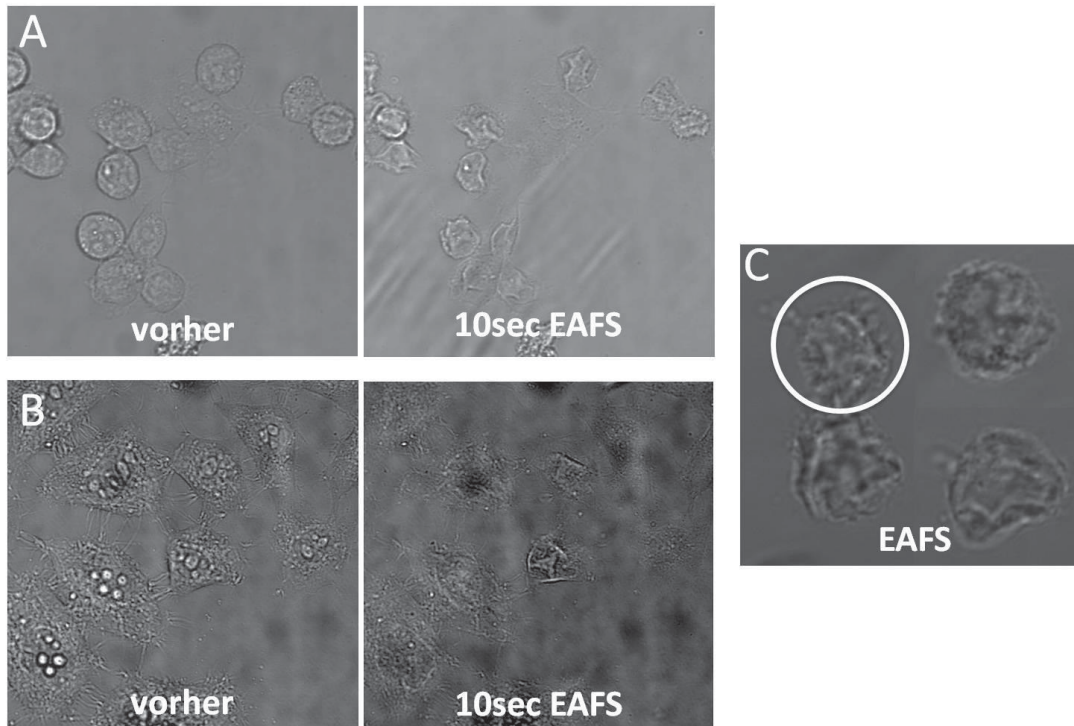


Abb 4.9: Lichtmikroskopische Betrachtung von Zellen unter dem Einfluss von EAFS
A HeLa-Zellen eine Stunde nach Aussaat (annähernd sphärisch aber schon adhären) vor und nach Behandlung mit EAFS **B** Komplette adhärenente und abgeflachte HeLa-Zellen vor und nach Behandlung mit EAFS **C** HeLa-Zellen in Suspension nach Behandlung mit EAFS. Zur Illustration wurde ein Kreis eingefügt, wie ihn ein Zellzähler für die Größenbestimmung um die Zelle legen würde. Maßstabsbalken: **A,B:** 10µm **C:** 5µm

Um zu quantifizieren, ob es sich bei der beobachteten Veränderung um ein Schrumpfen der Zellen handelt, wurden deshalb Zellen mit dem fluoreszenten Protein EGFP transfiziert und in einem konfokalen Mikroskop analysiert. Schrumpft die Zelle, kommt es in einem konfokalen Volumen innerhalb der Zelle zu einem Intensitätsanstieg, da die Konzentration von EGFP steigt. In Abbildung 4.10 ist zu sehen, dass es bei Behandlung der Zellen mit EAFS zu einem drastischen Anstieg der Fluoreszenz innerhalb von wenigen Sekunden auf 200-250% des Ausgangswertes kommt. Das bedeutet, dass die Zellen sofort drastisch auf 40-50% ihres Ausgangsvolumens schrumpfen. Zusätzlich wurden noch die Bestandteile des Mediums, die als zellpermeabel gelten (Ethylenglykol und Acetamid) und die, die nicht zellpermeabel sind (Ficoll und Sucrose), getrennt voneinander getestet. Ficoll und

Sucrose alleine führen zu einem mit EAFS vergleichbaren Schrumpfen der Zellen. Ethylenglykol mit Acetamid führen nur zu einem transienten und relativ schwachen Schrumpfen für einige Sekunden, danach kehrt das Zellvolumen auf seinen Ausgangswert zurück (Abb. 4.10).

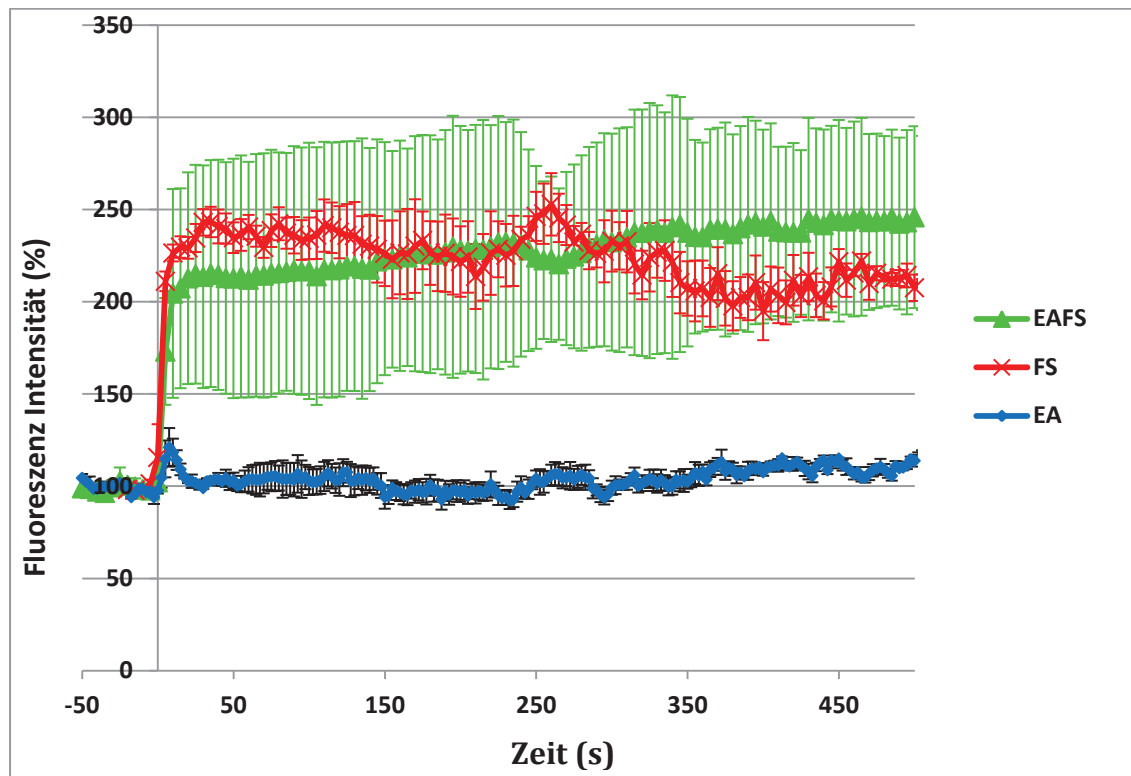


Abb 4.10: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des Zellvolumens nach Zugabe von EAFS und seinen Bestandteilen

Zu sehen ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in konfokalen Schnitten durch mit Kryoprotektiva behandelten Zellen über die Zeit. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels von isotonomem Zellkulturmedium zu dem jeweiligen Testmedium ist gleich 0 gesetzt. Die Temperatur wurde konstant bei 37°C gehalten. Die Substanzen wurden in den in Tab 3.1 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. **E**=Ethylenglykol; **A**=Acetamid; **F**=Ficoll 70; **S**=Sucrose

4.7.1.3 Beeinflussung der Zellmorphologie

Um einen Überblick zu bekommen, wie stark die Ultrastruktur der Zellen durch dieses massive Zusammenschrumpfen verändert wird, wurden nun elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht. Kryo-Elektronenmikroskopie wäre die beste Möglichkeit die Zellen im vitrifizierten Zustand direkt zu untersuchen. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Kontraste der Zellen nach EAFS Behandlung komplett verschwinden. Organellen oder Substrukturen sind nicht mehr zu detektieren (Abb 4.11).

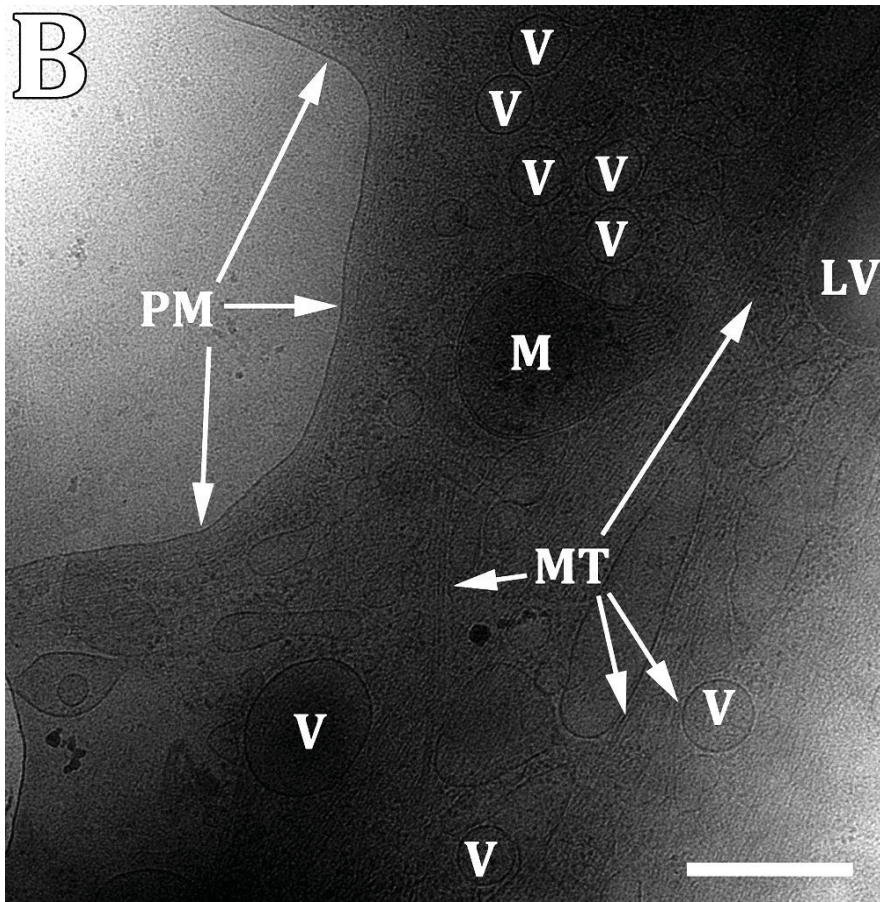
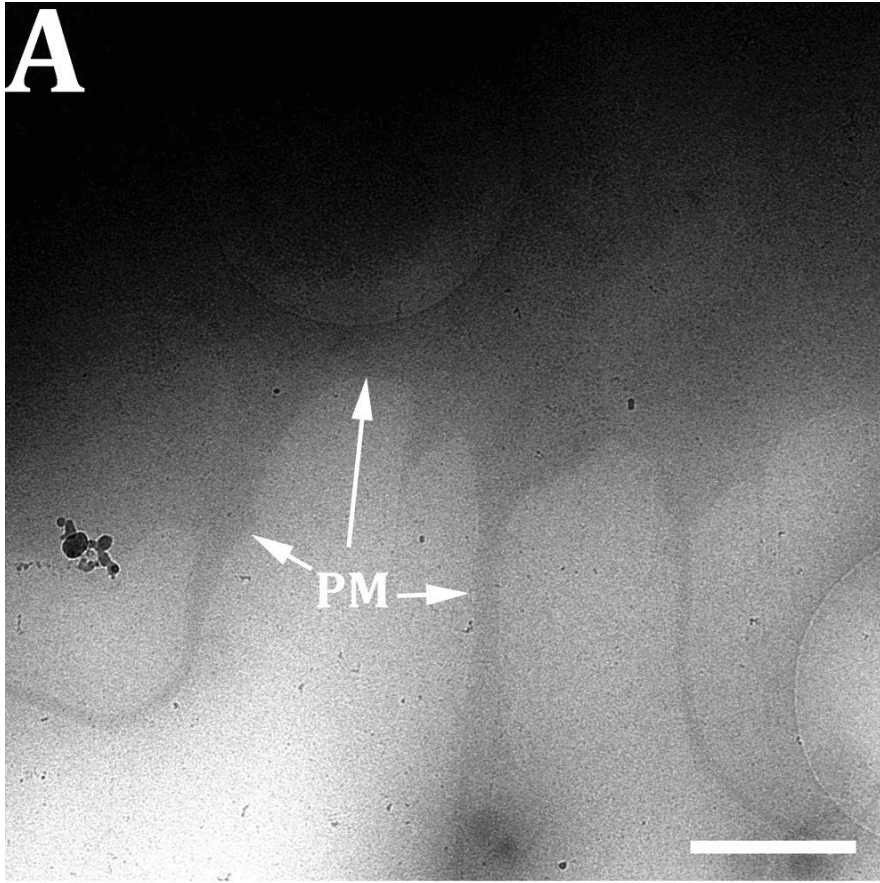
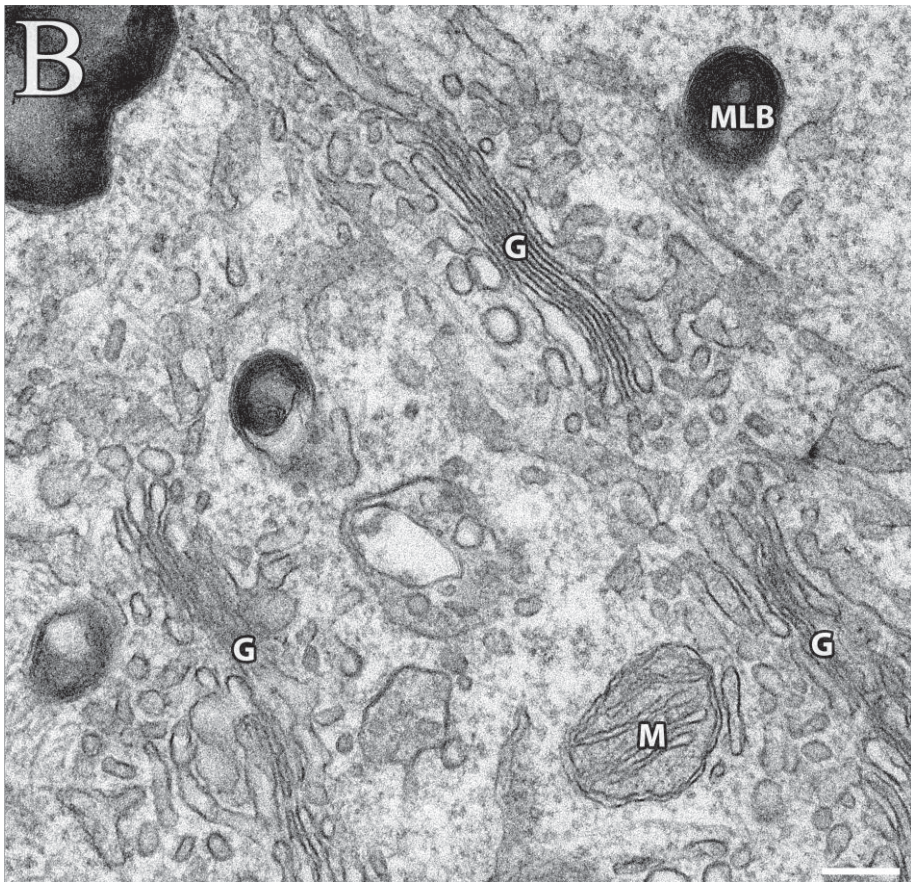
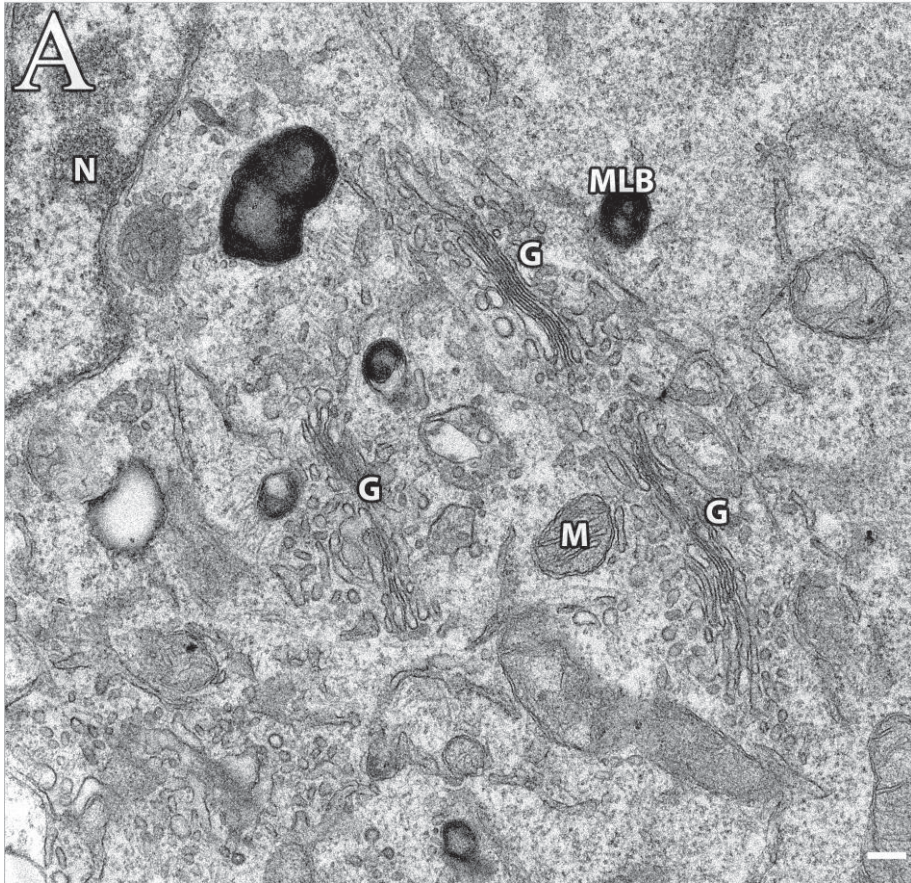


Abb 4.11: Kryo-Elektronenmikroskopie von HeLa-Zellen in EAFS und PBS

HeLa-Zellen in EAFS (A) und PBS (B) wurden mittels *plunge-freezing* gefroren und im Kryo-Elektronenmikroskop analysiert. **A** In EAFS ist das durch die Plasmamembran (PM) begrenzte Zellinnere vom extrazellulären Raum zu unterscheiden, aber im Zellinneren sind keine Substrukturen zu unterscheiden. **B** In PBS sind viele zelluläre Details wie Vesikel (V), Mitochondrien (M), Lipidvesikel (LV), die Plasmamembran mit darunterliegendem Aktincortex sowie zahlreiche Mikrotubuli (MT) im Inneren zu erkennen. Maßstabsbalken: 500nm.

Dies ist nicht nur bei den hier gezeigten durch *plunge-freezing* gefrorenen Proben der Fall, sondern auch in der Kryo-Elektronenmikroskopie vitrifizierter Schnitte (CEMOVIS), die aus den Proben der SPRF-Röhrchen angefertigt werden (Dr. Hongmei Han, unveröffentlichte Daten).

Da die kryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen nur geringen Informationsgehalt enthielten, wurde versucht die Zellen in EAFS mittels Gefriersubstitution zu untersuchen. Nach Gefriersubstitution und Einbettung in Kunstharz war es jedoch kaum möglich Ultradünnschnitte anzufertigen. Das Material war weich und löste sich auf der Oberfläche des Wassers, auf dem die Schnitte aufgefangen werden, auf. Bei der Gefriersubstitution wird das Wasser aus Zellen und Medium durch Aceton substituiert. Die verwendeten Kryoprotektiva sind in Aceton allerdings schwer löslich. Sie werden somit nicht heraus gelöst und blockieren eine Fixierung des Präparates und das Eindringen des Kunstharzes. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass nach Gefriersubstitution keine gute Kunstharzeinbettung möglich war. Da eine Untersuchung des gefrorenen Präparates mittels Kryo-EM oder Gefriersubstitution somit keine ausreichenden Informationen über die Ultrastruktur der vitrifizierten Probe liefern konnten, wurden die Zellen nun vor der Vitrifizierung mittels chemischer Fixierung für die Elektronenmikroskopie präpariert. Die Vitrifizierung selbst ist ein sehr rapider Prozess. Simulationen zufolge dauert sie weniger als 10ms (Yakovlev & Downing, 2011). Deshalb ist davon auszugehen, dass in diesem Zeitraum keine sichtbaren Veränderungen der Ultrastruktur auftreten. Die im Kryomedium fixierten Zellen spiegeln demnach auch den Zustand der Zelle im vitrifizierten Zustand wieder. Diese Optimierung der Präparation führte zum gewünschten Erfolg und ermöglichte eine Analyse der Ultrastruktur.



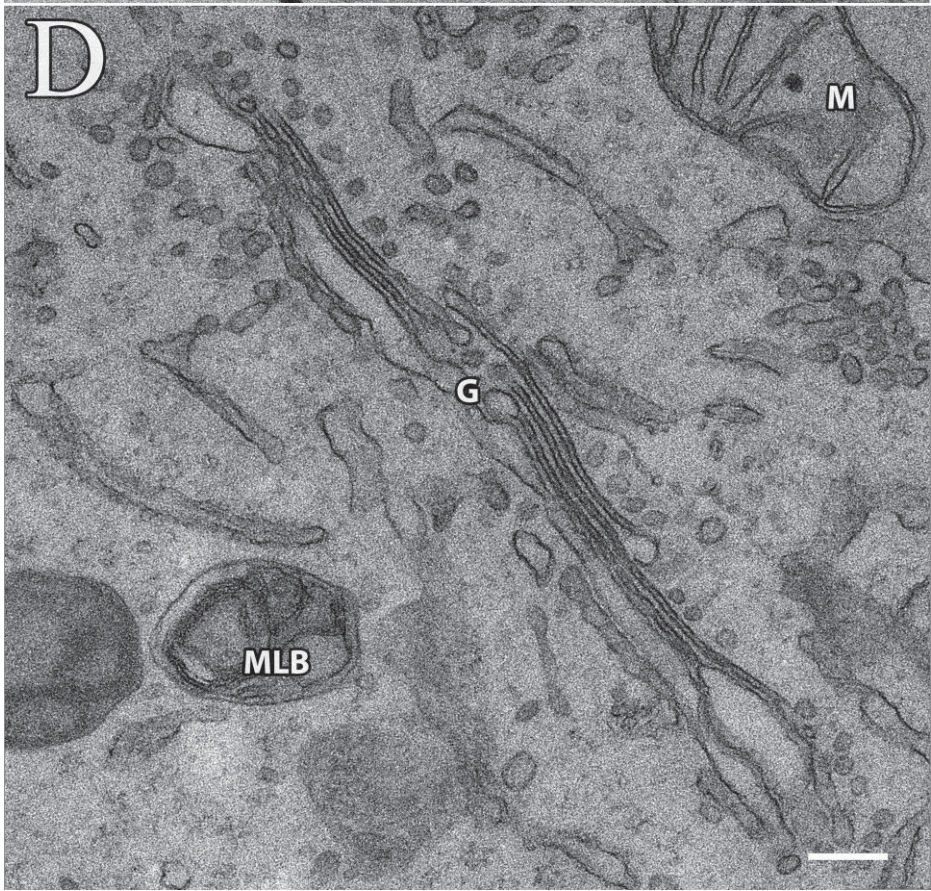
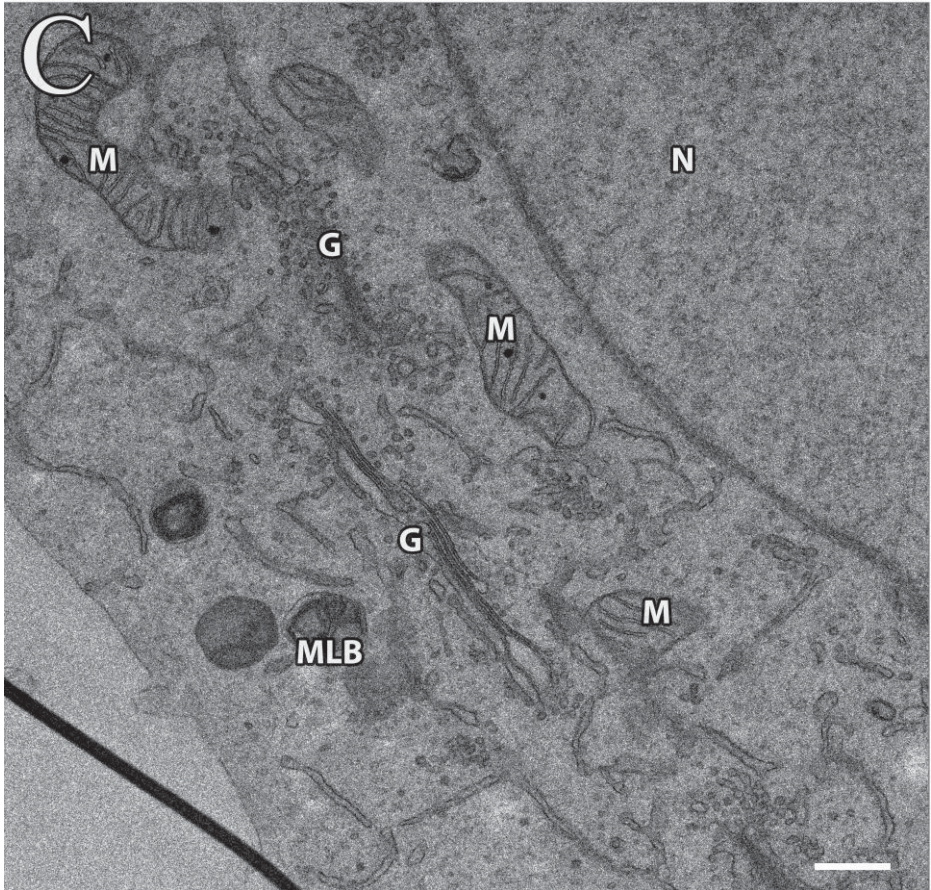


Abbildung 4.12: Elektronenmikroskopie von HeLa-Zellen in EAFS Medium

HeLa-Zellen die 30s mit EAFS Medium behandelt (**A, B**) sowie Kontrollzellen in PBS (**C, D**) wurden für die Elektronenmikroskopie präpariert. Der Zeitraum von 30s wurde gewählt, weil er in etwa dem Zeitraum entspricht, den die Zellen dem Medium vor der Vitrifizierung ausgesetzt sind. Zu sehen sind Aufnahmen von Ultradünnschnitten mit Originalvergrößerungen von 11200x (**A**), 14000x (**C**) und 28000x (**B, D**). G: Golgi Apparat, M: Mitochondrium; MLB: *Multilammellar Body*; N: Nukleus; Maßstabsbalken: **A,B,D**: 200nm; **C**:500nm

Membranbegrenzte Zellorganellen wie Golgi Apparat, Mitochondrien, Nukleus, endoplasmatisches Retikulum sowie Vesikel von Zellen die mit EAFS behandelt wurden haben trotz des extremen Schrumpfens der Zellen (Abb. 4.9/4.10) eine normale Ultrastruktur, die von unbehandelten Zellen kaum zu unterscheiden ist (Abb 4.12). Bei der Analyse vieler Zellen ist insgesamt zu beobachten, dass die Organellen enger zusammen liegen als normal, was mit dem Schrumpfen der Zelle und hauptsächlich Wasserverlust aus dem Zytoplasma zu erklären wäre.

4.7.2 DES/DE

4.7.2.1 Zusammensetzung des Mediums

Auch DES führt zu relativ hohen Überlebensraten nach SPRF. Wie EAFS besteht es aus zellpermeablen und nicht-zellpermeablen Kryoprotektiva. Da DMSO und Ethylenglykol zellpermeabel sind und nur Sucrose nicht, ist in diesem Medium der Anteil an zellpermeablen Kryoprotektiva an der Gesamtkryoprotektiva-Mixtur deutlich höher. Das Weglassen der rein extrazellulären Komponenten, in diesem Fall nur Sucrose, führt im Gegensatz zu den Versuchen mit EAFS nicht zu einer Reduktion des Überlebens von HeLa-Zellen nach SPRF (Abb 4.13).

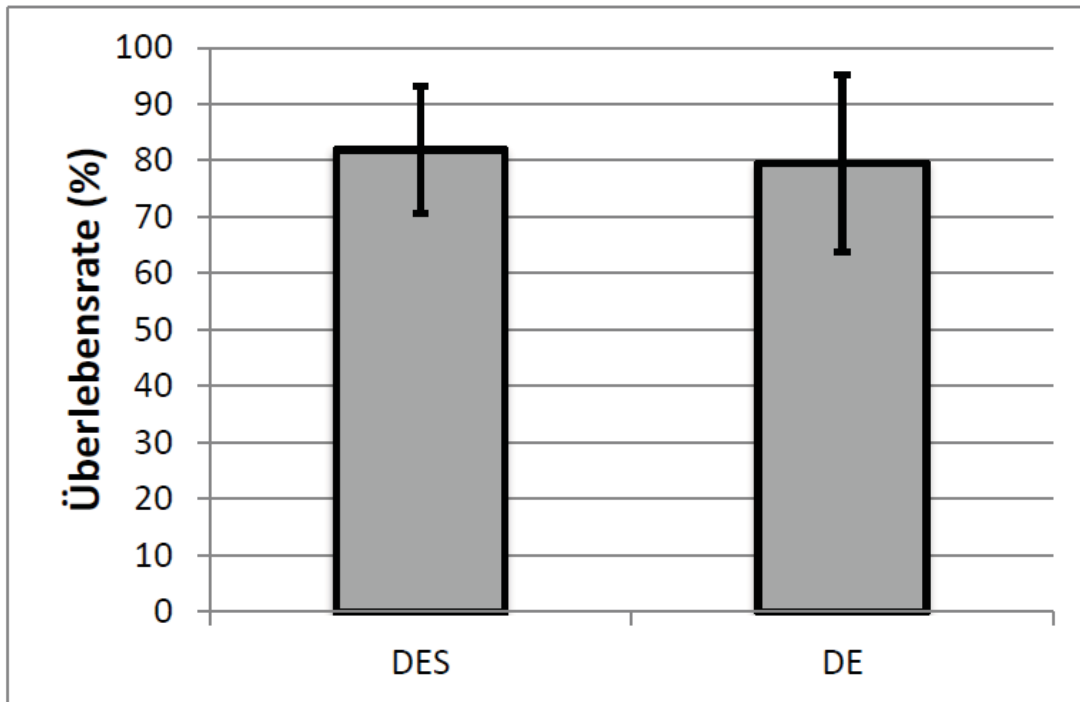


Abbildung 4.13: Überlebensraten von HeLa-Zellen nach SPRF in DMSO, Ethylenglykol und Sucrose

HeLa-Zellen wurden in 15% DMSO + 15% Ethylenglykol + 0,5M Sucrose (DES) oder 15%DMSO +15%Ethylenglykol (DE) mittels SPRF eingefroren. Nach Auftauen wurde ihr Überlebensrate anhand der Reaktivierbarkeit bestimmt.

4.7.2.2 Effekte auf das Zellvolumen

Die Änderungen des Zellvolumens durch das DES-Medium wurden analog zu denen durch EAFS mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt. DES verursacht dabei ein Schrumpfen der Zellen auf 40-50% ihres Volumens, vergleichbar zu EAFS (Abb 4.14). Verwendet man allerdings DE-Medium ohne Sucrose, so schrumpfen die Zellen nur für einige Sekunden und schwellen dann wieder auf ihr Ausgangsvolumen an (Abb 4.14). Da die Zellen vor dem Einfrieren mindestens 30s dem Medium ausgesetzt sind, sind diese Zellen nicht mehr geschrumpft, wenn sie eingefroren werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für EAFS gibt es hier folglich keine Korrelation von Zellschrumpfung und Überleben.

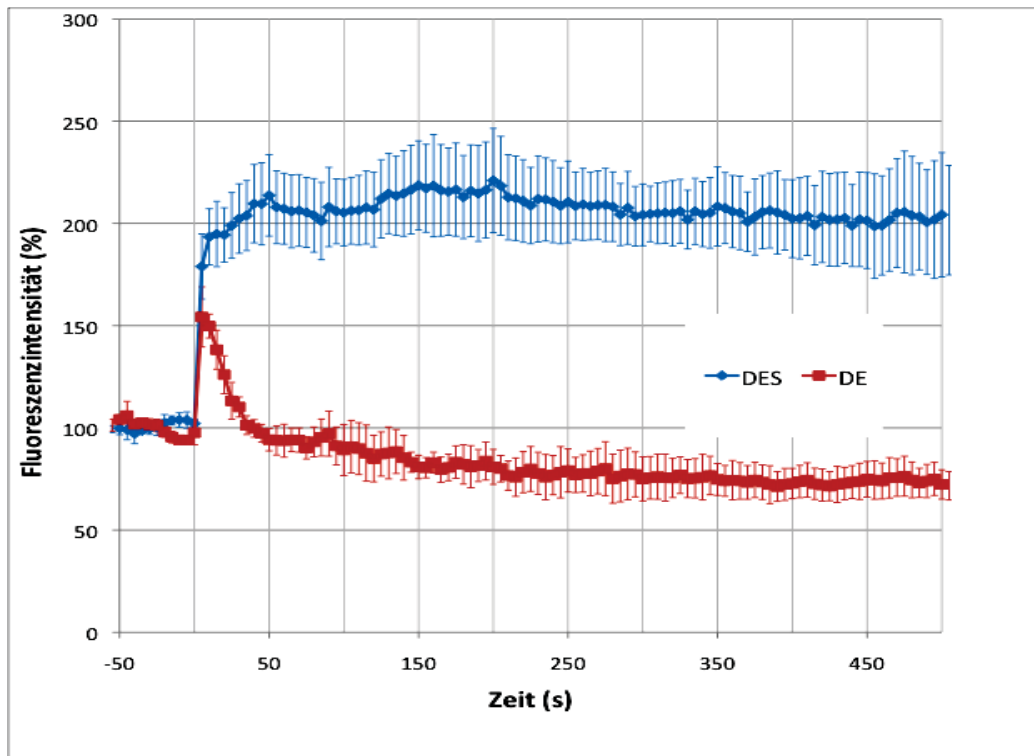


Abb 4.14: Volumenveränderungen von HeLa-Zellen in Medien die DMSO, Ethylenglykol und Sucrose enthalten

Zu sehen ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität in konfokalen Schnitten durch mit Kryoprotektiva behandelten Zellen über die Zeit. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels von isotonem Zellkulturmedium zu dem jeweiligen Testmedium ist gleich 0 gesetzt. Die Temperatur wurde konstant bei 37°C gehalten D: DMSO (15%); E: Ethylenglykol (15%); S: Sucrose (0,5M)

4.7.3.2 Veränderungen der Zellmorphologie

Bei der Beeinflussung der Zellmorphologie soll im Folgenden auf die Kryoprotektiva-Mixtur aus 15% DMSO + 15% Ethylenglykol ohne Sucrose (DE) eingegangen werden. Dieses Medium unterscheidet sich von EAFS und DES dadurch, dass es nicht zu einer Schrumpfung der Zellen führt (Abb 4.10/4.14). Dennoch werden bei der Verwendung dieses Mediums für SPRF hohe Überlebensraten erzielt (Abb 4.13). Dadurch erscheint es zunächst als ein vielversprechendes Medium für eine relativ gute Erhaltung der (Ultra-) Struktur bei gleichzeitig hohen Überlebensraten und somit für eine Kombination aus Kryofixierung und Kryokonservierung.

In Analogie zu den Untersuchungen mittels EAFS wurden zur Analyse der Ultrastruktur elektronenmikroskopische Bilder herangezogen. Aus Abb. 4.15 ist erkennbar, dass verschiedene Organellen angeschwollen erscheinen. In den meisten Zellen erscheinen die Mitochondrien weniger länglich, stattdessen rundlich und die Cristae haben teilweise ein pathologisch verändertes Erscheinungsbild (Abb. 4.15 E, F). In weiteren Zellen finden sich sehr viele runde und dicht

gedrängte Organellen von einer einzelnen Membran umgeben, die nicht eindeutig zu identifizieren sind (Abb 4.15 D). Aufgrund ihrer Häufigkeit und der gleichzeitigen kompletten Abwesenheit von ER-Zisternen, ist jedoch anzunehmen, dass es sich zumindest teilweise um stark aufgeblähtes endoplasmatisches Retikulum handelt.

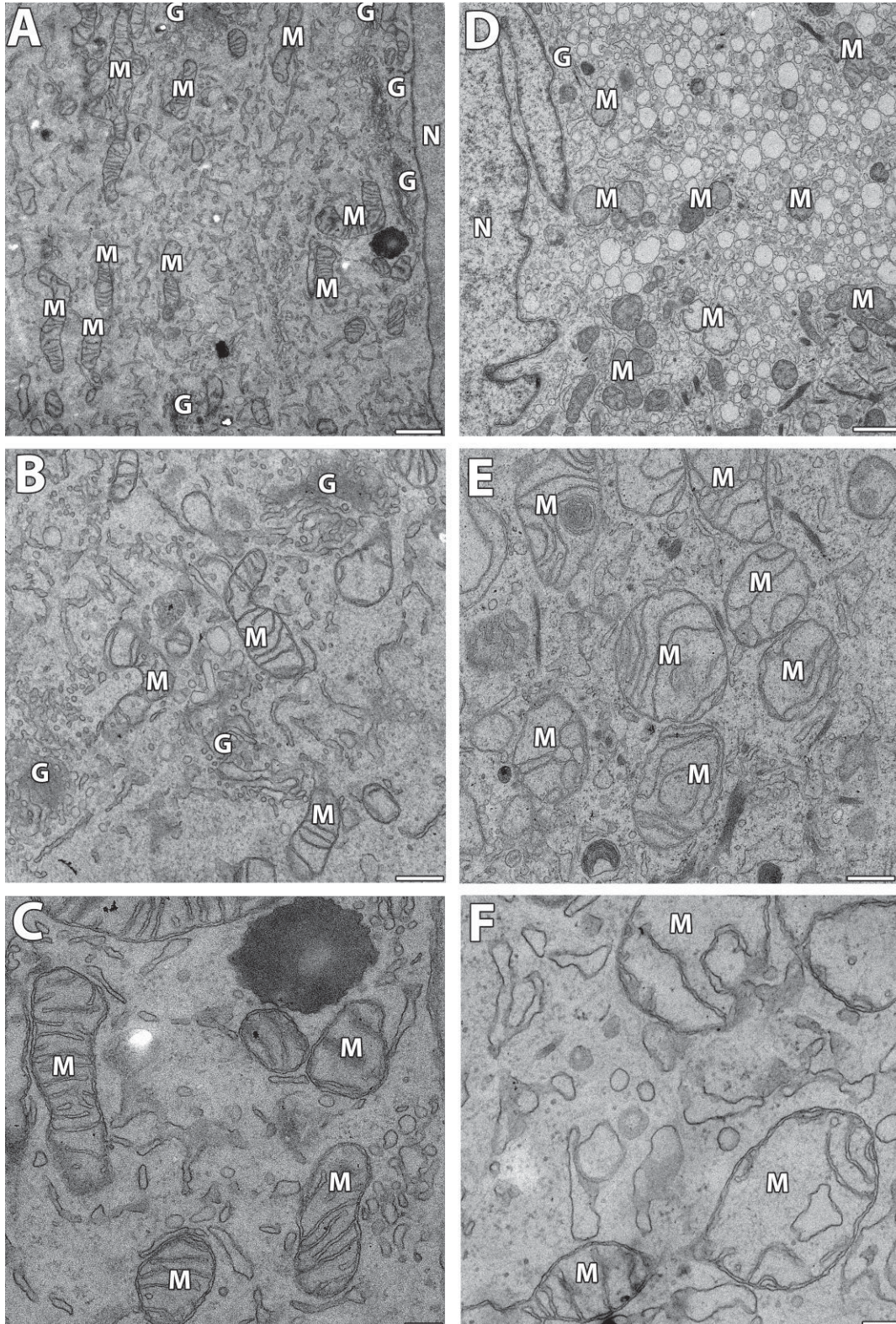


Abb. 4.15: Elektronenmikroskopische Untersuchung von HeLa-Zellen in DMSO und Ethylenglykol

Elektronenmikroskopische Analyse von Ultradünnschnitten von HeLa-Zellen die mit DE-Medium behandelt wurden (D-F) sowie Kontrollzellen (A-C).

M: Mitochondrium; G: Golgi-Apparat; N: Nukleus; Originalvergrößerung: 5000 (A,D); 10000 (B,D); 20000 (C,F); Maßstab: 1000nm (A,D); 500nm (B,D); 200nm (C,F)

Die Zellen wurden für Abb. 4.15 chemisch fixiert, während sie noch in dem Kryomedium waren. Da das Kryomedium relativ hohe Anteile an intrazellulären Kryoprotektiva hat, besteht die Gefahr, dass das Medium mit den Chemikalien für die Fixierung reagiert und so die ungewöhnliche Morphologie zustande kommen könnte. Aus diesem Grund wurde die Morphologie zusätzlich mit Kryoelektronenmikroskopie und -tomographie überprüft. Die DE-behandelten Mitochondrien sind auch hier verändert (Abb 4.16). Außerdem sind in den Zellen membranbegrenzte Organellen mit unregelmäßigen Formen zu erkennen (Asterisk in Abb 4.17), die in unbehandelten HeLa-Zellen nicht vorhanden sind (vergl. Abb 4.11 B). Hierbei könnte es sich um aufgeblähte ER-Zisternen handeln. Zudem fällt bei der Betrachtung vieler Bilder immer wieder auf, dass in den DE behandelten Zellen viele Mikrotubuli vorhanden sind. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an lebenden HeLa-Zellen belegen, dass durch die Behandlung mit DE-Medium deutlich mehr Tubulin zu Mikrotubuli polymerisiert (Abb 4.18 A). Besonders deutlich ist dies in mitotischen Zellen in der Metaphase zu erkennen, hier sieht man auch, dass nicht nur vorhandene Mikrotubuli verlängert werden, sondern auch neue Mikrotubuli entstehen (Abb 4.18 B). Die tubulin-reichen Strukturen in den mitotischen Zellen sind relativ klein und globulär. Theoretisch könnte es sich also auch um andere Strukturen als Mikrotubuli handeln. Dass es sich bei den neu entstandenen Strukturen wirklich um Mikrotubuli handelt und nicht um Ansammlungen von globulärem Tubulin, ist durch Nocodazol-Behandlung zu zeigen. Nocodazol ist eine Mikrotubuli-destabilisierende Substanz und es löst die neu entstandenen Strukturen wieder auf (Abb 4.18 B). Wären die neu entstandenen Tubulin-Ansammlungen keine Mikrotubuli, so sollte das Nocodazol keine Wirkung auf sie zeigen. Durch die Transfektion der Zellen mit Tubulin-EGFP kommt es außerdem zu einer Überexpression von Tubulin. Deshalb könnte es sein, dass es sich bei den Strukturen um Artefakte, hervorgerufen durch die Überexpression, handelt. In Immunfluoreszenzanalysen, bei denen keine Überexpression stattfindet, wurden jedoch dieselben Strukturen gefunden. Dies zeigt, dass es sich nicht um solche Artefakte handelt (Abb 4.18 C).

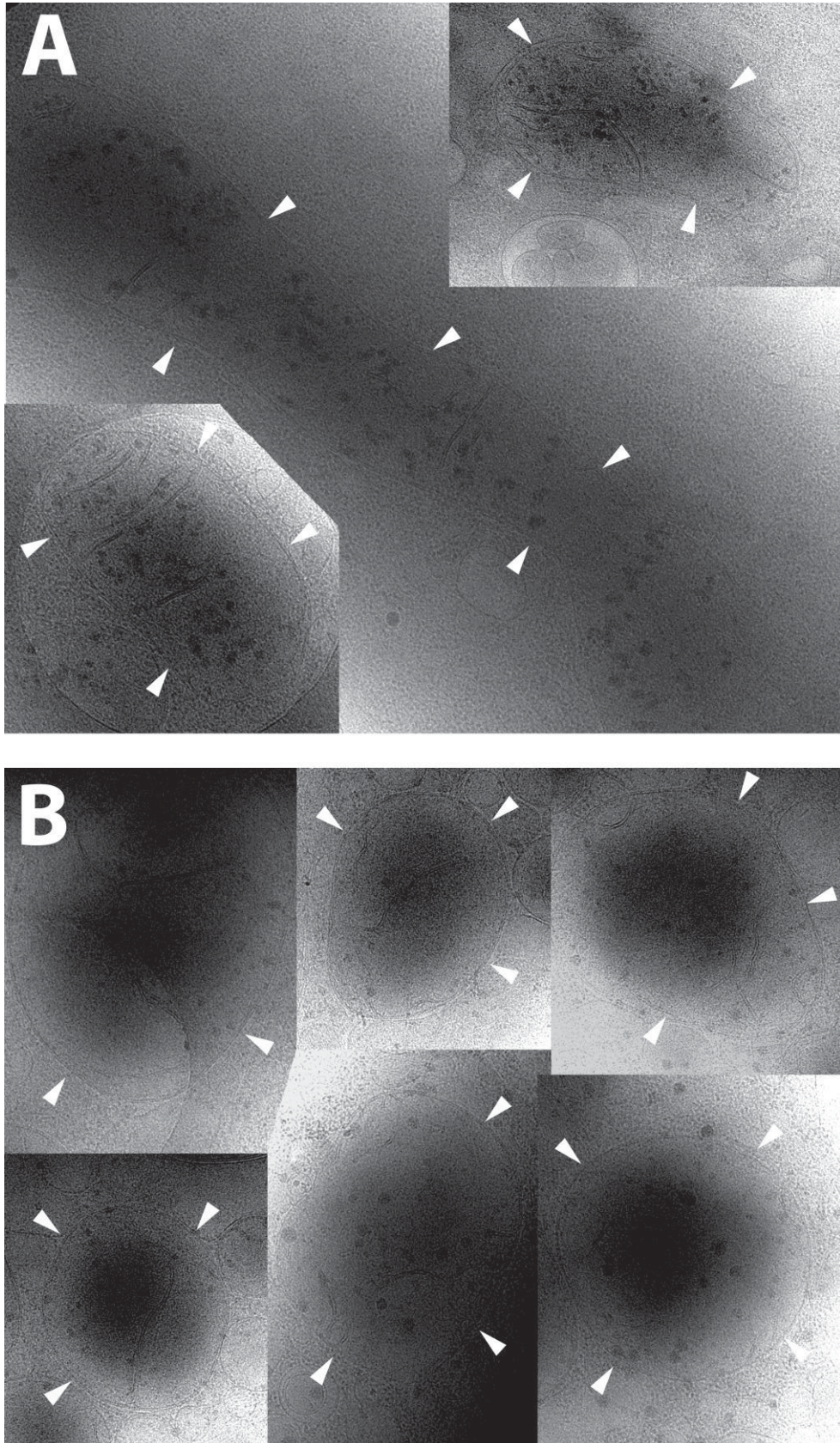


Abb 4.16: Kryo-Elektronenmikroskopie von Mitochondrien in HeLa-Zellen in DE und PBS
 Mitochondrien verschiedener HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* wurden kryoelektronenmikroskopisch analysiert. HeLa-Zellen in PBS (A) oder DE (B) wurden nach Kryofixierung durch *plunge-freezing* kryoelektronenmikroskopisch analysiert. Pfeilspitzen markieren die äußere Begrenzung der Mitochondrien.

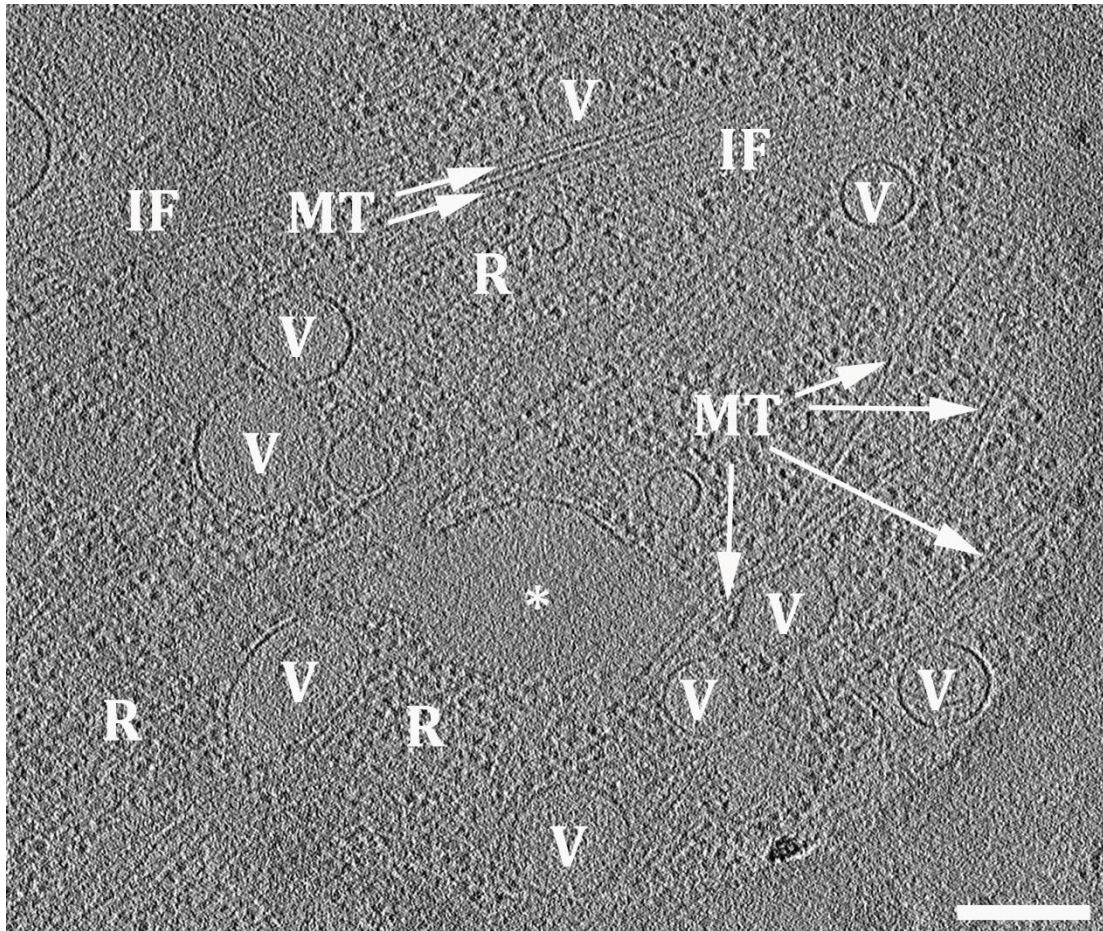
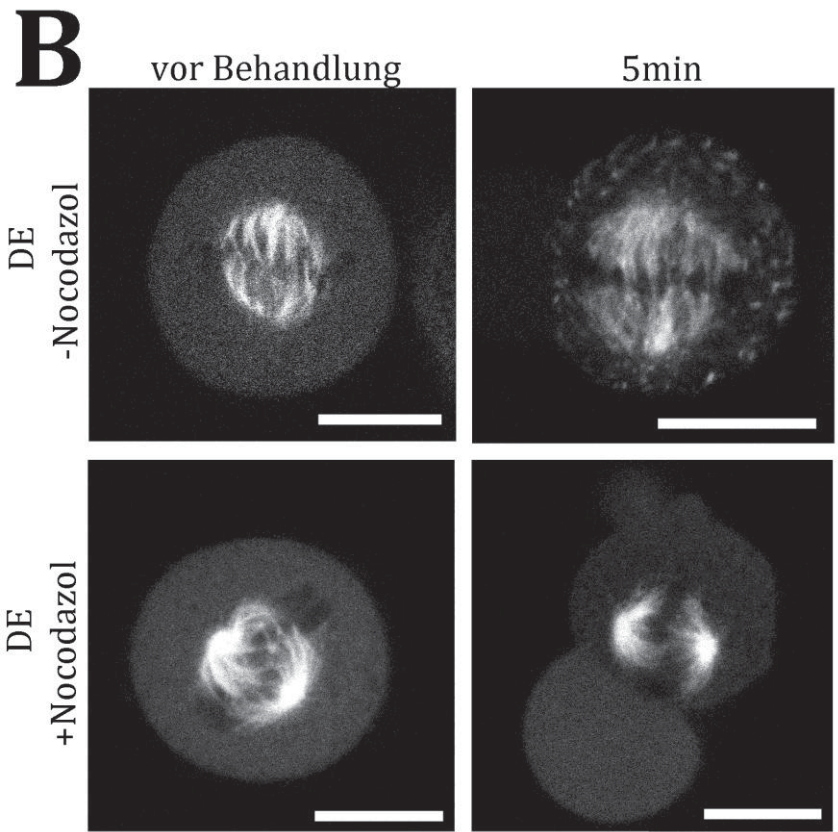
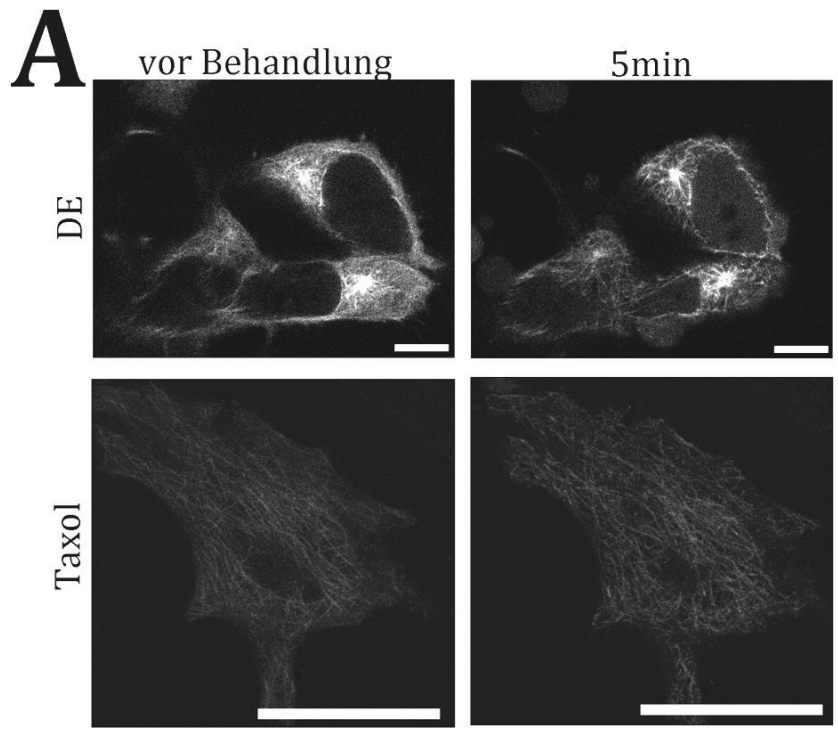


Abb 4.17: Kryo-Elektronen-Tomographie einer mit DE behandelten HeLa-Zelle
 Auf EM-Grids gewachsene HeLa-Zellen wurden durch *plunge-freezing* kryofixiert. Im Elektronenmikroskop wurden Kippserien aufgenommen und diese anschließend dreidimensional rekonstruiert. Gezeigt ist ein Schnitt durch eine 3D-Rekonstruktion. * markiert unregelmäßiges Organell, das möglicherweise angeschwollenes ER repräsentiert; V: Vesikel; MT: Mikrotubuli; IF: Intermediärfilamente; R: Ribosomen; Maßstabsbalken: 250nm

Das Netzwerk aus Mikrotubuli in der Zelle ist hochdynamisch. Mikrotubuli polymerisieren und depolymerisieren ständig. EB3 ist ein Protein, welches an die wachsenden Enden von Mikrotubuli bindet. In unbehandelten Zellen kann man so das Wachstum der Mikrotubuli beobachten. Nach dem Mediumwechsel zu DE-Medium, ist keinerlei spezifische Färbung von plus-Enden mehr zu sehen (Abb 4.19). Dies lässt darauf schließen, dass die Dynamik der Mikrotubuli-Polymerisation durch das verstärkte Polymerisieren komplett unterbunden wird. Die Zellen fangen des Weiteren auch an zu blebben (Abb 4.17 & 4.20) und sich zusammenzuziehen (Abb 4.20). Beides sind Phänomene, die durch Störungen des Zytoskeletts erklärt werden könnten. Auch die Änderung der Morphologie von Mitochondrien ist so stark, dass sie bereits fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Zellen nachweisbar ist (4.20).



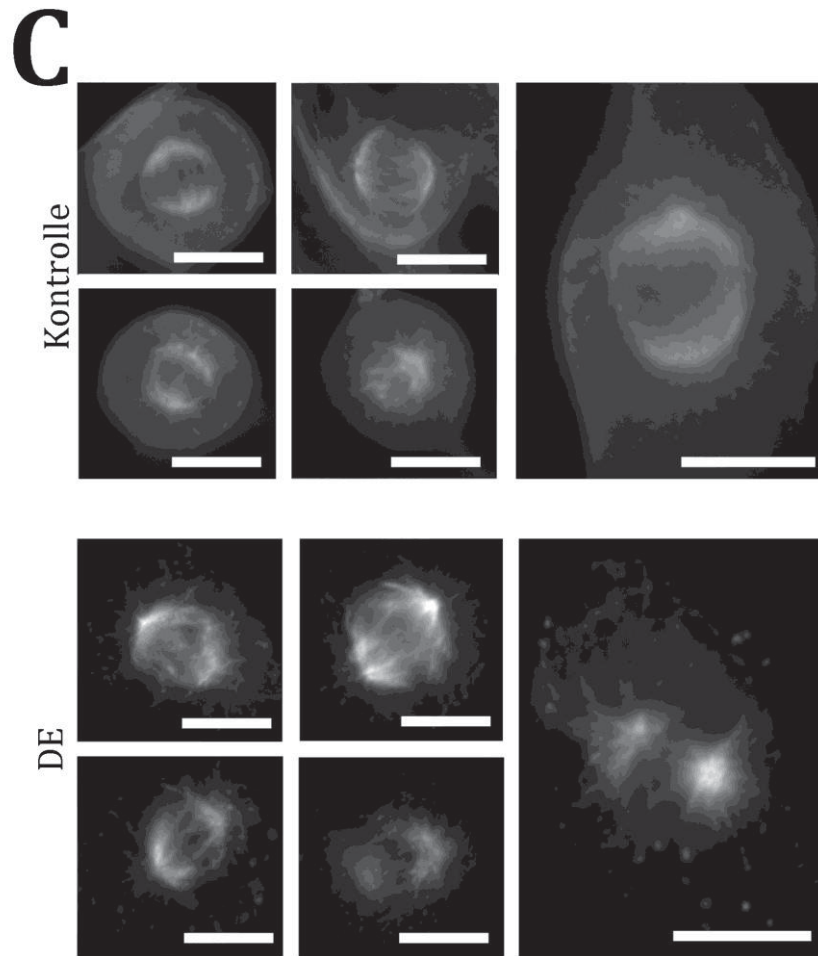


Abb. 4.18: Tubulin in HeLa-Zellen unter Einfluss von DE

A Fluoreszenzmikroskopie von Tubulin-GFP exprimierenden HeLa-Zellen vor und nach Mediumwechsel von PBS zu DE sowie vor und nach Behandlung mit $1\mu\text{M}$ Taxol. **B** Mitotische Zellen vor und nach Mediumwechsel zu DE sowie DE mit $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Nocodazol. **C** Tubulin-Immunfluoreszenz von HeLa Zellen in DE sowie Kontrollen in PBS; Maßstabsbalken: $50\mu\text{m}$ (**A**), $10\mu\text{m}$ (**B,C**)

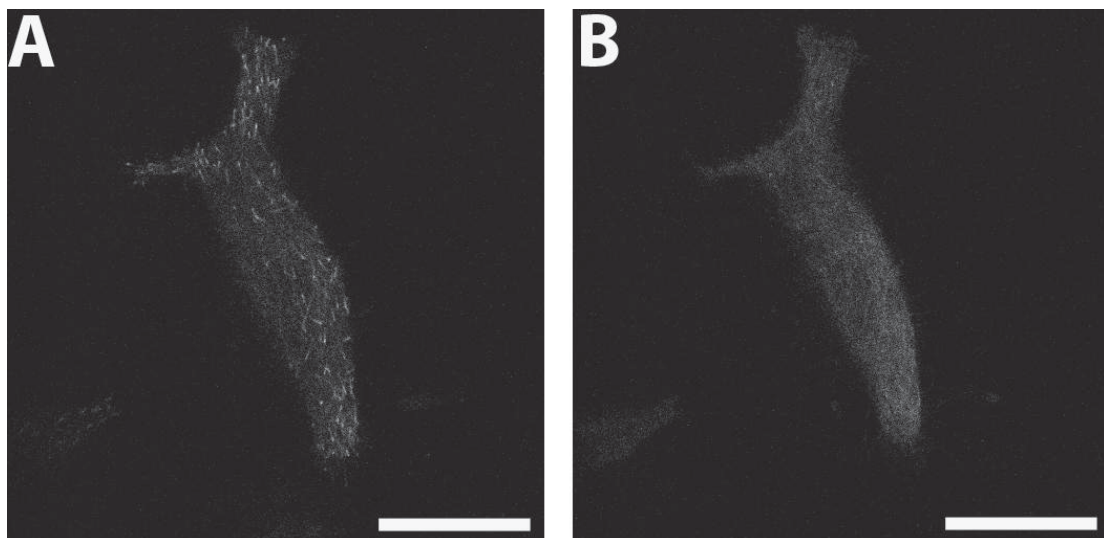


Abb. 4.19: EB3 in HeLa-Zellen unter Einfluss von DE

A EB3-GFP exprimierende HeLa-Zellen in PBS zeigen spezifische Färbungen an den Enden der Mikrotubuli. Diese bewegen sich kontinuierlich. **B** Nach Mediumwechsel zu DE verschwinden die spezifischen Färbungen innerhalb weniger Sekunden; Maßstabsbalken: 20µm

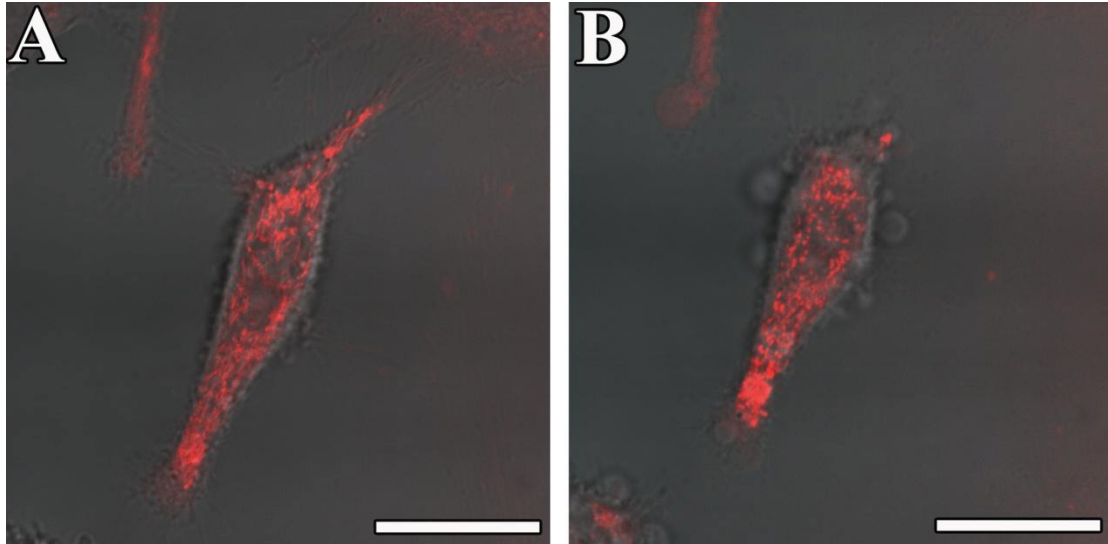


Abb. 4.20: Mitochondrien in HeLa-Zellen unter Einfluss von DE

Mitochondrien in lebenden HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von Rhod2-AM (rot) angefärbt. **A** In normalen Zellen weisen Mitochondrien eine tubuläre Struktur auf. **B** Nach Mediumwechsel zu DE erscheinen die Mitochondrien eher globulär, zusätzlich zieht sich die Zelle zusammen und fängt an zu blebber. Maßstabsbalken: 30µm

4.7.3 Dextran

Dextran ist in der Kryofixierung für die Kryo-Elektronenmikroskopie ein weit verbreitetes Kryoprotektivum (z.B. Al-Amoudi & Frangakis, 2013; Al-Amoudi et al., 2004; Bouchet-Marquis et al., 2008; Hagen & Grünewald, 2008; Han et al., 2012; Sader et al., 2009). Dextran wird im Gegensatz zu EAFS und DES auch nicht routinemäßig für die Kryokonservierung von Säugerzellen eingesetzt. Im Gegensatz zu EAFS und DES, überleben HeLa-Zellen in Dextran das SPRF oder HPF nicht. Dextran ist ein rein extrazelluläres Kryoprotektivum, welches die Zellmembran nicht durchqueren kann. Daher geht man allgemein davon aus, dass es die (Ultra-)Struktur der Zelle nicht entscheidend beeinflusst. Die hier durchgeführten Volumenmessungen zeigen allerdings, dass auch Dextran zu einer signifikanten Schrumpfung der Zellen führt (Abb 4.21). Diese ist langsamer als in EAFS- oder DES-Medium und etwas schwächer (vergl. Abb 4.10 & 4.12). Nach SPRF oder HPF überleben jedoch weder Zellen, die sehr schnell innerhalb weniger Sekunden gefroren wurden, noch Zellen, die mehrere Minuten in dem Medium inkubiert waren. Das Ausmaß der Schrumpfung ist demzufolge kein entscheidender Faktor für das

Zellüberleben nach Kryokonservierung in Dextran. Bei Raumtemperatur ist Dextran über diesen Zeitraum nicht toxisch für die Zellen (vergl. Abb 4.1).

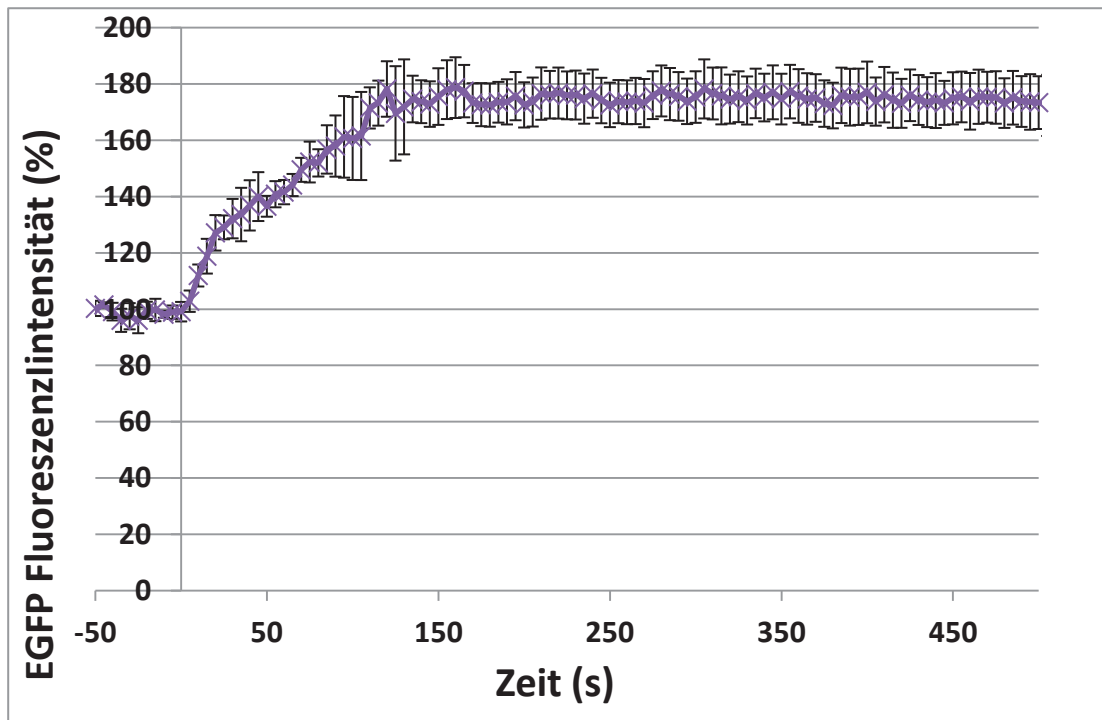


Abb. 4.21: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des Zellvolumens nach Zugabe von Dextran

Zu sehen ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in konfokalen Schnitten durch mit 30% Dextran behandelten Zellen über die Zeit. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels von isotonem Zellkulturmedium zu dem Testmedium ist gleich 0 gesetzt. Die Temperatur wurde konstant bei 37°C gehalten.

Dextran ermöglicht die Vitrifikation von Zellen mittels SPRF, aber sie überleben diese Präparation nicht (vergleiche Kap. 4.4 und (Han et al., 2012)). Daher sollte untersucht werden, welche zusätzlichen Komponenten hinzugefügt werden müssen, damit Zellen das Vitrifizieren in Dextran überleben können. Dextran ist strukturell sehr ähnlich zu Ficoll, welches Bestandteil von EAFS ist. Beides sind hochmolekulare Zucker, wobei Ficoll zusätzlich chemisch modifiziert ist. Aufgrund der Ähnlichkeit beider Substanzen wurde Dextran mit den verschiedenen Bestandteilen von EAFS supplementiert und das Überleben der Zellen nach SPRF analysiert. Wird nur Ethylenglykol zu Dextran zugegeben, so führt dies bereits zum Überleben eines geringen Anteils an Zellen. Unter der Zugabe von Ethylenglykol und Acetamid werden bereits relativ hohe Überlebensraten von >70% (Abb. 4.22) erzielt, wobei Ethylenglykol und Acetamid separat nur zu sehr geringen Überlebensraten führten (~10%; Abb. 4.8). Die Zugabe von Sucrose bringt keine weitere Steigerung der Überlebensrate

(Abb. 4.22). In Analogie zum EAFS-Medium scheint hier also wieder die Kombination extra- und intrazellulärer Kryoprotektiva notwendig zu sein, um hohe Überlebensraten zu erreichen.

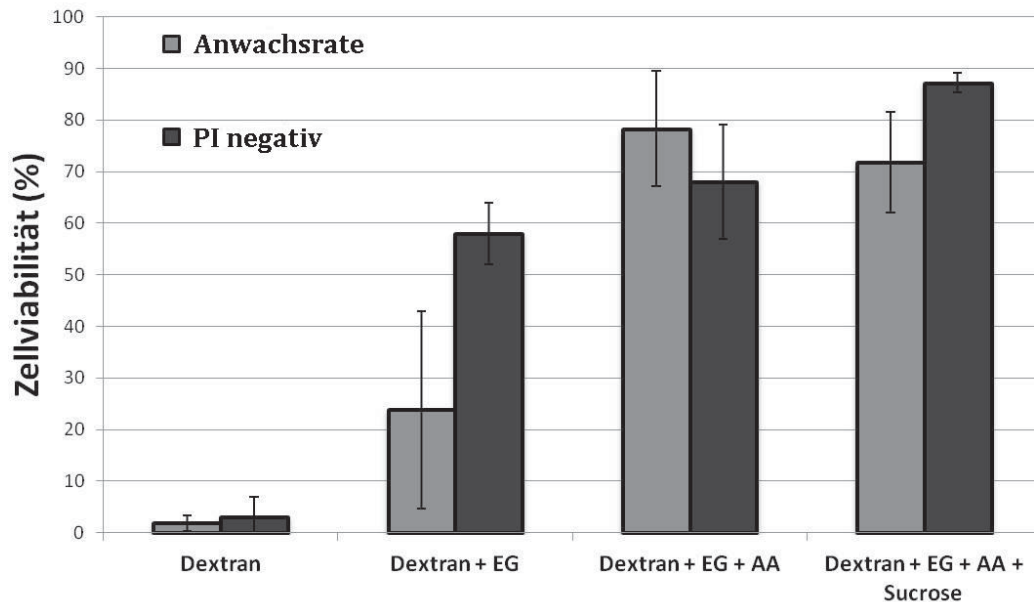


Abb. 4.22: Überlebensraten von HeLa-Zellen in Dextran in Kombination mit weiteren Kryoprotektiva nach SPRF

HeLa-Zellen wurden in den angegebenen Kryoprotektiva mittels SPRF gefroren und ihre Viabilität mittels Anwachsrate bestimmt. Außerdem wurde die Membranintegrität direkt nach dem Auftauen mittels PI Färbung quantifiziert. Alle Medien wurden auf Basis von PBS hergestellt. Dextran: 30%; EG: Ethylenglykol 10%; AA: Acetamid 10,7%; Sucrose: 0,5M; N=5

4.8 SPRF bringt Vorteile gegenüber etablierten Vitrifikationstechniken

Aufgrund der starken Optimierungen am SPRF-Protokoll, wie ungiftigen Hüllmaterialien und angepassten Kryoprotektiva, konnte eine sehr hohe Überlebensrate nach Kryokonservierung erzielt werden. Diese Überlebensrate wurde nun mit etablierten Vitrifikationsmethoden verglichen. Außerdem sollen Unterschiede bezüglich der praktischen Anwendung der Methoden für die Kryokonservierung beleuchtet werden. Die drei aktuell gebräuchlichsten Vitrifikationsmethoden für die Kryokonservierung menschlicher und tierischer Zellen sind der *french mini straw* (mini straw), *open pulled straw* (OPS) und *cryotop* (Abb 4.23).

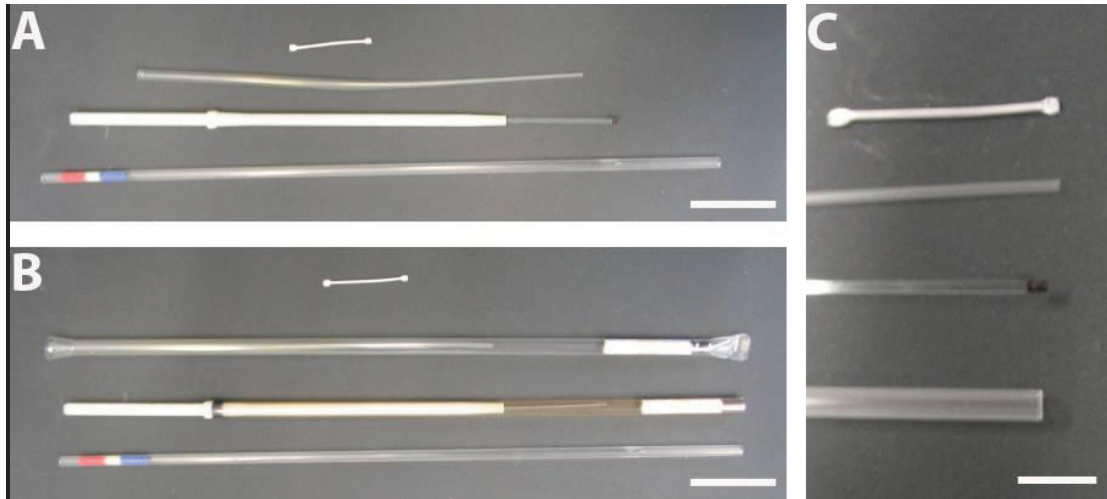


Abb. 4.23: Verschiedene Vitrifikations Apparate im Größenvergleich

Gezeigt sind je von oben nach unten ein SPRF-Röhrchen, ein *open-pulled straw*, ein *cryotop* und ein *french mini straw*. In **A** sind die Vorrichtungen zur Probenaufnahme dargestellt. **B** zeigt die Vorrichtungen, wie sie in flüssigem Stickstoff mit gegebenenfalls vorhandener Hülle gelagert werden. In **C** sind die Bereiche vergrößert dargestellt, die mit der Probe beladen werden. Maßstabsbalken: **A,B**: 15mm; **C**: 5mm

Der *mini straw* wurde aufgrund seines relativ geringen Volumens von 0,25mL für die Vitrifikation herangezogen, bevor es speziellere Systeme gab (Rall & Fahy, 1985; Vajta et al., 1995). OPS und *cryotop* sind offene Systeme. Der direkte Kontakt der Probe mit flüssigem Stickstoff soll die Kühlrate erhöhen (Iwayama et al., 2004; Vajta et al., 1998). Beim *cryotop* liegt die Probe dabei weitgehend frei auf einem Kunststoffsteg, im OPS befindet sie sich in einer offenen Kapillare. Das Plastik, von dem die Probe im *mini straw* vollständig und im OPS größtenteils umgeben ist, hat im Vergleich zu den hier im SPRF verwendeten Metallen eine sehr geringe Temperaturleitfähigkeit (Tabelle 4.1). Dies lässt vermuten, dass die Abkühlraten durch die Verwendung von Metall noch gesteigert werden können. Im *cryotop* liegt die Probe weitgehend frei und kommt an einem Großteil ihrer Oberfläche mit dem flüssigen Stickstoff in Berührung. Hier ist kaum vorherzusagen, wie sich die Abkühlung im Vergleich zu dem wesentlich größeren SPRF-Röhrchen, welches in flüssigem Ethan gekühlt wird, verhält.

Tabelle 4.1: Temperaturleitfähigkeiten der verwendeten Materialien

Material	Verwendet in	Temperaturleitfähigkeit (mm ² /s)
Plastik	mini straw/OPS	0,1*
Aluminium	SPRF	98,8**
Silber	SPRF	173**
Kupfer	SPRF	117**

* berechnet von (He, Park, Fowler, Yarmush, & Toner, 2008)

** entnommen von <http://de.wikipedia.org/wiki/temperaturleitfähigkeit>

Ein Reaktivierungstest der Zellen zeigt sowohl für Zellen in EAFS- als auch in DES-Medium, dass Kryokonservierung in *mini straw* und OPS zu signifikant niedrigeren Überlebensraten führen als in *cryotop* und SPRF (Abb 4.24 A). Die Überlebensraten nach Vitrifikation mit SPRF und *cryotop* sind vergleichbar und sehr hoch. Es ist schwierig eine Aussage darüber zu treffen, ob eine der beiden Methoden besser ist. Begründet ist dies dadurch, dass die Überlebensraten in keinem Fall über 100% sein können und zudem wird die Überlebensrate durch Präparationsschritte wie die Trypsin-Behandlung, das Zentrifugieren und das Befüllen des Röhrchens begrenzt. Dadurch ist der dynamische Bereich für das Messen hoher Überlebensraten sehr gering. Um herauszufinden, welche der beiden Methoden besser für die Vitrifikation geeignet ist, wurde nun das DES-Medium verdünnt, um durch niedrigere Überlebensraten in einem besseren dynamischen Bereich analysieren zu können. Ein signifikanter Unterschied zwischen *cryotop* und SPRF konnte allerdings auch hier nicht festgestellt werden (Abb 4.24 B).

Die Probe muss für das *cryotop* sehr klein sein (typischerweise $<0,1\mu\text{L}$; bis zu $0,5\mu\text{L}$ sind praktisch auf die Spitze zu pipettieren). Das Volumen der Probe im SPRF in den Dimensionen, die hier verwendet wurden, ist kleiner als das des *mini straws* und des OPS aber wesentlich größer als das des *cryotops* (Tabelle 4.2). OPS und *cryotop* sind auf einen Griff und eine Hülle angewiesen. Der *mini straw* ist viel größer als das SPRF Röhrchen, kann aber nicht vollständig mit Zellsuspension gefüllt werden, um gute Überlebensraten zu erzielen (Vajta et al., 1995). Deshalb weist SPRF eine deutlich höhere Rate von vitrifiziertem Volumen pro verwendetem Stauraum im flüssigen Stickstoff auf als die anderen Apparaturen (Tabelle 4.2). Das SPRF-Röhrchen benötigt, um die gleiche Probenmenge aufzunehmen, ca. 100fach weniger Stauraum als der OPS und ca. 1000x weniger als der *cryotop*.

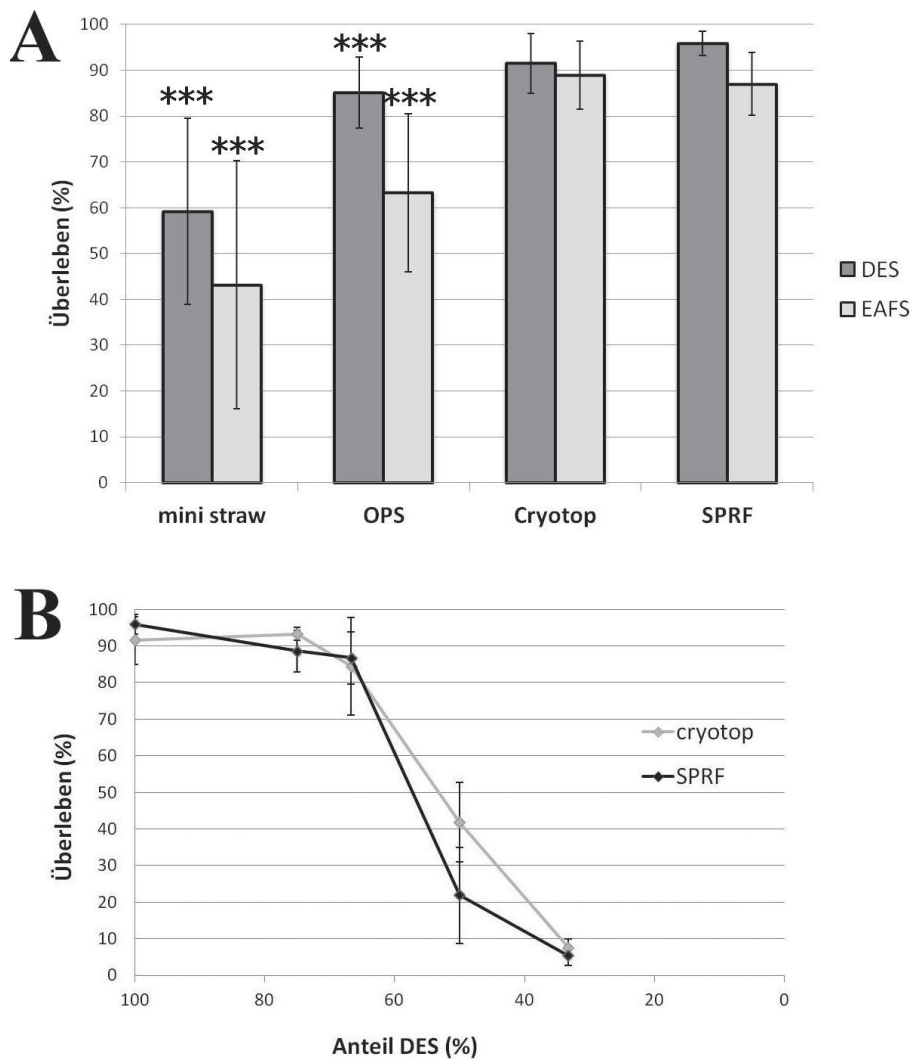


Abb 4.24: Überlebensraten von HeLa-Zellen nach Vitrifikation in EAFS- und DES-Medium in verschiedenen Vitrifikationsapparaturen

A Überlebensraten von HeLa-Zellen nach Vitrifikation in EAFS und DES in *mini straw*, OPS, *cryotop* und mittels SPRF. Die Überlebensraten wurden anhand der Rekultivierbarkeit der Zellen gemessen. ***: $p < 0.001$ gegenüber SPRF; N=15 **B** Überlebensraten von HeLa-Zellen in Verdünnungen von DES Medium in PBS nach Vitrifikation mittels *cryotop* und SPRF. N=5

Tabelle 4.2: Probengrößen der verschiedenen Vitrifikationsmethoden im Vergleich zu eingenommen Lagervolumen

Dargestellt sind die Größen der gefrorenen Probe/Zellsuspension im Vergleich zum Stauraum, der im flüssigen Stickstoff als Stauraum benötigt wird.

	Probengröße (µL)	Gesamtvolumen im Stickstoff (µL)	Probe / Gesamtvolumen
mini straw	4*	350	1,1%
OPS	~2	810	0,25%
cryotop	0,1-0,5	790	0,013-0,063%
SPRF	1**	4	25%

* Volumen, wie es in den hier gezeigten Versuchen eingefroren wurde und in der Literatur als optimal für diese Methode ermittelt wurde (Vajta et al., 1995), mini straw fasst mehr Volumen

** Volumen, wie es in den Testversuchen durchgeführt wurde, es könnten größere Röhren verwendet werden

4.9 Überlebensraten nach SPRF sind unabhängig vom Druckaufbau

Wie der Name „*self-pressurized rapid freezing*“ schon impliziert, gehen die Erfinder der Methode davon aus, dass sich innerhalb des SPRF-Röhrchens ein Druck aufbaut, welcher dann die Vitrifikation unterstützt bzw. erst ermöglicht (Leunissen & Yi, 2009). Um zu überprüfen, ob dieser Druck ein entscheidender Faktor für das Überleben der Zellen ist, wurden Zellen in geschlossenen sowie offenen Röhrchen kryokonserviert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Überlebensraten in offenen Röhrchen sich nicht signifikant von denen in geschlossenen Röhrchen unterscheiden (Abb 4.25). Dies gilt für die Membranintegrität direkt nach dem Auftauen, getestet durch Propidiumiodid (PI) Färbung, als auch für die Wiederanwachsrate der Zellen. Da der Druck durch das begrenzte Volumen des geschlossenen Röhrchens aufgebaut werden soll (Leunissen & Yi, 2009), ist davon auszugehen, dass er für die Kryokonservierung keine entscheidende Rolle spielt.

Da die offenen Röhrchen nicht im Wasserbad aufgetaut werden konnten, wurden alle Röhrchen für diesen Versuch direkt in dem Medium aufgetaut, in dem sie später kultiviert wurden. Die Auftaumethode ist somit dieselbe, die auch schon zum Auftauen der Zellen nach HPF verwendet wurde. Analog zu diesen Experimenten sind auch hier die Anwachsrate relativ gering (vergl. Abb 4.6). Die geringe Anwachsrate ist demzufolge durch die ineffektive Auftaurate zu erklären.

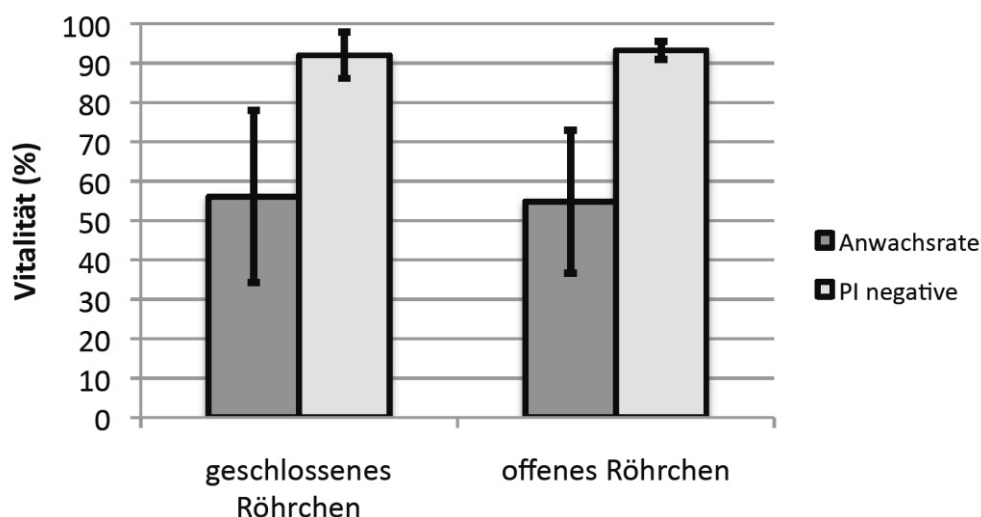


Abb 4.25: Überlebensraten von HeLa-Zellen nach Vitrifikation in geschlossenen und offenen Aluminium Röhrchen

HeLa-Zellen wurden in geschlossenen und offenen Aluminium-Röhrchen (Außendurchmesser 0,6mm; Innendurchmesser 0,3mm; Länge 1,5cm) durch *plunge freezing* in flüssigem Ethan vitrifiziert. Nach dem Auftauen wurde die Anwachsrate der Zellen, sowie die Membranintegrität mittels PI-Färbung bestimmt.

4.10 Temperaturleitfähigkeit des SPRF-Röhrchens und Temperatureaufnahme des Kühlmediums liegen im Optimum für das Zellüberleben

Die theoretisch höchste Einfriergeschwindigkeit, wird stark durch die Temperaturleitfähigkeit des Hüllmaterials des SPRF-Röhrchens beeinflusst. Je höher die Temperaturleitfähigkeit, desto schneller wird Wärme aus der Probe heraus transportiert. Die Einfriergeschwindigkeit wird allerdings auch durch die Geometrie der Probe begrenzt und ist ab einem, durch die Geometrie bestimmten, Limit durch die Materialeigenschaften kaum mehr steigerbar (He et al., 2008). Die Temperaturleitfähigkeit von Silber ist fast doppelt so hoch im Vergleich zu Aluminium (vergl. Tabelle 4.1). Aus Abb. 4.26 ist zu erkennen, dass die Überlebensraten durch die Verwendung von Silberröhrchen anstatt von Aluminiumröhrchen dennoch nicht mehr gesteigert werden konnten. Dies gilt sowohl für die Medien DES und EAFS mit denen hohe Überlebensraten erzielt werden konnten, als auch für ein Medium aus 10% Ethylenglykol in 30% Dextran, ein Medium mit dem nur geringe Überlebensraten erzielt werden können. Dieses Medium wurde zusätzlich getestet, da hier mehr Spielraum für die Verbesserung der Überlebensraten vorhanden ist. Der Aufenthalt in Silberröhrchen ist analog zu Aluminiumröhrchen bei Raumtemperatur nicht giftig für die Zellen (Abb. 4.26B).

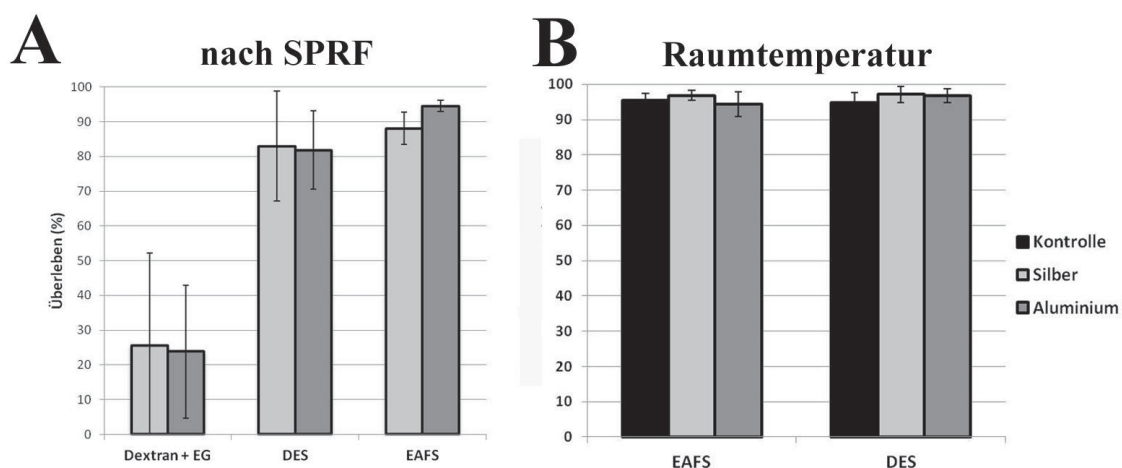


Abb. 4.26: Überlebensraten von HeLa-Zellen in Silber- und Aluminiumröhrchen nach SPRF und bei Raumtemperatur

Die Überlebensraten gemessen an der Wiederkultivierbarkeit von HeLa-Zellen nach SPRF in DES, EAFS sowie 10% Ethylenglykol in 30% Dextran sind dargestellt (A), sowie die Überlebensraten nach 5min Aufenthalt in den entsprechenden Röhrchen bei Raumtemperatur (B). Als Kontrollen dienten Zellen der entsprechenden Passagen, die nicht in ein Röhrchen gefüllt wurden. N=5

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich bei der gegebenen Geometrie keine starke Verbesserung der Abkühlrate durch Materialien mit höheren Temperaturleitfähigkeiten erzielen lässt.

Beim SPRF werden die Röhrchen in flüssiges Ethan bei -183°C eingetaucht. Das Ethan wird durch flüssigen Stickstoff gekühlt. Dadurch wird das Filmsieden (Leidenfrost-Phänomen) verhindert, welches auftritt, wenn Gegenstände von Raumtemperatur in flüssigen Stickstoff getaucht werden. Es ist bekannt, dass die Abkühlrate durch diese Vermeidung des Filmsiedens deutlich erhöht wird, obwohl die Temperatur etwas höher liegt als die von flüssigem Stickstoff (-196°C) (J. Dubochet & McDowall, 1981; Jacques Dubochet, 2012). Um herauszufinden, ob die Abkühlrate in Ethan schon am Maximum liegt, wurden auch Röhrchen direkt in Flüssigstickstoff gefroren. Es wurde eine Verdünnungsreihe des DES-Mediums vorgenommen, um die Überlebensraten in einen guten dynamischen Bereich messen zu können. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Überlebensraten zwischen Frieren in flüssigem Ethan und Frieren in flüssigem Stickstoff festgestellt werden (Abb 4.27).

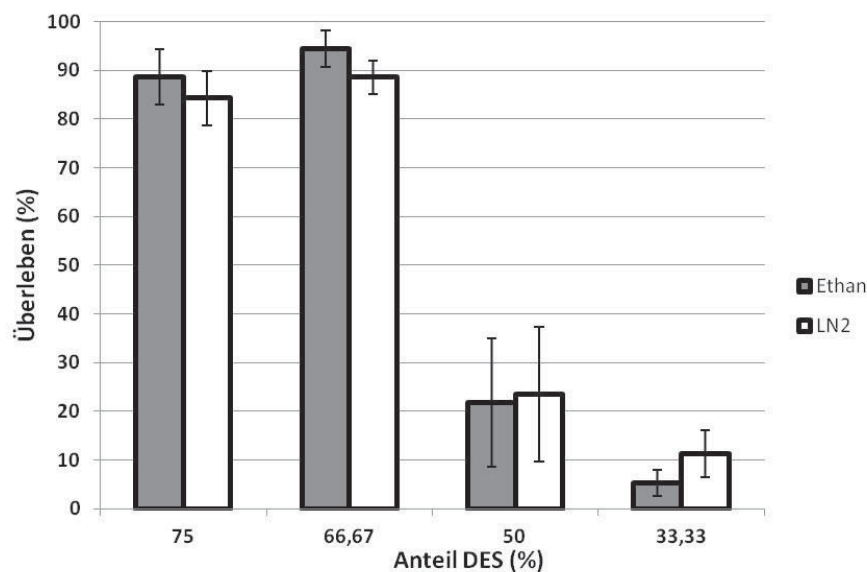


Abb. 4.27: Überlebensraten von HeLa-Zellen nach SPRF in Flüssig-Ethan und Flüssig-Stickstoff

HeLa-Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen von DES in PBS dem SPRF unterzogen. Die Aluminium Röhrchen wurden dabei entweder in flüssiges Ethan (grau) oder in flüssigen Stickstoff (LN2/weiss) gekühlt. Die Überlebensrate der Zellen wurde anhand der Re-Kultivierbarkeit bestimmt. N=4

4.11 Extra- und Intrazelluläre Eiskristallbildung ist nicht zwingend letal für Zellen

Dass Zellen das SPRF in Dextran nicht überleben, obwohl sie vitrifiziert werden (vergl. Kap. 4.4) zeigt, dass Vitrifikation nicht *ausreichend* für Zellüberleben während der Kryokonservierung ist. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob Vitrifikation überhaupt *notwendig* für Zellüberleben während der Kryokonservierung ist. In der Kryobiologie hat sich der Konsens herausgebildet, dass intrazelluläre Vitrifikation notwendig für das Zellüberleben ist und intrazelluläre Eiskristallbildung generell letal ist (Mazur & Seki, 2011; Pegg, 2002, 2007; Seki & Mazur, 2009, 2012). Zusätzlich ist der Begriff der Vitrifikation für Kryokonservierungsprotokolle so definiert, dass sowohl extra- als auch intrazelluläre Vitrifikation vorausgesetzt wird. Dies wird als entscheidend für eine erfolgreiche Kryokonservierung unter schnellen Einfrierraten angesehen (Pegg, 2007; Rall & Fahy, 1985; Seki & Mazur, 2012; Wowk, 2010).

Um die Eiskristallbildung direkt mit hoher räumlicher Auflösung analysieren zu können, soll an dieser Stelle Kryoelektronenmikroskopie als höchstauflösende mikroskopische Technik verwendet werden. Da sich einige der verwendeten Medien nicht bei Kryotemperaturen für die CEMOVIS-Analyse schneiden lassen (Dr. Hongmei Han, unpublizierte Ergebnisse), wird hier die Kryoelektronenmikroskopie von *plunge-frozen* Zellen angewandt. Dafür werden HeLa-Zellen direkt auf Elektronenmikroskopie-Netzchen kultiviert und diese dann mit *plunge-freezing* kryofixiert. Auf diese Weise lassen sich Randbereiche der Zellen und das sie umgebende extrazelluläre Medium elektronenmikroskopisch untersuchen. Die jeweilige Phase, in der sich das Wasser dort befindet, lässt sich mit hoher räumlicher Auflösung direkt mit Elektronendiffraktion darstellen (Abb. 4.29). Auf diese Weise lässt sich nachweisen, dass intra- und extrazellulärer Raum in allen Bereichen, die analysierbar sind (bis ca. 1µm Dicke), komplett vitrifiziert sind, selbst ohne die Verwendung von Kryoprotektiva. Da hier die Korrelation von Eiskristallbildung und Zelltod untersucht werden soll, wurde ein Protokoll zur Induktion der Eiskristallbildung entwickelt. Die zellbewachsenen Elektronenmikroskopie-Netzchen wurden für 30s zu verschiedenen Temperaturen unter dem Schmelzpunkt von Wasser aufgewärmt und anschließend vor der Analyse der Eiskristallbildung wieder abgekühlt (Abb.4.28). Da gegebenenfalls entstandene Eiskristalle die thermodynamisch

stabilere Form des Wassers sind, bleiben sie auch beim anschließenden Abkühlen erhalten.

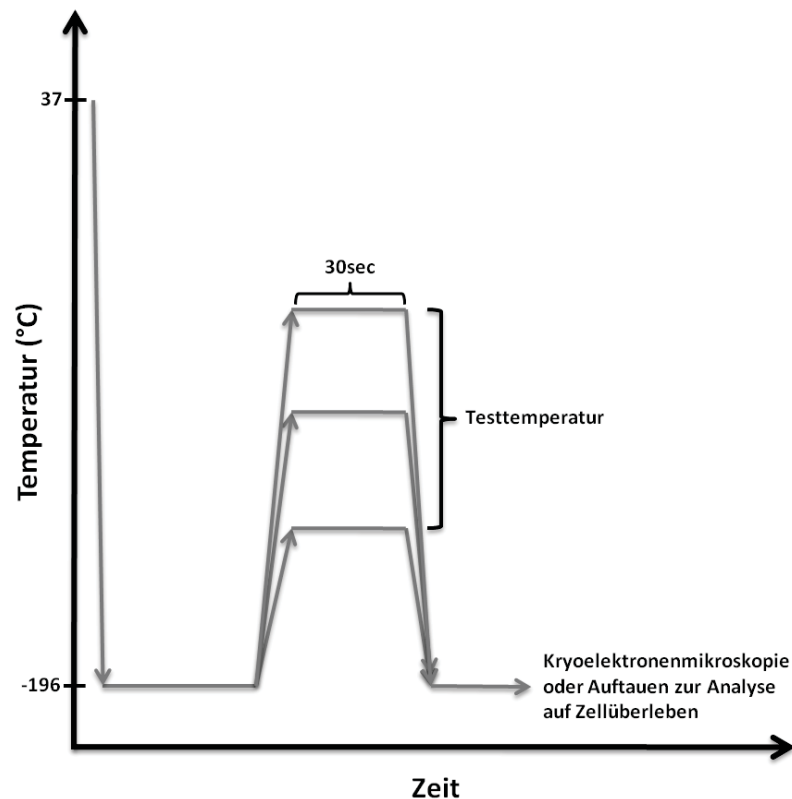
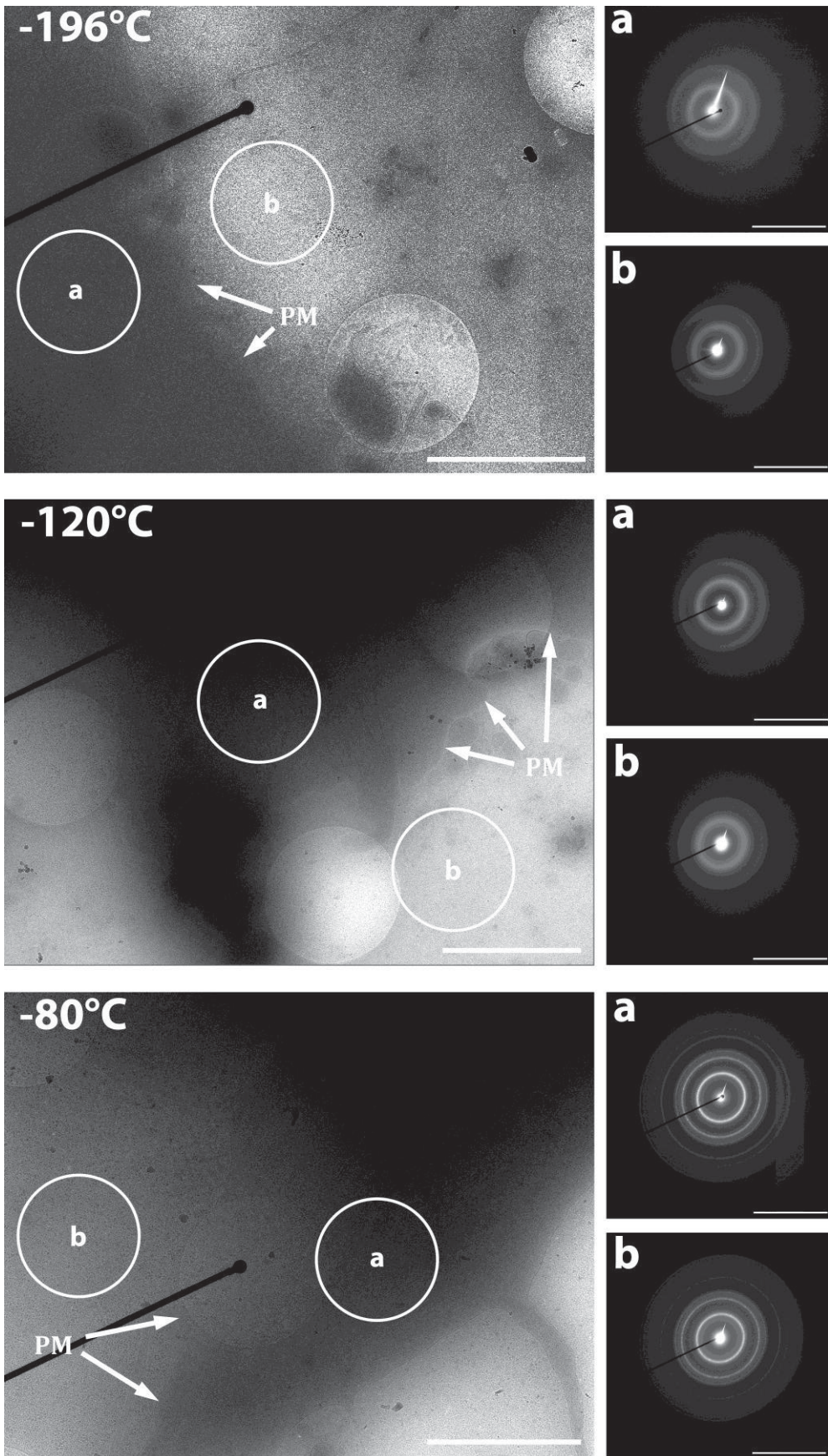


Abb. 4.28 Protokoll zur Induktion von Eiskristallbildung

Die Elektronenmikroskopie-Netzchen wurden durch *plunge-freezing* so schnell wie möglich abgekühlt und im flüssigen Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Zur Induktion der Eiskristallbildung wurden sie 30s zu verschiedenen Testtemperaturen erwärmt und anschließend wieder in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Zum Aufwärmen wurden die Netzchen direkt auf einen auf die Testtemperatur vortemperierten Metalblock transferiert. Zum Abkühlen wurden sie wieder direkt in den Stickstoff überführt.

In Abbildung 4.29 sind die resultierenden Eisphasen nach diesem Protokoll für Zellen ohne Kryoprotektiva zu sehen. Nach 30s bei -120°C , der Glasübergangstemperatur von Wasser, wurde noch keine Eiskristallbildung detektiert (Abb. 4.29). Nach -80°C ist die Probe hingegen durchkristallisiert, ein vitrifizierter Anteil ist nicht zu erkennen. Repräsentiert wird dieses kristalline Eis durch die scharfen Ringe in den Diffraktogrammen. Durch den Abstand der Ringe zum Zentrum lässt sich schließen, dass hier hexagonales Eis vorhanden ist. Es lässt sich nicht ausschließen, dass auch kubisches Eis vorhanden ist, da kubisches Eis durch weniger Ringe repräsentiert wird, diese Ringe kommen allerdings alle auch in Diffraktogrammen hexagonaler Kristalle vor (Jaques Dubochet et al., 1988).



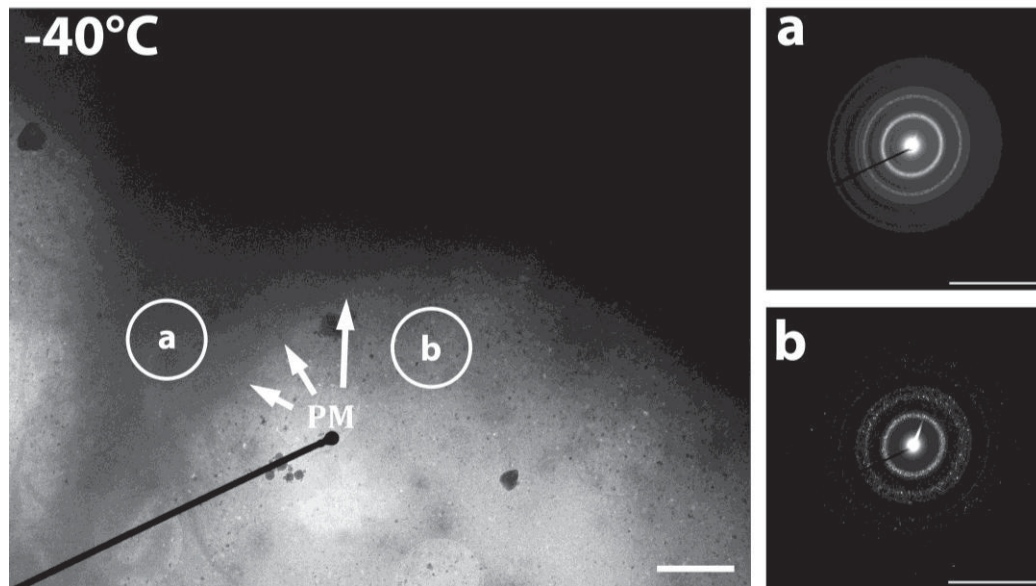


Abb. 4.29: Kryo-elektronenmikroskopische Analyse der Eisphasen in HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* und Aufwärmen zu verschiedenen Temperaturen

Gezeigt sind Ausschnitte von adhärennten HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* und Messungen der Wasserphasen durch Elektronendiffraktion in den eingekreisten Bereichen (a: intrazellulär, b: extrazellulär). Die Zellen wurden für 30s zu den angegebenen Temperaturen (-120°C/-80°C/-40°C) erwärmt und wieder auf -196°C abgekühlt oder bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff gehalten (-196°C). Die unscharfen Ringe (-196°C a,b & -120°C a,b) repräsentieren vitrifizierte Bereiche. Die scharfen Ringe (-80°C a,b und -40°C a,b) zeigen kristalline Bereiche. Haben die Ringe eine fleckigere Erscheinung, so bedeutet dies, dass weniger und potentiell größere Kristalle in dem Bereich zu finden sind (-40°C b). Alle Bilder sind repräsentativ aus Messungen an mindestens 15 Zellen aus mindestens 3 verschiedenen Experimenten. PM: Plasmamembran

Maßstäbe: 2µm für Transmissionsbilder; 1/0,11nm für Diffraktionsaufnahmen

Die Kristalle, die durch Eiskristallinduktion bei -80°C entstanden sind, sind im Transmissionsmodus des Elektronenmikroskops nur schwer, wenn überhaupt, erkennbar (Abb. 4.29). Nach 30s bei -40°C wiederum sind die Kristalle deutlich im Transmissionsmodus zu erkennen. Die Diffraktionsmuster zeigen zudem eher gepunktete als geschlossene Ringe (Abb. 4.29). Sind genügend kleine Kristalle in unterschiedlicher Orientierung vorhanden, so vereinen sich die Punkte ihrer Diffraktionsmuster zu scharfen Ringen. Sind es weniger Kristalle so werden die distinkten Punkte der einzelnen Kristalle sichtbar. Folglich sind nach 30s bei -40°C weniger Kristalle in den einzelnen Messfeldern detektiert worden, als bei -80°C. Das deutete darauf hin, dass hier bereits eine Rekristallisierung zu weniger, aber dafür größeren, Kristallen stattgefunden hat.

Analog zum SPRF ist auch das *plunge-freezing* für HeLa-Zellen ohne Kryoprotektiva zu 100% letal. Zellen in Dextran-, EAFS- oder DE-Medium überleben jedoch das *plunge-freezing* (Abb. 4.30). In diesen Medien wurde jetzt zunächst das Überleben der Zellen nach Induktion der Eiskristallbildung – nach dem Protokoll aus Abb. 4.28 –

bestimmt, um dies später mit der, durch Kryoelektronenmikroskopie analysierten, Phase des Wassers aus ebenso behandelten Zellen zu vergleichen. So kann ein direkter Vergleich des Überlebens und der Eisphasen aus absolut gleich behandelten Zellen gezogen werden. Allerdings ist es mit dieser Methode nicht möglich das Überleben der Zellen zu quantifizieren. Der Film wird durch die Behandlung an vielen Stellen zerstört, so dass Zellen in diesen Bereichen möglicherweise abgelöst werden. Tote Zellen lösen sich zum Großteil ab, gehen im Medium verloren und sind nicht mehr quantifizierbar (Abb. 4.30). Um das Überleben zu quantifizieren, die Bedingungen aber möglichst vergleichbar zu halten, wurden die Zellen mit SPRF gefroren. Die Eisbildung wurde analog zum *plunge freezing* – durch Erwärmung für 30s zu den angegebenen Temperaturen – induziert. Durch die höhere Zellzahl, die hierbei gefroren wurde, konnten tote und lebende Zellen verlässlich quantifiziert werden (Abb 4.31). Aus dem Vergleich von Abb. 4.30 & 4.31 ist ersichtlich, dass beide Analysen qualitativ zum selben Ergebnis kommen. Sind unter einer Bedingung alle Zellen nach *plunge freezing* tot, so gilt das auch nach SPRF. Gibt es überlebende Zellen nach *plunge freezing*, so gibt es sie auch nach SPRF.

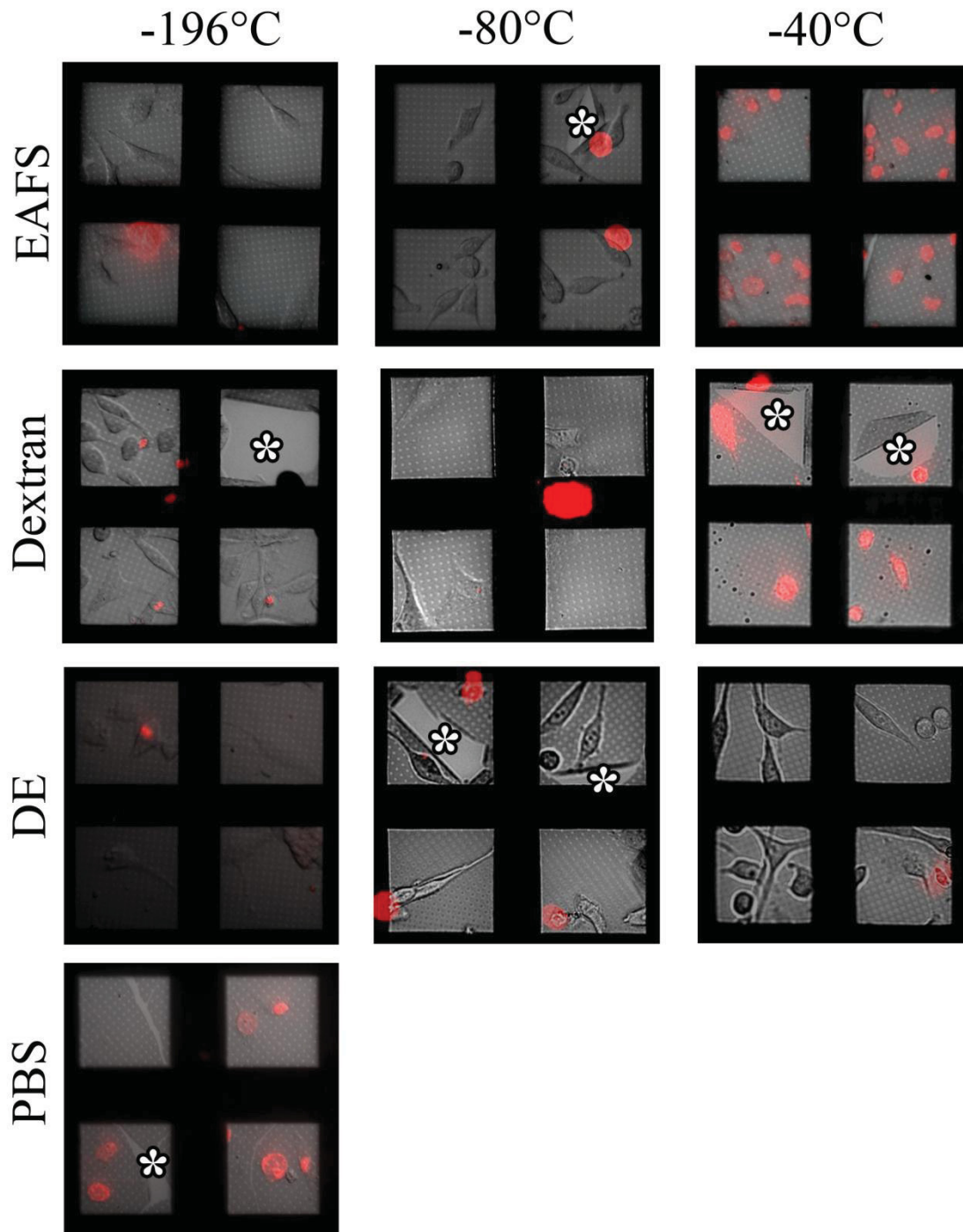


Abb. 4.30: PI-Färbung von HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* und anschließendem Auftauen

HeLa-Zellen wurden in den angegebenen Medien gefroren (*plunge-freezing*) und für 30s zu den angegebenen Temperaturen aufgewärmt, wieder in flüssigem Stickstoff abgekühlt und anschließend in vorgewärmtem Zellkulturmedium bei 37°C aufgetaut. Nach 12h Kultur wurden die Zellen PI gefärbt und mikroskopisch analysiert.

Sternchen markieren Stellen, an denen der Film auf den Netzchen gerissen ist.

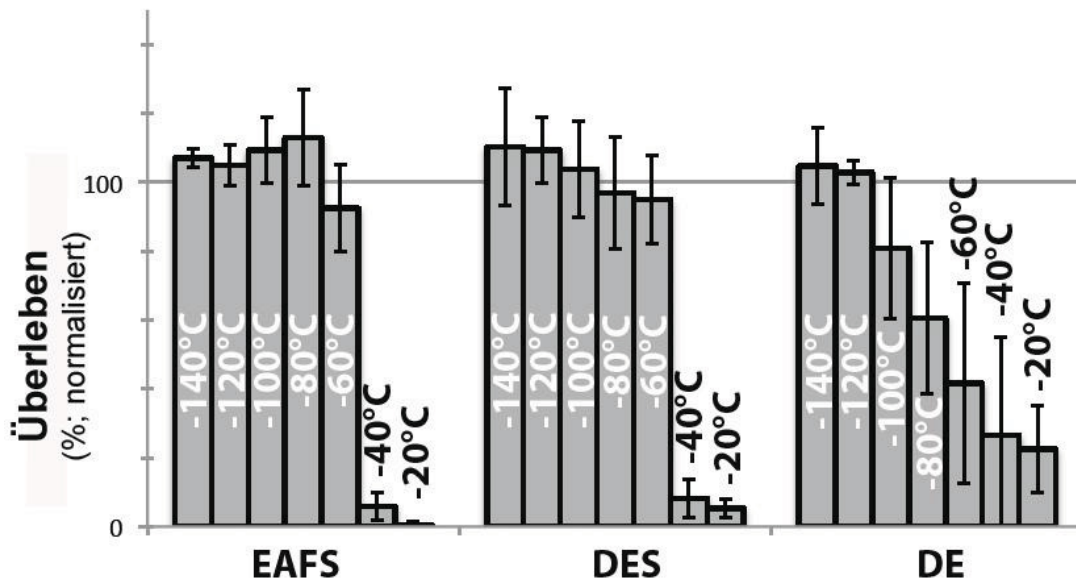


Abb. 4.31: Überlebensraten von HeLa-Zellen nach SPRF-Kryokonservierung, Aufwärmen auf höhere Temperaturen und Auftauen zu verschiedenen Temperaturen

Gezeigt sind die Überlebensraten von HeLa-Zellen die in den angegebenen Medien mit SPRF gefroren, dann für 30s zu den angegebenen Temperaturen aufgewärmt und anschließend aufgetaut wurden. Das Überleben wurde anhand der Wiederkultivierbarkeit gemessen und ist zur besseren Übersichtlichkeit normalisiert auf das Überleben von Zellen der jeweiligen Passage die nach SPRF direkt aus flüssigem Stickstoff aufgetaut wurden. Die absoluten Überlebensraten sind in Abb. 4.6 und 4.12 zu sehen. N=12

4.11.1 EAFS

In EAFS gibt es praktisch keine Überlebenden mehr nach 30s bei -40°C nach beiden Methoden. Nach 30s bei -80°C hingegen ist das Überleben gegenüber den Kontrollen, bei denen keine Eiskristallbildung induziert wurde, nicht reduziert (Abb. 4.30 & 4.31).

Schaut man sich die Eisphasen von Zellen in EAFS nach 30s bei -80°C an, so sieht man zwei unscharfe Ringe, die typisch für vitrifiziertes Eis sind. Zusätzlich sieht man aber auch einige wenige scharfe Punkte, die kristallines Eis repräsentieren. Im Transmissionsmodus des Elektronenmikroskops ist zu erkennen, dass diese von unregelmäßig verteilten dunklen Kristallen kommen (Abb. 4.32).

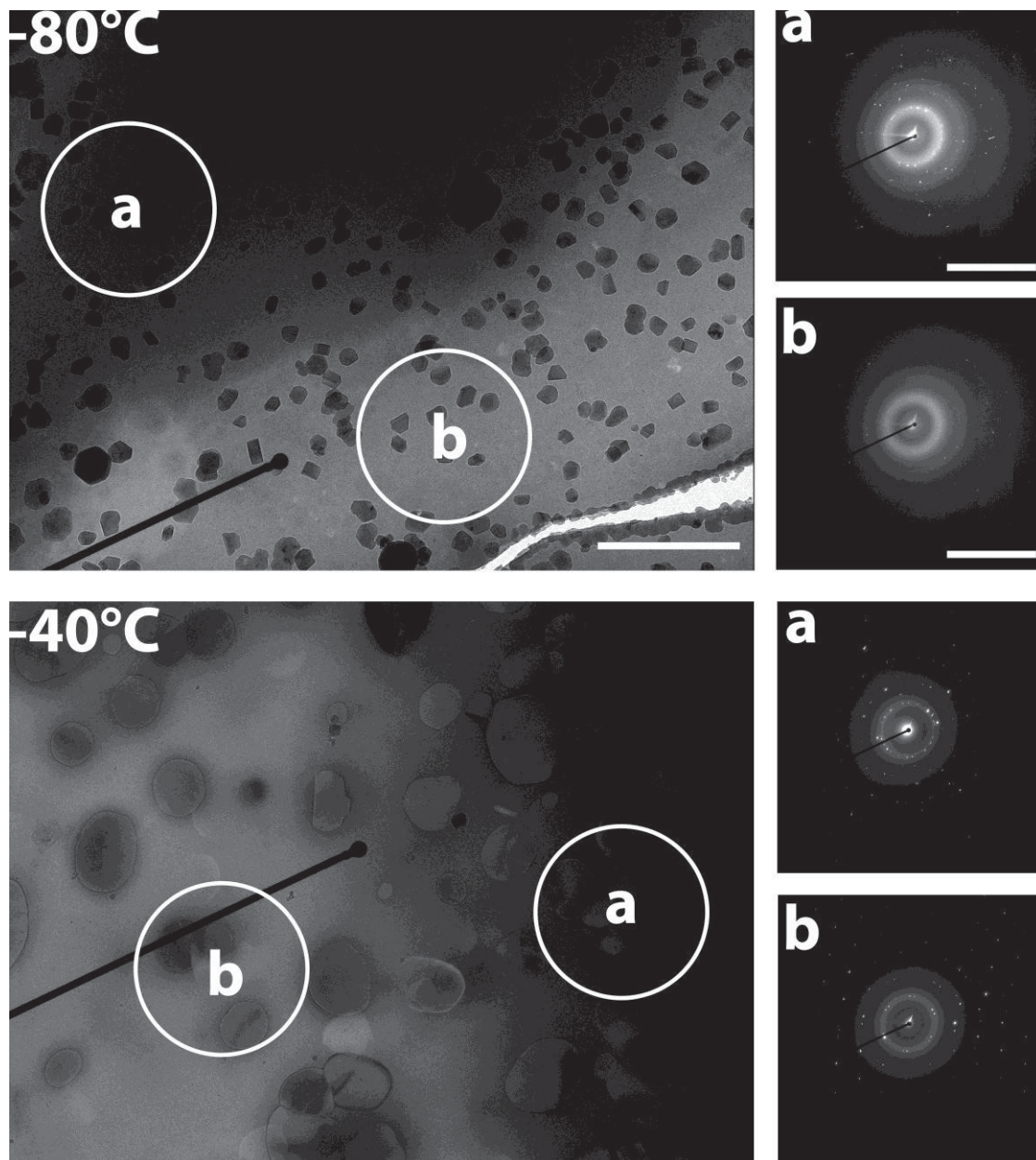


Abb. 4.32: Kryo-elektronenmikroskopische Analyse der Eisphasen in HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* in EAFS und Aufwärmen auf -80°C bzw. -40°C

Gezeigt sind Ausschnitte von adhärennten HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* in EAFS Medium und Messungen der Wasserphasen durch Elektronendiffraktion in den eingekreisten Bereichen (a: intrazellulär, b: extrazellulär). Die Zellen wurden für 30s zu den angegebenen Temperaturen ($-80^{\circ}\text{C}/-40^{\circ}\text{C}$) erwärmt. Die unscharfen Ringe in den Diffraktionsbildern repräsentieren vitrifizierte Anteile, die distinkten Punkte stammen von Eiskristallen. Alle Bilder sind repräsentativ aus Messungen an mindestens 15 Zellen aus mindestens 3 verschiedenen Experimenten.

Maßstabsbalken: $2\mu\text{m}$ für Transmissionsbilder; $1/0,11\text{nm}$ für Diffraktionsaufnahmen

Die Eiskristalle bei -80°C sind in den zweidimensionalen elektronenmikroskopischen Bildern sowohl in den Bereichen der Zellen als auch um sie herum zu sehen. Aus diesen Bildern ist nicht zu erkennen, ob die Eiskristalle in den Zellen sind, da sie auch darüber und darunter liegen könnten. Um dies heraus zu finden, wurden elektronentomographische Kippserien aufgenommen und

rekonstruiert. In den Rekonstruktionen ist klar zu erkennen, dass die Eiskristalle außerhalb der Zellen liegen (Abb. 4.33)

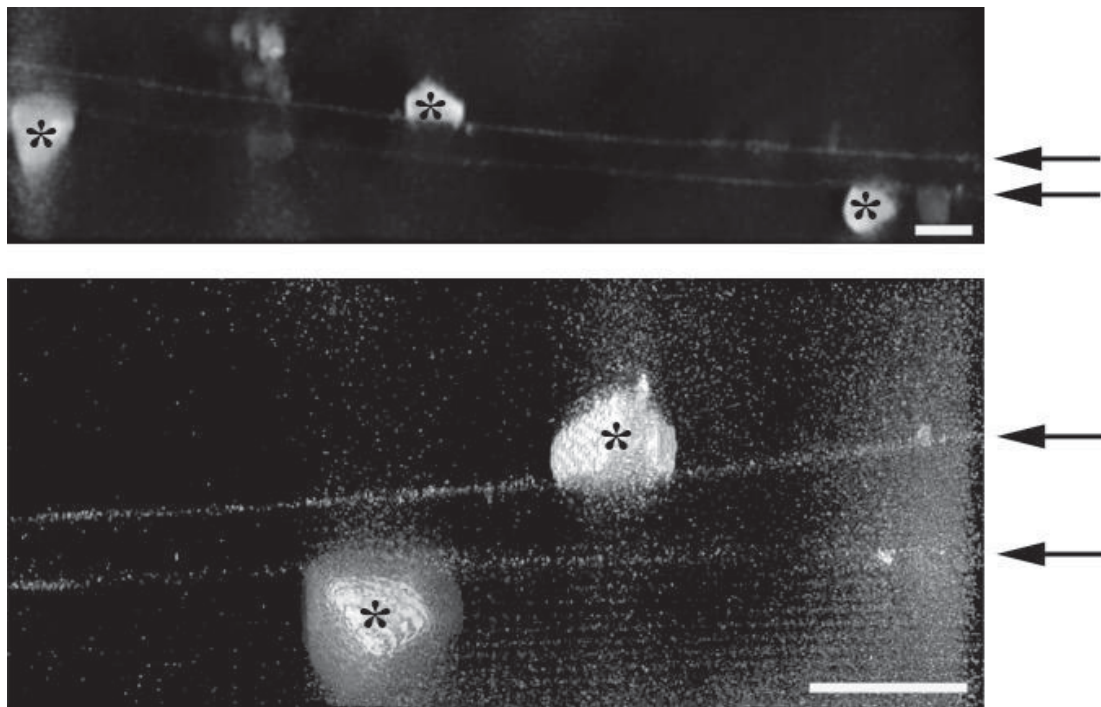


Abb. 4.33: Dreidimensionale Rekonstruktion Kryo-elektronenmikroskopischer Aufnahmen von HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* in EAFS und Aufwärmen auf -80°C

Gezeigt sind Ausschnitte von tomographischen Rekonstruktionen der HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* in EAFS-Medium und Aufwärmen für 30s auf -80°C . Gezeigt ist die Seitenansicht auf die Zelle. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Rekonstruktionen mit invertiertem Kontrast dargestellt. Pfeile deuten auf die Ober- und Untergrenze der vitrifizierten Schicht, die die Zellen enthält; Asteriske markieren die Eiskristalle; Originalvergrößerung für die Bildserien war 19000x; Maßstabsbalken 300nm

Bei -40°C zeigen die Diffraktogramme ebenfalls Kristalle auf vitrifiziertem Hintergrund. Die Transmissionselektronenmikroskopischen Bilder zeigen, dass die Kristalle deutlich größer sind. Außerdem erscheinen hier nicht alle Kristalle dunkel, sondern einige heller, als die Umgebung (Abb. 4.32). Auch von diesen Proben wurden Elektronentomographien aufgenommen. Eine Rekonstruktion in ein dreidimensionales Volumen wie in Abb. 4.33 ist aufgrund der starken Interferenzmuster von den Kristallen jedoch nicht möglich. Allerdings sieht man schon in der stereoskopischen Analyse, dass sich die hellen Kristalle beim Kippen der Probe nicht weg bewegen, die dunklen Kristalle jedoch schon (Abb. 4.34). Dies zeigt ebenfalls, dass die hellen Kristalle wirklich in der Ebene der Zellen liegen und nicht darauf oder darunter.

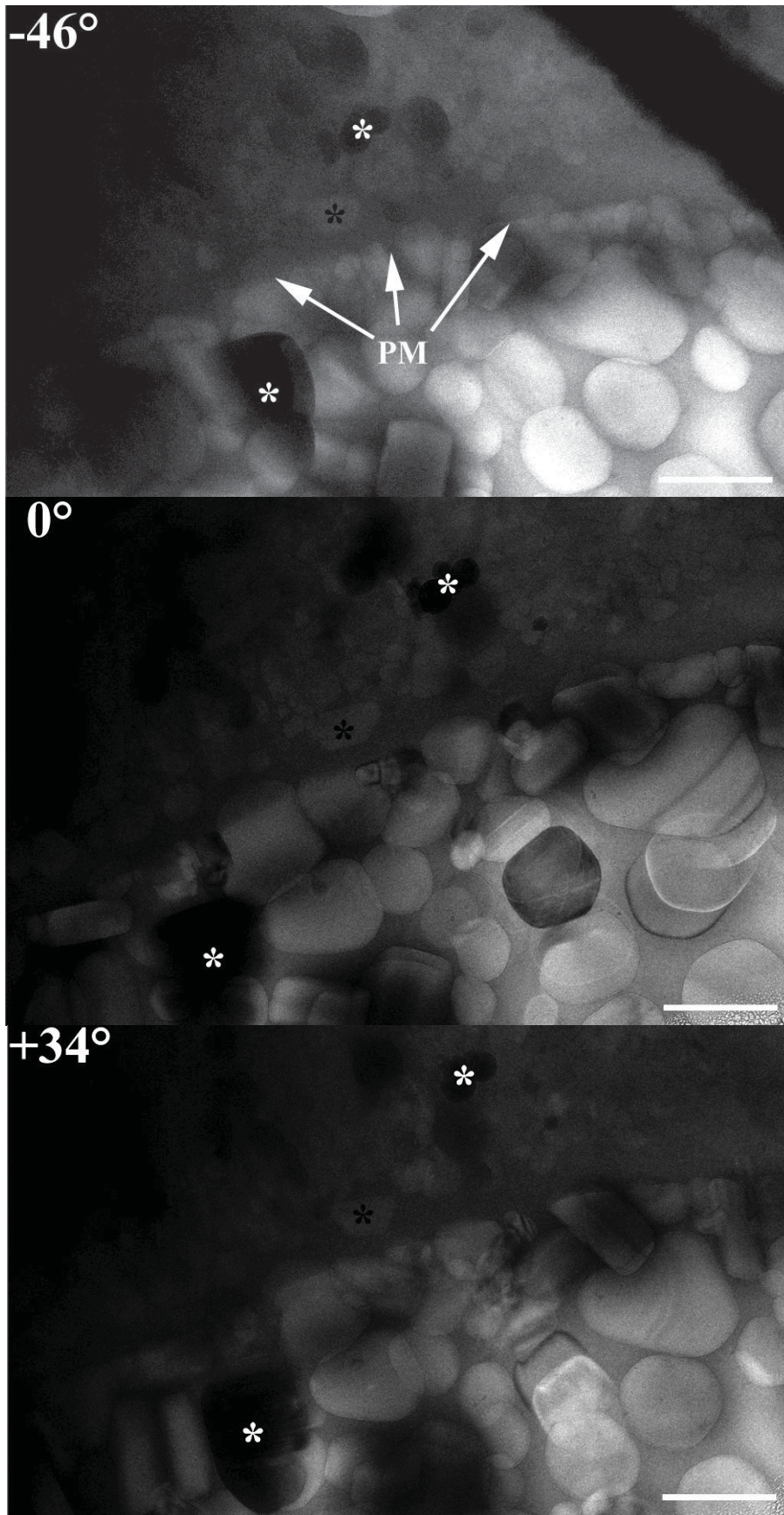


Abb. 4.34: Kryo-elektronentomographische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* in EAFS und Aufwärmen zu -80°C

Gezeigt sind ausgewählte Bilder einer Kippserie der Zellgrenze einer HeLa-Zelle (oberer dunkler Bereich: Zytoplasma; unterer heller Bereich: Extrazellularraum) nach *plunge-freezing* in EAFS Medium und Aufwärmen für 30s zu -80°C. Gezeigt sind die Aufnahmen bei einem Kippwinkel von -46°, 0° und +34°. Dunkle Kristalle (weiße Asteriske) verändern ihre Position stark mit dem Kippwinkel, helle Kristalle (schwarze Asteriske) bleiben hingegen relativ konstant an ihrer Position. PM: Plasmamembran; Originalvergrößerung für die Aufnahmen: 19000x; Maßstabsbalken 1µm

Um nachzuweisen, dass es sich bei den beobachteten hellen und dunklen Kristallen wirklich um die Eiskristalle handelt, die für die Punkte in den Diffraktogrammen verantwortlich sind, wurden Diffraktogramme speziell von Bereichen aufgenommen, in denen sich die Kristalle befinden (Abb. 4.35 A & B). Diese geben klar das Diffraktionsbild von kristallinem, hexagonalem Eis ab. In einem Bereich hingegen, in dem optisch keine Kristalle zu sehen sind, zeigt das Diffraktionssignal vitrifiziertes Wasser (Abb. 4.35 C).

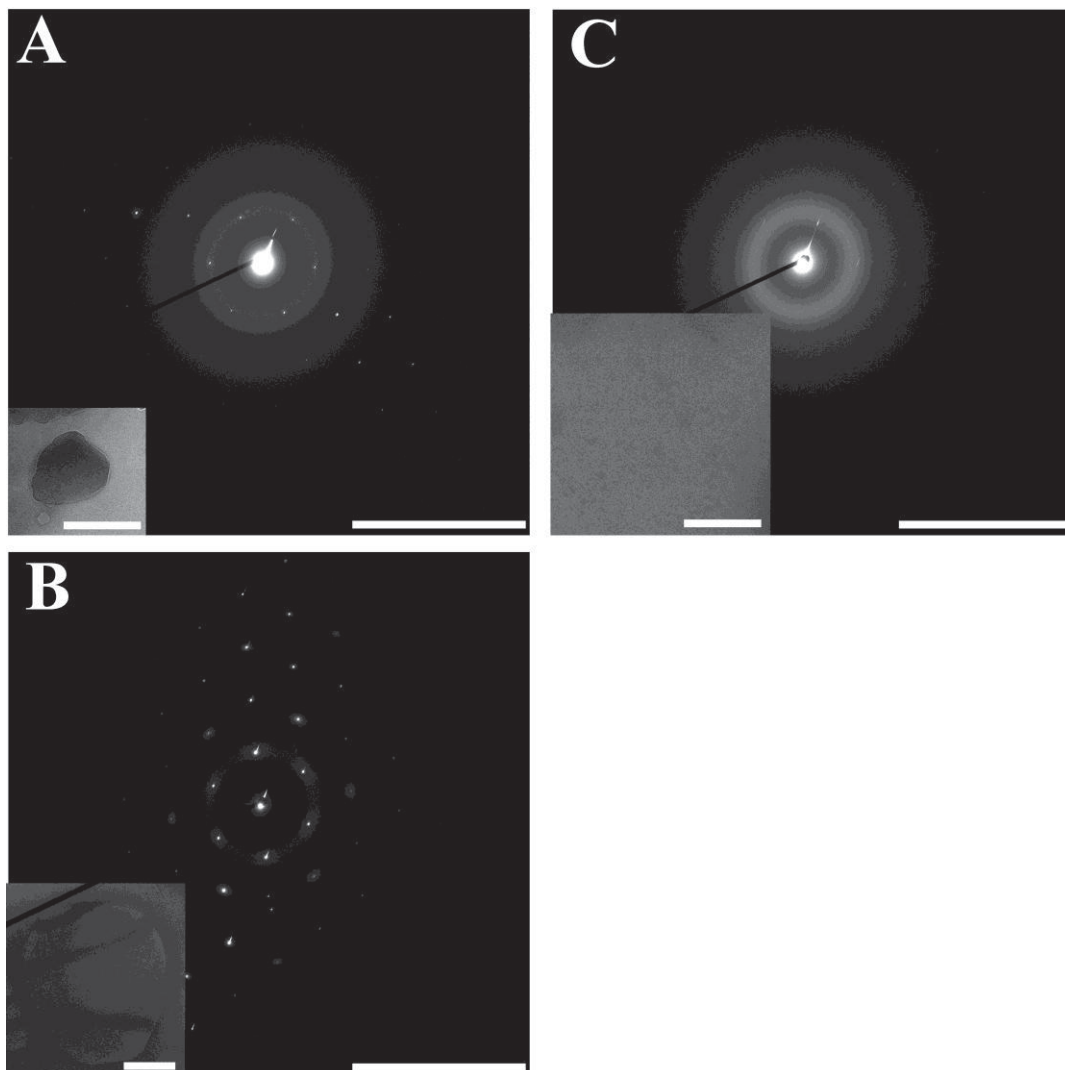


Abb. 4.35: Diffraktogramme ausgewählter Bereiche in HeLa-Zellen nach 30s Aufwärmung auf -40°C

Die Abbildung zeigt Diffraktionssignale eines dunklen Kristalls (A), eines hellen Kristalls (B) und eines Bereichs zwischen den Kristallen (C). Die distinkten Spots repräsentieren kristallines, hexagonales Eis, die diffusen Ringe amorphes, vitrifiziertes Eis. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Bereiche von denen die Diffraktion aufgenommen wurde sind in den Inserts zu sehen.

Maßstäbe: 1µm für die Transmissionsbilder; 1/0,11nm für die Diffraktionsbilder

Insgesamt betrachtet findet man für Zellen in EAFS die erwartete Korrelation zwischen der Bildung intrazellulären Eises und dem Zelltod: Nach 30s bei -80°C gibt es kein intrazelluläres Eis und die Zellen überleben, nach 30s bei -40°C gibt es intrazelluläres Eis und alle Zellen sind tot. Extrazelluläres Eis hingegen führt unter diesen Bedingungen nicht zum Zelltod.

4.11.2 Dextran

Zellen in Dextran überleben die Kryokonservierung mittels SPRF nicht (Kap. 4.1). Das Überleben nach Eiskristallinduktion lässt sich daher nicht quantifizieren. Die qualitative Analyse des Überlebens nach *plunge freezing* ergibt ein ähnliches Bild wie bei Zellen in EAFS-Medium. Nach Eiskristallinduktion für 30s bei -80°C gibt es überlebende Zellen, nach 30s bei -40°C nicht.

Betrachtet man die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen nach diesen Induktionen der Eiskristallbildung ergibt sich auch hier zunächst ein relativ ähnliches Bild zu Zellen in EAFS (Abb. 4.36). Bei Analyse der Diffraktogramme nach -80°C erkennt man allerdings, dass die Bereiche außerhalb der großen Kristalle nicht, wie bei EAFS vitrifiziert, sondern eindeutig kristallin sind (Abb. 4.36). Des Weiteren fällt auf, dass alle großen Kristalle auch nach Eiskristallinduktion bei -40°C dunkel erscheinen und somit potentiell extrazellulär sind.

In diesem Medium ist also kein Zusammenhang zwischen Eiskristallisation und Überleben herzustellen. Nach Eiskristallinduktion mit -80°C ist das intrazelluläre Wasser bereits durchkristallisiert, dennoch wurden hier überlebende Zellen detektiert. Einschränkend ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die Überlebensrate für Dextran nicht quantifizierbar war und es möglich ist, dass die Überlebensrate bei -80°C sehr gering ist und möglicherweise einzelne Zellen auch vitrifiziert sein könnten, auch wenn dies auf keine der 15 getesteten Zellen zutraf.

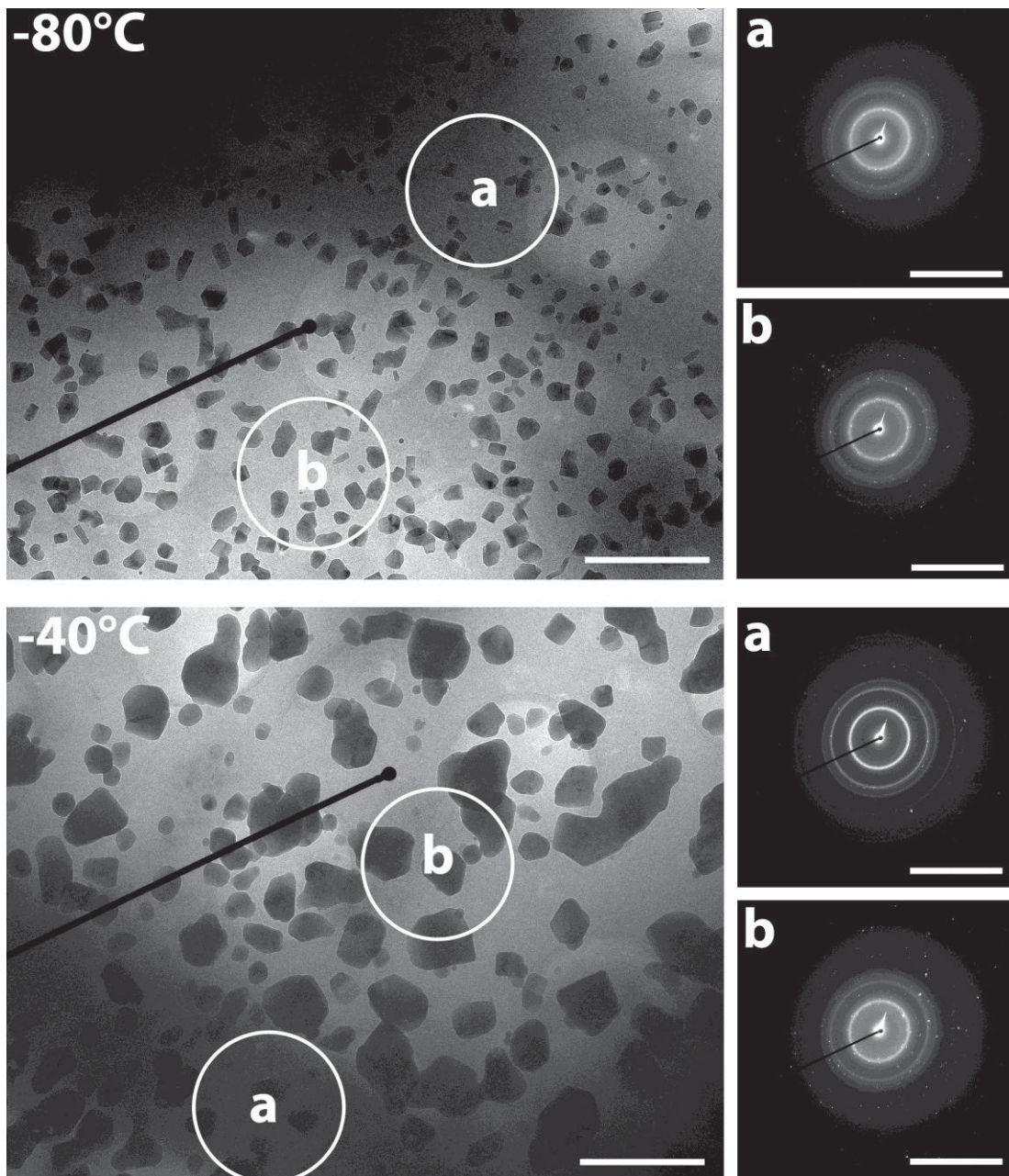


Abb. 4.36: Kryo-elektronenmikroskopische Analyse der Eisphasen in HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* in Dextran und Aufwärmen auf -80°C bzw. -40°C

Adhärente HeLa-Zellen wurden durch *plunge freezing* mit Dextran als Kryoprotektivum kryokonserviert, für 30s auf die angegebenen Temperaturen ($-80^{\circ}\text{C}/-40^{\circ}\text{C}$) aufgewärmt und wieder abgekühlt. Im Transmissionbild sind die Bereiche eingekreist, deren Phase mittels Elektronendiffraktion bestimmt wurde (a: intrazellulär; b: extrazellulär). Die scharfen Ringe in den Diffraktionsbildern werden durch eine Vielzahl kleiner Eiskristalle erzeugt. Die helleren distinkten Punkte von größeren Eiskristallen. Alle Bilder sind repräsentativ aus Messungen an mindestens 15 Zellen aus mindestens 3 verschiedenen Experimenten.

Maßstäbe: $2\mu\text{m}$ für Transmissionbilder; $1/0,11\text{nm}$ für Diffraktionsaufnahmen

4.11.3 DES/DE

In DE Medium gibt es im Unterschied zu Dextran- und EAFS-Medium nach jeder getesteten Temperatur zur Eisinduktion, von -120°C bis -20°C , überlebende Zellen (Abb. 4.30 & 4.31). Die Quantifizierung der Überlebensraten ergibt hier eine graduelle Abnahme der Zellviabilität mit steigender Temperatur der Induktion der Eiskristallbildung. Diese Beobachtung ist fundamental unterschiedlich zu den mit EAFS-Medium getätigten, wo es einen abrupten Abfall von maximal möglichem zu überhaupt keinem Überleben zwischen -60°C und -40°C gab. Es wurden des Weiteren auch die Überlebensraten in DES-Medium quantifiziert. Dieses Medium ist in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich zu DE-Medium – es enthält nur zusätzlich Sucrose – es schrumpft die Zellen aber wie EAFS Medium (vergl. Abb. 4.10 & 4.14). Die Quantifizierung der Überlebensraten in DES-Medium ist erstaunlich ähnlich zu der in EAFS-Medium und somit fundamental unterschiedlich zu der in DE-Medium (Abb. 4.31), dem einzigen getesteten Medium, welches nicht zu einer Zellschrumpfung führt (Abb. 4.14).

Betrachtet man die kryo-elektronenmikroskopische Analyse der Eisinduktion bei -80°C , so fällt auf, dass kein vitrifizierter Anteil des Mediums mehr detektierbar ist. Extra- und intrazellulärer Raum sind gefüllt mit kleinen Eiskristallen, die besonders extrazellulär auch schon im Transmissionsmodus des Elektronenmikroskops sichtbar sind. Bei -40°C hingegen finden sich weniger Kristalle, die allerdings deutlich größer sind als die bei -80°C . Ein vitrifizierter Hintergrund ist hier wieder sichtbar (Abb. 4.37). Möglicherweise werden durch das Wachsen der großen Eiskristalle in den Bereichen um die Kristalle herum die Kryoprotektiva und Salze so stark aufkonzentriert, dass sich hier eine amorphe Schmelze bildet, ähnlich wie bei Kryokonservierung mit langsamem Einfrieren. Bei -40°C sind sich die Erscheinungsbilder der Zellen in EAFS und DE ziemlich ähnlich. Die intrazellulären Eiskristalle in DE sind allerdings signifikant größer. Die Grundfläche der intrazellulären Kristalle nach Eiskristallinduktion mit -40°C beträgt in DE Medium $3027234 \pm 2941218\text{nm}^2$, in EAFS nur $261110 \pm 173748\text{nm}^2$ ($p < 0,001$).

Insgesamt korreliert für Zellen in DE-Medium das Vorhandensein intrazellulären Eises eindeutig nicht mit dem Zelltod. Bereits nach Eiskristallinduktion bei -80°C ist kein vitrifizierter Anteil mehr detektierbar, es gibt jedoch noch überlebende Zellen. Allerdings sind

Eiskristallgröße und Überlebensrate invers korreliert: Je größer die Eiskristalle, desto niedriger die Überlebensrate. Jedoch auch bei -40°C , der Testbedingung mit den größten Eiskristallen, gibt es noch überlebende Zellen.

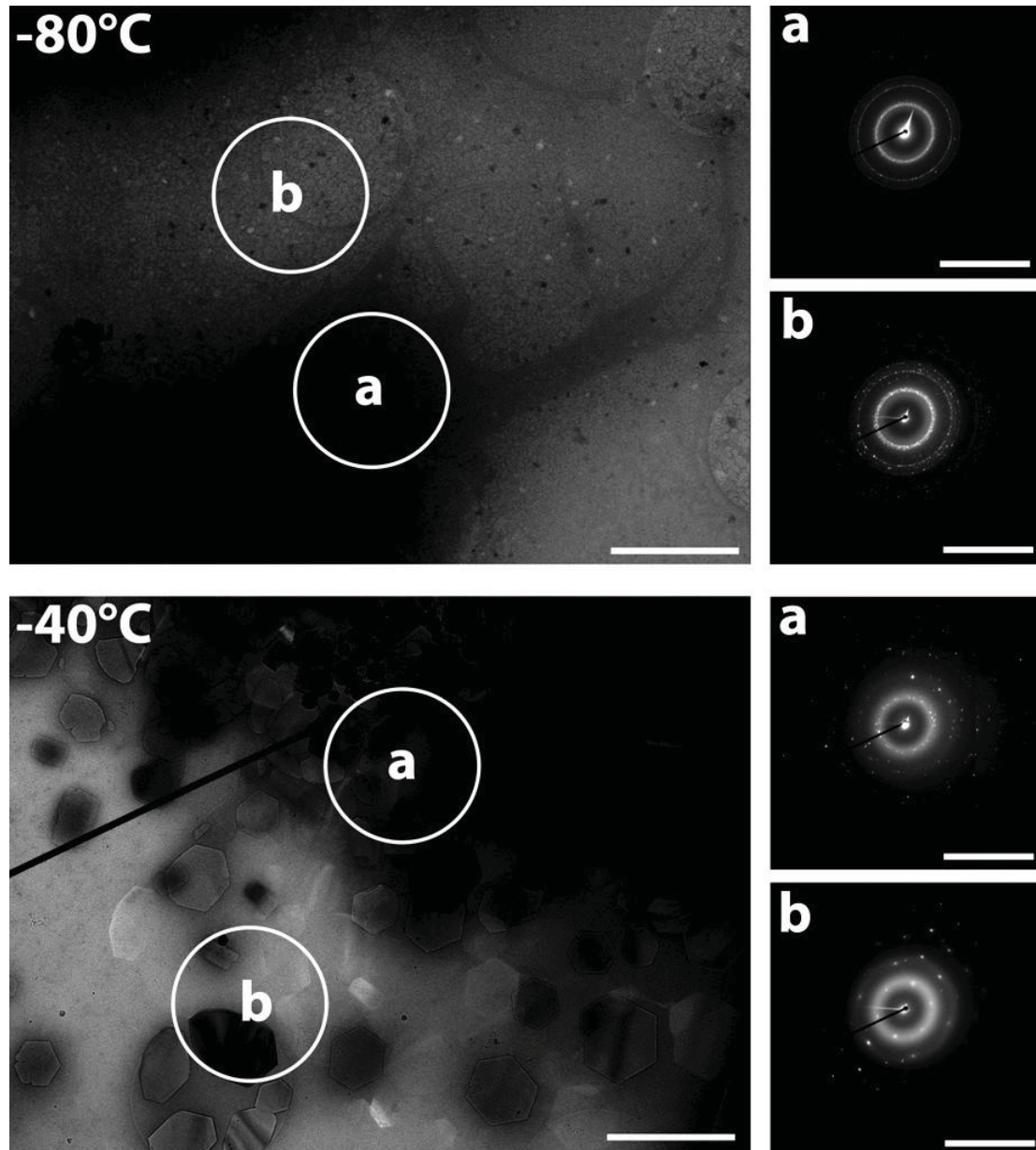


Abb. 4.37: Kryo-elektronenmikroskopische Analyse der Eisphasen in HeLa-Zellen nach *plunge-freezing* in DE-Medium und Aufwärmen auf -80°C und -40°C

Adhärente HeLa-Zellen wurden durch *plunge-freezing* kryokonserviert mit DE-Medium als Kryoprotektivum, für 30s auf die angegebenen Temperaturen ($-80^{\circ}\text{C}/-40^{\circ}\text{C}$) aufgewärmt und wieder abgekühlt. Im Transmissionbild sind die Bereiche eingekreist, deren Phase mittels Elektronendiffraktion bestimmt wurde (a: intrazellulär; b: extrazellulär). Die unscharfen Ringe in den Diffraktionsbildern repräsentieren vitrifizierte Anteile (-40°C a,b), die distinkten Punkte und Ringe (-80°C a,b & -40°C a,b) stammen von Eiskristallen. Alle Bilder sind repräsentativ aus Messungen an mindestens 15 Zellen aus mindestens 3 verschiedenen Experimenten.

Maßstabsbalken: $2\mu\text{m}$ für Transmissionbilder; $1/0,11\text{nm}$ für Diffraktionsaufnahmen

4.12 Vitrifikation ist nicht direkt korrelierbar mit Überleben bei Kryopreservation mittels OPS

Aus Abschnitt 4.4 ist zu ersehen, dass Vitrifikation allein nicht ausreichend ist für das Überleben der Zellen. Aus 4.11 ist zudem erkennbar, dass weder die extra- noch die intrazelluläre Kristallisation von Eis letal für die Zellen ist. Um zu überprüfen, ob dies auch auf routinemäßig angewandte Verfahren der Kryokonservierung zutrifft, wurden nun verschiedene kryoprotektive Medien mit dem OPS gefroren. Von diesen Medien wurden Röntgendiffraktogramme aufgenommen und die ermittelten Eisphasen jeweils mit den Überlebensraten der Zellen nach diesem Einfrierverfahren in diesen Medien verglichen.

Zellen in EAFS-Medium überleben Kryokonservierung mittels OPS zu einem sehr hohen Prozentsatz (Abb. 4.24), wobei das Medium komplett vitrifiziert (4.38 B). In DES-Medium überleben die Zellen auch sehr gut (Abb. 4.24), das Medium ist jedoch nur an der Spitze des OPS (wenige hundert μm) vitrifiziert. Im Rest des OPS findet sich kubisches Eis (Abb. 4.38 C). In DE-Medium konnte nur kubisches Eis nachgewiesen werden, bei trotzdem sehr guten Überlebensraten (Abb. 4.38 D & 4.39).

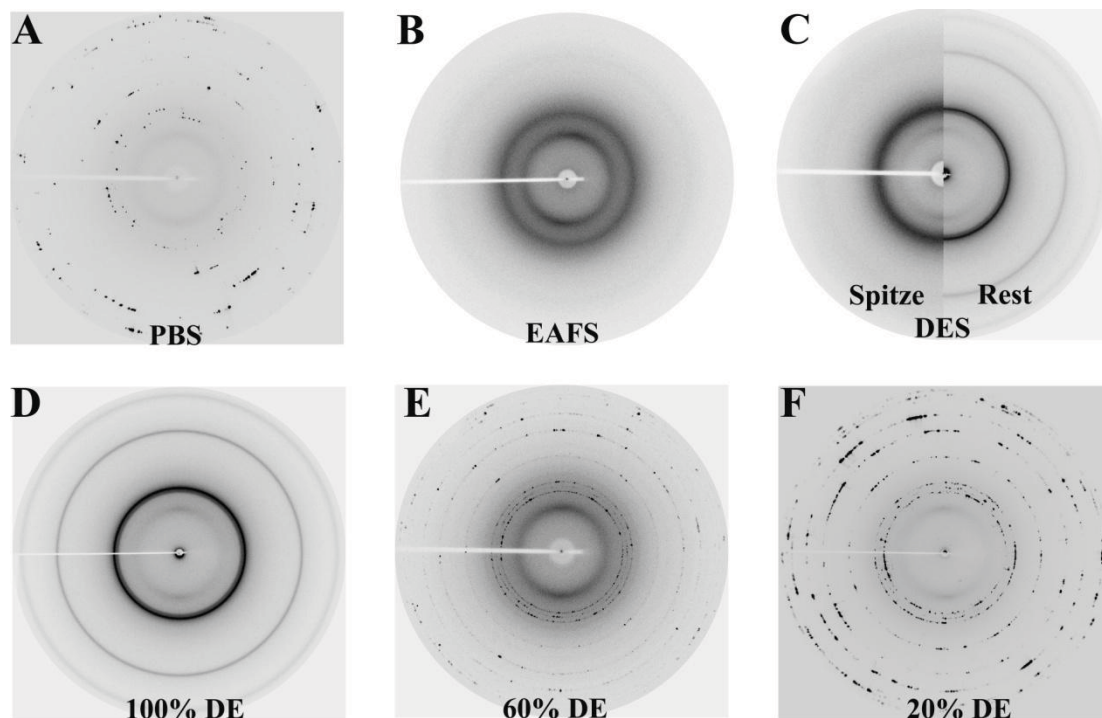


Abb. 4.38: Röntgendiffraktogramme verschiedener Medien gefroren im OPS

Gezeigt sind Röntgendiffraktogramme der Medien PBS, EAFS, DES sowie Verdünnungen von DE mit PBS die in der Spitze von OPS gefroren wurden. Dargestellt sind repräsentative Messungen aus vier Versuchen. Die Diffraktogramme in B & C (linke Hälfte) sind typisch für vitrifizierte wässrige Lösungen, die in C (rechte Hälfte) & D für kubisches Eis und die Diffraktogramme in A, E & F sind typisch für hexagonales Eis.

Kubisches Eis ist eine spezielle Eisform die nur bei sehr hohen Abkühlraten und entsprechendem Einsatz von kryoprotektiven Substanzen auftritt. Die Möglichkeit besteht, dass kubisches Eis weniger schädliche Auswirkungen auf das Zellüberleben hat, als das unter normalen Bedingungen auftretende hexagonale Eis. Aus diesem Grund wurde eine Verdünnungsreihe von DE, dem Medium mit der einfachsten Zusammensetzung, gemacht und das Zellüberleben nach Frieren im OPS getestet. Es stellte sich heraus, dass eine Mischung von 60% DE mit 40% PBS zu einem ebenso hohen Zellüberleben führt wie 100% DE. Erst bei niedrigeren Konzentrationen an DE sinken die Überlebensraten (Abb 4.39). 60% DE friert im OPS zu hexagonalem Eis (Abb. 4.38 E). Folglich hat auch beim Frieren mit OPS, einer Standardmethode zu Kryokonservierung mittels Vitrifikation, das Kristallisieren zu hexagonalem Eis keinen direkten schädlichen Einfluss auf die Überlebensraten der Zellen.

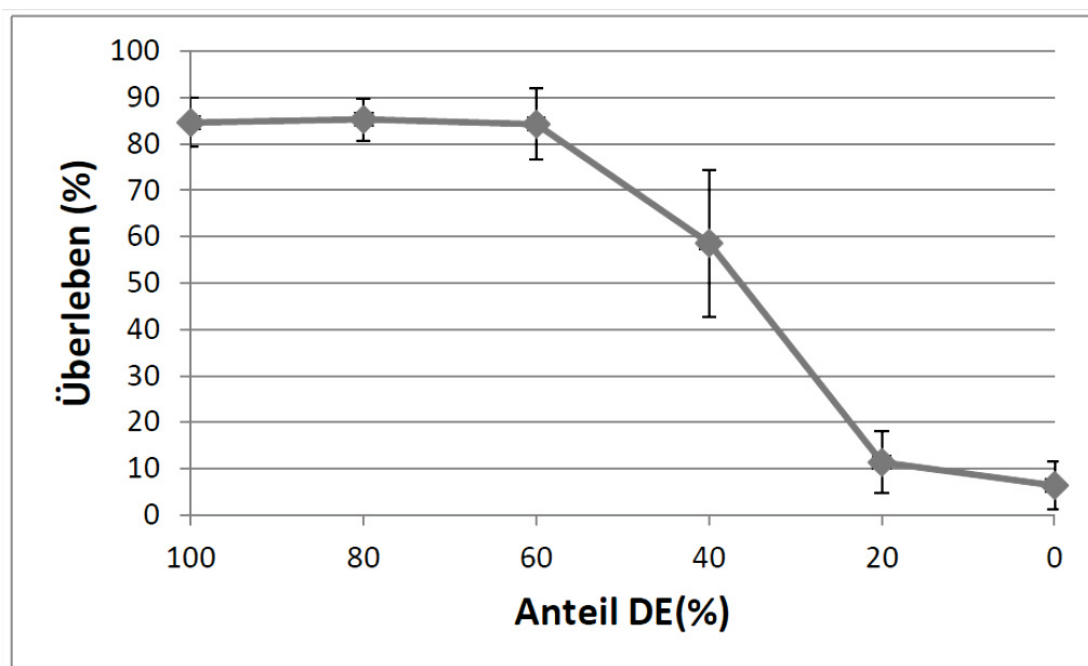


Abb. 4.39: Überlebensraten von HeLa-Zellen nach Frieren in OPS in absteigender Konzentration von DE-Medium

Gezeigt ist das Überleben von HeLa-Zellen, gemessen an der Fähigkeit weiter kultiviert werden zu können, nach Frieren in OPS. Auf der x-Achse ist die DE Konzentration angegeben, in denen die Zellen gefroren wurden. Das Medium wurde jeweils mit PBS verdünnt. N=8

5. Diskussion

5.1 Ist Vitrifikation eine hinreichende und notwendige Bedingung für das Überleben nach Kryokonservierung bei schnellem Einfrieren?

Vitrifikation ist keine hinreichende Bedingung für das Zellüberleben. Dies ist schon daran zu erkennen, dass Zellen, die nach Standardprotokollen der Kryofixierung vitrifiziert werden, normalerweise nach dem Auftauen nicht überleben (vergl. Kapitel 4.1). Das Problem hierbei ist, dass Vitrifikation nur den Weg des Abkühlens, nicht den Weg des Aufwärmens beschreibt. Dies wird in Kapiteln 5.2 & 5.3 noch eingehender diskutiert.

Die Frage, ob Vitrifikation eine notwendige Bedingung für das Überleben ist, ist komplexer. Zunächst ist festzustellen, dass in der Literatur zwischen Effekten der intra- und der extrazellulären Eiskristallbildung unterschieden wird. Von intrazellulärer Eisbildung wird angenommen, dass sie generell vermieden werden muss, da sie die Zellen abtötet (Fahy, 2007; Mazur & Seki, 2011; Pegg, 2002, 2007; Seki & Mazur, 2012). Bei extrazellulärer Eisbildung wird in der Literatur zwischen zwei verschiedenen Konzepten unterschieden. Es ist generell akzeptiert, dass bei langsamen Einfrierprotokollen zur Kryokonservierung extrazelluläre Eisbildung stattfindet. Diese wird von den Zellen toleriert, wenn Kryoprotektiva verwendet werden, um den Anteil an Eis geringer zu halten (Lovelock, 1953a; Mazur, 1963; Pegg, 2002, 2007; Wowk, 2010). In diesen langsamen Einfrierprotokollen sind zu schnelle Einfrieraten letal für die Zellen (Mazur, 1963; Pegg, 2002, 2007). Die sogenannten Vitrifikationsprotokolle hingegen arbeiten mit einem völlig anderen Prinzip, hier soll die Eisbildung komplett vermieden werden und dafür sind möglichst hohe Einfrieraten notwendig (Pegg, 2002, 2007; Rall & Fahy, 1985; Seki & Mazur, 2009, 2012; Wowk, 2010). Das erste Protokoll, das diesem Vitrifikationskonzept folgte und zu Zellüberleben führte, wurde von Rall & Fahy 1985 veröffentlicht (Rall & Fahy, 1985). Die Autoren stellten damals nicht die Schlussfolgerung an, dass extrazelluläre Eiskristallbildung in diesem Protokoll letal wäre. Vielmehr wollten sie zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, Zellen auch ohne extrazelluläre Eiskristallbildung zu kryokonservieren. Sie taten dies mit Hinblick auf die

Kryokonservierung von Zellverbänden und Organen, bei denen extrazelluläre Eiskristallbildung problematischer ist als bei der Kryokonservierung von Einzelzellen (Rall & Fahy, 1985). Dennoch ist in der aktuellen Literatur das Bild entstanden, dass für eine erfolgreiche Kryokonservierung Zellen entweder ziemlich langsam eingefroren werden müssen, damit sie genügend Zeit haben, als Reaktion auf das Eiswachstum zusammen zu schrumpfen oder so schnell abgekühlt werden müssen, dass jegliche Eiskristallbildung komplett unterbunden wird (Pegg, 2002, 2007; Seki & Mazur, 2009; Wowk, 2010). Dies führt dazu, dass bei der Suche nach möglichen kryoprotektiven Medien für die Kryokonservierung von Zellen neben der Zellverträglichkeit oft nur die Fähigkeit des Mediums zu vitrifizieren betrachtet wird (z.B. Matsumura, Bae, Kim, & Hyon, 2011; Seki & Mazur, 2009). Zudem wird zumeist nur untersucht, ob ein Medium vitrifizierbar ist und nicht, ob es in der verwendeten Methode und in Gegenwart von Zellen vitrifiziert. Die Vitrifizierbarkeit der Medien wird dabei in der Regel durch Methoden wie optische Inspektion oder Messung von exo- und endothermen Reaktionen überprüft (z.B. Matsumura et al., 2011; Rall & Fahy, 1985; Seki & Mazur, 2009). Diese Methoden sind indirekt, nicht quantitativ und haben keine hinreichende räumliche Auflösung. Somit kann durch sie keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine vollständige Vitrifikation erfolgt und auch nicht ob vitrifizierte Anteile intra- oder extrazellulär sind. In vielen Fällen wird eine Vitrifizierung auch einfach nur impliziert, sobald die Zellen überleben (z.B. Beier et al., 2011; Berthelot et al., 2000; Cuello et al., 2008; Gomis et al., 2013; Pedro et al., 1997; Perl et al., 2006). Der kausale Zusammenhang zwischen Vitrifikation und Zellüberleben wird somit von vielen Autoren vorausgesetzt, ist aber nie zweifelsfrei bewiesen worden.

Anhand der hier durchgeführten Röntgenbeugungs-Experimente verschiedener Medien mit dem *open-pulled straw* (OPS), einer etablierten Vitrifikationsmethode, ist zu erkennen, dass Vitrifikation des kryoprotektiven Mediums nicht mit dem Überleben der Zellen korreliert. Sowohl kubisches als auch hexagonales Eis konnte in kryoprotektiven Medien, mit denen sehr hohen Überlebensraten erzielt werden konnten, nachgewiesen werden. Extrazelluläres Eis ist demzufolge auch in sogenannten Vitrifikationsprotokollen tolerierbar.

In vorliegender Arbeit wurden des Weiteren erstmalig kryokonservierte Zellen mit Kryo-Elektronenmikroskopie und -tomographie direkt untersucht. Dadurch ist es möglich, die Eiskristallbildung mit hoher räumlicher Auflösung zu analysieren und extra- sowie intrazelluläre Eiskristalle zu unterscheiden. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass auch zwischen intrazellulärer Vitrifikation und Zellüberleben kein direkter kausaler Zusammenhang besteht. Dabei ist es abhängig von dem verwendeten kryoprotektiven Medium, wie viel intrazelluläre Eiskristalle von den Zellen toleriert werden. In Medien die zu einem Schrumpfen der Zellen führen (Dextran, EAFS, DES) wird wohl die Eisnukleation toleriert. Wachstum der Eiskristalle führt jedoch sehr schnell zu totaler Letalität. Diese Medien haben nur geringe absolute Level an intrazellulären Kryoprotektiva, da die intrazellulären Kryoprotektiva durch das osmotische Schrumpfen der Zellen in gleichem Maße wie das Wasser aus den Zellen gezogen wird. In Dextran gibt es sogar von vornherein kein intrazelluläres Kryoprotektivum. Eine interessante Kryoprotektiva-Mixtur wurde hier identifiziert, welche nicht zum Schrumpfen der Zellen führt, jedoch zu sehr hohen Überlebensraten. Dieses Medium besteht aus 15% DMSO und 15% Ethylenglykol und hat dementsprechend hohe Level an intrazellulären Kryoprotektiva. Nukleation oder Wachstum von Eiskristallen werden in den Zellen durch dieses Medium nicht inhibiert, jedoch tolerieren die Zellen die Präsenz deutlich größerer intrazellulärer Eiskristalle. Das Zellüberleben in diesem Medium ist zwar invers zur Größe der Eiskristalle korreliert, aber selbst bei den schlechtesten der getesteten Bedingungen, mit den größten in dieser Arbeit untersuchten Eiskristallen, gab es mit diesem Medium noch überlebende Zellen.

Diese Ergebnisse implizieren einen zusätzlichen, bislang unbekanntem Mechanismus der kryoprotektiven Wirkung von DMSO und Ethylenglykol, der unabhängig von der Unterdrückung der Eiskristallbildung ist. Ein möglicher Mechanismus könnte der Schutz der zellulären Bestandteile wie Membranen oder Proteinen sein. DMSO und Ethylenglykol sind kleine organische Moleküle, die in ihrer polaren Struktur dem Wassermolekül ähneln. Für DMSO wurde bereits gezeigt, dass es Plätze in der Hydrathülle von Lipidmembranen (Dabkowska, Foglia, Lawrence, Lorenz, & McLain, 2011; Gordeliy, Kiselev, Lesieur, Pole, & Teixeira, 1998) und Peptiden (Johnson, Malardier-Jugroot, & Head-Gordon, 2010; Malardier-Jugroot, Bowron, Soper, Johnson, & Head-Gordon, 2010) einnehmen

kann. Friert ein zu großer Anteil an Wasser zu Kristallen, so werden die Wassermoleküle aus der Hydrathülle entzogen (Akhoondi, Oldenhof, Stoll, Sieme, & Wolkers, 2011; Bronshteyn & Steponkus, 1993). Die Hydrathülle ist wichtig, weil ohne sie Proteine denaturieren, was tödlich für Zellen ist. Substanzen wie DMSO oder Ethylenglykol könnten Proteine gegen diesen Effekt stabilisieren. Membranen hingegen durchlaufen durch Denaturierung einen Phasenübergang (Selle & Pohle, 1998). Anhand dieses Phasenübergangs wurde bereits gezeigt, dass durch DMSO die Dehydrierung der Membran verlangsamt wird (Akhoondi et al., 2011; Spindler, Wolkers, & Glasmacher, 2009). Selbiges könnte folglich auch für Proteine gelten.

Es konnte in vorliegender Studie eindeutig gezeigt werden, dass Vitrifikation weder ausreichend noch notwendig für ein Zellüberleben bei schnellen Einfriermethoden ist. Dies schließt Vitrifikation als Methode für die Kryokonservierung im Umkehrschluss allerdings nicht aus. Das Konzept, dass biologisches Material direkt in eine Glasphase überführt wird und die Eiskristallbildung und damit verbundene Probleme umgangen werden, erscheint immer noch logisch und erstrebenswert. Nur basieren die Kryokonservierungsprotokolle mit hohen Konzentrationen an intrazellulären Kryoprotektiva offensichtlich auf anderen Mechanismen. Die genauen Mechanismen und Funktionsweisen dieser Kryoprotektiva gilt es noch aufzuklären. In Zukunft sollte die Aufklärung dieser Effekte zur effektiveren Suche nach optimalen Kryoprotektiva beitragen.

5.2 Warum sterben Zellen, deren Ultrastruktur perfekt durch Kryofixierung erhalten wurde?

Um diese Frage zu beantworten, muss zunächst die Frage gestellt werden, ob es überhaupt Zellen gibt, deren Ultrastruktur perfekt durch Kryofixierung erhalten wurde.

Eine etablierte Methode die angewendet wird, um biologisches Material mit möglichst perfekter Ultrastruktur zu erhalten, ist das *plunge-freezing*. Hierbei können elektronenmikroskopisch allerdings nur Randbereiche von Zellen analysiert werden, die nicht dicker sind als maximal 1µm (Chen et al., 2010; Mader, Elad, & Medalia, 2010; Marko & Hsieh, 2007). In vorliegender Arbeit konnte ebenfalls

bestätigt werden, dass es möglich ist, Proben mit adhärenen eukaryotischen Zellen in all diesen Bereichen zu vitrifizieren. Es wird allerdings angenommen, dass Bereiche, die wesentlich dicker als 1µm sind, nicht vitrifiziert werden können (Jaques Dubochet et al., 1988; Leis et al., 2009; Marko & Hsieh, 2007; Mayer, 1985). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass HeLa-Zellen das *plunge freezing* ohne Kryoprotektiva nicht überleben. Dass diese Zellen nicht überleben, könnte folglich dadurch erklärt werden, dass die dickeren Bereiche der Zellen nicht vitrifiziert werden und die Struktur der Zellen durch Eiskristallwachstum zerstört wird. Eiskristallwachstum wäre in diesem Falle letal, weil keine Kryoprotektiva vorhanden sind.

In der Kryo-Elektronenmikroskopie wird allgemein angenommen, dass auch Zellen in einer Dextranlösung keine oder nur sehr geringe Änderungen der Ultrastruktur erfahren (Al-Amoudi et al., 2004; Bouchet-Marquis et al., 2008; Hagen & Grünewald, 2008; Han et al., 2012; Leis et al., 2009; Sader et al., 2009). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Zellen in Dextran selbst bei einer nur sehr kurzen Inkubation deutlich zusammen schrumpfen und demzufolge ist ihre Struktur nicht perfekt erhalten. In Folge dessen muss konstatiert werden, dass eine Kryofixierung ganzer Zellen mit absolut perfekter Ultrastruktur mit heutigen Methoden wohl nicht erreicht werden kann. Es ist jedoch umfassend gezeigt, dass Zellen nach HPF oder SPRF in Dextranlösung vitrifizieren (z.B. Al-Amoudi et al., 2004; Bouchet-Marquis et al., 2008; Han et al., 2012). So gefrorene Zellen sind im Prinzip kleinere Zellen mit geringerem Wassergehalt, die dadurch – ohne die Zugabe intrazellulärer Kryoprotektiva – vitrifiziert werden können. Folglich können sie, im Bezug auf das Überleben, als Modell für Zellen dienen, die durch Vitrifikation in ihrer Ultrastruktur komplett erhalten bleiben.

Im Zuge dieser Arbeit wurde das SPRF Protokoll soweit optimiert, dass alle Präparationsschritte bei Raumtemperatur nicht letal für die Zellen sind. Dennoch ist eine erfolgreiche Vitrifizierung mit Dextran als Kryoprotektivum absolut letal für die Zellen (Kap. 4.1 & 4.2). Ebenso sterben sie, wenn man die intrazellulären Bestandteile von anderen kryoprotektiven Mixturen weglässt (Kap. 4.7). Ein Experiment der vorliegenden Arbeit zeigt jedoch, dass es möglich ist, Zellen ohne intrazelluläre Kryoprotektiva überleben zu lassen. In Kap. 4.11 wurde das Überleben von Zellen nach *plunge freezing* untersucht. Zellen ohne Kryoprotektiva überlebten nicht. Zellen in Dextranlösung überleben das *plunge freezing* allerdings. Warum also

überleben diese Zellen, Zellen suspendiert in Dextranlösung aber nicht und adhärente Zellen ohne Dextran auch nicht? Die Antwort scheint in der Dicke der Zelle zu liegen. Wie in Kapitel 4.7.3 gezeigt, hat das rein extrazelluläre Kryoprotektivum Dextran neben den vitrifikationsfördernden Eigenschaften ebenfalls einen Einfluss auf das Zellvolumen. Die Zellen schrumpfen. Da das extrazelluläre Medium beim *plunge freezing* ohnehin vitrifiziert, ist anzunehmen, dass das Schrumpfen der Zellen der entscheidende Faktor für das Überleben ist und nicht die vitrifizierungsfördernden Eigenschaften des Dextrans. Wachsen die Zellen adhärent, behalten sie trotz Schrumpfens ihren Grundriss bei und schrumpfen hauptsächlich in der Höhe. Nimmt man an, dass eine einzeln wachsende HeLa-Zelle im adhärensten Zustand an der dicksten Stelle etwa $4\mu\text{m}$ dick ist (Kim et al., 2012) und um ca. 50% in der Höhe schrumpft, so ist die Zelle nur noch $2\mu\text{m}$ dick. Eine sphärische HeLa-Zelle in Suspension jedoch hat einen Durchmesser von ca. $15\mu\text{m}$, basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Diese Zelle schrumpft in Dextran in allen Dimensionen gleich, somit ist der Durchmesser immer noch ca. $12\mu\text{m}$. Zudem sind Zellen in Suspension von einem wässrigen Medium umgeben, welches durch die schlechte Temperaturleitfähigkeit des Wassers als Isolator wirkt. Diese macht die Vitrifikation von dickeren Proben aufgrund der geringeren Abkühlraten im Zentrum problematischer (Studer et al., 2008). Trotz dieser schlechteren Voraussetzungen sind die Zellen in Suspension nach SPRF mit Dextran als Kryoprotektivum nachweislich vitrifiziert (Kap. 4. 4; Hong-Mei Han et al., 2012). Die Abkühlrate ist also unter diesen Umständen auch bei sphärischen Zellen in einer isolierenden Schicht wässriger Lösung – von etwa $300\mu\text{m}$ beim SPRF – schnell genug, um das so genannte „no-man’s-land“ (vergl. Abb. 1.1) (Loerting et al., 2011), in dem flüssiges Wasser absolut instabil ist, zu durchqueren, ohne dass es zu einer Eiskristallisation kommt. Somit ist die wahrscheinlichste Möglichkeit, dass die Zellen beim Aufwärmen sterben. Beim Aufwärmen müssen die Zellen vom vitrifizierten zurück in den flüssigen Zustand überführt werden und müssen dann denselben kritischen Temperaturbereich mindestens genauso schnell durchqueren, wie beim Abkühlen. Wie in Kapitel 4.5 gezeigt, ist der Aufwärmprozess langsamer als der Abkühlprozess. Dies liegt daran, dass die Temperaturangleichung einer Probe an ihre Umgebung zunächst annähernd linear mit seiner durch Geometrie und Materialeigenschaften begrenzten maximalen Geschwindigkeit verläuft. Nähert sich die Temperatur der Probe der Umgebungstemperatur an, verlangsamt sich die Temperatur-

änderungsrate sukzessive. Beim Einfrieren wird der kritische Temperaturbereich, in dem Eisbildung erfolgen kann, deutlich unterschritten, so dass das langsame Angleichen an die Temperatur des flüssigen Stickstoffs keine Rolle spielt. Beim Aufwärmen ist dies aber nicht möglich, da ein Überhitzen die Zellen ebenfalls abtöten würde (s. Kap. 4.5). Dies ist in der Kryobiologie im Prinzip bekannt und auch schon für kryokonservierte Proben gemessen und beschrieben worden. Das langsame Annähern an die Endtemperatur wird allerdings dem Schmelzen von Eis zugeschrieben (Koshimoto & Mazur, 2002; Mazur & Seki, 2011). Diese Schlussfolgerung ist allerdings dadurch zu widerlegen, dass der Effekt erstens auch beim Kühlen auftritt und zweitens ebenfalls auftritt, wenn das Thermoelement an der Luft aufgetaut wird und gar kein Wasser oder Eis vorhanden ist (s. Kap 4.5). Vielmehr handelt es sich um einen bekannten physikalischen Prozess. Die Wärmestromdichte (q) ist in einer einfachen, skalaren Darstellung des Fourier-Gesetzes zu beschreiben als

$$q=k(\Delta T/L)$$

wobei k die Wärmeleitfähigkeit, ΔT der Temperaturunterschied und L die Distanz ist (Lienhard & Lienhard, 2002). Damit ist klar, dass je geringer der Temperaturunterschied ist, desto geringer ist auch die Wärmestromdichte und somit auch die Temperaturänderung. Beim Auftauen ist zudem zu beachten, dass nach dem Durchqueren des „no man’s lands“ durch die erhöhte Temperatur Energie hinzugeführt wird. Kommt es also beim Auftauen zu einer Nukleation von Eiskristallen, so werden diese aufgrund der zugeführten Energie und der geringeren Viskosität rapide wachsen, beim Abkühlen wäre dieser Vorgang sehr viel langsamer. Zusätzlich ist zu beachten, dass durch die Kryofixierung der Einfriervorgang technisch verbessert wurde, beispielsweise durch die Verwendung von Ethan oder Propan als effektiveres Kryogen oder durch die Verwendung von Druck im HPF oder SPRF. Solche Entwicklungen gibt es für das Auftauen noch nicht, da der Auftauprozess für die Kryofixierung nicht von Bedeutung war. Bei der Kryofixierung wird die Konzentration an Dextran normalerweise so gewählt, dass sie möglichst niedrig ist, um Änderungen der zellulären Umgebung gering zu halten, und gerade hoch genug um Vitrifizierung zu ermöglichen. Dies könnte dazu führen, dass beim langsameren Aufwärmen der Zellen in Suspension Devitrifikation, Kristallisation und Kristallwachstum einsetzen und die Zellen dabei zerstört werden. In geschrumpften, adhären

Zellen ist jedoch der Durchmesser viel kleiner. Die Wärme wird beim Auftauen somit viel schneller hinein geleitet. Dadurch haben Eiskristalle wahrscheinlich nicht die Zeit so groß zu werden, dass sie den Zellen Schaden zufügen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es derzeit wahrscheinlich nicht möglich ist komplette Säugetierzellen unter vollständiger Erhaltung ihrer Ultrastruktur zu kryofixieren. Es sind verbesserte Kryofixierungsmethoden notwendig, die dies ermöglichen, um die Frage abschließend zu beantworten. Dennoch weisen diese Ergebnisse stark darauf hin, dass selbst wenn Zellen in ihrer Ultrastruktur perfekt erhalten blieben, der Auftauprozess komplexe Schwierigkeiten mit sich bringt, die überwunden werden müssten, um perfekt kryofixierte Zellen aus ihrer vitrifizierten in die flüssige Phase zu überführen ohne zwischenzeitliches Eiskristallwachstum. Empirische Studien der jüngsten Vergangenheit belegen die Wichtigkeit einer schnellen Auftaurate für das Zellüberleben auch bei Zellen, die mit Standardmethoden der Kryokonservierung schnell eingefroren wurden (Hopkins et al., 2012; Seki & Mazur, 2009, 2012). Wie Methoden zum schnelleren Auftauen und Einfrieren aussehen könnten, wird im folgenden Kapitel noch diskutiert.

5.3 Ist es möglich Zellen unter Erhaltung ihrer Ultrastruktur reversibel durch Kryobedingungen zu fixieren?

Die Beantwortung dieser Frage überschneidet sich sehr stark mit der Beantwortung der Frage, warum Zellen mit perfekt erhaltener Ultrastruktur sterben. Wie in Kapitel 5.2 bereits erläutert, ist hierzu zunächst festzustellen, dass heutige Methoden zur Kryofixierung von Säugetierzellen nicht zu einwandfreier Erhaltung der (Ultra-) Struktur führen. Des Weiteren ist festzustellen, dass alle hier getesteten Medien die routinemäßig zur Kryokonservierung eingesetzt werden zu noch drastischeren Änderungen der (Ultra-) Struktur führen (s. Kap. 4.7). Sie führen entweder zu einem massiven Zusammenschrumpfen der Zellen (EAFS, DES) oder führen zu erheblichen Veränderungen der inneren Struktur der Zelle (DE). Die Verwendung von hohen Konzentrationen verschiedener extra- und intrazellulärer Kryoprotektiva, wie sie für die Kryokonservierung verwendet werden, ist demzufolge auch keine Option, wenn die Ultrastruktur der Zellen erhalten bleiben soll.

Aus dem bereits diskutierten Überleben von Zellen in Dextran nach *plunge freezing* lässt sich dennoch ableiten, dass es theoretisch möglich sein müsste, Zellen unter Erhaltung ihrer Ultrastruktur reversibel zu fixieren. Diese Zellen überleben, obwohl sie nicht durch intrazelluläre Kryoprotektiva geschützt sind. Ihre Struktur ist nicht erhalten, da sie stark schrumpfen, dennoch zeigt dieses Experiment die theoretische Durchführbarkeit der reversiblen Kryofixierung unter Erhaltung der Ultrastruktur, da hier der einzige Schutz der Zellen schnelle Einfrier- und Auftauraten sind, die mutmaßlich ausreichen, um Eiskristallbildung über den gesamten Vorgang zu verhindern. Voraussetzung für eine erfolgreiche reversible Kryofixierung unter Erhaltung der Ultrastruktur ist jedoch, dass es gelingt die Vitrifikation über den kompletten Durchmesser der ungeschrumpften Zelle über den gesamten Vorgang hinweg vor Eisbildung zu schützen. Folglich müssten Methoden zum noch schnelleren Einfrieren und vor allem zum schnelleren Auftauen entwickelt werden.

Zum schnelleren Einfrieren könnte die Probe zu noch tieferen Temperaturen, bei gleichzeitiger Vermeidung des Leidenfrost-Phänomens, gekühlt werden. Beispielsweise könnte flüssiges Helium anstatt flüssigem Stickstoff zur Kühlung benutzt werden. Durch das Helium müsste dann ein anderer Stoff gekühlt werden, der im Bereich der Siedetemperatur von Helium (4K) flüssig ist, aber erst bei höherer Temperatur siedet, so dass der Leidenfrost-Effekt nicht auftritt. Von reinen Elementen scheint hier allerdings höchstens Wasserstoff geeignet (Siedepunkt 21K; Schmelzpunkt 14K). Eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung des Filmsiedens wäre es, die Probe mit flüssigem Helium unter Druck zu umspülen. Optimalerweise sollte sich möglichst wenig Material zwischen den Zellen und dem Kühlmedium befinden, ähnlich wie beim *plunge freezing*. Wenn ein Material verwendet werden muss, um die Zellen zu schützen, wäre es ratsam, Materialien mit noch höherer Wärmeleitung zu verwenden, wie z.B. Diamant oder Kohlenstoff-Nanotubes (Wärmeleitfähigkeit: 2300 und 6000W/mK).

Möglichkeiten zum schnelleren Aufwärmen wären z.B. Induktionswärme durch Anlegen eines Wechselstroms oder elektromagnetische Erwärmung mittels Mikrowellenstrahlung. Beide Methoden erlauben das Erzeugen von Wärme im Inneren der Probe. Sie beruhen also nicht auf der Wärmeleitung in die Probe hinein. Wärmeleitung in die Probe hinein ist durch die geringe

Wärmeleitfähigkeit des Wassers (flüssig $\sim 0,56 \text{ W/m}^*\text{K}$; hexagonales Eis $\sim 2,3 \text{ W/m}^*\text{K}$) begrenzt. Beide Möglichkeiten erlauben es theoretisch, genau die richtige Energiemenge hinzu zuführen, um die Probe genau auf die richtige Temperatur aufzuwärmen. Versuche zum Aufwärmen mit Hilfe von Mikrowellen wurden bereits durchgeführt und es hat sich gezeigt, dass hier höhere Aufwärmraten erzielbar sind (Luo, Yu, He, Lu, & Gao, 2006; Robinson, Wusteman, Wang, & Pegg, 2002). Dieser Ansatz ist technisch sehr aufwendig, möglicherweise hat er sich deshalb bislang nicht durchgesetzt. Versuche zum Aufwärmen von kryokonservierten Proben mittels Induktionswärme sind nicht bekannt.

5.4 Können die technischen Errungenschaften für die Kryofixierung auf die Kryokonservierung übertragen werden, um dort bessere Ergebnisse zu erzielen?

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch Optimierung der Protokolle möglich ist, Techniken, die für die Kryofixierung entwickelt wurden - wie HPF, SPRF oder auch *plunge freezing* - auch für die Kryokonservierung zu nutzen.

Beim HPF ist zwar der Abkühlprozess zur Vitrifizierung optimiert, das Sample kann aufgrund seiner hohen Wärmekapazität und offenen Konfiguration aber nur sehr ineffizient aufgetaut werden, was zu schlechten Überlebensraten führt (vergl. Kap. 4.6). Dadurch kann HPF nicht zu einer Verbesserung der Kryokonservierung beitragen.

Plunge freezing kann theoretisch auch zur Kryokonservierung genutzt werden. Die Zellen wachsen allerdings auf einem sehr empfindlichen Film, der durch die Behandlung an vielen Stellen zerstört wird, was zu einem signifikanten Zellverlust führt, der nicht durch den eigentlichen Gefriervorgang begründet ist (vergl. Kap. 4.11). Vorteil der Methode ist, dass Zellen direkt adhärent eingefroren werden, was besonders dann nützlich sein kann, wenn die Zellen nach der Kryokonservierung direkt untersucht werden sollen. Für Kryokonservierung zur reinen Erhaltung der Zellen ist *plunge freezing* nicht als vorteilhaft gegenüber etablierten Methoden anzusehen.

Am Beispiel des SPRF sind hingegen, nach den hier vorgenommenen Modifikationen, Vorteile gegenüber aktuell genutzten Methoden zur Kryokonservierung erkennbar. SPRF führt bei den hier getesteten kryoprotektiven Medien zu ebenso hohen Überlebensraten wie das beste der getesteten, etablierten Systeme (*cryotop*) und zu höheren als die beiden anderen getesteten. Dass der *cryotop* zu besseren Überlebensraten führt als die anderen kommerziell erhältlichen Systeme, ist in Übereinstimmung mit weiteren vergleichenden Studien (Iwayama et al., 2004; Liu et al., 2008; Morató, Izquierdo, Paramio, & Mogas, 2008). Gegenüber dem *cryotop* hat SPRF den Vorteil, dass es bei viel geringerem Platzbedarf für die Lagerung ein größeres Volumen einfriert und effiziente Platzausnutzung ist eine der bestehenden Herausforderungen, speziell für Biobanken (John G Day & Stacey, 2008). Ein weiterer Vorteil des SPRF gegenüber dem *cryotop* und auch dem OPS-System ist, dass die Probe nicht in direkten Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff kommt. Im flüssigen Stickstoff können Krankheitserreger zwischen Proben übertragen werden (Bielanski, 2012; Cobo, Bellver, de los Santos, & Remohí, 2012; Criado et al., 2011; Pegg, 2007; Tedder et al., 1995). Dies stellt besonders für Proben für die medizinische Anwendung oder für die Aufbewahrung infektiöser Proben ein großes Problem dar.

SPRF stellt demzufolge eine Technik dar, die für die Kryofixierung entwickelt wurde und die auch, unter Berücksichtigung signifikanter Modifikationen, in der Kryokonservierung Vorteile bringt. Gegenüber allen getesteten etablierten Methoden hat SPRF eine optimale Überlebensrate bei der Verwendung von Standard-Kryoprotektiva. Des Weiteren ist die Rate von eingefrorenem Zellvolumen zu benötigtem Lagerplatz viel besser als bei den getesteten kommerziellen Methoden. Zusätzlich befinden sich beim SPRF die Zellen in einem abgeschlossenen Container, wodurch die Gefahr von Kontaminationen minimiert wird. Das macht SPRF zu einer optimalen Einfriermethode für schnelles Einfrieren bei Anwendungen, bei denen Platzbedarf ein entscheidender Faktor ist, z.B. bei großen Biobanken, und bei denen Kontamination ein großes Problem ist, z.B. bei der Konservierung von Proben für medizinische Anwendung oder bei der Lagerung von infektiösem Material. Aufgrund seines relativ einfachen und kostengünstigen Aufbaus ist SPRF darüber hinaus in vielen Bereichen einsetzbar und kann dort für eine Kombination aus Kryokonservierung und Kryofixierung genutzt werden. Dies ist insbesondere auch für die Probenentnahme „im Feld“ oder in Hochsicherheitslaboren interessant, wo die

Mitnahme eines wartungsintensiven und sperrigen Hochdruckgefrierers nicht möglich ist.

6. Zusammenfassung

Vitrifikation nennt man den Vorgang, bei dem Wasser beim sehr schnellen Abkühlen in eine amorphe Phase mit einer sehr hohen Viskosität übergeht unter Umgehung der kristallinen Phase. Dieses vitrifizierte Wasser verhält sich wie ein Feststoff.

In der Biologie gibt es zwei Methoden bei denen dieser Vorgang angewandt wird. Einerseits die Kryofixierung als Präparation für die Elektronenmikroskopie und andererseits die Kryokonservierung lebender Zellen und Gewebes. Beide Methoden erfordern das Arretieren physiologischer und molekularer Vorgänge. Dies wird durch tiefkalte Temperaturen erreicht. Wasser, als Grundbestandteil biologischer Materie, gefriert bei diesen Temperaturen normalerweise zu kristallinem Eis. Bei der Kryofixierung würden die Eiskristalle die zu untersuchende Struktur artifiziell verändern und bei der Kryokonservierung geht man davon aus, dass intrazelluläres Eis letal ist.

Während für die Kryofixierung hauptsächlich der Abkühlvorgang optimiert worden ist, wurde für die Kryokonservierung die Zusammensetzung des Mediums durch Kryoprotektiva verändert, um eine Reversibilität des Arrests zu erreichen.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Methoden der Kryofixierung, nach signifikanten Anpassungen der Protokolle, auch für die Kryokonservierung verwendet werden können. Eine der getesteten Methoden, das *self-pressurized rapid freezing*, führte dabei zu ebenso hohen Überlebensraten wie das beste getestete, etablierte Kryokonservierungsprotokoll und es hat gegenüber diesem den Vorteil, dass es trotz größerer Probe deutlich platzsparender arbeitet und sowohl die Probe als auch die Außenwelt durch die geschlossene Bauweise vor Kontaminationen geschützt ist.

Außerdem konnte mit Hilfe kryoelektronenmikroskopischer Untersuchungen gezeigt werden, dass Vitrifikation weder notwendig noch ausreichend für das Überleben von Zellen ist. Aufgrund der hierbei erzielten hohen räumlichen Auflösung, konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Eiskristallbildung sowohl intra- als auch extrazellulär toleriert werden kann, wenn entsprechende Kryoprotektiva verwendet werden. Dies widerlegt die bisherige Annahme, dass intrazelluläre Eiskristalle immer letal sind. Des Weiteren wird hierdurch nahegelegt, dass ein zusätzlich aktiver Mechanismus zur Kryoprotektion bestehen muss, als bloße

Verhinderung der Eiskristallbildung. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass Eiskristallwachstum für optimale Überlebensraten begrenzt werden muss.

Überraschend war, dass Vitrifikation in sogenannten Vitrifikationsprotokollen für die Kryokonservierung nicht notwendigerweise stattfindet, wodurch jedoch Vitrifikation als Konzept für die Kryokonservierung nicht ausgeschlossen ist. Zudem konnte anhand geschrumpfter, adhärenter Zellen gezeigt werden, dass Kryokonservierung ohne intrazelluläre Kryoprotektiva generell möglich ist. Daraus lässt sich schließen, dass es theoretisch möglich sein müsste, auch voll hydrierte Zellen reversibel zu kryofixieren, wenn entsprechend hohe Abkühl- und Aufwärmraten erzielt werden könnten, um diese komplett zu vitrifizieren.

7. Literatur

- Akhoondi, M., Oldenhof, H., Stoll, C., Sieme, H., & Wolkers, W. F. (2011). Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, *1808*(3), 642–8. doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.021
- Al-Amoudi, A., & Frangakis, A. S. (2013). Three-Dimensional Visualization of the Molecular Architecture of Cell–Cell Junctions In Situ by Cryo-Electron Tomography of Vitreous Sections. (C. Has & C. Sitaru, Eds.) *Methods in Molecular Biology*, *961*, 97–117. doi:10.1007/978-1-62703-227-8
- Al-Amoudi, A., Norlen, L. P. O., & Dubochet, J. (2004). Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *Journal of structural biology*, *148*(1), 131–5. doi:10.1016/j.jsb.2004.03.010
- Allen, T. D. (2008). *Introduction to Electron Microscopy for Biologists*. Manchester. Academic Press.
- Angell, C. A. (2002). Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions. *Chemical reviews*, *102*(8), 2627–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175262>
- Aston, N. S., Watt, N., Morton, I. E., Tanner, M. S., & Evans, G. S. (2000). Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Human & experimental toxicology*, *19*(6), 367–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962511>
- Ballarin, C., & Peruffo, A. (2012). Primary cultures of astrocytes from fetal bovine brain. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *814*, 117–26. doi:10.1007/978-1-61779-452-0_9
- Beier, A. F. J., Schulz, J. C., Dörr, D., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J., & Zimmermann, H. (2011). Effective surface-based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Cryobiology*, *63*(3), 175–85. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.06.003
- Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Locatelli, A., Perreau, C., & Terqui, M. (2000). Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, *41*(2), 116–24. doi:10.1006/cryo.2000.2273
- Bielanski, A. (2012). A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*, *77*(3), 467–82. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.043

- Bouchet-Marquis, C., Starkuviene, V., & Grabenbauer, M. (2008). Golgi apparatus studied in vitreous sections. *Journal of microscopy*, *230*(Pt 2), 308–16. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.01988.x
- Braulke, T., Hasilik, A., & Von Figura, K. (1988). Low temperature blocks transport and sorting of cathepsin D in fibroblasts. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, *369*(6), 441–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3202952>
- Bronshteyn, V. L., & Steponkus, P. L. (1993). Calorimetric studies of freeze-induced dehydration of phospholipids. *Biophysical journal*, *65*(5), 1853–65. doi:10.1016/S0006-3495(93)81250-5
- Cao, B., Zheng, Y., Xi, T., Zhang, C., Song, W., Burugapalli, K., Yang, H., et al. (2012). Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. *Biomedical microdevices*, *14*(4), 709–20. doi:10.1007/s10544-012-9651-x
- Cavalier, A., Spehner, D., & Humbel, B. (2008). *Handbook of Cryo-Preparation Methods for Electron Microscopy (Methods in Visualization)* (p. 704). CRC Press. Retrieved from <http://www.amazon.com/Handbook-Cryo-Preparation-Electron-Microscopy-Visualization/dp/0849372275>
- Chang, J. J., McDowall, A. W., Lepault, J., Freeman, R., Walter, C. A., & Dubochet, J. (1982). Freezing, sectioning and observation artefacts of frozen hydrated sections for electron microscopy. *Journal of microscopy*, *132*(1), 109–123.
- Chen, S., McDowall, A., Dobro, M. J., Briegel, A., Ladinsky, M., Shi, J., Tocheva, E. I., et al. (2010). Electron cryotomography of bacterial cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (39). doi:10.3791/1943
- Choi, J., & Bischof, J. C. (2010). Review of biomaterial thermal property measurements in the cryogenic regime and their use for prediction of equilibrium and non-equilibrium freezing applications in cryobiology. *Cryobiology*, *60*(1), 52–70. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.11.004
- Cobo, A., Bellver, J., De los Santos, M. J., & Remohí, J. (2012). Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertility and sterility*, *97*(1), 74–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.006
- Coopman, K. (2011). Large-scale compatible methods for the preservation of human embryonic stem cells: Current perspectives. *Biotechnology Progress*, *27*(6), 1511–1521. doi:10.1002/btpr.680
- Coticchio, G., Bromfield, J. J., Sciajno, R., Gambardella, A., Scaravelli, G., Borini, A., & Albertini, D. F. (2009). Vitrification may increase the rate of chromosome

- misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 19 Suppl 3, 29–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034421>
- Criado, E., Moalli, F., Polentarutti, N., Albani, E., Morreale, G., Menduni, F., & Levi-Setti, P. E. (2011). Experimental contamination assessment of a novel closed ultravitrification device. *Fertility and sterility*, 95(5), 1777–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.12.044
- Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Almiñana, C., Gil, M. A., Perals, M. L., Lucas, X., Roca, J., et al. (2008). Effect of the cryoprotectant concentration on the in vitro embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Cryobiology*, 56(3), 189–94. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.02.005
- Dabkowska, A. P., Foglia, F., Lawrence, M. J., Lorenz, C. D., & McLain, S. E. (2011). On the solvation structure of dimethylsulfoxide/water around the phosphatidylcholine head group in solution. *The Journal of chemical physics*, 135(22), 225105. doi:10.1063/1.3658382
- Day, J. G., & Stacey, G. N. (2007). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*.
- Day, John G, & Stacey, G. N. (2008). Biobanking. *Molecular biotechnology*, 40(2), 202–13. doi:10.1007/s12033-008-9099-7
- Dillon, J. P., Waring-Green, V. J., Taylor, A. M., Wilson, P. J. M., Birch, M., Gartland, A., & Gallagher, J. A. (2012). Primary human osteoblast cultures. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 816, 3–18. doi:10.1007/978-1-61779-415-5_1
- Dong, J., Malsam, J., Bischof, J. C., Hubel, A., & Aksan, A. (2010). Spatial distribution of the state of water in frozen mammalian cells. *Biophysical journal*, 99(8), 2453–9. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.035
- Dubochet, J, Booy, F. P., Freeman, R., Jones, A. V, & Walter, C. A. (1981). Low temperature electron microscopy. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 10, 133–49. doi:10.1146/annurev.bb.10.060181.001025
- Dubochet, J., & McDowall, A. (1981). Vitriification of pure water for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 124(3), 3–4.
- Dubochet, Jacques. (2012). Cryo-EM--the first thirty years. *Journal of microscopy*, 245(3), 221–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22457877>
- Dubochet, Jacques, Zuber, B., Eltsov, M., Bouchet-Marquis, C., Al-Amoudi, A., & Livolant, F. (2007). How to “read” a vitreous section. *Methods in cell biology*, 79(null), 385–406. doi:10.1016/S0091-679X(06)79015-X

- Dubochet, Jaques, Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W., & Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly reviews of biophysics*, *21*(2), 129–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3043536>
- Erk, I., Nicolas, G., Caroff, A., & Lepault, J. (1998). Electron microscopy of frozen biological objects: a study using cryosectioning and cryosubstitution. *Journal of microscopy*, *189*(Pt 3), 236–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588022>
- Fahy, G. M. (2007). Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. *Reproductive biomedicine online*, *14*(6), 709–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579984>
- Gey, G. O., Coffmann, W. D., & Kubicek, M. D. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, *12*, 264–265.
- Gomis, J., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gil, M. A., Parrilla, I., Angel, M. A., Vazquez, J. M., et al. (2013). Forskolin improves the cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. *Cryobiology*, *null*(null). doi:10.1016/j.cryobiol.2012.12.009
- Gordeliy, V. I., Kiselev, M. A., Lesieur, P., Pole, A. V., & Teixeira, J. (1998). Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures. *Biophysical journal*, *75*(5), 2343–51. doi:10.1016/S0006-3495(98)77678-7
- Grabenbauer, M., Geerts, W. J. C., Fernandez-Rodriguez, J., Hoenger, A., Koster, A. J., & Nilsson, T. (2005). Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation. *Nature methods*, *2*(11), 857–62. doi:10.1038/nmeth806
- Gualtieri, R., Mollo, V., Barbato, V., Fiorentino, I., Iaccarino, M., & Talevi, R. (2011). Ultrastructure and intracellular calcium response during activation in vitrified and slow-frozen human oocytes. *Human reproduction (Oxford, England)*, *26*(9), 2452–60. doi:10.1093/humrep/der210
- Hagedorn, M., Van Oppen, M. J. H., Carter, V., Henley, M., Abrego, D., Puill-Stephan, E., Negri, A., et al. (2012). First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. *Cryobiology*, *65*(2), 157–8. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.05.008
- Hagen, C., & Grünewald, K. (2008). Microcarriers for high-pressure freezing and cryosectioning of adherent cells. *Journal of microscopy*, *230*(Pt 2), 288–96. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.01987.x
- Hajnoczyk, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., & Thomas, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, *82*(3), 415–424. doi:10.1016/0092-8674(95)90430-1

- Han, H.-M., Huebinger, J., & Grabenbauer, M. (2012). Self-pressurized rapid freezing (SPRF) as a simple fixation method for cryo-electron microscopy of vitreous sections. *Journal of structural biology*, *178*(2), 84–7. doi:10.1016/j.jsb.2012.04.001
- Han, H.-M., Zuber, B., & Dubochet, J. (2008). Compression and crevasses in vitreous sections under different cutting conditions. *Journal of microscopy*, *230*(Pt 2), 167–71. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.01972.x
- Hayat, M. A. (2000). *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. (M. A. Hayat, Ed.) (4th ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- He, X., Park, E. Y. H., Fowler, A., Yarmush, M. L., & Toner, M. (2008). Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology*, *56*(3), 223–32. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.03.005
- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L., & Evans, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *The Journal of cell biology*, *81*(2), 275–300. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2110310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M., & Hirao, M. (2004). Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology*, *61*(2-3), 267–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662127>
- Hopkin, M. (2008). Biodiversity: frozen futures. *Nature*, *452*(7186), 404–5. doi:10.1038/452404a
- Hopkins, J. B., Badeau, R., Warkentin, M., & Thorne, R. E. (2012). Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions. *Cryobiology*, *65*(3), 169–78. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.05.010
- Iwayama, H., Hochi, S., Kato, M., Hirabayashi, M., Kuwayama, M., Ishikawa, H., Ohsumi, S., et al. (2004). Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle stage. *Zygote (Cambridge, England)*, *12*(4), 333–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15751543>
- Jain, J. K., & Paulson, R. J. (2006). Oocyte cryopreservation. *Fertility and sterility*, *86*(4 Suppl), 1037–46. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.07.1478
- Ji, L., De Pablo, J. J., & Palecek, S. P. (2004). Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. *Biotechnology and bioengineering*, *88*(3), 299–312. doi:10.1002/bit.20243

- Johnson, M. E., Malardier-Jugroot, C., & Head-Gordon, T. (2010). Effects of co-solvents on peptide hydration water structure and dynamics. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, *12*(2), 393–405. doi:10.1039/b915888j
- Kaidi, S., Donnay, I., Lambert, P., Dessy, F., & Massip, A. (2000). Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology*, *41*(2), 106–15. doi:10.1006/cryo.2000.2272
- Kanno, H., Speedy, R. J., & Angell, C. A. (1975). Supercooling of Water to -92{degrees}C Under Pressure. *Science (New York, N.Y.)*, *189*(4206), 880–1. doi:10.1126/science.189.4206.880
- Karnovsky, M. J. (1971). Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *Proc 11th Meeting Am SOC Cell Biol* (p. 146). New Orleans.
- Keene, D. R., & McDonald, K. (1993). The ultrastructure of the connective tissue matrix of skin and cartilage after high-pressure freezing and freeze-substitution. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, *41*(8), 1141–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8331280>
- Kim, K. S., Cho, C. H., Park, E. K., Jung, M.-H., Yoon, K.-S., & Park, H.-K. (2012). AFM-detected apoptotic changes in morphology and biophysical property caused by paclitaxel in Ishikawa and HeLa cells. *PloS one*, *7*(1), e30066. doi:10.1371/journal.pone.0030066
- Kohl, I., Mayer, E., & Hallbrucker, A. (2000). The glassy water – cubic ice system : a comparative study by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry, 1579–1586.
- Koshimoto, C., & Mazur, P. (2002). Effects of cooling and warming rate to and from -70 degrees C, and effect of further cooling from -70 to -196 degrees C on the motility of mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, *66*(5), 1477–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967213>
- Kremer, J. R., Mastrorarde, D. N., & McIntosh, J. R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of structural biology*, *116*(1), 71–6. doi:10.1006/jsbi.1996.0013
- Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., Trounson, A. O., & Shaw, J. M. (1999). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, *38*(2), 119–30. doi:10.1006/cryo.1999.2153
- Leis, A., Rockel, B., Andrees, L., & Baumeister, W. (2009). Visualizing cells at the nanoscale. *Trends in biochemical sciences*, *34*(2), 60–70. doi:10.1016/j.tibs.2008.10.011

- Leunissen, J. L. M., & Yi, H. (2009). Self-pressurized rapid freezing (SPRF): a novel cryofixation method for specimen preparation in electron microscopy. *Journal of microscopy*, 235(1), 25–35. doi:10.1111/j.1365-2818.2009.03178.x
- Lienhard, J. H. I., & Lienhard, J. H. V. (2002). *A Heat transfer textbook 3/e* (3rd ed.). Cambridge: Phlogiston Press.
- Liu, Y., Du, Y., Lin, L., Li, J., Kragh, P. M., Kuwayama, M., Bolund, L., et al. (2008). Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. *Cryo letters*, 29(4), 315–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137194>
- Lloyd, T. D. R., Orr, S., Skett, P., Berry, D. P., & Dennison, A. R. (2003). Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell and tissue banking*, 4(1), 3–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256864>
- Loerting, T., Winkel, K., Seidl, M., Bauer, M., Mitterdorfer, C., Handle, P. H., Salzmann, C. G., et al. (2011). How many amorphous ices are there? *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 13(19), 8783–94. doi:10.1039/c0cp02600j
- Lovelock, J. E. (1953a). The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta*, 11(1), 28–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13066452>
- Lovelock, J. E. (1953b). The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta*, 10(3), 414–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13058999>
- Lovelock, J. E. (1954). Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 47(1), 60–2. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1918821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Luo, D., Yu, C., He, L., Lu, C., & Gao, D. (2006). Development of a single mode electromagnetic resonant cavity for rewarming of cryopreserved biomaterials. *Cryobiology*, 53(2), 288–93. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.07.001
- Luyet, B. J., & Thoennes, G. (1938). THE SURVIVAL OF PLANT CELLS IMMERSSED IN LIQUID AIR. *Science (New York, N.Y.)*, 88(2282), 284–5. doi:10.1126/science.88.2282.284

- Mader, A., Elad, N., & Medalia, O. (2010). Cryoelectron tomography of eukaryotic cells. *Methods in enzymology*, *483*, 245–65. doi:10.1016/S0076-6879(10)83012-5
- Malardier-Jugroot, C., Bowron, D. T., Soper, A. K., Johnson, M. E., & Head-Gordon, T. (2010). Structure and water dynamics of aqueous peptide solutions in the presence of co-solvents. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, *12*(2), 382–92. doi:10.1039/b915346b
- Marko, M., & Hsieh, C.-E. (2007). Three-dimensional cryotransmission electron microscopy of cells and organelles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *369*, 407–29. doi:10.1007/978-1-59745-294-6_20
- Mastrorarde, D. N. (1997). Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *Journal of structural biology*, *120*(3), 343–52. doi:10.1006/jsbi.1997.3919
- Matsumura, K., Bae, J. Y., Kim, H. H., & Hyon, S. H. (2011). Effective vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *Cryobiology*, *63*(2), 76–83. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.05.003
- Mayer, E. (1985). Vitrification of pure liquid water. *Journal of Microscopy*, *140*(1), 3–15. doi:10.1111/j.1365-2818.1985.tb02656.x
- Mayer, E., & Brüggeller, P. (1980). Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. *Nature*, *288*, 569–571.
- Mayer, E., & Brüggeller, P. (1982). Vitrification of pure liquid water by high pressure jet freezing. *Nature*, *298*, 715–718.
- Mazur, P. (1963). KINETICS OF WATER LOSS FROM CELLS AT SUBZERO TEMPERATURES AND THE LIKELIHOOD OF INTRACELLULAR FREEZING. *The Journal of general physiology*, *47*, 347–69. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2195343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology*, *247*(3 Pt 1), C125–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383068>
- Mazur, P., & Seki, S. (2011). Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed at 610° to $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, *62*(1), 1–7. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.10.159
- McDowall, A. W., Chang, J. J., Freeman, R., Lepault, J., Walter, C. A., & Dubochet, J. (1983). Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *Journal of microscopy*, *131*(Pt 1), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6350598>

- Miyata, K., Hayakawa, S., Kajiwara, K., & Kanno, H. (2012). Supercooling and vitrification of aqueous glycerol solutions at normal and high pressures. *Cryobiology*, *65*(2), 113–6. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.05.002
- Moor, H. (1971). Recent progress in the freeze-etching technique. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *261*(837), 121–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4399199>
- Moor, H., Bellin, G., Sandri, C., & Akert, K. (1980). The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue. *Cell and tissue research*, *209*(2), 201–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6994890>
- Morató, R., Izquierdo, D., Paramio, M. T., & Mogas, T. (2008). Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*, *57*(2), 137–41. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.07.003
- Morris, C. B. (2007). Cryopreservation of animal and human cell lines. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *368*, 227–36. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_16
- Mottet, G., Tuffereau, C., & Roux, L. (1986). Reduced temperature can block different glycoproteins at different steps during transport to the plasma membrane. *The Journal of general virology*, *67* (Pt 9), 2029–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3018135>
- Muldrew, K., Novak, K., Yang, H., Zernicke, R., Schachar, N. S., & McGann, L. E. (2000). Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes. *Cryobiology*, *40*(2), 102–9. doi:10.1006/cryo.2000.2236
- Orlova, E. V., & Saibil, H. R. (2011). Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. *Chemical reviews*, *111*(12), 7710–48. doi:10.1021/cr100353t
- Pedro, P. B., Zhu, S. E., Makino, N., Sakurai, T., Edashige, K., & Kasai, M. (1997). Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology*, *35*(2), 150–8. doi:10.1006/cryo.1997.2034
- Pegg, D. E. (2002). The history and principles of cryopreservation. *Seminars in reproductive medicine*, *20*(1), 5–13. doi:10.1055/s-2002-23515
- Pegg, D. E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *368*, 39–57. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_3
- Pegg, D. E. (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*, *60*(3 Suppl), S36–44. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.02.003

- Perl, A., Qian, Y., Chohan, K. R., Shirley, C. R., Amidon, W., Banerjee, S., Middleton, F. A., et al. (2006). Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(40), 14813–8. doi:10.1073/pnas.0602678103
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, *25*(13), 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084
- Plattner, H., & Zingsheim, H. P. (1987). *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. Stuttgart/New York: Gustav Fisher Verlag.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, *164*(4172), 666. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18143360>
- Prentice-Biensch, J. R., Singh, J., Mapletoft, R. J., & Anzar, M. (2012). Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *10*, 73. doi:10.1186/1477-7827-10-73
- Rall, W. F. (1987). Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, *24*(5), 387–402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3652721>
- Rall, W. F., & Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, *313*(6003), 573–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3969158>
- Robinson, M. P., Wusteman, M. C., Wang, L., & Pegg, D. E. (2002). Electromagnetic re-warming of cryopreserved tissues: effect of choice of cryoprotectant and sample shape on uniformity of heating. *Physics in medicine and biology*, *47*(13), 2311–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164589>
- Roldan, E. R. S., Gomendio, M., Garde, J. J., Espeso, G., Ledda, S., Berlinguer, F., Del Olmo, A., et al. (2006). Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the Organization of Genetic Resource Banks. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *41 Suppl 2*, 82–92. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00772.x
- Sader, K., Studer, D., Zuber, B., Gnaegi, H., & Trinick, J. (2009). Preservation of high resolution protein structure by cryo-electron microscopy of vitreous sections. *Ultramicroscopy*, *110*(1), 43–7. doi:10.1016/j.ultramic.2009.09.004

- Saliem, M., Holm, F., Tengzelius, R. B., Jorns, C., Nilsson, L.-M., Ericzon, B.-G., Ellis, E., et al. (2012). Improved cryopreservation of human hepatocytes using a new xeno free cryoprotectant solution. *World journal of hepatology*, *4*(5), 176–83. doi:10.4254/wjh.v4.i5.176
- Salzmann, C., Radaelli, P., Mayer, E., & Finney, J. (2009). Ice XV: A New Thermodynamically Stable Phase of Ice. *Physical Review Letters*, *103*(10), 105701. doi:10.1103/PhysRevLett.103.105701
- Sawicka, D., Brzezińska, J., & Bednarczyk, M. (2011). Cryoconservation of embryonic cells and gametes as a poultry biodiversity preservation method. *Folia biologica*, *59*(1-2), 1–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21614959>
- Seki, S., & Mazur, P. (2009). The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*, *59*(1), 75–82. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.04.012
- Seki, S., & Mazur, P. (2012). Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution. (J. M. Baltz, Ed.) *PloS one*, *7*(4), e36058. doi:10.1371/journal.pone.0036058
- Selle, C., & Pohle, W. (1998). Fourier transform infrared spectroscopy as a probe for the study of the hydration of lipid self-assemblies. II. Water binding versus phase transitions. *Biospectroscopy*, *4*(4), 281–94. doi:10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:4<281::AID-BSPY6>3.0.CO;2-5
- Shaw, J. M., Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., & Trounson, A. O. (1997). Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*, *35*(3), 219–29. doi:10.1006/cryo.1997.2043
- Shirazi, A., Soleimani, M., Karimi, M., Nazari, H., Ahmadi, E., & Heidari, B. (2010). Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*, *60*(2), 204–10. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.11.002
- Snyder, J. A., & McIntosh, J. R. (1976). Biochemistry and physiology of microtubules. *Annual review of biochemistry*, *45*, 699–720. doi:10.1146/annurev.bi.45.070176.003411
- Spindler, R., Wolkers, W. F., & Glasmacher, B. (2009). Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation. *Cryo letters*, *32*(2), 148–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21766144>
- Studer, D., Humbel, B. M., & Chiquet, M. (2008). Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure

- and atomic resolution. *Histochemistry and cell biology*, 130(5), 877–89. doi:10.1007/s00418-008-0500-1
- Taylor, K. A., & Glaeser, R. M. (1974). Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science (New York, N.Y.)*, 186(4168), 1036–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4469695>
- Taylor, K. A., & Glaeser, R. M. (1976). Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. *Journal of ultrastructure research*, 55(3), 448–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/933264>
- Tedder, R. S., Zuckerman, M. A., Goldstone, A. H., Hawkins, A. E., Fielding, A., Briggs, E. M., Irwin, D., et al. (1995). Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*, 346(8968), 137–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7603227>
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., & Callesen, H. (1995). Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified in vitro produced bovine blastocysts. *The Veterinary record*, 137(26), 672. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8966976>
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., & Callesen, H. (1996). Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal reproduction science*, 45(3), 191–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227922>
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T., & Callesen, H. (1998). Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular reproduction and development*, 51(1), 53–8. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V
- Webster, P., & Webster, A. (2007). Cryosectioning Fixed and Cryoprotected Biological Material for Immunocytochemistry. *Methods in Molecular Biology* (pp. 257–289). doi:10.1007/978-1-59745-294-6_13
- Wowk, B. (2010). Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 60(1), 11–22. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.05.007
- Wusteman, M. C., Pegg, D. E., Wang, L.-H., & Robinson, M. P. (2003). Vitrification of ECV304 cell suspensions using solutions containing propane-1,2-diol and trehalose. *Cryobiology*, 46(2), 135–145. doi:10.1016/S0011-2240(03)00019-1
- Yakovlev, S., & Downing, K. H. (2011). Crystalline ice as a cryoprotectant: theoretical calculation of cooling speed in capillary tubes. *Journal of microscopy*, 243(1), 8–14. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03498.x

8. Danksagung

Prof. Dr. Philippe Bastiaens danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, für kritische Diskussionen, sowie für die Möglichkeit die Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Prof. Dr. Frank Wehner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens der Arbeit, sowie häufigen kritischen Diskussionen und Unterstützungen während der Anfertigung der Arbeit.

Dr. Markus Grabenbauer danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Zuteilung des überaus interessanten Themas sowie interessanten wissenschaftlichen Diskussionen.

Den Mitgliedern des Kryo-Projektes, insbesondere den ständigen Mitgliedern Jens Christmann, Lale Azer und Dr. Hongmei Han, danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, angeregte Diskussionen sowie die Unterstützung bei gemeinsam durchgeführten Experimenten.

Dr. Oliver Hofnagel danke ich für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten, insbesondere bei den zeitaufwändigen kryoelektronischen Aufnahmen und den damit einhergehenden Diskussionen.

Dr. Sven Müller danke ich für die Hilfe bei den lichtmikroskopischen Arbeiten.

Dr. Ingrid Vetter danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Röntgenbeugungsexperimente und die Hilfe bei der Durchführung dieser.

Sabine Dongard danke ich für ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie für die Aufrechterhaltung der Laborordnung.

Anette Langerak und Petra Glitz danke ich für die Erhaltung der Zellkulturen und die Bereitstellung der Zellen für die Experimente.

Der Werkstatt des Institutes, insbesondere Bernd Fieber, danke ich für die Durchführung diverser Metallarbeiten.