Vergleichende Untersuchungen zur Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen: Verbesserte funktionserhaltende Kryokonservierung für therapeutisch relevante Zellsysteme

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

- Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften -

der Universität des Saarlandes

von

Dipl. Biol. Julia Christiane Schulz

Saarbrücken

2011

Tag des Kolloquiums:	25. Juni 2012
Dekan:	Prof. Dr. W. F. Maier
Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Zimmermann
	Prof. Dr. E. Heinzle
	Prof. Dr. C. J. Kirkpatrick
Vorsitz:	Prof. Dr. M. Schmitt
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. G.-W. Kohring

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 5

2. Einführung 6

3. Grundlagen 11

3.1 Zellschädigungen beim Einfrieren und Auftauen 11

3.2 Kryoprotektive Substanzen und Kryomedien 13

3.3 Effekte während der Kryokonservierung mit langsamen Kühlraten und während der Verglasung 17

3.4 Stand der Forschung: Einfrieren von therapeutisch relevanten Zellen, insbesondere PBMC/hESC 20

4. Material und Methoden 23

4.1 Techniken der Zellkultur 23

4.1.1 Isolation primärer Zellsysteme 23

4.1.2 Kultur und Differenzierung humaner Stamm- und Vorläuferzellen 24

4.1.3 Vitalitätstests und Funktionalitätsnachweise 28

4.1.4 Mikroskopietechniken: REM und MPLSM 33

4.2 Kryokonservierung 34

4.2.1 Kryokonservierung von adulten Stamm- und Vorläuferzellen in Suspension mittels langsamer Kühlrate 34

4.2.2 Kryokonservierung von humanen, embryonalen Stammzellen mit langsamen Kühlraten in Suspension 35

4.2.3 Kryokonservierung von adhärenten, humanen embryonalen Stammzellen mit langsamen Kühlraten und Vitrifikation 35

4.2.4 Kryokonservierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) 36

5. Resultate 38

5.1 Entwicklung funktionserhaltender Kryoprozeduren von humanen Stamm- und Vorläuferzellen 38

5.1.1 Vergleichende Untersuchungen zur *in vitro* Kultur embryonaler Stammzellen 38

5.1.2 Untersuchung neuer Kultivierungsansätze von humanen embryonalen Stammzellen. 45

5.1.3 Vergleichende Untersuchungen zur Kryokonservierung humaner Stamm- und Vorläuferzellen 56

5.1.4 Stabilitätsuntersuchungen und Integration in den Ablauf von Biobanken 79

5.2 Übertragung spezifischer Kryoprozeduren und –workflows auf Zellen des Immunsystems 105

5.2.1 Untersuchungen zur Substitution der Serumbestandteile des Kryomediums 105

5.2.2 Vergleichende Untersuchung zur xenofreien Kryokonservierung von Zellen des Immunsystems für immunologische Untersuchungen im Rahmen der HIV-Vakzinforschung 109

5.2.3 Evaluierung des neu entwickelten Kryosubstrates mit Zellen des Immunsystems unter xenofreien Bedingungen 114
6. Diskussion 117
7. Literaturverzeichnis 136
8. Anhang 146

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Strategien zur funktionserhaltenden Kryokonservierung von differenzierten Immun- und differenzierbaren Stammzellen im Hinblick auf eine standardisierte therapeutische Verwendung zu entwickeln. Dazu wurden die dreidimensionale Struktur von humanen embryonalen Stammzell (hESC) Kolonien und der Einfluss der notwendigen Mausfibroblasten untersucht. Auch wurden die Effekte unterschiedlicher Zellpräparationen, der Zell-Substrat-Adhäsion und verschiedener Kühlraten auf die Membranintegrität von hESCs während der Kryokonservierung evaluiert. Innovative Mikroskopiemethoden ermöglichten die Untersuchung der Mechanismen, die während des Einfrierens mit reduzierter DMSO-Konzentration und in serumfreien Medien auf die Stammzellen wirken.

Mit diesen Erkenntnissen wurde ein oberflächenbasiertes, serumfreies Vitrifikationsprotokoll etabliert, das die Vitalität und Pluripotenz nahezu vollständig erhält und für die Kryokonservierung einer großen Anzahl an hESCs geeignet ist. Weiterhin wurde ein proteinfreies, chemisch definiertes Kryomedium gefunden, das die Eigenschaften und Funktion von adulten Stammzellen, sowie von Immunzellen aus dem Blut auch während einer Langzeitlagerung konserviert.

Um eine sichere Aufbewahrung der Proben technisch zu gewährleisten, wurde ein neues Kryoröhrchen, das die Speicherung der Probeninformation mittels integrierten Speicherchips direkt an den Zellen ermöglicht, auf Funktionalitätserhalt und Überlebensrate der Zellen evaluiert.

Abstract

Aim of this work was the development of new strategies for the cryopreservation of differentiated blood cells and human stem cells that still can evolve into various cell types with regard to standardized, therapeutic applications. Therefore, the three-dimensional structure of human embryonic stem cell (hESC) colonies and the influence of murine embryonic fibroblasts, necessary for a stable cultivation of hESCs, were investigated. Additionally, the effect of cell preparation methods, cell-substrate-contact, and different cooling rates on membrane integrity of hESCs was analyzed. Innovative optical methods enabled the observation of damage mechanisms during cryopreservation of cells with reduced DMSO concentration as well as in serum-free media.

Based on these results, a surface-based and serum-free vitrification protocol maintaining viability and pluripotency could be established for the bulk cryopreservation of hESCs. Furthermore, use of a protein-free and fully chemically defined cryopreservation medium resulted in preserved cell function and cell characteristics for different human adult stem and blood cells, even after long-term storage.

To provide technology for a safe and controlled storage of biological material, a new cryovial was evaluated that allows data storage of sample information directly connected to the cells. For this, cell functionality and viability were investigated after cryopreservation in these cryovials.

2. Einführung

Die Zelle ist die kleinste lebensfähige und funktionelle Einheit aller Lebewesen. Ein erwachsener Mensch besteht aus 100 Billionen (10^{14}) Zellen, die sich in über 200 unterschiedliche Zelltypen aufteilen. Jede Zelle des menschlichen Körpers wird durch ihre spezifische Funktion definiert, die durch das biologische Milieu und das Genom der Zelle geprägt wird: so transportieren Erythrozyten Sauerstoff von der Lunge in jeden Teil des Körpers und ermöglichen Neuronen die Erregungsleitung innerhalb des Körpers. Nur diese Spezialisierung ermöglicht den Aufbau eines funktionierenden multizellulären Organismus. Für die Funktionalität einer Zelle besitzt die Zellmembran eine entscheidende Bedeutung. Sie bildet einen abgeschlossenen Reaktionsraum, das Zytoplasma, in dem der Zellmetabolismus und die Proteinsynthese stattfinden können. Außerdem können sich durch diese semipermeable Barriere Konzentrationsgradienten aufbauen, die das Ausbilden eines Membranpotentials und somit die Funktion von z.B. Neuronen und Herzmuskelzellen ermöglicht. Zusätzlich befinden sich auf und in der Membran Rezeptoren und Ionenkanäle, die eine Signaltransduktion und somit eine Reaktion der Zelle auf äußere Einflüsse gewährleistet. Auch für viele Zellcharakteristika, wie zum Beispiel Zellteilung, Zellbewegung und Zelladhäsion ist die Membranfunktionalität entscheidend.

Alle unterschiedlichen Zelltypen entstehen aus nur einer einzigen Ausgangszelle: der befruchteten Zygote. Im Blastozystenstadium enthält diese sogenannte embryonale Stammzellen (hESCs), die durch asymmetrische Teilung Tochterzellen bilden, aus denen Zellen aller drei Keimblätter (Reubinoff et al., 2000; Odorico et al., 2001) und somit alle Zellen des Körpers entstehen können (Pluripotenz). Außerdem besitzen sie das Potential zur Selbsterneuerung und eine hohe Telomeraseaktivität, wodurch sie sich prinzipiell unbegrenzt vermehren können. Durch diese Eigenschaften stehen Stammzellen seit der ersten Isolierung von hESCs 1994 (Bongso et al., 1994) und der Etablierung einer permanenten Kultur 1998 (Thomson et al., 1998) im Mittelpunkt der Forschung und stellen eines der vielversprechendsten Gebiete der Biotechnologie dar. Dabei wachsen hESCs *in vitro* in dreidimensionalen, eng gepackten Zellkolonien, die normalerweise $3x10^4$ bis $5x10^4$ Zellen enthalten (Hunt, 2007) und werden auf einem Monolayer aus mitotisch inaktivierten, embryonalen Mausfibroblasten (PMEF) kultiviert, um die Pluripotenz der Zellen zu erhalten.

Durch das außergewöhnliche Potential der hESCs rückt eine mögliche Entwicklung neuer Methoden zur Reparatur oder zum Ersatz von Zellen und Geweben, die durch Verletzungen oder Krankheiten geschädigt wurden, in greifbare Nähe (Daley et al., 2003; Henningson et al., 2003). Somit könnten mit Hilfe der Stammzelltherapie in Zukunft ernste Erkrankungen, wie zum Beispiel Herzischämie oder Morbus Parkinson behandelt werden (Lerou und Daley, 2005; Cohen et al., 2006).

Eine direkte Transplantation dieser Zellen ist aufgrund ihres tumorbildenden Potentials und der notwendigen Co-Kultur mit murinen Fibroblasten allerdings nicht möglich (Thomson et al., 1998). Außerdem werden die Zellen nicht als körpereigen erkannt, so dass es zu Abstoßungsreaktionen kommen würde und die Patienten ihr Leben lang Immunsuppressiva mit starken Nebenwirkungen einnehmen müssten. Ihre Kultivierbarkeit und ihre Fähigkeit, sich in jeden somatischen Zelltypen zu entwickeln, macht sie aber zu einer idealen Quelle für Zellersatztherapien und zu einem optimalen Modellsystem für toxikologische Screenings. Zusätzlich zur kontrollierten Differenzierung der Zellen benötigen kommerzielle Anwendungen von hESCs wie zum Beispiel im Bereich der Medikamentenentwicklung eine Hochskalierung der aktuellen Prozessierungsmethoden: ein Gebiet, das nicht nur hohe Anforde-

rungen an die Bioprozesstechnik, sondern auch an die Produktion von Zellen stellt, die für einen kommerziellen Nutzen geeignet sind (Thomson, 2007).

Allerdings ist es notwendig, für die Erzeugung von hESCs Embryonen zu zerstören, daher unterliegt die Forschung mit diesen Zellen in vielen Ländern, auch in Deutschland (Embryonenschutzgesetz, ESchG), strengen ethischen Beschränkungen. So wurden auch alle in dieser Arbeit dargestellten Versuche mit hESCs gemäß der 16. und 44. Genehmigung des Robert-Koch-Instituts (§6 des Stammzellgesetzes, StZG) durchgeführt. Alternativ könnten induziert pluripotente Zellen (iPS) eingesetzt werden, die aus somatischen Zellen von Spendern gewonnen und reprogrammiert werden. Diese zeigen jedoch ebenfalls, wie embryonale Stammzellen, die Fähigkeit zur Teratombildung. Außerdem enthalten sie aufgrund der Nutzung von Lenti- oder Retroviren bei der Reprogrammierung Transgene, die bei einer Reaktivierung zu einer Tumorgenese führen könnten (Okita et al., 2007).

Auch im adulten Körper befinden sich noch Stammzellen, die aus Knochenmark, Fettgewebe oder Nabelschnurblut isoliert und für mehrere Passagen kultiviert werden können (Asahara et al., 1997). Diese Zellen gelten als multipotent, können also vor allem Zellen ihres Ursprungsgewebes bilden und sorgen dadurch in einem spezifischen Bereich des Körpers für die Zellerneuerung bzw. die Regeneration nach Verletzungen (Watt und Hogan, 2000; Schöler, 2007). Diese ursprüngliche Definition wird allerdings in den letzten Jahren kontrovers diskutiert, da mehrfach auch die Transdifferenzierung adulter Stammzellen in Zelltypen eines anderen Keimblattes beobachten wurde (Wagers und Weissman, 2004; Phinney und Prockop, 2007). Dies würde ein deutlich größeres Potential dieser Zellen implizieren und könnte zu einer Erweiterung ihrer therapeutischen Anwendbarkeit führen.

Da adulte Stamm- und Vorläuferzellen ohne große Schädigungen für den Spender entnommen werden können, ist die Forschung mit diesen Zellen nicht signifikant beschränkt. Die therapeutische Verwendung adulter Stammzellen kombiniert die Vorteile einer körpereigenen (autologen) Zellquelle mit dem Differenzierungspotential multipotenter Stammzellen, so dass keine zusätzliche Behandlung der Patienten mit Immunsuppressiva nötig ist. Daher könnten bei einer Vielzahl an Krankheitsbildern, wie z.B. bei Knorpelschäden oder Myokardinfarkt, adulte Stammzellen aus Gewebe des Betroffenen isoliert, diese *in vitro* in den benötigten Zelltyp differenziert und wieder in den Patienten retransplantiert werden, ohne dass eine Immunreaktion zu erwarten ist. Verschiedene Ansätze dazu werden derzeit in klinischen oder präklinischen Studien getestet (Korbling und Estrov, 2003). Allerdings können nur geringe Zellmengen durch ein meist invasives Verfahren isoliert werden und die Zellcharakteristika variieren von Spender zu Spender. Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmarkstransplantationen werden bereits routinemäßig durchgeführt, um Patienten mit Leukämie oder anderen Krankheiten des Blut- und Immunsystems zu behandeln (Goldman et al., 1988; Stuart, 1993). Dabei wird, bei Übereinstimmung der HLA-Typen, auch eine Übertragung der Zellen auf vom Spender unterschiedliche Patienten durchgeführt.

Insgesamt können also alle Zelltypen im Körper in zwei große Gruppen eingeteilt werden: in differenzierbare und differenzierte Zellen.

Eine Langzeitkultivierung kann die Zellcharakteristik verändern und erhöht das Risiko einer Kontamination mit Viren und Mykoplasmen. Zusätzlich ist bei adulten Stammzellen während der Kultivierung *ex vivo* eine sogenannte Seneszenz, d.h. die Alterung der Zellen zu beobachten (Bonab et al., 2006). Dies stellt die Stammzellforschung vor erhebliche Probleme, da ein gut definierter und sicherer Bestand von therapeutisch relevanten Stammzellen entscheidend ist, um standardisierte und reproduzierbare Resultate erzielen zu können (Stacey, 2008). Zusätzlich ist für zukünftige Therapieansätze eine ständige Verfügbarkeit an qualitativ hochwertigen Stammzellen oder daraus abgeleiteten Zellen

nötig (Gearhart, 1998). Auch für die retrospektive Untersuchung von Patientenproben ist die sichere Aufbewahrung von biologischem Material von entscheidender Bedeutung, um Rückschlüsse auf einen Krankheitsverlauf zu ermöglichen bzw. Medikamententests an spezifischem Probenmaterial durchführen zu können.

Der Aufbau von Biobanken für die Konservierung von Stammzell- bzw. Patientenproben würde eine Lösung für dieses Problem darstellen, da eine kryogene Lagerung der Zellen unterhalb der Glasübergangstemperatur von -130 °C eine dauerhafte Konservierung der Zellen ohne Vitalitätsverluste und genetische Veränderungen der Proben ermöglicht, indem Stoffwechsel und chemische Reaktionen nahezu eingestellt werden (Mazur et al., 1972; Friedler et al., 1988). Unter der Voraussetzung einer gleichbleibenden, ionisierenden Hintergrundstrahlung von 0,1 rd/Jahr konnte Mazur für Mäuseoozyten berechnen, dass erst nach 200 Jahren Lagerung bei -196°C eine Schädigung der Zellen auftreten würde (Mazur, 1980). Aber die Etablierung von sicheren Lagerbedingungen von gut charakterisierten Stammzellen und von Einfrierprotokollen für eine zuverlässige Reaktivierung von Stammzellen steht noch ganz am Anfang.

Bei vielen ausdifferenzierten Zellen ermöglicht der aktuelle Stand der Einfriermethoden bereits eine gute Konservierung der Funktionalität und Vitalität. Allerdings sind die momentan angewandten Methoden zur Kryokonservierung von hESCs nicht standardisiert und besitzen nur eine geringe Effizienz: so garantieren selbst kommerzielle Stammzellanbieter wie das WiCell Research Institute nur eine Ausbeute von 0,1–1% und die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse ist sehr gering. Außerdem benötigen hESCs unter normalen Bedingungen den Zell-Zell-Kontakt untereinander zum Überleben. Daher werden sie auch, im Gegensatz zu permanenten Zelllinien, als dreidimensionale Koloniefragmente kryokonserviert. Doch durch diese Struktur kann eine optimalen Wärmeleitung und Diffusion der Kryoprotektiva zwischen dem Kolonieinneren und –äußeren nur schwer erreicht werden (Mazur et al., 1972; Pegg, 2001). Dies erhöht das Risiko einer Eiskristallbildung innerhalb der Kolonie und führt damit zum Aufsprengen der Zell-Zell-Kontakte und beträchtlichen Zellschädigungen. Zusätzlich ist der Einfluss der PMEF-Zellen auf die Koloniestruktur und Stammzellmorphologie noch nicht verstanden.

Obwohl vor allem adulte, hämatopoetische Stammzellen, aus denen sich Blutzellen bilden, zur Behandlung von Leukämiepatienten bereits häufig erfolgreich eingesetzt werden, sind Knochenmarkbanken hauptsächlich virtuell aufgebaut und speichern Informationen bezüglich der HLA-Typisierung möglicher Spender, anstatt die benötigten hämatopoetischen Stammzellen selbst zu lagern. Nabelschnurblutbanken sind weiter verbreitet und werden auch kommerziell betrieben, so dass Patienten die Möglichkeit gegeben wird, autologe Stammzellen für den Fall zu lagern, dass diese zur Behandlung einer Erkrankung benötigt werden. Auch der Aufbau von Biobanken zur Aufbewahrung von zum Beispiel Tumormaterial für retrospektive Untersuchungen gewinnt immer mehr an Bedeutung.

Allerdings basieren aktuelle Kryoprotokolle auf der Verwendung von DMSO in einer hohen Konzentration (normalerweise 10%) und tierischem Serum (FBS) als Kryoprotektiv, um eine tödliche Eiskristallbildung in den gefrorenen Zellen zu vermeiden. Die Verwendung von FBS ist jedoch ein ständiger Kritikpunkt der zuständigen Regulierungsbehörden (Korhonen, 2007), da es die Gefahr mit sich bringt, potentiell infektiöse Viren und Erreger auf den Menschen zu übertragen (Will et al., 1996; Bradley, 2004). Zusätzlich kann eine Übertragung von Pathogenen zwischen den Proben durch den flüssigen Stickstoff während der Lagerung nicht ausgeschlossen werden (Bielanski et al., 2003; Hubalek, 2003). FBS enthält außerdem eine natürliche und undefinierte Mischung aus Wachstumsfaktoren, Hormonen und Nährstoffen, die das Überleben und die Proliferation der Zellen

beeinflussen. Die schwankende Zusammensetzung dieses Naturproduktes macht daher eine standardisierte Zellpräparation und Lagerung fast unmöglich. Deshalb sind serum- oder proteinfreie Einfrier- und Zellkulturbedingungen für eine spätere therapeutische Anwendung und retrospektive Untersuchungen dringend erforderlich. Auch müssen kurz- sowie mittelfristige Effekte des Einfrierens auf die zellulären Eigenschaften noch untersucht werden.

Zusätzlich bestehen noch einige offene Fragen bezüglich der Wirkung von DMSO auf die Zellen, da DMSO bei falscher Anwendung zum Zelltod während des Einfrierens oder Auftauens führen kann. Darüberhinaus wurde wiederholt gezeigt, dass DMSO per se im Verdacht steht, eine Differenzierung von Stammzellen auszulösen (Adler et al., 2006). Daher ist es von großer Bedeutung, DMSO durch Kryomedien mit einer geringeren zellulären Toxizität zu ersetzen. In diesem Zusammenhang wurde bereits in Studien berichtet, dass kleinere Moleküle wie Sorbitol oder 1,6-Anhydroglukose die Proteinstruktur stabilisieren können und damit die Überlebensrate der Zellen nach dem Auftauen verbessern (Noventa-Jordao et al., 1999). Dies eröffnet Ansatzpunkte für eine Reduzierung der DMSO-Konzentration.

Auch während der Kryokonservierung übernimmt die Zellmembran entscheidende Schutzfunktionen der intrazellulären Strukturen gegen Schädigungen durch Eiskristallbildung und fungiert als Barriere gegen hohe Konzentrationsschwankungen. Auf sie wirken beim Einfrieren und Auftauen starke mechanische und osmotische Kräfte, so dass die Phospholipid-Doppelschicht und die darin integrierten Membranproteine und Rezeptoren bei einer suboptimalen Kryokonservierung erheblich geschädigt werden können. Durch den Verlust der Membranintegrität kann es zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität kommen. Außerdem können Strukturveränderungen der Rezeptoren und Ionenkanäle sowohl die Funktionalität der Zelle als auch die Signaltransduktion beeinflussen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe innovativer Mikroskopiemethoden ein großes Augenmerk auf die Membranstruktur und deren Funktionalität gelegt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Probleme bei der Kryokonservierung von hESCs zu verstehen, indem die dreidimensionale Koloniestruktur und die Interaktion der für die Kultur notwendigen PMEF mit den hECS untersucht werden. Um die Konservierung dieser Zellen zu verbessern, sollten zunächst enzymatische und mechanische Ablösemethoden im Bezug auf die Schädigungen der Membranintegrität und Adhäsionsfunktionalität verglichen werden. Zusätzlich sollten neben etablierten Kryoprotokollen für Zellen in Suspension auch oberflächenbasierte Techniken zur Lagerung der komplexen hESCs untersucht werden. Das adhärente Einfrieren bringt den Vorteil, dass die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Verbindungen der Zellen und Kolonien während des Einfrier- und Auftauprozesses in ihrem physiologischen Zustand, adhärent auf der Oberfläche, verbleiben und somit Stressreaktionen minimiert werden (Hornung et al., 1996).

Zusätzlich sollten neue Möglichkeiten zur Vermeidung von tierischen Bestandteilen während der Kultivierung und Kryokonservierung erarbeitet werden, um eine standardisierte Lagerung und spätere medizinische Verwendung der Zellen zu ermöglichen. Diese Untersuchungen fokussierten sich dabei sowohl auf die Effekte einer xenofreien als auch einer DMSO-reduzierten Kryokonservierung auf die Membranintegrität und Zellfunktionalität.

Dazu wurden neben Langzeituntersuchungen auch Kristallisationsprozesse während des Einfrier- und Auftauvorgangs mit unterschiedlichen kryoprotektiven Substanzen untersucht. Dies soll das Verständnis der optimalen Lagerbedingungen sowie die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Zellen erhöhen. Um dies zu ermöglichen, wurde neben einem neuartigen kryomikroskopischen Auf-

bau in Verbindung mit Multiphoton-Laser-Raster-Mikroskopie auch ein paralleles Videomikroskopiesystem und elektronenmikroskopische Methoden verwendet.

Um die Ergebnisse sowohl auf ein möglichst breites Spektrum an Zellen übertragen zu können und die Erkenntnisse statistisch abzusichern, sollten die Untersuchungen zusätzlich an primären Suspensionszellen aus dem Blut durchgeführt werden, so dass alle möglichen Zellgruppen (differenzierbar und differenziert) und Adhäsionszustände (nicht adhärent, adhärent als Monolayer und adhärent als dreidimensionale Kolonien) in einem integrierten, systematischen Ansatz berücksichtigt werden konnten.

Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) sind ein wichtiges Instrument in der Impfstoffforschung und in epidemiologischen Studien. In T-Zell-basierten Nachweismethoden wird die spezifische Reaktivität dieser Zellen auf Antigene als Indikator für die Effektivität von Impfstoffen oder die Evolution von Krankheiten genutzt. Auch retrospektive Untersuchungen und Multicenter-Studien machen die Entwicklung von standardisierten, langzeitstabilen und effizienten Kryoprotokollen in diesem Bereich notwendig. Die ethisch unbedenkliche Gewinnung der Zellen von einer Vielzahl unterschiedlicher Spender und die Möglichkeit zur hochsensiblen Bestimmung von Funktionalitätsänderungen bereits bei geringsten äußeren Einflüssen, macht dieses Zellsystem zu einem optimalen Modell und ermöglicht eine statistischen Absicherung der Ergebnisse.

Neben Protokollen zu einer sicheren und verlustfreien Aufbewahrung ist für eine funktionierende Kryobank auch die technische Wiederauffindbarkeit und Nachverfolgung jeder einzelnen Probe ein entscheidender Aspekt. Da heutige Kryobanken diese Verwechselungssicherheit und Kontrolle allerdings nicht vollständig gewährleisten können, wurde ein neues Kryosubstrat mit integriertem Datenspeicherchip entwickelt, das auch bei Tieftemperatur seine volle Funktionalität besitzt (Ihmig et al., 2009). Dieses Substrat ermöglicht eine Speicherung der Probeninformation und Bearbeitungsprotokolle gemeinsam mit den Zellen im Kryotank, zusätzlich ist durch Kombination mit einer entsprechenden Lagerungstechnologie und Tankinfrastruktur eine permanente Positionsbestimmung der Proben gewährleistet. Eine kommerzielle Verbreitung dieser Substrate benötigt allerdings zunächst eine genaue Überprüfung der Materialeigenschaften und eine Bestätigung der Biokompatibilität. Außerdem muss sichergestellt werden, dass der Einsatz der neuen Substrate die Zelleigenschaften nicht beeinflusst. Dazu sollten in dieser Arbeit neben materialwissenschaftlichen Untersuchungen auch die Vitalität, die Rückgewinnung der Zellen und der Funktionalitätserhalt mit Hilfe von immunologischen Untersuchungen an PBMCs bestimmt werden.

Die systematischen Analysen in dieser Arbeit, basierend auf mehreren differenzierbaren Stammzelltypen und differenzierten Zellen des Immunsystems mit therapeutischer Relevanz, sollten die Erstellung neuer Konzepte und Methoden für die standardisierte und langzeitstabile Ablage von Zellen in Biobanken vorbereiten. Es war der Anspruch, dass die hier entwickelten Protokolle und Techniken für zukünftige Biobanken eine fundierte Grundlage darstellen, um stammzellbasierte Therapien und T-Zell-basierte Nachweismethoden effektiv und sicher zu gestalten.

3. Grundlagen

3.1 Zellschädigungen beim Einfrieren und Auftauen

Tierische Zellen sind von Natur aus nicht in der Lage, kryogene Temperaturen zu überleben. Wird eine wässrige Lösung abgekühlt, so bilden sich Eiskristalle aus reinem, kristallinem Wasser (Nukleation). Die Nukleation stellt dabei einen stochastischen Effekt dar, wobei die Wahrscheinlichkeit der Eiskristallisation mit der Temperaturabnahme und dem Volumen zunimmt. Dies führt dazu, dass in den meisten Fällen die Nukleation im Extrazellulärraum beginnt, nicht innerhalb der Zelle. Da Eis nahezu kein Potential besitzt, Stoffe zu lösen, erhöht sich während der fortschreitenden Eiskristallisation beständig die Osmolarität in der verbleibenden, flüssigen Phase bis zum eutektischen Punkt (Abbildung 1). An diesem Punkt geht die Lösung direkt von der flüssigen in die feste Phase über und das komplette System ist kristallisiert.

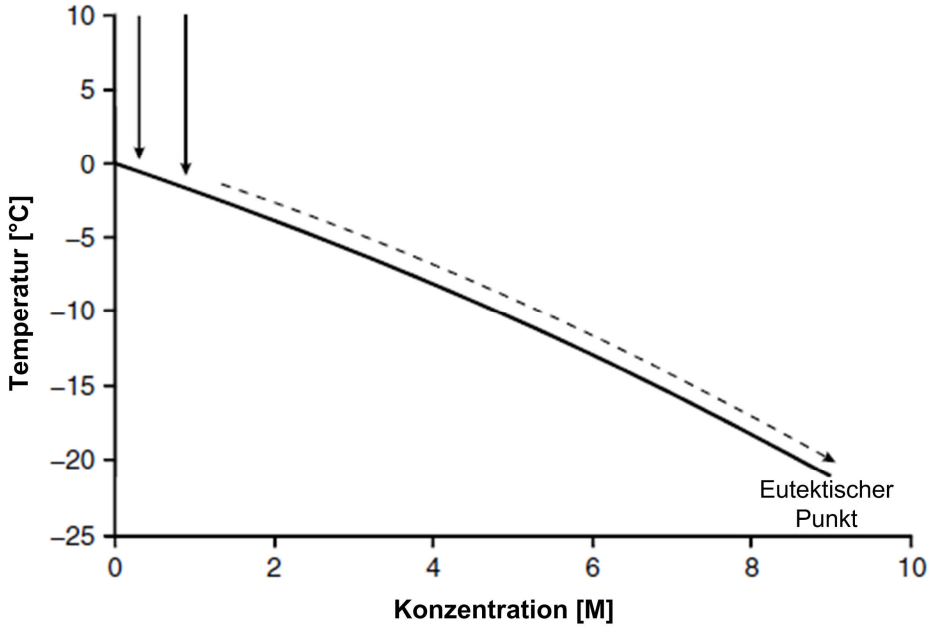


Abbildung 1: Darstellung der Liquiduskurve eines NaCl–H_2O Phasendiagramms während des Einfriervorganges (Abbildung verändert aus Muldrew et al., 2004).

Die Pfeile kennzeichnen die Anfangskonzentration einer isotonischen (0,3M) bzw. dreifach isotonischen Lösung (0,9M). Werden diese Lösungen abgekühlt, bleibt die Zusammensetzung konstant, bis die Liquiduskurve erreicht wird. Die Liquiduskurve trennt den Bereich der rein flüssigen Phase vom Bereich der flüssig-festen Mischphase. Bei einer weiteren Temperaturabnahme folgt die Lösung dem Kurvenverlauf und es kommt durch die Eiskristallbildung zu einer Konzentrationszunahme bis zum Erreichen des Eutektischen Punktes bei -21,2 °C.

Die steigende extrazelluläre Stoffkonzentration resultiert in einer Dehydratation der Zelle, wodurch sich die intrazelluläre Konzentration ebenfalls erhöht. Aus diesem Phänomen leiteten vor allem Jim Lovelock in den 1950er Jahren (Lovelock, 1953b; Lovelock, 1953a; Lovelock, 1954; Lovelock, 1955) und Mazur et al. in den 1980er Jahre (Mazur et al., 1981; Mazur und Rigopoulos, 1983; Mazur und Cole, 1985; Mazur und Cole, 1989) die beiden vorherrschenden Schädigungsmechanismen der Zellen während des Einfrierens ab:

(I) Mechanische Schädigungen durch die Bildung von Eiskristallen

(II) Osmotische Schädigungen durch die erhöhte Salzkonzentration („solution effects“)(Farrant, 1977)

So können wachsende Eiskristalle die Zellmembran (Takamatsu und Rubinsky, 1999) und intrazelluläre Organellen (Bischof und Rubinsky, 1993) schädigen, während eine erhöhte Salzkonzentration zur Denaturierung der intrazellulären Proteine führen kann. Durch die Eiskristallbildung wird der Zelle Wasser entzogen, wobei ab einem kritischen Punkt auch die Hydrathülle der Membran und der Proteine beeinflusst wird. Dies resultiert schließlich in einem Funktionsverlust der Proteine, da deren Tertiärstruktur nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Dabei zeigten Meryman et al., dass zum Beispiel Säugetierzellen die Hälfte ihres Wasseranteils verlieren können, bevor es zu irreversiblen Schädigungen kommt (Meryman, 1968; Meryman, 1970), Wolfe und Bryant postulierten sogar eine mögliche Reduktion des Wassergehalts auf 10% (Wolfe und Bryant, 1999). Die Plasmamembran der Zelle besteht aus einer Lipiddoppelschicht aus Phospholipiden mit einer hydrophilen Kopf- und einer lipophilen Schwanzregion. Wird der Membran während des Abkühlens Wasser entzogen, rücken die Kohlenwasserstoffketten aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen näher zusammen, da die Wassermoleküle von Natur aus zwischen den Phospholipiden eingelagert sind. Dies führt dazu, dass die normalerweise flexible Zellmembran von der flüssigen in den gelartigen Aggregatszustand übergeht und an Beweglichkeit verliert (Williams et al., 1981). Sie ist damit wesentlich anfälliger gegen mechanische Schädigungen, wobei nachgewiesen wurde, dass die häufigste Schwachstelle der Membran an der Kontaktzone zwischen Phospholipiden und Membranproteinen liegt (Crowe et al., 1984).

Da ein direkter Zusammenhang zwischen der Salzkonzentration und der Anzahl und Größe der gebildeten Eiskristalle besteht, postulierte Mazur, 1963, dass eine ausreichend langsame Kühlrate und eine ausreichend hohe Wasserpermeablität der Zellmembran zur Vermeidung von intrazellulärem Eis führen sollte. Dies fasste er in seiner „Zwei-Faktor-Hypothese“ zusammen (Mazur et al., 1972), in der besagt wird, dass für jeden Zelltyp eine optimale Kühlrate existiert. Ist die Kühlrate zu langsam, kommt es durch die starke Aufkonzentrierung der gelösten Stoffe im Extrazellulärraum zu osmotischen Schädigungen der Zellen. Ist sie allerdings zu schnell, verliert die Zelle zu wenig Wasser und es bildet sich intrazelluläres Eis, das tödlich für die Zellen ist (Abbildung 2).

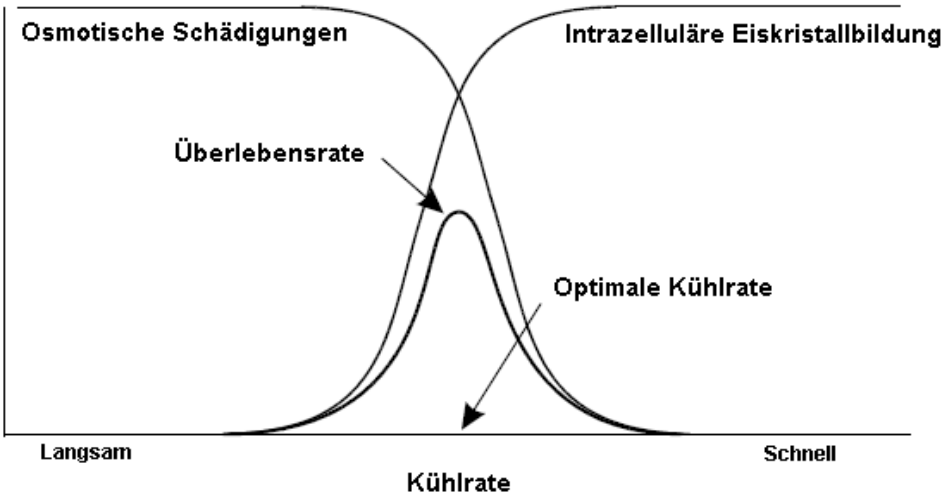


Abbildung 2: Zwei-Faktor Hypothese nach Mazur et al., 1972 (Abbildung verändert aus Muldrew et al., 2004).

Dargestellt sind die sich überschneidenden Schädigungsmechanismen mit langsamen (osmotische Schädigungen) und schnellen Kühlraten (intrazelluläre Eiskristallbildung) und die entsprechenden Überlebensraten.

Doch auch während des Auftauprozesses kann es zu signifikanten Zellschädigungen kommen. Zum einen schmelzen die Eiskristalle in einer Probe nur sukzessiv, so dass es phasenweise zu einer stark

erhöhten Stoffkonzentration innerhalb der Zelle kommt. Es folgt ein Wassereinstrom, der zur Lyse der Zelle führen kann, sollte die Zellmembran dem Druck nicht standhalten. Zum anderen entstehen bereits beim Einfrieren intrazellulär kleine Eiskristalle, die allerdings bis zu einer kritischen Größe keine Schäden verursachen (Mazur, 1977). Während der Erwärmung kann es zum Wachstum und zur Rekristallisation dieser Eiskristalle kommen. Aufgrund der energetisch günstigeren Form können diese beim Auftauen fusionieren und einen schädigenden Umfang einnehmen. Shaw et al., 1995, konnten dabei zeigen, dass bis zu 100% der Probenverluste durch Bildung und Wachstum von Eis während des Auftauens verursacht wurden.

Um das Schmelzen der Eiskristalle und die Rehydratation der Membran und Proteine zu beschleunigen, werden daher schnelle Auftauraten als vorteilhaft angesehen (Muldrew und McGann, 1994).

Die Lagerung der Zellen bei unter -80°C führt dazu, dass nahezu keine biochemischen Prozesse mehr ablaufen und die Zellen somit theoretisch unbegrenzt konservierbar sind. Bei dieser Temperatur sind allerdings noch Rekristallisationsprozesse im Eis möglich, da noch eine Molekülbewegung des Wassers stattfinden kann. Aus diesem Grund sollten biologische Proben für eine langfristige Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur von reinem Wasser von -130°C aufbewahrt werden (Meryman, 1963). Bei diesen Temperaturen können theoretisch nur noch der Einfluss kosmischer Strahlungen und mechanische Erschütterungen zu einer Schädigung der Proben führen.

3.2 Kryoprotektive Substanzen und Kryomedien

Trotz allem haben sich auch in der Natur bei einigen Pflanzen und Tieren Strategien entwickelt, um die unwirtlichen Bedingungen, die zum Beispiel im Winter auftreten, überstehen zu können. So findet man eine natürliche Kältetoleranz bei nahezu allen Invertebraten und bei einige Amphibien und Reptilien. Dabei stellen die Dosenschildkröten (*Terrapene carolina, Terrapene ornata*) mit einem Gewicht von ungefähr 0,5 kg die größten bekannten, kältetoleranten Tiere dar (Costanzo und Claussen, 1990; Storey et al., 1993). Die niedrigste Temperatur, die kältetolerante Tiere überleben können, liegt allerdings nur bei -6 °C. Um dies zu ermöglichen, wird hauptsächlich die Strategie verfolgt, die Eiskristallbildung auf den Extrazellulärraum zu beschränken, indem unter anderem extrazelluläre Nukleationskeimen eingesetzt werden. Außerdem werden durch eine teilweise Dehydratation sowie „Antifreeze“ Proteine (AFP), die eine Rekristallisation verhindern, spezielle Bereiche und Organe des Körpers geschützt. Zusätzlich findet man in kältetoleranten Pflanzen und Tieren häufig eine hohe Konzentration an Zuckern mit einem geringen Molekulargewicht, zum Beispiel Glukose in Waldfröschen (Storey und Storey, 1984).

Basierend auf den Erkenntnissen, die aus der Natur gewonnen werden konnten, wurden Stoffe entdeckt, die eine künstliche Kryotoleranz in den Zellen induzieren, sog. Kryoprotektiva. Dabei wurde die erste kryoprotektive Substanz von Polge, 1949, nur zufällig durch eine falsch beschriftete Flasche entdeckt (Polge et al., 1949). Sie fanden heraus, dass durch die Zugabe von Glyzerin Vogelspermatozoen Temperaturen von -70°C überlebten und begründeten damit das Gebiet der Kryokonservierung von Zellen.

Grundsätzlich sind Kryoprotektiva Substanzen aus unterschiedlichen chemischen Stoffgruppen, deren Funktion darin besteht, die in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Kryoschädigungen während des Einfrier-

prozesses zu minimieren oder vollständig zu verhindern. Dabei werden unterschiedliche Strategien verfolgt: es wird der Gefrierpunkt der Lösung gesenkt, die Zellmembran stabilisiert und/oder die Dehydratation der Zellen beeinflusst. Aufgrund ihrer Molekülgröße und damit ihrer Fähigkeit, eine Zellmembran zu passieren, unterscheidet man membrangängige von nicht-membrangängigen Kryoprotektiva (Meryman, 1971) (Tabelle 1).

Membrangängige Kryoprotektiva entwickeln ihre Schutzfunktion extra- und intrazellulär. Ihre Aufgabe besteht grundsätzlich darin, Wassermoleküle zu ersetzen und somit die Membran sowie Makromoleküle während der Dehydratation durch die extrazelluläre Eiskristallbildung zu stabilisieren (Mazur, 1984). Zusätzlich besitzen sie kolligative Eigenschaften. Darunter versteht man das chemische Potential gelöster Stoffe in Lösungen, unabhängig von der Art der gelösten Stoffe, eine Erniedrigung des Gefrierpunktes zu induzieren. Außerdem bilden einige dieser Kryoprotektiva, wie zum Beispiel DMSO, während des Abkühlens Komplexe mit Wasser und können in hoher Konzentration als kristalliner Feststoff vorliegen (Abbildung 3).

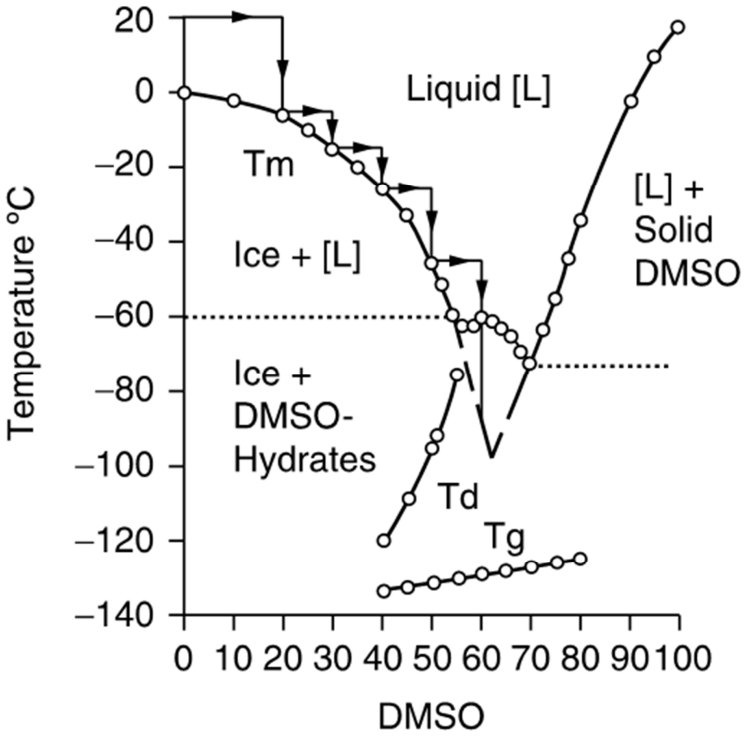


Abbildung 3: Gleichgewichtsphasendiagramm einer wässrigen DMSO-Lösung (Taylor et al., 2004).

Dargestellt sind die grundsätzlichen Ereignisse und Phasenänderungen in der Lösung während des Einfrierens und Auftauens (Rasmussen und MacKenzie, 1968; MacFarlane, 1987). T_m: Liquiduskurve; T_g: Glasübergangstemperatur, T_d: Devitrifikation; die stufenförmige Linie oberhalb der Liquiduskurve T_m beschreibt die schrittweise Äquilibrierung von multizellulärem Gewebe.

Nicht-membrangängige Kryoprotektiva können aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes die Zellmembran nicht passieren, schützen aber gelöst im Extrazellulärraum vor osmotischen Schäden und stabilisieren die Zellmembran (Meryman, 1971; Shaw und Jones, 2003). Zusätzlich bewahren sie die Zellen während des Gefriervorganges vor zu großen Volumenänderungen, indem sie die Geschwindigkeit des Wasserein- und -ausstroms beeinflussen und somit als osmotischer Puffer wirken (Friedler et al., 1988). Mono- und Disaccharide stellen dabei die am häufigsten verwendeten nicht-membrangängigen Kryoprotektiva dar. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass ihre Schutzwirkung direkt vom Molekulargewicht der Saccharide abzuhängen scheint (Izutsu et al., 2004). Neben ihrer

osmotischen Aktivität schützen Zucker Membran und Proteine ebenfalls, indem sie die eingelagerten Wassermoleküle ersetzen („Water replacement"-Theorie) (Clegg et al., 1982; Wolfe und Bryant, 1999). Vor allem Trehalose findet aufgrund der guten Glasbildungseigenschaft, der hohen Stabilität und der schwachen Kristallisationstendenz auch bei hohen Konzentrationen eine häufige Anwendung. Außerdem besitzt Trehalose in jeder Konzentration eine höhere Glasübergangstemperatur als die meisten anderen Zucker und eine geringe Reaktivität als Reduktionsmittel (Ring und Danks, 1998).

Daneben werden auch weitere Makromoleküle wie Ficoll, Polyvinylpyrrolidone (PVP) und Polyvinylalkohol (PVA) eingesetzt. Diesen Polymeren wird ebenfalls die Fähigkeit zur Protektion der Zellmembran als Serumersatz (Gutierrez et al., 1993; Shaw et al., 1997) und zur Reduktion der Eiskristallbildung (Wowk et al., 2000) zugesprochen. Eine weitere Schutzfunktion basiert wahrscheinlich darauf, dass es durch die Zugabe von Polymeren ins Kryomedium zu einer temperaturabhängigen Viskositätsänderung während der Kryokonservierung kommt, wodurch die mechanische Belastung auf die Zellen reduziert wird (Kasai et al., 1996).

Tabelle 1: Übersicht über membrangängige und nicht-membrangängige Kryoprotektiva

Membrangängige Kryoprotektiva		
Name	**Abkürzung**	**Molekulargewicht [g/mol]**
Dimethylsulfoxid	DMSO	78,13
Ethylenglykol	EG	62,07
1,2-Propandiol	PROH	76,10
Glyzerin	GLYC	92,10
2,3-Butandiol	BUT	90,12
Formamid	FOR	45,04
Nicht-membrangängige Kryoprotektiva		
Name	**Abkürzung**	**Molekulargewicht [g/mol]**
Polyvinylpyrrolidon	PVP	>25.000
Polyvinylalkohol	PVA	>18.000
Ficoll		70.000 bzw. 400.000
Dextran		n.a.
Polyethylenglykol	PEG	8.000
Saccharose	SAC	342,30
Trehalose	TRE	378,30
Raffinose	RAFF	594,5
Glucose	GLU	180,16
Manitol	MAN	182,17
Sorbitol	SOR	182,2
Ribose	RIB	150,13
Fetales Kälberserum	FBS	n.a.
Bovines Serumalbumin	BSA	n.a.
Humanes Serumalbumin	HSA	n.a.
Hydroxyethylstärke	HES	>20.000

Allerdings wirkt eine Vielzahl der Kryoprotektiva in Abhängigkeit von der Temperatur toxisch und schädigt die Zelle, wenn diese nach dem Erwärmen wieder physiologische Temperaturen erreicht. Daher müssen diese schnellstmöglich aus der Probe entfernt werden, indem sie direkt nach dem Auftauen mit Kulturmedien, das eine geringe Osmolarität besitzt, ausgewaschen werden. Dies resultiert in der Ausbildung eines starken Konzentrationsgefälles zwischen Intra- und Extrazellulärraum, so dass ein Wassereinstrom in die Zelle stattfindet, da die Membranpermeabilität temperaturunabhängig für Wasser höher ist als für die Kryoprotektiva (Paynter et al., 1999). Es kommt zu einem Anschwellen der Zelle in Abhängigkeit von Temperatur und extrazellulärer Stoffkonzentration. Die dabei auftretenden Volumenänderungen können zu einer Schädigung der Plasmamembran und einer Lyse der Zelle führen. Doch spezies- und zelltypbedingte Unterschiede in den Permeabilitätseigenschaften der Zellmembran resultieren auch in einer verschieden stark ausgeprägten osmotischen Toleranz.

Es wurde gezeigt, dass die maximale Konzentration an Kryoprotektiva, die die Zellvitalität nicht beeinträchtigt, hauptsächlich von der Temperatur und Geschwindigkeit der Zugabe bzw. des Entfernens abhängt. Zusätzlich ist das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit dem Kryoprotektiva eine Zelle durchdringen, abhängig von Spezies, der Inkubationsdauer, der Inkubationstemperatur und der Art der Kryoprotektiva (Fahy et al., 1984; Rall, 1987; Mazur, 1990). Allerdings wurde bereits bei verschiedenen Spezies, u.a. auch beim Menschen (Sathananthan et al., 1988), eine schädigende Wirkung von kryoprotektiven Substanzen auf die Mikrotubuli und den Spindelapparat nachgewiesen (Vincent et al., 1989; Vincent und Johnson, 1992; Saunders und Parks, 1999).

Eine Erniedrigung der Toxizität kann durch eine Kombination aus nicht-membrangängigen mit membrangängigen Kryoprotektiva erreicht werden, da auf diesem Weg eine geringere Einzelkonzentration der zytotoxischen Kryoprotektiva notwendig ist (Kuleshova et al., 1999).

3.3 Effekte während der Kryokonservierung mit langsamen Kühlraten und während der Verglasung

Anhand der Abkühlraten während des Gefriervorganges kann man zwischen langsamen und schnellen Protokollen unterscheiden. Langsame Protokolle sind definiert durch geringe Abkühlraten (0,3-1 °C/Min) und durch niedrige molare Konzentrationen von Kryoprotektiva im Einfriermedium (Shaw und Jones, 2003). Während des Abkühlens bilden sich im Extrazellulärraum Eiskristalle, es kommt zu einer Phasentrennung zwischen Wassermolekülen und gelösten Stoffen und die Zellen geben Wasser ab, wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben (Abbildung 4A). Diese Eiskristallbildung kann schließlich in einer mechanischen und osmotischen Schädigung der Zellen resultieren.

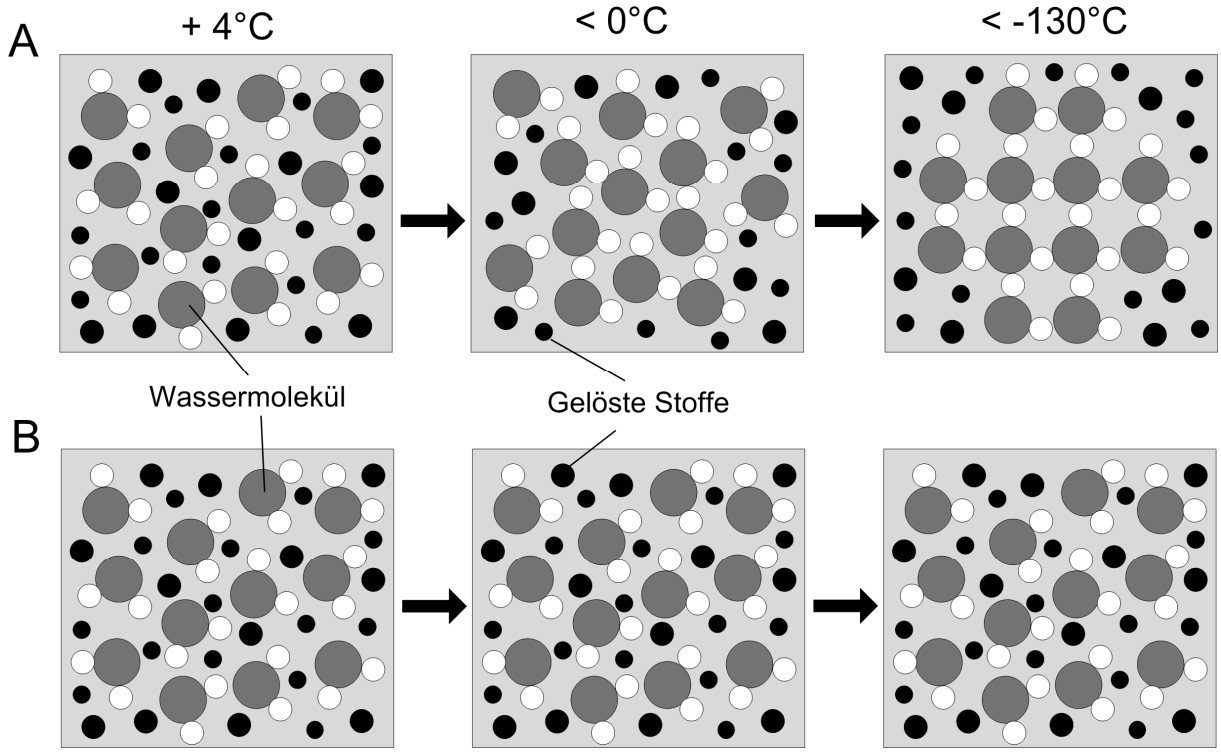


Abbildung 4: Gefriervorgang mit langsamen (A) und schnellen Kühlraten (B).

Während des Gefriervorganges mit langsamen Kühlraten (A) kommt es zu einer Phasentrennung zwischen Wassermolekülen und gelösten Stoffen während der Eiskristallisation; mit schnellen Kühlraten (B) findet keine Eiskristallisation statt, die Lösung erreicht einen amorphen Zustand (B).

Bereits 1937 wurde von Luyet festgestellt, dass eine Eiskristallbildung eine negative Auswirkung auf das Überleben von Zellen während der Kryokonservierung besitzt und daher vermieden werden sollte. Daher zielen schnelle Protokolle auf eine Verglasung (Vitrifikation) der Probe ab. Eine verglaste Lösung besitzt die Eigenschaften eines Feststoffes, behält aber immer noch die Molekularstruktur einer Flüssigkeit, es kommt daher nicht zu einer Phasentrennung zwischen Eiskristallen und löslichen Stoffen (Abbildung 4B). Dies findet statt, wenn sich beim Abkühlen die Viskosität der Lösung so stark erhöht, dass keine Eiskristallbildung mehr stattfinden kann. Dabei erreicht die Lösung bei tiefen Temperaturen schließlich eine amorphe, glasähnliche Struktur (Luyet, 1937; Fahy et al., 1984). In diesem Zustand liegen dieselben ionischen und molekularen Eigenschaften einer wässrigen Lösung vor, ohne dass die Gefahr von mechanischen und chemischen Schäden durch Konzentrationsveränderung und Eiskristallbildung besteht. Dieser Prozess wird durch die Verwendung von Kryoprotektiva in hohen molaren Konzentrationen (7-8M) und einer extrem schnellen Kühlrate realisiert (Abbildung

5). Dies gewährleistet, dass der Bereich einer möglichen heterogenen Nukleation schnell durchfahren und eine Verglasung erreicht werden kann. Durch das Eintauchen von sehr kleinen Probenvolumina (bis zu 20µl) in dünnen Kapillaren direkt in flüssigen Stickstoff werden Kühlraten von bis zu 20000 °C/min erzeugt (Vajta et al., 1997). Da die benötigten hohen Stoffkonzentrationen stark zytotoxisch auf die Zellen wirken können, werden meistens Kombinationen aus membrangängigen und nicht-membrangängigen Kryoprotektiva verwendet, um die Toxizität zu vermindern. Zusätzlich wird die Osmolarität der Kryoprotektiva schrittweise erhöht, um so die intrazelluläre Konzentration der Kryoprotektiva gezielt zu steuern und die Adaption der Zellen zu erleichtern (Rall, 1987).

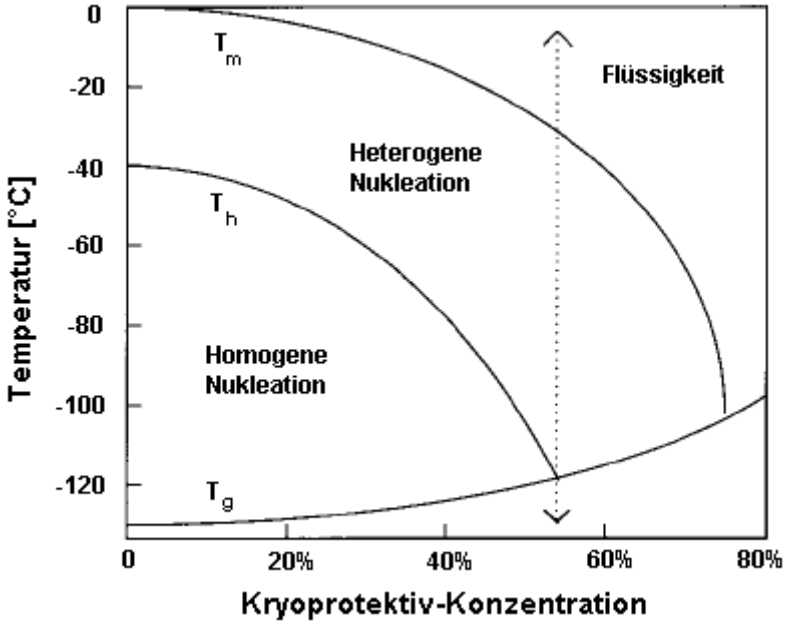


Abbildung 5: Phasendiagramm eines exemplarischen Kryoprotektivs in Wasser (Abbildung verändert aus Wowk et al., 2000, nach Fahy et al., 1984)

Der Vitrifikationsprozess benötigt während des Einfrierens und Auftauens eine Kryoprotektivkonzentration gemäß der gepunkteten Linie, ist daher also höchst anfällig für eine heterogene Eisnukleation. T_m: Gleichgewichtsschmelztemperatur, T_h: homogene Nukleationstemperatur und T_g: Glasübergangstemperatur.

Um eine stabile Glasbildung zu ermöglichen, müssen die Zellen während des Abkühlens in ausreichendem Maße Wasser verlieren. Daher werden Saccharide in Konzentrationen von bis zu 2M zur Vitrifikationslösung hinzugefügt (Trounson et al., 1987; Kuleshova et al., 1999).

Doch selbst wenn ein glasähnlicher, stabiler Zustand nach dem Einfrieren erreicht wurde, kann es anschließend beim Auftauen zu Schädigungen durch die Bildung von Eiskristallen (Devitrifikation) kommen (Boutron und Kaufmann, 1978). Denn auch beim schnellen Abkühlen von Lösungen bis zur Glasbildung können kleinste Eiskristalle entstehen. Deren Anzahl und Größe bleibt dabei aber so minimal, dass sie selbst durch Röntgenanalysen oder kalorimetrische Messmethoden nicht nachgewiesen werden können (Shaw und Jones, 2003). Durchläuft das biologische Material während des Erwärmens mit zu geringen Auftauraten einen kritischen Temperaturbereich (ab -90°C), wird das verglaste Zytoplasma der Zelle flüssig, bevor im Extrazellulärraum der Schmelzpunkt erreicht ist. In diesem unterkühlten, metastabilen Zustand besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Eisnukleation im Zytoplasma, so dass es verstärkt zur Bildung von Eiskristallen während des Auftauens kommen kann.

Schnelle Auftauraten können dies verhindern, da bis zum Erreichen von physiologischen Temperaturen nur Sekunden vergehen, so dass keine Zeit zur Bildung von Eiskristallen bleibt.

Insgesamt sind Auftauraten von >400 °C/min, extrem hohe Kühlraten, hochosmolare Vitrifikationsmedien und kleinste Probenvolumina nötig, um die Bildung von Eiskristallen während des Abkühlens, sowie die Devitrifikation während des Auftauens zu verhindern (Fahy et al., 1984; Wolfe und Bryant, 1999).

Werden die aufgetauten Zellen nach einem erfolgreichen Vitrifikationsvorgang direkt in Kulturmedium aufgenommen, unterliegen die Zellen durch den großen Konzentrationsunterschied einem starken osmotischen Stress. Eine Möglichkeit zur Vermeidung osmotischer Schädigungen nach dem Auftauen und während des Waschens ist der Zusatz von Sacchariden in das Auftaumedium und eine schrittweise Adaption der Osmolarität, wie in Abbildung 6 gezeigt. So konnte durch einen zusätzlichen Verdünnungsschritt nach der Vitrifikation die Teilungs- und Blastozystenrate von Mäuseoozyten deutlich verbessert werden (Shaw et al., 1991).

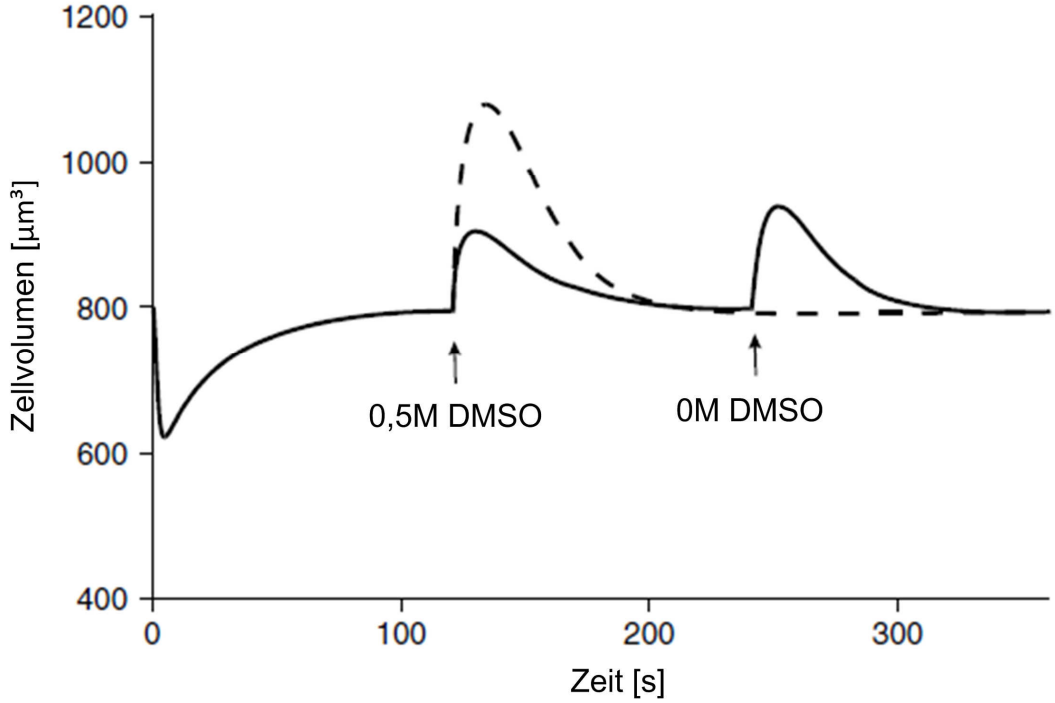


Abbildung 6: Veränderung des Zellvolumens während des Auswaschens von DMSO (Abbildung verändert aus Muldrew et al., 2004).

Die Zellen werden zu Beginn in eine 1M DMSO Lösung gegeben, nach 120 Sekunden in eine 0,5M DMSO Lösung überführt und schließlich nach 240 Sekunden in einer DMSO-freien Lösung aufgenommen. Die gestrichelte Linie beschreibt die Volumenänderung der Zellen bei einer Überführung der Zellen direkt aus der 1M DMSO Lösung in die DMSO-freie Lösung nach 120 Sekunden.

Neben der Vitrifikation in offenen oder geschlossenen Plastikkapillaren wird in innovativen Ansätzen die Glasbildung auf mit Stickstoff gekühlten Oberflächen (solid surface vitrification, SSV), auf Metallgittern (electron microscop grids) und Nylonnetzen oder Nylonschlingen (cryoloop, nylon mesh) untersucht. Alle diese Verfahren beruhen auf einem möglichst direkten Kontakt zwischen dem flüssigen Stickstoff und dem biologischen Material.

3.4 Stand der Forschung: Einfrieren von therapeutisch relevanten Zellen, insbesondere PBMC/hESC

Humane embryonale Stammzellen (hESCs) stellen ein anspruchsvolles Zellmodell dar, da die Zellen in dreidimensionalen Kolonien wachsen und aufgrund von engen Zell-Zell-Kontakten nicht in Einzelzellen dissoziiert werden können, da sie sonst in Apoptose übergehen. Zusätzlich ist für den Erhalt der Pluripotenz, also der Fähigkeit, Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) zu bilden, eine Co-Kultur mit primären, embryonalen Mausfibroblasten (PMEF) notwendig (Hunt und Timmons, 2007). Die ersten Versuche zur Etablierung von effizienten Kryoprotokollen wurden dabei empirisch durchgeführt und basierten hauptsächlich auf Methoden, die sich bei anderen, scheinbar vergleichbaren Zelltypen als erfolgreich erwiesen. Die naheliegendsten Kandidaten dafür waren murine embryonale Stammzellen (mESCs) und Embryonen, so dass gemäß den Standardprotokollen dieser Zellsysteme Protokolle zur Kryokonservierung von hESCs entwickelt wurden, die ebenfalls auf langsamen Kühlraten bzw. auf Vitrifikation beruhten (Hunt, 2007).

Die Ansätze mit langsamen Kühlraten basieren auf etablierten Protokollen, die für die Kryokonservierung von mES-Zellen entwickelt wurden. Dazu werden die Zellen routinemäßig enzymatisch in Einzelzellen dissoziiert und in einem 1ml Kryovial mit einer DMSO-Konzentration von 5-20% in Kulturmedium mit fetalem Kälberserum (FBS) eingefroren. Die Kühlrate von 1-2 °C/min wird entweder durch direktes Einbringen der Proben in einen -80°C Gefrierschrank oder kontrolliert mit Hilfe von Einfrierautomaten erzeugt. Doch während mit diesen Protokollen bei mES-Zellen eine Überlebensrate von 90% erreicht werden, resultieren sie bei hESCs, die als Zellaggregate eingefroren werden müssen, in deutlichen Misserfolgen (Heng et al., 2005b). So konnten 2001 in einer frühen Studie nur 16% der mit 10% DMSO langsam eingefrorenen Kolonien wiedergewonnen werden (Reubinoff et al., 2001). Zusätzlich besaßen die kryokonservierten Stammzellkolonien nach zweiwöchiger Kultivierung eine geringere Größe als nicht eingefrorene Kolonien und zeigten ein signifikantes Ausmaß an Differenzierung. Bis heute konnten durch unterschiedliche Ansätze, so zum Beispiel der Kombination von DMSO und Ethylenglykol (EG) eine Überlebensrate von maximal 30% erreicht werden (Ha et al., 2005), wobei durch kontrolliertes Einfrieren mit Hilfe von Einfrierautomaten keine Verbesserung erzielt werden konnten (Richards et al., 2004). Auch einige kommerzielle Stammzellanbieter von hESCs nutzen langsame Kühlraten für die Bereitstellung der Zellen, garantieren damit allerding nur eine Überlebensrate von 0,1–1% der Zellen.

Abgesehen von diesen Studien werden hauptsächlich Vitrifikationsprotokolle verwendet, da trotz der praktischen Schwierigkeiten, die mit dieser Methode verbunden sind, Überlebensraten von über 75% erreicht werden können (Richards et al., 2004; Zhou et al., 2004). Dazu wurden Protokolle aus dem Bereich der Vitrifikation von Ovarien und Embryonen (Vajta et al., 1998a) erfolgreich von Reubinoff et al., 2001, auf hESCs übertragen. Dabei werden Fragmente der Stammzellkolonien nacheinander kurz (wenige Sekunden bis Minuten) in zwei Vitrifikationslösungen mit ansteigender Kryoprotektivkonzentration inkubiert, um die Stammzellen an die extrem hohen Osmolaritäten zu adaptieren. Die Lösungen enthalten als häufigste Komponenten DMSO und EG, sowie variierende Konzentrationen an Saccharose. Anschließend wird ein Volumen von ungefähr 20µl in Kapillaren gefüllt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Handhabung dieser Methode ist allerdings sehr anspruchsvoll, so dass durch geringe Fehler während der Prozedur ein deutlicher Vitalitätsverlust der Zellen verursacht werden kann. Selbst im Originalpaper von Reubinoff et al., 2001, wird nur von ungefähr 30% undifferenzierter Stammzellfrag-

mente berichtet, die wiedergewonnen werden konnten. Auch beinhaltet das Probenvolumen von 20µl nur 8 bis 12 Koloniefragmente, wodurch statistisch relevante Untersuchungen kaum möglich sind. Um eine Devitrifikation zu vermeiden werden die Kapillaren mit einer möglichst hohen Aufwärmrate aufgetaut. Ein schrittweises Waschen der Koloniefragmente in Medien mit abnehmender Saccharosekonzentration verhindert zusätzlich einen osmotischen Schock der Zellen.

Für die Erzeugung von Zellen für eine medizinische Anwendung, müssen die Zellen in Einrichtungen gewonnen werden, die den Richtlinien gemäß der „Guten Herstellungspraxis“ (GMP) entsprechen. Auch müssen die Standardprotokolle dementsprechend angepasst werden und es ist ein hohes Maß an Standardisierung und Qualitätsüberwachung notwendig. Daher wurden bereits einige Stammzellbanken, so zum Beispiel die UK Stem Cell Bank 2003, gegründet, die sich mit diesen Aufgaben befassen und versuchen, einen gut charakterisierten und definierten Bestand von hESCs für die Wissenschaft bereit zu stellen.

Für eine erhöhte Standardisierung und eine mögliche therapeutische Anwendung existieren außerdem Ansätze, die embryonalen Mausfibroblasten durch mitotisch inaktivierte humane Zellen zu ersetzen (Lee et al., 2004) und serum- (Pera et al., 2006) bzw. PMEF-freie Kultivierungssysteme (Amit und Itskovitz-Eldor, 2006) zu entwickeln.

Die Kryokonservierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) ermöglicht retrospektive epidemiologische Analysen zur Entstehung und Entwicklung von Infektionskrankheiten und ist Grundlage vieler klinischer Impfstoffstudien. Eine stetig steigende Anzahl an Untersuchungen befasst sich mit der Entwicklung experimenteller Impfstoffe gegen Krankheiten, die die zelluläre Immunantwort aktivieren, so z.B. HIV (McMichael und Hanke, 2003; Picker et al., 2011), Krebs (Gilboa, 2004) und Malaria (Moorthy et al., 2004). Dazu wird die Immunreaktion der PBMCs in *ex vivo* Nachweisen, wie dem ELISPOT (Enzyme-linked Immunospot) untersucht, indem die Freisetzung von Zytokinen nach der Stimulation mit spezifischen Antigenen quantitativ ermittelt wird (Czerkinsky et al., 1988). Der Grad mit dem mögliche Vakzine eine T-Zell-Antwort auslösen stellt dabei das Potential des Impfstoffes dar, das Immunsystem des Empfängers zu aktivieren. Allerdings ist das Zeitfenster, in dem die Zellen nach der Blutentnahme für Analysen genutzt werden können sehr eng (Bull et al., 2007), so dass eine Kryokonservierung dieser Proben unerlässlich ist. Zusätzlich gewährleistet die Verfügbarkeit von biologischen Proben in Biobanken die Durchführung vergleichender Multicenter-Studien (Reimann et al., 2000).

Doch eine suboptimale Kryokonservierung resultiert in einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität und –zahl und kann außerdem zu einer Veränderung des Phänotyps sowie der T-Zell-Antwort gegen spezifische Antigene führen (Costantini et al., 2003). Eine Vielzahl an Studien wurde bereits durchgeführt, die sich mit der Wirkung der Kryokonservierung auf PBMCs beschäftigen. Dabei werden die Zellen standardmäßig mit langsamen Kühlraten (1 °C/min) in einem Kryomedium aus 90% FBS und 10% DMSO eingefroren. Die meisten der Studien zeigten nur einen minimalen Effekt auf die Vitalität der Zellen (Birkeland, 1980; Sobota et al., 1997; Hayes et al., 2002) mit einer klaren Korrelation von Vitalität und T-Zell-Funktionalität in PBMC-basierten Nachweismethoden (Reimann et al., 2000; Weinberg et al., 2000). Dagegen wird über die Frage, ob auch die antigenspezifische T-Zell-Antwort erfolgreich konserviert werden kann, permanent diskutiert. Einige Untersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen frischen und eingefrorenen Proben feststellen (Kreher et al., 2003; Maecker et al., 2005; Disis et al., 2006), während andere eine Zunahme der T-Zell-Antwort in eingefrorenen Proben (Weinberg et al., 1998; Maecker et al., 2005) oder eine Abnahme der Reaktivität gegen HIV

p24 und CMV Antigene zeigten (Costantini et al., 2003; Miniscalco et al., 2003; Owen et al., 2007). Daher sind weitere Untersuchungen vor allem der T-Zell-Funktionalität notwendig.

Allerdings erschwert die Verwendung von FBS im Kryomedium eine Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Nachweismethoden. FBS ist eine natürliche, undefinierte Mischung aus verschiedenen Wachstumsfaktoren und Nährstoffen, die eine unspezifische Aktivierung der T-Zellen auslösen kann und somit in T-Zell-basierten Nachweisen falsch positive Ergebnisse erzeugen könnte. So wurde zum Beispiel vom Cancer Vaccine Consortium des Sabin Vaccine Institutes (CVC/SVI) berichtet, dass die Wahl des Serums zu suboptimalen Ergebnissen bei den Teilnehmern ihres internationalen ELISPOT-Leistungstests führte (Janetzki et al., 2008). Daher werden momentan die verwendeten FBS-Chargen in zeitaufwendigen Untersuchungen im Hinblick auf deren Einfluss auf die Immunzellen vorgetestet, um Chargen mit einer geringen Hintergrundreaktivität zu identifizieren.

4. Material und Methoden

4.1 Techniken der Zellkultur

4.1.1 Isolation primärer Zellsysteme

Isolation von erythroiden Zellen aus dem Nabelschnurblut (UCB-ECs)

Für die Isolation von erythroiden Zellen (UCB-ECs) wurde nach Kaiserschnitt- (38.-40. Schwangerschaftswoche) oder Spontangeburten das Nabelschnurblut mit Einverständniserklärung der Mutter, gemäß den institutionellen Richtlinien der Medizinischen Universität Wien, entnommen. Das Blut wurde 1:2 mit PBS (Gibco, Karlsruhe) verdünnt und die mononukleären Zellen (MNCs) anschließend mit Hilfe einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll Separating Solution, Biochrom, Berlin) für 40 Minuten bei 600g von den Erythrozyten getrennt. Die Blut/Ficoll-Interphase wurde gesammelt, mit PBS verdünnt und erneut mit 300g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50ml eines hypotonen Lysepuffers (8,99 g/L NH_4Cl; 1g/L $KHCO_3$; 0,037g/L EDTA; pH=7,3) resuspendiert und darin für 30 Minuten inkubiert, um störende Erythrozyten zu entfernen.

Isolation von endothelialen, koloniebildenden Zellen aus dem Nabelschnurblut (UCB-ECFCs)

Endotheliale, koloniebildende Zellen (UCB-ECFCs) wurden ebenfalls aus Nabelschnurblut isoliert, das nach Kaiserschnittgeburten (38.-40. Schwangerschaftswoche) gewonnen wurde (Le Blanc et al., 2008). Die Einverständniserklärung der Mutter wurde gemäß den institutionellen Richtlinien des Universitätsspitals Zürich eingeholt. Für die Blutgewinnung wurde ein Entnahmesystem mit einer Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin-Mischung als Antikoagulationslösung (MacoPharma, Mouvaux, Frankreich) genutzt. Für die MNC-Isolierung wurde das Blut innerhalb einer Stunde 1:2 mit PBS, das 2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthielt, verdünnt und anschließend mit Hilfe einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation prozessiert. Die MNCs wurden aus der entstandenen Interphase entnommen, einmal mit kaltem PBS/EDTA gewaschen und in einem Kulturmedium für endotheliale Zellen (EGM-2, Lonza, Basel, Schweiz) auf mit Fibronektin beschichteten Zellkulturplatten (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA) mit einer Zelldichte von $5x10^5$ Zellen/cm² über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die nicht adhärenten Zellen entfernt und frisches endotheliales Medium zugefügt. Das Medium wurde jeweils nach sieben Tagen erneuert. Die ersten typischen kopfstein-pflasterähnlichen Kolonien waren 12 bis 20 Tage nach dem Aussäen zu erkennen. Die Kolonien wurden ausgezählt, mit Akkutase (Sigma-Aldrich, Steinheim) abgelöst und anschließend mit einer Konzentration von $2\text{-}4x10^3$ Zellen/cm² in T75-Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und regelmäßig passagiert.

Isolation von mesenchymale Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSCs)

Mesenchymale Stromazellen (AT-MSCs) wurden aus Fettgewebe, das durch Fettabsaugen bei kosmetischen Operationen gewonnen wurde, mit Einverständniserklärung der Spender nach belgischem Recht isoliert. Das Fettgewebe bestand aus zwei Fraktionen: einer dünnflüssigen, schwimmenden

Fettschicht und einer Flüssigkeit mit höheren Dichte. 10ml der dünnflüssigen Fettschicht wurden zunächst mit einer 0,15%igen Kollagenaselösung verdaut und 10min mit 800g zentrifugiert (Zuk et al., 2002). Die Zellen wurden in Kulturmedium aus Dulbecco´s Modified Essential Medium (DMEM) mit geringem Glucosegehalt, angereichert mit 15% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen (alle Bestandteile von Invitrogen, Karlsruhe). Bevor die Zellen in einer T75-Kulturflasche ausplattiert wurden, wurden sie durch ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 40µm filtriert. Das Kulturmedium wurde alle 3 bis 4 Tage erneuert. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit einer Zelldichte von 1,6x10³ Zellen/cm² in 20ml Kulturmedium in T75-Kulturflaschen ausplattiert.

Isolation von primären Blutzellen aus dem peripheren Blut

Die Blutproben von gesunden, CMV seropositiven Spendern wurden vom Blutspendezentrum Saarbrücken mit Einverständniserklärung der Spender zur Verfügung gestellt. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus Citratblut mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung eines Lymphozyten-Separationsmediums (PAA, Cölbe) isoliert. Die entstandene Leukozytenschicht wurde abgenommen und einmal mit PBS (Gibco, Karlsruhe) gewaschen. Verunreinigende Erythrozyten wurden durch einen Lyseschritt mit Ammoniumchlorid (PharmLyse, Becton Dickinson, Heidelberg) entfernt. Dazu wurden $2x10^8$ Zellen in 20ml einer 1:10 in destilliertem Wasser (B. Braun, Melsungen) verdünnten PharmLyse für 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30ml PBS mit 1% FBS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 10min bei 800g zentrifugiert und das Pellet in IMDM (Gibco, Karlsruhe) mit 10% FBS (PAA, Cölbe) und 1mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe) aufgenommen.

4.1.2 Kultur und Differenzierung humaner Stamm- und Vorläuferzellen

Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen

In dieser Arbeit wurden hESCs der Linien H1 und H9 (WiCell, Madison, WI, USA) gemäß der 18. Und 44. Genehmigung des Robert-Koch-Instituts (§6 StZG) verwendet. Um eine Differenzierung zu verhindern, wurden die Stammzellen auf inaktivierten, primären, embryonalen Mausfibroblasten (PMEFs) des CF-1 Stammes (Millipore, Schwalbach) kultiviert. Die PMEFs wurden in DMEM (Gibco, Karlsruhe) mit 10% hitzeinaktiviertem FBS (Gibco, Karlsruhe) und nicht essentiellen Aminosäuren (Invitrogen, Karlsruhe) kultiviert und zur mitotischen Inaktivierung in 0,01 µg/ml Mitomycin C (Sigma Aldrich, Steinheim) für 120 Minuten inkubiert. Bevor die inaktivierten PMEFs für die Stammzellkultur ausgesät wurden, wurden die Zellkulturplatten für mindestens 2 Stunden im Inkubator mit einer 0,1%igen Gelatinelösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) beschichtet. Anschließend wurden die inaktivierten PMEFs mit einer Konzentration von $2x10^4$ Zellen/cm² ausplattiert und für mindestens 24 Stunden kultiviert, bevor die hESCs in einem Medium aus DMEM-F12 (Gibco, Karlsruhe) mit 20% synthetischem Serumersatz, 2mM L-Glutamin, 1% nicht essentiellen Aminosäuren, 4 ng/ml humanem, rekombinanten bFGF, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alle Zusätze von Invitrogen, Karlsruhe) und 100µM β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) auf die PMEF-Zellschicht gegeben wurden.

Die hESCs wurden alle 6-7 Tage auf eine frische PMEF-Zellschicht passagiert, indem sie entweder mit 1 mg/ml Kollagenaselösung IV (Gibco, Karlsruhe) enzymatisch abgelöst und durch sanftes Resuspendieren fragmentiert wurden oder mechanisch mit Hilfe einer sterilen Präparationsnadel von <0,6mm Durchmesser (Fine Science Tools, Heidelberg) zerschnitten und von der Oberfläche abgehoben wurden, ohne diese anschließend weiter zu fragmentieren.

PMEF-freie Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen in 2D- und 3D-Umgebung

Zur PMEF-freien Kultivierung von hESCs in 2D-Umgebung wurden Zellkulturplatten mit 1-2%iger humaner extrazellulärer Matrix (MaxGel®, Sigma-Aldrich, Steinheim) für mindestens 2 Stunden im Inkubator beschichtet. Vor der weiteren Verwendung wurde die flüssige ECM abgesaugt, so dass die verbleibende Schicht leicht antrocknen konnte. Anschließend wurden die abgelösten hESC-Fragmente in konditioniertem hESC-Kulturmedium darauf gegeben, das für 24 Stunden mit PMEFs inkubiert wurde und zusätzlich mit 6 ng/ml bFGF (Invitrogen, Karlsruhe) auf eine Endkonzentration von 10 ng/ml angereichert wurde.

Für eine PMEF-freie Kultivierung der hESCs in 3D-Umgebung, wurden Cytodex-3 Microcarrier (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben in PBS (Invitrogen, Karlsruhe) für 24 Stunden rehydratisiert und im Dampfdruckautoklaven bei 121°C sterilisiert. Vor Verwendung wurden die Microcarrier ebenfalls mit 1-2%iger humaner ECM für mindestens 2 Stunden im Inkubator beschichtet und anschließend in Kombination mit konditioniertem Medium und einer Carrierkonzentration von ungefähr 40 Carriern/Koloniefragment verwendet.

Die hESCs auf Microcarriern wurden im hängenden Tropfen (HD) kultiviert, indem Tropfen konditionierten Mediums mit einem Volumen von 10µl und einem Überschuss an beschichteten Microcarriern (ca. 40) auf die Innenseite eines Petrischalendeckels (Corning, Kaiserslautern) mit einem Durchmesser von 10cm pipettiert wurden. Dieser wurde invertiert über ein Reservoir aus 10ml PBS (Invitrogen, Karlsruhe) platziert. Die Stammzellkolonien wurden mechanisch abgelöst und je ein Koloniefragment von 50-100µm Kantenlänge mit weiteren 10µl konditionierten Mediums zum Tropfen mit den Microcarriern hinzugefügt. Jeden zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums manuell entnommen und frisches Medium hinzugefügt.

Verkapselung von primären Mausfibroblasten in ultrahoch viskosem Alginat

Das ultrahoch viskose (UHV) Alginat wurde aus Braunalgen der Arten *Lessonia nigrescens* und *Lessonia trabeculata* gewonnen, die zwischen 18° und 56° der südlichen geographischen Breite an der chilenischen Küste wachsen. *L. nigrescens* besitzt aufgrund ihres Vorkommens in der Gezeitenzone (Eulitoral) und der dort vorherrschenden starken Brandung eine flexible Struktur, die durch das Verhältnis von α-L-Guluron- zu β-D-Mannuronsäure verursacht wird. *L. trabeculata* wächst dagegen im Sublitoral in bis zu 30 Metern Tiefe. Aufgrund der starken Bodenströmung sind diese Algen sehr starr und steif.

Die Algen wurden vor Ort geerntet und nach einer strengen Qualitätskontrolle wurden die Stängel mit Antiseptika behandelt, geschält, geschnitten und getrocknet. Aus diesem Rohmaterial wurde am Fraunhofer IBMT, wie bereits beschrieben (Zimmermann et al., 1992; Zimmermann et al., 2005), das Alginat extrahiert. Dabei wird aus *L. nigrescens* das Alginat durch die Zugabe von 50mM Diiminosuccinat (Markenname Baypur CX 100 MU von Lanxess, Leverkusen) gewonnen, während es

aus *L. trabeculata* mit Hilfe von 50mM EDTA (Roth Chemikalien, Karlsruhe) und 50mM Na-Glukonat (Merck, Darmstadt) gelöst wird. Nach dem Herausfiltern von Zelldebris wird das Alginat durch Zugabe von Ethanol unter ständiger Durchlüftung gefällt. Das Material wird anschließend erneut in Lösung gebracht und der Fällungsvorgang zweimal wiederholt, um Phenole, Fucoidane, Proteine, Endotoxine und Oligomere mit geringem Molekulargewicht vollständig zu entfernen. Das gewonnene Alginat wird mechanisch zerkleinert und kann getrocknet bei 4°C gelagert werden.

Das getrocknete Alginat aus *L. nigrescens* und *L. trabeculata* wurde für die Experimente in einer Konzentration von 0,65%ige (w/v) in 0,9%iger NaCl-Lösung (290 mOsmol/kg, pH-Wert von 7,0 bis 7,5) gelöst. Die getrennt voneinander angesetzten Alginatlösungen wurden vor der Verkapselung in einem 1:1 Verhältnis gemischt. Die Polymerisation des ionotropen Alginats wird ausgelöst durch die Zugabe von multivalenten Kationen, wie Ba^{2+} und Ca^{2+}.

Für die Verkapselung mit Hilfe der „Crystal Gun" Methode (Zimmermann et al., 2001; Zimmermann et al., 2007b) wurde eine PMEF-Suspension mit 10^6 Zellen/ml in der Alginatmischung hergestellt und in eine 1ml Spritze aufgezogen. Die Spritze wurde in die Verkapselungsanlage eingesetzt (Abbildung 7), Druckluft wurde angeschlossen, die Crystal Gun-Flasche, die mit getrocknetem, gesiebtem $BaCl_2$-Pulver gefüllt war, verbunden und unter der Düse eine Petrischale mit 20ml $BaCl_2$-Lösung (20mM $BaCl_2$, 115mM NaCl, 5mM L-Histidin in dest. Wasser) als Polymerisationsbad positioniert. Die Spritze wurde mit einem Vorschub von 2,00 entleert und der Tropfenabriss durch Druckluft von 1bar, 2,5–3,5 l/min erzeugt. Die Crystal Gun ermöglichte durch einen Luftdurchfluss von 10 l/min bei 2bar eine zusätzliche Anreicherung von $BaCl_2$-Kristallen im Inneren des Alginattropfens während des Abrissvorganges.

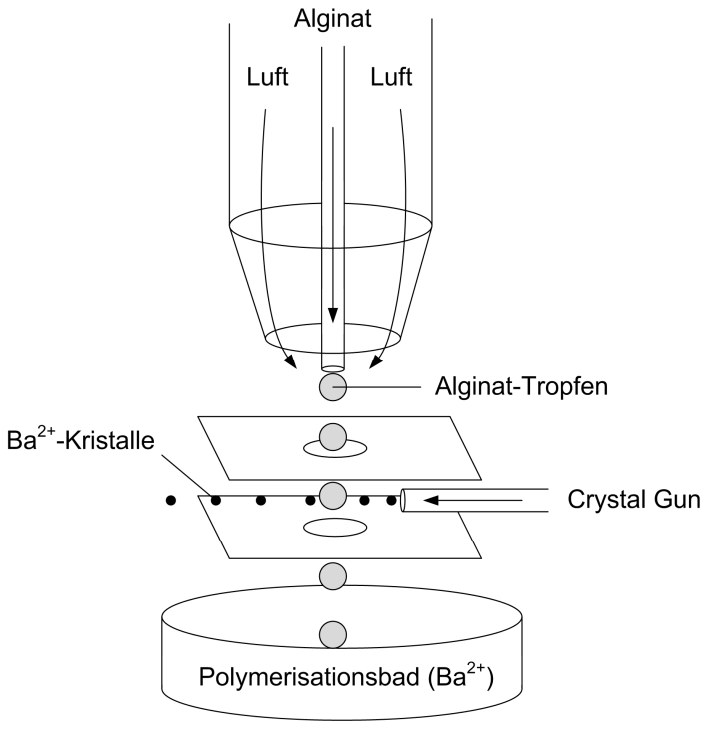


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Verkapselungsanlage in Kombination mit der „Crystal Gun" (Abbildung verändert aus Zimmermann et al., 2005).

Die Kapseln wurden im Polymerisationsbad 20 Minuten inkubiert, anschließend drei Mal mit je 10ml 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in Kulturmedium aufgenommen. Die Kapseln

wurden in einer 10cm Petrischale im Brutschrank gelagert und das Kulturmedium jeden zweiten Tag erneuert.

Kultivierung von UCB-ECs

Nach der Isolation wurden die MNCs in einer Konzentration von ungefähr $10x10^6$ Zellen/ml im serumfreien Epansionsmedium StemSpan (SFEM; Stem Cell Technologies, Köln) aufgenommen, dem 2 U/ml Erythropoietin (Erypo, 10000 U/ml, Jannsen-Cilag, Neuss), 100 ng/ml Stammzellfaktor (SCF), $1x10^{-6}$M Dexamethason (Dex), 40 ng/ml insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) und 20 µg/ml einer Cholesterin reichen Lipidmischung (alle Zusätze von Sigma-Aldrich, Steinheim) zugefügt wurde (Dolznig et al., 2005). Es wurde täglich ein halber Mediumwechsel durchgeführt und adhärente Zellen wurden entfernt, indem die Zellsuspension in eine neue Kulturschale überführt wurde. Die Zunahme der erythroiden Vorläuferzellen wurde mit Hilfe der May-Grünwald-Giemsa-Färbung von Zytospinpräparaten und durch Analyse der Größenprofile unter Verwendung eines CASY Zellzählgerätes (Schärfe System GmbH, Reutlingen) beobachtet. Sobald die Kultur überwiegend aus erythroiden Zellen bestand (Tag 6-10), wurde die Zellkonzentration auf $2x10^6$ Zellen/ml eingestellt und durch einen entsprechenden Mediumwechsel konstant auf diesem Wert gehalten. Am Tag 14 zeigten mehr als 95% der Zellen in durchflusszytometrischen Untersuchungen und hämatologischen Färbungen die Charakteristika von erythroiden Zellen, wobei sie die Oberflächenantigene CD71 und CD36 exprimierten.

Terminale Differenzierung von UCB-ECs in Erythrozyten

Die terminale Differenzierung von UCB-ECs in Erythrozyten wurde induziert, indem die Zusammensetzung der Zytokine im Kulturmedium geändert wurde (Leberbauer et al., 2005). Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in StemSpan SFEM mit folgenden Faktoren kultiviert: 10 U/ml Erythropoietin, $4x10^{-4}$ IE/ml Insulin (Actrapid, 100 IE/ml, NovoNordisk, Mainz), 10^{-6}M T3 Thyroidhormon, $3x10^{-6}$M Mifepriston (RU486), 3% humanes AB-Serum und 1 mg/ml Transferrin (alle Bestandteile von Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Faktoren wurden durch einen täglichen Mediumwechsel erneuert. Die Differenzierung wurde durch die Abnahme des Zelldurchmessers, durch das Anfärben von Zytospinpräparaten mit Benzidin und durch den kolorimetrischen Nachweis von Hämoglobin nachverfolgt (Dolznig et al., 2005).

Kapillarbildung bei UCB-ECFCs

Um eine Kapillarbildung auszulösen, wurden $5x10^3$ bis $2x10^4$ Zellen/Well in einer 96-Well-Zellkulturplatte, die mit 50µl Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg) beschichtet war, kultiviert. Die Kapillarbildung wurde über einen Zeitraum von 8 Stunden mit einem inversen Phasenmikroskop (DMIL Mikroskop, Leica, Glattbrugg, Schweiz), das mit einer DML Digitalkamera und der LeicaQ Win Software zur Bildanalyse (Leica Imaging System Ltd, Cambridge, UK) ausgestattet war, kontrolliert. HUVEC-Zellen wurden in diesem Nachweis als Positivkontrolle verwendet. Um eine Aktivierung der Endothelzellen auszulösen, wurden UCB-ECFCs mit 10 ng/ml rekombinantem, humanem Tumornekrosefaktor α (TNFα, Life Technologies, Darmstadt) für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Hochregulierung von CD62E und CD54 mit PE-gebundenen Antikörpern in einem Durchflusszytometer gemessen.

Differenzierung von AT-MSCs in Zellen des Mesoderms

Das Potential von AT-MSCs in Chondrozyten, Adipozyten und Osteozyten zu differenzieren, wurde *in vitro* getestet. Die Differenzierung wurde mit Hilfe von kommerziellen Medien induziert. Eine Kontrolle wurde in NH Expansion Medium (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) kultiviert. Für eine adipogene Differenzierung wurden AT-MSCs mit einer Zelldichte von $5x10^4$ Zellen/Well in einer 12-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät und für 3 Wochen in AdipoDiff-Medium (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) mit einem Mediumwechsel jeden 2. Tag kultiviert. Anschließend wurde Oil Red O verwendet, um die Lipidtröpfchen sichtbar zu machen. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in kaltem Methanol für 5 Minuten fixiert, gewaschen und schließlich für 20 Minuten in 0,5%iger Oil Red O Lösung (Sigma-Aldrich AG, Steinheim) in Isopropanol bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen gewaschen und mikroskopisch untersucht.

Zur Initiierung einer chondrogenen Differenzierung wurden die Zellen im ChondroDiff-Medium (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) kultiviert. Dazu wurden $5x10^6$ AT-MSCs durch 5minütiges Zentrifugieren bei 300g pelletiert. Das Zellpellet wurde für 24 Tage in ChondroDiff-Medium inkubiert, wobei alle 48 Stunden das Medium gewechselt wurde. Anschließend wurde das Pellet in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Färbung der Glykosaminoglykane wurde entweder direkt an deparaffinierten, 5µm Schnitten durchgeführt oder in Kombination mit der PAS-Reaktion (Periodic acid-Schiff reaction), die Glykogen färbt. Zur Detektion von Glykokonjugaten wurden Schnitte für 10 Minuten in 1% Alzian Blau, gelöst in 3% wässriger Essigsäure (pH 2,5), getaucht. Die Proben wurden gewaschen und für 10 Minuten in Schiffs-Reagenz inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten gewaschen, mit Hämatoxylin nach Weigerts gegen gefärbt, in einer Ethanolkonzentrationsreihe entwässert, mit Xylen behandelt und in einem harzigen Medium eingeschlossen.

Für die osteogene Differenzierung wurden $3x10^4$ AT-MSCs in 12-Well-Platten (Trasadingen, Schweiz) ausgesät und für 3 Wochen in OsteoDiff-Medium (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) kultiviert, wobei jeden zweiten Tag das Medium gewechselt wurde. Nach drei Wochen wurden die Zellen in 70%igem Ethanol fixiert. Die Alkalische Phosphatase in den Zellen wurde mit Hilfe des BCIP-NBT-Nachweis (Gibco, Karlsruhe) gemessen. Dazu wurde die BCIP-NBT-Lösung nach angesetzt und die Zellen darin nach Herstelleranweisung gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mikroskopisch untersucht.

4.1.3 Vitalitätstests und Funktionalitätsnachweise

Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Vitalität von dreidimensionalen, hESC-Fragmenten wurde eine Lösung aus Fluorsceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid (EB) verwendet (Dankberg und Persidsky, 1976). Diese Lebend-Tot-Färbung bestand aus 5ml proteinfreiem Basismedium (oder PBS), mit 8µl FDA (Stocklösung: 5 mg/ml in Aceton, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) und 50µl EB (Stocklösung: 1 mg/ml in Wasser, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe). Abgelöste hESC-Koloniefragmente wurden 1:1 mit der Vitalitätstest–Lösung gemischt, adhärente Kolonien wurden mit der reinen Lösung bedeckt, für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und mit PBS gewaschen. Anschließend

wurde an einem Fluoreszenzmikroskop mit Tripleband-Filter (Eclipse TE300, Nikon Europe, Amsterdam, Niederlande) Bilder aufgenommen und mit Hilfe der Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA, im Internet frei erhältlich) die Vitalität bestimmt, wie bereits beschrieben (Ehrhart et al., 2009).

Die Fläche der vitalen und adhärenten hESC-Kolonien wurde vor und nach der Kryokonservierung miteinander verglichen. Dazu wurden die Kolonien vor dem Einfrieren gekennzeichnet und deren Fläche bestimmt. Um die lebenden von den abgestorbenen Koloniebereichen nach dem Auftauen unterscheiden zu können, wurden die Zellen nach der Kryokonservierung mit FDA und EB angefärbt. Bilder wurden mit einem SMZ1500 Stereofluoreszenzmikroskop (Nikon Europe, Amsterdam, Niederlande) aufgenommen und mit Hilfe der Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA, im Internet frei erhältlich) miteinander verglichen. Für jeden Versuch wurden mindestens 150 Kolonien aus drei unabhängigen Ansätzen ausgewertet.

Bestimmung der Anwachsrate von humanen embryonalen Stammzellen

Zur Bestimmung der Anwachsrate wurden hESC-Fragmente in 6ml hESC-Kulturmedium auf eine 4,8cm Petrischalen (Corning, Kaiserslautern) mit inaktivierten PMEFs gegeben. Anschließend erfolgte die exakte Bestimmung der auf der Petrischale befindlichen Koloniefragmente durch Auszählen am Mikroskop (Eclipse TS100, Nikon Europe, Amsterdam, Niederlande) bei zweifacher Vergrößerung. 48 Stunden nach dem Aufgeben erfolgte der erste Mediumwechsel. Nach sieben Tagen wurde die Zahl der angewachsenen Kolonien am Mikroskop bei zweifacher Vergrößerung bestimmt. Die Anwachsrate errechnete sich dabei aus folgender Formel:

Anwachsrate [%] =(Anzahl der angewachsenen hESC-Fragmente / Anzahl der ausplattierten hESC-Fragmente)x 100

Immunphänotypisierung adulter Stamm- und Vorläuferzellen

Zur Immunphänotypisierung wurden die Zellen abgelöst und eine Antikörperfärbung an den lebenden Zellen durchgeführt. Dabei waren entweder Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC) direkt an die Primärantikörper gebunden oder, im Fall von ungelabelten Primärantikörpern, wurden anti-Maus IgG1, IgG2 oder IgG3 aus der Ratte oder Ziege (alle Bestandteile von Becton Dickinson, Heidelberg) als Zweitantikörper genutzt, die mit einem Farbstoff gebunden waren. Zur Färbung des intrazellulären von Willebrand-Faktors (vWf) wurden die Zellen zunächst für 3 Minuten mit 0,1%iger Triton X100 Lösung permeabilisiert.

Zur Charakterisierung der UCB-ECs wurden folgende Antikörper benutzt: anti-CD3 (Klon UCHT1), anti-CD34 (Klon 581), anti-CD29 (Klon K20), anti-CD81 (Klon JS64) von Beckman-Coulter, anti-CD14 (Klon MϕP9), anti-CD36 (Klon CB38), anti-CD44 (Klon G44-26), anti-CD45 (Klon HI30), anti-CD71 (Klon M-A712), anti-CD117 (Klon YB5.B8), anti-CD235A (Klon GA-R2/HIR2) von Becton Dickinson (Heidelberg) und anti-CD133 (Klon 293C3) von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach).

Zur Charakterisierung der UCB-ECFCs wurden folgende Antikörper benutzt: anti-CD45 (Klon 5B1), anti-CD133 (Klon AC133) von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), anti-CD105 (Klon MEM-226) von Abcam (Cambridge, UK), anti-CD31 (Teilnummer 2003788), anti-CD54/ICAM-1 (Teilnummer 2003785), anti-von Willebrand-Faktor (vWF, Teilnummer 2003787), anti-CD146 (Teilnummer 2003789) von Chemicon International (Hofheim), anti-KDR (89106) von R&D Systems (Wiesbaden),

anti-CD14 (Klon M5E2), anti-CD62E/E-Selectin (Klon 68-5H11), anti-CD117 (Klon YB5.B8), anti-CD144 (Klon 55-7H1) von Becton Dickinson (Heidelberg).

Zur Charakterisierung der AT-MSCs wurden folgende Antikörper benutzt: anti-CD11b (Klon ICRF44), anti-CD79a (Klon HM47) von BioLegend (DS Uithoorn, Niederlande), anti-CD34 (Klon AC136), anti-CD45 (Klon 5B1) von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), anti-CD14 (Klon M5E2), anti-CD44 (Klon G44-26), anti-CD73 (Klon AD2), anti-CD90 (Klon 5E10), anti-CD166 (Klon GHI/61), anti-MHC-I (Klon G46-2.6), anti-MHC-II (Klon G46-6) von Becton Dickinson (Heidelberg)und anti-CD105 (Klon MEM-226) von Abcam (Cambridge, UK).

Als Kontrolle wurden unspezifische Isotypantikörper verwendet. Die Zellen wurden mit einer 4%igen, gepufferten Formalinlösung fixiert und mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Pro Probe wurden mindestens 10^4 Ereignisse gemessen.

Nachweis der Fähigkeit zur Koloniebildung (CFU-Nachweis)

Für den CFU-Nachweis wurden ungefähr 10^5 MNCs in 500µl IMDM mit 2% BSA (StemCell Technologies, Köln) aufgenommen. 400µl dieser Suspension wurden in 3,6ml Methylzellulosemedium (StemCell Technologies, Köln) verdünnt. Mit einer 5ml Spritze und einer 16 Gauge Kanüle wurden 1,1ml Aliquots der Methylzellulose in Dreifachansätzen in eine 35mm Zellkulturschale (Nunc, Langenselbold) gegeben. Es wurden somit ungefähr $2x10^4$ mononukleäre Zellen pro Schale ausplattiert. Die Zellen in Methylzellulose wurden für ungefähr 14 Tage kultiviert und anschließend wurden die Kolonien mit einem inversen Mikroskop (Olympus, Hamburg) unter Verwendung von 4x und 10x Objektiven ausgezählt.

Bestimmung der Anzahl lebender CD34+-Zellen aus frischen Nabelschnurblut und mononukleären Zellen

Zur Quantifizierung lebender CD34+-Zellen aus Nabelschnurblut wurde eine 50µl Probe mit 20µl anti-CD45/CD34 Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) in einem TruCount-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) gemäß Herstelleranweisung gemischt. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt und rote Blutkörperchen (RBC) wurden durch Zugabe von 1ml Ammoniumchlorid Lysepuffer (PharmLyse, Becton Dickinson, Heidelberg) entfernt. Nach Lyse der Erythrozyten wurde 20µl des 7-AAD Farbstoffes (Becton Dickinson, Heidelberg) hinzugefügt, um die toten Zellen zu färben. Eine durchflusszytometrische Analyse wurde mit einem FACSScan durchgeführt und die Anzahl lebender CD34+-Zellen wurde gemäß eines modifizierten Protokolls nach ISHAGE bestimmt (Sutherland et al., 1996; Brocklebank und Sparrow, 2001). Das Färbeprotokoll wurde mit Hilfe des BD Stammzell Kontrollkits (Becton Dickinson, Heidelberg) kalibriert.

Zur Bestimmung der CD34+-Zellen aus isolierten MNCs, wurden die Zellen nach der Färbung mit 1ml PBS mit 0,1% BSA verdünnt, mit 7-AAD gemischt und analysiert wie oben beschrieben. Eine Lyse der Erythrozyten war hierbei nicht nötig.

Pluripotenznachweis bei humanen embryonalen Stammzellen

Die Expression von zwei Markern, Tra-1-81 und Oct-3/4, wurde mit Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen bestimmt. Für die Präparation wurden die adhärenten hESC-Kolonien mit 1 mg/ml Kollagenase IV (Fisher Scientific, Schwerte) abgelöst. Um die hESC-Koloniefragmente von den PMEFs zu trennen, wurden die Fragmente durch ein Zellsieb mit der Maschenweite von 70µm filtriert, mit einem Puffer aus PBS, 1% FBS und 0,09% NaN_3 (Sigma-Aldrich, Steinheim) gewaschen, um die unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu blockieren, und durch eine 15-minütige Behandlung mit Trypsin (0,05%ig mit 0,53mM EDTA, Invitrogen, Karlsruhe) bei 37 °C in Einzelzellen dissoziiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 300µl Fixationspuffer (Cytofix, Becton Dickinson, Heidelberg) resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C fixiert. Die Zellsuspension wurde dann mit anti-Oct-3/4- bzw. anti-Tra-1-81-Antikörpern gefärbt. Für eine Färbung des intrazellulären Oct-3/4 wurde die Probe zunächst für 30 Minuten bei 4 °C mit dem Perm Buffer III (Becton Dickinson, Heidelberg) permeabilisiert, während zur Detektion der Tra-1-81-Expression die Probe direkt mit dem Antikörper behandelt wurde. Dazu wurden 1µl PE-gekoppelter anti-Tra-1-81 IgM Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) bzw. 1µl PE-gekoppelter anti-Oct3/4 IgG Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) pro 10^5 Zellen verwendet. Als Kontrolle wurde eine ungefärbt, fixierte Probe bzw. eine IgG/IgM-Isotypkontrolle (Becton Dickinson, Heidelberg) genutzt. Die Proben wurden mit Hilfe eines FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) und mit der Software CellQuestPro (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert, wobei mindestens 10^4 Ereignisse gemessen wurden.

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Analyse wurden auch immunzytochemische Untersuchungen der Expression des spezifischen Human-Embryonic-Stem-Cell-Antigen-2 (HESCA-2) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen, und anschließend in einer Lösung aus 0,15M Natrium-Cacodylat-Puffer (Agar Scientific, Essex, UK) mit 2% Glutaraldehyd (Agar Scientific, Essex, UK) für mindestens 24 Stunde bei 4°C fixiert. Anschließend wurde die Probe dreimal mit PBS gewaschen und unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch 20minütige Inkubation in 1,5%igem Ziegenserum in PBS blockiert.

Die Bindung des anti-HESCA-2 Primärantikörpers (1:100, Millipore, Schwalbach) erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre IgM-Antikörper goat anti-mouse IgG, der mit AlexaFluorR 594 gekoppelt war (Invitrogen, Karlsruhe), in einer 1:200 Verdünnung in PBS mit 1% bovinem Serum Albumin (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim) zugegeben.

Die Probe wurde bei 4°C über Nacht oder alternativ für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar vor der qualitativen Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE 300, Nikon Europe, Amsterdam, Niederlande) wurde der Zellkern mit 10 µg/ml Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 (Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt.

Nachweis der Zellvitalität und Stoffwechselaktivität durch WST-1- und AlamarBlue-Test

Das Funktionsprinzip beider Methoden beruht auf einer enzymatischen Umsetzung, die einen photometrisch messbaren Farbumschlag bewirkt. Der WST-1-Test weist dabei die Funktionalität der Atmungskette nach, indem das schwach rote Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) von Zellen mit intaktem mitochondrialem Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenasesystem zum dunkelroten Formazan reduziert wird. Die Umsetzungsrate des Tetrazoliumsalzes spiegelt damit die Stoffwechselaktivität wieder.

Dazu wurden $1x10^4$ bzw. $2x10^4$ in Alginat verkapselte PMEFs in 200µl einer 10 Vol.-%igen WST-1 Lösung (Roche, Mannheim) für 4 bzw. 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand 1:10 mit PBS verdünnt und die Absorption der Flüssigkeit und somit die Umsetzung des Tetrazolimsazes an einem Spektralphotometer (Life Science UV/Vis Spektrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Der gleiche Vorgang wurde zusätzlich mit reinem Medium als Nullwert durchgeführt.

Der AlamarBlue-Assay (Invitrogen, Karlsruhe) dagegen basiert auf dem nicht fluoreszierenden, blauen Farbstoff Resazurin, der von metabolisch aktiven Zellen in fluoreszierendes, pinkes Resorufin umgesetzt wird. Dazu wurden die adhärenten Zellen in einer 10 Vol.-%igen Lösung des AlamarBlue-Reagenz in Zellkulturmedium für bis zu 24 Stunden inkubiert und anschließend wurde die Emission (λ=610nm) bei einer Anregung von λ=560nm am Mikroplattenlesegerat TECAN infinite 200 (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Schweiz) gemessen.

Die gemessene relative Absorption bzw. Fluoreszenz gibt dann, normiert auf reines Medium ohne Zellen als Kontrollwert, Informationen über die metabolische Aktivität der Zellen.

ELISPOT-Nachweis zur Analyse der Ausschüttung von Interferon-γ durch PBMCs

Die IFN-γ Ausschüttung von Lymphozyten, die im peripheren Blut vorhanden sind, wurde nach Stimulation mit Peptiden des Cytomegalievirus (CMV pp65 Peptidpool, Becton Dickinson, Heidelberg), bzw. mit einer Mischung dieser Peptide mit Bestandteilen des Epstein-Barr- und Influenzavirus (CEF-Peptide, CTL, Bonn) untersucht. Die grundsätzliche Fähigkeit zur IFN-γ Ausschüttung wurde durch eine unspezifische Anregung mit Phytohemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich, Steinheim) getestet und das Hintergrundsignal wurde durch Medium mit 0,4% DMSO bestimmt. Alle Reaktionen wurden in Dreifachansätzen analysiert. Dazu wurden 96-Well-Platten, die mit anti-humanen IFN-γ 1-D1k Antikörpern aus der Maus beschichtet waren (Mabtech, Hamburg), viermal mit PBS (Gibco, Karlsruhe) gewaschen und anschließend 30 Minuten mit IMDM (Gibco, Karlsruhe), das 10% FBS (PAA, Cölbe) und 1% L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe) enthielt, geblockt. Die eingefrorenen PBMCs wurden aufgetaut und über Nacht kultiviert. Ungefähr $2x10^5$ Zellen/Well wurden für die Ansätze mit CMV, CEF und die Messung des Hintergrunds eingesetzt. Für die Ansätze mit PHA wurden $1x10^5$ Zellen/Well verwendet. Die CEF- und CMV-Peptide sowie PHA wurden in einer finalen Konzentration von 128 µg/ml, 483 µg/ml bzw. 8 µg/ml zugegeben. Anschließend wurden die Platten für 20 bis 22 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nachdem die Platten fünfmal mit PBS gewaschen wurden, wurde die IFN-γ-Ausschüttung der T-Zellen durch die Zugabe von an HRP-gekoppelten 7-B6-1 Detektionsantikörpern aus der Maus (Mabtech, Hamburg), 1:200 verdünnt mit steril filtriertem PBS mit 0,5% FBS, gemessen. Nach der Inkubation wurden die Platten erneut fünfmal mit PBS gewaschen. Die Spots wurden unter Verwendung des Nova Red Substrat Kits (Vector Laboratories INC, Burlingame, USA) entwickelt. Dazu wurde die Spotentwicklung nach ein bis zwei Minuten gestoppt, indem die Platten ausgiebig mit destilliertem Wasser (B. Braun, Melsungen) gewaschen wurden. Die Spots wurden mit dem Immunospot Analyser (CTL, Bonn) ausgewertet. Das Ergebnis wird als die Anzahl spotbildender Zellen (SFC) pro 10^6 PBMCs angegeben.

4.1.4 Mikroskopietechniken: REM und MPLSM

Untersuchungen der Oberflächenstrukturen mit Hilfe der Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Für Untersuchungen mit Hilfe der Raster-Elektronen-Mikrokospie wurden die Zellen in PBS oder in 0,25 M Hepes-Pufferlösung (PAN, Aidenbach) gewaschen und in 2%igem Glutaraldehyd (Agar Scientific, Essex, UK), das in Natrium-Cacodylatpuffer (Agar Scientific, Essex, UK) gelöst wurde, für mindestens einen Tag bei 4 °C fixiert. Zellen in Suspension wurden anschließend mit PBS gewaschen und für mindestens 2 Stunden in PBS oder Medium ohne FBS auf mit Ethanol gereinigter Alufolie inkubiert, so dass sie aufgrund elektrostatischer Kräfte auf der Oberfläche adsorbiert wurden. hESC-Fragmente wurden für die Präparation in Zellkultureinsätzen (Micell, 12µm Porengröße, Millipore, Schwalbach) immobilisiert, während für adhärente Proben dieser Schritt nicht notwendig war. Anschließend wurden die Proben für REM nach dem Standardverfahren präpariert: mit Wasser gewaschen, entwässert in einer ansteigenden Ethanolkonzentrationsreihe, mit einem Polaron Range Kritisch-Punkt-Trockner CPD-7501 (Quorum Technologies Ltd., Ashford, UK) getrocknet und mit Schwermetallen bzw. Kohlenstaub beschichtet. Für einen besseren Kontrast wurden die hESC-Kolonien vor der Entwässerung mit 2%igem Osmiumtetroxid (Roth, Karlsruhe), 1%iger Tanninsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1%igem Uranylacetat (TED PELLA INC., Redding, USA) behandelt (Katsen et al., 1998). Die Proben wurden mit Sekundärelektronen- und Rückstreuelektronenkontrast an einem Philips XL30 ESEM Mikroskop (FEI, Eindhoven, Niederlande) mit 10kV Beschleunigungsspannung und 10mm Arbeitsabstand untersucht.

Untersuchungen der Membranintegrität mit Hilfe der Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie (MPLSM)

Um die räumliche Auflösung, die Eindringtiefe und die Qualität der Zellaufnahmen während und nach der Kryokonservierung zu verbessern, wurde das Multiphoton-Laser-Raster-Mikroskop LSM-510-Meta-NLO (Zeiss, Jena) verwendet. Dazu wurden humane embryonale Stammzellkolonien adhärent oder in Suspension vor und nach der Kryokonservierung in Hinsicht auf Membranintegrität und Zytoplasmaorganisation untersucht. Die innere Plasmamembran der Zellen wurde mit 2 µg/ml Di-8-Anneps (Invitrogen, Karlsruhe), der Zellkern wurde mit 10 µg/ml Hoechst 33342 (Sanofi-Aventis, Frankfurt) für ein bis zwei Stunden bei 37 °C gefärbt.

Um die Eiskristallbildung von unterschiedlichen Kryomedien in adulten Stamm- und Vorläuferzellen während der Kryokonservierung beobachten zu können, wurde das MPLSM in einer adaptierten Form verwendet (Doerr et al., 2009). AT-MSCs und UCB-ECFCs wurden in einer Konzentration von $1{,}5x10^4$–$3{,}8x10^4$ Zellen/cm² mindestens für 24 Stunden auf zellkulturbehandelten Kunststoffdeckgläsern (Thermanox©, Nunc, Langenselbold) mit einem Durchmesser von 13mm kultiviert. Um die Zellen während des Einfriervorganges deutlich sichtbar zu machen, wurde das Zytoplasma vorher mit 2 µg/ml Calcein (Invitrogen, Karlsruhe) und der Zellkern mit 10 µg/ml Hoechst33342 (Sanofi-Aventis, Frankfurt) angefärbt, indem die Zellen darin für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Nach der Färbung wurden die Zellen für 5 Minuten bei 4°C in den zu untersuchenden Kryomedien gehalten. Anschließend wurden die Zellen auf einen Kühltisch platziert, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Der Kühltisch besitzt eine computergesteuerte Temperaturrückkopplung und einen Temperaturbereich von +600 bis -196 °C (MDS 600). Er ist verbunden mit einer Temperaturkontrolle (TMS 94), einer Pumpe für flüssigen Stickstoff (alle Bestandteile von Linkam Scientific Instruments, Tadworth,

UK) und einem Vorratsbehälter für flüssigen Stickstoff. Die gefärbten Proben wurden mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren und mit 60 °C/min auf ungefähr 20 °C wieder aufgetaut. Zur Anregung wurde bei allen Versuchen ein Ti:Saphir Femtosekunden (Le Blanc et al.) Lasersystem (Mai Tai Broadband, Spectra-Physics, Mountain View, USA) mit einer mittleren Wellenlänge von 800nm verwendet, das einen 120fs Laserpuls mit einer Impulsfrequenz von 80MHz erzeugt. Die Bildaufnahmen wurden anschließend mit der Software Zeiss LSM Image Browser Version 3,5,0,376 analysiert. Bei den Aufnahmen der hESC-Kolonien nach der Vitrifikation wurde die Helligkeit bzw. der Kontrast für den blauen Kanal auf 68 bzw. 71 und für den grünen Kanal auf 47 bzw. 39 eingestellt. Außerdem wurden die Bilder für eine bessere Visualisierung mit dem „despeckle"-Modus der Software ImageJ bearbeitet, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren.

4.2 Kryokonservierung

4.2.1 Kryokonservierung von adulten Stamm- und Vorläuferzellen in Suspension mittels langsamer Kühlrate

Nach dem Ablösen der UCB-ECs, UCB-ECFCs und AT-MSCs wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit einer Konzentration von $1x10^6$ Zellen/ml in den unterschiedlichen Kryomedien resuspendiert. Dabei wurden als Kryomedien 90% FBS mit 10% DMSO als Kontrolle und ein proteinfreies, chemisch vollständig definiertes Medium, das auf dem Poloxamer 188 basiert mit einer DMSO-Konzentration von 5% bzw. 10% (Fischer Procryotect, Zürich, Schweiz, mit einer Lizenz des Fraunhofer IBMT hergestellt und vertrieben) verwendet. Anschließend wurden 1,5ml Aliquots in eisgekühlte Kryoröhrchen gefüllt, wobei aus jedem Röhrchen direkt wieder 0,2ml entnommen wurden, um die Zellzahl und Vitalität vor der Kryokonservierung zu bestimmen. Die Kryoröhrchen wurden in einer Isopropanolbox (Mr. Frosty, Nalgene, Langenselbold) mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren. Nach mindestens 2 Stunden wurden die Proben in einen Stickstofftank überführt, in dem sie mindestens 24 Stunden gelagert wurden. Zum Auftauen wurden die Röhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben, bis fast kein Eis mehr sichtbar war. Direkt nach dem Auftauen wurde aus jedem Röhrchen eine 0,2ml Probe zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde in 15ml Kulturmedium verdünnt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 6ml warmen Kulturmedium aufgenommen und jede Probe auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftauen (24 und 48 Stunden für UCB-ECFCs und AT-MSCs, 48 und 96 Stunden für UCB-ECs) wurden die Zellen mit dem Überstand abgelöst und gesammelt, um die Zellzahl und die Vitalität zu bestimmen. Jede Probe wurde dreifach mit einer Neubauerkammer oder mit einem automatischen Zellzählgerät ausgezählt, die Anzahl toter Zellen wurde mit Propidiumiodid am Durchflusszytometer bestimmt.

4.2.2 Kryokonservierung von humanen, embryonalen Stammzellen mit langsamen Kühlraten in Suspension

Die hESC-Kolonien wurden entweder mechanisch mit Hilfe einer sterilen Metallnadel, die normalerweise für die rasterelektronenmikroskopische Präparation verwendet wird (Fine Science Tools, Heidelberg), zerteilt und von der Oberfläche abgelöst oder nach einer 10minütigen Inkubation in 1 mg/ml Kollagenase IV (Gibco, Karlsruhe) durch Resuspendieren und anschließendes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 100g vorbereitet. In einer weiteren Präparationsmethode wurde die Suspension von enzymatisch abgelösten Fragmenten mit Hilfe eines Zellsiebs (Becton Dickinson, Heidelberg) nach Größe sortiert. hESC-Fragmente, die größer als 70µm waren, wurden in dem Sieb aufgefangen. Das Eluat mit Zellresten unter 70µm wurde verworfen. Die auf dem Zellsieb haftenden Koloniefragmente wurden von diesem Zellsieb durch Umdrehen und Abspülen mit 3ml hESC-Kulturmedium abgelöst.

Zur Bestimmung der Fragmentanzahl wurden 50µl der Suspension mikroskopisch ausgezählt. 100 (mechanisch) bzw. 1000 (enzymatisch) Koloniefragmente wurden mit 500µl Kulturmedium in ein Kryovial (Nunc, Langenselbold) gegeben. Zu der Suspension wurde die exakt gleiche Menge des Kryomediums aus 60% FBS und 20% DMSO (WAK-Chemie Medical, Steinbach) in Kulturmedium zugegeben, so dass die entstandene Lösung eine Endkonzentration von 10% DMSO und 30% FBS besaß. Die Kolonien wurden 30 Minuten bei 4°C inkubiert, in einem programmierbaren Einfrierautomat (IceCube 14s, Sy-Lab GmbH, Neupurkersdorf, Österreich) mit 1°C auf -80°C eingefroren und anschließend bei -176°C in der Gasphase über flüssigem Stickstoff in einem Kryotank (Biosafe®MD, Cryotherm, Kirchen/Sieg) eingelagert. Nach mindestens sieben Tagen Lagerung wurden die Proben im Wasserbad für drei Minuten bei 37°C aufgetaut. Die mechanisch abgelösten Kolonien wurden aufgrund der geringen Anzahl nach dem Auftauen direkt in eine 5cm Petrischale (Nunc, Langenselbold) mit 6ml hESC-Medium gegeben und ohne weitere Behandlung analysiert. Enzymatisch abgelöste Fragmente wurden in 9ml Kulturmedium aufgenommen, für eine Minute bei 100g zentrifugiert und in 3ml hESC-Medium aufgenommen. Vor und nach der Kryokonservierung wurde mit FDA/EB die Vitalität und durch Ausplattieren auf mitotisch inaktivierte PMEFs die Adhäsionsrate der Fragmente bestimmt.

4.2.3 Kryokonservierung von adhärenten, humanen embryonalen Stammzellen mit langsamen Kühlraten und Vitrifikation

Adhärente hESC-Kolonien wurden langsam in 35mm Zellkulturschalen (Nunc, Langenselbold) eingefroren. Nach einer Kultivierung von hESC-Kolonien für 4-6 Tage in einem Inkubator (37 °C, 5% CO_2, 95% Luftfeuchtigkeit) wurde das Kulturmedium abgesaugt. Die Kolonien wurden mit 1ml Kryokonservierungsmedium, bestehend aus 60% Standardmedium, 30% FBS (Gibco, Karlsruhe) und 10% DMSO (WAK-Chemie Medical, Steinbach), überschichtet, mit Parafilm umschlossen und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden in einem programmierbaren Einfrierautomaten (IceCube 14s, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Österreich) mit 1 °C/min von 4 auf -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Proben in einem Stickstofftank eingelagert (Biosafe®MD, Cryotherm, Kirchen/Sieg) und in der Gasphase für 5-7 Tage gelagert. Die hESC-Kolonien wurden in einem 37°C warmen Wasserbad innerhalb von zwei Minuten aufgetaut, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass kein Wasser aus dem Wasserbad in die Zellkulturschalen gelangte. Nach dem Auftauen wurden 2ml Kulturmedium tropfenweise zugegeben, um den osmotischen Schock zu minimieren. Anschlie-

ßend wurden die Zellen zweimal mit 1ml Kulturmedium gewaschen und in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden direkt, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden analysiert.

Für die Vitrifikation wurden hESCs auf zellkulturbehandelten Kunststoffdeckgläsern (Thermanox©, Nunc, Langenselbold) kultiviert und zwei Kryokonservierungslösungen hergestellt (Vajta et al., 1998a; Richards et al., 2004). Vitrifikationslösung 1 (VS1) enthielt 10% DMSO (WAK-Chemie Medical, Steinbach) und 10% EG (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Kulturmedium. Vitrifikationslösung 2 (VS2) bestand aus 300mM Saccharose (Sigma-Aldrich, Steinheim), 20% DMSO (WAK-Chemie Medical, Steinbach) und 20% EG (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Kulturmedium. Eine 6cm Zellkulturschale (Nunc, Langenselbold) wurde in einem Vorratsgefäß mit flüssigem Stickstoff versenkt. Die Kunststoffdeckgläser wurden zunächst für eine Minute in VS1, dann für 5 Sekunden in VS2 inkubiert und anschließend direkt in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Proben wurden für den Transport in die 6 cm Zellkulturschale mit Stickstoff gegeben und darin in der Gasphase eines Stickstofftanks eingelagert.

Nach mindestens 5-7 Tage Lagerung bei -170 °C wurde die Zellkulturschale mit den Kunststoffdeckgläsern wieder mit flüssigem Stickstoff gefüllt und in ein mit Stickstoff gefülltes Transportgefäß überführt. Die Proben wurden dann direkt in die Auftaulösungen getaucht. Dabei bestand Lösung 1 (WS1) aus 200mM Saccharose (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Kulturmedium und Auftaulösung 2 (WS2) aus 100mM Saccharose (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Kulturmedium. Zum Auftauen wurden die Zellen für 1 Minute in WS1 und dann für 5 Minuten in WS2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Standardmedium überführt und in einem Inkubator bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

4.2.4 Kryokonservierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs)

Für die Kryokonservierung von frisch isolierten PBMCs wurden folgende sechs Kryomedien verwendet:

(I) GHRC-CryoMedium I, hergestellt unter GMP-Bedingungen von PAA (Cölbe), enthält 12,5% BSA Fraktion V in RPMI 1640 und wird mit 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt.
(II) GHRC-CryoMedium II, hergestellt unter GMP-Bedingungen von PAA (Cölbe), enthält 12,5% BSA Fraktion V in RPMI 1640, 6% Hydroxyethylstärke (HES) und wird mit 5% DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt.
(III) GHRC-CryoMedium III, hergestellt unter GMP-Bedingungen von PAA (Cölbe), enthält 12,5% humanes Serum in RPMI 1640 und wird mit 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt.
(IV) IBMT-Medium I ist ein chemisch vollständig definiertes und proteinfreies Kryomedium, das auf 1% Poloxamer 188 als Additiv basiert und 10% DMSO enthält (Fischer Procryotect, Zürich, lizensiert durch das Fraunhofer IBMT, St. Ingbert).
(V) IBMT-Medium II ist nahezu identisch zu c) enthält aber 5% DMSO (Fischer Procryotect, Zürich, lizensiert durch das Fraunhofer IBMT, St. Ingbert).
(VI) Als Kontrollmedium wurde vorgetestetes, hitzeinaktiviertes FBS (PAA, Cölbe bzw. Gemini Bio-Products, West Sacramento, USA) mit 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet.

Dabei bestehen die GHRC-CryoMedien aus zwei Lösungen. Lösung A enthält kein DMSO, Lösung B ist mit 20% DMSO versetzt. Alle Kryomedien wurden frisch angesetzt und bei 4°C verwendet. Isolierte PBMCs wurden in einer Konzentration von 20 – 23x10^6 Zellen/ml in Lösung A der verschiedenen GHRC-CryoMedien resuspendiert. Die gleiche Menge von Lösung B wurde tropfenweise dazugege-

ben, so das eine finale Lösung mit 10% DMSO und mit 10 – 11,5x10^6 Zellen/ml entstand. In den proteinfreien Medien und der FBS-Kontrolle wurden die PBMCs direkt in einer Konzentration von 10–11,5x10^6 Zellen/ml resuspendiert.

Auf -20 °C vorgekühlte Kryoröhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht) wurden mit 1ml Aliquots der Zellsuspension befüllt, in eine Isopropanolbox (VWR, Darmstadt; Kühlrate laut Hersteller: 1°C/min) überführt und über Nacht bei - 80°C eingefroren. Anschließend wurden die Proben in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde IMDM-Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 10% vorgetestetem, hitzeinaktiviertem FBS (PAA, Cölbe bzw. Gemini Bio-Products, West Sacramento, USA) und 1mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe) verwendet. Die Kryoröhrchen wurden direkt aus dem Lagertankt in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und dort inkubiert, bis nur noch eine geringe Menge Eis in der Probe vorhanden war. Anschließend wurde 1ml des warmen Auftaumediums tropfenweise zur PBMC-Suspension zugegeben und die Probe in ein 50ml Polypropylenröhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht) mit 9ml vorgewärmten Auftaumedium pipettiert. Die Röhrchen wurden für fünf Minuten bei 400g zentrifugiert, das Zellpellet in 10ml Auftaumedium aufgenommen und über Nacht in einem Inkubator (5% CO_2, 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit) mit leicht angeschraubten Deckel kultiviert.

Es wurden je drei Proben pro Kryomedium und Spender aufgetaut. Die Zellvitalität und die Anzahl lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl wurden direkt nach dem Auftauen und nach Übernachtkultur bestimmt. Dazu wurden die Proben dreimal mit einem automatischen Zellzählgerät (ViCell, Beckman Coulter, Krefeld), das Trypanblau verwendet, gemessen.

Die Lebendzellzahl und die Vitalität wurden folgendermaßen bestimmt:

(I) Lebendzellzahl (%) (direkt nach dem Auftauen, 0h):

% Lebendzellzahl = Anzahl lebender PBMCs nach der Kryokonservierung x 100 / Anzahl der eingefrorenen, lebenden PBMCs

(II) Lebendzellzahl (%) (nach Übernachtkultur, 24h):

% Lebendzellzahl = Anzahl lebender PBMCs nach der Übernachtkultur x 100 / (Anzahl der eingefrorenen, lebenden PBMCs – Anzahl der lebenden PBMCs, die für die Messung bei 0h idealerweise entnommen wurden)

(III) Vitalität (%) (direkt nach dem Auftauen und nach Übernachtkultur)

% Vitalität = Anzahl lebender PBMCs x 100 / Anzahl aller gemessenen PBMCs (lebend+tot)

5. Resultate

5.1 Entwicklung funktionserhaltender Kryoprozeduren von humanen Stamm- und Vorläuferzellen

Humane Stamm- und Vorläuferzellen besitzen eine große Bedeutung im Bereich der Arzneimittelentwicklung und in regenerativen Therapien. Doch während die Isolierung und Kultur dieser Zelltypen bereits in einer Vielzahl von Studien untersucht wurden und strengen Kriterien bei therapeutischer Anwendung unterliegen, werden die Mechanismen der Schädigung einer kurz- oder langfristigen Kryokonservierung von Stamm- und Vorläuferzellen auf deren Funktionalität, Vitalität und Differenzierungspotential bzw. Pluripotenz bislang nicht verstanden. Vor allem das Einfrieren von humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) in Suspension stellt noch eine große Herausforderung dar, da mit den gegenwärtigen Standardprotokollen nur eine sehr geringe Überlebensrate der Zellen erzielt werden kann (siehe Kap. 2.1.4). Aus diesem Grund werden in diesem Kapitel zunächst die dreidimensionale Koloniestruktur der hESCs und deren Co-Kultur mit den embryonalen Mausfibroblasten (PMEF) charakterisiert, um Hinweise zur Verbesserung der Kryokonservierung zu erhalten. Daraus resultierend werden neben kryobiologischen Ansätzen in Suspension auch oberflächenbasierte Verfahren und deren Invasivität hinsichtlich der Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte analysiert. Für eine therapeutische Anwendung von adulten Stamm- und Vorläuferzellen werden Untersuchungen zur Vermeidung von tierischen Bestandteilen in Kryomedien und zur Reduktion der DMSO-Konzentration durchgeführt. Dazu werden die Kristallisationsvorgänge während des Einfrierens und Auftauens sowie deren Effekte auf die Membranintegrität und Zellfunktionalität untersucht.

5.1.1 Vergleichende Untersuchungen zur *in vitro* Kultur embryonaler Stammzellen

Im Gegensatz zur Kryokonservierung von Einzelzellen, stellt die standardisierte Ablage von Zellaggregaten und Zellgemischen aufgrund von unterschiedlichen thermodynamischen und osmotischen Eigenschaften innerhalb eines Zellverbandes und zwischen unterschiedlichen Zelltypen hohe Ansprüche an das Einfrierprotokoll. Daher befasst sich das folgende Kapitel zunächst mit der genauen Charakterisierung der hESCs und deren Interaktion mit den PMEFs, um so den Einfluss der dreidimensionalen Koloniestruktur und der Co-Kultur von hESCs mit PMEF auf die Kryokonservierbarkeit dieses Zellsystems zu untersuchen. Dazu wurde die Funktionalität der Stammzellen durch Untersuchung des Adhäsionsverhaltens bestimmt und die Eigenschaft der Selbsterneuerung („self-renewal“) durch Analyse der Zellproliferation charakterisiert.

Vergleichende Untersuchung zur mechanischen und enzymatischen Kolonieernte in Relation zur Morphologie der Stammzellaggregate

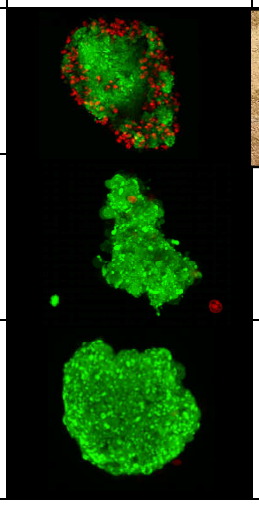
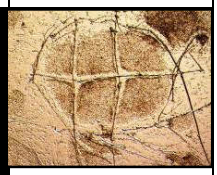
Um die adhärenten hESCs für eine Subkultivierung oder Kryokonservierung in Suspension von der Kulturoberfläche abzulösen, werden entweder mechanische oder enzymatische Prozesse angewendet. Zur Verbesserung der Zellpräparation im Hinblick auf die Kultivierung und das Einfrieren, wurden drei Protokolle zum Ablösen der Zellen miteinander verglichen (Tabelle 2). Dabei wurde untersucht,

ob durch das Ablösen der hESC-Koloniefragmente die Mebranintegrität und die Adhäsionsfähigkeit der Kolonien verändert werden.

Zunächst wurden die Zellen mechanisch mit einer feinen Nadel, die normalerweise für REM-Präparationen genutzt wird, zerschnitten, abgelöst und so belassen. Zum Vergleich wurden die Stammzellen enzymatisch mit einer 0,1%igen Kollagenaselösung geerntet und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren weiter fragmentiert. Aufbauend auf dieser Prozedur wurde die Zellsuspension in einem dritten Versuchsansatz noch durch ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 70µm filtriert und nur die im Sieb verbleibenden Fragmente für die weiteren Untersuchungen genutzt.

Tabelle 2: Übersicht über die unterschiedlichen Ablösemethoden.

Effizienz und Limitierungen der mechanischen und enzymatischen Behandlung der Zellen, sowie des enzymatischen Ablösens mit anschließender Größensortierung.

	Effizienz	**Zeitaufwand**	**CLSM-Aufnahmen (3D)**	
Mechanisch abgelöste Kolonien (gepickt)	Max. 100 Kolonien	2-3 Kolonien pro Minute		
Enzymatisch abgelöste Kolonien (0,1% Kollagenase)	Ca. 10.000 Kolonie-fragmente pro Zellkulturplatte	Ca. 30 Minuten pro Zellkultur-platte		
Enzymatisch abgelöste Kolonien größer als 70µm (Zellsieb)	Ca. 4000 Koloniefragmente pro Zellkultur-platte	Ca. 40 Minuten pro Zellkultur-platte		

Das mechanische Ablösen ermöglichte die Auswahl spezifischer Kolonien unter dem Mikroskop. Somit konnte eine Vorauswahl basierend auf der Qualität und dem Differenzierungsstatus individueller Kolonien getroffen werden. Diese Ablösemethode war jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Selbst für trainiertes Personal war das Ablösen von nur ungefähr zwei bis drei Kolonien pro Minute möglich. Da hESCs sehr sensitiv auf Temperatur- und CO_2-Schwankungen reagieren, sollten nie mehr als 100 Kolonien auf einmal abgelöst werden. Diese Methode ist daher für umfangreiche Experimente sehr limitiert.

Das enzymatische Ablösen erhöhte deutlich die Effizienz. Es war damit möglich, alle Kolonien einer Zellkulturplatte (bis zu 10000 hESC-Koloniefragmente) innerhalb von 30 Minuten zu ernten. Außerdem ist das parallele Ablösen mehrerer Platten möglich, so dass es hier nahezu zu keiner Limitierung kommt. Es konnte jedoch keine spezifische Auswahl der Kolonien getroffen werden und somit wurden auch spontan differenzierte Zellen mit abgelöst. Zusätzlich führte diese Methode zu einem inhomogenen Zellgemisch mit stark unterschiedlich großen Koloniefragmenten.

Um die kleinsten Koloniefragmente auszuschließen, wurden die enzymatisch abgelösten Kolonien im letzten Versuchsansatz mit Hilfe eines Zellsiebes noch zusätzlich nach Größe sortiert. Diese Adaption der enzymatischen Behandlung führte, wie in den folgenden Untersuchungen gezeigt wird, zu einer homogeneren Größenverteilung, verringerte allerdings die Effizienz der Methode. So wurde ungefähr die Hälfte der Fragmente aussortiert, da sie kleiner als 70µm waren. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt

nahm ungefähr 10 Minuten mehr Zeit in Anspruch. Die Nachteile lagen auch hier darin, dass keine Vorauswahl der Kolonien möglich war und dass jeder zusätzliche Arbeitsschritt die Gefahr einer Kontamination erhöhte.

Um die Effekte der unterschiedlichen Ablösemethoden auf die Membranintegrität und Koloniestruktur untersuchen zu können, wurden die hESC-Koloniefragmente mit Fluorsceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid (EB) gefärbt und die dreidimensionale Struktur der Fragmente mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht (Abbildung 8).

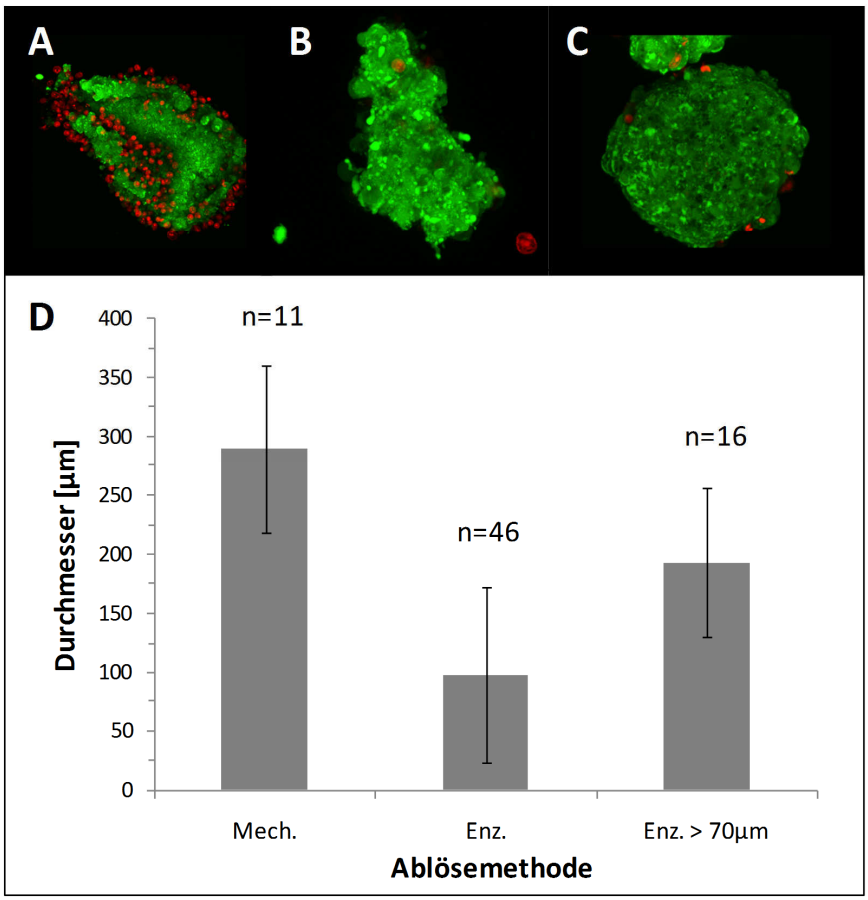


Abbildung 8: Struktur und Fragmentgröße von hESC-Koloniefragmenten nach dem Ablösen mit den drei unterschiedlichen Methoden.

(A-C) zeigen hESC-Koloniefragmente nach dem Ablösen mit den drei unterschiedlichen Ansätzen. Die Zellen wurden mit FDA und EB angefärbt, um die Membranintegrität zu bestimmen. Lebende Zellen erscheinen grün, tote rot. Die dreidimensionalen Darstellungen wurden aus optischen Schnitten durch die Koloniefragmente, die mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie erstellt wurden, konstruiert. (A) zeigt mechanisch abgelöste Kolonien, (B) enzymatisch abgelöste und (C) enzymatisch abgelöste Fragmente größer als 70µm. (D) zeigt die mittleren Durchmesser mit Standardabweichung der Fragmente, die manuell mit Hilfe der Software ImageJ aus Mikroskopaufnahmen bestimmt wurden. Die im Diagramm angegebenen Werte entsprechen der Anzahl der Fragmente, die ausgewertet wurden. Mech.: mechanisch abgelöst; Enz.: enzymatisch abgelöst; Enz.>70µm: enzymatisch abgelöste Fragmente größer als 70µm.

Alle Fragmente besaßen nach dem Ablösen eine gute Membranintegrität und eine kompakte Struktur mit engen Zell-Zell-Kontakten, unabhängig von der verwendeten Methode (Abbildung 8A-C). Allerdings wurden bei den mechanisch zerschnittenen und abgelösten Kolonien eine erhöhte Anzahl toter Zellen an der Peripherie der Fragmente detektiert (Abbildung 8A), die wahrscheinlich auf den mechanischen Stress während des Ablösens zurückzuführen sind. Im Vergleich besaßen die enzymatisch abgelösten Fragmente mit 97,93 ± 74,42µm die geringste und ungleichmäßigste Größe. Die

mechanisch abgelösten Kolonien, die nicht weiter fragmentiert wurden, besaßen mit 289,54 ± 71,38µm den größten Durchmesser (Abbildung 8G). Das zusätzliche Sortieren der enzymatisch abgelösten Fragmente mit Hilfe eines Zellsiebes führte zu einer erhöhten Homogenität der Suspension mit einem deutlich größeren Fragmentdurchmesser von 193,12 ± 62,56µm.

Da für ein optimales Ablösen der hESCs nicht nur die Vitalität, die über die Membranintegrität bestimmt wurde, sondern auch das Wiederanwachsen der Fragmente entscheidend ist, wurde parallel auch die Adhäsionsrate der unterschiedlich abgelösten Fragmente auf einer chemisch inaktivierten PMEF-Schicht untersucht (Abbildung 9).

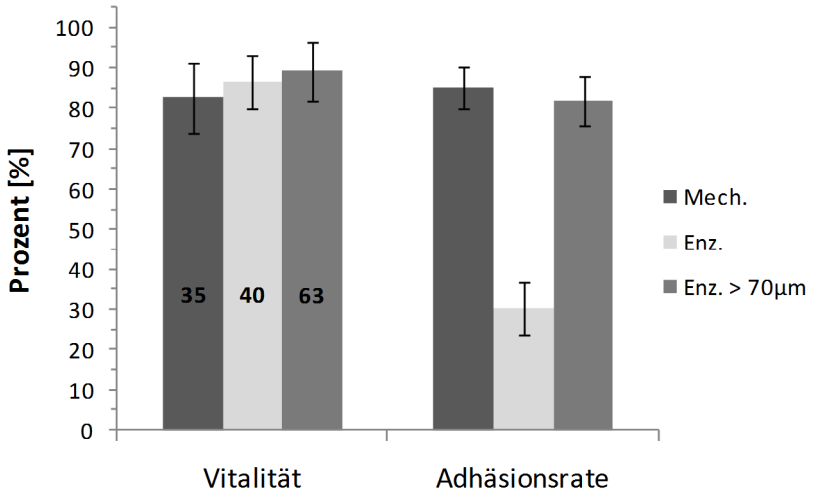


Abbildung 9: Vitalität und Adhäsionsrate der mit den unterschiedlichen Methoden abgelösten hESC-Koloniefragmente.

Die hESC-Koloniefragmente wurden nach dem Ablösen mit FDA und EB angefärbt und an einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert, um die Membranintegrität zu bestimmen. Die Vitalität wurde anschließend mit Hilfe einer computerbasierten Bildauswertung berechnet. Die Werte in der Graphik entsprechen der Anzahl der analysierten Fragmente. Die Adhäsionsrate entspricht dem Verhältnis der eingesetzten und nach einer Woche tatsächlich angewachsenen Fragmente und wurde in vier unabhängigen Ansätzen bestimmt.

Die Vitalität der abgelösten Kolonien war mit allen Methoden sehr hoch (Abbildung 9) und lag durchschnittlich bei mindestens 80%. Am geringsten war dabei die Vitalität der mechanisch abgelösten Fragmente mit 82,67 ± 8,76%, worauf bereits die CLSM-Aufnahmen der gefärbten Kolonien hindeuteten. Mit 86,63 ± 5,10% bzw. 89,30 ± 7,25% waren die Werte der enzymatisch abgelösten und der zusätzlich nach Größe sortierten Fragmente vergleichbar hoch.

Die Untersuchungen des Adhäsionspotentials der unterschiedlich abgelösten Kolonien ergaben, dass trotz der erhöhten Anzahl toter Zellen bei den mechanisch abgelösten Fragmenten, diese mit 85,22 ± 6,68% das beste Ergebnis erzielten. Im Gegensatz dazu wuchsen von den enzymatisch abgelösten, inhomogenen Fragmenten nur 30,45 ± 6,42% wieder an. Nach dem Entfernen aller Koloniefragmente von unter 70µm Durchmesser ergab sich dagegen eine sehr gute Adhäsionsrate von 81,83 ± 6,00%. Aus diesem Grund wurde in einem Kontrollversuch auch der Teil der Fragmentsuspension, der das Zellsieb passieren konnte, also kleiner als 70µm im Durchmesser war, auf einer Schicht aus inaktivierten PMEF-Zellen ausplattiert. Bei diesen Fragmenten konnte nahezu keine Adhäsion festgestellt werden. Somit scheint es eine Korrelation zwischen der Fragmentgröße und der Adhäsionsfähigkeit vorhanden zu sein: je kleiner die Fragmente, desto geringer ist das Adhäsionspotential.

Diese Ergebnisse zeigten, dass für ein effizientes Ablösen der Zellen für die Subkultivierung eine homogene Fragmentgröße der Stammzellkolonien und eine nicht zu starke Fragmentierung der Kolo-

nien wichtig sind. In den folgenden Messungen wurden daher immer enzymatisch abgelöste hESC-Fragmente mit einer Mindestgröße von 70µm verwendet. Zusätzliche Auswirkungen der unterschiedlichen Ablösemethoden auf die Kryokonservierung werden im weiteren Verlauf untersucht (Kapitel 4.1.3).

Strukturaufklärung von humanen embryonalen Stammzellkolonien

Die Adhäsion der hESC-Fragmente auf einer Zellkulturoberfläche nach einer Kryokonservierung ist ein kritischer Punkt und entscheidend für die weitere Verwendung der Zellen. Nur durch ein effizientes und reproduzierbares Anwachsverhalten der Zellen unter Erhalt der Pluripotenz können die Zellen als standardisiertes Ausgangsmaterial in spezifischen Differenzierungsprotokollen oder für toxikologische Untersuchungen genutzt werden. Um den spezifischen Adhäsionsvorgang einer Stammzellkolonie besser verstehen zu können, ist zunächst eine Untersuchung der Koloniestruktur von adhärenten Stammzellen im Vergleich zu Aggregaten in Suspension auf Einzelzellebene notwendig. Dazu wurden hESC-Kolonien mittels Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie (MPLSM) analysiert, da diese Technik eine gute räumliche Auflösung und eine hohe Eindringtiefe besitzt, dabei allerdings nur eine geringe lichtinduzierte Schädigung der Zellen auslöst. Mit Hilfe der MPSLM wurden optische Schnitte durch die Zellaggregate in vertikaler und horizontaler Richtung erstellt (Abbildung 10) und die abgebildeten Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktion untersucht.

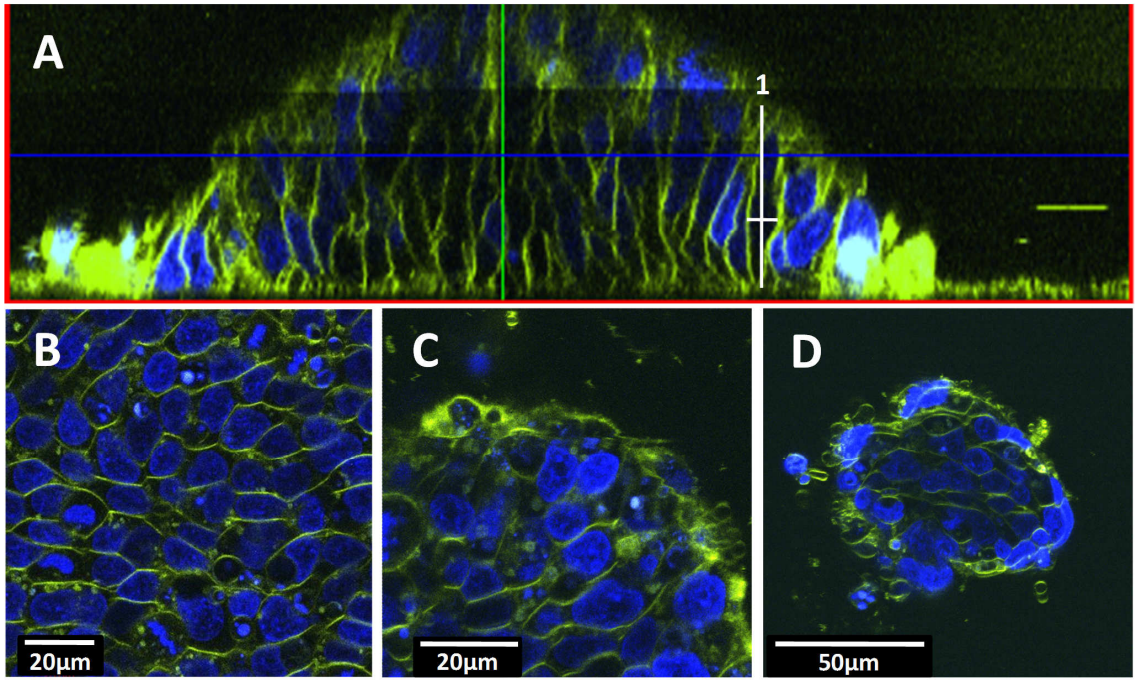


Abbildung 10: Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie von adhärenten Stammzellen (A, B) und abgelösten Fragmenten in Suspension (C, D).

Die MPLSM-Darstellung offenbart die Koloniestruktur; in den adhärenten Stammzellkolonien ist eine palisadenartige Anordnung der Zellen erkennbar (A) während die Zellen in abgelösten Kolonien keine Orientierung besitzen (C, D); zusätzlich sind die Zellen nahezu komplett vom Nukleus ausgefüllt (B-D); anhand der Bilder ist eine Bestimmung des Verhältnisses der vertikalen zur horizontalen Seitenlänge (A1) möglich; die innere Zellmembran wurde mit Di-8-Anneps (grün), der Zellkern mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt.

Die Untersuchungen zeigten, dass in Stammzellen der Nukleus einen Großteil der Zellen einnimmt und die adhärenten Kolonien eine kompakte Struktur besitzen (Abbildung 10A, B). Die Kolonie in Abbildung 10 hat einen maximalen Durchmesser von 290µm und ist 85µm hoch, wobei einige Kolo-

nien Durchmesser von über 1000µm erreichen können. Optische Schnitte zeigen eine palisadenartige Anordnung der Zellen innerhalb der Kolonie (Abbildung 10A), das heißt die Zellen ziehen sich vertikal durch die Kolonie. Dabei beträgt das Verhältnis der vertikalen zur horizontalen Seitenlänge einen Wert von 5,40 ± 1,15 (Abbildung 10A1, n=10). Zusätzlich konnten in der Kolonie vier Zellschichten unterschieden werden.

Die Zellstruktur innerhalb der Kolonie ändert sich deutlich nach dem Ablösen von der Oberfläche. Die langgestreckten Zellen ziehen sich in Suspension zusammen und gehen in eine abgekugelte Form über, wobei der Zellkern immer noch den größten Teil der Zelle einnimmt (Abbildung 10C, D).

Diese veränderte Koloniestruktur verdeutlicht die Komplexität der Reorganisation während des Ablöseprozesses und Anwachsvorganges und erklärt die Anfälligkeit dieser Schritte bei der Kryokonservierung. Doch eine Untersuchung dieses dynamischen Vorganges ist mit Hilfe von Standardmikroskopiemethoden nicht möglich. Für die dreidimensionale Visualisierung der Zellbewegung innerhalb der Kolonie ist die Verwendung von spezifischen Membran- und Kernfärbung notwendig, die allerdings diesen sensiblen Prozess direkt beeinflussen könnten. Zusätzlich ist für die Untersuchung des Adhäsionsvorganges eine zeitlich aufgelöste Darstellung der Koloniereorganisation wichtig, so dass weitere Analysen des Anwachsprozesses und der Proliferation mittels Videomikroskopie an ungefärbten Proben durchgeführt wurden.

Untersuchungen der Zelldynamik über Morphologieanalysen mittels Langzeitvideomikroskopie

Für die Kryokonservierung von hESCs stellen das Ablösen der adhärenten Kolonien von der Kulturoberfläche vor und das Anwachsen der Aggregate nach dem Auftauen entscheidende Schritte dar. Ziel war es daher, die komplexen Interaktionen der PMEF und der hESC-Kolonien während des Adhäsionsvorganges der abgelösten hESC-Koloniefragmente zu analysieren. Um diesen höchst dynamischen Vorgang detailliert untersuchen zu können, wurde der Anwachsvorgang von hESCs auf einer Zellschicht aus chemisch inaktivierten PMEF und die anschließende Proliferation der Zellen mittels Videomikroskopie zur mikroskopischen Beobachtung von Zellbewegungen und zellulären Prozessen unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5% CO_2 und über 95% Luftfeuchtigkeit) untersucht. Nur mit dieser Methode war es möglich, die Interaktion der hESC-Koloniefragmente mit den PMEF-Zellen und die strukturelle Umorganisation der Fragmente zeitlich hochaufgelöst beobachten zu können. Der Anwachsprozess und die Proliferation der Zellen wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden durch Aufnahme eines Bildes alle 15 Minuten beobachtet. Die Ergebnisse wurden dargestellt, indem die Fläche der Stammzellkolonie aus den Einzelaufnahmen ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen wurde (Abbildung 11). Es konnte beobachtet werden, dass die Koloniefragmente innerhalb von fünf Stunden wieder anwachsen und nach einer kurzen Verzögerung mit der Proliferation beginnen (Abbildung 11A). In der Proliferationsmessung von fünf Fragmenten konnte eine Größenzunahme der Koloniefläche auf bis zum 25-fachen der Ausgangsgröße innerhalb von 95 Stunden gemessen werden (Abbildung 11B, Fragment 2). Nach einer zeitlich hochaufgelösten Beobachtung des Adhäsionsvorganges und der PMEF-hESC-Interaktion mit Hilfe der Videomikroskopie, wurde die weitere Proliferation für 300 Stunden mittels konventioneller Mikroskopie untersucht (Abbildung 11C).

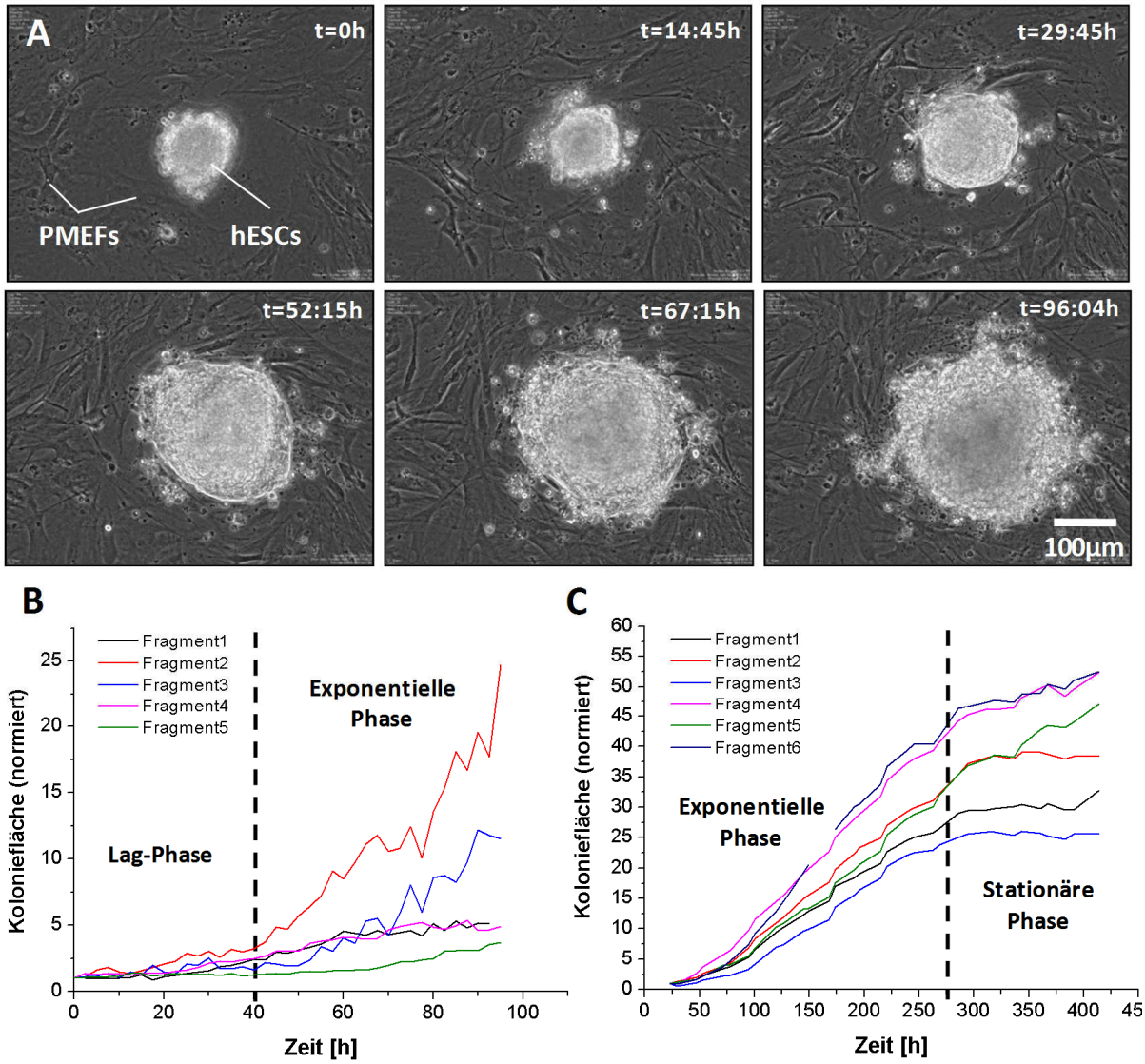


Abbildung 11: Anwachsprozess eines hESC-Koloniefragments innerhalb von 96 Stunden (A) und die entsprechenden Fläche-Zeit-Graphen von fünf Fragmenten (B), sowie die weitere Proliferation von sechs Fragmenten für 300 Stunden, aufgenommen mit konventioneller Mikroskopie (C).

Die Aufnahmen wurden mittels Videomikroskopie erstellt. Die Wachstumskurve zeigte eine sehr gute Proliferation der humanen embryonalen Stammzellkolonien und ermöglichte die Identifizierung von drei Wachstumsphasen; die Auswertung von Fragment3, t=168h in (C) fehlt.

Durch diese systematische Beobachtung war die Identifikation von drei unterschiedlichen Phasen der Zellproliferation möglich (Abbildung 11B, C). Bis die Fragmente nach dem Ausplattieren wieder angewachsen sind und sich reorganisiert haben, findet in der Lag-Phase nur ein geringes Koloniewachstum statt. In der anschließenden Exponentiellen Phase ist eine deutliche Zellproliferation sichtbar (Abbildung 11B, C), während in der Stationären Phase die Proliferation stagniert (Abbildung 11C). Da vor allem der Anwachsprozess eine kritische Voraussetzung für die Kultivierung der Stammzellen darstellt, wurde dieser Vorgang mit Hilfe der videomikroskopischen Aufnahmen noch einmal detaillierter untersucht. So konnten den bereits identifizierten Proliferationsphasen noch zwei weitere Anwachsphasen hinzugefügt werden. Es wurde festgestellt, dass die hESC-Koloniefragmente nach dem Aussäen schnell auf die PMEF-Zellschicht absinken (Sedimentations-Phase) und die PMEF-Zellen nach dem ersten Zellkontakt vor den Stammzellen zurückweichen (Kontakt-Phase, Abbildung 11A, t=0). Während der Lag-Phase, die bis 40 Stunden nach dem Ausplattieren dauert, kommt es zur

Adhäsion der Kolonien und es findet eine Reorganisation der hESC-Koloniestruktur statt (Abbildung 11A, t=14:45h). Direkt im Anschluss beginnen die Zellen in der Exponentiellen Phase zu proliferieren (Abbildung 11A, t=29:45h), wodurch die PMEF-Zellen noch weiter zurück gedrängt werden bis die Prolilferation in der Stationären Phase aufgrund der Platzlimitierung und der Unterversorgung der Zellen im Kolonieinneren stagniert.

Die videomikroskopischen Aufnahmen ermöglichten es also, das Anwachsen und die anschließende Proliferation der hESC-Koloniefragmente in insgesamt fünf Phasen zu unterteilen: Sedimentations-, Kontakt- (PMEF-Verdrängung), Lag- (Reorganisation), Exponentielle und Stationäre Phase. Diese Ergebnisse zeigten somit, dass eine direkte Interaktion der hESCs und der PMEF-Zellen vorliegt, da diese während des Anwachsvorganges und der Proliferation vor den hESC-Koloniefragmenten zurückweichen. Um die Effekte, die eine Co-Kultur mit inaktivierten PMEF-Zellen auf die Koloniestruktur und Zellmorphologie der Stammzellen besitzt, zu untersuchen, wurde ein Kultursystem entwickelt, das eine direkte Interaktion der beiden Zelltypen vermeidet, aber zur Standardkultur vergleichbare Kulturbedingungen gewährleistet.

5.1.2 Untersuchung neuer Kultivierungsansätze von humanen embryonalen Stammzellen

Für eine therapeutische Anwendung der hESCs ist entweder eine strikte Separation dieser Zellen von den PMEF notwendig oder es muss eine komplette Vermeidung der Mausfibroblasten erreicht werden. Insbesondere ist es wichtig, den Einfluss der PMEF auf die hESCs zu verstehen, um diese Kulturbedingung definiert imitieren zu können und somit optimale Konditionen zum Erhalt der Stammzellpluripotenz zu schaffen. Darüber hinaus sind Kultivierungsprotokolle notwendig, die eine standardisierte und kontrollierte Expansion des Zellmaterials für die Produktion von spezifisch differenzierten Zellen oder für die Untersuchung in toxikologischen Screenings ermöglichen. Das folgende Kapitel befasst sich daher mit der Untersuchung des Einflusses einer physischen Trennung von PMEF- und Stammzellen durch die Immobilisierung der Mausfibroblasten in ultrahoch viskosem Alginat auf die Stammzellmorphologie und den Pluripotenzerhalt. Zusätzlich wurde das Adhäsionsverhalten der Stammzellen in einer miniaturisierten und kontrollierbaren Umgebung analysiert.

Charakterisierung von primären embryonalen Mausfibroblasten

PMEF-Zellen stellen in der Co-Kultur den Stammzellen eine extrazelluläre Matrix zur Verfügung, auf der diese wachsen können, und sezernieren Faktoren in das Kulturmedium, die eine spontane Differenzierung der hESCs verhindern. Welche zusätzlichen Effekte eine direkte Interaktion der PMEFs mit den hESCs auf die Stammzellmorphologie besitzt, soll im Folgenden untersucht werden.

Dazu wurden PMEF-Zellen in Alginat, das aus Braunalgen gewonnen wurde, verkapselt, um beide Zelltypen räumlich zu trennen. In einem ersten Schritt wurden zunächst die PMEFs im Hinblick auf die Proliferationsgeschwindigkeit unterschiedlicher Passagen charakterisiert, um für die folgenden Untersuchungen ein geeignetes Ausgangsmaterial zu definieren (Abbildung 12). Da die Zellen kommerziell als Passage 3 erhältlich sind, wurde das Wachstum ab Passage 4 bis Passage 7 verglichen.

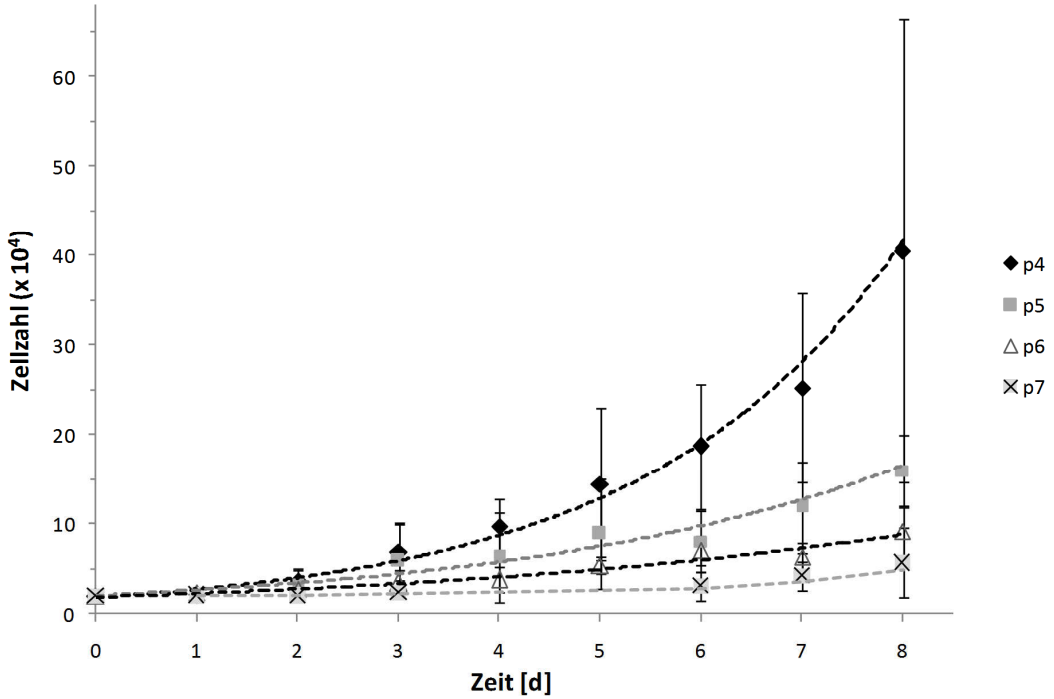


Abbildung 12: Wachstumskurven adhärent wachsender PMEF aus unterschiedlichen Passagen

Für jede Passage (p = Passage) wurden 8 mit Gelatine beschichteten T25-Kulturflaschen mit je 2x10^4 PMEFs angesetzt. Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, täglich wurde von jeder Passage eine Flasche abgelöst und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt; aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=3.

Die Analyse der Wachstumskurven zeigte, dass die Zellen der Passage 4 die höchste Proliferationsrate besaßen. Das Zellwachstum verlief exponentiell, so dass sich die durchschnittliche Zeit für eine Verdopplung der Zellzahl berechnen lässt (Abbildung 12).

Für die Zellen der Passage 4 wurde über die untersuchten acht Tage hinweg im Durchschnitt eine Verdopplungszeit von 2 Tagen bestimmt. Die Zellen aus späteren Passagen wuchsen dagegen deutlich langsamer. So verdoppelten sich die Zellen der p5 nach ungefähr 3 Tagen, während bei Zellen der p6 eine Verdopplungszeit von ungefähr 4 Tagen gemessen wurde. Am langsamsten wuchsen Zellen der Passage 7, hier betrug die Zeit für eine Verdopplung durchschnittlich 4-5 Tage. Diese Untersuchungen zeigten, dass für eine effiziente Verwendung für die PMEF nur ein enges Zeitfenster zur Verfügung steht. Aus Zellen der p7 können mit einer Verdopplungszeit von 4-5 Tagen nur mit einem großen Zeitaufwand die für eine Co-Kultur mit humanen embryonalen Stammzellen benötigten Zellen erzeugt werden. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen nur PMEFs der Passagen 4 bis 6 verwendet.

Verkapselung von primären embryonalen Mausfibroblasten in ultrahoch viskosem Alginat

Eine Immobilisierung der PMEFs in ultrahoch viskosem Alginat ermöglicht es den Zellen weiterhin, alle für das Überleben notwendigen Nährstoffe aufzunehmen und gleichzeitig die zum Pluripotenzerhalt für die hESCs nötigen Wachstumsfaktoren zu sezernieren. Dazu wurden zunächst das Verhalten und die Überlebensrate von PMEF, die in Alginatkapseln eingeschlossen wurden, untersucht. Zudem wurden proliferierende und mit Mitomycin C mitotisch inaktivierte Zellen miteinander verglichen, ob durch die physische Hemmung der Zellen im Alginat die zeitaufwendige Inaktivie-

rung der PMEF-Zellen, die in der Standardkultur ein Überwachsen der hESCs verhindern soll, noch erforderlich ist.

Dazu wurden 10^6 proliferierende und chemisch inaktivierte PMEF mit dem „Crystal Gun"-Verfahren in 1ml 0,65%igem Alginat verkapselt. Dabei wurden die Zellen in einer ultrahoch viskosen Alginatlösung aufgenommen und aus der Suspension wurde mit Hilfe von Druckluft Alginatkapseln mit einem Durchmesser von ungefähr 500µm gebildet. Durch Inkubation der Kapseln in einem Polymerisationsbad mit Ba^{2+}-Ionen, sowie durch den Einschuss von Ba^{2+}-Kristallen wurde das Alginat äußerlich und von Innen vernetzt.

Die Zellen wurden anschließend für sieben Tage in einem Inkubator (37 °C, 5% CO_2, 95% Luftfeuchtigkeit) mit einem Mediumwechsel an jedem zweiten Tag kultiviert. Die Vitalität der Zellen in Suspension wurde anhand der Membranintegrität vor und nach der Verkapselung täglich bestimmt. Dazu wurde eine Probe der Kapseln mit EB/FDA-Lösung gefärbt und die Anzahl lebender und toter Zellen in jeweils vier Kapseln am Fluoreszenzmikroskop bestimmt (Abbildung 13).

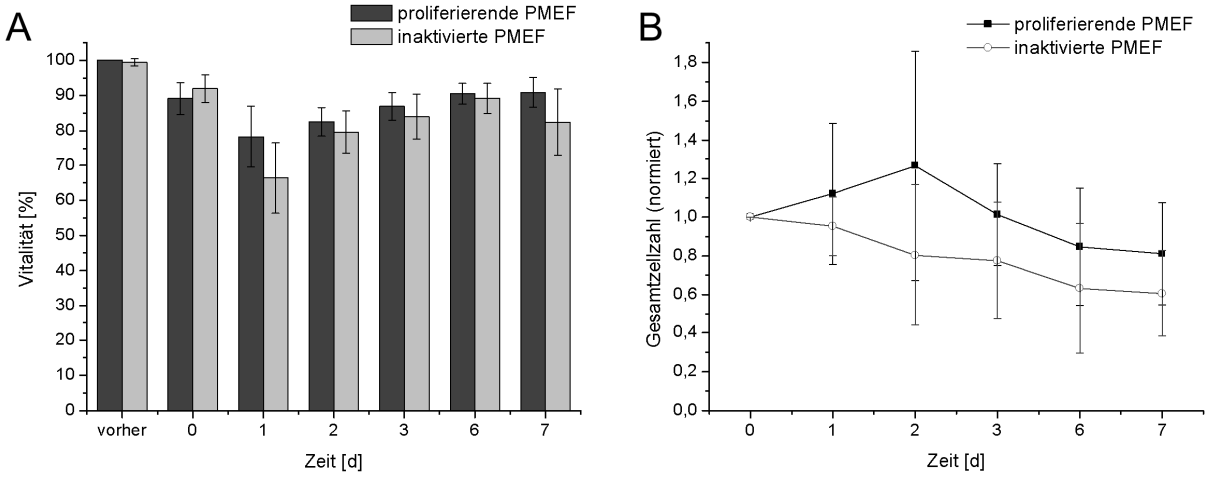


Abbildung 13: Vitalität (A) und Gesamtzellzahl (B) von proliferierende und mit Mitomycin C inaktivierten PMEF, die in 0,65%iges Alginat verkapselt wurden.

Proliferierende und mitotisch inaktivierte PMEF wurden mit Hilfe der Crystal Gun in Alginat immobilisiert. Die Vitalität der Zellen wurde vor und nach der Verkapselung bestimmt. Die Kapseln wurden mit einem Mediumwechsel jeden 2. Tag im Brutschrank inkubiert. Zur Vitalitätsbestimmung wurde eine Probe entnommen, mit FDA/EB-Lösung gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Der Prozentsatz vitaler Zellen von der Gesamtzellzahl wurde berechnet.

(A) Vitalität von proliferierenden und inaktivierten, verkapselten PMEF. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=3x4; (B) Gesamtzellzahl aller fluoreszierenden Zellen nach der Vitalitätsfärbung von proliferierenden und inaktivierten PMEF in Alginatkapseln. Aufgetragen sind die Mittelwert aus n=3x4 mit Standardabweichung, normiert auf den Mittelwert nach Verkapselung.

Die Vitalitätswerte der verkapselten PMEF ließen einen Tag nach der Verkapselung zunächst einen Einbruch auf 78,32 ± 8,76% bei proliferierenden bzw. auf 66,48 ± 10,15 % bei inaktivierten Fibroblasten erkennen (Abbildung 13A). In den Folgetagen verbesserte sich die Vitalität wieder und bis Tag 7 blieben zwischen 80 und 90% der verkapselten Zellen vital. Der Prozentsatz lebender, fluoreszierender Zellen lag dabei bei proliferierenden PMEF ab Tag 1 zwischen 82,56 ± 4,02% und 90,88 ± 4,20% und erreichte damit immer geringfügig höhere Werte als die mitotisch inaktivierten Zellen.

Zusätzlich zum prozentualen Anteil lebender Zellen wurde noch die Gesamtzellzahl der in den Alginatkapseln eingeschlossenen, fluoreszierenden Zellen aufgetragen (Abbildung 13B). Dabei nahm die Zellzahl der mitotisch inaktiven stetig ab, während bei den proliferierenden Zellen zunächst eine

Zunahme auf 126,45 ± 59,20% erkennbar war. Nach einer Woche war die Gesamtzellzahl bereits auf 60,55 ± 22,18% (chemisch inaktiviert) bzw. auf 81,16 ± 26,38% (proliferierend) der Ausgangsmenge gesunken.

Diese Ergebnisse konnten aufgrund der hohen Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede von proliferierenden und inaktivierten PMEF, die in Alginatkapseln eingeschlossen waren, sichtbar machen. Beide Proben zeigten eine gute Zellvitalität innerhalb von sieben Tagen, jedoch mit einer gleichzeitigen Abnahme der detektierbaren Zellzahl. Da dieses Resultat darauf schließen ließ, dass keine Proliferation der aktiven PMEF stattfand, wurde in den weiteren Experimenten auf eine mitotische Inaktivierung der PMEF verzichtet.

Da die Vitalitätsmessung allein keine vollständige Charakterisierung der verkapselten PMEF ermöglicht, wurde zusätzlich die Stoffwechselaktivität der eingeschlossenen Zellen täglich mit Hilfe eines WST-1-Tests über einen Zeitraum von einer Woche bestimmt. Um den Einfluss der Verkapselung auf den Metabolismus der PMEF zu untersuchen, wurden verkapselte proliferierende PMEF mit in 2D-Kultur wachsenden, chemisch inaktivierten Zellen, die für die Kultivierung von hESCs genutzt werden, und als Kontrolle zusätzlich mit in 2D-Kultur wachsenden proliferierenden PMEF verglichen (Abbildung 14).

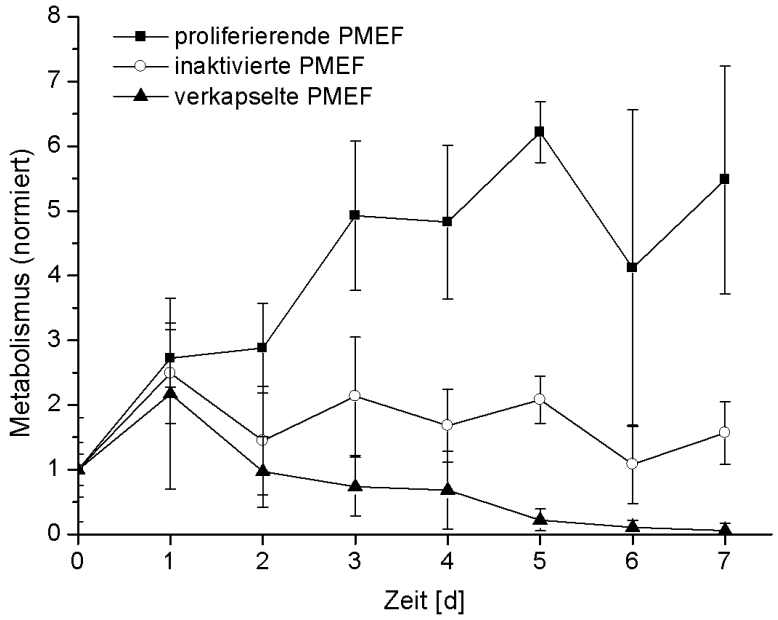


Abbildung 14: Bestimmung der Stoffwechselaktivität durch den WST-1-Test.

In einer 96-Wellplatte wurden proliferierende, mitotisch inaktivierte und verkapselte PMEF kultiviert (200 µl/Well, alle 2 Tage Mediumwechsel), die Konzentration der Suspensionen betrug 5x10^4 Zellen/ml, bzw. 1 Ansatz PMEF-Kapseln/10ml. Täglich wurden 3 Wells pro Ansatz und eine zellfreie Kontrolle mit je 10% WST-1-Lösung gemischt und 24h inkubiert. Der Überstand wurde 1:10 mit PBS verdünnt und die Absorption photometrisch bei 450nm gemessen. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=3.

Die Stoffwechselaktivität von proliferierenden PMEFs nahm deutlich zu und nach einer Woche wurde der fünffache Ausgangswertes erreicht. Der Kurvenverlauf zeigte dabei an Tag 6 einen Einbruch, bevor der Stoffwechsel an Tag 7 wieder anstieg. Der Metabolismus der mitotisch inaktivierten Zellen schwankten dagegen deutlich, blieb aber in einem annähernd konstanten Bereich von 1,00 ± 0,42 bis 2,49 ± 0,78. Im Vergleich dazu war bei den verkapselten PMEF ein stetiger Abfall der Metabolismusaktivität zu erkennen, der nach 6 bis 7 Tagen gegen Null tendierte.

Auch die Bestimmung der Membranintegrität und Metabolismusaktivität zeigte keine Proliferation der verkapselten PMEF. Es bestätigte sich daher, dass die Verkapslung der PMEF in Alginat eine zusätzliche mitotische Inaktivierung der Zellen unnötig macht. Allerdings wurde eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl und der Stoffwechselaktivität festgestellt. Im Folgenden wurde untersucht, ob die verbleibenden Zellen ausreichen, um die Pluripotenz der Stammzellen in Co-Kultur zu erhalten, oder ob die PMEF in der Fähigkeit zur Sezernierung der für die Stammzellkultivierung relevanten Faktoren durch die Immobilisierung in Alginat limitiert sind.

Co-Kultur von humanen embryonalen Stammzellen mit verkapselten PMEF-Zellen

Um den Einfluss eines mechanischen Kontakts der PMEF-Zellen auf die Stammzell- und Koloniemorphologie feststellen zu können, wurden hESCs räumlich getrennt von proliferierenden PMEF-Zellen, die in ultrahoch viskosem Alginat verkapselt wurden, kultiviert, so dass es zu keiner Zell-Zell-Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen kommen konnte. Außerdem sollte für eine therapeutische Anwendung der Zellen eine Co-Kultur der hESCs mit tierischen Zellen komplett vermieden oder wenigstens ein direkter physischer Kontakt verhindert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst ein neues PMEF-System mit in Alginat verkapselten, mitotisch aktiven PMEF entwickelt. Dazu wurden H9 hESCs auf humaner extrazellulärer Matrix (ECM) kultiviert und Alginatkapseln mit PMEF dem Medium zugesetzt. Dieser Ansatz verhindert eine Vermischung der beiden Zelltypen und garantiert eine vergleichbare Mediumzusammensetzung im Vergleich zur Standard-Co-Kultur. Die verkapselten PMEF konnten weiterhin alle nötigen Faktoren sezernieren und die ECM simulierte die von den PMEF produzierten Adhäsionsproteine. Diese Kultivierungsmethode erlaubt daher eine vereinfachte Handhabung mit einer strikten Separation der Zellen.

Um die Effizienz des neuen Kultursystems und die Auswirkung der fehlenden PMEF-Interaktion zu untersuchen, wurde sowohl die Morphologieveränderung der Stammzellkolonien mit Hilfe von Durchlicht- und Raster-Elektronen-Mikroskopie, als auch der Erhalt der Pluripotenz während der Kultivierung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Stammzellkolonien wurden dazu mechanisch abgelöst, um eine Übertragung von inaktivierten PMEF aus der Standardkultur zu vermeiden, und anschließend auf Kontroll- und Versuchsplatten gleichmäßig verteilt. Als Kontrolle dienten hESCs, die i) auf chemisch inaktivierten PMEF als Standardkultur ii) auf mit humaner ECM beschichteten Platten unter Verwendung von konditioniertem Medium mit einer erhöhten bFGF-Konzentration (10 ng/ml) als PMEF-freie Kontrolle, iii) auf mit humaner ECM beschichteten Platten unter Verwendung von konditioniertem Medium mit einer erhöhten bFGF-Konzentration (10 ng/ml) und zusammen mit Alginatleerkapseln, um die mechanischen Effekte der Alginatkapseln auf die hESCs identifizieren zu können, und iv) auf mit humaner ECM beschichteten Platten unter Verwendung von Standardmedium als Negativkontrolle ausplattiert wurden. Um die Auswirkung von verkapselten PMEF auf die Stammzellen zu untersuchen, wurde nach dem Verteilen der H9-Zellen, ein Ansatz PMEF-Kapseln im Standardmedium pro Platte zugefügt.

Die Morphologie der Kolonien wurde mit dem Lichtmikroskop nach einem Zeitraum von sieben Tagen verglichen (Abbildung 15A-D).

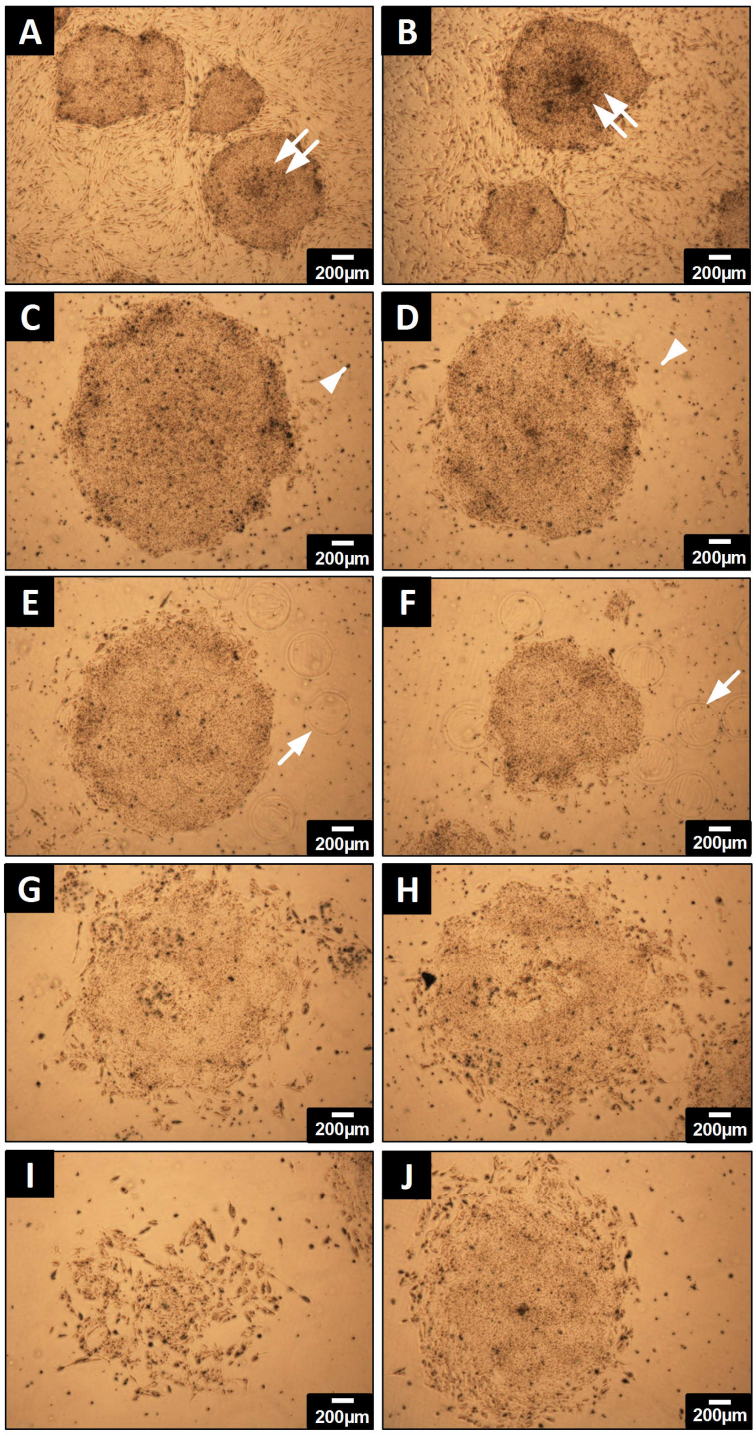


Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen von H9 hESCs, die mit in Alginat verkapselten PMEF für sieben Tage co-kultiviert wurden.

Die hESCs wurden auf inaktivierten PMEF-Platten (A, B) als kompakte Kolonien mit einem Zentrum aus mehreren Zellschichten (Doppelpfeile), auf humaner extrazellulärer Matrix mit konditioniertem Medium (C, D), mit konditioniertem Medium und Leerkapseln (E, F, Pfeile) sowie mit verkapselten PMEF-Zellen (G, H) kultiviert. Als Negativkontrolle dienten hESCs, die ohne PMEF im Standardmedium (I, J) gehalten wurden. Die Pfeilspitzen markieren einzelne hESCs, die den Kolonieverbund verlassen haben.

Die Fläche der hESC-Kolonien, die auf einer inaktivierten PMEF-Zellschicht kultiviert wurden, erreichte nach sieben Tagen eine Fläche zwischen 0,07 und 2,01 mm², ihre Morphologie blieb dabei kompakt mit einem klar abgegrenzten, glatten Rand und einer dreidimensionaler Struktur (Abbildung 15A, B). Diese Merkmale deuten auf einen undifferenzierten Zustand der Stammzellen hin. Deutlich

zu erkennen sind auch die dunkleren Regionen im Zentrum der Kolonien, an der die Kolonien besonders dick sind (Abbildung 15A, B; Doppelpfeil). In der PMEF-freien Kontrolle, die für sieben Tage in konditioniertem Medium mit einer erhöhten bFGF-Konzentration (10 ng/ml) kultiviert wurde, wurde dagegen mit Werten zwischen 1,32 und 5,27mm² eine deutlich größere Koloniefläche festgestellt als in der Standardkultur (Abbildung 15C, D). Die Kolonien besaßen zusätzlich eine geringere Höhe und nahmen beinahe eine Monolayerstruktur an. Der Kolonierand war hier etwas unebener und es waren in der Kultur eine Vielzahl an Einzelzellen sichtbar, die aus der Kolonie herausgewandert waren (Abbildung 15C, D; Pfeilspitzen). Um einen mechanischen Effekt der Alginatkapseln auf die Koloniemorphologie auszuschließen, wurde die PMEF-freie Kontrolle mit Alginatleerkapseln kultiviert (Abbildung 15E, F; Pfeil). Dabei wurde kein Unterschied zur PMEF-freien Kontrolle festgestellt. Im Versuchsansatz mit verkapselten PMEF waren die Kolonien ebenfalls nur als dünne Monolayer erkennbar (Abbildung 15G, H) und mit einer Fläche zwischen 1,13 und 5,61mm² vergleichbar groß wie in der PMEF-freien Kontrolle, wobei der Rand der Kolonien nach sieben Tagen ausgefranster war als in der Standardkultur oder in der PMEF-freien Kontrolle. Am Rand der Stammzellkolonien waren dabei die Zellen so weit auseinander gewachsen, dass man sogar die Umrisse einzelner Stammzellen sehen konnte (Abbildung 15G, H). Als Negativkontrolle wurden Stammzellen ohne PMEF auf humaner ECM mit Standardmedium kultiviert. In diesem Versuchsansatz wurde ein deutlich erhöhter Zellverlust festgestellt. Zusätzlich waren auch hier die Kolonien sehr flach, doch ging die Koloniestruktur in den meisten Fällen nahezu komplett verloren (Abbildung 15I), so dass nur noch ein lockerer Zellverbund aus vielen Einzelzellen erkennbar war.

Um zu überprüfen, ob die veränderte Morphologie der H9-Kolonien reversibel war oder aber als Anzeichen für eine beginnende Differenzierung gewertet werden muss, wurden die Zellen in einem weiteren Versuch nach 7-tägiger Kultur passagiert und auf Kulturplatten mit inaktivierten PMEF weiter kultiviert.

Die Stammzellen, die auf humaner ECM mit verkapselten PMEF-Zellen eine sehr flache Struktur mit weitläufiger Ausbreitung gezeigt hatten, bildeten nach dem Umsetzen auf eine mit inaktivierten PMEF bewachsene Standardplatte wieder kompakte dreidimensionale Kolonien mit einem klar abgegrenzten Rand (Abbildung 16A). Diese Kolonien ließen sich nach der Passage morphologisch nicht mehr von den Kontrollkolonien unterscheiden (Abbildung 16B).

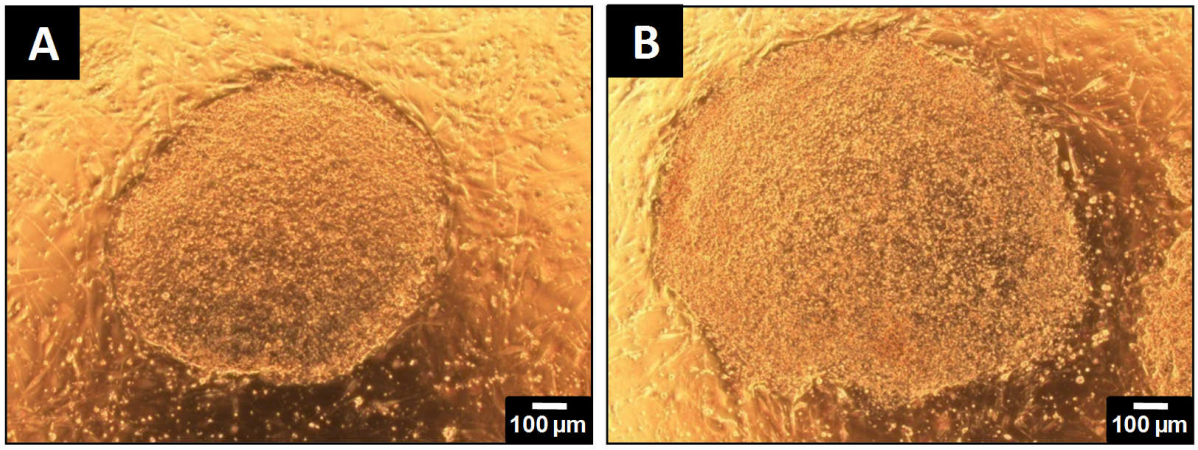


Abbildung 16: H9 hESC-Kolonien, die mit in Alginat verkapselten PMEF (A) bzw. auf mitotisch inaktivierten PMEF kultiviert wurden (B), nach dem Passagieren.

Die hESC-Kolonien wurden nach 7-tägiger Kultivierung mit in Alginat verkapselten PMEF-Zellen wieder auf einen Monolayer aus chemisch inaktivierten PMEF-Zellen umgesetzt (A) bzw. dauerhaft unter Standardbedingungen kultiviert (B).

Die H9 hESC-Kolonien wurden zusätzlich für rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen präpariert. Mit dieser Methode sollten neben morphologischen Unterschieden auch die Oberflächenbeschaffenheiten der Kolonien genauer untersucht werden. Dazu wurden die Kontrollkolonien aus der Standardkultur mit hESC-Kolonien, die auf humaner ECM mit PMEF-Alginatkapseln kultiviert wurden, an Tag 2 und 7 der Kultivierung miteinander verglichen und in Abbildung 17 dargestellt.

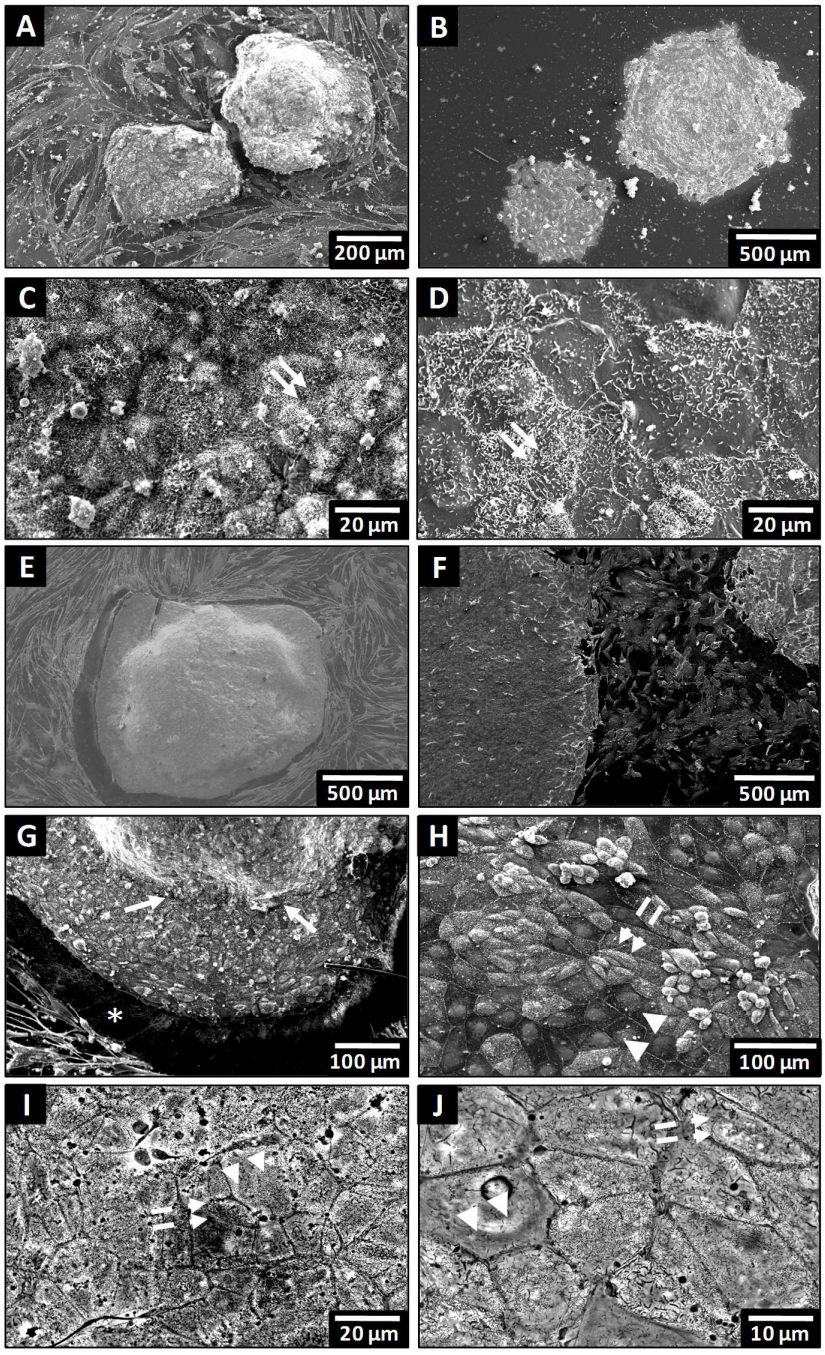


Abbildung 17: Repräsentative REM-Aufnahmen von H9 hESC-Kolonien an Tag 2 (A-D) und 7 (E-J) der Kultivierung auf einer inaktivierten PMEF-Zellschicht (A, C, E, G, I) und auf humaner ECM mit verkapselten PMEF (B, D, F, H, J).

(A) Kolonien, die für zwei Tage auf einem Monolayer aus inaktivierten PMEF-Zellen bzw. (B) auf humaner ECM mit in Alginat verkapselten PMEF-Zellen kultiviert wurden mit dichtem Mikrovillibesatz auf der Membranoberfläche (C, D, Doppelpfeile); nach sieben Tagen (E-J) ist in der Standardkultur eine Lücke zwischen der Stammzellkolonie und den PMEF-Zellen (G, Stern) mit einer deutlich erhöhten Koloniedicke im Zentrum erkennbar (G, Pfeile), dagegen sind aus der Kolonie auf humaner ECM mit verkapselten PMEF-Zellen einige Stammzellen aus der Kolonie herausgewandert und als Einzelzellen sichtbar (F); mit Hilfe des Rückstreuelektro-

nenmodus (back scattered electrons, BS) sind in beiden Proben enge Zell-Zell-Kontakte, sowie Zellen mit einer länglichen (H-J, gestrichelte Pfeile), bzw. runden Form (H-J, Pfeilspitzen) erkennbar.

Die REM Aufnahmen an Tag 2 der Kultivierung ergaben, dass sich die Kolonien auf humaner ECM mit verkapselten PMEF-Zellen bereits nach kurzer Zeit morphologisch von den Kolonien in der Standardkultur auf inaktivierten PMEF-Zellen unterschieden. Während die Kolonien auf den inaktivierten PMEF-Zellen eine dreidimensionale, unebene Struktur besaßen (Abbildung 17A), wuchsen die Kolonien auf humaner ECM flacher und nahmen die ungefähr 2,5-fache Fläche der Kolonien aus der Standardkultur (Abbildung 17B) ein, wobei in beiden Proben kompakte Zellen mit dichtem Mikrovillibesatz sichtbar waren (Abbildung 17C, D). Nach sieben Tagen war der Größenunterschied noch deutlicher erkennbar, wobei die PMEF-Zellen in einigen Fällen keinen direkten Kontakt mit den hESC-Kolonien hatten (Abbildung 17E, G, Stern). In beiden Ansätzen wurden enge Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 17H-J) festgestellt, allerdings waren die einzelnen Zellen bei dem Versuchsansatz mit PMEF-Alginatkapseln größer und flacher (Abbildung 17H, J) als in der Standardkultur (Abbildung 17I).

Zusätzlich fand man in beiden Proben morphologisch unterschiedliche Zellen, die entweder eine längliche Form angenommen hatten, die an Fibroblasten erinnerten (Abbildung 17H-J, gestrichelte Pfeile) oder rund waren (Abbildung 17H-J, Pfeilspitzen).

Um zu überprüfen, ob das neue verkapselte PMEF-System ein potentieller Kultivierungsansatz für hESCs darstellt, ist eine morphologische Untersuchung der Kolonien allein nicht ausreichend. Deshalb wurde mittels Antikörperfärbung gegen den spezifischen embryonalen Marker anti-Oct3/4 und durchflusszytometrischer Analysen analysiert, ob die verkapselten PMEF noch die Fähigkeit besitzen, die pluripotenten Eigenschaften der hESCs zu erhalten (Abbildung 18).

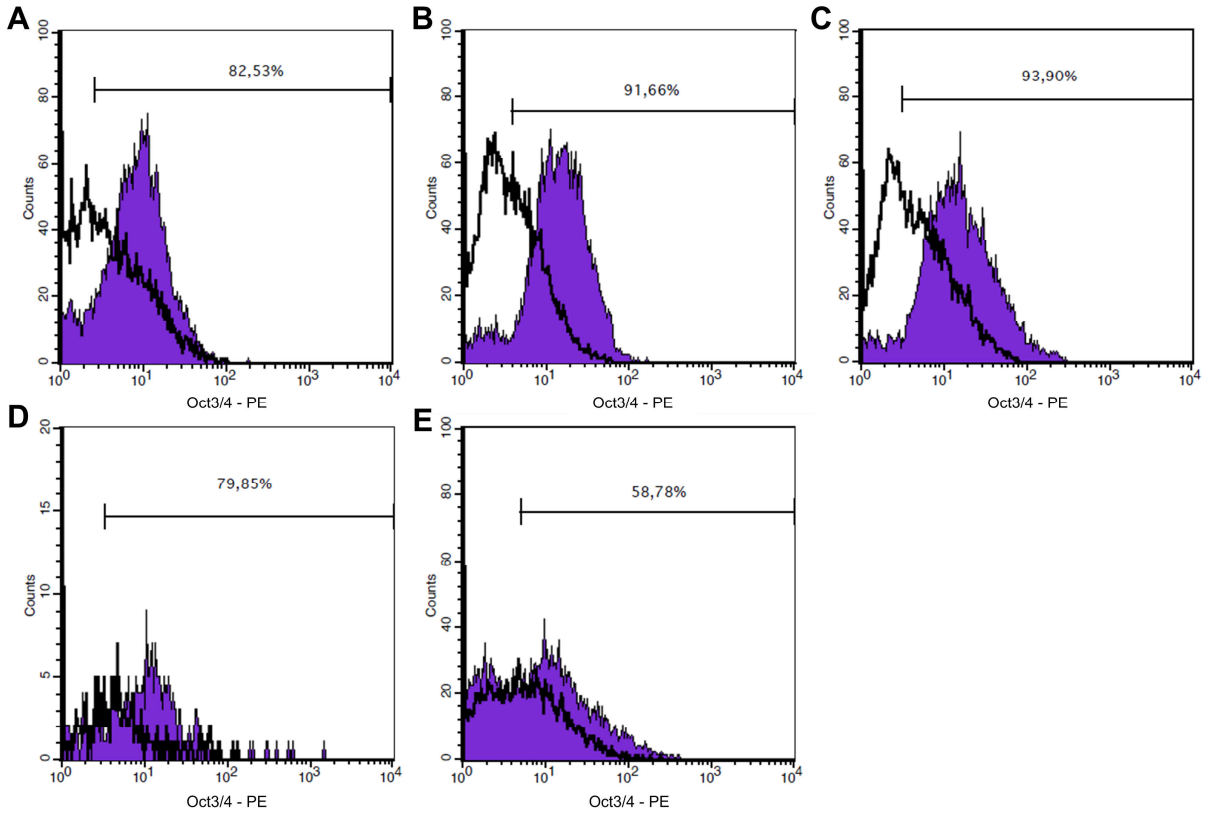


Abbildung 18: Repräsentative Histogrammdarstellungen der FACS-Analyse von hESCs nach einer Kultivierung zusammen mit verkapselten PMEF-Zellen und den Kontrollen.

Messung der Oct3/4-Expression vonH9 hESCs kultiviert auf humaner ECM mit verkapselten PMEF (A), von der PMEF-freien Kontrolle auf humaner ECM mit konditioniertem Medium (B), von der PMEF-freien Kontrolle mit

konditioniertem Medium und Alginatleerkapseln (C), von hESCs kultiviert nach dem Standardprotokoll (D) und von einer Negativkontrolle auf humaner ECM mit Standardmedium (E). In allen Proben wurden mindestens 5000 Zellen gemessen, nur in zwei Proben des Standardprotokolls lag die Zellzahl unter diesem Wert. Die Ergebnisse wurden dennoch in die Auswertung mit einbezogen, da es keine Auswirkung auf die Zellverteilung hatte. Schwarze Linie: Isotypkontrolle, violette Fläche: Oct3/4-Antikörper.

Die Bestimmung des Oct3/4-Signals ergab, dass die Expression bei H9 hESCs, die auf humaner ECM mit verkapselten PMEF (Abbildung 18A) kultiviert wurden mit 70,73 ± 11,10% vergleichbar war und in der gleichen Größenordnung lag wie bei den PMEF-freien Kontrollen auf humaner ECM mit konditioniertem Medium (77,8 ± 14,93%; Abbildung 18B) bzw. zusätzlich mit Alginatleerkapseln (82,55 ± 14,32%; Abbildung 18C). Im Gegensatz dazu zeigten Stammzellen, die ohne PMEF und im Standardmedium kultiviert wurden, einen Verlust der Oct3/4-Expression auf 58,10 ± 10,00% (Abbildung 18E). Die Standardkultur zeigte mit 71,40 ± 18,88% ebenfalls vergleichbare Werte (Abbildung 18D), durch die nötige Separation der hESCs von den inaktivieren PMEFs mit Hilfe eines Zellsiebes kam es allerdings zu einem erheblichen Zellverlust, so dass nur in einer Proben 5000 Ereignisse gemessen werden konnten.

Insgesamt zeigte sich, dass die Interaktion der Stammzellen mit den PMEF die Koloniestruktur definiert und zu einem dreidimensionalen Aufbau der Kolonie führt. Ohne die Co-Kultur mit den PMEF-Zellen besaßen die Stammzellkolonien eine größere Fläche und wuchsen in nur ein bis zwei Zellschichten. Auch die Stammzellen selbst schienen in REM-Aufnahmen größer zu sein als in der Standardkultur, wobei die Oberflächenbeschaffenheit in beiden Ansätzen identisch war. Die Verwendung von humaner ECM kann dabei die Co-Kultivierung mit PMEFs ersetzen. Zusätzlich wird entweder ein von den PMEF-Zellen für 24 Stunden konditioniertes Medium mit einer auf 10 ng/ml erhöhten bFGF-Konzentration oder das in dieser Arbeit entwickelte System aus in Alginat verkapselten PMEF-Zellen benötigt, um die Pluripotenz der hESCs zu erhalten. Ein weiterer Vorteil ist, dass anschließende Analysen durch die Homogenität der reinen embryonalen Stammzellpopulationen deutlich erleichtert werden.

Abschließend wurde untersucht, ob die Kultivierung von hESCs für eine spätere Verwendung in toxikologischen Screening-Ansätzen oder zur Medikamentenentwicklung unter vollständig standardisierten und kontrollierbaren Bedingungen auf eine miniaturisierte Umgebung übertragen werden kann. Aufgrund des sehr geringen benötigten Volumens und dem daraus resultierenden niedrigen Zell- und Wirkstoffverbrauchs, wurde die etablierte Methode der „Hanging droplet“ (HD)-Kultivierung als Basis des Versuchsaufbaus verwendet. Bei dieser Technik werden Zellen in einem Tropfenvolumen von ungefähr 20µl an die Deckelunterseite einer Zellkulturschale platziert, die mit Flüssigkeit befüllt ist, um die Evaporation zu verringern. Die HD-Kultivierung wird normalerweise nicht zur Kultivierung von Zellen, sondern zur Bildung von Stammzellaggregaten und zur Induzierung der Differenzierung verwendet. Um dies zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die PMEF-freie Kultivierung der hESCs auf Microcarriern etabliert. Durch die Microcarrier wurde den Zellen die für die Kultivierung benötigte Adhäsionsoberfläche bereit gestellt und ein möglichst hoher Grad an Standardisierung erreicht. Die PMEF-freien Bedingungen wurden durch die Verwendung von konditioniertem Medium, das für 24 Stunden mit PMEF-Zellen inkubiert und mit einer erhöhten Konzentration an bFGF (10 ng/ml) angereichert wurde, sowie durch die Beschichtung der Microcarrier mit humaner ECM geschaffen. Anschließend wurden die hESCs für 10 Tage im hängenden Tropfen kultiviert.

Die Ergebnisse in Abbildung 19 zeigten, dass eine Kultivierung von hESCs auf Microcarriern im hängenden Tropfen möglich ist. Dabei konnte ein deutliches Wachstum der Zellen während der 10-

tägigen Kultivierung festgestellt werden, wobei die Zellen eine steigende Zahl an Microcarriern besiedelten (Abbildung 19A). Außerdem zeigte die immunzytochemische Untersuchung der Zellen nach der Kultivierung den nahezu vollständigen Erhalt der Pluripotenz (Abbildung 19C-E). Dazu wurden die hESCs nach der 10-tägigen Kultivierung wieder auf einem Monolayer aus inaktivierten PMEF-Zellen kultiviert, um somit eine Latenzzeit für eine mögliche, induzierte Differenzierung zu gewährleisten. Es konnte dabei kein Unterschied in der Expression des spezifischen Stammzellantigens HESCA-2 zur Standardkultur und der PMEF-freien Kontrolle, die in einer 96-Well-Platte kultiviert wurden, festgestellt werden.

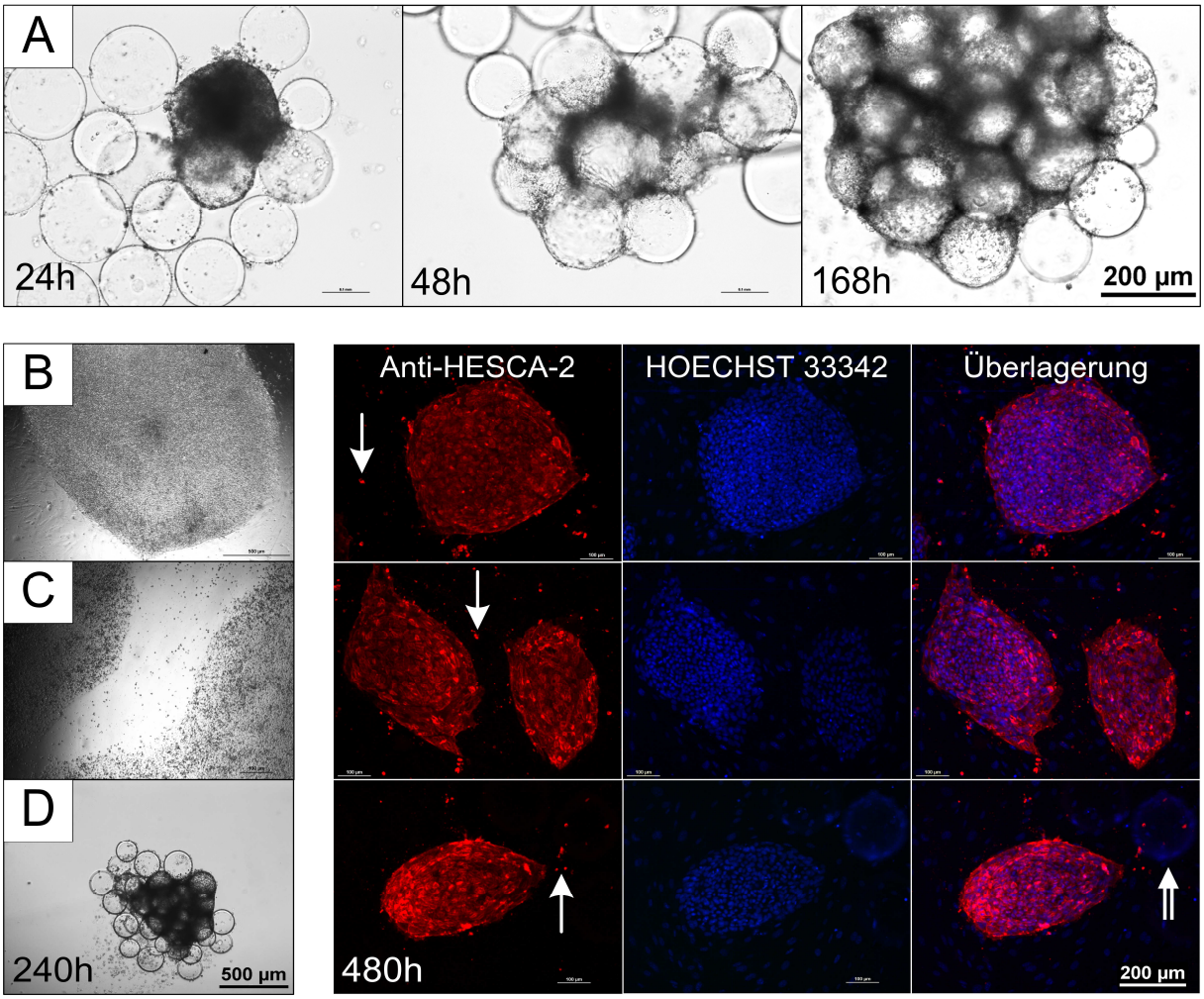


Abbildung 19: Wachstum und Pluripotenz von hESCs, die für 10 Tage ohne PMEF im hängenden Tropfen mit einem Mediumwechsel an jedem zweiten Tag kultiviert wurden (Abbildung aus Schulz et al., 2011b).

(A) Stammzellen bewachsen während der HD-Kultivierung weitere Microcarrier und bilden ein immer größeres Agglomerat. (B-D) Vergleich der Morphologie und Pluripotenz von hESCs, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden an Tag 10 der Kultivierung in 2D- und 3D-Systemen. Es sind Mikroskopbilder und die entsprechenden immunzytochemischen Färbungen gegen das spezifische Stammzellantigen HESCA-2, die Kernfärbung mit Hoechst 33342 und die Überlagerung beider Färbungen nach zwei anschließenden Passagen dargestellt. (B) Standardkultur von hESCs auf einem Monolayer aus chemisch inaktivierten PMEF-Zellen. (C) PMEF-freie 2D-Kultur von hESCs auf humaner ECM mit konditioniertem Medium, das für 24 Stunden mit PMEF-Zellen inkubiert wurde und die bFGF-Konzentration auf 10 ng/ml erhöht wurde. (D) PMEF-freie 3D-Kultur von hESCs im hängenden Tropfen auf Microcarriern, die mit humaner ECM beschichtet wurden, mit konditioniertem Medium. Die Pfeile kennzeichnen Einzelzellen, die außerhalb der Stammzellkolonien ein positives Pluripotenzsignal zeigten, der Doppelpfeil zeigt auf einen nach der Passage in der 2D-Kultur verbliebenen Microcarrier.

Insgesamt konnten grundlegende Kulturbedingungen für eine PMEF-freie Kultivierung von adhärenten hESCs auf Microcarriern im hängenden Tropfen etabliert werden. Diese Ergebnisse bilden den ersten Schritt zu einer miniaturisierten Screening-Plattform, die auch die Implementierung von Pipettier- und Mikrofluidiksystemen ermöglicht.

5.1.3 Vergleichende Untersuchungen zur Kryokonservierung humaner Stamm- und Vorläuferzellen

Effiziente und verlässliche Kryokonservierungsprotokolle sind unerlässlich für einen therapeutischen und pharmazeutischen Einsatz von biologischem Material. Außerdem kann nur eine kontrollierte Langzeitlagerung eine permanente und ortsunabhängige Verfügbarkeit garantieren. Gegenwärtig erfüllt die Kryokonservierung von humanen Stamm- und Vorläuferzellen durch die geringe Effizienz und xenogene Zusätze noch nicht die erforderlichen Voraussetzungen. Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel Ansätze zur Verbesserung dieser Missstände sowie zur nötigen Reduktion der zytotoxischen DMSO-Konzentration evaluiert. Dazu wird der zelluläre Stress, der während der Zellpräparation und Kryokonservierung auf die Membranintegrität und Morphologie wirkt, untersucht. Basierend auf diesen Analysen werden im folgenden Kapitel Strategien entwickelt, wie zum Beispiel oberflächenbasierte Kryoprotokolle, um diesen Stress zu reduzieren.

Untersuchungen zum Einfluss der Adhäsion von humanen embryonalen Stammzellen auf den Kryokonservierungserfolg

Zur Kryokonservierung von humanen embryonalen Stammzellen in Suspension müssen die Stammzellkolonien zunächst von der Kulturoberfläche abgelöst werden. Da in Kapitel 4.1.1 gezeigt wurde, dass unterschiedliche Ablösemethoden einen Einfluss auf die Vitalität und Adhäsion der Zellen haben, soll nun die Auswirkung der Zellpräparation auf den Kryokonservierungserfolg untersucht werden. Um diesen zu evaluieren, wurden die Vitalität und die Fähigkeit der hESCs zur Adhäsion als Auswerteparameter festgelegt (Abbildung 20). Die Koloniefragmente wurden nach dem Ablösen mit den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Methoden in einem Kryomedium aus 30% FBS und 10% DMSO in Kulturmedium aufgenommen, darin bei 4°C für 30 Minuten inkubiert und mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Proben in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Aufgetaut wurden die Proben in einem 37 °C warmen Wasserbad.

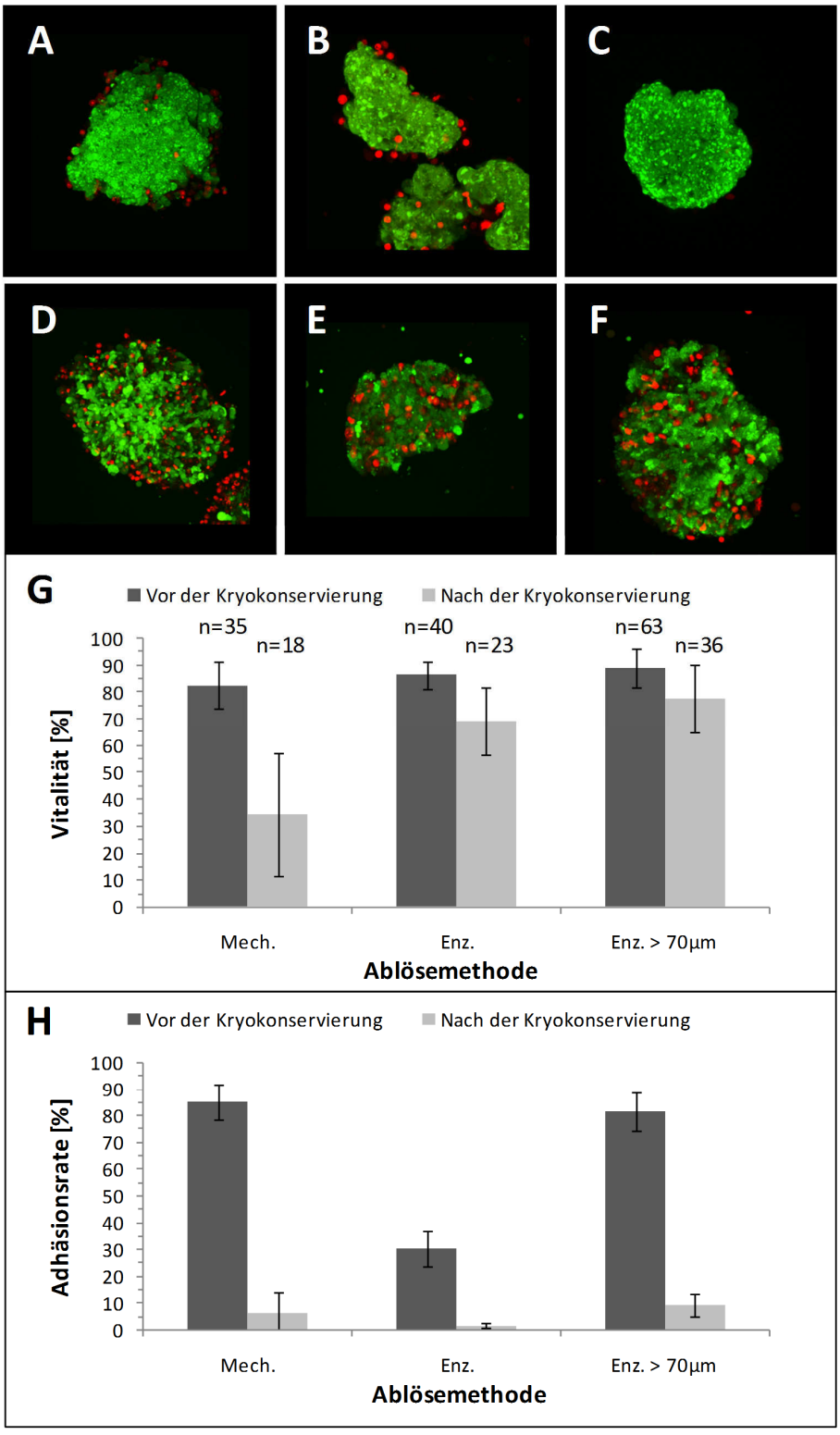


Abbildung 20: Vitalität (A-G) und Adhäsionsrate (H) der unterschiedlich abgelösten hESC-Koloniefragmente vor und nach der Kryokonservierung.

Die hESC-Koloniefragmente wurden mechanisch (A, D), enzymatisch (B, E) oder enzymatisch mit anschließender Größensortierung (C, F) abgelöst und in Medium mit 30% FBS und 10% DMSO eingefroren. Nach dem Ablösen bzw. nach der Kryokonservierung wurden die Proben mit Fluoresceindiacetat und Ethidiumbromid angefärbt und an einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert, um die Membranintegrität zu analysieren. Die Vitalität (G) wurde anschließend anhand der Membranintegrität mit Hilfe einer computerbasierten Bildauswertung bestimmt. Die im Diagramm angegebenen Werte entsprechen der Anzahl der Fragmente, die vermessen wurden. Zusätzlich wurden CLSM-Aufnahmen der gefärbten Fragmente erstellt (A-F). Die Adhäsionsrate (H) entspricht

dem Verhältnis der eingesetzten und nach einer Woche tatsächlich angewachsenen Fragmenten und wurde in vier unabhängigen Ansätzen bestimmt. Mech.: mechanisch abgelöst; Enz.: enzymatisch abgelöst; Enz.>70µm: enzymatisch abgelöste Fragmente größer als 70µm.

Im Gegensatz zu den Aufnahmen vor der Kryokonservierung (Abbildung 20A-C) zeigten CLSM-Aufnahmen einen Verlust der Vitalität und Kompaktheit in allen Proben nach dem Auftauen (Abbildung 20D-F). Vor allem am Rand der Koloniefragmente war eine erhöhte Anzahl toter Zellen zu erkennen, die zu einem ausgefransten Erscheinungsbild führten.

Dabei erreichten enzymatisch abgelöste Fragmente bzw. enzymatisch abgelöste Fragmente, die größer als 70µm waren direkt nach dem Auftauen eine Vitalität von 69,15 ± 12,74% bzw. 77,47 ± 12,61%, nur mit dem mechanischen Ablöseprotokoll fiel die Vitalität nach der Kryokonservierung auf 34,47 ± 22,90% (Abbildung 20G).

Nach der Kryokonservierung verringerte sich die Adhäsionsrate aller Koloniefragmente deutlich auf maximal 9,39 ± 4,04% für enzymatisch abgelöste Fragmente, die größer als 70µm waren, wobei das Ergebnis für enzymatisch abgelöste hESCs mit 1,88 ± 1,10% am geringsten war (Abbildung 20H).

Um diesen Effekt nach der Kryokonservierung zu verstehen, wurde der Anwachsvorgang von 29 hESC-Koloniefragmenten auf einer PMEF-Zellschicht erneut mittels Videomikroskopie unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5% CO_2 und über 95% Luftfeuchtigkeit) untersucht. Für diesen Ansatz wurden nur enzymatisch abgelöste Koloniefragmente mit einer Mindestgröße von 70µm verwendet, da diese Probenpräparation, wie eben beschrieben, die besten Vitalitäts- und Adhäsionsergebnisse vor und nach der Kryokonservierung ergab. Der Anwachsprozess und die Proliferation der Zellen wurden dargestellt, indem die Fläche der Stammzellkolonie aus den Einzelaufnahmen ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen wurde (Abbildung 21).

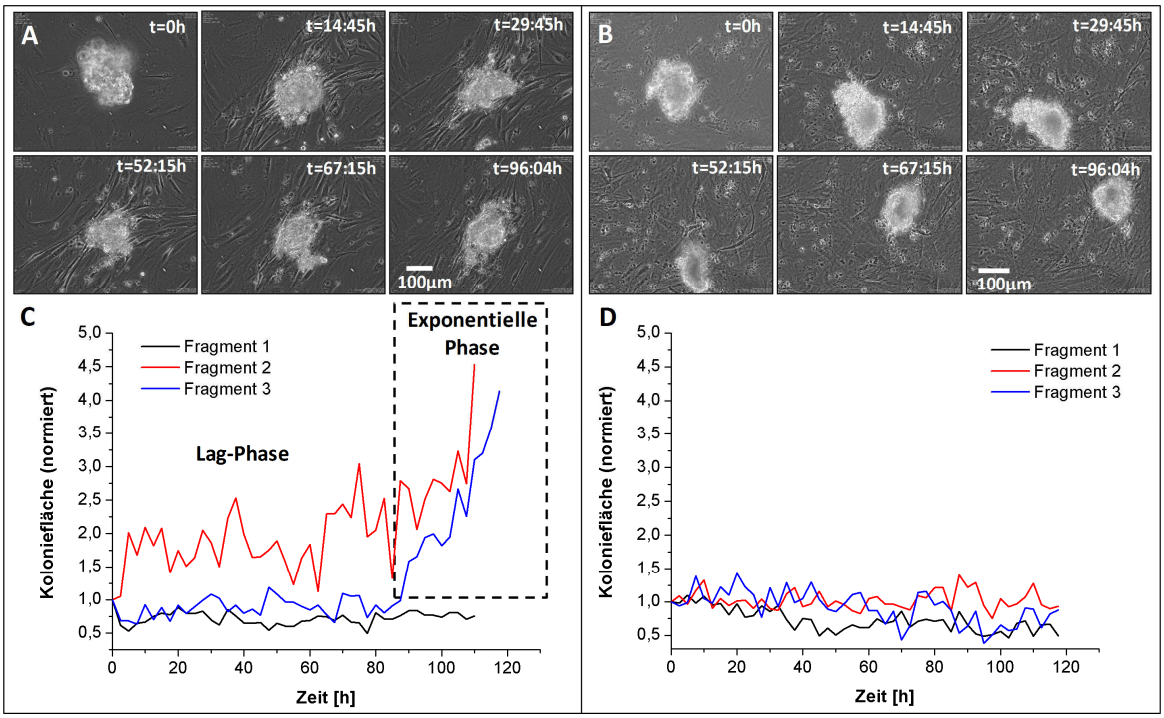


Abbildung 21: Anwachsprozesse von enzymatisch abgelösten hESC-Koloniefragmenten (>70µm) innerhalb von 96 Stunden nach der Kryokonservierung (A, B) und die entsprechenden Fläche-Zeit-Graphen von jeweils drei Fragmenten (C, D).

Die Aufnahmen wurden mittels Videomikroskopie realisiert. Die Wachstumskurve ermöglicht die Unterscheidung in Adhäsion mit verzögertem Wachstum (Lag-Phase nach der Kryokonservierung) (A, C) und keine Adhäsion (B, D) der Stammzellkolonien.

Nicht eingefrorene, enzymatisch abgelöste Koloniefragmente, die größer als 70µm waren, wuchsen nahezu vollständig innerhalb von fünf bis neun Stunden wieder an und begannen nach einer kurzen Lag-Phase zu proliferieren (Kapitel 4.1.1). Doch nach dem Auftauen wuchsen 18 von 29 untersuchten hESC-Koloniefragmenten nicht mehr auf der PMEF-Zellschicht an und zerfielen meistens innerhalb kürzester Zeit (Abbildung 21B, D). Dabei wurden die hESC-Fragmente von den PMEF-Zellen über die Oberfläche bewegt und dissoziierten während dessen Stück für Stück (Abbildung 21B). 11 von 29 Fragmenten adhärierten zwar, jedoch zeigten 8 von diesen morphologische Anzeichen einer nahezu vollständigen Differenzierung innerhalb der ersten 96 Stunden. Daher konnten nur 3 angewachsene, morphologisch undifferenzierte Aggregate detektiert werden. Diese verloren zunächst an Größe und verblieben dann in der Lag-Phase ohne zu proliferieren (Abbildung 21A, C). Frühestens nach 80 Stunden begannen die Kolonien wieder zu wachsen und gingen in die Exponentielle Wachstumsphase über (Abbildung 21C).

Um die Zell- und Koloniestruktur nach der Kryokonservierung besser zu verstehen, wurde erneut die Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie genutzt (Abbildung 22).

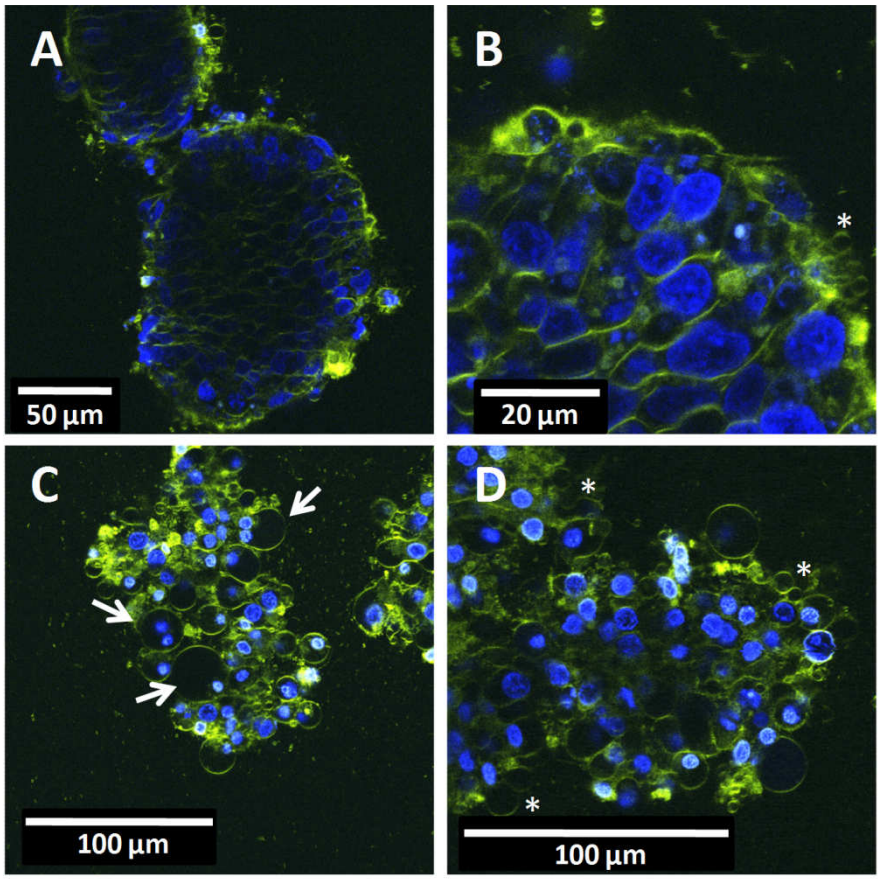


Abbildung 22: MPLSM-Aufnahmen von enzymatisch abgelösten hESC-Koloniefragmenten größer als 70µm vor (A, B) und nach der Kryokonservierung (C, D).

Die Fragmente wurden in Kulturmedium mit 30% FBS und 10% DMSO für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren und anschließend in der Gasphase eines Stickstofftanks gelagert. Nach dem Auftauen in einem 37 °C warmen Wasserbad wurde die innere Zellmembran (Di-8-Anneps, grün) und der Zellkern (Hoechst 33342, blau) von den hESCs angefärbt und an einem MPLSM untersucht; die Kolonien zeigten enge Zell-Zell-Kontakte (A, B) und nur sehr wenige Membranvesikel (B, Stern) vor dem Einfrieren; nach der Kryokonservierung war ein starkes Anschwellen der Zellen (C, Pfeil), sowie eine große Anzahl Membranvesikel (D, Stern) zu erkennen.

Vor der Kryokonservierung besaßen die abgelösten Koloniefragmente eine kompakte Struktur mit einem großen Zellkern, der einen Großteil des Zellinneren ausfüllte (Abbildung 22A, B). Nach der Kryokonservierung war ein deutliches Anschwellen der Zellen erkennbar (Abbildung 22C, Pfeil). Außerdem waren viele Membranvesikel mit einem Durchmesser von 2 bis 30µm in der ganzen Kolonie zu erkennen (Abbildung 22D, Stern), wodurch die Koloniestruktur im Vergleich zu nicht eingefrorenen Fragmenten deutlich lockerer erschien (Abbildung 22C, D). Vesikel waren zwar auch vor der Kryokonservierung zu erkennen, aber in einer wesentlich geringeren Anzahl (Abbildung 22B, Stern). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Veränderungen der Membranintegrität für die geringe Adhäsion nach der Kryokonservierung verantwortlich sind.

Um diese Theorie zu bestätigen, wurde eine REM Untersuchung der Membranveränderungen vor und nach der Kryokonservierung durchgeführt (Abbildung 23).

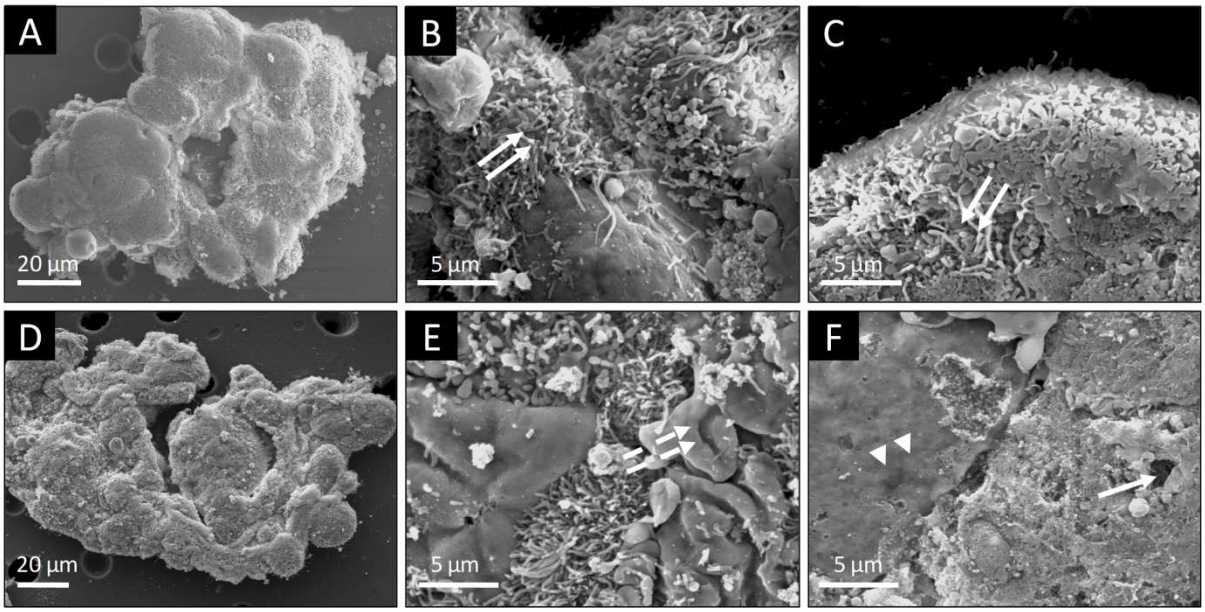


Abbildung 23: REM-Aufnahmen von enzymatisch abgelösten hESC-Koloniefragmenten größer als 70µm vor (A-C) und nach der Kryokonservierung (D-F).

Die Fragmente wurden in Kulturmedium mit 30% FBS und 10% DMSO für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren und anschließend in der Gasphase eines Stickstofftanks gelagert. Nach dem Auftauen in einem 37 °C warmen Wasserbad wurden die Fragmente fürs REM präpariert. Übersichtsaufnahme (A, D) und Detailansicht (B, C, E, F). Vor der Kryokonservierung war die intakte Membranoberfläche (A) mit dichtem Mikrovillibewuchs (B, C, Doppelpfeil) sichtbar. Nach der Kryokonservierung waren auf der unebenen Membranoberfläche (D) eine Vielzahl an Vesikel (E, gestrichelter Doppelpfeil), Löcher (F, Pfeil) und eine unnatürliche Glättung der Membran (F, Pfeilspitzen) erkennbar.

Diese Untersuchung ergab eine kompakte Koloniestruktur der Fragmente vor der Kryokonservierung (Abbildung 23A). Die gleichmäßige und dichte Verteilung von Mikrovilli auf der Membran in Abbildung 23B deutete auf einen vitalen und funktionalen Zustand der Kolonie hin. Nach der Kryokonservierung waren die hESC-Koloniefragmente weniger kompakt und es war eine große Anzahl an Membranvesikeln sichtbar (Abbildung 23E, gestrichelte Doppelpfeile). Nach dem Einfrieren konnten unterschiedliche Oberflächenstrukturen identifiziert werden: a) Zellen mit Mikrovilli auf der Oberfläche, vergleichbar mit der Kontrolle (Abbildung 23E); b) Zellen mit glatter Oberfläche, eine Stressreaktion auf die Kryokonservierung (Abbildung 23F, Pfeilspitzen); c) Glatte Zellen mit Löchern in der Membran (Abbildung 23F, Pfeil). Diese Zellen schienen nach dem Einfrieren ernsthaft geschädigt zu sein.

Diese Ergebnisse zeigten, dass trotz Verbesserungen der Zellpräparation vor dem Einfrieren keine signifikante Verbesserung der Kryokonservierung von humanen embryonalen Stammzellen in Suspension mit langsamen Kühlraten erzielt werden konnte. Die Zellen weisen nach der Kryokonservierung trotz guter Membranintegrität deutliche Membranveränderungen auf, wodurch eine erneute Adhäsion der Zellen unterbunden bzw. eine Differenzierung der Zellen ausgelöst wurde. Dies führte dazu, dass weitere Kryokonservierungsmethoden in die Untersuchungen mit einbezogen wurden. Außerdem wurde deutlich, dass die Bestimmung der Vitalität allein nicht ausreicht, um eine signifikante Aussage zur Kryokonservierungseffizienz zu treffen. Dementsprechend wurden im weiteren Verlauf neue Analysemethoden entwickelt und evaluiert, die auf die besonderen Eigenschaften der hESCs und die extremen Bedingungen während der Kryokonservierung adaptiert wurden.

Untersuchung zum Einfluss oberflächenbasierter Einfriermethoden auf Vitalität und Morphologie von humanen embryonalen Stammzellen

Neben der Kryokonservierung von Koloniefragmenten oder Zellen in Suspension besteht auch die Möglichkeit, Zellen adhärent auf einer Oberfläche einzufrieren. Dies hat den Vorteil, dass die Zellen in ihrem physiologischen Zustand verbleiben, da die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte während der Kryokonservierung erhalten bleiben. Außerdem besitzen adhärente Stammzellkolonien im Gegensatz zu abgelösten Fragmenten eine flache Morphologie, so dass auch Wärmeleitfähigkeit und Diffusion der kryoprotektiven Substanzen vorteilhafter sind. Um die Effekte dieser Methode auf die Einfriereffizienz zu testen, wurden adhärente humane embryonale Stammzellen zusammen mit PMEF erneut mit dem Kryomedium bestehend aus 30% FBS und 10% DMSO in Kulturmedium überschichtet, 30 Minuten bei 4°C inkubiert und langsam mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren. Die Proben wurden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert und schließlich in einem 37 °C warmen Wasserbad wieder aufgetaut (Beier et al., 2011).

Um eine exakte Analyse dieser Proben zu gewährleisten, wurde ein neues Auswertungssystem etabliert. Die Adhäsionsrate, ein geeigneter Parameter für Suspensionszellen, ist in diesem Versuchsaufbau nicht von Bedeutung. Außerdem ist die Vitalität von adhärenten Zellen grundsätzlich sehr hoch, da tote Zellen sich innerhalb kurzer Zeit von der Oberfläche ablösen. Aus diesem Grund wurde die Fläche der adhärenten, vitalen Stammzellkolonien in die Analyse mit einbezogen, indem diese vor und nach der Kryokonservierung miteinander verglichen wurde (Abbildung 24). Durch die Untersuchung der vitalen Restfläche vor und nach dem Einfrieren geht auch ein kompletter oder teilweiser Kolonieverlust in das Ergebnis mit ein. Zusätzlich kann auch die Proliferationsrate mit diesem Analysesystem berechnet werden.

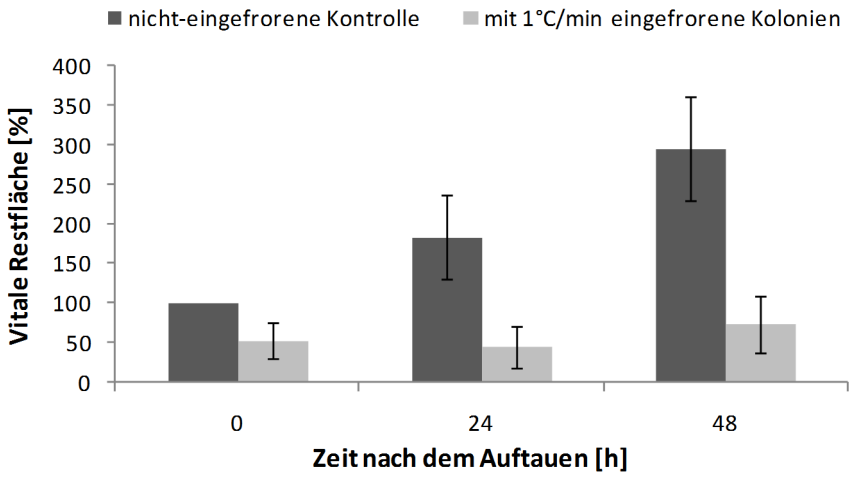


Abbildung 24: Vitale Restfläche von Kontrollkolonien (graue Balken) und Kolonien eingefroren mit 1 °C/min (hellgraue Balken) direkt nach dem Auftauen, nach 24 und nach 48 Stunden (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die Kolonien wurden aufgetaut und an den unterschiedlichen Zeitpunkten mit FDA/EB angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die vitalen Restflächen wurden anschließend mit Hilfe der Software ImageJ manuell bestimmt und mit den Kolonieflächen vor der Kryokonservierung verglichen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen dargestellt.

Unter Verwendung dieser Methode wurde zwanzig Minuten nach dem Auftauen bei den Stammzellkolonien eine vitale Restfläche von 51,93 ± 22,66% festgestellt. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank nahm der Wert zunächst auf 44,38 ± 25,45% ab, stieg nach 48 Stunden dann wieder auf 73,44 ± 36,41% an. Im Vergleich dazu zeigten die nicht eingefrorenen Kontrollkolonien eine Zunahme der vitalen Restfläche von 60-80% pro 24 Stunden (Abbildung 24). So betrugen die gemessen Werte der Referenzkolonien nach 24 Stunden 184,07 ± 52,56% und nach 48 Stunden 295,55 ± 65,50%. Dabei zeigte sich, dass viele der eingefrorenen Kolonien nach dem Auftauen komplett verloren gingen, während andere eine nahezu 100%ige Überlebensrate zeigten, was sich in den hohen Standardabweichungen wiederspiegelt. Vor allem im Zentrum der eingefrorenen Kolonien waren viele tote Zellen erkennbar, was durch die positive Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen werden konnte, weniger in den peripheren Bereichen (Abbildung 25B, C, Pfeil). Nach 24 Stunden hatten sich fast alle abgestorbenen Zellen von der Kulturoberfläche abgelöst, so dass ein Großteil der Kolonien eine inhomogene Struktur mit fehlenden Bereichen besaß (Abbildung 25E, F, Doppelpfeile). 48 Stunden nach dem Auftauen konnte eine Repopulation der Kolonien festgestellt werden, doch zeigten die Kolonien immer noch eine inhomogene, weniger kompakte Morphologie im Vergleich zu nicht kryokonservierten Zellen (Abbildung 25H, I).

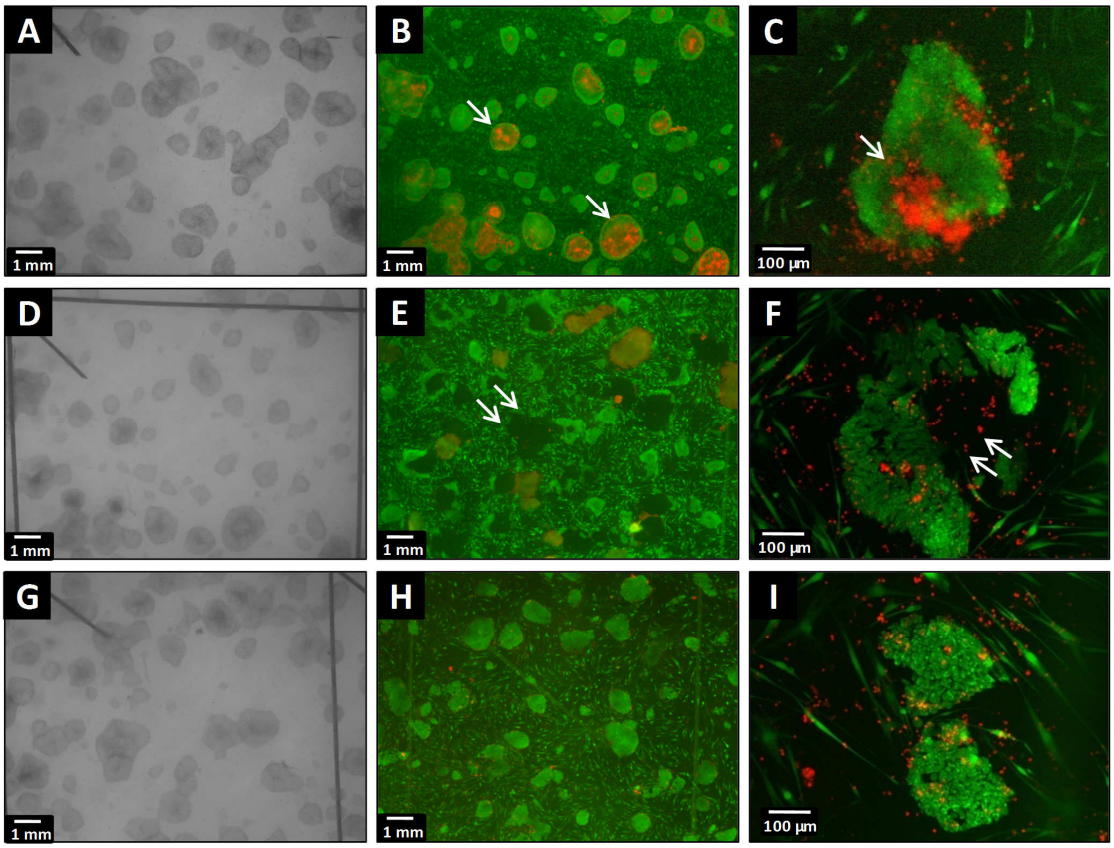


Abbildung 25: Aufnahmen von H1 hESC-Kolonien adhärent kryokonserviert mit langsamer Kühlrate (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die Kolonien wurden zunächst als Referenz direkt vor dem Einfrieren mit Durchlicht fotografiert (A, D, G). Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C in einem Kryomedium aus 30% FBS und 10% DMSO inkubiert, mit 1°C/min eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kolonien wurden mit FDA/EB direkt (B, C), 24 Stunden (E, F) und 48 Stunden (H, I) nach dem Auftauen angefärbt. Es zeigten sich tote Bereiche innerhalb der Stammzellkolonien direkt nach dem Auftauen (B, C, Pfeil), sowie komplett abgelöste Areale nach 24 Stunden (E, F, Doppelpfeile). Nach 48 Stunden war ein Großteil der abgelösten Bereiche wieder von den Stammzellen besiedelt (H). Für eine bessere Visualisierung wurde der maximale, dargestellte Bereich des roten Kanals von 255 auf 100 in den Bildern B, E, H verringert.

Bereits während der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Ablösemethoden auf die Kultur und Kryokonservierung wurde die Theorie aufgestellt, dass die Koloniegröße eine entscheidende Auswirkung auf die Effizienz haben könnte. Dies wurde nun weiter untersucht, indem ein detaillierter Vergleich der Koloniegröße vor der Kryokonservierung und der entsprechenden Überlebensrate durchgeführt wurde. Dazu wurden die Kolonien in vier Kategorien eingeteilt: Durchmesser unter 250µm, von 251–500µm, von 501–750µm und Kolonien größer als 750µm. Von diesen vier Gruppen wurde die vitale Restfläche getrennt voneinander zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftauen bestimmt (Abbildung 26).

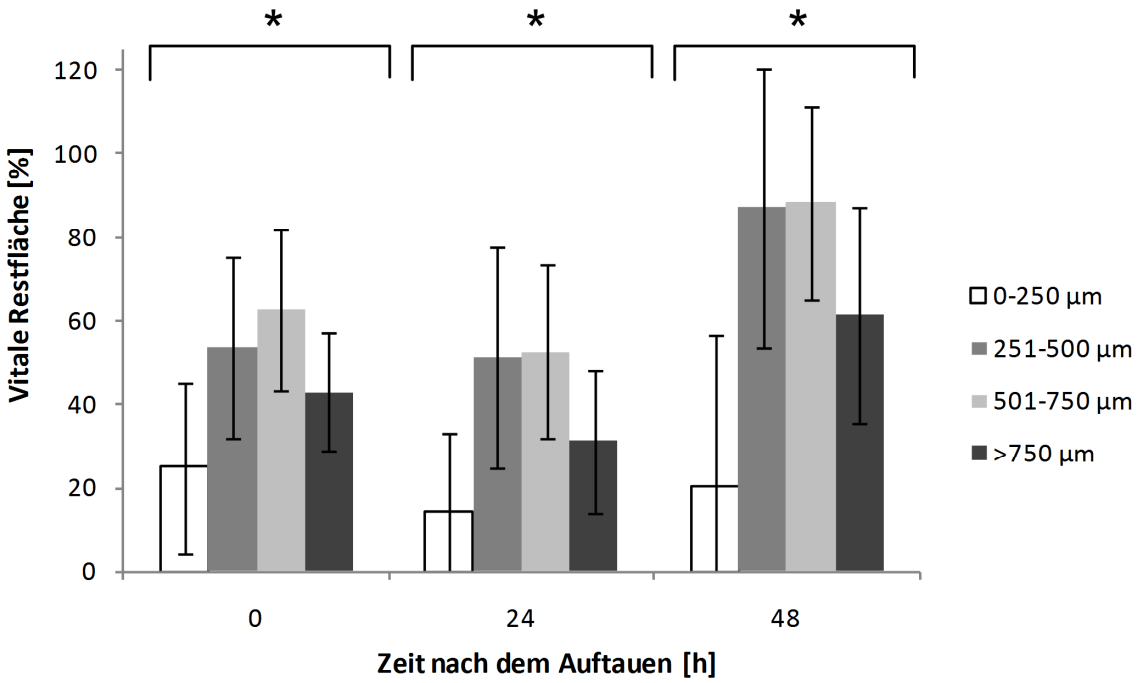


Abbildung 26: Abhängigkeit der Kryokonservierung von adhärenten H1-Kolonien mit langsamer Kühlrate von der Koloniegröße (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die vitale Restfläche von Stammzellkolonien, die mit 1 °C/min in einem Kryomedium aus 30% FBS und 10% DMSO in Kulturmedium eingefroren wurden, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftauen (0h, 24h, 48h) bestimmt. Dazu wurden die Kolonien mit FDA/EB angefärbt und die vitale Restfläche manuell mit Hilfe der Software ImageJ gemessen. Die Balken stehen für unterschiedliche Koloniedurchmesser vor der Kryokonservierung. Zu beachten ist die statistisch signifikante (p<0,05) Abhängigkeit der Überlebensrate von der Koloniegröße vor dem Einfrieren mit langsamen Kühlraten (*), bestimmt mit dem Student t-Test. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen dargestellt.

Die adhärent und mit 1 °C/min eingefrorenen Stammzellkolonien mit einem Durchmesser von unter 250µm zeigten mit 14,57-24,89% an jedem Zeitpunkt nach dem Auftauen die geringste vitale Restfläche. Am besten überlebten Kolonien mit einem Durchmesser zwischen 251 und 750µm mit Werten von 51,25-88,56%. Größere Kolonien zeigten ebenfalls eine reduzierte Kryokonservierungseffizienz mit vitalen Restflächen zwischen 31,27-61,54% (Abbildung 26). Zusätzlich zeigte sich, dass es in allen Proben zunächst zu einem Rückgang der vitalen Restfläche 24 Stunden nach dem Auftauen kam, bei dem auch ein Zusammenhang mit der Koloniegröße bestand. So lag diese Abnahme bei Kolonien mit einem Durchmesser von 251-750µm, die auch die größten vitalen Restflächen zeigten, bei prozentual nur 4,60 bzw. 15,60%, während bei kleineren und größeren Kolonien eine Reduktion von 41,46 bzw. 27,37% im Bezug auf ihre Größe direkt nach dem Auftauen festgestellt wurde. Anschließend begannen die Kolonien zu proliferieren, so dass nach 48 Stunden in allen Proben eine deutliche Flächenzunahme von prozentual 38,68% (0-250µm) bis zu 96,82% (>751µm) gemessen wurde.

Zusätzlich zur Überlebensrate der hESCs wurden MPLSM-Aufnahmen der Kolonien verglichen, um detaillierte Informationen über die internen und basalen Strukturen zu erhalten (Abbildung 27). Auffallend bei den mit 1 °C/min eingefrorenen, adhärenten Kolonien war erneut die Ausbildung von Membranbläschen („blebbing“), die sofort nach dem Auftauprozess sichtbar waren (Abbildung 27C, D). Die entstehenden Bläschen besaßen einen Durchmesser von 9,19 ± 5,94µm (n=10), es konnten aber auch Exemplare von bis zu 70µm entdeckt werden. Diese waren vorwiegend zwischen den Stammzellkolonien und der Kulturoberfläche sichtbar und verteilten sich im Kulturmedium. Außer-

dem konnte erneut ein deutliches Anschwellen der Zellen detektiert werden, dass in vergleichbarem Ausmaß bei Suspensionszellen nach dem Auftauen auftrat.

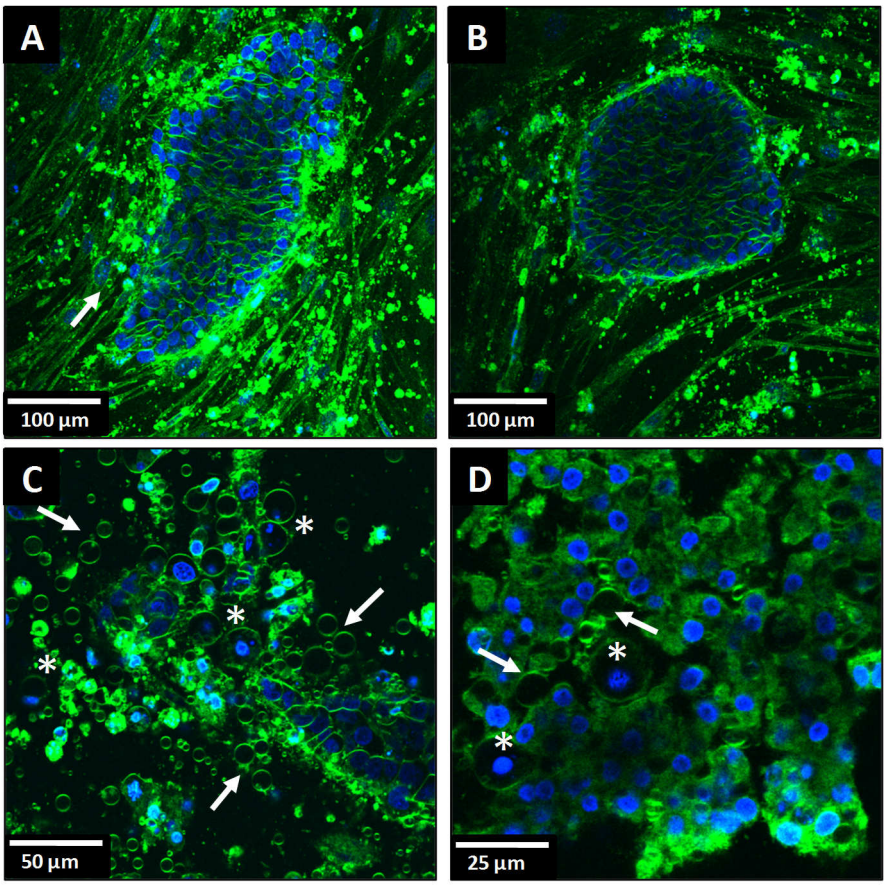


Abbildung 27: Abbildungen von adhärenten Stammzellkolonien vor (A, B) und nach der Kryokonservierung mit 1 °C/min (C, D), aufgenommen mittels MPLSM (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Nicht eingefrorenen Kontrollkolonien (A, B) und Kolonien eingefroren mit 1 °C/min (C, D) nach dem Auftauen. Die Membran wurde dabei nach der Kryokonservierung mit Di-8-Anneps (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt. Die kompakte Koloniestruktur war nach dem Auftauen deutlich zerstört. Außerdem wurde bei einem Großteil der Zellen ein deutliches Anschwellen detektiert (C, D, Sterne). Zusätzlich zeigte sich eine große Zahl an Membranvesikel (Pfeile) nach dem Auftauen sowohl direkt in den eingefrorenen Kolonien, als auch im umgebenden Medium (C, D).

Eine REM-Analyse zeigte enge Zell-Zell-Kontakte und dicht mit Mikrovilli bedeckte Oberflächen (Abbildung 28A-C) mit nur wenigen Membranvesikeln (Abbildung 28B, Pfeil) bei nicht eingefrorenen Kontrollkolonien. Bei Kolonien, die mit 1 °C/min kryokonserviert wurden, war eine Vielzahl an Veränderungen sichtbar. Bereits 20 Minuten nach dem Auftauen (Abbildung 28D-F) waren deutliche Löcher (Abbildung 28E, Pfeilspitze) und eine Vielzahl an Vesikeln und Bläschen (Abbildung 28D-F, Pfeile) auf der Membranoberfläche erkennbar, aber auch mikrovillifreie, sehr glatte Zelloberflächen (Abbildung 28F, Plus). Nach einer 24-stündigen Kultivierung hat sich eine Kolonie nahezu vollständig abgelöst (Abbildung 28G, Doppelstern), wobei extrazelluläre Matrix und einzelne Zellen auf der Oberfläche verblieben. In allen Proben konnten wenigstens stellenweise Mikrovilli auf der Membranoberfläche detektiert werden (Abbildung 28, Doppelpfeile), nach 24 Stunden wurde in einigen Kolonien eine vollständige Wiederherstellung der Mikrovilli festgestellt.

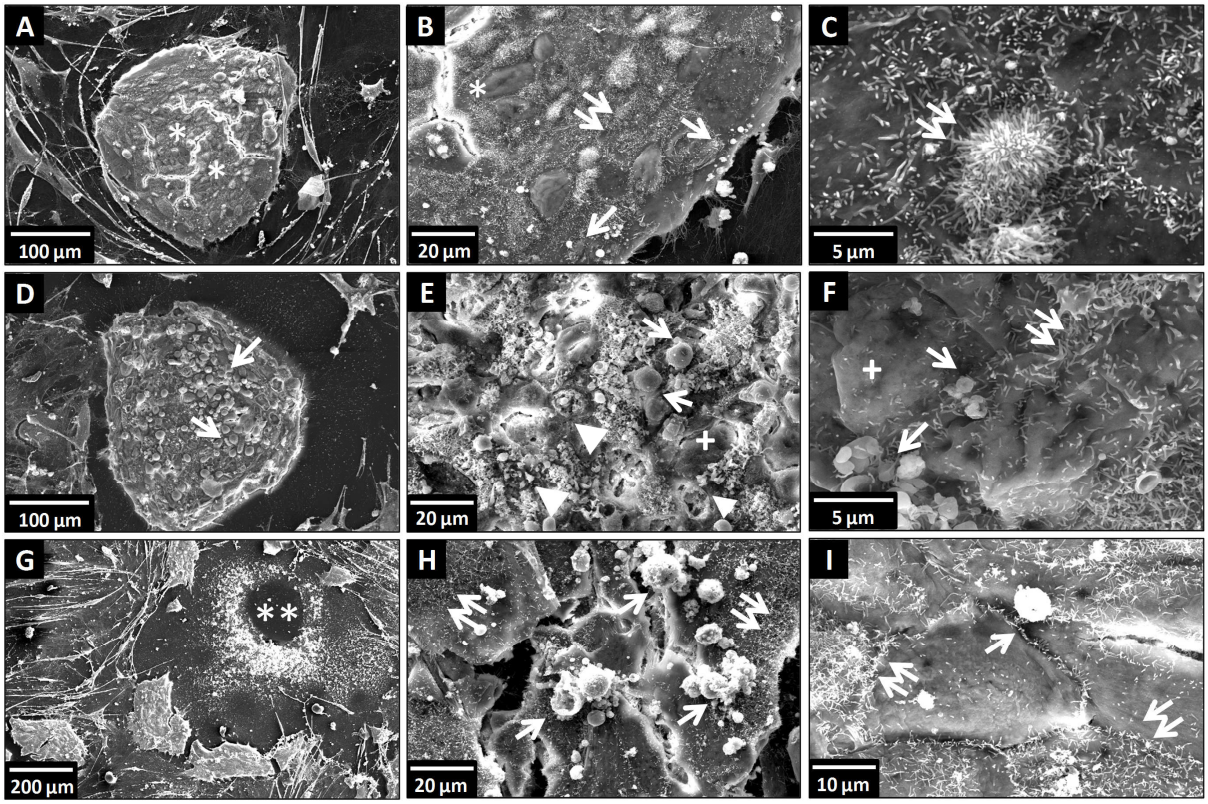


Abbildung 28: REM-Aufnahmen von adhärenten H1 hESC-Kolonien, die mit 1°C/min eingefroren wurden (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die Aufnahmen zeigen nicht eingefrorene Kontrollkolonien (A-C) und Kolonien eingefroren mit 1 °C/min in einem Medium aus 30% FBS und 10% DMSO in Kulturmedium (D-I). Die Zellen wurden direkt (D-F) und 24 Stunden nach dem Auftauen (G-I) untersucht. Die nicht eingefrorenen Referenzkolonien besaßen einen dichten Mikrovillibewuchs (B, C, Doppelpfeile) mit nur wenigen Membranvesikeln (B, Pfeil). Die Risse in der Kolonie sind auf Artefakte während der Präparation zurückzuführen (A, B, Stern). Es zeigten sich deutliche Veränderungen der Zellmembran direkt nach dem Auftauen (D-F) in Form von Bläschen und Vesikel (Pfeile) sowie Löcher und Vertiefungen (Pfeilspitzen). Zusätzlich war häufig eine unnatürliche Glättung der Zelloberfläche erkennbar (Plus). Nach einer 24-stündigen Kultivierung waren das vollständige Ablösen von Kolonien (G, Doppelstern) und vereinzelte Vesikel (H, I, Pfeile) sichtbar. An allen Zeitpunkten konnten Mikrovilli auf der Membranoberfläche detektiert werden (Doppelpfeile), nach 24 Stunden (I) war die Dichte stellenweise vergleichbar zur nicht eingefrorenen Kontrolle (C).

Die Ergebnisse zeigten, dass diese oberflächenbasierte Einfriermethode für hESCs mit Werten von 51,93 ± 22,66% direkt nach dem Auftauen und 73,44 ± 36,41% 48 Stunden später bereits zu einer deutlichen Verbesserung der Überlebensrate im Vergleich zur Kryokonservierung in Suspension führte, bei der nur eine Adhäsionsrate von 11,05 ± 5,10%, erreicht werden konnte. Doch trotz allem kam es in allen Proben immer wieder zu einem vollständigen Verlust von einer Vielzahl an Kolonien. Die REM- und MPLSM-Aufnahmen zeigten außerdem, dass mit dieser Methode vergleichbare Schädigungen wie bei den Suspensionszellen induziert wurden, so dass weitere Optimierungen notwendig sind. Zusätzlich basierte das hier verwendete Einfriermedium auf FBS, wodurch ein Einsatz der kryokonservierten Proben in medizinischen Anwendungen unmöglich wird. Weitere Entwicklungen sollten daher auch die Substitution xenogener Bestandteile des Kryomediums umfassen.

Substitution xenogener Bestandteile des Kryomediums von humanen embryonalen Stammzellen durch glasbildende Verfahren

Eine weitere vielversprechende Methode zur Kryokonservierung von hESCs stellt die Vitrifikation dar. Dabei wird normalerweise eine sehr geringe Anzahl an Stammzellkolonien in Suspension in einen glasartigen Zustand überführt ohne dass schädigende Eiskristalle in der Probe entstehen. Da das beschränkte Probenvolumen dieser Methode eine großflächige Anwendung limitiert und mit oberflächenbasierten Protokollen bereits Fortschritte erzielt werden konnten, wurde in diesem Abschnitt versucht, beide Ansätze zu kombinieren. Dazu wurden hESCs auf für die Zellkultur behandelten Kunststoffdeckgläsern kultiviert (Beier et al., 2011) und nach einem etablierten Vitrifikationsprotokoll nach Richards et al. 2004 eingefroren (Richards et al., 2004).

Die Stammzellkolonien, die mit der hier vorgestellten Vitrifikationsmethode eingefroren wurden (Beier et al., 2011), zeigten ungefähr 20 Minuten nach dem Auftauen eine vitale Restfläche von 89,81 ± 10,68% (Abbildung 29). Außerdem konnten nur wenige EB-positive Zellen im Umkreis der Kolonien festgestellt werden (Abbildung 30). Die vitale Restfläche stieg innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Auftauen auf 167,52 ± 38,38 an. Nach 48 Stunden nahm der Wert noch weiter auf 254,64 ± 81,78% zu.

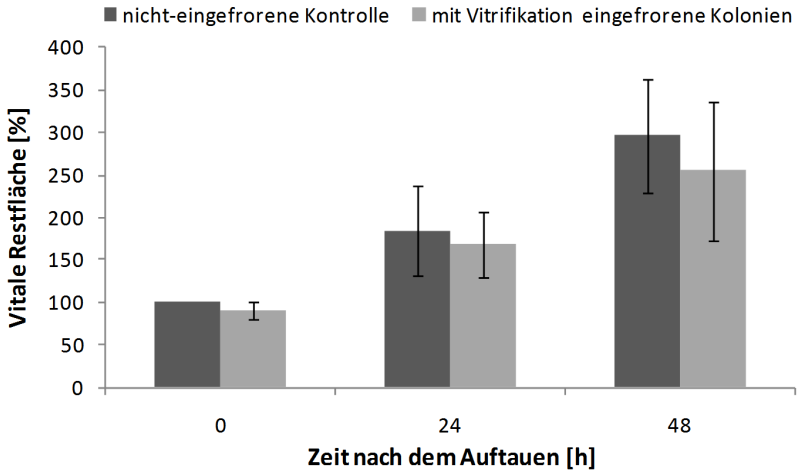


Abbildung 29: Vitale Restfläche von Kontrollkolonien (graue Balken) und Kolonien eingefroren mittels Vitrifikation (hellgraue Balken) direkt nach dem Auftauen, nach 24 und nach 48 Stunden (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die Kolonien wurden an den unterschiedlichen Zeitpunkten mit FDA/EB angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die vitalen Restflächen wurden anschließend mit Hilfe der Software ImageJ manuell bestimmt und mit den Koloniefläche vor der Kryokonservierung verglichen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen dargestellt.

Die Stammzellkolonien zeigten nach dem Auftauen eine sehr gute Vitalität mit einer kompakten und homogenen Struktur (Abbildung 30). Es konnte weder eine Fragmentierung der Kolonien noch ein Verlust der inneren Koloniebereiche nach 24 Stunden festgestellt werden (Abbildung 30E, F), auch begannen die Kolonien sofort nach dem Auftauen mit der Proliferation.

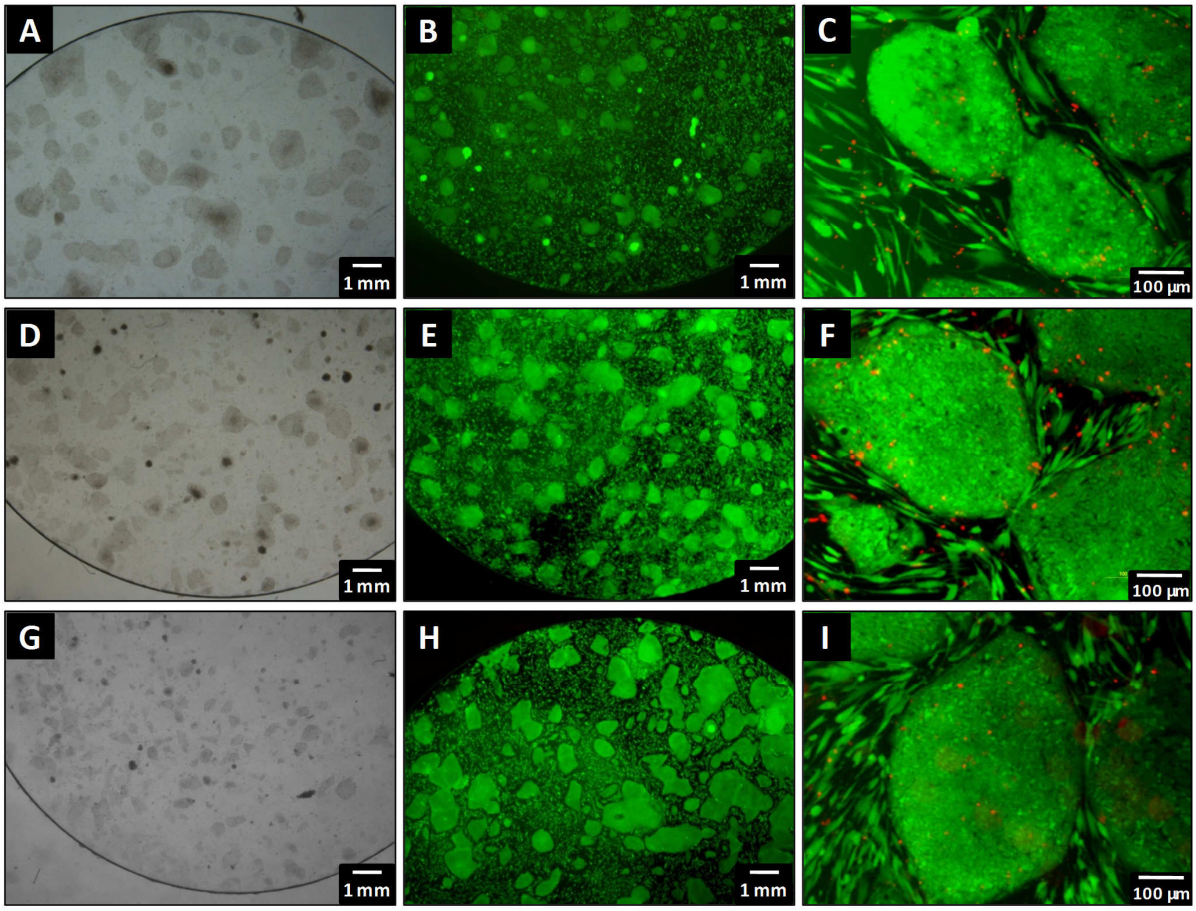


Abbildung 30: Repräsentative Aufnahmen von H1-Kolonien, adhärent kryokonserviert mittels Vitrifikation (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die Kolonien wurden als Referenz direkt vor dem Einfrieren mit Durchlicht fotografiert (A, D, G). Zur Vitrifikation wurden die Zellen zunächst für eine Minute in Vitrifikationslösung 1, dann für fünf Sekunden in Vitrifikationslösung 2 inkubiert und anschließend direkt in flüssigen Stickstoff getaucht und dort auch gelagert. Die Kolonien wurden mit FDA/EB direkt (B, C), 24 Stunden (E, F) und 48 Stunden (H, I) nach dem Auftauen angefärbt. Es zeigte sich eine hohe Vitalität der Stammzellkolonien mit nur einer geringen Anzahl toter Zellen (C, F, I) zu allen Zeitpunkten nach dem Auftauen. Außerdem konnten nahezu alle Stammzellkolonien wiedergewonnen werden.

Um zu ermitteln, ob auch bei dieser Kryokonservierungsmethode eine Abhängigkeit der Überlebensrate von der Koloniefläche vor der Kryokonservierung besteht, wurde erneut, wie bereits beschrieben, ein detaillierter Größenvergleich durchgeführt. Dazu wurden einzelne Kolonien vor und nach der Kryokonservierung mittels Vitrifikation untersucht, indem sie entsprechend ihres Durchmessers analysiert wurden: Durchmesser unter 250µm, von 251–500µm, von 501–750µm und Kolonien größer 750µm. Von diesen vier Gruppen wurde die vitale Restfläche getrennt voneinander an unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftauen bestimmt.

Im Gegensatz zu den langsam eingefrorenen Kolonien zeigten vitrifizierte Kolonien keine Größenabhängigkeit, zumindest bis 24 Stunden nach dem Auftauen (Abbildung 31). Nach 48 Stunden zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen. Dies beruht allerdings wahrscheinlich auf der exponentiellen Proliferation der Stammzellen.

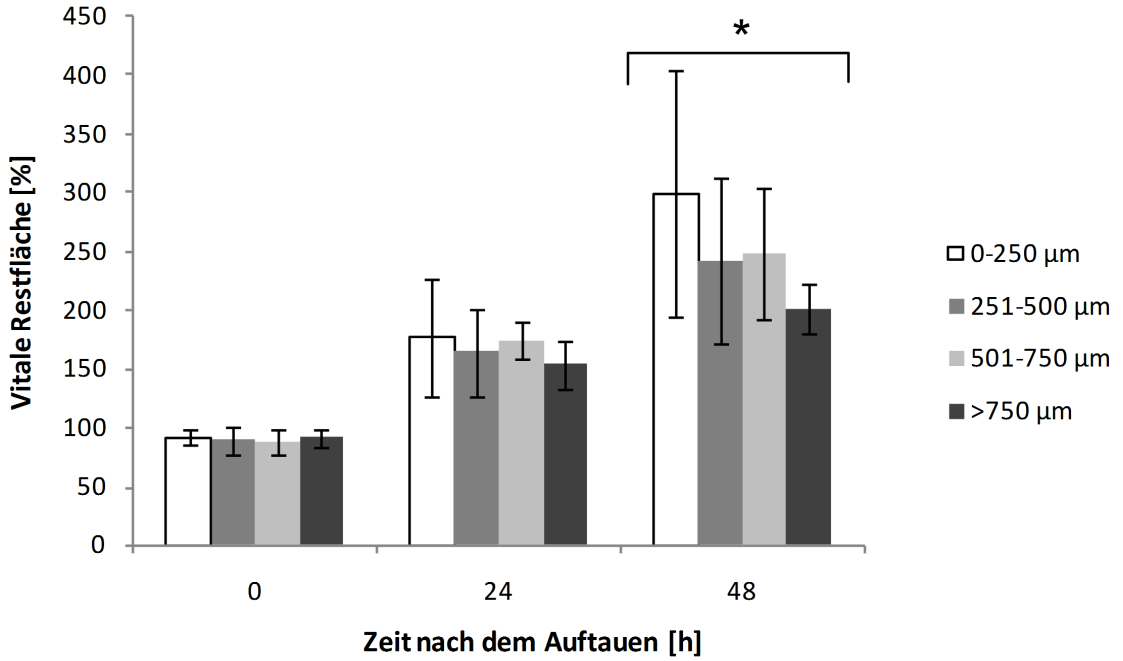


Abbildung 31: Abhängigkeit der Kryokonservierung adhärenter H1-Kolonien von der Koloniegröße mittels Vitrifikation (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die vitale Restfläche von Stammzellkolonien, die mittels adhärenter Vitrifikation eingefroren wurden, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftauen (0h, 24h, 48h) bestimmt. Die Balken stehen für unterschiedliche Koloniedurchmesser vor der Kryokonservierung. Dazu wurden die Kolonien mit FDA/EB angefärbt und die vitale Restfläche manuell mit Hilfe der Software ImageJ gemessen. Die Balken stehen für unterschiedliche Koloniedurchmesser vor der Kryokonservierung. Es ist nach 0h und 24h keine statistisch signifikante Abhängigkeit der Überlebensrate von der Koloniegröße vor dem Einfrieren mit Vitrifikation erkennbar, allerdings nach 48h (, $p<0,05$), bestimmt mit dem Student t-Test. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen dargestellt.*

Um die Veränderungen innerhalb der Kolonien besser untersuchen zu können, wurde die Koloniestruktur vor (Abbildung 32A, B) und nach der oberflächenbasierten Vitrifikation (Abbildung 32C, D) mit Hilfe von MPLSM-Aufnahmen verglichen. Im Gegensatz zu den adhärenten Stammzellkolonien, die mit langsamen Kühlraten eingefroren wurden, waren in den vitrifizierten Kolonien und den nicht eingefrorenen Kontrollkolonien nur sehr wenige Membranvesikel sichtbar (Abbildung 32B-D, Pfeil). Außerdem zeigten die Stammzellen nach der Vitrifikation kaum ein Anschwellen und besaßen daher eine deutlich kompaktere Koloniestruktur, anders als die langsam eingefrorenen Kolonien.

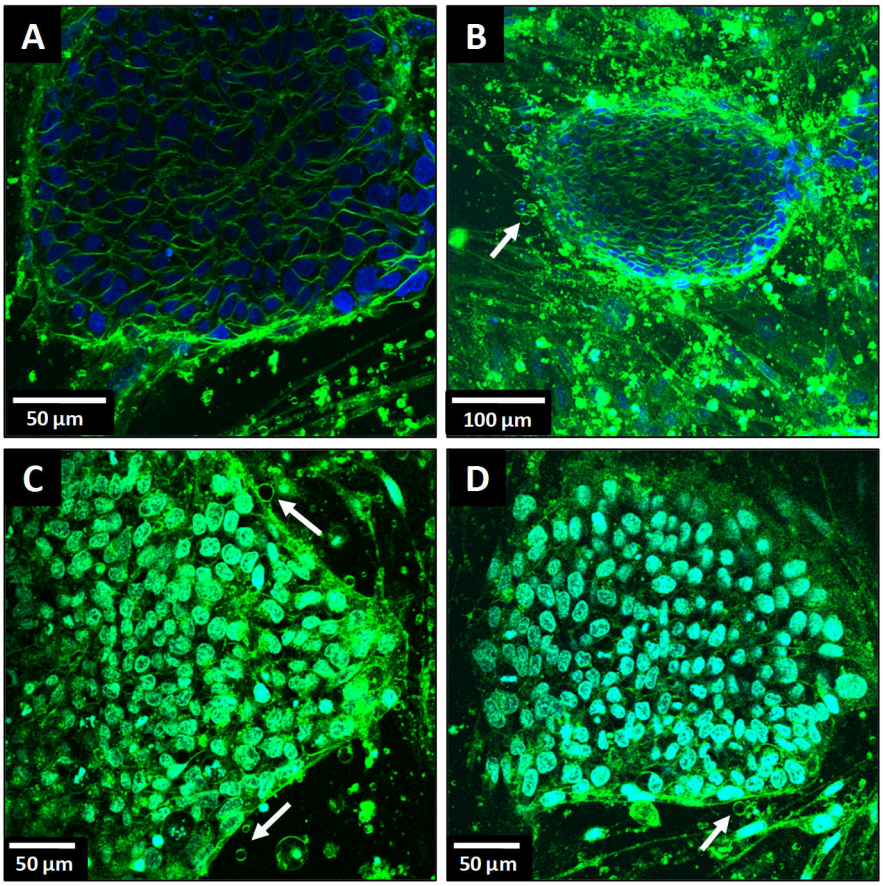


Abbildung 32: Abbildungen von adhärenten Stammzellkolonien vor (A, B) und nach der Vitrifikation (C, D), aufgenommen mittels Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Nicht eingefrorene Kontrollkolonien (A, B) und Kolonien eingefroren mit Vitrifikation (C, D) nach dem Auftauen. Die Membran wurde dabei mit Di-8-Anneps (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt. Die kompakte Koloniestruktur war nach dem Auftauen immer noch erhalten. Es konnte keine Veränderung der Zellmorphologie nach der Vitrifikation festgestellt werden (C, D). Zusätzlich wurde nur eine sehr geringe Anzahl an Membranvesikeln nach dem Auftauen an der Peripherie der eingefrorenen Kolonien detektiert (C, D, Pfeile), die auch in vergleichbarem Maße in der Kontrolle auftraten (A, B, Pfeil). Bei den Aufnahmen nach der Vitrifikation wurde die Helligkeit bzw. der Kontrast für den blauen Kanal auf 68 bzw. 71 und für den grünen Kanal auf 47 bzw. 39 eingestellt.

In den REM-Aufnahmen konnten bei den adhärent vitrifizierten Proben bereits direkt nach dem Auftauen eine dichte Schicht aus Mikrovilli auf der vollständig intakten Zellmembran festgestellt werden (Abbildung 33E, F, Doppelpfeile). Insgesamt zeigten sich direkt nach dem Auftauen nahezu keine Veränderungen im Vergleich zur nicht eingefrorenen Kontrolle. Zu beiden Zeitpunkten nach dem Auftauen waren einige wenige, kleine Membranvesikel auf der Zelloberfläche sichtbar, die ebenso in der Kontrolle auftraten. Nach 24 Stunden war die Oberflächenmorphologie komplett wiederhergestellt (Abbildung 33H, I).

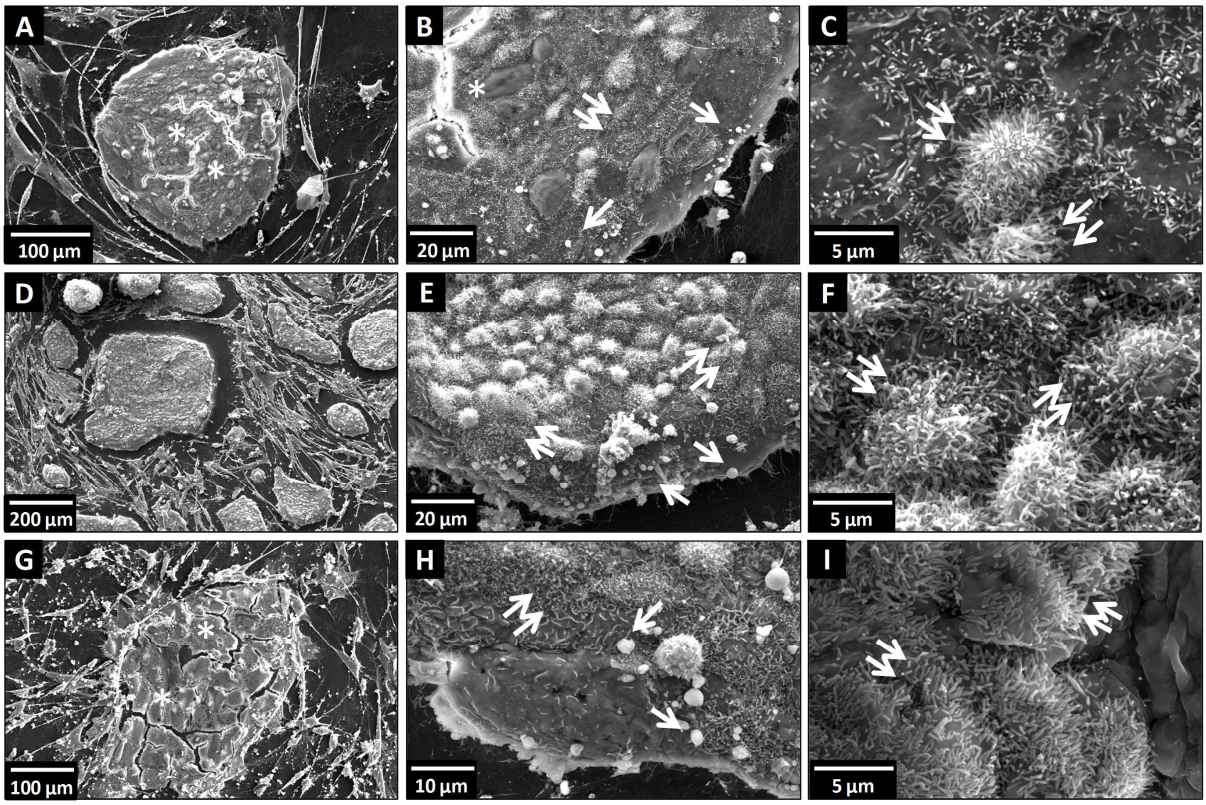


Abbildung 33: REM-Aufnahmen von adhärenten H1 hESC-Kolonien, die mittels Vitrifikation eingefroren wurde (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die Aufnahmen zeigen nicht eingefrorene Kontrollkolonien (A-C) und Kolonien, die mittels Vitrifikation eingefroren wurden (D-I). Die Zellen wurden direkt (D-F) und 24 Stunden nach dem Auftauen (G-I) untersucht. Die nicht eingefrorenen Referenzkolonien besaßen einen dichten Mikrovillibewuchs (B, C, Doppelpfeile) mit nur wenigen Membranvesikeln (B, Pfeil). Direkt nach dem Auftauen (D-F) zeigten die Stammzellkolonien nahezu keine Veränderung der Oberflächenstruktur, es konnten immer noch eine sehr dichte Mikrovillischicht und enge Zell-Zell-Kontakte detektiert werden (E, F, H, I, Doppelpfeile). Außerdem zeigte die Membranoberfläche zu allen Zeitpunkten nur eine geringe Anzahl an Membranvesikel (E, H, Pfeil). 24 Stunden nach dem Auftauen konnte eine komplette Wiederherstellung der Oberflächeneigenschaften gezeigt werden (H, I, Doppelpfeil) Die Risse in den Kolonien sind auf Artefakte während der Präparation zurückzuführen (A, B, G, Stern).

Die oberflächenbasierte Vitrifikation von hESCs resultierte in sehr guten Überlebensraten mit einem geringen Zellverlust und zeigte eine nahezu komplette Konservierung der Oberflächenmorphologie nach dem Auftauen. Doch für eine effiziente Kryolagerung von qualitativ hochwertigen Stammzellen ist neben diesen Parametern der Erhalt der Pluripotenz von größter Bedeutung. Nur mit undifferenzierten, nicht beschädigten Stammzellen können in späteren Analysen und Testreihen signifikante Aussagen getroffen werden. Aus diesem Grund wurde nach dieser erfolgreichen, grundlegenden Charakterisierung der Methode der Pluripotenzstatus der Stammzellen nach der Vitrifikation mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS) mit Antikörper gegen den spezifischen Transkriptionsfaktor Oct-3/4 und das Oberflächenantigen Tra1-81 bestimmt. Dabei wurden die Proben nach der Vitrifikation noch sieben Tage kultiviert, um eine deutlichere Ausprägung einer möglichen Differenzierung nach dem Auftauen zu erreichen. Die Verwendung des Antikörpers anti-Tra1-81 resultierte in einem positiven Signal bei 80,03% ± 12,48% der vitrifizierten Probe (Abbildung 34A) im Vergleich zu 81,36% ± 13,08% bei der nicht eingefrorenen Kontrolle (Abbildung 34C). Zusätzlich wurde in 77,69% ± 14,65% der vitrifizierten Probe eine Oct-3/4 Expression gemessen (Abbildung 34B), die in der nicht eingefrorenen Kontrolle mit 77,96% ± 16,45% vergleichbar stark ausgeprägt war (Abbildung 34D).

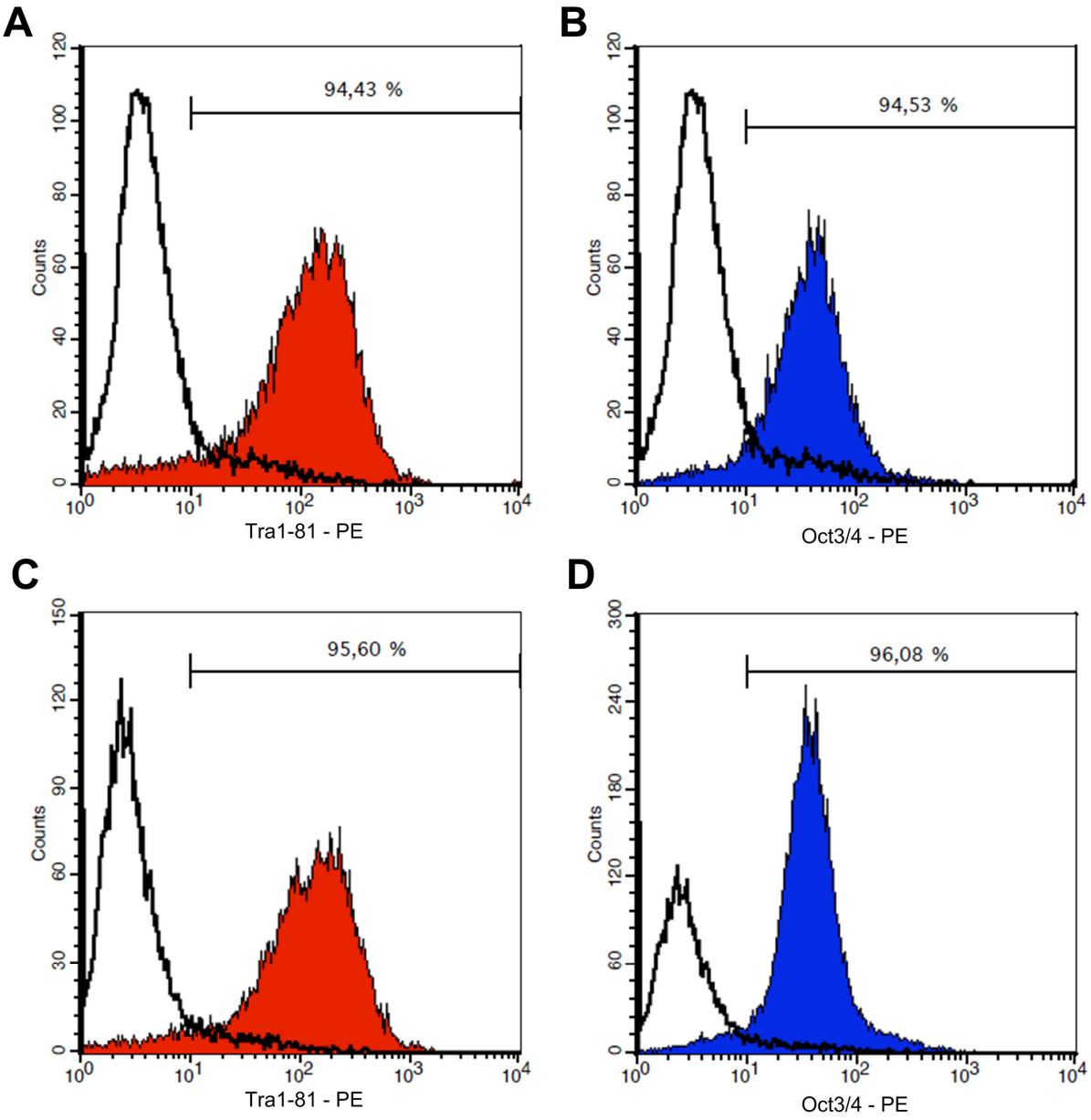


Abbildung 34: Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse (FACS) von vitrifizierten Kolonien (A, B) und nicht eingefrorenen Kontrollkolonien (C, D) (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die Zellen wurden mit Antikörper gegen das Oberflächenantigen Tra1-81 (A, C) und den Transkriptionsfaktor Oct-3/4 (B, D), die einen Nachweis für die Pluripotenz der Zellen darstellen, angefärbt. Die Proben C und D wurden vor der FACS-Analyse dauerhaft kultiviert. Die Proben A und B wurden adhärent vitrifiziert, wie in den Material und Methoden beschrieben. Nach dem Auftauen wurden die Kolonien nach einer 48 stündigen Kultivierung einmalig passagiert. Vor der FACS-Analyse wurden die passagierten Kolonien für 5 Tage kultiviert. In allen Proben wurden ungefähr 10000 Zellen gemessen, nur in je einer Probe der vitrifizierten Zellen und der Kontrolle lag die Zellzahl unter diesem Wert. Das Ergebnis wurde dennoch in die Auswertung mit einbezogen, da es keine Auswirkung auf die Zellverteilung hatte. Schwarze Linie: ungefärbte Kontrolle; rote Fläche: Tra1-81-Antikörper; blaue Fläche: Oct3/4-Antikörper.

Um die Langzeitauswirkung der hier beschriebenen adhärenten Vitrifikation zu untersuchen, wurden die vitrifizierten Zellen nach einer Subkultivierung erneut morphologisch untersucht. Bei diesen Proben konnte keine Veränderungen nach der Passage oder nach einer weiteren Kultivierung im Vergleich zur nicht eingefrorenen Kontrolle festgestellt werden.

Doch neben diesen Vorteilen der oberflächenbasierten Vitrifikation haben sich auch einige wenige Nachteile ergeben. So müssen die Zellkulturdeckgläser mit den Stammzellkolonien direkt in flüssigen Stickstoff getaucht werden, um die benötigte Kühlrate zu erreichen. Dieser Umstand erhöht allerdings die Gefahr von Kontaminationen und erschwert die Aufrechterhaltung der Sterilität. Doch dieses Problem kann relativ einfach durch die Verwendung von steril gefiltertem Stickstoff gelöst werden. Außerdem entstanden durch die extremen thermischen Unterschiede in einigen Zellkulturdeckgläsern Risse, die auch zu Schäden an den Kolonien führten (Abbildung 35).

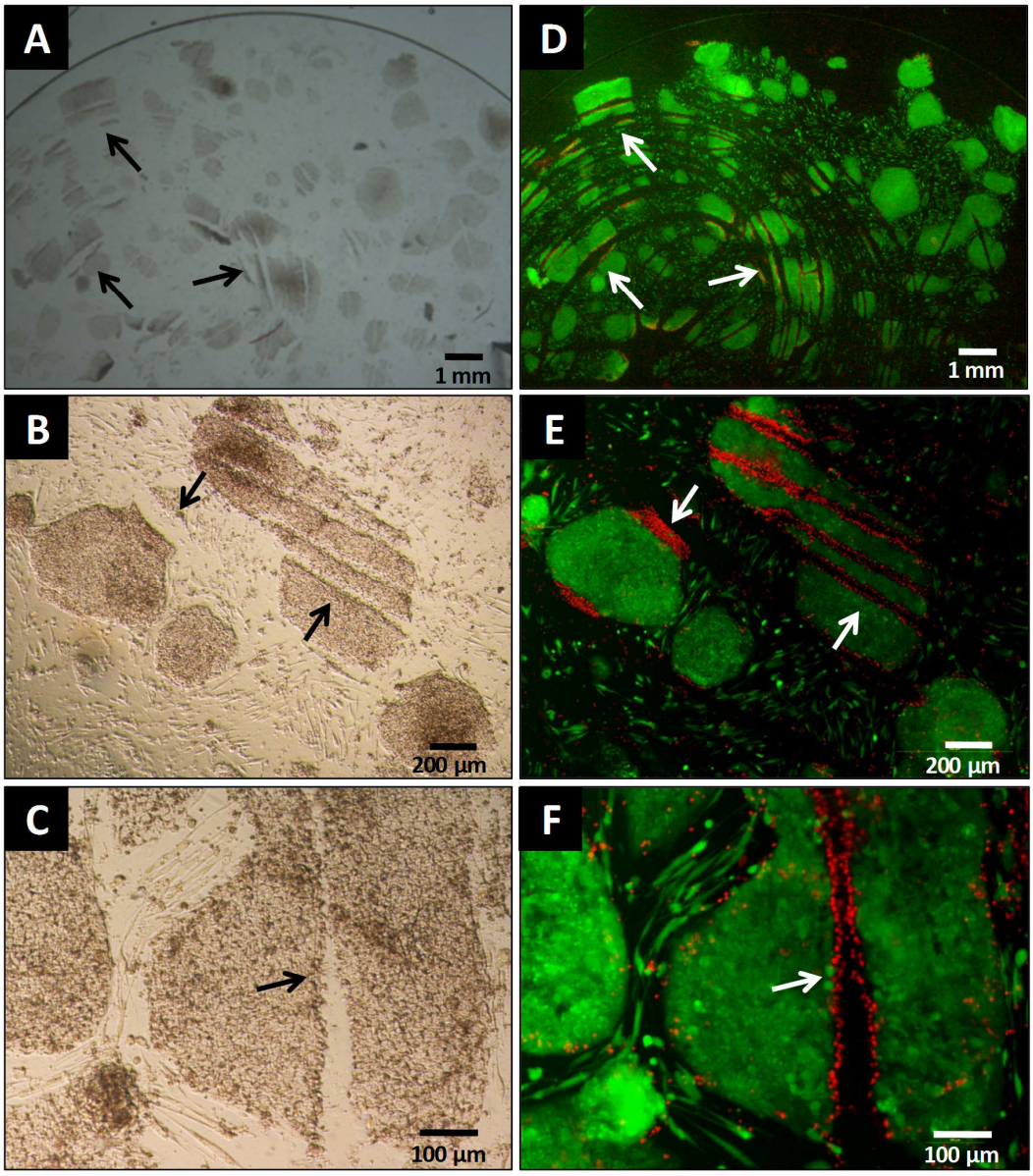


Abbildung 35: Repräsentative Aufnahmen von zerrissenen Stammzellkolonien durch thermische Materialschäden nach der Vitrifikation (Abbildung verändert aus Beier et al., 2011).

Die adhärenten Stammzellkolonien wurden gemäß der beschriebenen Methode vitrifiziert, aufgetaut, mit FDA/EB gefärbt und mit Durchlicht (A-C) bzw. Fluoreszenz (D-F) fotografiert. Die Kolonien zeigten nach dem Auftauen Schädigungen durch Risse in den Zellkulturdeckgläsern (Pfeile). Deutlich zu erkennen ist eine Häufung toter, rot gefärbter Zellen an den Risskanten (D-F, Pfeile).

Dennoch resultierte die hier beschriebene Methode zur oberflächenbasierten Vitrifikation von hESCs in einer nahezu vollständigen Konservierung der Vitalität, Oberflächenmorphologie und Pluripotenz der Zellen. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit langsamen Kühlraten erzielt wurden, zeigte sich

eine Verbesserung der Überlebensrate direkt nach dem Auftauen von ungefähr 40%. Dies ergab sich vor allem, da mit der Vitrifikationsmethode nahezu keine Kolonien während des Kryokonservierungsvorganges oder in den Stunden nach dem Auftauen verloren gingen. Zusätzlich kann durch den Vorgang der Glasbildung in der Probe eine Verwendung von xenogenen Bestandteilen in den Vitrifikationsmedien vermieden werden. Der kryogene Schutz der Zellen beruht daher nicht auf der Wirkung von FBS, wie in den Protokollen mit langsamer Kühlrate, und ermöglicht somit eine erhöhte Standardisierung des Einfriervorgangs.

Untersuchungen an adulten Stamm- und Vorläuferzellen zur extra- und intrazellulären Kryoprotektion mit Trehalose und DMSO

Die Kryokonservierung von Einzelzellen in Suspension führt bereits zu sehr guten Überlebensraten für einen Großteil an Zelltypen. Auch für adulte Stammzellen existieren effiziente Protokolle für das Einfrieren von Zellen mit langsamen Kühlraten, doch diese basieren meistens auf der Schutzwirkung von tierischem Serum, wie z.B. FBS, und mit 10% auf einer relativ hohen Konzentration des zytotoxischen DMSOs. Da DMSO im Verdacht steht, die Differenzierung von Stammzellen zu induzieren, wurde zunächst versucht, DMSO durch die Zugabe eines extrazellulären Kryoprotektivs, in diesem Fall Trehalose, zu ersetzen. Dazu wurden beide Stoffe direkt in das Kulturmedium der Zellen gemischt, so dass eine 150mM Trehaloselösung entstand. Um dabei eine allgemein gültige Aussage treffen zu können, die nicht spezifisch auf einen adulten Stammzelltyp beschränkt ist, wurden für diesen Versuch adulte Stamm- und Vorläuferzellen aus drei unterschiedlichen Quellen genutzt: a) erythroide Zellen aus dem Nabelschnurblut (UCB-EC); b) mesenchymale Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSC) und c) endotheliale koloniebildende Zellen aus dem Nabelschnurblut (UCB-ECFC). Diese Zellen wurden zunächst eingehend im Hinblick auf Morphologie (Abbildung 36A, C, E) und Immunphänotyp (Abbildung 36B, D, F) gemäß international etablierter und akzeptierter Kriterien (Schafer et al., 2007; Timmermans et al., 2009; Yoder und Ingram, 2009) charakterisiert.

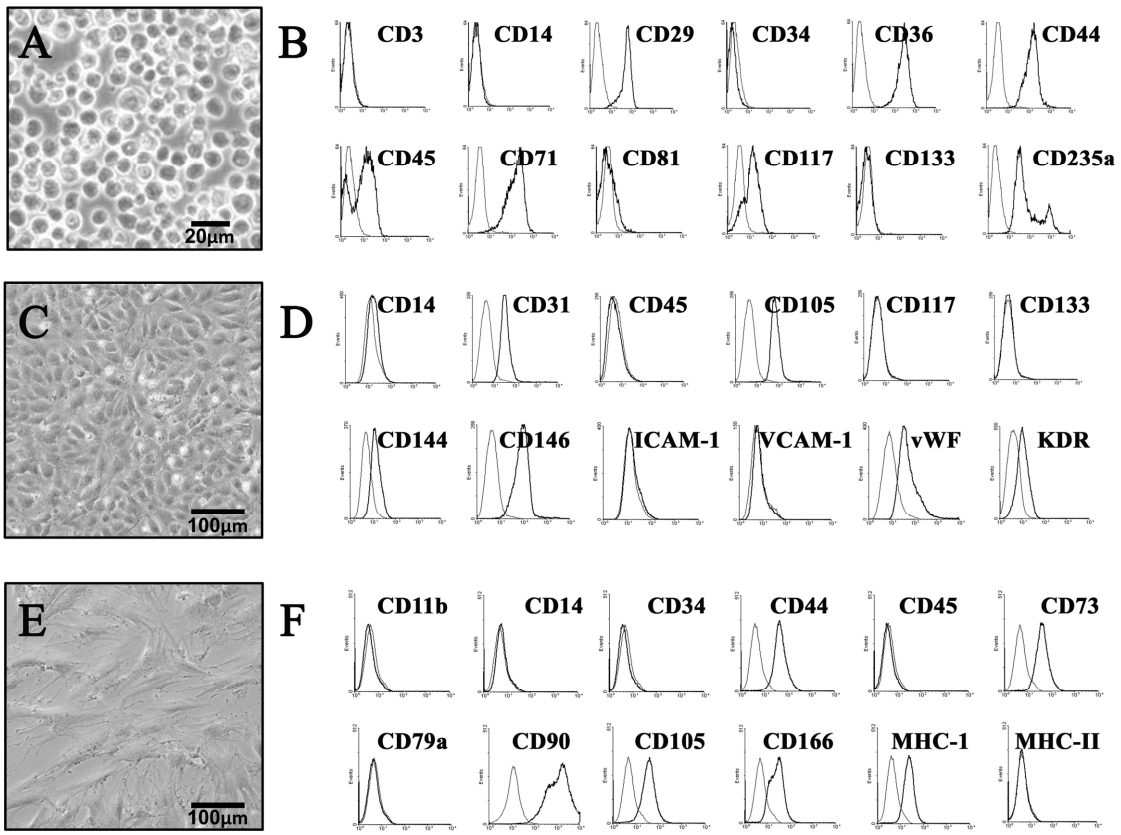


Abbildung 36: Isolierung und Charakterisierung von UCB-EC, UCB-ECFC und AT-MSC (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011).

Morphologie (A, C, E) und Immunphänotyp (B, D, F) von erythroiden Zellen aus Nabelschnurblut (UCB-ECs, A, B), von endothelialen, koloniebildenden Zellen mit einer pflastersteinähnlichen Struktur aus dem Nabelschnurblut (UCB-ECFCs, C, D) und von mesenchymalen Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSCs, E, F).

Dabei gibt Tabelle 3 eine Übersicht der positiven und negativen Expression der getesteten Antigene.

Tabelle 3: Übersicht der Expression spezifischer Antigene zur Charakterisierung der verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen

Zelltyp	**Expression**	**Oberflächenantigen**
UCB-ECs	Positiv	CD29, CD36, CD44, CD45, CD71, CD117, CD235a
	Negativ	CD3, CD14, CD34, CD81, CD133
UCB-ECFCs	Positiv	CD31, CD105, CD144, CD146, vWF, KDR
	Negativ	CD14, CD45, CD117, CD133, ICAM-1, VCAM-1
AT-MSCs	Positiv	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, MHC-1
	Negativ	CD11b, CD14, CD34, CD45, CD79a, MHC-II

Da für Stamm- und Vorläuferzellen neben der Morphologie vor allem die Funktionalität ein entscheidendes Kriterium ist und diese auch während der Kryokonservierung erhalten bleiben muss, wurden die Zellen zusätzlich auf ihr Differenzierungspotential untersucht (Abbildung 37). Für UCB-ECs zeigten

die gleichmäßige Abnahme des Zellvolumens und die Zunahme des Hämoglobingehaltes die Fähigkeit zur *in vitro* Differenzierung in Erythrozyten. Zytospinaufnahmen bestätigten diese Veränderungen und ergaben, dass proliferierende UCB-ECs größtenteils aus unreifen Blasten mit einer Zellgröße von 800fl bestehen (Abbildung 37A, obere Reihe). 24 Stunden nach Beginn der Differenzierung begann die Zellgröße bis zu einem finalen Volumen von 200fl abzunehmen (Abbildung 37B). Parallel dazu zeigte sich eine Akkumulation von Hämoglobin in den Zellen, nachgewiesen mit einer Benzidinfärbung (Abbildung 37A, mittlere und untere Reihe) und einem kolorimetrischen Nachweis (Abbildung 37C). Dabei wurde nach einer 7-tägigen Differenzierung eine Zunahme des Hämoglobingehaltes auf den achtfachen Ausgangswert festgestellt.

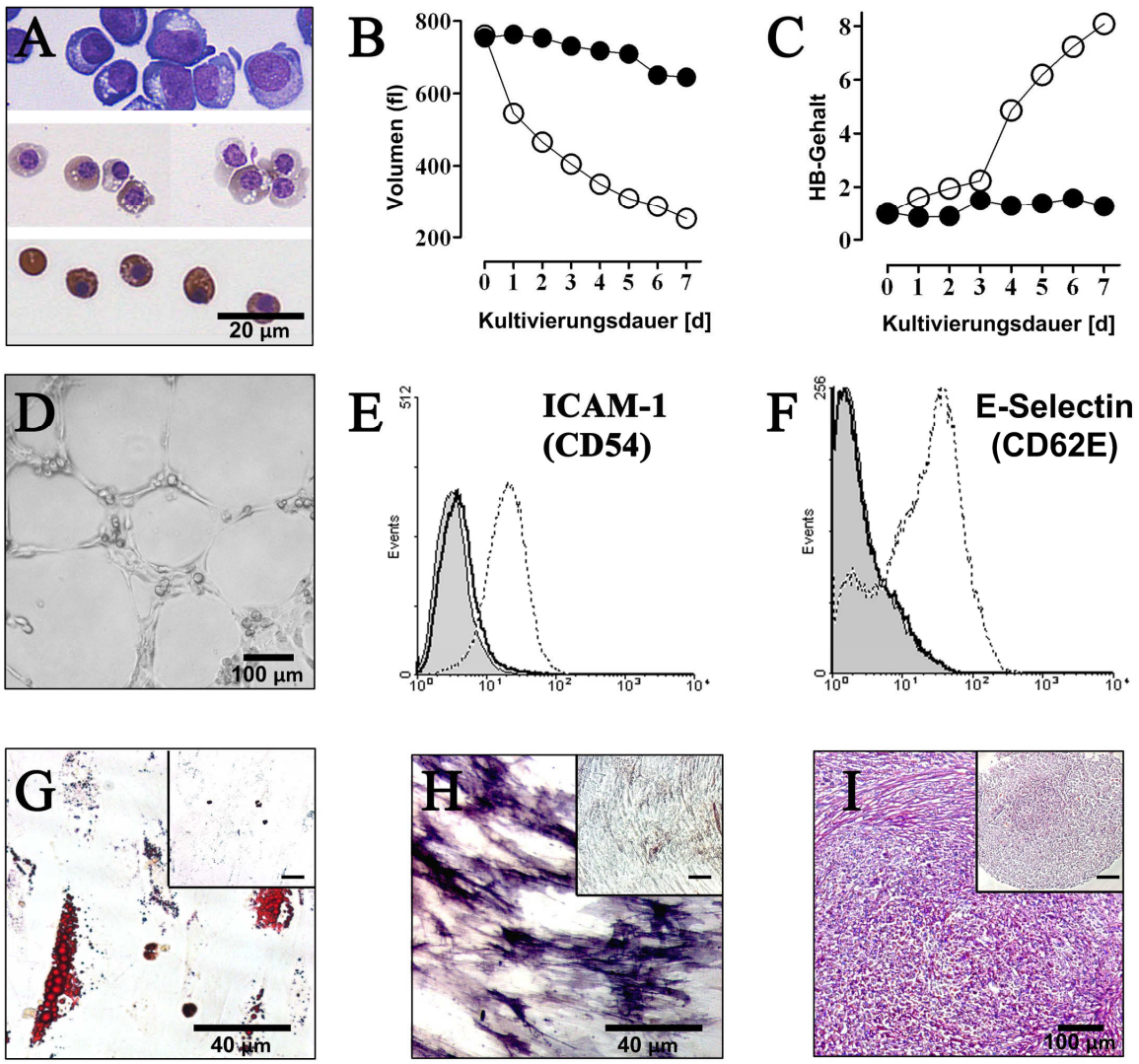


Abbildung 37: Funktionale Charakterisierung von UCB-ECs (A-C), UCB-ECFCs (D-F) und AT-MSCs (G-I) (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011).

UCB-ECs zeigten die Fähigkeit zur Differenzierung in Erythrozyten (A-C). Dies wurde anhand einer gleichmäßigen Abnahme des Zellvolumens und einer Zunahme des Hämoglobingehaltes während der Differenzierung durch Zytospinanalysen (A), durch Bestimmung der Zellgröße (B) und durch kolorimetrische Hämoglobinanalysen (C) nachgewiesen. Schwarze Kreise: Zellen in Kulturmedium; weiße Kreise: Zellen in Differenzierungsmedium. Für UCB-ECFCs zeigte die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen auf Matrigel (D) sowie die Hochregulierung von ICAM-1/CD54 (E) und E-Selectin/CD62E (F) nach TNF-α-Stimulation die Funktionalität der endothelialen Zellen. Grau: Isotypkontrolle; schwarze Linie: unstimulierte Zellen; gestrichelte Linie: stimulierte Zellen. Für AT-MSCs bewiesen in vitro Differenzierungsstudien das Potential der Zellen, Adipozyten (G, Oil Red O Färbung), Osteozyten (H, BCIP-NBT-Nachweis) und Chondrozyten (I, PAS-Färbung) zu bilden. Einfügung: unstimulierte Kontrolle.

Für UCB-ECFC wurde die Kapillarbildung auf Matrigel (Abbildung 37D) und die Hochregulierung von ICAM-1 (Abbildung 37E) und E-Selectin (Abbildung 37F) nach einer Stimulation mit TNF-α als Nachweis endothelialer Zelleigenschaften demonstriert. Für AT-MSC zeigten *in vitro* Studien das große Spektrum des Differenzierungspotentials in Zelltypen mesodermalen Ursprungs. Die Differenzierung in Adipozyten (Abbildung 37G), Osteozyten (Abbildung 37H) und Chondrozyten (Abbildung 37I) konnte nach einer spezifischen Stimulierung nachgewiesen werden.

Um die Effizienz der DMSO-freien Kryokonservierung in Trehalose zu evaluieren, wurden als Analyseparameter zunächst die Vitalität der Zellen und die Anzahl der zurückgewonnenen, lebenden Zellen direkt nach dem Auftauen und nach einer 24-stündigen Kultivierung im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl festgelegt (Abbildung 38).

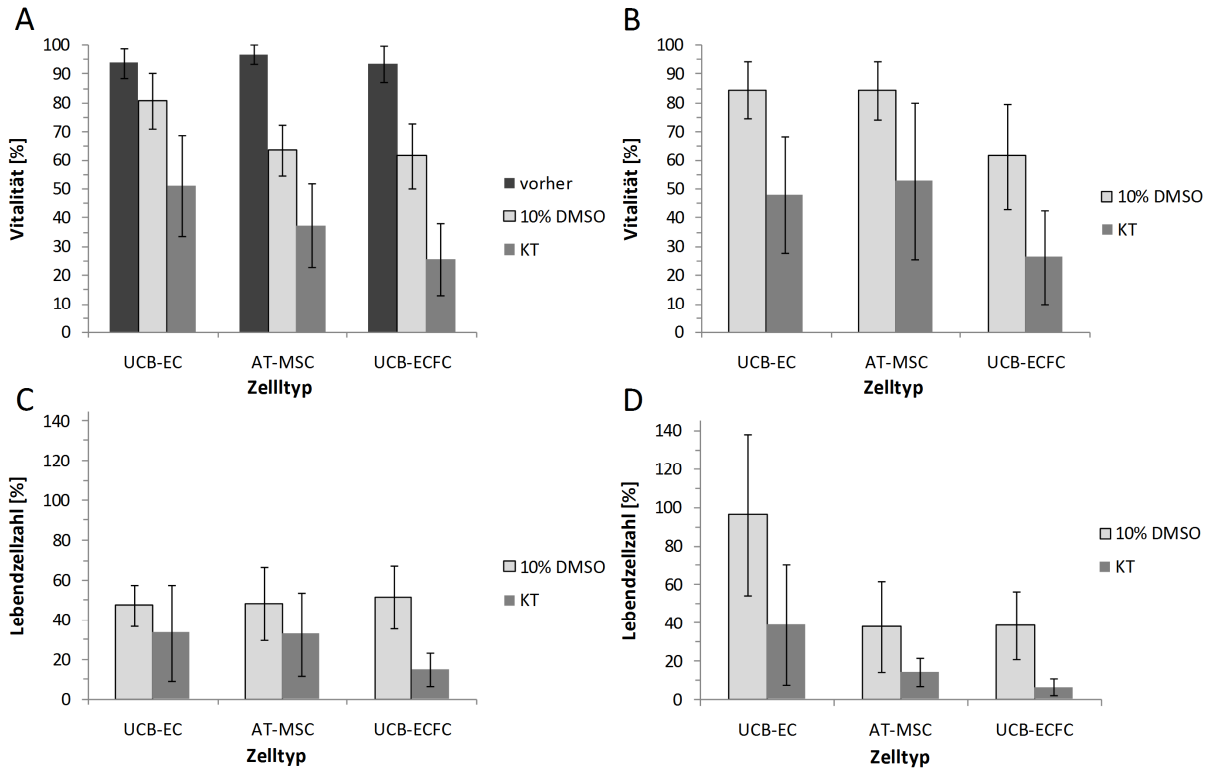


Abbildung 38: Kryokonservierung humaner, adulter Stamm- und Vorläuferzellen mit intrazellulärem (10% DMSO) und extrazellulärem Kryoprotektiv (Trehalose, KT).

Die Vitalität (A, B) und der Anteil lebender Zellen im Vergleich zur eingefrorenen Zellzahl (C, D) wurden direkt nach dem Auftauen (A, C) und nach einer 24-stündigen Kultur (B, D) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen in einem 37 °C warmen Wasserbad wurden mittels FDA/EB die Vitalität und der Anteil lebender Zellen im Vergleich zur eingefrorenen Zellzahl unter Verwendung eines Hämozytometers bestimmt.

Die Vitalitätsmessung ergab, dass in allen Proben, die in Kulturmedium mit 10% DMSO eingefroren wurden, die höchsten Vitalitätswerte erreicht wurden mit Werten von 61,41 ± 11,29% für UCB-ECFCs bis 80,76 ± 9,54% für UCB-ECs (Abbildung 38A). Dagegen lagen die Resultate für die Zellen, die in Kulturmedium mit Trehalose eingefroren wurden, mit 25,57 ± 12,58% für UCB-ECFCs bis 51,12 ± 17,47% für UCB-ECs signifikant darunter. Auch nach 24 Stunden wurde diese Tendenz bestätigt. Während die Vitalität der mit 10% DMSO eingefroren Zellen konstant blieb oder sich leicht erholte und bei 61,31 ± 18,22% für UCB-ECFCs bis 84,38 ± 9,95% für UCB-ECs anstieg, sanken oder stagnierten die Werte für UCB-ECFCs bzw. UCB-ECs auf 26,23 ± 16,25% bzw. 47,93 ± 20,27% nach der Kryokonservierung mit Trehalose (Abbildung 38B). Nur bei den AT-MSCs war eine leichte Erholung auf

52,53 ± 27,21% festzustellen (Abbildung38B). Doch auch wenn die Vitalität der mit 10% DMSO eingefrorenen Zellen zufriedenstellende Ergebnisse erzielte, war die Anzahl lebender Zellen, die direkt nach dem Auftauen wiedergewonnen werden konnten, auch mit DMSO sehr gering (Abbildung 38C). Hierbei lagen die Werte zwischen 47,33 ± 10,19% für UCB-ECs bis 51,77 ± 15,83% für UCB-ECFC und damit immer noch über den Ergebnissen für mit Trehalose eingefrorene Zellen, die von 14,89 ± 8,47% für UCB-ECFCs bis 33,37 ± 24,20% für UCB-ECs reichten. 24 Stunden nach dem Auftauen zeigten nur die UCB-ECs, die mit 10% DMSO eingefroren wurden, von Natur aus stark proliferierende Suspensionszellen, eine deutliche Erholung und einen klaren Anstieg der Lebendzellzahl mit 96,21 ± 41,98% auf nahezu den Ausgangswert. Für AT-MSCs und UCB-ECFCs, die mit 10% DMSO kryokonserviert wurden, sanken die Werte dagegen auf 38,02 ± 23,73% bzw. 38,76 ± 17,45%. Auch UCB-ECs, die mit Trehalose eingefroren wurden, zeigten eine leichte Verbesserung auf 39,02 ± 31,55%, wogegen die Ergebnisse für AT-MSCs und UCB-ECFCs auf 14,54 ± 7,32% bzw. 6,64 ± 4,40% abfielen (Abbildung 38D).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verwendung des extrazellulären Kryoprotektivs Trehalose zu einem gewissen Schutz der Zellen vor Einfrierschäden führt, doch ein kompletter Ersatz von DMSO durch Trehalose momentan noch nicht möglich ist. Da allerdings auch die direkte Zugabe von DMSO ins Kulturmedium der hier verwendeten Zellen vor allem im Bezug auf die Anzahl lebender Zellen, die wiedergewonnen werden konnte, nicht zu optimalen Ergebnissen führte, wurde die Wirkung weiterer Additive untersucht.

Zunächst wurden dazu weitere Untersuchungen in Bezug auf Zellzahl und Vitalität durchgeführt, bevor die Funktionalität nach der Kryokonservierung tiefer gehend analysiert wurde. Zusätzlich enthielten die hier untersuchten Kryomedien tierisches Serum, das in den Kulturmedien vorlag. Da dies eine therapeutische Anwendung der relevanten adulten Stamm- und Vorläuferzellen unmöglich macht, wurde die Vorgabe einer xenofreien Kryokonservierung für die Ablage der Zellen in Biobanken in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen.

Untersuchungen zur Vermeidung xenogener Bestandteile im Kryomedium von adulten Stamm- und Vorläuferzellen durch Verwendung von Poloxameren

Poloxamere sind in Anwendungen mit einer hohen Belastung der Zellmembran weit verbreitet. So schützen sie die Zellen in Bioreaktoren vor den auftretenden Scherkräften und stabilisieren biologische Materialien während Lyophilisierungsvorgängen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob das Poloxamer 188 als Additiv zum Kryomedium einen Schutz der Zellen gegen Kryoschädigungen bewirkt und somit FBS als Mediumzusatz ersetzen kann. Dazu wurden zunächst die Effekte des Poloxamers 188 auf den Zellmetabolismus untersucht, um die höchste, biokompatible Konzentration des Stoffes zu bestimmen. Primäre mesenchymale Stammzellen, die aus der Nabelschnur isoliert wurden, wurden daher für 24 Stunden in unterschiedlichen Konzentrationen des Poloxamers 188 sowie in 10% des bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkenden DMSO als Negativkontrolle in Standardmedium kultiviert. Anschließend wurde der Zellmetabolismus mit Hilfe des AlamarBlue-Nachweises analysiert (Abbildung 39).

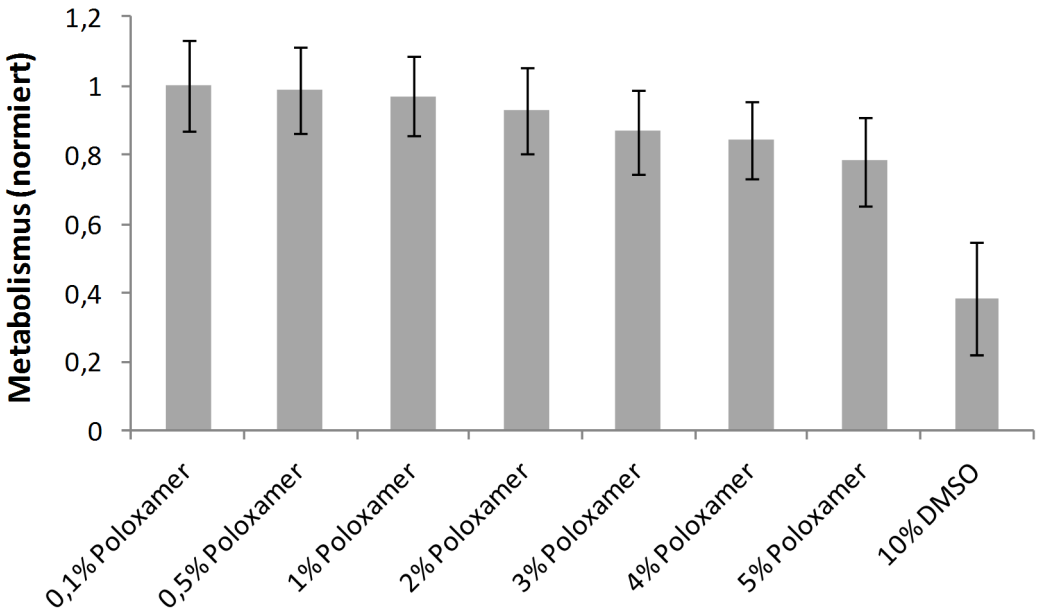


Abbildung 39: Effekte von unterschiedlichen Poloxamerkonzentrationen auf die Stoffwechselaktivität von MSCs aus der Nabelschnur.

Die MSCs wurden für 24 Stunden in den verschiedenen Konzentrationen des Poloxamers 188 kultiviert, anschließend wurde die Stoffwechselaktivität mit Hilfe des AlamarBlue-Nachweises photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 unabhängigen Versuchsansätzen, normiert auf die poloxamerfreie Kontrolle.

Dabei zeigte sich, dass für Poloxamerkonzentrationen von 0,1-1% nahezu kein Unterschied zur Kontrolle ohne Poloxamer festgestellt werden konnte. Mit höheren Poloxamerkonzentrationen nahm der Metabolismus der Zellen um 3,02% (4% Poloxamer) bis 7,14% (5% Poloxamer) ab. Die deutlichste Reduktion wurde nach der Kultivierung der Zellen in 10% DMSO gemessen, so fiel der Wert auf 48,98 ± 43,42% im Vergleich zur Kontrolle ohne Poloxamerzusatz. Nach diesen Versuchen wurde ein Kryomedium basierend auf einer Poloxamerkonzentration von 1% evaluiert, da hiermit nur geringe Effekte auf den Zellstoffwechsel gemessen wurden. Um die membranstabilisierende Wirkung dieses Poloxamers zu untersuchen, wurde es anstelle von FBS zum Kryomedium zugegeben, so dass ein vollständig proteinfreies, chemisch vollständig definiertes Kryomedium für die weiteren Versuche verwendet werden konnte.

5.1.4 Stabilitätsuntersuchungen und Integration in den Ablauf von Biobanken

Zukünftige Therapieansätze benötigen einen ständig verfügbaren, verlässlichen und sicheren Vorrat an qualitativ hochwertigen Stammzellen oder daraus abgeleiteten Zellen. Daher ist die Etablierung von sicheren Lagerbedingungen und von effizienten, reproduzierbaren und xenofreien Kryokonservierungsprotokollen in Biobanken von großer Bedeutung. Aus diesem Grund befasst sich dieses Kapitel mit der Entwicklung von verlässlichen Kryoprozeduren, frei von tierischen Bestandteilen, und deren Langzeitstabilität. Da viele Stammzellen nicht direkt nach der Isolierung verwendet werden, sondern wie bei hämatopoetischen Stammzellen über mehrere Jahre gelagert werden müssen, ist die Robustheit und Stabilität der Protokolle für den Erhalt der Zellvitalität und –funktionalität entscheidend. Außerdem wurden im weiteren Verlauf innovative Lagertechnologien als Antwort auf die Er-

fordernisse in modernen Biobanken entwickelt und evaluiert, um eine Probenidentifikation, Dokumentation und Nachverfolgung nach dem aktuellen Stand der Technik zu ermöglichen.

Kryokonservierung von in Alginat verkapselten PMEFs

Um das in Kapitel 4.1.2 entwickelte und in Kapitel 4.1.3 getestete PMEF-System jederzeit für die Kultur von hESCs verfügbar zu haben, wurde untersucht, ob die verkapselten PMEF-Zellen auch kryokonservierbar und damit dauerhaft lagerfähig sind. Dazu wurden verkapselte PMEF einen Tag nach der Verkapselung in PMEF-Kulturmedium mit 10% DMSO und in dem beschriebenen proteinfreien Medium, das auf eine Poloxamerkonzentration von 1% basiert, mit 5% und 10% DMSO kontrolliert mit 1 °C/min auf -80°C eingefroren. Nach 10 Tagen Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff wurden die Alginatkapseln wieder aufgetaut. Die Vitalität (Abbildung 40A) und die Stoffwechselaktivität (Abbildung 40B) der eingeschlossenen Mausfibroblasten wurden durch eine FDA/EB-Färbung und anhand eines WST-1-Tests vor dem Einfrieren, 0 und 24 Stunden nach dem Auftauen untersucht.

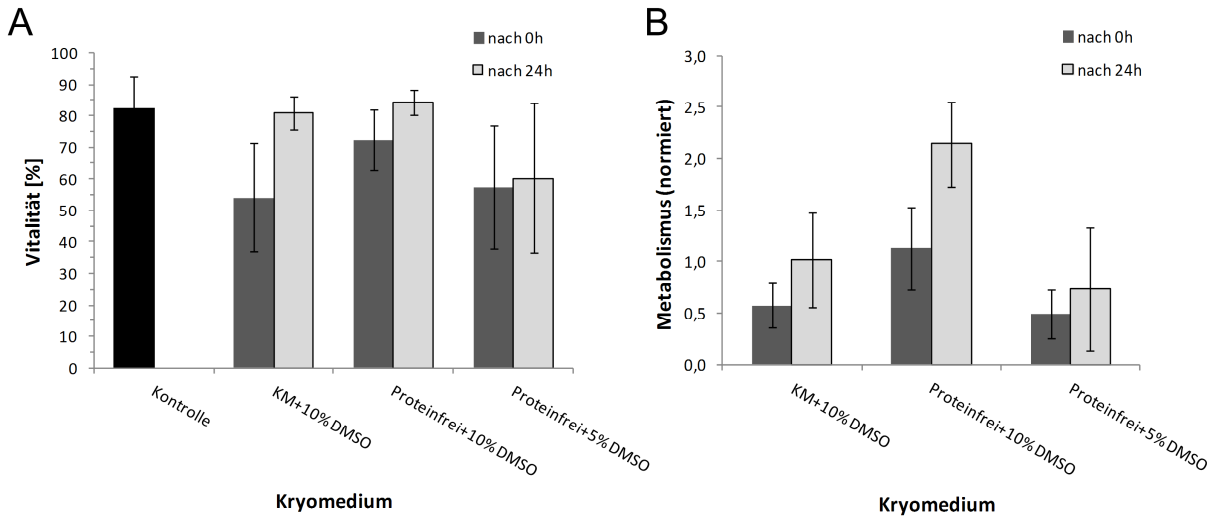


Abbildung 40: Kryokonservierung von in Alginat verkapselten PMEF.

Vitalität (A) und Metabolismusaktivität (B) der verkapselten PMEF nach der Kryokonservierung in PMEF-Kulturmedium mit 10% DMSO (KM+10% DMSO), sowie im proteinfreien Medium mit 5% bzw. 10% DMSO; für die Vitalitätsbestimmung wurden die Kapseln mit Vitalitätslösung gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt; aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=3x4; für die Bestimmung der Metabolismusaktivität wurde die Absorption des Überstandes nach 4h Reaktion der Kapselsuspension mit 10% WST-1-Reagenz photometrisch ermittelt und die Resultate nach der Kryokonservierung auf die Messung vor dem Einfrieren normiert; aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=3x3.

Bei der Vitalitätsauswertung waren vor der Kryokonservierung durchschnittlich 82,57 ± 10,16% der Zellen in den Alginatkapseln vital (Abbildung 40A). Nach 10 Tagen Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff wurde die Vitalität erneut bestimmt. Dabei lagen die Werte direkt nach dem Auftauen zwischen 54,09 ± 17,28 % für Kapseln, die im PMEF-Medium mit 10% DMSO eingefroren wurden und 72,31 ± 9,62% nach einer Kryokonservierung im proteinfreien Medium mit 10% DMSO. 24 Stunden nach dem Auftauen erholte sich die Vitalität bei Kapseln, die im PMEF-Medium bzw. im proteinfreien Medium mit 10% DMSO eingefroren wurden, deutlich auf 80,84 ± 5,18% bzw. 84,36 ± 4,11%, während der Wert bei Kapseln nach der Kryokonservierung im proteinfreien Medium mit 5% DMSO mit 60,32 ± 23,86% relativ konstant blieb.

Dieses Ergebnis konnte durch die Bestimmung der Metabolismusaktivität bestätigt werden (Abbildung 40B), wobei die Messungen auf die Resultate vor der Kryokonservierung normiert wurden.

Direkt nach dem Auftauen sank der Stoffwechsel von den Ansätzen, die im Kulturmedium mit 10% DMSO bzw. im proteinfreien Medium mit 5% DMSO eingefroren wurden, auf 0,58 ± 0,22 bzw. 0,49 ± 0,24, während die Werte für Kapseln, die im proteinfreien Medium mit 10% DMSO kryokonserviert wurden, mit 1,13 ± 0,40 relativ konstant zum Ausgangswert blieben. 24 Stunden nach dem Auftauen zeigte sich ein Anstieg der Stoffwechselaktivität in allen Proben. Die Kapseln, die in PMEF-Kulturmedium mit 10% DMSO eingefroren waren, erreichten ein Metabolismusniveau vergleichbar mit dem vor der Kryokonservierung (1,01 ± 0,46), während der Wert für Proben, die im proteinfreien Medium mit 10% DMSO kryokonserviert wurden, auf das doppelte Ausgangsniveau anstieg (2,14 ± 0,41). Im proteinfreien Medium mit 5% DMSO wurde nur eine geringe Zunahme des Stoffwechsels auf 0,73 ± 0,60 ermittelt.

Es zeigte sich somit, dass mittels langsamer Einfrierrate und mit dem Zusatz von DMSO eine proteinfreie Kryokonservierung der verkapselten PMEF für eine dauerhafte Lagerung und einen sofortigen Einsatz in der Stammzellkultur möglich ist.

Multicenter-Studie zur xenofreien und chemisch vollständig definierten Kryokonservierung adulter Stamm- und Vorläuferzellen

Für eine direkte therapeutische Anwendung sind momentan nur adulte Stamm- und Vorläuferzellen relevant, da die Verwendung von hESC großen ethischen Bedenken unterliegt. Zusätzlich besitzen diese Zellen aufgrund ihrer Charakteristika ein stark karzinogenes Potential, das ein großes Risiko für den Empfänger darstellt. Aus diesem Grund fokussiert sich die Ablage von Biobanken momentan auf humane adulte Stammzellen.

Die folgenden Untersuchungen befassen sich daher mit der Etablierung eines effizienten, xenofreien und chemisch vollständig definierten Kryokonservierungsprotokolls speziell für diese Zellen, auch in Verbindung mit einer möglichen DMSO-Reduzierung. Zur Substitution der tierischen Bestandteile der Kryomedien wurde das Poloxamer 188 verwendet. Dies sollte die schützende Wirkung des Serums übernehmen. Darauf basierend wurden Kryomedien hergestellt, bei denen neben der standardmäßig verwendeten DMSO-Konzentration von 10% zusätzlich auch 5% getestet wurden, um eine mögliche DMSO-Reduktion zu testen. Als Kontrolle diente dabei ein Kryomedium, das aus 90% FBS mit 10% DMSO bestand. Um vergleichende Kryokonservierungsexperimente durchführen zu können, wurden erneut die bereits beschriebenen adulten, primären Vorläuferzellpopulationen UCB-ECs, UCB-ECFCs und AT-MSCs verwendet (Zeisberger et al., 2011).

Da in den ersten Untersuchungen festgestellt wurde, dass die Vitalität allein kein geeigneter Parameter zur Evaluierung der Protokolle darstellt, wurde die Effizienz der Kryoprotokolle anhand der Anzahl zurück gewonnener, lebender Zellen direkt nach dem Auftauen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl und der anschließenden Proliferationsrate an unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftauen miteinander verglichen (Abbildung 41). Diese Auswertung beinhaltet sowohl die Vitalität der Zellen und den Zellverlust während der Kryokonservierung, bezieht aber auch die Effekte von Apoptose und Proliferation der Zellen mit ein.

Die Zellen wurden daher in zwei vollständig proteinfreien Kryomedien, die auf einer 1%igen Poloxamer 188-Konzentration basieren und 5% bzw. 10% DMSO enthalten, sowie in 90% FBS mit 10% DMSO mit einer langsamen Kühlrate (1 °C/min) eingefroren. Die Anzahl lebender Zellen wurde direkt vor (Abbildung 41; gestrichelte Linie) und nach dem Einfrieren (Abbildung 41; weiße Balken) bestimmt. Zusätzlich wurden von jedem Ansatz nach dem Auftauen Zellen ausgesät und die absolute

Anzahl lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Lebendzellzahl nach 24 (Abbildung 41A, hellgraue Balken) und 48 Stunden (Abbildung 41A, dunkelgraue Balken) für UCB-ECs bzw. nach 48 (Abbildung 41B, C, hellgraue Balken) und 96 Stunden (Abbildung 41B, E, dunkelgraue Balken) für UCB-ECFCs und AT-MSCs bestimmt.

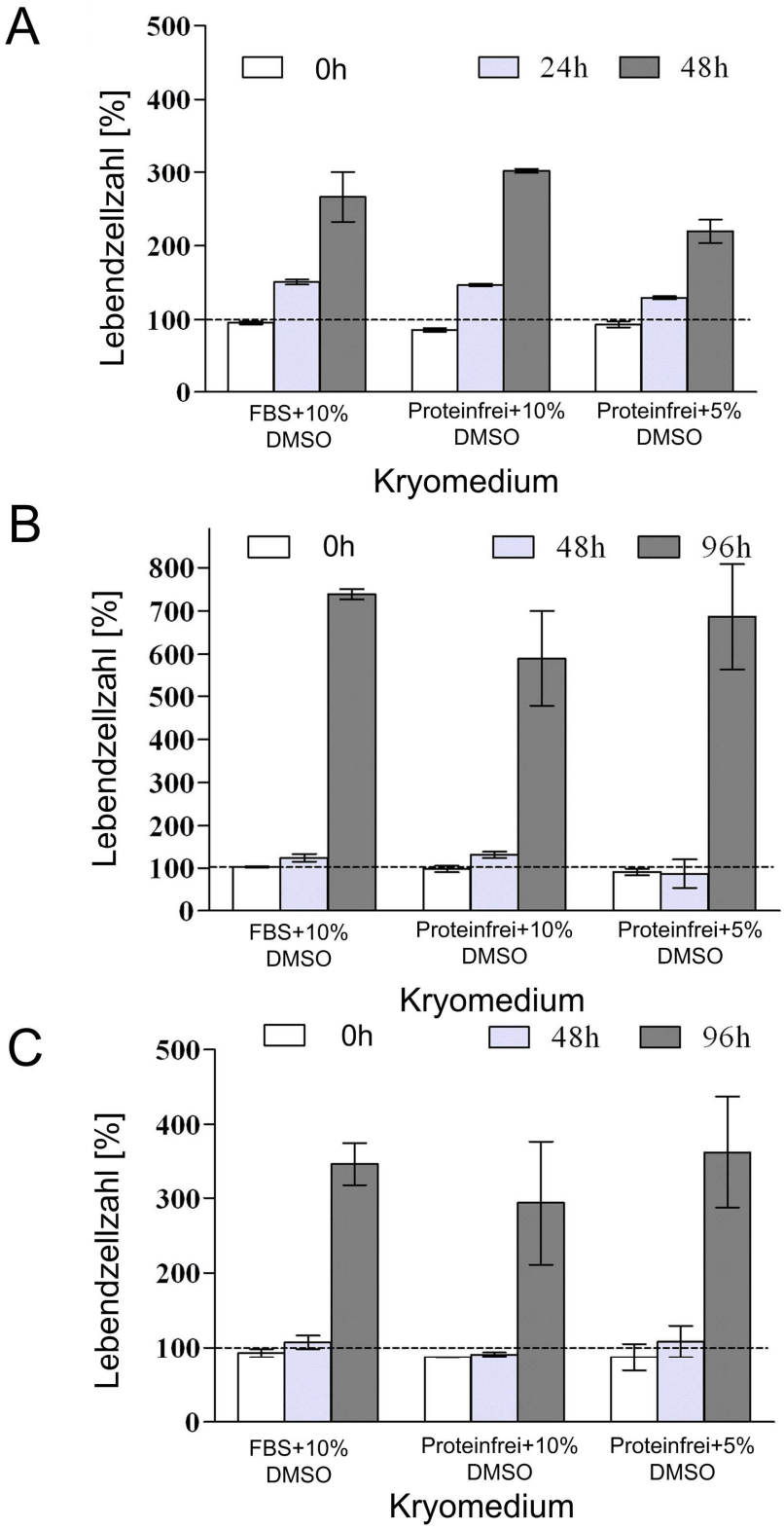


Abbildung 41: Anteil lebender Zellen von UCB-ECs (A), UCB-ECFCs (B) und AT-MSCs (C) im Vergleich zur eingefrorenen Zellzahl direkt nach der Kryokonservierung in proteinfreien, chemisch vollständig definierten Kryomedien und an unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftauen (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011)

UCB-ECs (A), UCB-ECFCs (B) und AT-MSCs (C) nach der Kryokonservierung in den proteinfreien Medien mit 5% bzw. 10% DMSO und im Referenzmedium aus 90% FBS mit 10% DMSO. Die Anzahl lebender Zellen wurde direkt nach der Kryokonservierung (A-C, weiße Balken), 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen für UCB-ECs (A, hell- und dunkelgraue Balken) bzw. 48 und 96 Stunden nach dem Auftauen für UCB-ECFCs und AT-MSCs (B, C, hell- und dunkelgraue Balken) bestimmt und auf die eingefrorenen Lebendzellzahl normiert (A-C, gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchsansätzen.

Dabei ergab sich für alle drei Zelltypen und getesteten Bedingungen nur ein geringer Zellverlust direkt nach dem Auftauen, so dass der Anteil lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl in allen Ansätzen über 90% lag. 48 Stunden nach dem Auftauen zeigten die UCB-ECFCs (Abbildung 41B) und AT-MSCs (Abbildung 41C) noch eine Stagnation bzw. geringe Abnahme der Lebendzellzahl, unabhängig vom verwendeten Kryomedium. Doch nach weiteren 48 Stunden konnte eine deutliche Proliferation beider Zelltypen gemessen werden, so stieg die Lebendzellzahl auf den ungefähr siebenfachen (UCB-ECFC) bzw. dreifachen Wert (AT-MSCs) an. Dabei erzielte in beiden Ansätzen die Kryokonservierung mit dem proteinfreien Kryomedium, das mit 5% DMSO versetzt wurde, vergleichbare Ergebnisse zur Kryokonservierung mit dem Referenzmedium (90% FBS mit 10% DMSO). Die Effizienz mit dem proteinfreien Kryomedium, das 10% DMSO enthält, lag leicht darunter. Die UCB-ECs zeigten bereits 24 Stunden nach dem Auftauen eine Zunahme der Lebendzellzahl in allen Ansätzen mit Werten zwischen 129,70 ± 2,18 für Zellen, die im proteinfreien Medium mit 5% DMSO eingefroren wurden, und 151,20 ± 3,30% für UCB-ECs, die in FBS mit 10% DMSO kryokonserviert wurden (Abbildung 41A). Nach 48 Stunden verdeutlichte sich dieser Anstieg noch, wobei Zellen, die im proteinfreien Kryomedium mit 10% DMSO eingefroren wurden, mit 302,02 ± 2,88% vergleichbare Ergebnisse zum Referenzmedium erzielten (266,51 ± 33,64%), während die Werte nach der Kryokonservierung im proteinfreien Medium mit 5% DMSO mit 219,80 ± 15,89% leicht darunter lagen.

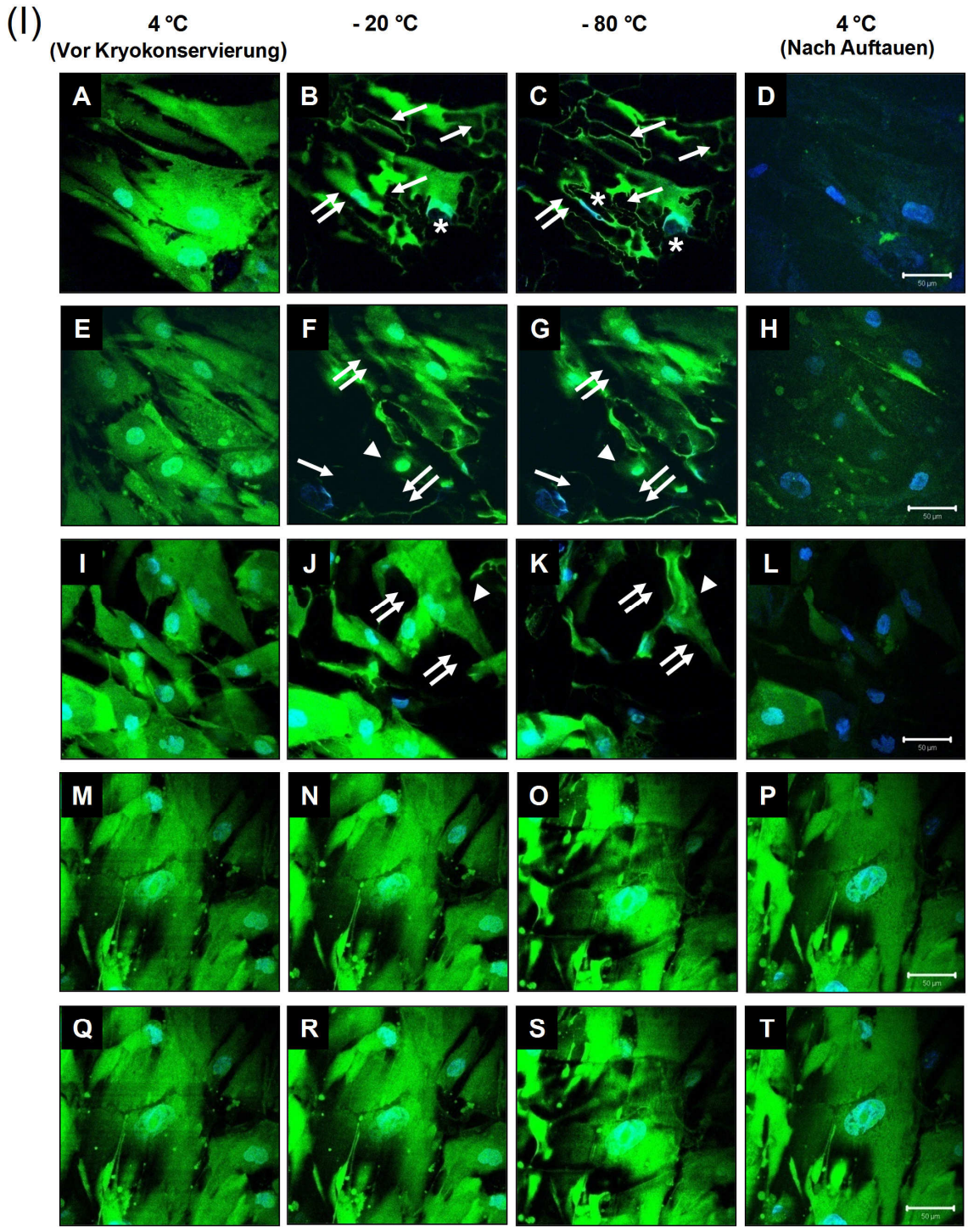
Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass eine proteinfreie, chemisch definierte Kryokonservierung von humanen adulten Stamm- und Vorläuferzellen mit einem guten Erhalt der Lebendzellzahl und Proliferation möglich ist. Zusätzlich konnte die DMSO-Konzentration mit vergleichbaren Ergebnissen zum Referenzmedium auf 5% halbiert werden.

Um die intrazellulären Vorgänge und Effekte durch unterschiedliche DMSO-Konzentrationen während der Kryokonservierung untersuchen zu können, wurde ein modifizierter Aufbau der Multiphotonen-Laster-Raster-Mikroskopie verwendet. Dieser ermöglicht durch eine Verbindung des Mikroskops mit einem Computer gesteuerten Kryotisch, Zellen definiert einzufrieren und dabei mikroskopisch zu beobachten. Durch spezifische Färbungen des Zytoplasmas mit Calcein und des Zellkerns mit Hoechst33342 können Auswirkungen auf die Membranintegrität und eine Eisnukleation im Zellinneren während des Einfriervorganges in Echtzeit dargestellt werden. Um die Zellveränderungen zeitaufgelöst untersuchen zu können, ist die Verwendung adhärenter Zellen notwendig, so dass diese nicht durch thermische Strömungen aus dem Fokus geraten können. Somit war diese Analyse nur mit AT-MSCs und UCB-ECFCs möglich. Zusätzlich zur Untersuchung der intrazellulären Vorgänge während der Kryokonservierung wurden auch die Auswirkungen einer reduzierten DMSO-Konzentration evaluiert, um so zu untersuchen, ob eine weitere DMSO-Reduktion möglich ist. Dazu wurden AT-MSCs (Abbildung 42 (I) A-T) und UCB-ECFCs (Abbildung 42 (II) A-T) auf Deckgläschen kultiviert und anschließend mit Calcein und Hoechst33342 angefärbt. Die markierten Zellen wurden mit dem bereits beschriebenen und xenofreien, chemisch definierten Kryomedium überschichtet, das mit 0%, 2%, 5% bzw. 10% DMSO versetzt wurde. Als Referenzmedium wurde FBS mit 10% DMSO verwendet. Die adhärenten Zellen wurden langsam eingefroren (1 °C/min) und der Einfrierprozess wurde vor (4 °C),

während (-20 °C, -80 °C) und nach der Kryokonservierung (4 °C) mit Hilfe der Multiphotonen-Laser-Raster-Kryo-Mikroskopie untersucht.

Die Kryokonservierung beider Zelltypen im DMSO-freien, xenofreien Kryomedium resultierte in einer signifikanten intrazellulären (Pfeile) und intranukleären Eisbildung (Sternchen) bereits bei -20 °C. Dabei entstanden Eiskristalle mit einer Größe von bis zu 700µm² in den AT-MSCs (Abbildung 42 (I) B) bzw. von bis zu 400µm² in den UCB-ECFCs (Abbildung 42 (II) B). Diese vergrößerten sich und verschmolzen in den AT-MSCs bei einer Temperatur von -80 °C auf eine Fläche von bis zu 1500µm² (Abbildung 42 (I) C), während in den UCB-ECFCs kein Wachstum der Eiskristalle festgestellt werden konnte (Abbildung 42 (II) C). Während der Kryokonservierung mit 2% DMSO waren sowohl in den AT-MSCs (Abbildung 42 (I) F, G, Doppelpfeile), als auch in den UCB-ECFCs (Abbildung 42 (I) F, G, Doppelpfeile) große interzelluläre Eiskristalle sichtbar, die dazu führten, dass sich der Zell-Zell-Abstand vergrößerte. Zusätzlich zeigte sich bei einigen Zellen eine Volumenabnahme bei -20 °C bzw. -80 °C (Abbildung 42 (I) und (II) F, G, Pfeilspitze). Dagegen konnte in beiden Proben keine intrazellulären oder intranukleären Eiskristalle detektiert werden. Mit beiden DMSO-Konzentrationen war ein Zytoplasmaaustritt nach dem Auftauprozess zu erkennen, was auf eine Membranschädigung hindeutet. Dies führte zu einem Verblassen der Zytoplasmafärbung und einer stärker werdenden grünen Hintergrundfluoreszenz bei den AT-MSC (Abbildung 42 (I) E, H) und den UCB-ECFC (Abbildung 42 (II) E, H) nach dem Auftauen. Mit 5% DMSO konnte ebenfalls eine kleine Anzahl interzellulärer Eiskristalle in den AT-MSCs (Abbildung 42 (I) J, K, Doppelpfeile) erkannt werden, die zu einer Vergrößerung des Zell-Zell-Abstandes führten. Dieser Effekt trat aber nicht bei den UCB-ECFCs auf (Abbildung 42 (II) J, K). Zusätzlich war bei beiden Zelltypen erneut das Schrumpfen von Zellen erkennbar (Abbildung 42 (I) und (II) J, K). Ein geringer Austritt von Zytoplasma nach dem Auftauen war dabei nur bei den AT-MSCs detektierbar (Abbildung 42 (I) L), nicht aber bei den UCB-ECFCs (Abbildung 42 (II) L). Keine inter- oder intrazellulären Eiskristalle entstanden während der Kryokonservierung mit 10% DMSO im proteinfreien, chemisch definierten Kryomedium und mit 10% DMSO in 90% FBS, weder in AT-MSCs (Abbildung 42 (I) M-T) noch in UCB-ECFCs (Abbildung 42 (II) M-T). Ebenso war mit diesen Kryomedien auch kein Zytoplasmaaustritt nach dem Auftauen erkennbar.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen mit der Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie in Verbindung mit dem Kryomikroskop, dass ohne DMSO intrazelluläre und intranukleäre Eiskristalle entstehen. Bei geringen DMSO-Konzentrationen wurde dieses Phänomen nicht mehr festgestellt, dafür bildeten sich allerdings Eiskristalle im Extrazellulärraum, die eine mechanische Auswirkung auf die Zellen besaßen. Die Kryokonservierung ohne DMSO und mit 2% DMSO resultierte außerdem in einem Verlust der Membranintegrität nach dem Auftauen. Mit 5% DMSO konnten bei UCB-ECFCs nur geringe Veränderungen während der Kryokonservierung in Form eines Schrumpfens vereinzelter Zellen festgestellt werden, während in den AT-MSCs zusätzlich interzelluläre Eiskristalle und ein geringer Zytoplasmaaustritt nach dem Auftauen beobachtet werden konnten. Eine Kryokonservierung mit 10% DMSO zeigte einen kompletten Erhalt der zellulären Strukturen beider Zelltypen. Eine Verwendung des proteinfreien, vollständig definierten Kryomediums resultierte dabei in vergleichbaren Ergebnissen zum FBS-haltigen Standardmedium.


(I)
4 °C
(Vor Kryokonservierung)
- 20 °C
- 80 °C
4 °C
(Nach Auftauen)
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T

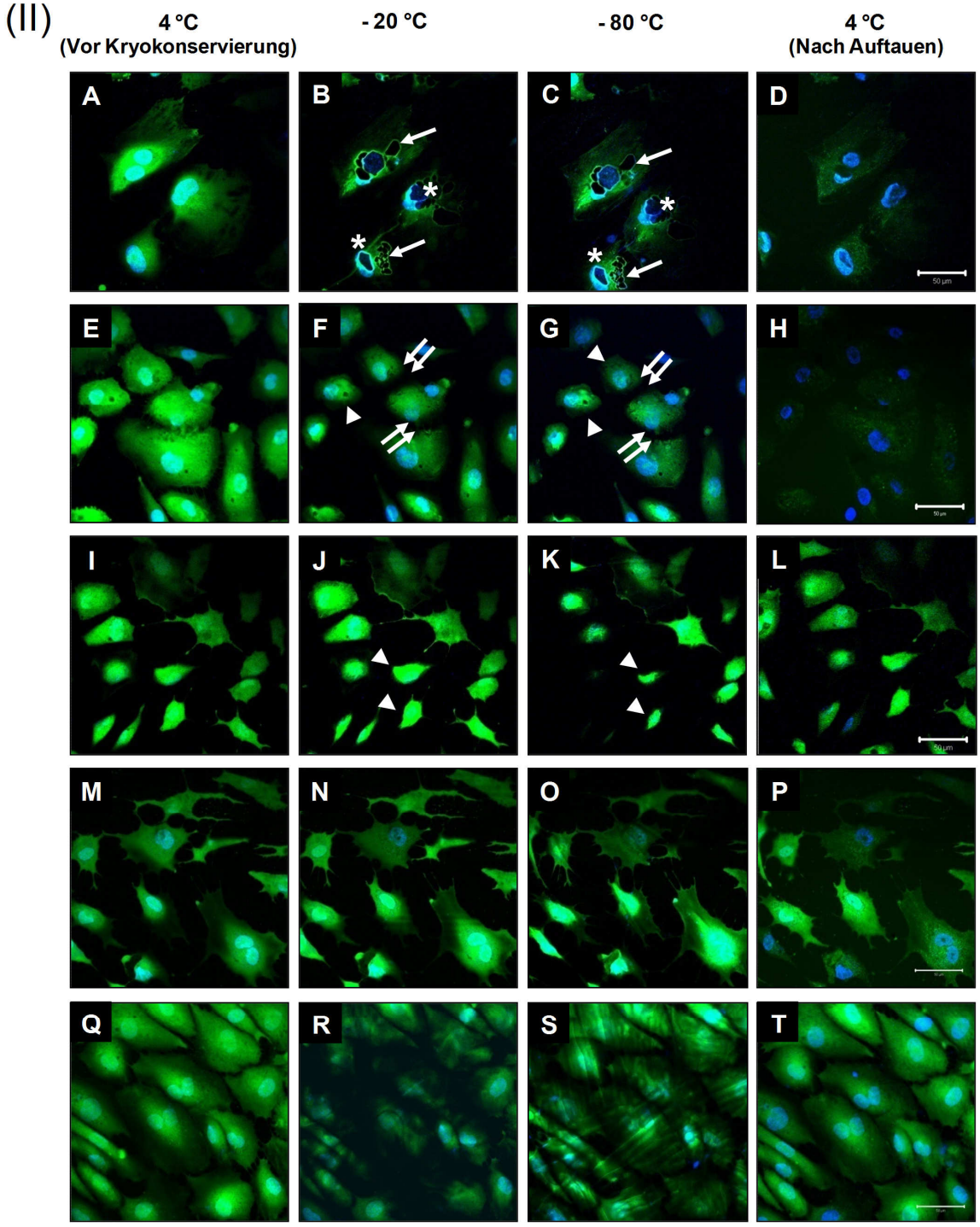


Abbildung 42: Multiphotonen Laser-Raster-Mikroskopie in Verbindung mit einem Kryomikroskop von AT-MSCs (I) und UCB-ECFCs (II) (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011).

Repräsentative Aufnahmen von AT-MSCs (I) und UCB-ECFCs (II) vor (linke Spalte, 4°C), während (mittlere Spalten, -20°C, -80°C) und nach der Kryokonservierung (rechte Spalte, 4°C) im xenofreien Kryomedium mit 0% (A-D), 2% (E-H), 5% (I-L) und 10% DMSO (M-P), sowie in FBS mit 10% DMSO (Q-T) mit einem Multiphotonen-Laser-Raster-Kryo-Mikroskop. Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit Calcein (grün), zur Färbung von intrazellulären Proteinen, und Hoechst33342 (blau), zur Färbung der Zellkerne, markiert und in den unterschiedlichen Kryomedien inkubiert. Anschließend wurden sie mit einem Kryomikroskop mit 1°C/min von 4°C auf -80°C eingefroren und mit 60°C/min auf 4°C aufgetaut. Der Maßstab entspricht 50µm.

Da die Analysen mit dem Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskop in Verbindung mit einem Kryomikroskop darauf hindeuteten, dass die Membranintegrität der Zellen nach der Kryokonservierung ohne

DMSO bzw. mit geringen DMSO-Konzentrationen beeinträchtigt war, wurde eine detaillierte Untersuchung der Membraneigenschaften und Oberflächenstrukturen mit Hilfe der Raster-Elektronen-Mikrokopie (REM) durchgeführt. Dazu wurden UCB-ECs (Abbildung 43), UCB-ECFCs (Abbildung 44) und AT-MSCs (Abbildung 45) im proteinfreien Kryomedium mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen und dem serumhaltigen Referenzmedium mit 10% DMSO eingefroren. Die Zellen wurden vor und nach dem Auftauen fixiert und für das REM präpariert. Die Mehrzahl der UCB-ECs besaß vor der Kryokonservierung eine runde Form, einige waren auch langgestreckt (Abbildung 43A, B). Des Weiteren wurde bei den UCB-ECs eine heterogene Oberflächenstruktur festgestellt: einige wenige Zellen besaßen eine glatte Zellmembran (Abbildung 43A, Stern), bei den meisten allerdings befanden sich Mikrovilli auf der Oberfläche (Abbildung 43B, Pfeile) oder sie waren mit Vesikeln und kurzen Mikrovilli bedeckt. Nach der Kryokonservierung im proteinfreien Medium ohne DMSO waren Anzeichen für Zellschädigungen, so z.B. eine glatte Oberfläche ohne Mikrovilli (Abbildung 43C, Stern), Vesikel (Abbildung 43C, D, Doppelpfeile) und zahlreiche Löcher (Abbildung 43C, D, Pfeilspitzen), sichtbar. Außerdem war ohne DMSO und mit 2% DMSO ein Anschwellen der Zellen erkennbar, bei dem der Zelldurchmesser von 7-8µm auf ca. 12µm anstieg. Trotzdem erzielte das Einfrieren mit 2% DMSO bereits eine deutliche Verbesserung der Membranintegrität (Abbilddung 43E, F). Es konnten zwar noch unterschiedliche Merkmale von Zellschäden festgestellt werden, diese reichten von einer Glättung der Oberfläche (Abbildung 43E, F, Stern) bis hin zu einer unebenen Oberfläche mit einer Vielzahl von Vesikeln und Membranfalten (Abbildung 43E, F, Doppelpfeile). Die Zellmembran an sich war jedoch intakt.

Die Kryokonservierung von UCB-ECs im proteinfreien Medium mit 5% (Abbildung 43G, H) und 10% DMSO (Abbildung 43I, J) zeigte die besten Ergebnisse. So gab es in diesen Proben nahezu keine Unterschiede in Zellmorphologie und Größe im Vergleich zur nicht eingefrorenen Kontrolle. Die Oberfläche der Zellen war dicht mit Mikrovilli besetzt (Abbildung 43G-J, Pfeile) und es waren nur wenig Vesikel sichtbar (Abbildung 43G-J, Doppelpfeile). Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die in FBS mit 10% DMSO eingefroren wurden, verschiedene Reaktionen auf die Kryokonservierung (Abbildung 43K, L). Einige Zellen waren mit einer Vielzahl an Vesikeln (Abbildung 43K, L, Doppelpfeile), aber nur mit wenigen Mikrovilli bedeckt (Abbildung 43L, Pfeil), andere hatten eine glatte Oberfläche (Abbildung 43K, Stern) mit tiefen Furchen in der Plasmamembran (Abbildung 43K, Pfeilspitze).

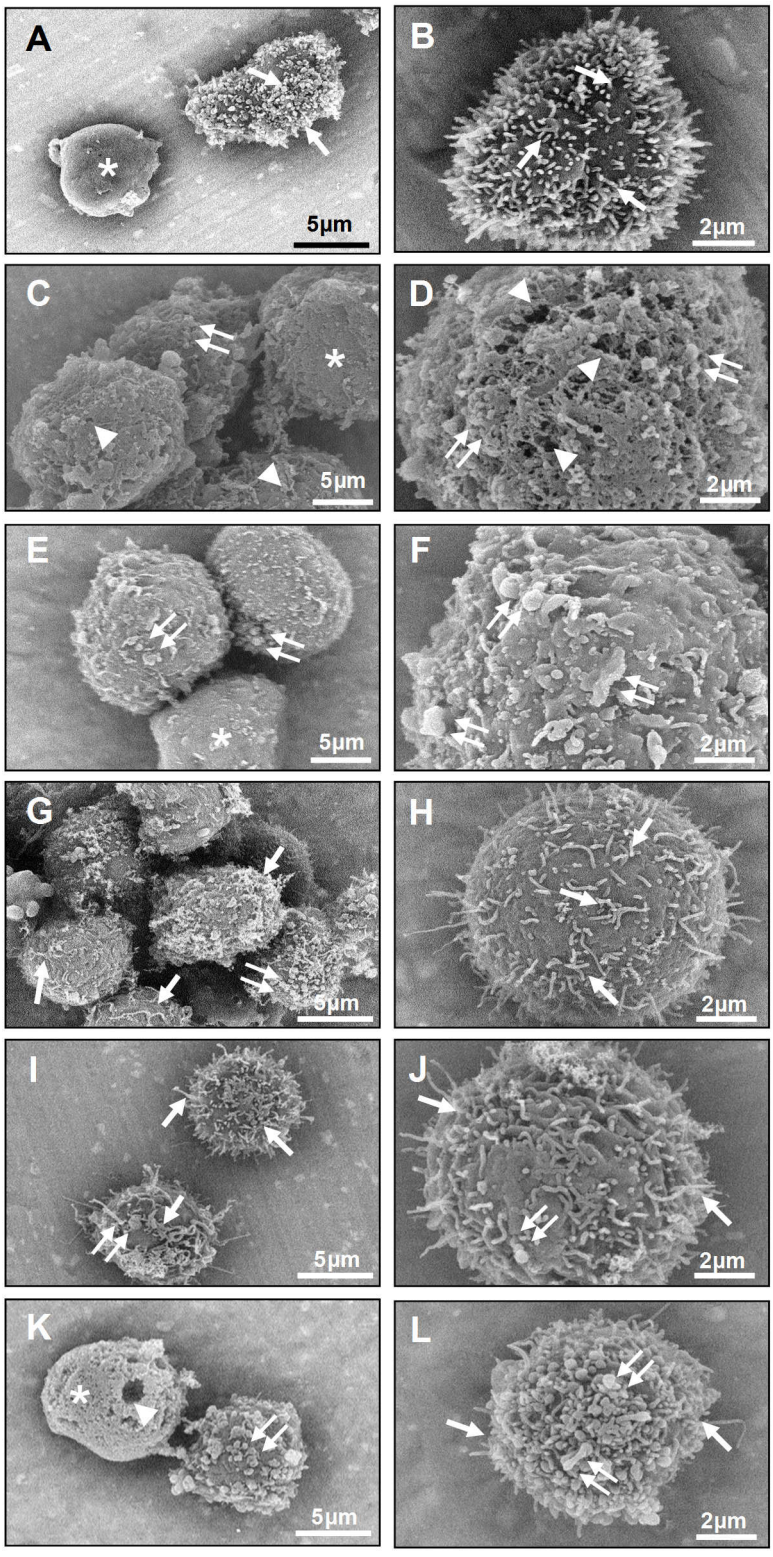


Abbildung 43: REM-Aufnahmen von UCB-ECs nach einer proteinfreien, chemisch vollständig definierten Kryokonservierung mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011).

REM-Aufnahmen von UCB-ECs vor (A, B) und nach der Kryokonservierung in proteinfreiem Medium ohne DMSO (C, D) und mit 2% (E, F), 5% (G, H) und 10% DMSO (I, J). Als Referenzmedium diente 90% FBS mit 10% DMSO (K, L). Die Zellen wurden mit 1°C/min von 4°C auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Nach einem schnellen Auftauen im Wasserbad wurden die Zellen fixiert und für das REM präpariert. Für jeden Ansatz sind zwei Abbildungen mit unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt.

Die meisten UCB-ECFCs besaßen eine runde oder ovale Form mit einem Durchmesser von bis zu 30µm (Abbildung 44A, B). Die Oberfläche war mit einer Vielzahl von Vesikeln (Abbildung 44A, B, Doppelpfeile) und kurzen Mikrovilli bedeckt. Einige Zellen waren dagegen rund mit einem Zelldurchmesser von nur 10µm. In den meisten REM-Aufnahmen der UCB-ECFCs waren kleine Strukturen von unter einem Mikrometer auf der Zell- und Substratoberfläche zu erkennen. Unsere Analysen zeigten allerdings, dass als Ursprung dieser Strukturen eine Kontamination ausgeschlossen werden kann. Direkt nach der Kryokonservierung im xenofreien Medium ohne DMSO konnten ein Schrumpfen der Zellen und tiefe Löcher (Abbildung 44C, D, Pfeilspitzen), sowie Membranvesikel (Abbildung 44D, Doppelpfeile) festgestellt werden. Eine Zugabe von 2% DMSO resultierte in einer glatten, geschlossenen Zelloberfläche und verringerte die Anzeichen von Zellschädigungen, so dass nur wenige Membranvesikel (Abbildung 44E, Doppelpfeil), aber auch nahezu keine Mikrovilli sichtbar waren (Abbildung 44E, F, Pfeil). Die unebene, aber mikrovillifreie Oberfläche von UCB-ECFC, die mit 5% DMSO eingefroren wurden (Abbildung 44G, H), veränderte sich zu einer faltigen Oberfläche mit einzelnen Mikrovilli durch das Einfrieren mit 10% DMSO im proteinfreien Medium (Abbildung 44I, J, Pfeil) oder in FBS (Abbildung 44K, L, Pfeil). Eine Vesikelbildung war dabei in allen Ansätzen erkennbar (Doppelpfeile).

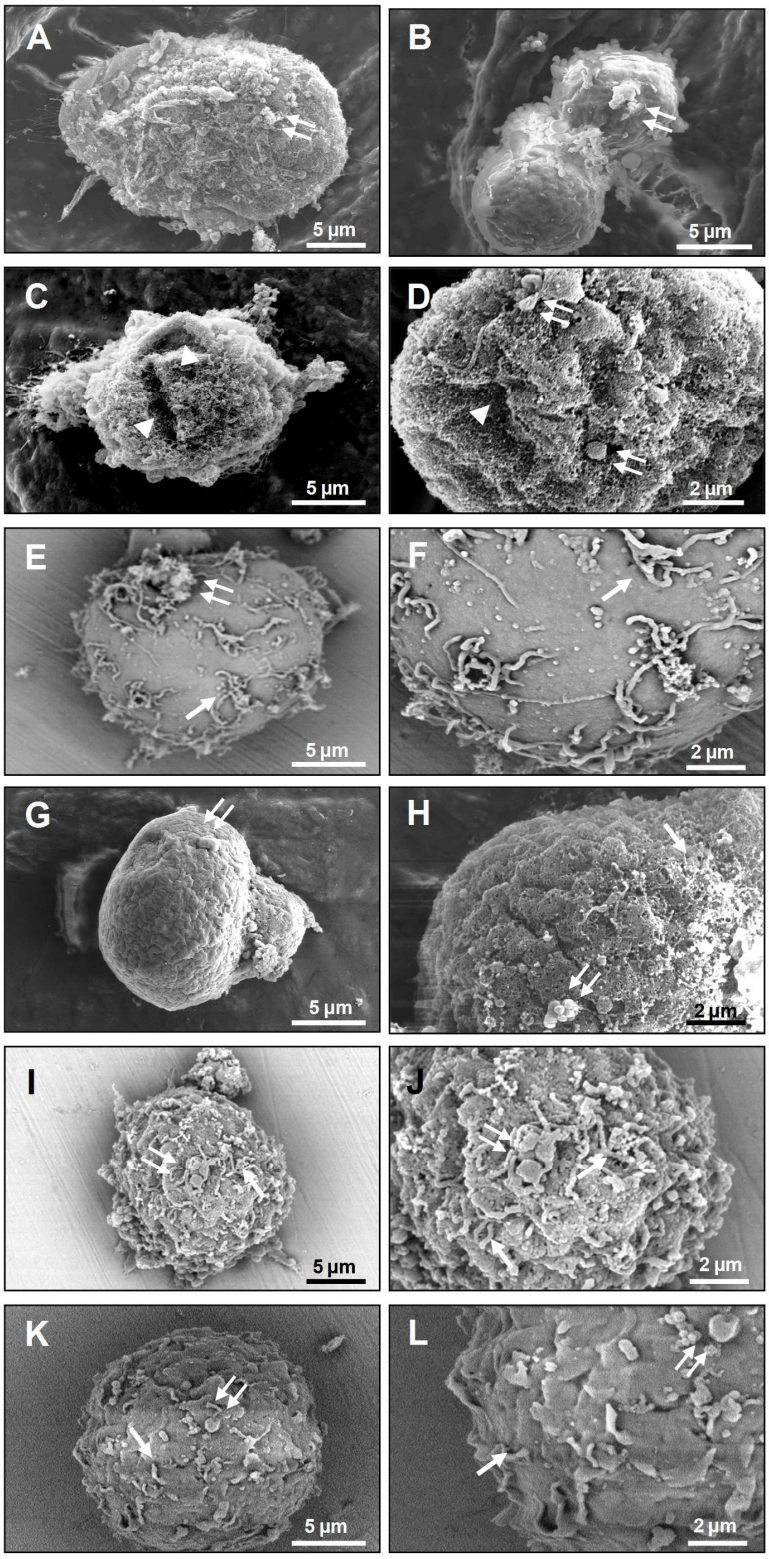


Abbildung 44: REM-Aufnahmen von UCB-ECFCs nach einer proteinfreien, chemisch vollständig definierten Kryokonservierung mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011).

REM-Aufnahmen von UCB-ECs vor (A, B) und nach der Kryokonservierung in proteinfreiem Medium ohne DMSO (C, D) und mit 2% (E, F), 5% (G, H) und 10% DMSO (I, J). Als Referenzmedium diente 90% FBS mit 10% DMSO (K, L). Die Zellen wurden mit 1°C/min von 4°C auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Nach einem schnellen Auftauen im Wasserbad wurden die Zellen fixiert und für das REM präpariert. Für jeden Ansatz sind zwei Abbildungen mit unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt.

AT-MSCs besaßen einen Durchmesser von 20-30µm, sie hatten eine runde oder ovale Form und ein faltiges Oberflächenrelief mit Mikrovilli (Abbildung 45A, B). Bei einigen wenigen Zellen waren Vesikel auf der Oberfläche zu erkennen (Abbildung 45B, Doppelpfeil). Die Kryokonservierung im proteinfreien Medium ohne DMSO veränderte deutlich die Zellmorphologie und führte zu Zellen mit einer Vielzahl an Vesikeln auf der Zelloberfläche (Abbildung 45D, Doppelpfeile) und kleinen Löchern in der Plasmamembran (Abbildung 45C, D, Pfeilspitzen). Bereits die Zugabe von 2% DMSO erzielte eine deutliche Verbesserung der Membranintegrität. Die Zellen waren dicht mit Mikrovilli bedeckt (Abbildung 45E, F, Pfeile), wobei auf einigen Zellen eine Vielzahl an Vesikeln zu erkennen war (Abbildung 45E, F, Doppelpfeile). Zwischen den proteinfreien Medien mit 5% und 10% DMSO bzw. FBS mit 10% DMSO waren nur geringe Unterschiede sichtbar. In jedem dieser Ansätze waren die Zellen dicht mit langen Mikrovilli besetzt, auch konnte das Auftreten langer, feiner Filamente beobachtet werden (Abbildung 45G-L, Pfeile). Nach der Kryokonservierung im proteinfreien Medium mit 10% DMSO waren einige geschrumpfte Zellen mit Furchen und Einbuchtungen auf der Zelloberfläche zu sehen (Abbildung 45J, kleines Kästchen).

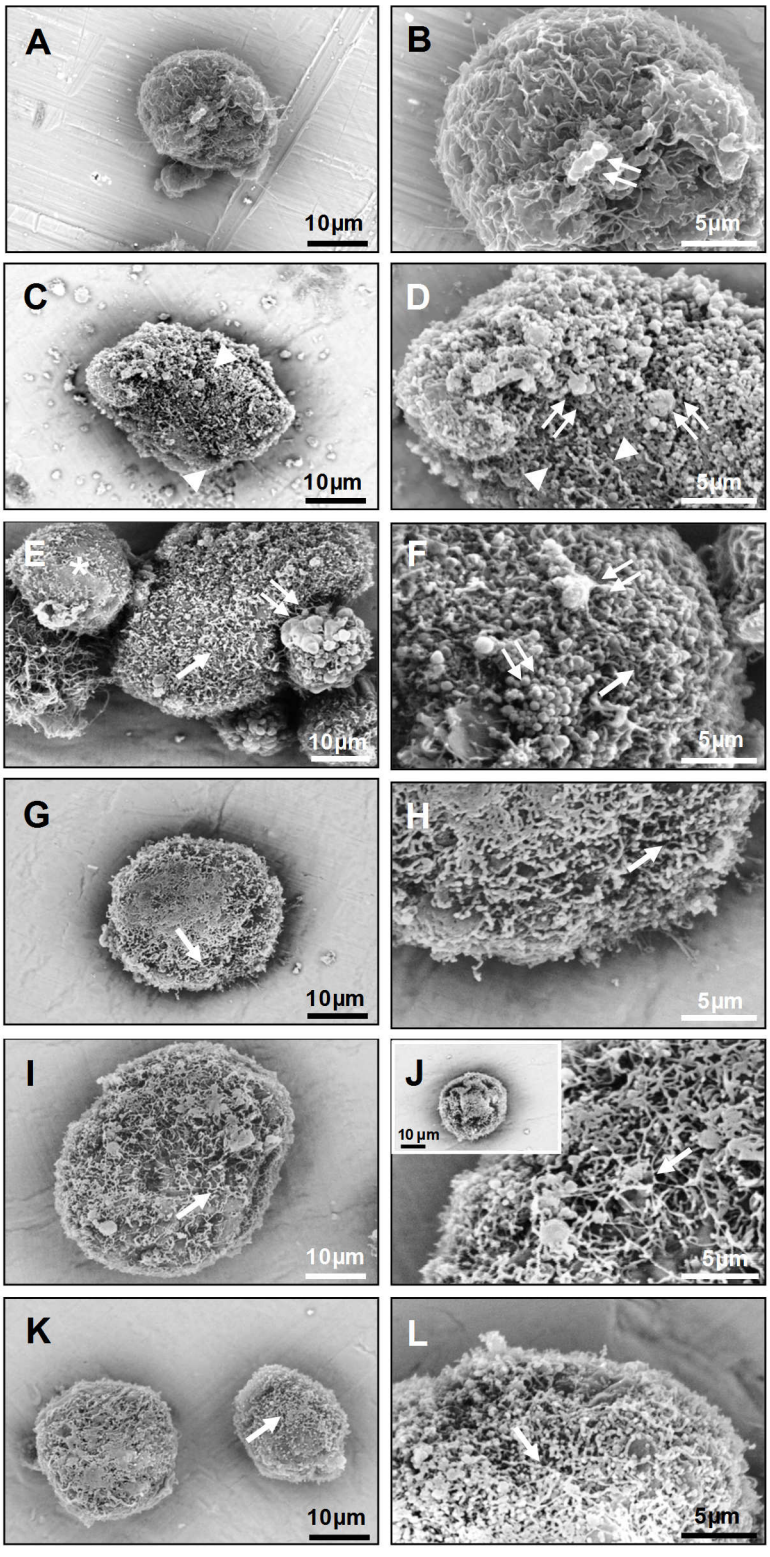


Abbildung 45: REM-Aufnahmen von AT-MSCs nach einer proteinfreien, chemisch vollständig definierten Kryokonservierung mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011).

REM-Aufnahmen von UCB-ECs vor (A, B) und nach der Kryokonservierung in proteinfreiem Medium ohne DMSO (C, D) und mit 2% (E, F), 5% (G, H) und 10% DMSO (I, J). Als Referenzmedium diente 90% FBS mit 10% DMSO (K, L) Die Zellen wurden mit 1°C/min von 4°C auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Nach einem schnellen Auftauen im Wasserbad wurden die Zellen fixiert und für das REM präpariert. Für jeden Ansatz sind zwei Abbildungen mit unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt.

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten, dass bereits durch die Zugabe einer geringen DMSO-Konzentration von 2% die Membranintegrität der Zellen nach dem Auftauen deutlich verbessert werden konnte. Doch für einen vollständigen Erhalt der Oberflächenstrukturen war, abhängig vom Zelltyp, mindestens eine DMSO-Konzentration von 5% notwendig. Diese Konzentration resultierte bei den UCB-ECs und AT-MSCs in optimalen Ergebnissen, während für UCB-ECFCs die beste Kryoprotektion durch die Verwendung von 10% DMSO erreicht zu werden schien. Zusätzlich konnten erneut nahezu keine Unterschiede zwischen dem proteinfreien Medium und der serumhaltigen Kontrolle festgestellt werden.

Nach der Etablierung von xenofreien, vollständig definierten Kryokonservierungsbedingungen mit sehr guten Vitalitäts- und Proliferationsergebnissen, wurden zusätzlich funktionale Studien durchgeführt, um das Differenzierungspotential der UCB-ECs (Abbildung 46A-C), UCB-ECFCs (Abbildung 46D-F) und AT-MSCs (Abbildung 46G-I) nach der Kryokonservierung im proteinfreien Medium mit 5% und 10% DMSO, sowie in FBS mit 10% DMSO zu untersuchen. Die UCB-ECs zeigten kaum Unterschiede in der *in vitro* Differenzierung zu Erythrozyten nach der Kryokonservierung in den drei Medien. Dies wurde durch eine gleichmäßige Größenabnahme und Hämoglobinanreicherung in Zytospinanalysen (Abbildung 46A) und quantitativ durch die Abnahme des Zellvolumens bestimmt (Abbildung 46B). Dabei verringerte sich das Volumen der Zellen, die in den unterschiedlichen Medien eingefroren wurden, einheitlich von 600fl auf 250fl. Die Bestimmung des Hämoglobingehalts nach der Kryokonservierung im proteinfreien Medium mit 5% DMSO ergab mit 5,49 ± 0,12 allerdings einen signifikant geringeren Hämoglobingehalt an Tag 7 als bei Zellen, die mit 10% DMSO in FBS (8,03 ± 0,15; $p<0,05$) oder mit 10% DMSO im proteinfreien Medium (8,35 ± 0,53; $p<0,05$; Abbildung 46C) eingefroren wurden. Die Volumenabnahme und die Hämoglobinakkumulation erreichten in diesen beiden Versuchsansätzen damit einen vergleichbaren Wert zu nicht eingefrorenen Zellen. Für UCB-ECFCs konnten weder quantitative Unterschiede in der Hochregulierung von ICAM-1 (Abbildung 46D) und E-Selectin (Abbildung 46E) nach TNF-α-Stimulation noch qualitative Unterschiede in der Kapillarbildung auf Matrigel (Abbildung 46F) bei den unterschiedlich eingefrorenen Zellen, unabhängig vom verwendeten Kryomedium, festgestellt werden. Für AT-MSC zeigten *in vitro* Differenzierungsstudien das große Spektrum des Differenzierungspotentials in Zellen mesodermalen Ursprungs nach der Kryokonservierung im proteinfreien Medium mit 10% DMSO. Die eingefrorenen Zellen besaßen die Fähigkeit, nach einer spezifischen Stimulation in Adipozyten (Abbildung 46G), Osteozyten (Abbildung 46H) und Chondrozyten (Abbildung 46I) zu differenzieren.

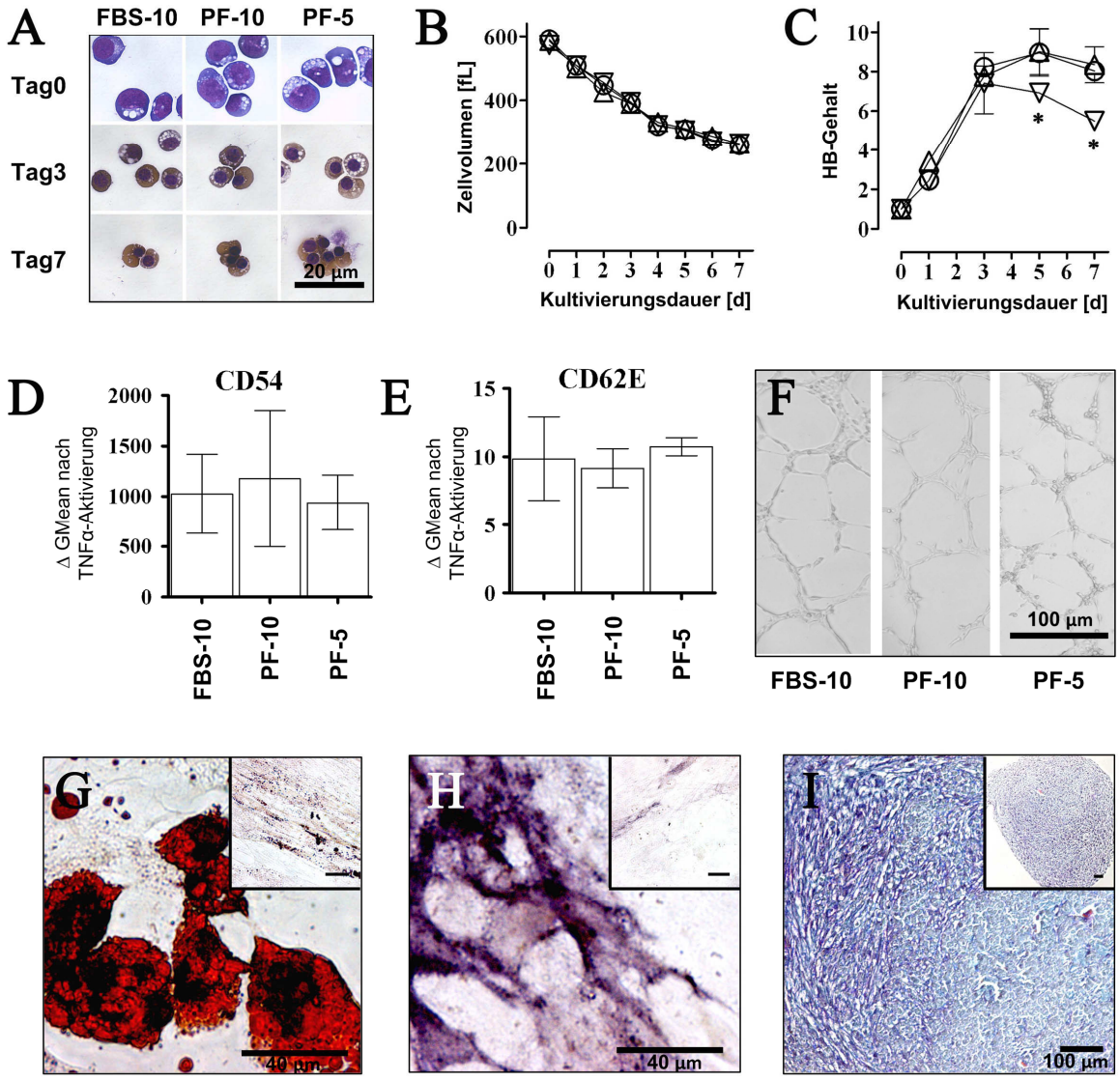


Abbildung 46: Funktionale Charakterisierung von UCB-ECs, UCB-ECFCs und AT-MSCs nach xenofreier, chemisch vollständig definierter Kryokonservierung mit 5% und 10% DMSO (Abbildung verändert aus Zeisberger et al., 2011).

*Funktionale Charakterisierung von UCB-ECs (A-C), UCB-ECFCs (D-F) und AT-MSCs (G-I) nach dem Einfrieren im proteinfreien Medium mit 5% (PF-5) oder 10% DMSO (PF-10), sowie in FBS mit 10% DMSO (FBS-10). Für UCB-ECs zeigten in vitro Differenzierungsstudien die Fähigkeit der Zellen, in Erythrozyten zu differenzieren. Dies wurde durch eine gleichmäßige Abnahme des Zellvolumens und eine Zunahme des Hämoglobingehaltes mit Hilfe von Zytospinanalysen (A, Maßstab entspricht 20µm), Größenmessungen mit einem CASY-Zellzählgerät (B) und einer kolorimetrischen Hämoglobinbestimmung (C) nachgewiesen. In (B) und (C) stellen Dreiecke die Werte für FBS mit 10% DMSO dar, Quadrate für das proteinfreie Medium mit 10% DMSO und Rauten für das proteinfreie Medium mit-5% DMSO (n=3, * enspricht p<0,05).*

Für UCB-ECFCs zeigte die Hochregulierung von ICAM-1/CD54 (D) und E-Selectin/CD62E (E) nach TNF-α-Stimulation sowie die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen auf Matrigel (F, Maßstab entspricht 100µm) die funktionalen Eigenschaften endothelialer Zellen nach der Kryokonservierung in den drei verschiedenen Kryomedien. Dabei ist die Isotypkontrolle in grau, unstimulierte Zellen als dickgedruckte und stimulierte als gestrichelte Linie dargestellt (n=3).

Für AT-MSCs bewiesen in vitro Differenzierungsstudien das Potential der Zellen, nach der Kryokonservierung in chemisch vollständig definiertem Medium mit 10% DMSO Adipozyten (G, Oil Red O Färbung, Maßstab entspricht 40µm), Osteozyten (H, BCIP-NBT-Nachweis, Maßstab entspricht 40µm) und Chondrozyten (I, PAS-und

Alzianblaufärbung, Maßstab entspricht 100µm) zu bilden. Die kleinen Kästchen zeigen die unstimulierte Kontrolle.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass eine proteinfreie, chemisch definierte Kryokonservierung von unterschiedlichen humanen, adulten Stamm- und Vorläuferzellen mit guten Vitalitäts- und Proliferationsergebnissen möglich ist, so dass vergleichbare Ergebnisse zum serumhaltigen Standardprotokoll erzielt werden können. Auch blieb das Differenzierungspotential der Zellen nach der Kryokonservierung erhalten. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduzierung der DMSO-Konzentration auf 5% nur einen geringen Effekt auf die Zellstruktur besitzt und somit zelltyp- und anwendungsspezifisch eingesetzt werden kann. Eine weitere Verringerung des DMSO-Gehaltes führte dagegen aufgrund von intrazellulärer und interzellulärer Eiskristallbildung zu signifikanten Membran- und Oberflächenschädigungen. Diese Resultate besitzen damit eine direkte Relevanz für die Übertragbarkeit auf Zell- und Biobanken und wurden deshalb in weiteren Untersuchungen in Hinblick auf Langzeitstabilität und Übertragbarkeit auf andere Zellsysteme evaluiert.

Langzeitstabilität einer xenofreien, chemisch definierten Kryokonservierung von erythroiden Vorläuferzellen

Das im vorherigen Kapitel untersuchte xenofreie, chemisch definierte Kryomedium erzielte vielversprechende Ergebnisse im Bezug auf Zellvitalität, –proliferation und den Erhalt der funktionalen Eigenschaften der Zellen nach einer kurzzeitigen kryogenen Lagerung. Da aber die meisten Zellsysteme, die in späteren therapeutischen Anwendungen genutzt werden sollen, für einen längeren Zeitraum in Biobanken gelagert werden, ist vor allem auch die Langzeitstabilität der verwendeten Kryoprotokolle entscheidend. Aus diesem Grund wurde in weiteren Untersuchungen die Auswirkung einer Langzeitlagerung im xenofreien, chemisch definierten Kryomedium auf humane Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut analysiert, da für dieses Zellmodell eine gute Revitalisierung nach langjähriger Lagerung kritisch ist. Dazu wurde das xenofreie Protokoll an elf Nabelschnurblutproben getestet und mittels vier verschiedener Analyseparameter nach einer Woche und nach einem Jahr Kryokonservierung evaluiert: i) Bestimmung der Lebendzellzahl klinisch relevanter CD34+-Zellen und der Gesamtzellzahl vor und nach der Kryokonservierung; ii) Analyse der Vitalität; iii). Bestimmung des multipotenten Differenzierungspotentials der Nabelschnurblutzellen mittels Analyse der koloniebildenden Zellen (CFUs) vor und nach dem Einfrieren; iv) Untersuchung der Proliferation von erythroiden Vorläuferzellen (EPCs) in gut charakterisierte Expansionskulturen vor und nach der Kryokonservierung (Mairhofer et al., 2011). Es wurden elf Nabelschnurbluteinheiten gewonnen, aus denen zunächst eine Vollblutprobe zur Bestimmung der CD34+-Zellzahl entnommen wurde. Die mononukleären Zellen (MNCs), ein Zellgemisch aus Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, u.a., in dem auch die therapeutisch relevanten CD34+-Zellen enthalten sind, wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert. Die Anzahl der CD34+-Zellen variierte stark in den Nabelschnurblutproben von unterschiedlichen Spendern (Tabelle 4). So lag die Gesamtzellzahl der CD34+-Zellen im Vollblut der Nabelschnurblutproben zwischen $5x10^5$ (Probe-Nr. 3) und $4x10^6$ Zellen (Probe-Nr. 6). Außerdem zeigte sich, dass der Anteil der CD34+-Zellen an den isolierten mononukleären Zellen mit 0,21% bis 1,18% ebenfalls sehr stark schwankte und insgesamt nur sehr gering war.

Tabelle 4: Bestimmung der Anzahl lebender CD34+-Zellen in Nabelschnur Vollblut und nach der Isolation und Lyse

Nabelschnurblut-probe	CD34+-Zellen im Vollblut	CD34+-Zellen nach MNC Isolation und Lyse	Effizienz der Isolation [%]	Anteil der CD34+-Zellen an MNCs [%]
1	2.299.743	1.219.459	53,03	0,91
2	2.112.500	747.289	35,37	0,54
3	483.366	275.760	57,05	0,21
4	2.068.953	684.563	33,09	0,36
5	867.606	460.189	53,04	0,69
6	4.131.444	2.112.542	51,13	0,60
7	694.284	572.074	82,40	0,66
8	3.521.574	1.270.201	36,07	0,73
9	2.659.751	1.181.334	44,42	0,50
10	3.228.722	2.091.795	64,79	1,18
11	2.730.120	1.575.010	57,69	0,79

Zusätzlich wurde festgestellt, dass bereits eine erhebliche Anzahl der CD34+-Zellen nach der Isolation der mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation und nach der Erythrozytenlyse verloren ging. So konnten nach der Isolierung zwischen 33,09% (Probe-Nr. 4) und 82,40% (Probe-Nr. 7) der CD34+-Zellen aus dem Vollblut erhalten werden, wobei neun von elf Proben eine Effizienz unter 60% aufwiesen.

Zur Kryokonservierung wurden die MNCs im xenofreien Kryomedium mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden mit 1 °C/min eingefroren und entweder für eine Woche oder ein Jahr gelagert. Als Referenz wurden nicht eingefrorene Zellen bezüglich der CD34-Expression, der Fähigkeit zur Koloniebildung und in Expansionskulturen untersucht. Die entsprechenden Experimente wurden auch mit den Zellen durchgeführt, die für eine Woche oder ein Jahr eingefroren waren. Zusätzlich wurde ermittelt, wie groß der Anteil lebender MNCs und CD34+-Zellen war, die nach der Kryokonservierung wiedergewonnen werden konnten. Dabei wurde festgestellt, dass die Zellen unabhängig von der Lagerdauer den Einfrierprozess sehr gut überstanden. So blieben nach einer Lagerung von einer Woche 94,85 ± 12,29% der MNCs und 89,90 ± 17,75% der CD34+-Zellen erhalten (Abbildung 47).

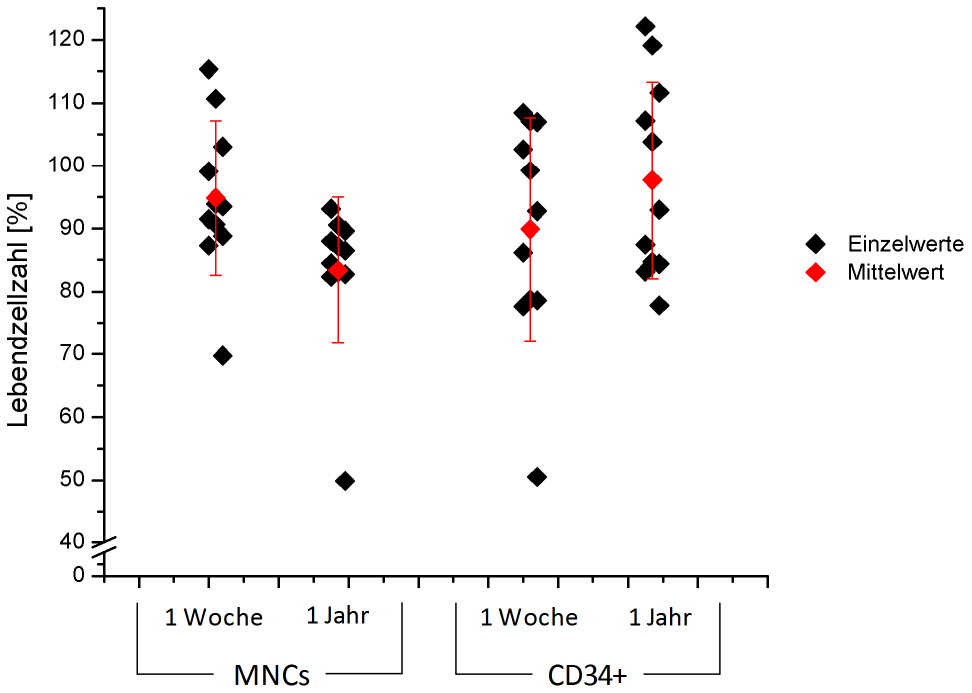


Abbildung 47: Anteil lebender MNCs und CD34+-Zellen, die nach einer Woche bzw. einem Jahr zurückgewonnen werden konnten.

Die Zellen wurden im xenofreien Kryomedium resuspendiert, mit 1°C/min eingefroren und für eine Woche bzw. ein Jahr in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Nach einem Jahr Lagerung konnte nur eine geringe Veränderung dieser Werte festgestellt werden. So lag der Anteil lebender MNCs und CD34+-Zellen, die wiedergewonnen werden konnten, im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl bei 83,40 ± 11,63% bzw. 97,65 ± 15,67% (Abbildung 47). Die Unterschiede in der MNC- und CD34+-Zellzahl vor der Kryokonservierung und nach einer einwöchigen oder einjährigen Lagerung waren damit für die meisten Proben nur gering, so dass eine effiziente, xenofreie Langzeitlagerung von MNCs und CD34+-Zellen realisierbar erscheint.

Zusätzlich zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde auch die Fähigkeit zur Koloniebildung (CFUs) vor und nach der Kryokonservierung im xenofreien Kryomedium untersucht (Abbildung 48).

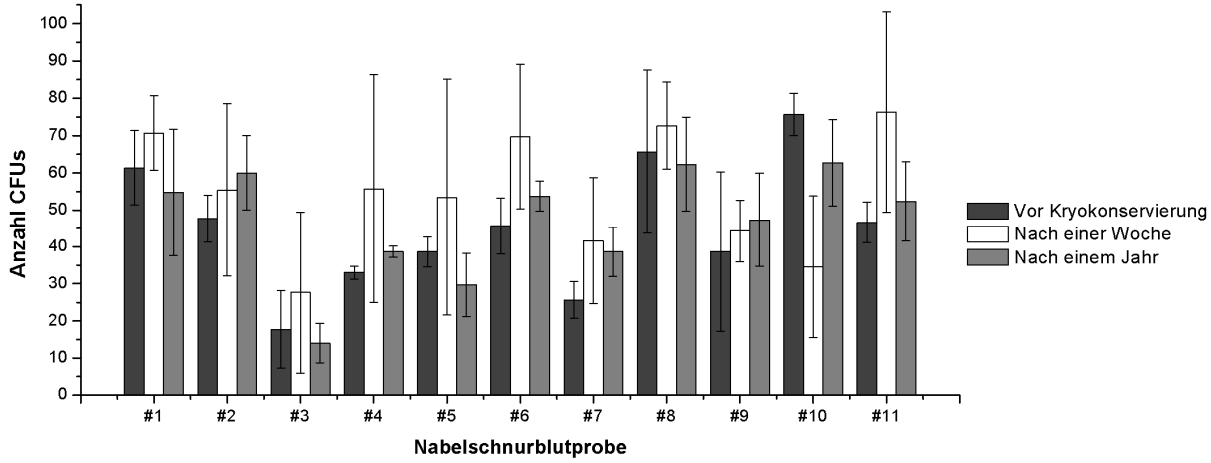


Abbildung 48: Anzahl der CFUs vor der Kryokonservierung, nach einer Woche und einem Jahr kryogener Lagerung.

20000 mononukleäre Zellen pro Ansatz wurden dazu in Dreifachansätzen ausgesät, nach 14 Tagen Kultivierung wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien mikroskopisch bestimmt.

Um die CFU-Anzahl zu ermitteln wurde ein semisolides Methylzellulosemedium verwendet, das das Wachstum der Zellen in Kolonien unterstützt. Nach einer 14-tägigen Kultivierung wurde die Anzahl der CFUs bestimmt. Nach einer Woche Kryokonservierung zeigten 10 von 11 ein höheres und 1 von 11 (Probe-Nr. 10) eine verringertes Potential zur CFU-Bildung im Vergleich zur Situation vor dem Einfrieren. Die Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung nach einem Jahr Lagerung war nahezu identisch mit den Ergebnissen vor der Kryokonservierung. So ergab sich für 6 von 11 Proben ein höheres, für 2 von 11 ein vergleichbares (Probe-Nr. 3 und 8) und für 3 von 11 ein leicht geringeres Potential zur Koloniebildung (Probe-Nr. 1, 5 und 10). Die geringen Unterschiede lassen sich durch Fehleranfälligkeit dieser Methode erklären. So können geringe Abweichungen beim Ansatz der CFUs zu deutlichen Abweichungen nach 14-tägiger Kultur führen. Daher kann man insgesamt feststellen, dass auch das multipotente Differenzierungspotential der Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut sehr gut nach einer einwöchigen oder einjährigen, xenofreien Kryokonservierung erhalten wurde.

Schließlich wurde ebenfalls untersucht, ob die kurzzeitige oder langfristige Kryokonservierung die Expansion von erythroiden Vorläuferzellen (EPC) beeinflusst. Dazu wurden Kulturen zur Vermehrung von EPCs aus nicht eingefrorenen und kryokonservierten Proben angelegt. Die Expansion der EPC war erfolgreich für alle Proben (Nabelschnurblutprobe 1 bis 11) und zu jedem Zeitpunkt (Referenz, eine Woche, ein Jahr) mit einem Ergebnis von $2x10^7$ bis $14x10^7$ Zellen ausgehend von jeweils 10^7 MNCs. Nach der Kryokonservierung zeigte sich allerdings in fast allen Proben eine Reduktion des Expansionserfolgs der EPCs um durchschnittlich 41,27 ± 20,11% im Vergleich zur nicht eingefrorenen Referenzkultur, unabhängig von der Lagerungsdauer (Abbildung 49). Nach einer Woche kryogener Lagerung wurde in 9 von 11 Proben eine Abnahme des Proliferationspotentials festgestellt, nach einem Jahr in 10 von 11 Proben. Im Gegensatz dazu stieg das Kultivierungsergebnis in den Proben 6 und 8 nach einer Woche und in der Probe 8 nach einem Jahr kryogener Lagerung auf 133,83% und 133,50% nach einer Woche bzw. auf 230,00% nach einem Jahr an. Insgesamt schien die Expansion nach einer 14-tägigen Kultivierung von kryokonservierten Zellen reduziert zu sein, unabhängig von der Lagerungsdauer.

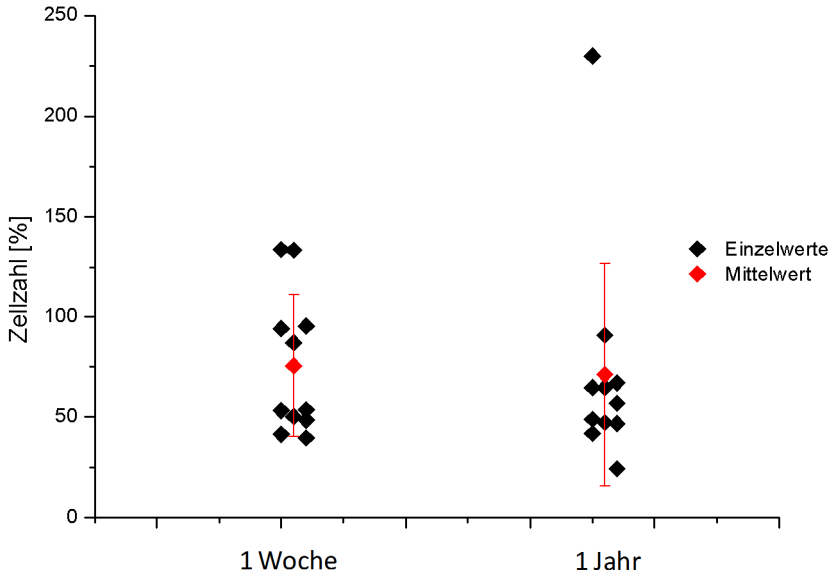


Abbildung 49: Expansion von EPCs nach der Kryokonservierung für eine Woche oder ein Jahr.

Nach der Kryokonservierung von MSCs im proteinfreien Kryomedium mit 10% DMSO für eine Woche oder ein Jahr wurden Expansionskulturen von EPCs angelegt. Nach einer 14-tägigen Kultivierung wurde die Zellzahl bestimmt und als Prozentsatz der Zellzahl, die in den nicht eingefrorenen Referenzproben erreicht wurde, dargestellt.

Um zu zeigen, dass der Phänotyp der expandierten Zellen nicht durch die Kryokonservierung beeinflusst wurde, wurden die Zellen an Tag 14 mittels durchflusszytometrische Analyse der charakteristischen erythroiden Marker CD71, CD36, GlycophorinA (CD235a) und c-Kit (CD117) (Abbildung 50A) untersucht. Hier war deutlich erkennbar, dass die für eine Woche und ein Jahr kryokonservierten EPCs an Tag 14 nicht von der Referenzprobe unterscheidbar sind. Alle Kulturen zeigten eine starke Expression von CD71 und CD36. Im Gegensatz dazu ergab die Analyse von GlycophorinA (CD235a) ein sehr inhomogenes Ergebnis mit Zellen, die CD235a unterschiedlich stark exprimierten, aber auch einem deutlichen Anteil an Zellen ohne diesen Marker. Die Expression des c-Kit Rezeptors CD117, eines typischen Stammzellmarkers, war in allen untersuchten erythroiden Zellen vergleichbar gering. Zusätzlich wurde die Homogenität der Kulturen überprüft, indem die Zellen auf spezifische Marker anderer Blutzelltypen getestet wurden (Abbildung 50B). Die Untersuchungen ergaben eine starke Expression des Leukozytenantigens CD45. Die Kulturen waren aber nicht durch andere Blutzellpopulationen verunreinigt, was durch die fehlende Detektion der dafür spezifischen Marker bestätigt wurde.

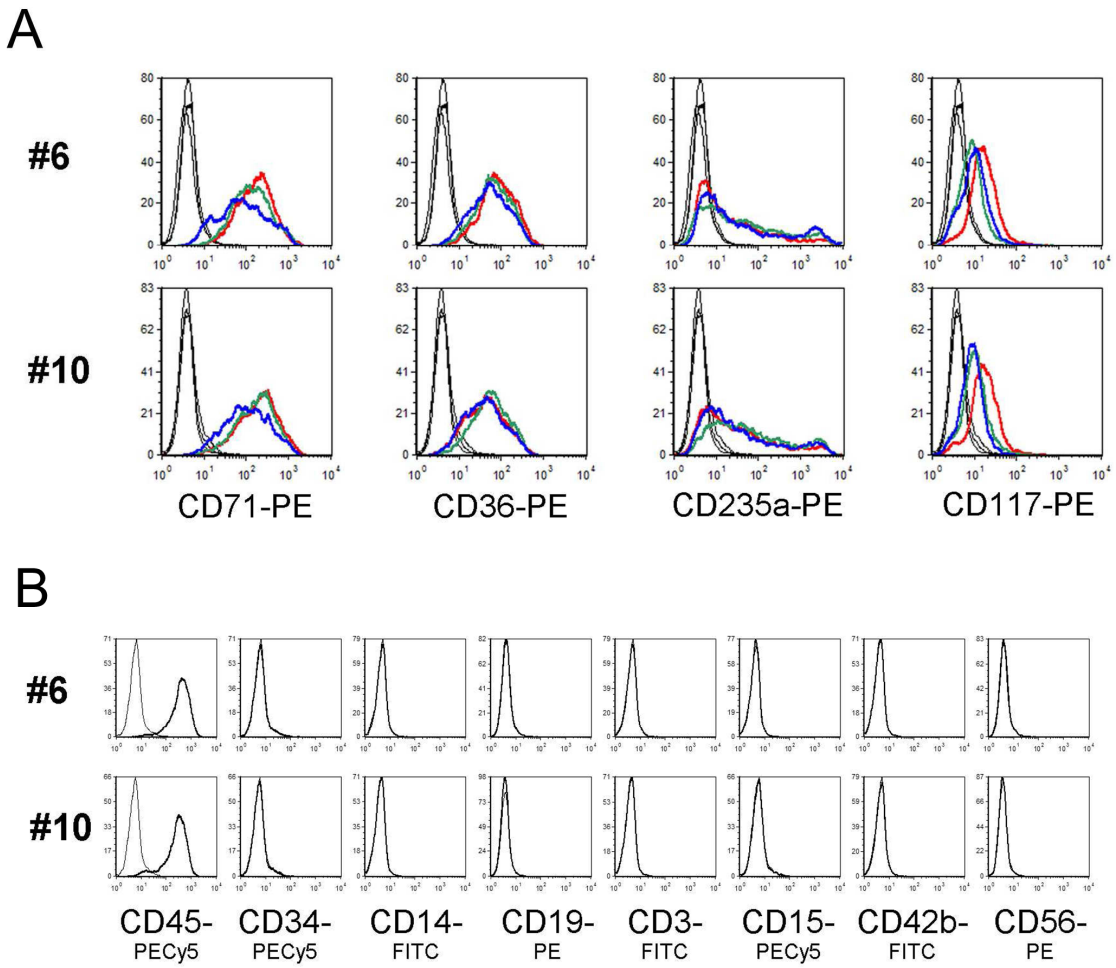


Abbildung 50: Repräsentative Untersuchung des Phänotyps von expandierten EPCs aus nicht eingefrorenen Referenzkulturen und aus MNCs, die für eine Woche oder ein Jahr im xenofreien Kryomedium mit 10% DMSO eingefroren waren (Abbildung verändert aus Mairhofer et al., 2011).

(A) Durchflusszytometrische Analyse der zelltypspezifischen Marker CD71, CD36, GlycophorinA (CD235a) und c-Kit (CD117) an zwei repräsentativen EPC-Kulturen (Probe-Nr. 6 und 10) nach einer 14-tägigen Expansion aus nicht eingefroren MNCs und aus MNCs, die für eine Woche oder ein Jahr im xenofreien Kryomedium mit 10% DMSO eingefroren waren. (B) Nachweis der Kulturhomogenität durch Ausschluss anderer Blutzelltypen mittels Durchflusszytometrie.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse daher, dass eine Langzeitlagerung von Zellen aus dem Nabelschnurblut unter xenofreien Bedingungen mit einer effizienten Wiedergewinnung von lebenden CD34+-Zellen und MNCs möglich ist. Zusätzlich wurde das multipotente Differenzierungspotential der Stamm- und Vorläuferzellen, das mittels CFU-Assays analysiert wurde, durch die unterschiedlich lange, kryogene Lagerung nicht beeinflusst. Das Expansionspotential der EPCs war in allen kryokonservierten Proben reduziert, wobei hier auch kein negativer Effekt durch die Langzeitlagerung festgestellt werden konnte.

Das hier vorgestellte Kryoprotokoll ermöglicht dadurch eine verlässliche und effiziente Lagerung von Zellen für therapeutische Anwendungen in Biobanken. Die komplette Vermeidung tierischer Bestandteile im Kyomedium einhergehend mit einem nahezu vollständigen Erhalt der Lebendzellzahl und Zellfunktionalität selbst nach einer langen Lagerungsdauer erhöht deutlich die Reproduzierbarkeit und Stabilität des Kryokonservierungsprozesses. Dies ermöglicht eine verbesserte Standardisierung der Abläufe in Biobanken.

Materialwissenschaftliche Untersuchungen zur Entwicklung eines neuen Kryosubstrates, das an die Anforderungen moderner Biobanken adaptiert wurde

Die sichere Ablage von therapeutisch relevanten Zellen in Biobanken bedarf neben der Entwicklung xenofreier und effizienter, zelltypspezifischer Kryoprotokolle auch der Verbesserung der Lagertechnologie, da die aktuellen Arbeitsabläufen aus vielen fehleranfälligen Einzelschritten bestehen. Dabei unterliegen Zellen für eine medizinische Verwendung strengen Bestimmungen in Hinblick auf die Standardisierung der Vorgänge. Aus diesem Grund sind vor allem eine intakte Kühlkette während des Probentransports sowie ein robustes System zur Probenidentifikation und Dokumentation erforderlich.

Zudem ist die Infrastruktur moderner Biobanken sehr anspruchsvoll. Gemeinschaftliche Forschung basiert auf einem weltweiten Probenaustausch und auf der Vergleichbarkeit von Ergebnissen. Dies stellt hohe Anforderungen an die Qualitätssicherung und Dokumentation von wertvollen Proben. Standardisierung und optimierter Datenaustausch während der Sammlung und Lagerung von biologischem Material sind daher der Schlüssel für aktuelle Forschungsprojekte und Biobanken. Biobanken sollten daher nicht nur die Möglichkeit bieten, viele Proben bei kryogenen Temperaturen zu lagern, sondern auch eine 100%ige Identifikation und Nachverfolgung der Proben garantieren. Aus diesem Grund wurden innerhalb dieser Arbeit neue elektronische Kryoröhrchen, die an Flash-Speicherkarten gekoppelt sind, entwickelt, so dass ein redundanter und transportabler Datensatz an jeder Probe verfügbar ist. Diese neue Technologie ermöglicht die Ablage von sensiblen Informationen, wie zum Beispiel Patientendaten, Probenursprung oder Bearbeitungsschritte, verbunden mit der relevanten Probe. Die Probendaten können direkt im Tiefkalten ausgelesen werden, so dass zusätzlich eine komplette Inventarisierung durchgeführt werden kann, ohne die Proben auftauen zu müssen.

In dieser Arbeit wurde das Design für diese Kryoröhrchen mitentwickelt. Dazu wurden unterschiedliche Materialien für ein neues Kryoröhrchen im Hinblick auf Kryostabilität und Biokompatibilität getestet. In Kapitel 4.2.2 wurde schließlich auch die Kryokonservierungseffizienz in den innovativen Kryosubstraten mit den Standardröhrchen verglichen.

Dazu wurden zunächst Materialtests durchgeführt, um den hohen Anforderungen an ein Kryosubstrat gerecht zu werden. Voraussetzung für die Eignung eines Materials für die Kryokonservierung von biologischen Proben ist die Zulassung des Materials für medizinische Anwendungen, die

Stabilität des Materials bei extremen Temperaturschwankungen und gegen relevante Lösungsmittel (z.B. DMSO). Zusätzlich ist die Biokompatibilität des Materials von großer Bedeutung. Daher wurde der Fokus auf folgende vier Kandidaten für die Herstellung eines Kyosubstrates gelegt: i) Polyethylen hoher Dichte (HDPE), das bereits in der Kryokonservierung verwendet wird, ii) Makrolon, das schon von der Medizinindustrie verwendet wird, iii) Polypropylen (PP), das für kommerzielle Kryoröhrchen verwendet wird und iv) Polymethylpenten (TPX).

Da in der Kryokonservierung Dimethylsulfoxid (DMSO) immer noch das gebräuchlichste Kryoprotektiv ist, muss das Material, aus dem ein Kryosubstrat besteht, chemisch absolut unempfindlich gegenüber DMSO sein. Sollte das Material eines Kryosubstrates mit DMSO reagieren, könnten giftige Substanzen, wie zum Beispiel Farbstoffe oder Nebenprodukte aus der Produktion, aus dem Material herausgelöst werden und die zu kryokonservierende Zellsuspension verunreinigen. Daher wurden Kryoröhrchen aus den Materialien für 24 Stunden bei 37°C in reinem DMSO inkubiert und anschließend auf optische Veränderungen hin untersucht.

Der DMSO Stabilitätstest zeigte bei Makrolon starke Veränderungen. Es konnten Risse im Material sowie eine Trübung des Röhrchens und der DMSO-Lösung festgestellt werden, da sich Substanzen aus dem Material herausgelöst haben (Abbildung 51).

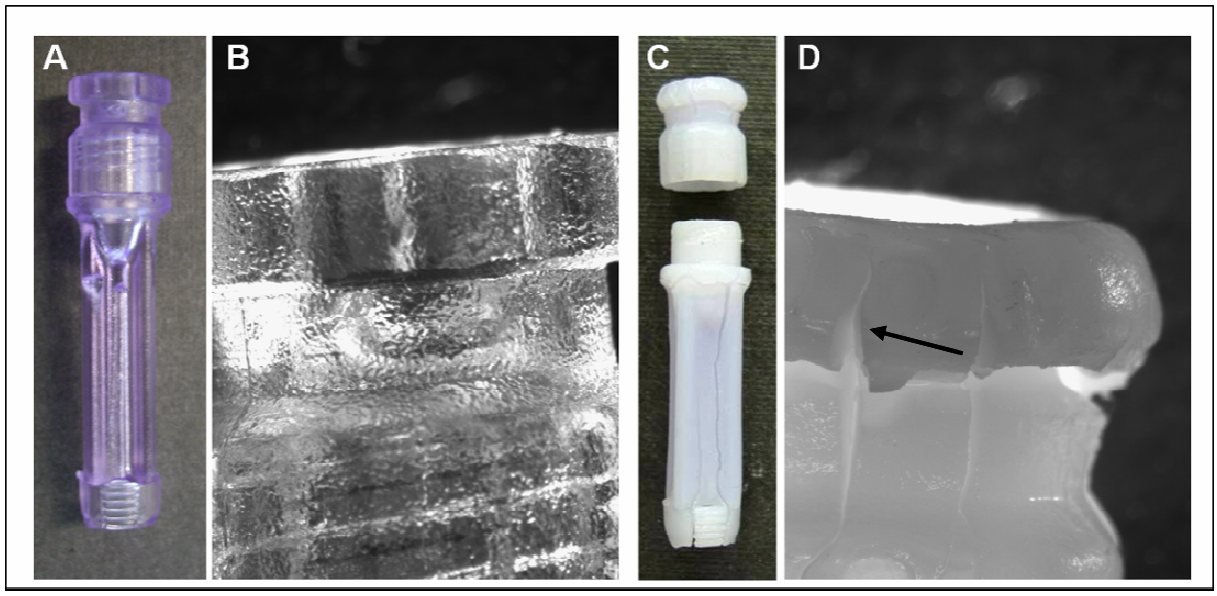


Abbildung 51: Einfluss von DMSO auf ein Kryosubstrat aus Makrolon.

Dargestellt ist ein Substrat vor (A, B) und nach der Inkubation in DMSO (C, D). Es konnten starke Veränderungen des Materials festgestellt werden. So wurde das Substrat fast komplett entfärbt, es zeigten sich Risse im Röhrchen (Pfeil) und es kam zu einer starken Trübung des Materials.

Nach diesem Test konnte Makrolon als Kunststoff für ein Kryosubstrat ausgeschlossen werden. Es wurde aber zur Vergleichbarkeit mit den restlichen Materialien in den weiteren Untersuchungen mit eingeschlossen.

Bei der Kryokonservierung sind die Materialien, aus dem das Kryosubstrat besteht, enormen Belastungen ausgesetzt. Zum einen muss das Material das Abkühlen auf bis zu -196 °C überstehen, zum anderen muss das Kryosubstrat beim Auftauprozess extremen thermischen Schwankungen standhalten. Dabei wird eine Probe von -160°C in nur zwei Minuten auf 37°C im Wasserbad aufgewärmt. Dies entspricht einer Auftaugeschwindigkeit von 98,5 °C/min.

Die Stabilität der Substrate aus PP, HDPE und TPX auf diese thermischen Schwankungen wurde getestet, indem sie mit Hilfe eines Roboters zehn- bis zwanzigmal abwechselnd in flüssigen Stickstoff und in 80°C warmes Wasser getaucht wurden.

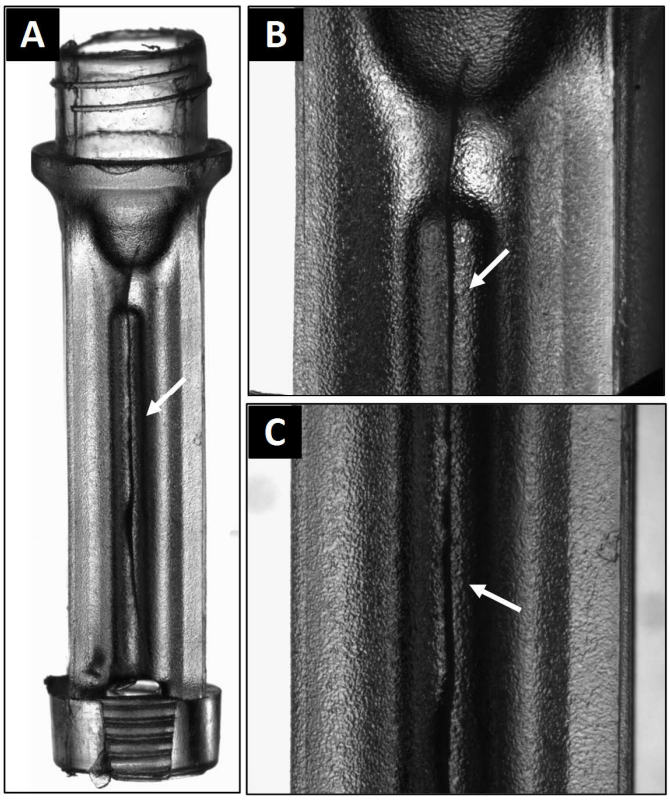


Abbildung 52: Kryosubstrat aus TPX nach 10- bis 20-fachem Abkühlen auf -196°C und Erwärmen auf 80°C.

(A) Übersichtsaufnahme des Kryosubstrats; (B, C) Teilabschnitte; Die Kryosubstrate wurden mit einem Roboterarm einem Dauerstresstest unterzogen, indem sie 10- bis 20-mal abwechselnd in flüssigen Stickstoff und in ein 80°C warmes Wasserbad getaucht wurden. Dabei waren im Kryosubstrat aus TPX deutliche Risse im Material erkennbar (A-C, Pfeile).

Diese Untersuchungen ergaben, dass bei den Substraten aus TPX Risse in den Kryosubstraten am Probenbehälter entstanden (Abbildung 52A-C, Pfeile). Die Substrate aus Polyethylen hoher Dichte und aus Polypropylen hingegen zeigten keine Beeinträchtigungen.

Als Ergebnis dieser Tests wurde TPX als geeignetes Material für die Entwicklung eines neuen Kryosubstrates ausgeschlossen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Materialtests für die Entwicklung eines neuen Kryosubstrates. Die Substrate bestanden aus HDPE, Makrolon, PP und TPX.

Material	DMSO Stabilität	Stabilität bei kryogenen Temperaturen
HDPE	+	+
Makrolon	-	+
PP	+	+
TPX	+	-

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Materialtests zeigten, dass Makrolon anfällig gegenüber DMSO ist und TPX den starken Temperaturschwankungen bei der Kryokonservierung nicht standhält (Tabelle 5). Daher waren nur PP und HDPE als Material für ein neues Kryosubstrat geeignet. Schließlich wurde aus PP ein Kryosubstrat mit unterschiedlichen Volumina (100µl, 500µl, 2ml) entwickelt, da dieses Material härter und teilweise lichtdurchlässig ist. So wurde eine verwechslungssichere Ablage der Proben zusammen mit den dazugehörigen Probeninformationen ermöglicht.

Die hier entwickelten Kryosubstrate sind Bestandteil einer innovativen Lagertechnologie für eine dokumentierte und verlässliche Lagerung der Zellen. Dabei garantieren vier voneinander unabhängige Systeme eine sichere Identifikation und Zuordnung der Proben: i) das Substrat kann äquivalent zu kommerziellen Kryoröhrchen per Hand beschriftet werden; ii) ein zweidimensionaler Barcode kann auf das Substrat aufgebracht werden; iii) in den Hauptteil des Substrates kann ein RFID-Chip (radio frequency identification tag) eingebracht werden und iv) identifiziert ebenfalls der im Substrathauptteil befindliche Speicherchip die Probe (Abbildung 53). Beide Chips werden während der Produktion in das Substrat eingespritzt, so dass diese auch nicht während des Transportes oder Einfrierprozess verloren gehen können.

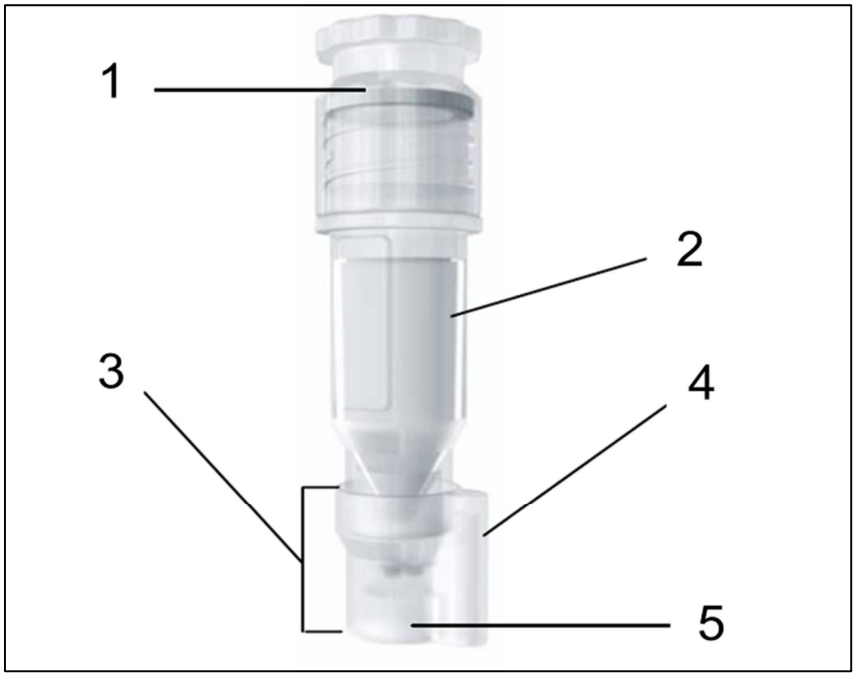


Abbildung 53: Aufbau des 2ml Kryosubstrats aus PP, hergestellt im Spritzgussverfahren (Abbildung aus Ihmig et al., 2009).

Das Röhrchen besteht aus dem Probenbehälter (2) mit Schraubdeckel (1) und einem Fuß (3), der den RFID-Chip (4) und den seriellen Flash-Speicherchip (5) als transportables Datenarchiv enthält. Durchmesser: 15 mm, Höhe: 56 mm.

Damit der Vorteil dieser neuen Lagertechnologie auch für herkömmliche Kryovials und ältere Probenbestände genutzt werden kann, wurde zusätzlich ein Adapter für kommerzielle Kryoröhrchen entwickelt. Dieser kann einfach selbst um bereits eingefrorene Röhrchen befestigt werden und stattet die Röhrchen damit ebenfalls mit allen beschriebenen Identifikationsmerkmalen aus.

Der Fuß des Substrats und des Adapters wurde so konzipiert, dass damit das Röhrchen zusätzlich in speziellen Lagerboxen eingesteckt werden kann, so dass eine Verbindung zur Trägerplatte und damit zu der elektronischen Kryotank-Infrastruktur besteht (Abbildung 54).

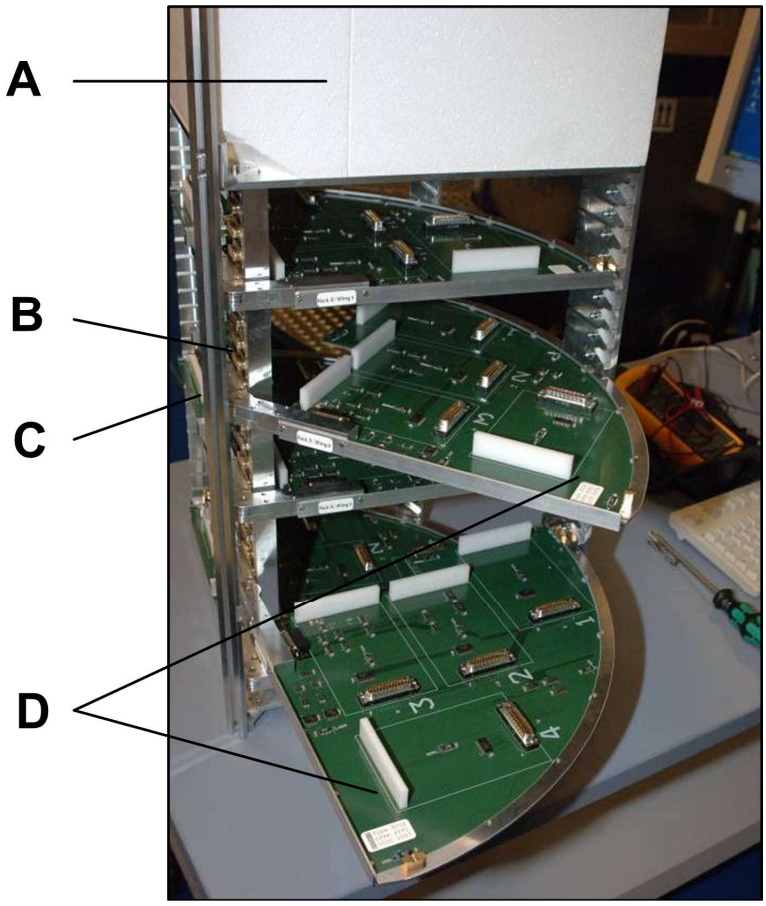


Abbildung 54: Aufbau der elektronischen Kryotank-Infrastruktur

(A) Thermische Isolation des Lagersystems; (B) Elektrischer Anschlussstecker zur externen Steuereinheit; (C) Rückwandplatine mit Mikrokontroller; (D) Modulare Lagerebenen; (E)Verbindungsstecker der Trägerplatte zur Kryotank-Infrastruktur.

Im Tank befinden sich vier jeweils mit einer Rückwandplatine ausgestattete Lagersysteme. Dieser Aufbau ermöglicht die Lokalisation der Proben während der kryogenen Lagerung und auch einen Datenzugriff im eingefrorenen Zustand (Shirley et al., 2009).

Die hier beschriebene Lagertechnologie bestehend aus elektronischen Kryoröhrchen in Verbindung mit einer innovativen Kryotank-Infrastruktur ermöglicht somit eine verwechslungssichere Lagerung und den Versand von sensiblen Proben in modernen Biobanken sowie eine komplette Inventarisierung und Aktualisierung des bereits bestehenden Probenbestands.

Alle hier verwendeten Materialien besitzen eine Zulassung für medizinische Anwendungen. Dennoch könnte es zu Verunreinigungen der Materialien während der Produktion der Substrate kommen. Dies macht die erneute Überprüfung der Biokompatibilität der Kryosubstrate erforderlich, weshalb in Kapitel 4.2.3 die Effekte einer Kryokonservierung in den neu entwickelten Kryosubstraten auf die Vitalität und Funktionalität von Immunzellen aus dem peripheren Blut untersucht wurden.

5.2 Übertragung spezifischer Kryoprozeduren und –workflows auf Zellen des Immunsystems

Nachdem die hier vorgestellten Kryoprozeduren für eine xenofreie und effiziente Lagerung von humanen adulten und embryonalen Stammzellen erarbeitet wurden, wurde aufbauend auf diesen Ergebnissen die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf ein weiteres Zellmodell untersucht und statistisch durch die Durchführung von Untersuchungen an mindestens 10 Blutproben abgesichert. Zellen aus dem peripheren Blut stellen ein wichtiges Werkzeug für die Entwicklung neuer Impfstoffe und für die Untersuchung von Krankheiten, die die zelluläre Immunität beeinflussen, dar. Auch werden Blutproben von Patienten für retrospektive und epidemiologische Untersuchungen für mehrere Jahre gelagert. Dabei ist vor allem der Erhalt der antigenspezifischen T-Zell-Funktionalität von großer Bedeutung, da diese Aussagen über die Effizienz von Impfstoffen und über Veränderungen des Immunsystems während eines Krankheitsverlaufs ermöglichen. Allerdings beeinflussen suboptimale Kryokonservierungsprotokolle die T-Zellantwort und verhindern damit reproduzierbare Analysen eingefrorener Zellen.

Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel, basierend auf den bisherigen Erkenntnissen, Kryoprozeduren im Hinblick auf schädigende Einflüsse auf die Zellvitalität, -funktionalität und Lebendzellzahl von Zellen des Immunsystems statistisch untersucht. Ziel war es dabei, eine Reduktion der zytotoxischen DMSO-Konzentration und eine Erhöhung der Prozessstabilität und –reproduzierbarkeit durch die Vermeidung von xenogenen Substanzen, auch nach einer Langzeitlagerung, zu erreichen. Schließlich wurden die neu entwickelten Kryoröhrchen unter Verwendung der in diesem Kapitel etablierten, xenofreien Kryoprozedur evaluiert, um somit eine sichere und dokumentierbare Ablage der Zellen in Biobanken zu ermöglichen.

5.2.1 Untersuchungen zur Substitution der Serumbestandteile des Kryomediums

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) besitzen, im Gegensatz zu humanen Stammzellen, eine geringere Relevanz für eine therapeutische Anwendung. Doch T-Zell-basierte Nachweismethoden bilden aufgrund ihrer antigenspezifischen Reaktivität das Fundament der Impfstoffforschung und einen wichtigen Bestandteil von epidemiologischen Studien. Allerdings kann der Einfrierprozess eine Auswirkung auf dieses sensible Zellsystem besitzen. Vor allem die Verwendung von FBS im Kryomedium, einem Naturprodukt, das eine undefinierte Mischung aus Wachstumsfaktoren und Zytokinen enthält, beeinflusst das Ergebnis der Funktionalitätsanalysen und verhindert eine Standardisierung der Auswertung. Zusätzlich unterliegt FBS strikten Importbeschränkungen und somit ist ein weltweiter Probenaustausch in Multicenter-Studien deutlich erschwert. Daher wird in diesem Abschnitt die Möglichkeit evaluiert, den Serumanteil des Kryomediums durch das definierte bovine Serumalbumin Fraktion V (BSA) zu ersetzen und damit eine erhöhte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Verfügbarkeit des Probenmaterials zu erreichen. Zusätzlich wurde auch bei diesem Zellsystem versucht, die DMSO-Konzentration durch die Zugabe eines extrazellulären Kryoprotektivs, der Hydroxyethylstärke (HES), zu reduzieren.

Dazu wurden PBMCs von zehn verschiedenen Blutspendern, die positiv auf Antikörper gegen das Cytomegalievirus (CMV seropositiv) getestet wurden, isoliert. Die Zellen wurden anschließend in einem BSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO, in einem BSA-basierten Medium mit HES und 5%

DMSO und zur Kontrolle in 90% FBS mit 10% DMSO eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen im 37°C warmen Wasserbad wurden der Anteil lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl (Abbildung 55A, C) und die Vitalität (Abbildung 55B, D) direkt nach dem Auftauen (Abbildung 55A, B) sowie nach 24 Stunden (Abbildung 55C) analysiert.

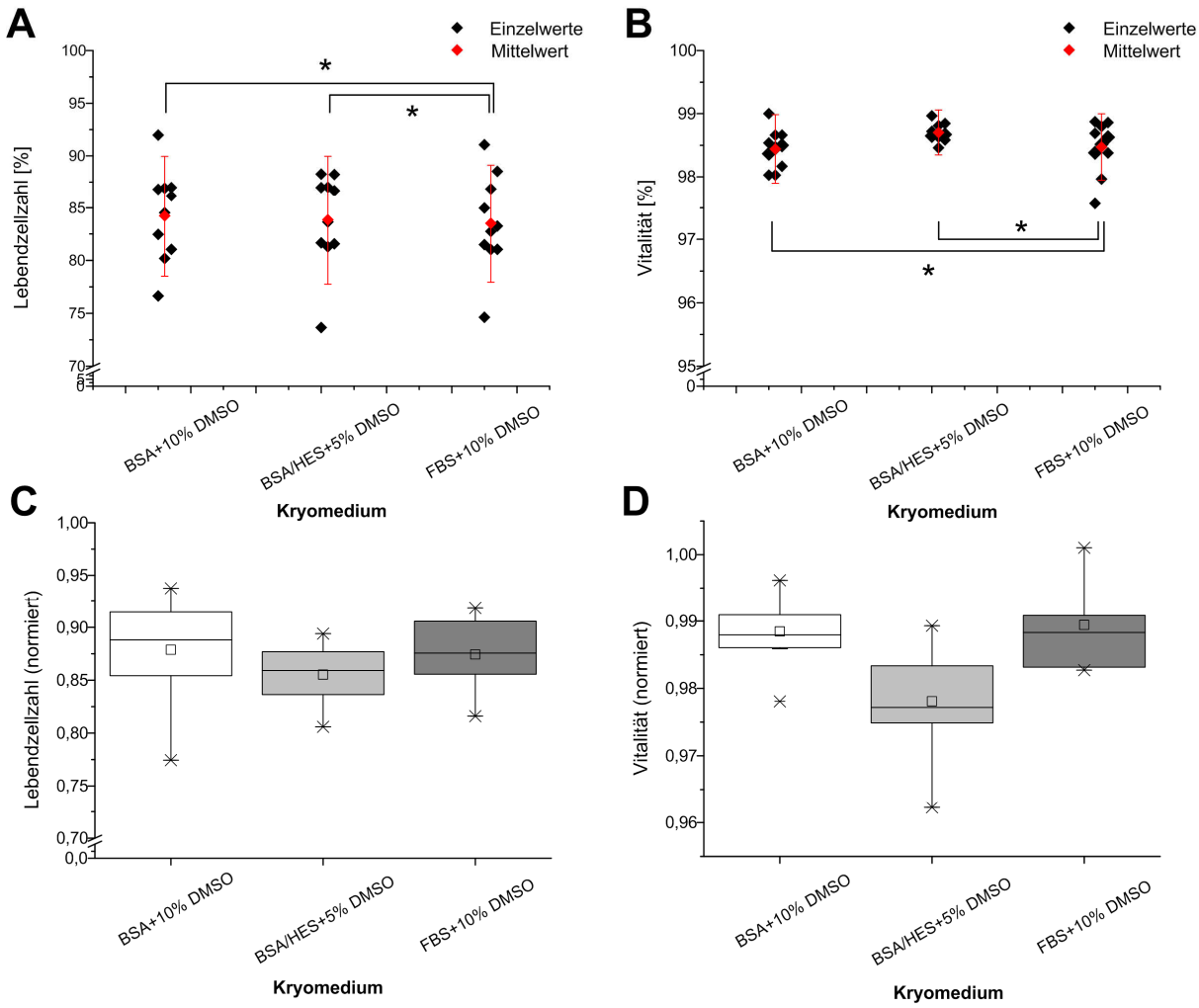


Abbildung 55: Anteil lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl (A, C) und Vitalität (B, D) von PBMC kryokonserviert in BSA-basierten Medium mit 10% DMSO bzw. mit HES und 5% DMSO, sowie in 90% FBS mit 10% DMSO direkt nach dem Auftauen (A, B) und nach 24 Stunden (C, D) (Abbildung verändert aus Germann et al., 2011).

Die isolierten PBMCs wurden in den drei unterschiedlichen Medien aufgenommen, mit langsamer Kühlrate auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad wurden die Lebendzellzahl (A) und Vitalität (B) automatisiert unter Verwendung von Trypanblau bestimmt. Aufgetragen sind die Einzelwerte der zehn Versuchsreihen und der Mittelwert mit Standardabweichung, nach einer 24-stündigen Kultivierung wurden diese Werte erneut gemessen (C, D), auf die Ergebnisse direkt nach dem Auftauen normiert und in einem Box-Whisker-Plot dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet.

Der Anteil lebender Zellen im Vergleich zur eingefrorenen Zellzahl war direkt nach dem Auftauen in allen drei Kryomedien statistisch vergleichbar ($p \leq 0,05$) und lag zwischen 83,52 ± 5,59% für PBMCs eingefroren in 90% FBS mit 10% DMSO und 84,23 ± 5,72% nach der Kryokonservierung im BSA-basierten Medium mit 10% DMSO (Abbildung 55A). Auch die Vitalität der Zellen direkt nach dem Auftauen erzielte mit Werten von 98,44 ± 0,54% (BSA-basiertes Medium mit 10% DMSO) bis 98,70 ± 0,36% (BSA-basiertes Medium mit 5% DMSO) ein sehr gutes Ergebnis (Abbildung 55B), so dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Kryomedien festgestellt werden konnte ($p \leq 0,05$).

24 Stunden nach dem Auftauen wurde eine Abnahme der Lebendzellzahl und Vitalität in allen Proben, unabhängig vom Kryomedium, gemessen (Abbildung 55C, D). So zeigte sich ein Verlust der lebenden Zellen um 12,13 ± 5,00% (BSA-basiertes Medium mit 10% DMSO), 14,48 ± 3,09% (BSA-basiertes Medium mit 5% DMSO), bzw. um 12,58 ± 3,60% (90% FBS mit 10% DMSO) im Vergleich zu den Resultaten direkt nach dem Auftauen. Auch die Vitalität nahm leicht ab, wobei PBMCs, die in 90% FBS mit 10% DMSO eingefroren waren, mit 1,06 ± 0,67% den geringsten Verlust zeigten und Zellen, die im BSA-basierten Medium mit 5% DMSO kryokonserviert waren, mit 2,19 ± 0,78% die größte Abnahme aufwiesen. Die statistische Auswertung ergab dabei einen signifikanten Unterschied der Ergebnisse, die mit dem DMSO-reduzierten Kryomedium erzielt wurden, im Vergleich zu den statistisch identischen Resultaten mit 90% FBS bzw. mit dem BSA-basierten Medium mit 10% DMSO.

Insgesamt zeigte sich, dass beide serumfreie, definierte Medien gute Ergebnisse im Bezug auf Zellvitalität und Erhalt der Lebendzellzahl erreichten. Dabei erzielte das BSA-haltige Kryomedium mit 10% DMSO statistisch vergleichbare Resultate zum FBS mit 10% DMSO, wobei mit dem DMSO-reduzierten Medium etwas geringere Werte erzielt wurden.

Da für die Verwendung von PBMCs in T-Zell-basierten Nachweismethoden vor allem der Erhalt der antigenspezifischen T-Zell-Antwort von entscheidender Bedeutung ist, wurde diese in einem hoch sensitivem Funktionalitätsnachweis, dem Gamma-Interferon-ELISPOT (IFN-γ ELISPOT), untersucht. Dabei werden die T-Zellen mit spezifischen Antigenen stimuliert und die resultierende Ausschüttung des Gamma-Interferons, die *in vivo* zur Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunabwehr führt, mit Hilfe einer Farbreaktion bestimmt. In dieser Untersuchung wurden sowohl Peptide des Cytomegalievirus (CMV) als auch eine Mischung dieser Peptide mit Bestandteilen des Epstein-Barr- und Influenzavirus (CEF-Peptide) verwendet. Aufgrund mangelnden Probenmaterials konnte die Funktionalitätsanalyse dabei nur bei sieben der zehn Blutproben durchgeführt werden.

Die Untersuchung der antigenspezifischen IFN-γ-Ausschüttung ergab, dass 6 von 7 bzw. 7 von 7 der eingefrorenen PBMC-Proben nach dem Auftauen eine Reaktion auf die CMV- (Abbildung 56A) bzw. CEF-Peptide (Abbildung 56B) zeigten, unabhängig vom genutzten Kryomedium. Außerdem wurde bei allen unstimulierten Kontrollen ein sehr geringes Hintergrundsignal mit 0 ± 0 bis 5 ± 5 reaktiven Zellen pro 10^6 PBMCs gemessen (Abbildung 56C). Dieses Ergebnis zeigte, dass mit keinem Kryomedium durch den Einfrier- und Auftauprozess selbst eine unspezifische Aktivierung der Zellen erfolgte.

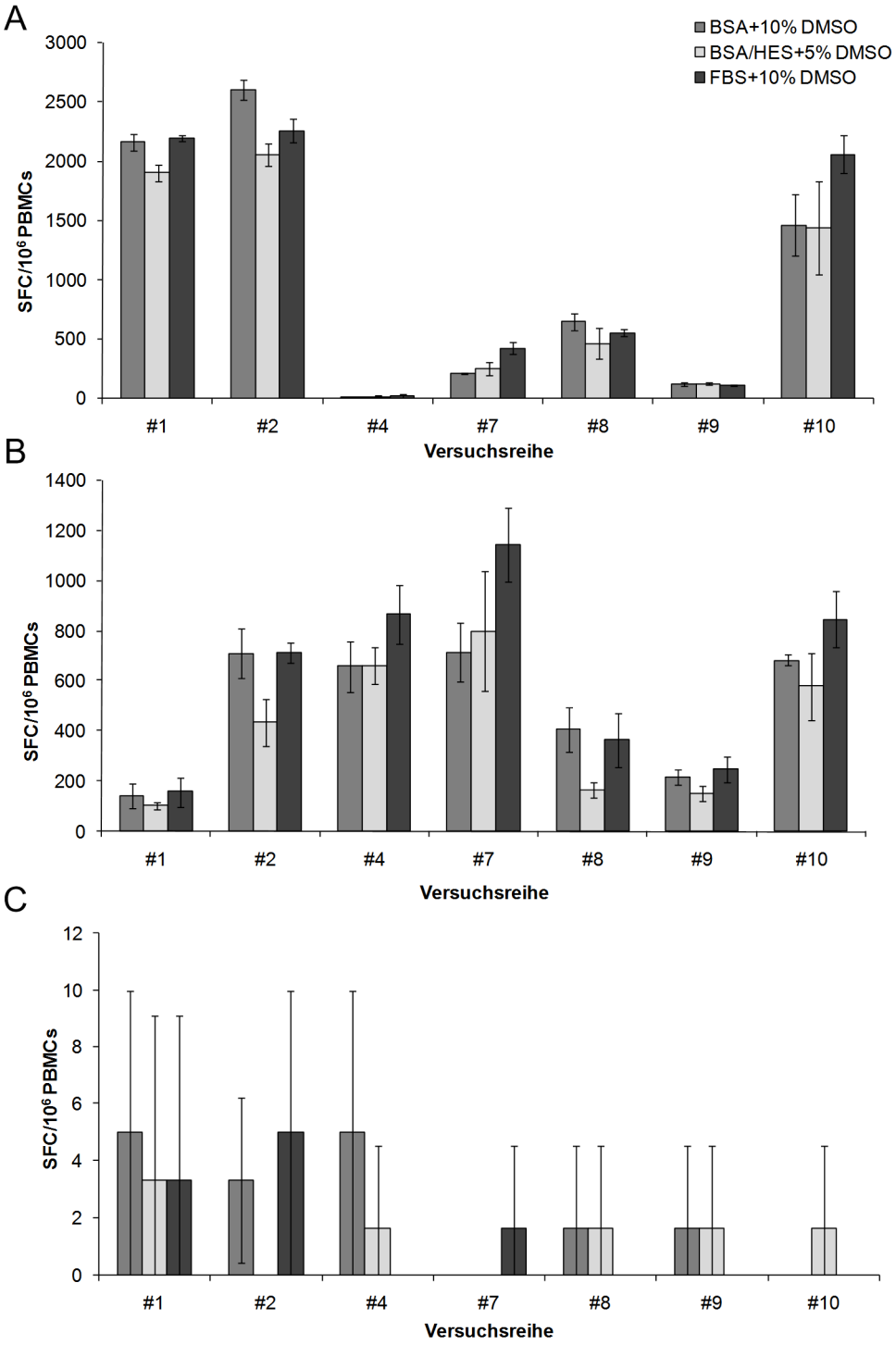


Abbildung 56: IFN-γ-Ausschüttung von PBMCs, die im BSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO, im BSA-basierten Kryomedium mit HES und 5% DMSO, sowie in 90% FBS mit 10% DMSO eingefroren wurden, nach Stimulation mit CMV- (A) und CEF-Peptiden (B). Zusätzlich ist das unspezifische Hintergrundsignal unstimulierter PBMCs nach der Kryokonservierung in den drei Kryomedien dargestellt (C) (Abbildung verändert aus Germann et al., 2011).

Es wurde die antigenspezifische Reaktivität von PBMCs aus 7 Isolationen ermittelt, die in den drei Kryomedien mit langsamer Kühlrate auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Nach dem Auftauen im 37°C warmen Wasserbad wurden die PBMCs für 24 Stunden kultiviert, mit den CMV- bzw. CEF-Peptiden stimuliert und die IFN-γ-Ausschüttung mittels spezifischer Antikörper detektiert. Angegeben ist die mittlere Anzahl von Zellen, die IFN-γ ausschütten (SFC), pro 10^6 PBMCs aus drei Ansätzen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Reaktivität der PBMCs nach der Kryokonservierung im BSA-haltigen Kryomedium mit 10% DMSO nahezu identisch zu FBS war (Abbildung 56A, B). Dagegen wurde bei dem PBMCs, die im BSA-basierten Medium mit HES und 5% DMSO eingefroren wurden, eine geringere Reaktivität detektiert (Abbildung 56A, B).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Verwendung von undefiniertem Serum im Kryomedium durch die Zugabe von BSA Fraktion V vermieden werden konnte. Diese serumfreie Kryokonservierung von PBMCs resultierte in einer guten Zellvitalität und einem hohen Anteil lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl, die statistisch vergleichbare Ergebnisse zu FBS erzielte. Entscheidend dabei war, dass die T-Zell-Funktionalität in den BSA-basierten Medien erhalten blieb und vergleichbar zur Reaktivität von in FBS eingefroren PBMCs war. Zusätzlich scheint eine Reduktion der DMSO-Konzentration durch die Zugabe eines extrazellulären Kryoprotektivs möglich, wobei diese allerdings zu einer geringen Abnahme der Zellvitalität und Lebendzellzahl und zu einer leichten Reduktion der antigenspezifischen Reaktivität führte.

Diese Ergebnisse ergaben, dass eine erhöhte Standardisierung des Einfrierprozesses für PBMCs durch die Vermeidung von tierischem Serum möglich ist. Da bei humanen adulten Stammzellen bereits in Kapitel 4.1.4 gezeigt werden konnte, dass auch eine komplett xenofreie Kryokonservierung mit vollständigem Funktionalitätserhalt und Langzeitstabilität möglich ist, wurden in weiteren Untersuchungen die Effekte einer xenofreien Kryokonservierung von PBMCs untersucht, um dadurch auch bei diesem Zellmodell definierte Bedingungen zu etablieren.

5.2.2 Vergleichende Untersuchung zur xenofreien Kryokonservierung von Zellen des Immunsystems für immunologische Untersuchungen im Rahmen der HIV-Vakzinforschung

Für eine vollständige Standardisierung der Kryokonservierung von PBMCs ist eine komplette Vermeidung von Proteinen im Kryomedium notwendig. Vor allem die Verwendung von tierischem Serum kann zu einer unspezifischen Aktivierung der T-Zellen führen, wodurch keine verlässlichen Aussagen in T-Zell-basierten Nachweismethoden getroffen werden können. Doch gerade diese Reproduzierbarkeit in den Funktionalitätsanalysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und auch in verschiedenen Laboratorien ist entscheidend für die Entwicklung neuer Impfstoffe. Aus diesem Grund werden im Folgenden unterschiedliche xeno- und auch komplett proteinfreie Alternativen zum FBS im Hinblick auf Zellvitalität und Lebendzellzahl sowie Funktionalitätserhalt untersucht. Außerdem ist auch bei diesem Zellsystem eine effiziente Langzeitlagerung von großer Bedeutung, um verlässliche retrospektive Analysen durchführen zu können. Daher wurden die Ergebnisse der verschiedenen Medien nach einer Lagerungsdauer von wenigen Wochen und nach mehreren Monaten miteinander verglichen.

Um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden PBMCs von 13 gesunden, CMV seropositiven Blutspendern isoliert. Die Zellen wurden anschließend in vier unterschiedlichen Alternativen zum FBS-basierten Standardprotokoll eingefroren: i) im bereits erfolgreich getesteten BSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO, ii) in einem xenofreien Kryomedium, das humanes Serumalbumin (HSA) und 10% DMSO enthält und iii) in den beiden proteinfreien und vollständig definierten Kryomedien, basierend auf 1% Poloxamer mit 5% bzw. iv) 10% DMSO. Als Referenz wurden die Zellen in hitzeinaktiviertem und im ELISPOT-Nachweis getesteten FBS mit 10% DMSO eingefroren. Nach

einer Lagerungsdauer von maximal vier Wochen wurden die Proben aufgetaut und automatisiert unter Verwendung von Trypanblau im Hinblick auf die Anzahl lebender Zellen, die wiedergewonnen werden konnten (Abbildung 57A), und ihre Vitalität (Abbildung 57B) analysiert. Dabei konnte nach der Kryokonservierung der PBMCs im BSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO mit 91,25 ± 6,97% eine vergleichbar große Anzahl lebender Zellen erhalten werden wie nach dem Einfrieren in FBS mit 10% DMSO (91,40 ± 10,47%). Dagegen führte das Einfrieren der Zellen im proteinfreien Medium mit 5% bzw. 10% DMSO zu den geringsten Lebendzellzahlen mit 87,40 ± 7,22% bzw. 87,50 ± 8,51%. Nach einer 24-stündigen Kultivierung wurde in allen Proben ein Zellverlust festgestellt, so dass die Lebendzellzahl nur noch zwischen 71,04 ± 5,48% bzw. 71,76 ± 5,96% für das proteinfreie Kryomedium mit 5% DMSO bzw. für das HSA-basierte Kryomedium mit 10% DMSO und 78,14 ± 6,53% bzw. 79,81 ± 4,94% für FBS bzw. für das BSA-basierte Kryomedium mit 10% DMSO lag. Die statistische Auswertung ergab dabei, dass direkt nach dem Auftauen die Lebendzellzahl nur bei PBMCs, die in BSA mit 10% DMSO bzw. HSA mit 10% DMSO eingefroren wurden, vergleichbar war zu den Proben, die in FBS eingefroren wurden. 24 Stunden später traf diese statistische Vergleichbarkeit für BSA mit 10% DMSO und das proteinfreie Medium mit 10% DMSO zu, nicht für die restlichen Ansätze.

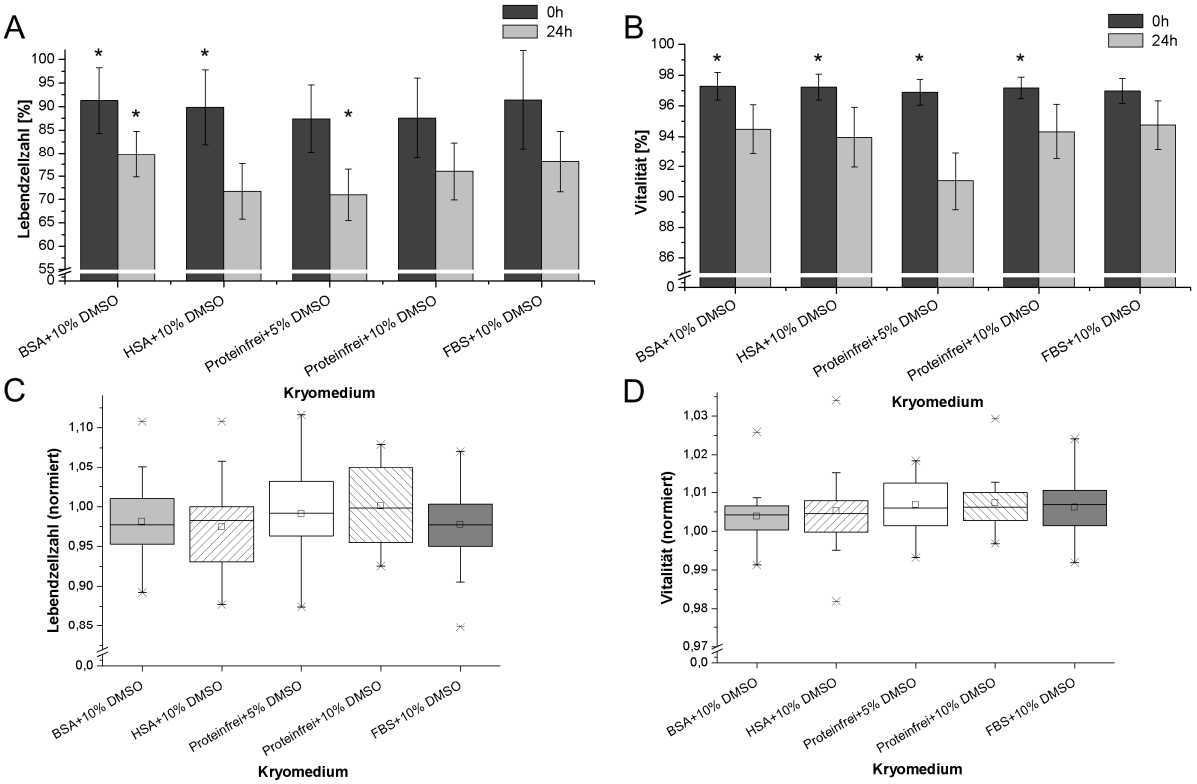


Abbildung 57: Anteil lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl (A, C) und Vitalität (B, D) der PBMCs nach einer kryogenen Lagerung in BSA- bzw. HSA-basiertem Kryomedium mit 10% DMSO, in proteinfreiem Kryomedium mit 5% bzw. 10% DMSO und in 90% FBS mit 10% DMSO für maximal vier Wochen (A, B) bzw. ungefähr sechs Monaten (C, D) (Abbildung verändert aus Schulz et al., 2011a).

Die PBMCs wurden von 13 verschiedenen Blutspendern isoliert, in den fünf verschiedenen Kryomedium mit langsamer Kühlrate eingefroren und in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Nach einer Lagerungsdauer von maximal vier Wochen bzw. ungefähr sechs Monaten wurden die Proben im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und automatisiert mittels Trypanblau in Bezug auf Vitalität und Lebendzellzahl direkt nach dem Auftauen (0h) und nach einer 24-stündigen Kultivierung (24h) analysiert. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen und Kryomedien nach der Langzeitlagerung wurden auf die entsprechenden Kurzzeitresultate normiert (B, D) und als Box-Whisker-Plot dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet.

** statistisch vergleichbar mit FBS ($p \leq 0,05$)*

Die Vitalität der PBMCs nach einer Lagerung von maximal vier Wochen war direkt nach dem Auftauen in allen Proben mit Werten von 96,88 ± 0,84% (proteinfreies Medium mit 5% DMSO) bis 97,28 ± 0,90% (BSA-basiertes Medium mit 10% DMSO) sehr hoch, unabhängig vom verwendeten Kryomedium. 24 Stunden nach dem Auftauen wurde ein geringer Vitalitätsverlust in allen Proben detektiert mit der deutlichsten Abnahme für das proteinfreie Medium mit 5% DMSO (91,64 ± 1,67%). PBMCs, die in den anderen Medien eingefroren waren, zeigten eine deutlich höhere Vitalität nach 24 Stunden mit Werten zwischen 94,50 ± 1,59% für das HSA-basierte Medium mit 10% DMSO und 95,47 ± 1,29% für FBS mit 10% DMSO. Die Vitalität von allen Proben war direkt nach dem Auftauen vergleichbar zu den Werten der Proben, die in FBS eingefroren wurden. Nach 24 Stunden fand allerdings in allen Proben eine äußerst geringe, aber signifikante Abnahme statt.

Diese Ergebnisse deuteten bereits darauf hin, dass das HSA-basierte Medium mit 10% DMSO und das proteinfreie Medium mit 5% DMSO aufgrund der im Vergleich geringeren Vitalitätswerte und Lebendzellzahlen 24 Stunden nach dem Auftauen, dem für T-Zell-basierten Nachweismethoden relevanten Zeitpunkt, keine optimalen Alternativen zum serumhaltigen Standardprotokoll darstellen. Dagegen resultierten das BSA-basierte Kryomedium und das proteinfreie Medium mit 10% DMSO in vergleichbaren Ergebnissen zu FBS mit 10% DMSO.

Um die Stabilität der vier serumfreien Alternativen zu FBS bei einer längerfristigen kryogenen Lagerung evaluieren zu können, wurden nach einer Lagerung von ungefähr sechs Monaten die Proben erneut nach den gleichen Parametern ausgewertet (Abbildung 57C, D). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Resultate der einzelnen Versuchsreihen und Kryomedien auf die Ergebnisse, die die Analyse nach einer kurzzeitigen Lagerung ergaben, normiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur eingefroren Zellzahl nach einer Lagerung von mehreren Monaten nur geringfügig von den Werten nach einer kurzzeitigen Kryokonservierung unterschied (Abbildung 57C), während die Vitalität der PBMCs vollständig identisch war (Abbildung 57D). Die Lebendzellzahl in den Proben, die in den fünf unterschiedlichen Kryomedien für ungefähr sechs Monate eingefroren wurden, war mit Werten zwischen 0,97 ± 0,05 (HSA+10% DMSO) und 1,00 ± 0,05 (Proteinfrei+10% DMSO) nahezu identisch zu den Ergebnissen nach einer Kurzzeitlagerung. Die Vitalität der Zellen stimmte komplett mit den Resultaten, die nach einer Lagerung der Proben von maximal vier Wochen erreicht wurden, unabhängig vom Kryomedium überein.

Insgesamt deuteten die Untersuchungen darauf hin, dass alle untersuchten, serumfreien Alternativen zum FBS eine langzeitstabile Kryokonservierung von PBMCs ermöglichen. Es konnte mit keinem der verwendeten Kryomedien eine signifikante Verschlechterung der Kryokonservierungseffizienz nach einer längeren Lagerungsdauer festgestellt werden.

Nachdem eine erste Einschätzung zur Wirksamkeit und Langzeitstabilität der vier serumfreien Kryomedien mittels Vitalitäts- und Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt wurde, wurde in weiteren Untersuchungen das Potential der Kryomedien zum Funktionalitätserhalt der PBMCs nach einer kurzzeitigen und langfristigen Lagerung in ELISPOT-Nachweisen analysiert (Abbildung 52). Dazu wurde die T-Zell-Antwort der PBMCs, die im BSA- bzw. HSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO, im proteinfreien Kryomedium mit 5% bzw. 10% DMSO und in 90% FBS mit 10% DMSO für maximal vier Wochen eingefroren wurden, nach einer Antigenstimulation mit CMV- (Abbildung 58A) und CEF-Peptiden (Abbildung 58B) gemessen. Die Untersuchung der antigenspezifischen IFN-γ-Ausschüttung ergab, dass 12 von 13 bzw. 9 von 13 der eingefrorenen PBMC-Proben nach dem Auftauen eine Reaktion auf die CMV- bzw. CEF-Peptide zeigten, unabhängig vom verwendeten Kryomedium. Außerdem wurde

bei allen unstimulierten Kontrollen ein sehr geringes Hintergrundsignal mit 0 ± 0 bis 8,33 ± 2,89 reaktiven Zellen pro 10^6 PBMCs gemessen. Dieses Ergebnis zeigte, dass mit keinem Kryomedium durch den Einfrier- und Auftauprozess selbst eine unspezifische Aktivierung der Zellen erfolgte.

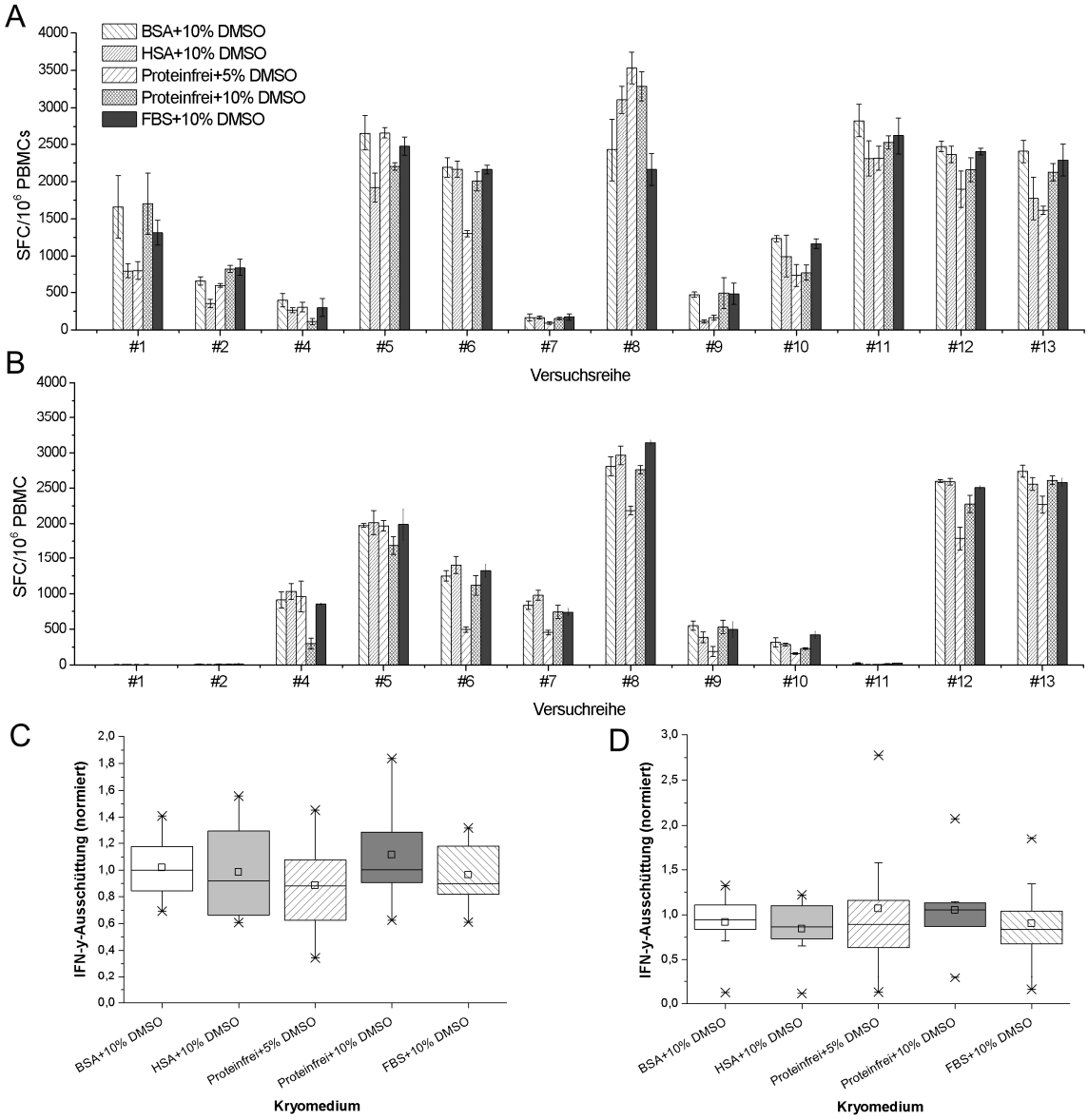


Abbildung 58: IFN-γ-Ausschüttung von PBMCs aus 12 Isolationen, die im BSA- bzw. HSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO, im proteinfreien Kryomedium mit 5% DMSO bzw. 10% DMSO, sowie in 90% FBS mit 10% DMSO für maximal vier Wochen (A, B) bzw. ungefähr sechs Monaten (C, D) eingefroren waren, nach Stimulation mit CMV- (A, C) und CEF-Peptiden (B, D) Abbildung verändert aus (Schulz et al., 2011a).

Dargestellt ist die antigenspezifische Reaktivität von PBMCs aus 12 Isolationen, die in den fünf Kryomedien mit langsamer Kühlrate auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff für maximal vier Wochen bzw. ungefähr sechs Monaten gelagert wurden. Nach dem Auftauen im 37°C warmen Wasserbad wurden die PBMCs für 24 Stunden kultiviert, mit den CMV- bzw. CEF-Peptiden stimuliert und die IFN-γ-Ausschüttung mittels spezifischer Antikörper detektiert. Nach der Kurzzeitlagerung wurde die mittlere Anzahl von Zellen, die IFN-γ ausschütten (SFC), pro 10^6 PBMCs aus drei Ansätzen, angegeben (A, B). Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen und Kryomedien nach der Langzeitlagerung wurden auf die entsprechenden Kurzzeitresultate normiert (B, D) und als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Dieser Vergleich zeigte, dass PBMCs, die im HSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO eingefroren waren, nach einer maximal vierwöchigen Lagerung eine reduzierte antigenspezifische Reaktivität gegen die CMV-Peptide besaßen (Abbildung 58A). Auch bei PBMCs, die im proteinfreien Medium mit

5% DMSO kryokonserviert waren, konnte eine deutlich verringerte IFN-γ-Ausschüttung gegen CMV- und CEF-Peptide festgestellt werden (Abbildung 58A, B). Die vergleichbarsten Ergebnisse zu FBS wurden mit dem BSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO und dem proteinfreien Kryomedium mit 10% DMSO erzielt, so dass diese eine vielversprechende Alternative zu FBS darstellten.

Da es von entscheidender Bedeutung ist, dass auch die Funktionalität der PBMCs nach einer Langzeitlagerung erhalten bleibt, wurde die Reaktivität der Zellen, die in den fünf unterschiedlichen Kryomedien eingefroren wurden, erneut nach einer kryogenen Lagerung von ungefähr sechs Monaten in ELISPOT-Analysen untersucht. Um die Resultate nach einer Kurz- und Langzeitlagerung besser miteinander vergleichen zu können, wurde die IFN-γ-Ausschüttung der einzelnen Versuchsreihen nach einer Kryokonservierung von ungefähr sechs Monaten auf die Ergebnisse, die nach einer maximal vierwöchigen Lagerung erzielt wurden, normiert (Abbildung 58C, D).

Dabei ergab sich, dass die gleichen PBMC-Proben (1 von 13 nach CMV- bzw. 4 von 13 nach CEF-Stimulation) nach dem Auftauen keine Reaktion auf die Antigenstimulation zeigten, die auch nach einer vierwöchigen kryogenen Lagerung nicht aktivierbar waren. Diese wurden in den Vergleich der Reaktivität der PBMCs nach einer Kurz- und Langzeitlagerung nicht mit einbezogen. Die IFN-γ-Ausschüttung nach Antigenstimulation war nach einer Kryokonservierung von ungefähr sechs Monaten bis auf wenige Ausnahmen vergleichbar zur Reaktivität der Zellen nach einer maximal vierwöchigen Lagerung, unabhängig vom Kryomedium. Dabei zeigten vor allem PBMCs, die im proteinfreien Medium mit 5% DMSO eingefroren wurden, nach der Stimulation mit CMV-Peptiden mit 0,89 ± 0,32 eine geringere Reaktivität im Vergleich zu den Kurzzeitergebnissen.

Insgesamt zeigten diese Untersuchungen, dass eine effiziente serum- und sogar komplett proteinfreie und vollständig definierte Kryokonservierung von PBMCs mit sehr guter Vitalität und hohen Lebendzellzahlen möglich ist. Vor allem das BSA-basierte Kryomedium mit 10% DMSO und das proteinfreie Kryomedium mit 10% DMSO ergaben vergleichbare Ergebnisse zum FBS-basierten Standardprotokoll, während HSA keine Alternative zu FBS darzustellen scheint. Auch eine Reduktion der zytotoxischen DMSO-Konzentration resultierte in einer verringerten Vitalität und einem erhöhten Zellverlust, so dass damit keine effiziente Kryokonservierung der PBMCs garantiert werden konnte. Diese Ergebnisse wurden durch die Funktionalitätsanalyse der eingefroren Zellen in antigenspezifischen ELISPOT-Nachweisen bestätigt. Nach der Kryokonservierung von PBMCs im BSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO und im proteinfreien Medium mit 10% DMSO wurde die T-Zell-Reaktivität auf CMV- und CEF-Antigenstimulation im vergleichbaren Maße zu Zellen erhalten, die in FBS mit 10% DMSO eingefroren wurden. Die spezifische Reaktivität nach der Kryokonservierung im HSA-basierten Kryomedium mit 10% DMSO und im proteinfreien Medium mit 5% DMSO war dagegen deutlich verringert. Schließlich wurde auch gezeigt, dass nach einer kryogenen Lagerung der Zellen für ungefähr sechs Monate kein Verlust von Vitalität, Lebendzellzahl und nur eine geringe Veränderung der Funktionalität im Vergleich zur kurzzeitigen Lagerung erfolgte, so dass die beiden serum- bzw. proteinfreien Medien vielversprechende Alternativen zum FBS-basierten Standardmedium darstellen.

5.2.3 Evaluierung des neu entwickelten Kryosubstrates mit Zellen des Immunsystems unter xenofreien Bedingungen

Für die Evaluierung eines neuen Kryosubstrates sind die in Kapitel 4.1.4 beschriebenen materialwissenschaftlichen Untersuchungen alleine nicht ausreichend. Vor allem die Materialoberfläche im Probenbehältnis kann während der Kryokonservierung einen Einfluss auf die Eiskristallbildung und damit auf die Vitalität und Funktionalität der Zellen besitzen. Zusätzlich ist für die Lagerung von wertvollen Proben auch eine effiziente Rückgewinnung der Zellen nach der Kryokonservierung von großer Bedeutung, wobei dies ebenfalls durch die Oberflächenbeschaffenheit beeinflusst wird. Um die neu entwickelten 500µl-Substrate mit den kommerziellen Kryoröhrchen (1,8ml) zu vergleichen, wurden isolierte PBMCs mit dem in Kapitel 4.2.2 etablierten Protokoll eingefroren und in Bezug auf Vitalität, Lebendzellzahl und Funktionalität evaluiert. Die Lebendzellzahl (Abbildung 59A) und Vitalität (Abbildung 59B) wurden direkt nach dem Auftauen und erneut nach 24 Stunden automatisiert mit Trypanblau ermittelt.

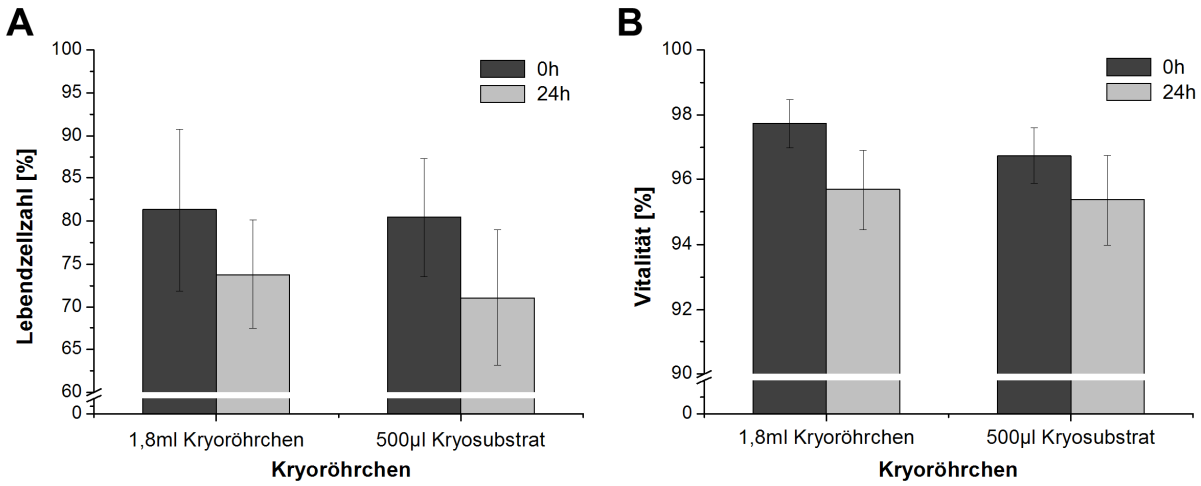


Abbildung 59: Anteil lebender Zellen im Bezug zur eingefrorenen Zellzahl (A) und Vitalität (B) von PBMCs aus 11 Isolationen, die im kommerziellen Kryoröhrchen (1,8ml) und in den elektronischen 500µl-Kryosubstraten eingefroren wurden.

$2{,}5x10^7$ Zellen/ml wurden im proteinfreien Kryomedium mit 10% DMSO aufgenommen und 400µl der Zellsuspension im kommerziellen Kryoröhrchen (1,8ml) bzw. im elektronischen 500µl-Kryosubstraten mit 1°C/min auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Die Proben wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgebaut und sowohl direkt nach dem Auftauen, als auch 24 Stunden später automatisiert mit Trypanblau im Hinblick auf Vitalität und Lebendzellzahl ausgewertet.

Die Rückgewinnung der PBMCs nach dem Auftauen war im kommerziellen Kryoröhrchen und dem elektronischen 500µl-Substrat sowohl direkt nach dem Auftauen (81,33 ± 9,43% bzw. 80,47 ± 6,90%) als auch nach 24 Stunden (73,77 ± 6,33% bzw. 71,05 ± 7,92%) vergleichbar (Abbildung 59A). Auch die Vitalität der Zellen war in beiden Einfriergefäßen mit Werten von über 96% direkt nach dem Auftauen und von über 95% nach 24 Stunden nahezu identisch (Abbildung 59B).

Dieses Ergebnis konnte auch durch die Funktionalitätsanalyse mittels ELISPOT-Nachweis bestätigt werden. Das Hintergrundsignal war mit 0 ± 0 bis 8,33 ± 14.43 reaktiven Zellen pro 10^6 PBMCs in beiden Einfriergefäßen sehr gering, so dass die neu entwickelten, elektronischen Kryosubstrate keine unspezifische Aktivierung der T-Zellen auslösen sollten (Abbildung 60C). Auch wurde in allen Versuchsreihen bei PBMCs, die im kommerziellen Kryoröhrchen und den 500µl-Kryosubstraten eingefroren wurden, eine vergleichbare Interferon-γ-Ausschüttung nach einer spezifischen Stimulation mit CMV- (Abbildung 60A) und CEF-Peptiden (Abbildung 60B) gemessen.

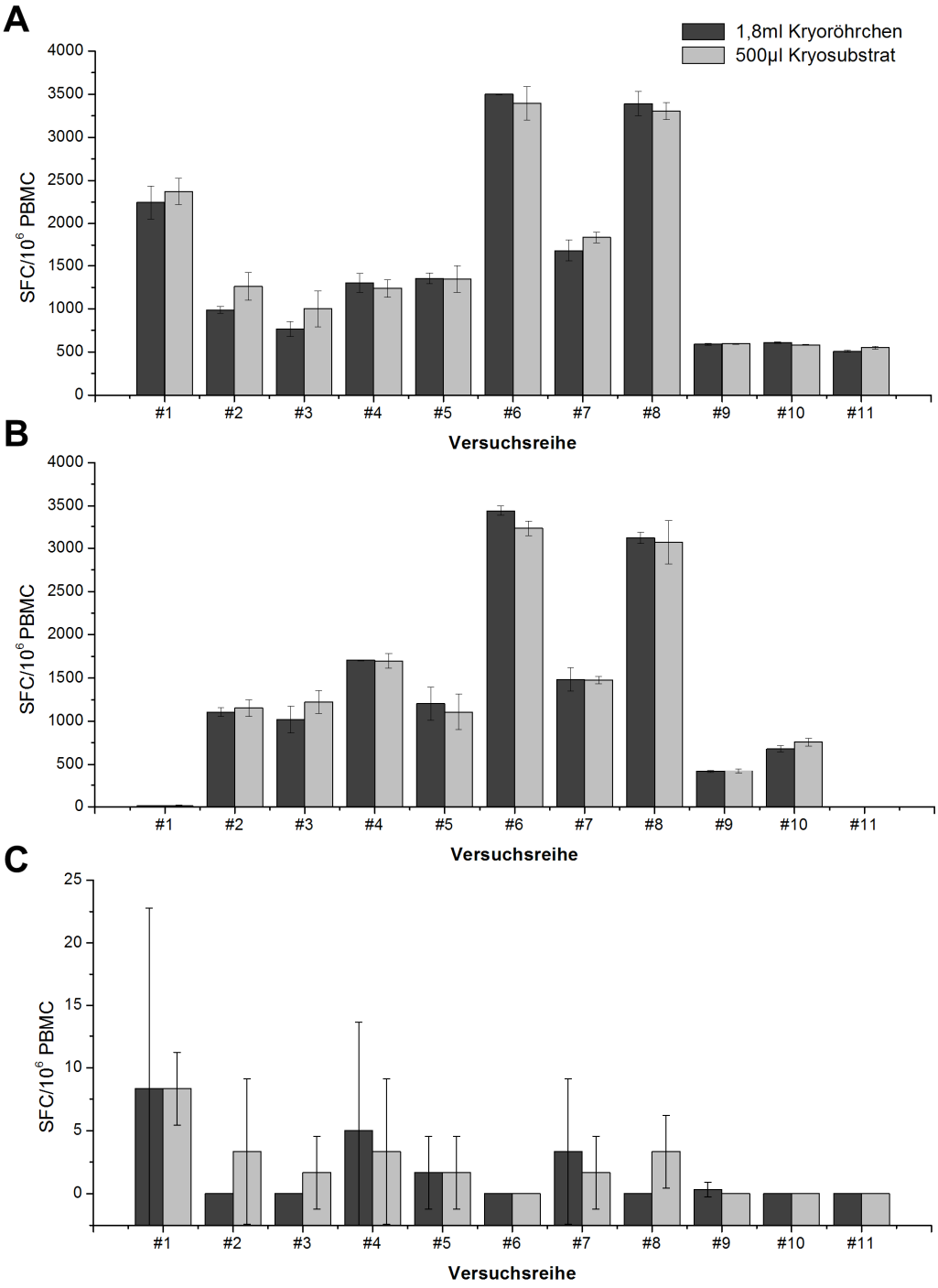


Abbildung 60: IFN-γ-Ausschüttung von PBMCs aus elf Isolationen, die im kommerziellen Kryoröhrchen (1,8ml) bzw. im neuen, elektronischen 500µl-Kryosubstrat eingefroren wurden, nach Stimulation mit CMV- (A) und CEF-Peptiden (B), sowie das unspezifische Hintergrundsignal unstimulierter PBMCs nach der Kryokonservierung (C).

Dargestellt ist die antigenspezifische Reaktivität von PBMCs aus elf Isolationen, die im kommerziellen Kryoröhrchen (1,8ml) bzw. im neuen, elektronischen 500µl-Kryosubstrat mit langsamer Kühlrate auf -80°C eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff für maximal vier Wochen bzw. ungefähr sechs Monaten gelagert wurden. Nach dem Auftauen im 37°C warmen Wasserbad wurden die PBMCs für 24 Stunden kultiviert, mit den CMV- (A) bzw. CEF-Peptiden (B) stimuliert und die IFN-γ-Ausschüttung mittels spezifischer Antikörper detektiert. Zusätzlich wurde das unspezifische Hintergrundsignal unstimulierter PBMCs nach der Kryokonservierung in den beiden Röhrchen ermittelt (C). Dabei wurde die mittlere Anzahl von Zellen, die IFN-γ ausschütten (SFC), pro 10^6 PBMCs aus drei Ansätzen, angegeben.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die neu entwickelten Kryosubstrate mit integriertem elektronischem Speicherchip eine vergleichbare Kryokonservierung zu kommerziellen Kryoröhrchen ermöglichten. In den miniaturisierten Kryosubstraten blieb sowohl die Zellvitalität, als auch –funktionalität der PBMCs erhalten.

6. Diskussion

Jeder Zelltyp eines Organismus wird über seine spezifische Funktion definiert. Dabei spielt die Zellmembran in allen Prozessen eine entscheidende Rolle. Sie ermöglicht über Rezeptoren und Transmembranproteine die Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung und ist an entscheidenden zellulären Mechanismen wie Zellbewegung und –teilung beteiligt. Die Zellmembran als semipermeable Barriere gewährleistet die Aufrechterhaltung eines geschlossenen Reaktionsraums und die Ausbildung von elektrochemischen Gradienten, wodurch die Zelle überhaupt erst funktionsfähig wird. Außerdem unterliegt sie während der Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen einer dynamischen Veränderung: zum Beispiel wird während der osteogenen Differenzierung von adulten Stammzellen Hydroxylapatit in die Zellmembran eingelagert und embryonale Stammzellen verändern die Expression ihrer Oberflächenantigene. Dies zeigt, dass die Zellmembran eine hoch komplexe Struktur darstellt und eine zentrale Rolle bei allen Zellreaktionen spielt, so dass geringste Veränderungen und Schädigungen eine signifikante Auswirkung auf das Zellverhalten besitzen.

Da die Zellmembran auch während der Kryokonservierung die Barriere darstellt, die Organellen und Proteine im Zellinneren schützt und durch Eiskristallbildung selbst osmotischen und mechanischen Schäden unterliegt, wurden die Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit vor allem auf die Membraneigenschaften fokussiert.

Dazu wurden die Schädigungsmechanismen während der Kryokonservierung an Zellen mit unterschiedlichsten Membrancharakteristika untersucht: Suspensionszellen aus dem Blut, die keine Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Adhäsion besitzen, deren Funktionalität aber durch Rezeptoren in der Membran definiert ist; humane embryonale Stammzellen, die enge Zell-Zell-Kontakte besitzen und in dreidimensionalen Kolonien wachsen; sowie humane adulte Stammzellen, die als Monolayer wachsen. Diese drei Zelltypen repräsentieren außerdem Vertreter der beiden großen Zellklassen, die im Körper zu finden sind: differenzierbare und differenzierte Zellen, so dass ein weites Spektrum an Zelltypen in die Untersuchungen einbezogen wurden.

Welche Auswertungsparameter definieren die Zellfunktionalität?

Für eine exakte Evaluierung der Schädigungsmechanismen während der Zellpräparation und Kryokonservierung ist eine systematische Untersuchung auf unterschiedlichen Analyseebenen notwendig, um die verursachten Effekte vollständig erfassen zu können. Es ist somit unmöglich, die Funktionalität der Zellen mit nur einer Nachweismethode zu analysieren, stattdessen ist eine Charakterisierung sowohl auf subzellulärer Ebene, als auch in der Gesamtheit der Zellpopulation entscheidend (Abbildung 61). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit für jeden Zelltyp Auswertungsparameter definiert, um eine vollständige und spezifische *in vitro* Charakterisierung zu ermöglichen. Dazu wurden auf struktureller Ebene die Membranintegrität und Zellmorphologie mit Hilfe unterschiedlicher Mikroskopiemethoden untersucht. Zusätzliche wurden auf funktionaler Ebene die Zelldynamik und der Metabolismus unter Verwendung von Videomikroskopie und kolorimetrischen Nachweisen evaluiert. Auf reaktiver bzw. phänotypischer Ebene wurden Analysen des Phänotyps und des Differenzierungspotentials der Stammzellen, sowie der antigenspezifischen T-Zell-Antwort bei Lymphozyten vor und nach der Kryokonservierung durchgeführt.

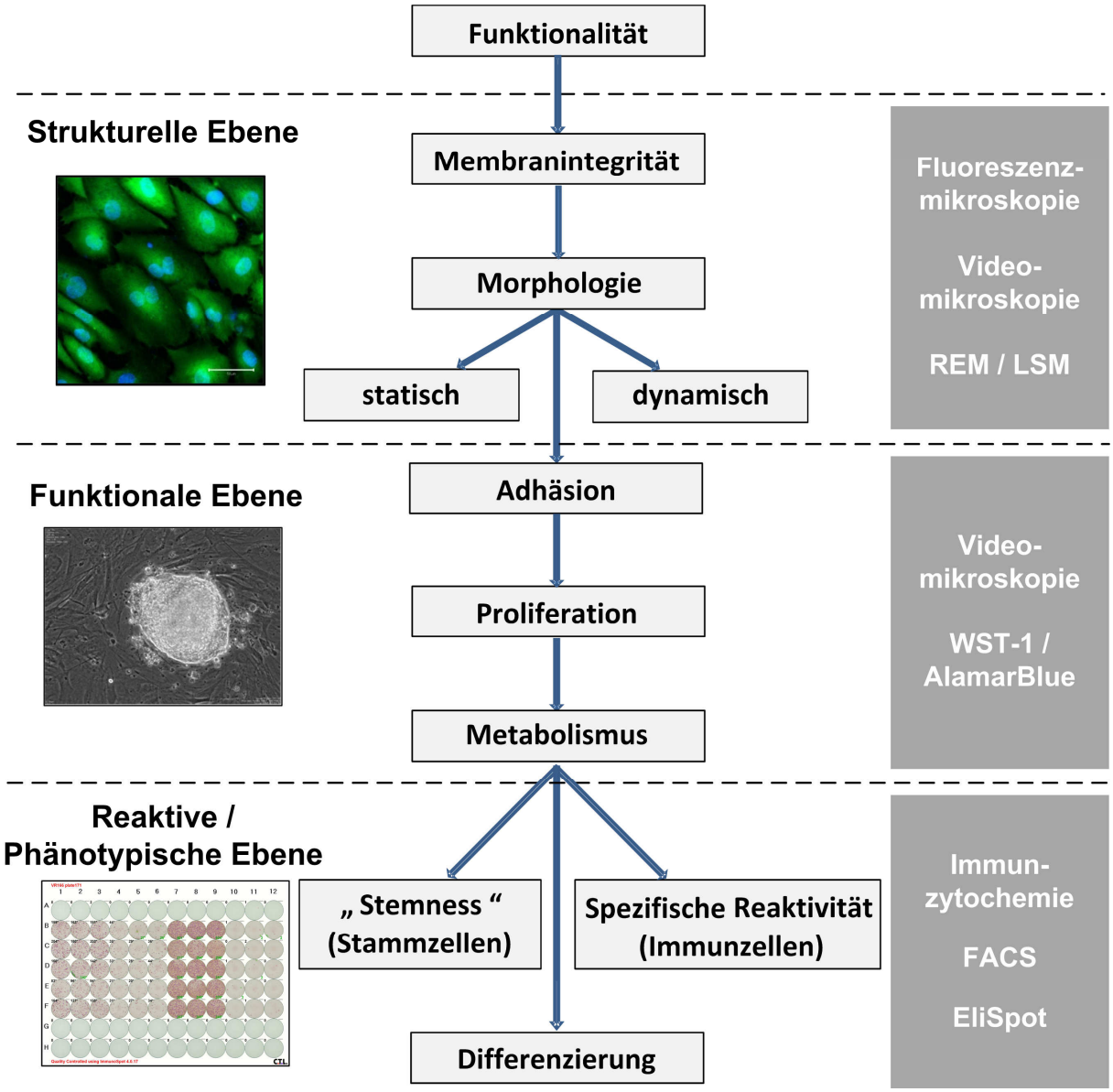


Abbildung 61: Übersicht über Auswertungsparameter, die auf unterschiedlichen Ebenen wirken sowie die entsprechenden Nachweismethoden.

Jede Untersuchungsmethode resultiert dabei in einem unterschiedlich aussagekräftigen Ergebnis: so sagt die ermittelte Membranintegrität auf struktureller Ebene direkt nach der Kryokonservierung noch nichts über die Überlebensrate der Zellen aus, da aufgrund von Apoptose- und Nekrosevorgängen immer noch ein Großteil der Zellen nach dem Auftauen verloren gehen kann (Heng et al., 2006). Allerdings gibt die Membranintegrität einen Hinweis auf die Mechanismen des zellulären Stresses, die während des Einfrier- und Auftauvorgangs auf die Zellen wirken können, wie zum Beispiel intrazelluläre Eiskristallbildung oder osmotischen Stress. Dies wurde in Kapitel 4.1.3 während der Untersuchung der Kryokonservierung von hESCs in Suspension bestätigt. Obwohl die Membranintegrität der enzymatisch abgelösten Stammzellfragmente direkt nach dem Auftauen mit ungefähr 70% gut war, konnte auf funktionaler Ebene nur eine sehr geringe Adhäsion (maximal 10%) und Proliferation der Zellen festgestellt werden (Abbildung 20). Die Analyse der Membranintegrität mit Hilfe der Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie direkt nach dem Auftauen (Abbildung 22) zeigte dabei, dass es zu einem deutlichen Anschwellen der Zellen in Verbindung mit starker „bleb“-

Bildung kam und die kompakte Koloniestruktur während der Kryokonservierung zerstört wurde, so dass die geringe Adhäsionsfähigkeit auf Veränderungen der Membran zurückgeführt werden konnte.

Weiterhin sind der Erhalt der Pluri- bzw. Multipotenz bei Stammzellen, der durch die Expression spezifischer Oberflächenantigene und Transkriptionsfaktoren nachgewiesen wird, sowie der antigenspezifischen T-Zell-Antwort bei Lymphozyten unbestritten die wichtigsten Charakteristika für eine erfolgreiche Kryokonservierung und Lagerung von Zellen. Doch nur in Verbindung mit der Wiedergewinnung einer adäquaten Zellzahl, was durch die Bestimmung der Membranintegrität und der Proliferationsrate kontrolliert wird, kann ein Protokoll als wirkungsvoll angesehen werden.

Daher wurde in dieser Arbeit auf allen Nachweisebenen und für alle Zelltypen Auswertungsparameter definiert, die eine vollständige *in vitro* Charakterisierung der Zellen vor und nach der Kryokonservierung ermöglichen. Nur die Gesamtheit der hier etablierten Analysemethoden gewährleistet eine vollständige Evaluierung der Schädigungen, die während der Zellpräparation und Kryokonservierung entstehen, und deren Effekte auf die Zellfunktionalität.

Definieren PMEF-Zellen die Koloniestruktur und Proliferation embryonaler Stammzellen?

Die Untersuchungen der Stammzell- und Koloniestruktur in Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 zeigten erhebliche Unterschiede zwischen hESCs, die in Co-Kultur mit chemisch inaktivierten PMEF-Zellen gehalten wurden, und Stammzellkolonien, die PMEF-frei kultiviert wurden. Um ein ungehindertes Ausbreiten der Stammzellkolonien zu ermöglichen, wurde eine direkte Interaktion der Stammzellen mit den PMEFs verhindert, indem die PMEF-Zellen in Alginat verkapselt und so zusammen mit den Stammzellen kultiviert wurden. Die Alginatmatrix ermöglichte dabei die ungehinderte Sezernierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch die PMEF, so dass durch die zusätzliche Beschichtung der Kulturoberfläche mit extrazellulärer Matrix eine identische Kulturumgebung zum Standardprotokoll vorlag. Um die dreidimensionale Struktur von nativen, adhärenten Stammzellkolonien zu erfassen, wurden neue und leistungsfähige bildgebende Verfahren genutzt. Dabei ist die Multi-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie (MPLSM) aufgrund der verwendeten Wellenlängen im nahen infraroten Bereich besser als ein herkömmliches konfokales Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) in der Lage, das Innere von großen biologischen Proben abzubilden (Centonze und White, 1998).

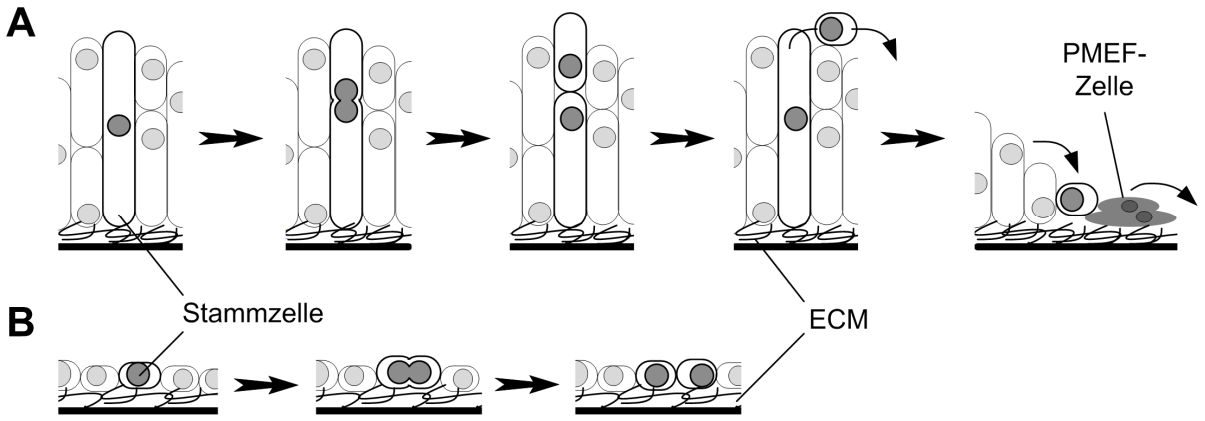


Abbildung 62: Theoretisches Modell einer vertikalen Zellteilung (A) in humanen embryonalen Stammzellkolonien, die auf inaktivierten PMEF-Zellen kultiviert wurden, bzw. einer horizontalen Zellteilung (B) von Stammzellen in einer PMEF-freien Kultur.

Diese Untersuchungen zeigten in Abbildung 10, dass die direkte Interaktion von Stammzellen mit PMEF zur Bildung von kompakten Kolonien mit einer dreidimensionalen Struktur aus zwei bis drei Zellschichten führte. Die Zellen waren innerhalb der Kolonie palisadenartig, d.h. langgestreckt in vertikaler Ausrichtung angeordnet. Im Gegensatz dazu wuchsen Stammzellen in einer PMEF-freien Umgebung als Monolayer und besaßen eine flache Zellform (Abbildung 15). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Co-Kultur von Stammzellen und PMEF eine direkte Auswirkung auf die Morphologie der Zellen und Kolonien besitzt. Der Monolayer aus inaktivierten PMEF limitiert das Raumangebot für die Proliferation der Stammzellen derart, dass nur eine Ausbreitung der Stammzellen in vertikaler Richtung möglich ist. Dies erklärt die dreidimensionale Koloniestruktur mit zwei bis drei Zellschichten. Zusätzlich herrscht im Kolonieinneren ein Nährstoffmangel aufgrund von Diffusionshemmung in dem kompakten Zellaggregat, wodurch die Zellen sich in Richtung der vorteilhafteren Umgebungskonditionen orientieren. Die Zellen nehmen eine palisadenartige Struktur an, um in die Nähe der Kolonieoberfläche zu gelangen, während Stammzellen unter PMEF-freien Bedingungen eine flache, runde Form besitzen, da im Monolayer eine optimale Versorgung der Zellen vorliegt. Die langgestreckte Zellmorphologie in den Stammzellkolonien auf inaktivierten PMEF-Zellen macht auch eine adaptierte Form der Zellteilung wahrscheinlich (Abbildung 62A). Da in dem räumlich begrenzten Kolonieinneren keine Zellteilung in horizontaler Richtung möglich ist, teilen sich die palisadenartigen Stammzellen in vertikaler Richtung, wodurch die dreidimensionale Struktur der Zellkolonie entsteht. Dies würde auch das Vorhandensein vereinzelter runder Zellen auf der Kolonieoberfläche erklären. Aus der Zellteilung hervorgehende Zellen verbleiben kurzzeitig auf der Kolonieoberfläche, werden dann aber von darunter liegenden Zellen verdrängt und wandern zur Peripherie des Stammzellaggregats.

Im Gegensatz dazu zeigen neueste Untersuchungen mit Hilfe der Videomikroskopie, dass sich Stammzellen, die ungehindert auf einer PMEF-freien Kulturoberfläche wachsen, in horizontaler Richtung teilen (Abbildung 62B, 63). Diese Zellen unterliegen keiner räumlichen Limitierung, so dass sich die Kolonie als Monolayer ausbreiten kann, eine größere Fläche einnimmt und die Zellen eine flache Form besitzen.

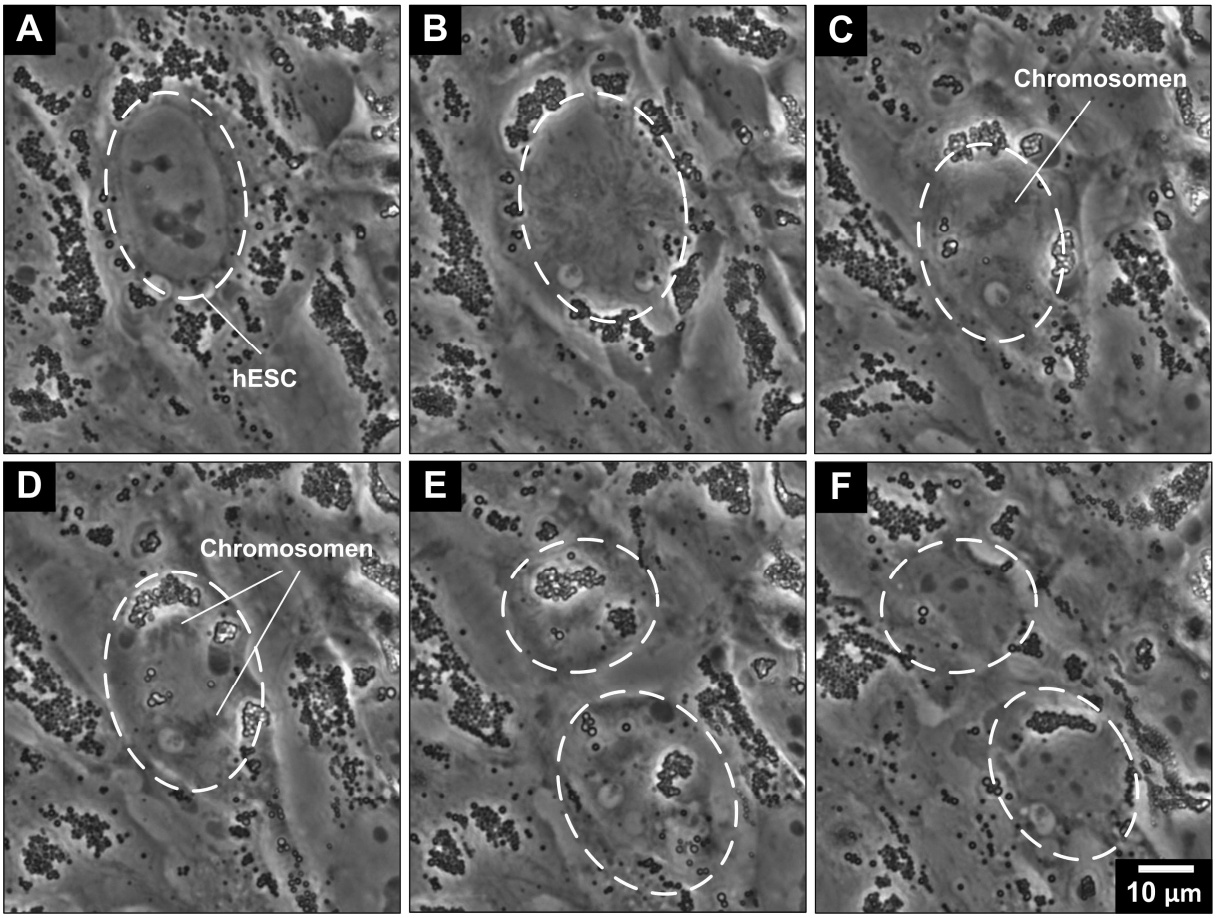


Abbildung 63: Zellteilung einer humanen embryonalen Stammzelle in einer Stammzellkolonie unter PMEF-freien Bedingungen. Während der Zellteilung konnten alle Mitosephasen identifiziert werden: Prophase (B), Metaphase (C), Anaphase (D) und Telophase (E); zur Verfügung gestellt von M. Gepp.

Unter PMEF-freien Bedingung waren die Einzelzellen einer hESC-Kolonie deutlich als flache, runde Zellen zu erkennen (Abbildung 63A). Während der Zellteilung löste sich in der Prophase zunächst der Zellkern auf und die Chromosomen kondensierten (Abbildung 63B). Die Chromosomen ordneten sich anschließend in der Äquatorialebene an (Metaphase, Abbildung 63C) und die Chromatiden wurden jeweils zu den entgegen gesetzten Polen gezogen (Anaphase, Abbildung 63D). Schließlich bildete sich die Kernmembran neu und es entstanden zwei unabhängige Tochterzellen (Telophase, Abbildung 63E, F).

Wie strukturieren sich hESC-Kolonien während der Adhäsion und Proliferation?

Das Anwachsen von abgelösten hESC-Koloniefragmenten ist ein entscheidender Schritt für die Initialisierung einer neuen Subkultur und nach der Kryokonservierung. Untersuchungen dieses Vorganges mit Hilfe der Videomikroskopie in Kapitel 4.1.1 (Abbildung 11) ermöglichten die Identifizierung von fünf unterschiedlichen Phasen der Adhäsion und Proliferation (Abbildung 64): In der Sedimentations-Phase sinken die hESC-Koloniefragmente auf die Zellschicht aus chemisch inaktivierten PMEF-Zellen ab, in der Kontakt-Phase weichen die PMEF vor dem Stammzellaggregat zurück, so dass dieses auf die zurückbleibende, von den Fibroblasten produzierte extrazelluläre Matrix absinkt. Dieser Prozess wurde zusätzlich durch MPLSM-Aufnahmen bestätigt, die zeigten, dass sich unter einer adhärenten Stammzellkolonie keine PMEF-Zellen befinden.

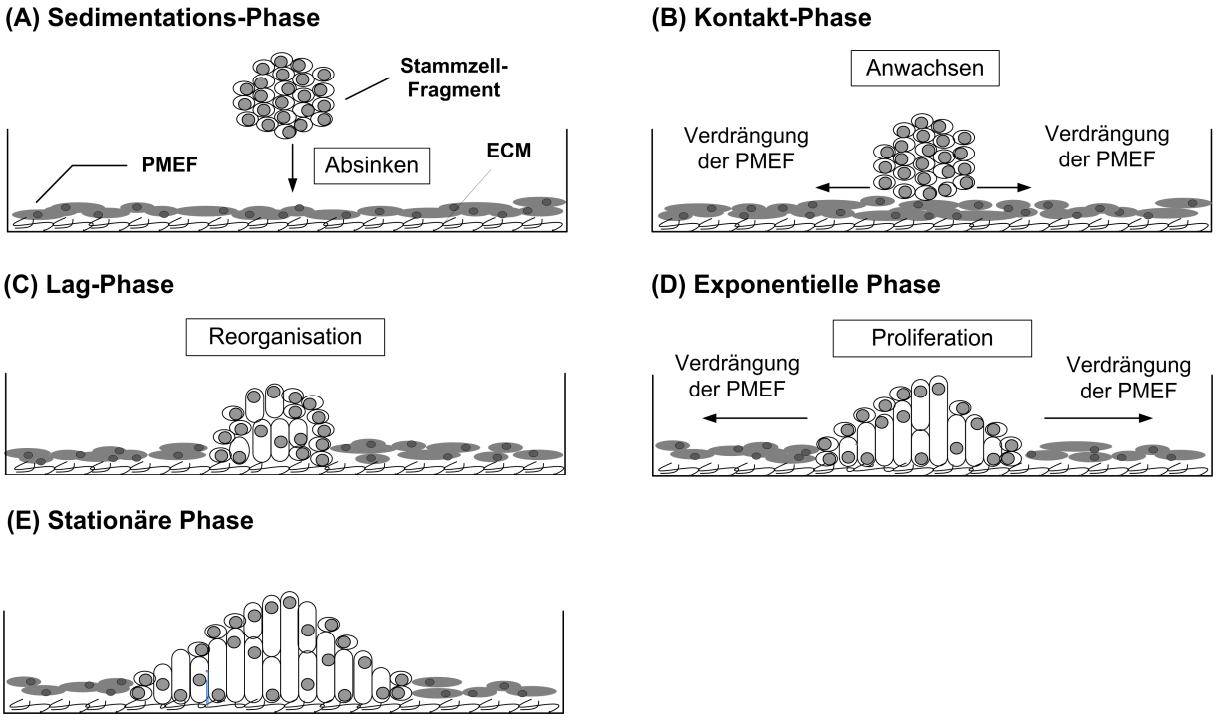


Abbildung 64: Modell der identifizierten Adhäsions- und Proliferationsphasen von Koloniefragmenten humaner embryonaler Stammzellen auf einem Monolayer aus chemisch inaktivierten PMEF-Zellen.

Die PMEF-Bewegung wird höchstwahrscheinlich durch ein mechanisches Signal der Stammzellen initiiert (Abbildung 65A). Die Stammzellen würden dabei über Transmembranproteine einen direkten Zell-Zell-Kontakt mit den Fibroblasten eingehen. Vor allem die Gruppe der Cadherine ist bei den embryonalen Stammzellen und den Fibroblasten für Zell-Zell-Kontakt und Signalübertragung verantwortlich (Larue et al., 1996; Mary et al., 2002; Mohamet et al., 2011). Diese transmembranen Glykoproteine besitzen eine extrazelluläre Domäne, um Kontakt mit anderen Zellen herstellen zu können und sind intrazellulär mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden (Perez-Moreno und Fuchs, 2006). Die Übertragung von Signalen in die Zelle wird durch die zytoplasmatische Cadherindomäne gewährleistet. Dabei verbinden Catenine intrazellulär die transmembranen Cadherine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts dar. Bei Aktivierung dieses Signalwegs könnte also direkt eine Zellbewegung der PMEF stattfinden.

Auch eine chemische Signalübertragung zwischen den Stammzellen und den PMEF wäre möglich, wobei sich die Fibroblasten durch negative Chemotaxis von den Stammzellen wegbewegen würden (Abbildung 65B). Dabei würden Stammzellen Signalfaktoren, höchstwahrscheinlich Zytokine, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen regulieren, freisetzen, die durch den Extrazellulärraum diffundieren und an spezifische Rezeptoren auf der Membranoberfläche der PMEF-Zellen binden. Die Rezeptoren sind Transmembranproteine, die nach Aktivierung eine Signaltransduktion ins Zellinnere ermöglichen, so dass, im Fall der negativen Chemotaxis, eine Fortbewegung der Zellen entlang eines Stoffkonzentrationsgradienten stattfindet. Es existieren Untersuchungen, die andeuten, dass externe chemotaktische Konzentrationsunterschiede wahrgenommen werden und sich in einem intrazellulären PIP3 Gradienten niederschlagen (Artemenko et al., 2011). Dieser wirkt auf eine Signalkaskade, die zur Polymerisation von Aktinfilamenten führt. Deren wachsendes distales Ende bildet intrazellulär Verbindungen mit der Plasmamembran aus und es kommt zur Ausbildung von Pseudopodien.

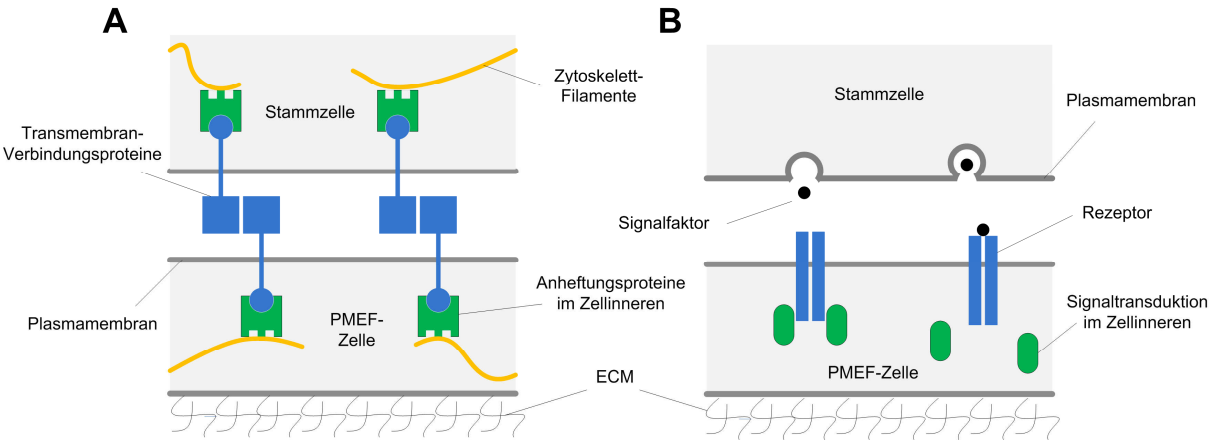


Abbildung 65: Modell zur mechanischen (A) oder chemischen (B) Signalübertragung zwischen humanen embryonalen Stammzellen und PMEF-Zellen.

Die beiden ersten der in Abbildung 64 beschriebenen Adhäsionsphasen sind Bestandteil der Lag-Phase, in der nur eine geringe Proliferation der hESCs stattfindet. Stattdessen kommt es nach der Adhäsion zu einer Reorganisation der Stammzellen, in der die Zellen ihre typische Koloniemorphologie einnehmen. Insgesamt dauert die Lag-Phase 20 bis 40 Stunden, bevor in der Exponentiellen Phase eine deutliche Proliferation der Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 11B, C). Kommt es aufgrund der Co-Kultur mit den PMEF-Zellen zu einer räumlichen Limitierung der Kulturoberfläche und zusätzlich aufgrund der Koloniegröße zu einer Nährstoffunterversorgung im Zentrum der Kolonie, gehen die Stammzellkolonien in die Stationäre Phase über, in der nahezu keine Vergrößerung der Koloniefläche in x- und y-Richtung mehr gemessen werden konnte (Abbildung 11C). Allerdings wurde ein verstärktes Ausbreiten in z-Richtung festgestellt. Beim Vergleich einer relativ jungen Kolonie (drei Tage nach der Passagierung) mit einer relativ alten Kolonie (sechs Tage nach der Passagierung) zeigte sich in MPLSM-Aufnahmen, dass die Höhe der jungen Kolonie von nur 40µm von einer bis zwei Zellschichten ausgefüllt wurde. Bei der älteren Kolonie wurde die Höhe von 80µm durch maximal vier Zellschichten erreicht.

Dieser Adhäsions- und Proliferationsverlauf entspricht nahezu komplett der idealisierten Wachstumskurve, wie sie in der Biologie bei Bakterien, Hefezellen aber auch der Ausbreitung von Epidemien gefunden wurde (Abbildung 66).

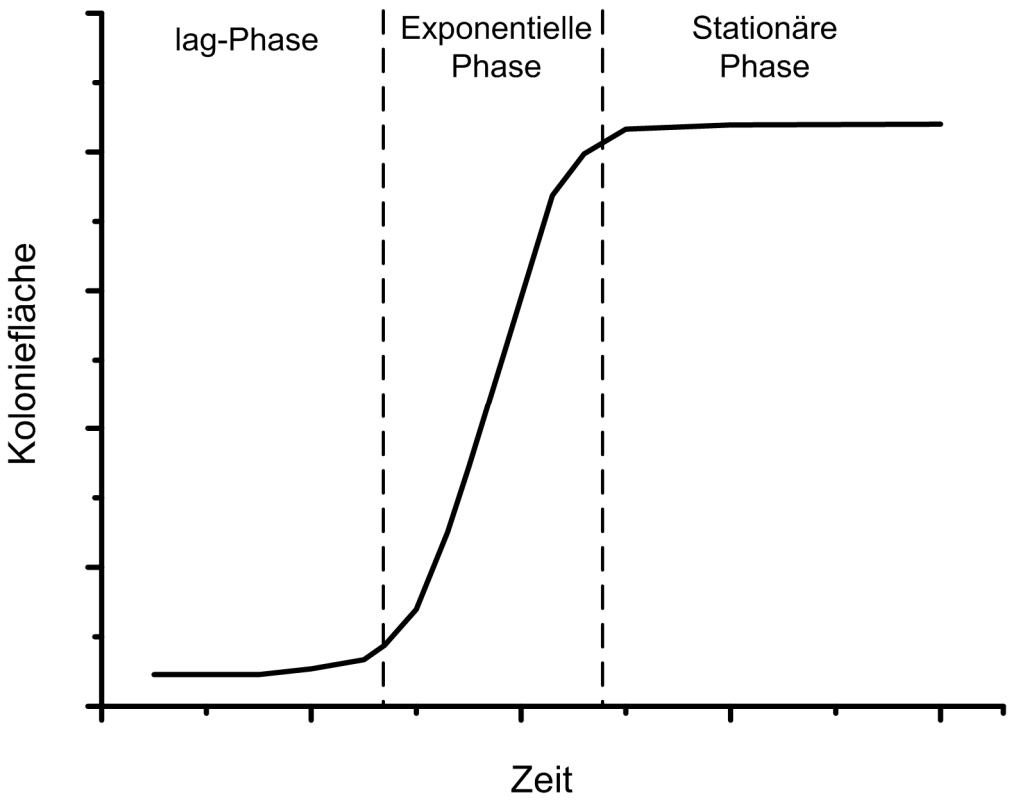


Abbildung 66: Idealisierte Wachstumskurve von humanen embryonalen Stammzellen, die in Lag-Phase, Exponentielle Phase und Stationäre Phase unterteilt werden kann.

Dabei kann in der Exponentiellen Phase mit der Gleichung:

$$\ln N = \ln N_0 + kt$$

der Anstieg der Individuenzahl beschrieben werden. N stellt dabei die Anzahl der Individuen zum Zeitpunkt t dar, N_0 die ursprüngliche Anzahl der Individuen und k die Wachstumskonstante (Wachstumsrate). Um die Verdoppelung der Individuenzahl zu bestimmen, wird, aus der beschriebenen Gleichung abgeleitet, folgende Formel verwendet:

$$\ln (2N_0) = \ln N_0 + kt \quad \longrightarrow \quad t = \frac{\ln 2}{k} \approx \frac{0{,}69}{k}$$

Für die Bestimmung der Wachstumskonstante wird der Logarithmus der Individuenzahl gegen die Zeit aufgetragen. Für die Exponentielle Wachstumsphase ergibt sich eine Gerade, deren Steigung die Wachstumskonstante darstellt.

Diese Berechnungen lassen sich auch auf das Koloniewachstum übertragen, wobei das dreidimensionale Wachstum der Stammzellkolonien in dieser Formel nicht berücksichtigt wird. Dennoch wird eine Abschätzung der Verdopplungszeit ermöglicht, die bei den untersuchten Kolonien zwischen 47 und 73 Stunden lag.

Welche Effekte besitzen enzymatische und mechanische Ablösemethode auf die Membranfunktionalität?

Um die Schädigungsmechanismen von enzymatischen und mechanischen Ablösemethoden während der Zellpräparation auf die Funktionalität der Stammzellen vor (Kapitel 4.1.1) und nach der Kryokon-

servierung (Kapitel 4.1.3) zu untersuchen, wurden die Stammzellkolonien sowohl mechanisch mit REM-Präparationsbesteck als auch enzymatisch mit 0,1%iger Kollagenaselösung abgelöst. Zusätzlich wurde die Suspension aus inhomogenen, enzymatisch abgelösten hESC-Koloniefragmenten in einem weiteren Schritt mit Hilfe eines Zellsiebes separiert, so dass nur Zellaggregate, die größer als 70µm waren, für die Analysen verwendet wurden. Dabei zeigte sich, dass mechanisch abgelöste Kolonien zwar nach dem Ablösen mit 83% eine leicht reduzierte Membranintegrität besaßen, enzymatisch abgelöste Fragmente dagegen mit 30% eine deutlich geringere Adhäsionsrate erzielten (Abbildung 9). Die Membranschädigung der mechanisch abgelösten Kolonien kann durch eine stärkere Vorbelastung der Zellen verursacht worden sein, da die Kolonien mit Hilfe von Nadeln oder Kanülen zunächst in kleinere Stücke geteilt und dann ohne eine weitere Behandlung von der Kulturoberfläche abgelöst werden. Dies führt zu einem hohen Anteil an zerstörten Stammzellen an der Fragmentperipherie, was durch die Analyse der Membranintegrität mit Hilfe von CLSM-Aufnahmen in Abbildung 8A bestätigt wurde. Gemäß Literaturangaben (Heng et al., 2007) können mechanische Belastungen zu einer verringerten Vitalität der Stammzellen führen.

Im Gegensatz dazu wird durch Verwendung der Kollagenaselösung der Zell-Substrat-Kontakt der Stammzellkolonien aufgelöst. Evseenko et al., 2009, zeigten, dass die extrazelluläre Matrix von undifferenzierten, humanen embryonalen Stammzellen in dieser Phase hauptsächlich aus Laminin-11 und Nidogen-1 besteht, Kollagen wird erst in der weiteren Entwicklung gebildet. Daher ermöglicht die Verwendung von Kollagenase das schonende Ablösen der kompletten Stammzellkolonie von der Oberfläche, da nur die von den Fibroblasten gebildete ECM angegriffen wird, ohne die Koloniestruktur zu verändern. Die abgelösten Stammzellkolonien wurden durch vorsichtiges Resuspendieren fragmentiert, wodurch eine inhomogene Suspension entstand, insgesamt aber ein geringerer mechanischer Stress auf die Stammzellen wirkte.

Zusätzlich zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen enzymatisch abgelösten Kolonien und Kolonien, die anschließend noch durch Zellsiebe mit einer Maschenweite von 70µm separiert wurden. Die inhomogene Fragmentsuspension, die mit 0,1% Kollagenase abgelöst und direkt ausplattiert wurde, erreichte nur eine Adhäsionsrate von 30%. Dagegen wurde durch eine zusätzliche Separation, bei der nur noch Aggregate mit einer Mindestgröße von 70µm verwendet wurden, eine Erhöhung der Adhäsionsrate auf 80% erreicht (Abbildung 9). Diese signifikante Varianz lässt eine Größenabhängigkeit des Anwachsprozesses vermuten, was auch durch Reubinoff et al., 2000, bei Koloniefragmenten beobachtet wurde, die aus weniger als 10 Zellen bestanden. Diese Theorie wurde überprüft, indem der Teil der Suspension, der das Zellsieb passieren konnte, auf einen Monolayer aus inaktivierten PMEF aufgegeben wurde. Es zeigte sich dabei, dass diese Suspension nicht in der Lage war, Kolonien auf PMEF zu bilden. Diese Größenabhängigkeit ist mit dem hier vorgestellten Adhäsionsmodell erklärbar (Abbildung 64). Bevor die abgelösten hESC-Koloniefragmente adhärieren können, müssen die inaktivierten PMEF zurückweichen und die von ihnen produzierte extrazelluläre Matrix freigeben. Dieser Vorgang wird entweder durch eine chemische oder mechanische Signalübertragung durch die embryonalen Stammzellen induziert (Abbildung 65). Besitzt das hESC-Koloniefragment nun nicht eine kritische Zellzahl, kann in beiden Transduktionswegen die Signalschwelle nicht überschritten werden, die eine Reaktion der PMEF-Zellen auslöst, so dass das hESC-Koloniefragment nicht adhärieren kann und in Apoptose übergeht (Watanabe et al., 2007).

Nach der Kryokonservierung der hESC-Koloniefragmente in einem Kryomedium aus 30% FBS und 10% DMSO mit 1°C/min war die Membranintegrität der Fragmente mit ungefähr 70% immer noch sehr hoch, nur mit dem mechanischen Ablöseprotokoll fiel der Wert signifikant auf 35% (Abbildung 20G).

Dieser Effekt könnte durch die bereits beschriebenen Zellschädigungen, die während der Probenpräparation entstanden sind, verursacht worden sein. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von Heng und Liu von 2007, die ebenfalls einen negativen Einfluss von mechanischen Ablösemethoden auf die Kryokonservierungseffizienz nachweisen konnten. Dabei könnten gerade die zerstörten Zellmembranen in der Peripherie der Stammzellkolonien als Nukleationskeime fungieren (Toner, 1990), wobei der Kristallisationsprozess innerhalb der Probe ausgelöst wird. Sollte dieser Prozess induziert werden, bevor ein ausreichender Wasserverlust bei den Stammzellen gemäß Mazur´s Zwei-Faktor-Hypothese (Mazur et al., 1972) stattfinden konnte, bildet sich intrazelluläres Eis, das zu signifikanten Schäden an der Zellmembran und den Organellen führt (Mazur, 1963). Zusätzlich sind die Stammzellen innerhalb einer Kolonie durch Gap-Junctions verbunden, so dass sich der Kristallisationsvorgang über diese im ganzen Fragment ausbreiten kann (Wong et al., 2004; Hunt und Timmons, 2007). Diese Art der Ausbreitung intrazellulären Eises wurde schon in mehreren Geweben nachgewiesen (Berger und Uhrik, 1996; Acker et al., 1999) und könnte, ausgehend von einem intra- oder extrazellulär auftretenden Nukleationskeim, für die geringere Vitalität von mechanisch abgelösten hESC-Koloniefragmenten beim Einfrieren mit langsamen Kühlraten verantwortlich sein.

Zusätzlich besaßen nur 2% bis 10% der eingefrorenen Fragmente nach der Kryokonservierung die Fähigkeit zur Adhäsion auf einem Monolayer aus inaktivierten Mausfibroblasten und zur Koloniebildung (Abbildung 20H). Die niedrigste Anwachsrate für die enzymatisch abgelösten Fragmente könnte durch die zu geringe Aggregatgröße eines Teils dieser Fragmente erklärt werden. Amit et al., 2000, zeigten, dass eine Fragmentgröße von 100 bis 500 Zellen für die Kryokonservierung optimal ist.

Insgesamt steht dieses Ergebnis in einem deutlichen Widerspruch zu der ermittelten Membranintegrität nach der Kryokonservierung. Die Mechanismen, die für das geringe Anwachspotential der Stammzellen verantwortlich sind, führen also nicht direkt nach dem Auftauen zu einem feststellbaren Verlust der Membranintegrität. Nekrose als Hauptursache kann daher vermutlich ausgeschlossen werden, da diese als Resultat von Kryoschäden durch Eiskristallbildung oder osmotischem Schock zu einem direkten Verlust der Membranintegrität führen würde (Heng et al., 2007).

Um zu untersuchen, ob eine nach der Kryokonservierung veränderte Zell- oder Membranstruktur für die geringe Adhäsionsrate verantwortlich ist, wurden hochaufgelöste MPLSM-Aufnahmen der Stammzellkolonie analysiert. Dabei zeigte sich in Abbildung 16 eine deutliche Strukturveränderung der Stammzellen nach der Kryokonservierung. So waren ein deutliches Anschwellen der Zellen und eine große Anzahl an Membranvesikel mit einer Größe von bis zu 30µm am Rand und innerhalb der Kolonie erkennbar. Dabei ist wahrscheinlich, dass die Vesikelbildung durch eine Apoptose der Zellen induziert wurde, indem der Caspase3-Signalweg durch den Kryokonservierungsprozess ausgelöst wurde (Baust et al., 2004). Dieser Vorgang resultiert in der Abschnürung von sogenannten „blebs“ und „apoptotic bodies“ von den Zellen (Goldman et al., 1988). Hauptursache für Zellschäden während der Kryokonservierung mit langsamen Kühlraten stellt die Bildung von intrazellulärem Eis dar (Luyet, 1937; Farrant, 1977). Um dies zu vermeiden, ist nach der Zwei-Faktor-Hypothese von Mazur (Mazur et al., 1972) eine ausreichende Dehydratation der Zellen notwendig. Dies wird bei Einzelzellen durch eine entsprechend langsame Kühlrate erreicht, allerdings ist bei dreidimensionalen Zellaggregaten dieser Vorgang wesentlich komplexer. So zeigten Untersuchungen an Hepatozyten, dass die hydraulische Leitfähigkeit in Sphäroiden geringer ist als in Einzelzellen (Korniski et al., 1999), wodurch der notwendige Wasserverlust der Zellen nur vermindert stattfinden kann. Dies resultiert in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung in den hESC-Koloniefragmenten, wodurch auch apoptotische Vorgänge in der Zelle ausgelöst werden. Neueste Untersuchungen

zeigten, dass durch die Verwendung von Y-27632, eines selektiven Inhibitors der Rho-Kinase (Narumiya et al., 2000), das Überleben von in Einzelzellen dissoziierte hESCs deutlich verbessert wird (Watanabe et al., 2007). Dies könnte auch einen deutlichen Vorteil für die Kryokonservierung von hESCs bringen, da das Einfrieren von dissoziierten Einzelzellen eine gleichmäßige Dehydratation der Zellen, eine optimale Wärmeleitung und eine ungehinderte Diffusion des Kryoprotektivs ermöglicht.

Zusätzlich ist nach der Kryokonservierung die Membranintegrität oftmals aufgrund der hohen osmotischen Kräfte, der die Membran während des Einfrierens und Auftauens ausgesetzt ist, gestört (Dankberg und Persidsky, 1976; Morris, 1981). Dies könnte zu einer Beeinflussung der für die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion verantwortlichen Transmembranproteine führen, wodurch die nötigen zellulären Prozesse zur Verdrängung der PMEF nicht initiiert werden können.

Videomikroskopische Untersuchungen des Adhäsionsprozesses nach dem Auftauen ergaben weiterhin, dass die angewachsenen Zellen zunächst in einer verlängerten Lag-Phase von mindestens 80 Stunden verbleiben (Abbildung 21C), bis sich der Zellstoffwechsel wieder komplett vom Stress der Kryokonservierung erholt hat (McGann et al., 1988) und wieder eine Proliferation der Zellen detektiert werden konnte.

Außerdem geben neueste Untersuchungen mit Hilfe von Affimetrixanalysen Hinweise auf eine signifikante Veränderung des Transkriptoms von hESCs, die als Fragmente mit langsamen Kühlraten eingefroren wurden (Wagh et al., 2011). So kam es zu einer erhöhten Expression von Genen, die an Apoptose- und Morphogenesevorgängen beteiligt sind, wodurch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden.

Um auszuschließen, dass das verwendete Kryomedium mit 10% DMSO und 30% FBS einen Effekt auf die Membranintegrität besitzt, wurde die Adhäsionsrate der Koloniefragmente nach einer 30minütigen Inkubation im Kryomedium untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anwachsrate nach der Inkubation im Kryomedium identisch mit der Anwachsrate von nicht inkubierten Stammzellen war (Daten wurden nicht gezeigt). Das Kryomedium scheint also nicht verantwortlich für die massiven Veränderungen der Koloniestruktur zu sein. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von Ware et al., 2005, die ebenfalls keinen negativen Effekt des DMSOs auf die Vitalität und Anwachsrate der Kolonien feststellen konnten.

Welche Schädigungsmechanismen wirken auf adhärente hESC-Kolonien während der Kryokonservierung?

Um das Problem der verminderten Adhäsionsfähigkeit der hESC-Koloniefragmente nach der Kryokonservierung zu umgehen, wurden in einem nächste Schritt in Kapitel 4.1.3 die Effekte während des Einfrierens adhärenter embryonaler Stammzellkolonien untersucht. Die oberflächenbasierte Kryokonservierung besitzt den Vorteil, dass die Zellen in ihrem physiologischen Zustand verbleiben können (Hornung et al., 1996), so dass die Zell-Zell-Kommunikation und Proteininteraktionen während des Einfriervorganges aufrecht erhalten bleiben. Eine erfolgreiche Kryokonservierung von direkt wieder verwendbaren, adhärenten Zellen würde den zeitaufwendigen Prozess des Anwachsens und der Expansion von eingefrorenen Suspensionszellen vermeiden (Malpique et al., 2009). Außerdem kann mit einer zusätzlichen Beschichtung der Zellen oder der Kulturoberfläche mit ECM und anderen Hydrogelen die Adhäsion verbessert und die Zellen vor mechanischen Belastung geschützt werden (Tomlinson und Sakkas, 2000; Katsen-Globa et al., 2008). Um die Kryokonservierungseffizienz von adhärenten Stammzellkolonien evaluieren zu können, sind etablierte Methoden zur Vitalitätsbe-

stimmung wie die Verwendung von Neubauer-Zählkammern nicht geeignet. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst ein neuartiges Auswertungssystem entwickelt, mit dem die exakten Flächen der Kolonien vor und nach der Kryokonservierung ermittelt und miteinander verglichen werden. Diese Methode ermöglicht eine realistischen Ermittlung des Kryokonservierungserfolges von adhärenten Stammzellkolonien und die Darstellung des Wachstumsprozesses der Kolonien über die Zeit.

Die Kryokonservierung von adhärenten hESC-Kolonien mit dem gleichen Kryomedium und der gleichen Kühlrate, die auch für die abgelösten Fragmente verwendet wurden, führte zu Ergebnissen, die mit denen von Ji et al. und Heng et al. übereinstimmen (Ji et al., 2004; Heng et al., 2006). So war innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Auftauen ein Rückgang der vitalen Restflächen zu verzeichnen (Abbildung 24), der auf die von Heng et al. postulierte Apoptose innerhalb der ersten 90 Minuten nach dem Auftauen zurückgeführt werden könnte. Nach einer weiteren 24-stündigen Kultivierung war ein Wachstum der Kolonien auf ungefähr 74% der Ausgangsfläche erkennbar, so dass die Zellen nach einer Lag-Phase wieder mit der Proliferation begannen. Nach dem Auftauen waren häufig die Zellen im Zentrum der Stammzellkolonie abgestorben und lösten sich mit der Zeit aus dem Zellverband (Abbildung 25). Dabei könnte die erhöhte Dicke der Kolonien im Kolonieinneren zu einer veränderten Abkühlrate und zu einer verlangsamten Dehydratation beim Einfriervorgang führen, wodurch die Wahrscheinlichkeit intrazellulärer Eiskristallbildung und somit des Absterbens der betroffenen Koloniefragmente erhöht ist (Mazur et al., 1972).

Zusätzlich zeigten die adhärenten Stammzellkolonien, die mit einer langsamen Kühlrate eingefroren wurden, eine deutliche Größenabhängigkeit der Kryokonservierungseffizienz (Abbildung 26), im Gegensatz zu den adhärent vitrifizierten Kolonien (Abbildung 31). Dies spricht dafür, dass Kristallisationsvorgänge innerhalb der Kolonie, die nur bei langsamen Kühlraten auftreten, für diesen Effekt verantwortlich sind. Dabei konnte ein kritischer Koloniedurchmesser von 250µm identifiziert werden, dessen Unterschreitung zu einem rapiden Abfall der vitalen Restflächen nach der Kryokonservierung führte. Ab einem Durchmesser von 750µm konnte ebenfalls eine Abnahme der vitalen Restflächen auf 43% festgestellt werden, wodurch eine optimale Größe der adhärenten hESC-Kolonien für die Kryokonservierung mittels langsamer Kühlraten definiert werden konnte. Für eine optimale Kryokonservierung sollten die Stammzellkolonien daher nicht kleiner als 250µm und nicht größer als 750µm im Durchmesser sein. Wie bereits beschrieben, lösten sich bei großen Kolonien häufig Kolonieteile aus dem Zentrum, da dort aufgrund der erhöhten Koloniedicke (3-4 Zellschichten) eine geringere Abkühlrate und Dehydratation beim Einfriervorgang stattfindet. Der Verlust der Kolonien unter 250µm Durchmesser könnte aus einem geringeren Kontakt der Kolonie mit den benachbarten PMEF-Zellen resultieren, da bei Versuchen mit einer erhöhten Zelldichte eine erhöhte Überlebensrate festgestellt werden konnte (Daten wurden nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde festgestellt, dass häufig benachbarte Stammzellkolonien, die auch ungefähr die gleiche Größe besaßen, unterschiedlich auf den Kryokonservierungsprozess reagierten, so dass eine Kolonie vollständig verloren ging, während bei der anderen eine vitale Restfläche von 70-80% gemessen werden konnte. Dieses Phänomen des asymmetrischen Zellverlustes innerhalb derselben Probe kann ebenfalls, wie bereits in Suspension festgestellt, aus einer Propagation intrazellulärer Eiskristalle durch Gap-Junctions innerhalb der Zellkolonie resultieren (Hunt und Timmons, 2007). Somit könnte bereits das Auftreten von intrazellulärem Eis in einer einzigen Zelle zum Verlust der kompletten Kolonie führen.

Die Untersuchung der Koloniestruktur der kryokonservierten, adhärenten Stammzellen mittels MPLSM zeigte vergleichbar zu Fragmenten, die in Suspension eingefroren wurden, das Anschwellen

der Stammzellen und das Auftreten von Membranvesikeln im Inneren sowie außerhalb der Kolonien (Abbildung 27). Die Vesikel entstehen wahrscheinlich aufgrund der gleichen apoptotischen Vorgänge, wie sie bereits bei hESC-Fragmenten, die in Suspension eingefroren wurden, beschrieben wurden.

Das in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Protokoll zur Kryokonservierung adhärenter hESC-Kolonien erzielte insgesamt eine Überlebensraten von 52% und erreichte damit eine bedeutende Verbesserung des Kryokonservierungserfolges im Vergleich zu in Suspension kryokonservierten hESC-Koloniefragmenten, die nur eine maximale Adhäsionsrate von 10% erreichten.

Auf eine komplette Vermeidung intrazellulärer Eiskristallbildung zielt die Methode der Vitrifikation ab, durch welche mit Hilfe sehr schneller Abkühlraten eine Verglasung des Mediums und des Zytoplasmas erreicht werden kann. Zusätzlich zeigten MPLSM-Aufnahmen in Kapitel 4.1.1, dass fast das gesamte Volumen einer Stammzelle von ihrem Kern ausgefüllt wird. Dies führt dazu, dass die Zelle nur wenig osmotisch aktives Volumen besitzt, was Auswirkungen auf die Kryokonservierung hat. So kann vermutet werden, dass der Wasseraustausch mit der Umgebung sehr schnell vonstatten gehen kann und damit schnellere Einfrierraten bei hESC-Zellen theoretisch möglich wären. Daher wurden in weiteren Untersuchungen auch Vitrifikationsprotokolle in Betracht gezogen. Bis heute stellt die Vitrifikation die meistgenutzte Form der Kryokonservierung von hESCs, Spermien und Eizellen dar. Grundprinzip dieser Methode ist eine Verglasung der verwendeten Zelltypen, welche durch extrem hohe Abkühlraten und sehr hohe Konzentrationen an Kryoprotektiva erreicht werden kann. Dadurch lässt sich eine intrazelluläre Eiskristallbildung, welche in der Regel zu irreparablen Schäden an Organellen und Membranen der Zellen führt, weitestgehend vermeiden.

Erste Modelle zur Vitrifikation von hESCs wurden 2001 von Reubinoff et al. entwickelt und bis heute ständig weiter verbessert (Reubinoff et al., 2001; Zhou et al., 2004). Allerdings sind die entwickelten Methoden nicht geeignet, um eine optimale Kryokonservierung von Stammzellen für eine therapeutische Anwendung zu erreichen. Die meist auf einer Verwendung von kleinen Plastikkapillaren, sogenannten „Straws“, basierende Methode zur Vitrifikation von Stammzellkolonien in Suspension sind nur geeignet, um eine sehr geringe Menge an hESCs zu kryokonservieren (ca. 8-12 Kolonien pro Straw). Um eine größere Anzahl an Kolonien einfrieren zu können, wurde diese Methode daher in Kapitel 4.1.3 auf adhärente Stammzellen übertragen. Dabei zeigt die Kryokonservierungseffizienz von nahezu 100%, dass die ausgespreitete, adhärente Form der Kolonien zu einer optimalen Wärmeableitung führt, wodurch anscheinend der Prozess der Verglasung des intrazellulären Mediums begünstigt wird (Abbildung 29). Untersuchungen mit dem MPLSM zeigten zusätzlich keine signifikanten Veränderungen der Membranstruktur oder die Bildung von Vesikeln (Abbildung 32). Apoptotische und nekrotische Vorgänge, die durch die Kryokonservierung induziert werden können, wurden daher nicht festgestellt. Durch die Vermeidung von intrazellulärem Eis schien es insgesamt also möglich zu sein, einen Großteil der zellulären Schädigungsmechanismen zu verhindern. Zusätzlich kommt es durch die Bildung von Eiskristallen während der Kryokonservierung mit langsamen Kühlraten zu einer Aufkonzentrierung der löslichen Stoffe, also auch der kryoprotektiven Substanzen. Dies führt dazu, dass obwohl die Anfangskonzentration der Kryomedien von den Zellen toleriert wird, es während des Einfriervorganges dennoch zu Schädigungen kommen kann. Im Gegensatz dazu wird für die Vitrifikation von Anfang an eine höhere Konzentration der Kryomedien benötigt, durch die nicht stattfindende Kristallisation bleibt diese allerdings während des ganzen Prozesses konstant, so dass auf die Zellen ein geringer osmotischer Stress wirkt.

Die Analyse der Überlebensraten in Abhängigkeit der Koloniegröße ergab dabei, anders als bei der Kryokonservierung mittels langsamer Kühlraten, keine Existenz einer kritischen Koloniegröße (Abbildung 31).

Diese sehr guten Ergebnisse der Vitrifikation adhärenter hESCs führten zu der Überlegung, ob eine erfolgreiche Verglasung auch ohne direkten Flüssigstickstoffkontakt möglich ist. Nur so kann eine sterile Ablage der Zellen ohne Gefahr einer Übertragung von Bakterien und Viren zwischen den Proben gewährleistet werden. Viele Krankheitsüberträger können bei den für die kryogene Lagerung üblichen Temperaturen (-160 °C) überleben (Bielanski et al., 2003; Hubalek, 2003). So konnte der Ausbruch von Hepatitis B unter den Empfängern von autologem Knochenmark auf eine Lagerung des Materials in kontaminiertem, flüssigen Stickstoff zurückgeführt werden (Tedder et al., 1995).

Um dieses Risiko so gering wie möglich zu halten, wurden bereits verschiedene Strategien verfolgt: die Proben wurden in steril filtriertem Stickstoff vitrifiziert oder es wurden zusätzliche Gefrierbehälter zur Lagerung verwendet, so dass während der Lagerung kein direkter Stickstoffkontakt bestand (Vajta et al., 1998b; Heng et al., 2005a). Diese methodischen Adaptionen bieten zwar einen relativ hohen Schutz gegen Folgekontaminationen, der Vitrifikationsschritt selbst erfolgt aber immer direkt im Stickstoff, und so sind diese Verfahren immer noch nicht ausreichend sicher.

Um eine Vitrifikation ohne den direkten Kontakt mit flüssigem Stickstoff zu ermöglichen, muss die Wärmeableitung durch die Substratoberfläche, auf welcher die Stammzellkolonien kultiviert werden, ähnlich hohe Werte erreichen, wie durch den Kontakt mit Flüssigstickstoff. Auch muss eine geeignete Kryokompatibilität der Substrate gegeben sein, um ein Eindringen von Flüssigstickstoff ins Substratinnere auszuschließen. Dies wurde durch weiterführende Untersuchungen zur Entwicklung eines sterilen Vitrifikationssubstrates realisiert.

Ersatz der Serumfunktion durch den Zusatz von Poloxameren zum Kryomedium?

Eine bedeutende Voraussetzung für die Prozessstandardisierung und den Einsatz von humanen Stamm- und Vorläuferzellen in Zelltherapien ist die Vermeidung von tierischen Bestandteilen sowohl während der Isolation, Kultivierung, aber auch der Kryokonservierung. Vor allem kann das weit verbreitete FBS als xenogenes Naturprodukt mit einer undefinierten und stets variierenden Konzentration an Proteinen und Wachstumsfaktoren in Medien bei Transplantationen zu verschiedenen Komplikationen führen, wie z.B. der Übertragung von Pathogenen oder einer erhöhten Abstoßungsreaktion durch das Empfängerimmunsystem (Ellerstrom et al., 2006).

Während kommerzielle Medien für die serumfreie Expansion und Gewinnung von Stammzellen bereits vielfach erhältlich sind, enthalten Einfriermedien immer noch Serum- oder Proteinbestandteile (Buchanan et al., 2004; Lindroos et al., 2009; Liu et al., 2010; Thirumala et al., 2010). Daher war es weiterhin Ziel dieser Arbeit, ein chemisch vollständig definiertes, proteinfreies Kryomedium für eine langzeitstabile Lagerung von Stammzellen und Lymphozyten im Hinblick auf den Erhalt der Multipotenz und Funktionalität zu evaluieren.

Kryoprotektive Proteine aus Serumkomponenten wie fetales Kälberserum (FBS) und bovines Serumalbumin (BSA) stellen osmotisch aktive Kolloide biologischen Ursprungs dar. Um die Funktion von Serum im Kryomedium zu ersetzen, wurde das Poloxamer 188 als Additiv untersucht. Es wurde bisher kaum bei Säugerzellen in der Kryokonservierung genutzt, findet jedoch bereits in vielen Bereichen der Pharmaindustrie und Biotechnologie Anwendung. So erhöht die Zugabe des Poloxa-

mers die Toleranz von Zellen gegen Scherkräfte, die in Bioreaktoren auftreten (Ramirez und Mutharasan, 1990; al-Rubeai et al., 1993) und verbessert die Aufnahme von schwer löslichen Wirkstoffen (Batrakova et al., 1998). Darüberhinaus führte die außergewöhnlich niedrige Toxizität des Blockpolymers (Ashwood-Smith et al., 1973), die auch in Kapitel 4.1.3 bei humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 33), dazu, dass es von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA bereits regulatorisch als sicher eingestuft wurde.

All diese Voraussetzungen weisen das Poloxamer 188 als geeigneten Kandidaten für die Entwicklung eines proteinfreien Kryomediums aus. Zellen, die im proteinfreien Kryomedium mit 1% Poloxamer 188 eingefroren wurden, erreichten in allen Fällen ein vergleichbares oder besseres Ergebnis zu Zellen, die in der serumhaltigen Kontrolle konserviert wurden (Kapitel 4.1.4 und 4.2.2). Dabei wird angenommen, dass das Blockpolymer aufgrund seines amphiphilen Charakters mit dem hydrophoben Polypropylenoxidanteil in die Zellmembran eingebaut oder durch Van-der-Waals-Kräfte an die Membran adsorbiert wird, wobei die hydrophilen Ketten aus Polyethylenoxid in den extrazellulären Raum ragen (Anthony et al., 1997). Biologische Membranen sind als flexible Lipiddoppelschicht aufgebaut. Während der Kryokonservierung kommt es durch die abnehmende Temperatur zu einer reduzierten Molekularbewegung innerhalb der Membran und benachbarte Lipide beginnen, miteinander zu interagieren. Dies führt dazu, dass die normalerweise flexible Zellmembran vom flüssigen in den gelartigen Aggregatszustand übergeht und an Beweglichkeit verliert (Williams et al., 1981). Da nicht die komplette Membran simultan diese Strukturveränderung durchläuft, kann es lokal zu einer lateralen Phasenverschiebung kommen. Dabei kann die Membranintegrität und –funktion gestört werden (Quinn, 1985). Der Einbau der Poloxamermoleküle führt zu einer gleichmäßigen Reduktion der Membranfluidität, so dass sich die Steifheit der Zellmembran erhöht, ohne dass eine laterale Phasenseparation auftritt (Abbildung 67) und es zu Membranschäden kommt.

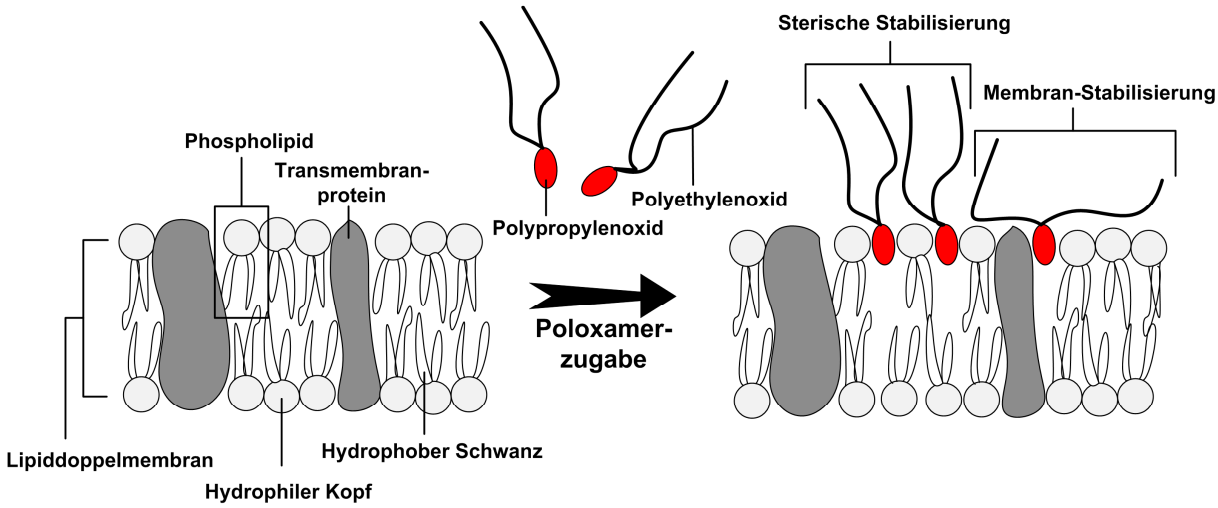


Abbildung 67: Wirkmechanismen des Poloxamers 188 auf die Zellmembran, die zur Reduktion von mechanischen Schäden während der Kryokonservierung führen.

Zusätzlich kommt es durch die langen, hydrophilen Polymerketten, die in das Medium ragen, zu einer sterischen Stabilisierung. Das bedeutet, dass eine Überlappung von zwei Zellen, an denen sich das Blockpolymer angelagert hat, thermodynamisch und osmotisch ungünstig ist, so dass die Zellen direkt wieder auseinanderweichen. Dieser Prozess verhindert die Zusammenlagerung der Einzelzellen, wodurch es während des Einfriervorgangs zu weniger mechanischen Schäden durch Scherstress und zu einer homogenen Kristallisation kommt (Anthony et al., 1997). Auch eine Überlagerung der adsorbierten Poloxamermoleküle wird verhindert, so dass die Membran zusätzlich stabilisiert wird.

Darüber hinaus verringert das Poloxamer als nichtionisches Tensid den Einfluss von Luftblasen während des Einfrier- und Auftauvorganges. Bilden sich Luftblasen während der Probenpräparation oder der Kryokonservierung, könnten Zellen daran adhärieren und durch hydrodynamische Kräfte, die auftreten, wenn die Luftblasen platzen, geschädigt werden (Meier et al., 1999). Das Poloxamer 188 erhöht dabei die Stabilität der Luftblasen, so dass diese schädigenden Kräfte minimiert werden (Handa-Corrigan et al., 1989; Jordan et al., 1994). Diese Charakteristika erklären den erfolgreichen Austausch von tierischen Proteinen durch das Poloxamer 188 unter Erhalt der Zellvitalität und –funktionalität.

DMSO-Reduktion durch Kombination mit extrazellulären Kryoprotektiva?

Die Effekte einer Reduktion des zytotoxisch wirkenden DMSO auf die Zellvitalität und –funktionalität von adulten Stamm- und Vorläuferzellen (Kapitel 4.1.4) sowie Zellen des Immunsystems (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) wurden ebenfalls untersucht, da DMSO bekannt dafür ist, epigenetische Veränderungen auszulösen und toxische Auswirkungen auf Zellen zu besitzen (Willhite und Katz, 1984; Arav et al., 1993). Zusätzlich konnten Baxter und Lathe, 1971, die Veränderung des Enzyms FDPase (Fructosediphosphatase) durch DMSO als spezifische Ursache der Zellschädigung nachweisen.

Ein etabliertes Verfahren zur DMSO-Reduktion ist die Verwendung von extrazellulären, nichtmembrangängigen Kryoprotektiva. Die Wirkung von zum Beispiel Sacchariden beim Gefrieren besteht zum einen in der Beeinflussung der Dehydratation während des Einfrierens. Zum anderen agieren sie während des Auftauvorganges als wichtiger osmotischer Puffer (Friedler et al., 1988; Leibo, 1989; Suzuki, 1990; Paynter et al., 2005). Neben ihrer osmotischen Aktivität erklärt sich die kryoprotektive Wirkung der Zucker durch einen Mechanismus, der auf der Substitution von Wassermolekülen basiert und dadurch Proteine und Membranen stabilisiert (Wolfe und Bryant, 1999). Obwohl Wolfe und Bryant die Vorteile der Trehalose in der guten Glasbildungseigenschaft, der hohen Stabilität und der schwachen Kristallisationstendenz sahen, zeigte sich allerdings, dass ein kompletter Ersatz von DMSO durch Trehalose zwar eine Protektion der Zellen ermöglichte, Trehalose allerdings durch die niedrigen Überlebensraten keine Alternative zu DMSO darstellt (Abbildung 38). Eine Halbierung der DMSO-Konzentration im proteinfreien Medium auf 5% erzielte für adulte Stamm- und Vorläuferzellen nahezu identische Vitalitäts- und Funktionalitätsergebnisse, so dass die Schutzwirkung der geringeren DMSO-Konzentration für eine effiziente Protektion der Zellen auszureichen scheint (Abbildung 41).

Die Kryokonservierung von PBMCs im proteinfreien Medium mit 5% DMSO führte dagegen zu deutlich verminderten Resultaten in allen durchgeführten Analysen (Kapitel 4.2.2). Diese Unterschiede erklären sich dadurch, dass die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung neben der Kühlrate von spezies- und zelltypspezifischen Eigenschaften der Zellmembran abhängt (Leibo, 1989)(Abbildung 68).

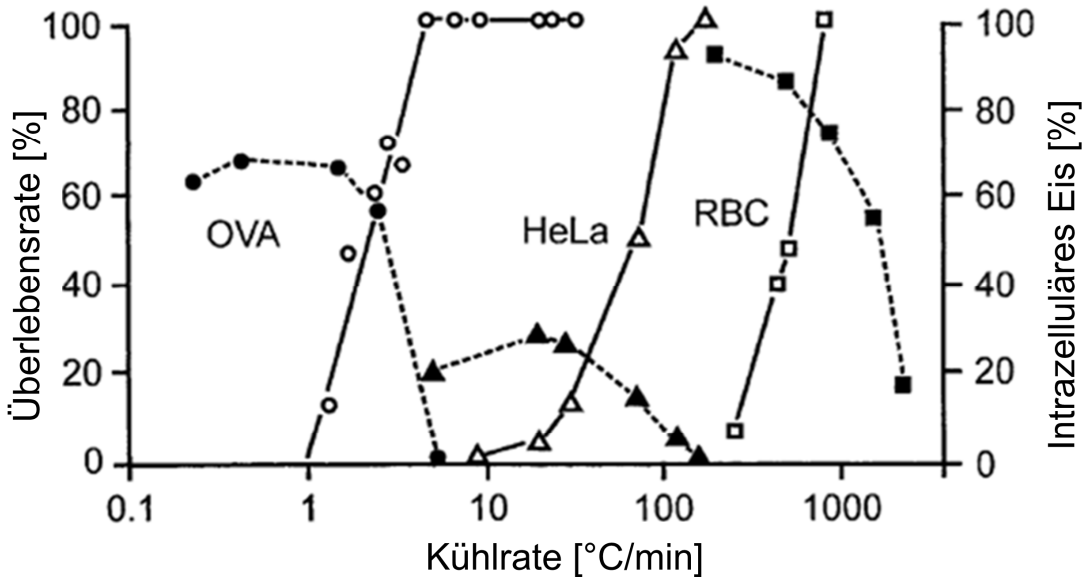


Abbildung 68: Abhängigkeit der intrazellulären Eiskristallbildung von zelltypspezifischen Eigenschaften und Kühlrate (Abbildung verändert aus Leibo, 1977).

Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen der Überlebensrate (gestrichelte Linie) und dem Anteil der Zellen, die intrazelluläres Eis bildeten (durchgezogenen Linie) bei unterschiedlichen Kühlraten in Mausoozyten (OVA), HeLa-Zellen und Erythrozyten (RBC).

Diese Membraneigenschaften sind definiert durch die hydraulische Konduktivität einer Zelle und einer temperaturabhängigen Permeabilitätskonstante für Wasser. Ein weiterer entscheidender Faktor für die Kryokonservierungseffizienz ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Zelle (Mazur, 1963; Mazur et al., 1972). Bei einem großen Zelldurchmesser dauert die Dehydratation wesentlich länger und entsprechend langsame Kühlraten müssen angewandt werden, um intrazelluläres Eis zu vermeiden. Je höher der Wasserpermeabilitätskoeffizient einer Zelle ist, desto schneller kann der Wasserverlust während des Abkühlvorgangs ablaufen und desto höhere Kühlraten werden ohne intrazelluläre Eiskristallbildung toleriert. Untersuchungen an Embryonen von Mäusen und Hamstern, deren Oberfläche zu Volumen-Verhältnis vergleichbar ist, konnten zeigen, dass Hamsterzellen, deren Wasserpermeabilitätskoeffizient höher ist als der von Mäusen, höhere Abkühlgeschwindigkeiten überlebten (Leibo, 1989). Somit könnten die unterschiedlichen Membraneigenschaften der PBMCs im Vergleich zu adulten Stammzellen dazu führen, dass eine alleinige Reduktion der DMSO-Konzentration keine ausreichende Protektion der Zellen ermöglicht. Dagegen ermöglichte in Kapitel 4.2.1 die Kryokonservierung in einem BSA-haltigen Medium unter Verwendung von Hydroxyethylstärke als extrazelluläres Kryoprotektiv mit einer DMSO-Konzentration von 5% eine nahezu identische Konservierung der Zellen im Vergleich zu 10% DMSO. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine effiziente DMSO-Reduktion von den spezifischen Zelleigenschaften abhängt und somit individuell adaptiert werden muss.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Verbesserung der Kryokonservierung von therapeutisch relevanten, differenzierten bzw. differenzierbaren Zellen durch die Etablierung eines oberflächenbasierten Vitrifikationsprotokolls und durch die Entwicklung von Strategien zur Reduktion der zytotoxischen DMSO-Konzentration erreicht werden. Zusätzlich gewährleistet die Evaluierung eines proteinfreien, chemisch vollständig definierten Kryomediums, das auf dem Poloxamer 188 als Serumersatz basiert, eine erhöhte Reproduzierbarkeit und Standardisierung des Einfrier- und Auftauprozesses, selbst bei einer Langzeitlagerung der Proben. Abgeschlossen wurden die Untersuchungen zur Entwicklung neuer, effizienter und standardisierter Kryoprozesse durch die

Evaluierung eines elektronischen Kryosubstrates, das in Verbindung mit einer adaptierten Kryotank-Infrastruktur eine sichere Lagerung der Proben und eine permanente Verwaltung der Probendaten durch eine ständige Zugriffmöglichkeit garantiert.

Ausblick

Die Etablierung von standardisierten und PMEF-freien Bedingungen für die Kultivierung von hESCs in miniaturisierten Volumina in dieser Arbeit (Abbildung 19) eröffnet neue Möglichkeiten für Hochdurchsatzuntersuchungen zur Verbesserung von Kultivierungs- und Differenzierungsprotokollen. Vor allem die Faktoren und zeitlichen Abläufe, die für eine effiziente, gerichtete Differenzierung von hESCs in spezifische Zelltypen wie Herzmuskelzellen oder neuronale Zellen notwendig sind, sind momentan noch nicht verstanden. Die dynamischen Zusammenhänge sind allerdings in ihrer Komplexität allein durch manuelle Versuchsdurchführungen nicht klärbar, daher sind Automatisierungsansätze von großer Bedeutung. Um eine größtmögliche Standardisierung durch eine vollständige Kontrolle der Mikroumgebung zu erreichen, bieten miniaturisierte und PMEF-freie Bedingungen entscheidende Vorteile. Basierend auf den Arbeiten von Gastrock et al., 2001, Mueller et al., 2003, und Zimmermann et al., 2007a, könnten neue mikrofluidische Ansätze für miniaturisierte Hochdruchsatzuntersuchungen entwickelt werden (Abbildung 69). Diese Systeme sollten sowohl für Einzelzellen bzw. Koloniefragmente in Suspension, als auch für adhärente Zellen in Verbindung mit Microcarriern genutzt werden können.

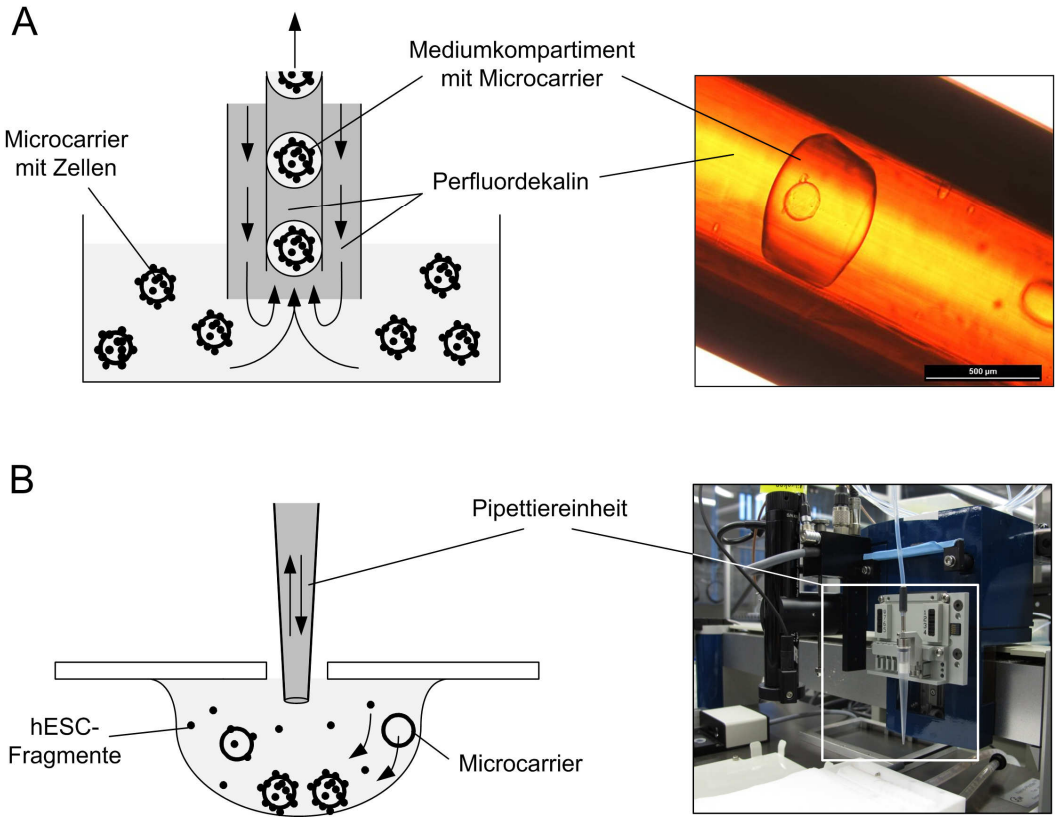


Abbildung 69: Schematische Modelle zur Durchführung miniaturisierter Hochdurchsatzuntersuchungen.

(A) Mikrokanalsystem, das Mediumkompartimente über ein inertes, hydrophobes Flüssigmedium (Perfluordekalin) in einem Schlauchsystem erzeugt; (B) Modifizierte HD-Kultur, automatisiert durch Implementierung eines Pipettierroboters.

Dabei könnten mit Hilfe einer Zwei-Fluid-Sonde Mediumkompartimente mit Zellen erzeugt werden, die durch ein inertertes, hydrophobes Flüssigmedium (Perfluordekalin) getrennt sind (Abbildung 69A). Zu diesen Kompartimenten, die ein Volumen im Bereich von nl bis zu mehreren 100µl besitzen können, sollten über Mikroventile definierte Mengen an Differenzierungsfaktoren o.ä. zugegeben werden können.

Ein weiterer Ansatz basiert auf der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Methode zur Kultivierung von hESC in hängenden Tropfen. Die arbeitsaufwendigen Prozessschritte der Tropfengenerierung, des Mediumwechsels und der Ernte könnten durch die Implementierung eines Pipettierroboters übernommen werden (Abbildung 69B). Zusätzlich könnten unterschiedliche Konzentrationen an Faktoren in die 20µl Tropfen zugegeben werden, durch die Verwendung von piezoelektrischen Spitzen bis in den pl-Bereich. Dies wird ermöglicht, indem die Tropfen über einer Öffnung platziert werden, so dass von oben ein Zugang für den Pipettierroboter möglich ist, die sedimentierten Zellen aber nicht beeinträchtigt werden.

In beiden Systemen stellen die Mediumkompartimente abgeschlossene, miniaturisierte Reaktionsräume dar, so dass in jedem Kompartiment verschiedene Faktoren oder Faktorkonzentrationen getestet werden könnten. Somit kann zukünftig mit einem äußerst geringen Materialverbrauch unter den in dieser Arbeit definierten Bedingungen Hochdurchsatzuntersuchungen durchgeführt werden.

Zusätzlich bieten beide Ansätze einen deutlichen Vorteil für die Vitrifikation von Zellen. Die Mediumkompartimente im Schlauchsystem verhalten sich vergleichbar zu den für die Vitrifikation von Suspensionszellen verwendeten Kapillaren. Werden statt Differenzierungsfaktoren Kryoprotektiva in die Mediumkompartimente injiziert und die Schläuche anschließend direkt in den Stickstoff getaucht, ergibt sich die Möglichkeit einer sterilen, automatisierten Vitrifikation von Zellen.

Das kleine Tropfenvolumen des modifizierten HD-Ansatzes und das große Oberflächen zu Volumen Verhältnis ermöglichen ebenfalls sehr hohe Abkühlraten bei direktem Kontakt mit flüssigem Stickstoff und könnten für eine direkte Vitrifikation der Zellen im hängenden Tropfen genutzt werden.

Somit stellen beide Systeme innovative, mikrofluidischen Ansätze zur Abbildung einer vollständigen Zellprozessierung von der Kultivierung über die Differenzierung bis hin zur Kryokonservierung dar.

7. Literaturverzeichnis

Acker, J.P., Larese, A., Yang, H., Petrenko, A. and McGann, L.E. (1999) Intracellular ice formation is affected by cell interactions. Cryobiology 38, 363-71.

Adler, S., Pellizzer, C., Paparella, M., Hartung, T. and Bremer, S. (2006) The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. Toxicol In Vitro 20, 265-71.

al-Rubeai, M., Emery, A.N., Chalder, S. and Goldman, M.H. (1993) A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells. J Biotechnol 31, 161-77.

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J. and Thomson, J.A. (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol 227, 271-8.

Amit, M. and Itskovitz-Eldor, J. (2006) Feeder-free culture of human embryonic stem cells. Methods Enzymol 420, 37-49.

Anthony, P., Lowe, K.C., Power, J.B. and Davey, M.R. (1997) Synergistic enhancement of the postthaw growth of cryopreserved rice cells by oxygenated perfluorocarbon and pluronic F-68. Cryobiology 35, 201-8.

Arav, A., Shehu, D. and Mattioli, M. (1993) Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. J Reprod Fertil 99, 353-8.

Artemenko, Y., Swaney, K.F. and Devreotes, P.N. (2011) Assessment of development and chemotaxis in Dictyostelium discoideum mutants. Methods Mol Biol 769, 287-309.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. and Isner, J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275, 964-7.

Ashwood-Smith, M.J., Voss, W.A. and Warby, C. (1973) Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with pluronic polyols. Cryobiology 10, 502-4.

Batrakova, E.V., Han, H.Y., Alakhov, V., Miller, D.W. and Kabanov, A.V. (1998) Effects of pluronic block copolymers on drug absorption in Caco-2 cell monolayers. Pharm Res 15, 850-5.

Baust, J.M., Van Buskirk, R. and Baust, J.G. (2004) Gene Activation of the Apoptotic Caspase Cascade Following Cryogenic Storage. Biopreservation and Biobanking 1, 63-80.

Baxter, S.J. and Lathe, G.H. (1971) Biochemical effects of kidney of exposure to high concentrations of dimethyl sulphoxide. Biochem Pharmacol 20, 1079-91.

Beier, A.F., Schulz, J.C., Dorr, D., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J. and Zimmermann, H. (2011) Effective surface-based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. Cryobiology 63, 175-85.

Berger, W.K. and Uhrik, B. (1996) Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to-cell propagation of intracellular ice in cell chains from salivary glands. Experientia 52, 843-50.

Bielanski, A., Bergeron, H., Lau, P.C. and Devenish, J. (2003) Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. Cryobiology 46, 146-52.

Birkeland, S.A. (1980) Cryopreservation of human lymphocytes for sequential testing of immune competence. J Immunol Methods 35, 57-67.

Bischof, J.C. and Rubinsky, B. (1993) Large ice crystals in the nucleus of rapidly frozen liver cells. Cryobiology 30, 597-603.

Bonab, M.M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S.H., Ghavamzadeh, A. and Nikbin, B. (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biol 7, 14.

Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C. and Ratnam, S. (1994) Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Hum Reprod 9, 2110-7.

Boutron, P. and Kaufmann, A. (1978) Stability of the amorphous state in the system water--glycerol--dimethylsulfoxide. Cryobiology 15, 93-108.

Bradley, R. (2004) Bovine spongiform encephalopathy and its relationship to the variant form of Creutzfeldt-Jakob disease. Contrib Microbiol 11, 146-85.

Brocklebank, A.M. and Sparrow, R.L. (2001) Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. Cytometry 46, 254-61.

Buchanan, S.S., Gross, S.A., Acker, J.P., Toner, M., Carpenter, J.F. and Pyatt, D.W. (2004) Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. Stem Cells Dev 13, 295-305.

Bull, M., Lee, D., Stucky, J., Chiu, Y.L., Rubin, A., Horton, H. and McElrath, M.J. (2007) Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. J Immunol Methods 322, 57-69.

Centonze, V.E. and White, J.G. (1998) Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. Biophys J 75, 2015-24.

Clegg, J.S., Seitz, P., Seitz, W. and Hazlewood, C.F. (1982) Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. Cryobiology 19, 306-16.

Cohen, S., Leshanski, L. and Itskovitz-Eldor, J. (2006) Tissue engineering using human embryonic stem cells. Methods Enzymol 420, 303-15.

Costantini, A., Mancini, S., Giuliodoro, S., Butini, L., Regnery, C.M., Silvestri, G. and Montroni, M. (2003) Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. J Immunol Methods 278, 145-55.

Costanzo, J.P. and Claussen, J.P. (1990) Natural freeze tolerance in the terrestrial turtle, Terrapene carolina. J Exp Zool 254, 228-32.

Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Chapman, D. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. Science 223, 701-3.

Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H.P., Nilsson, L.A., Klareskog, L. and Ouchterlony, O. (1988) Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. J Immunol Methods 110, 29-36.

Daley, G.Q., Goodell, M.A. and Snyder, E.Y. (2003) Realistic prospects for stem cell therapeutics. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 398-418.

Dankberg, F. and Persidsky, M.D. (1976) A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function. Cryobiology 13, 430-2.

Disis, M.L., dela Rosa, C., Goodell, V., Kuan, L.Y., Chang, J.C., Kuus-Reichel, K., Clay, T.M., Kim Lyerly, H., Bhatia, S., Ghanekar, S.A., Maino, V.C. and Maecker, H.T. (2006) Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. J Immunol Methods 308, 13-8.

Doerr, D., Stark, M., Ehrhart, F., Zimmermann, H. and Stracke, F. (2009) Multiphoton microscopy for the in-situ investigation of cellular processes and integrity in cryopreservation. Biotechnol J 4, 1215-20.

Dolznig, H., Kolbus, A., Leberbauer, C., Schmidt, U., Deiner, E.M., Mullner, E.W. and Beug, H. (2005) Expansion and differentiation of immature mouse and human hematopoietic progenitors. Methods Mol Med 105, 323-44.

Ehrhart, F., Schulz, J.C., Katsen-Globa, A., Shirley, S.G., Reuter, D., Bach, F., Zimmermann, U. and Zimmermann, H. (2009) A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. Cryobiology 58, 119-27.

Ellerstrom, C., Strehl, R., Moya, K., Andersson, K., Bergh, C., Lundin, K., Hyllner, J. and Semb, H. (2006) Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. Stem Cells 24, 2170-6.

Evseenko, D., Schenke-Layland, K., Dravid, G., Zhu, Y., Hao, Q.L., Scholes, J., Wang, X.C., Maclellan, W.R. and Crooks, G.M. (2009) Identification of the critical extracellular matrix proteins that promote human embryonic stem cell assembly. Stem Cells Dev 18, 919-28.

Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21, 407-26.

Farrant, J. (1977) Water transport and cell survival in cryobiological procedures. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 278, 191-205.

Friedler, S., Giudice, L.C. and Lamb, E.J. (1988) Cryopreservation of embryos and ova. Fertil Steril 49, 743-64.

Gastrock, G., Lemke, K. and Metze, J. (2001) Sampling and monitoring in bioprocessing using microtechniques. J Biotechnol 82, 123-35.

Gearhart, J. (1998) New potential for human embryonic stem cells. Science 282, 1061-2.

Germann, A., Schulz, J.C., Kemp-Kamke, B., Zimmermann, H. and von Briesen, H. (2011) Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery and Antigen-specific T-cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium. Biopreservation and Biobanking 9, 229-36.

Gilboa, E. (2004) The promise of cancer vaccines. Nat Rev Cancer 4, 401-11.

Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., Biggs, J.C., Champlin, R.E., Gluckman, E., Hoffmann, R.G., Jacobsen, S.J., Marmont, A.M., McGlave, P.B. and et al. (1988) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. Ann Intern Med 108, 806-14.

Gutierrez, A., Garde, J., Artiga, C.G., Munoz, I. and Pintado, B. (1993) In vitro survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. Theriogenology 39, 1111-20.

Ha, S.Y., Jee, B.C., Suh, C.S., Kim, H.S., Oh, S.K., Kim, S.H. and Moon, S.Y. (2005) Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. Hum Reprod 20, 1779-85.

Handa-Corrigan, A., Emery, A.N. and Spier, R.E. (1989) Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanisms of cell damage by bubbles. Enzyme Microb Technol 11, 230-5.

Hayes, R.B., Smith, C.O., Huang, W.Y., Read, Y. and Kopp, W.C. (2002) Whole blood cryopreservation in epidemiological studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11, 1496-8.

Heng, B.C., Bested, S.M., Chan, S.H. and Cao, T. (2005a) A proposed design for the cryopreservation of intact and adherent human embryonic stem cell colonies. In Vitro Cell Dev Biol Anim 41, 77-9.

Heng, B.C., Kuleshova, L.L., Bested, S.M., Liu, H. and Cao, T. (2005b) The cryopreservation of human embryonic stem cells. Biotechnol Appl Biochem 41, 97-104.

Heng, B.C., Liu, H., Ge, Z. and Cao, T. (2007) Mechanical dissociation of human embryonic stem cell colonies by manual scraping after collagenase treatment is much more detrimental to cellular viability than is trypsinization with gentle pipetting. Biotechnol Appl Biochem 47, 33-7.

Heng, B.C., Ye, C.P., Liu, H., Toh, W.S., Rufaihah, A.J., Yang, Z., Bay, B.H., Ge, Z., Ouyang, H.W., Lee, E.H. and Cao, T. (2006) Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. J Biomed Sci 13, 433-45.

Henningson, C.T., Jr., Stanislaus, M.A. and Gewirtz, A.M. (2003) 28. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 111, S745-53.

Hornung, J., Muller, T. and Fuhr, G. (1996) Cryopreservation of anchorage-dependent mammalian cells fixed to structured glass and silicon substrates. Cryobiology 33, 260-70.

Hubalek, Z. (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 46, 205-29.

Hunt, C.J. (2007) The Banking and Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells. Transfus Med Hemother 34, 293-304.

Hunt, C.J. and Timmons, P.M. (2007) Cryopreservation of human embryonic stem cell lines. Methods Mol Biol 368, 261-70.

Ihmig, F.R., Shirley, S.G., Durst, C.H.P., Schulz, J.C., von Briesen, H. and Zimmermann, H. (2009) The technology of the Global HIV Vaccine Research Cryorepository. Eng Life Sci 9, 376-383.

Izutsu, K., Aoyagi, N. and Kojima, S. (2004) Protection of protein secondary structure by saccharides of different molecular weights during freeze-drying. Chem Pharm Bull (Tokyo) 52, 199-203.

Janetzki, S., Panageas, K.S., Ben-Porat, L., Boyer, J., Britten, C.M., Clay, T.M., Kalos, M., Maecker, H.T., Romero, P., Yuan, J., Kast, W.M. and Hoos, A. (2008) Results and harmonization guidelines

from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). Cancer Immunol Immunother 57, 303-15.

Ji, L., de Pablo, J.J. and Palecek, S.P. (2004) Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. Biotechnol Bioeng 88, 299-312.

Jordan, M., Eppenberger, H.M., Sucker, H., Widmer, F. and Einsele, A. (1994) Interactions between animal cells and gas bubbles: The influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface. Biotechnol Bioeng 43, 446-54.

Kasai, M., Zhu, S.E., Pedro, P.B., Nakamura, K., Sakurai, T. and Edashige, K. (1996) Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. Cryobiology 33, 459-64.

Katsen-Globa, A., Schulz, J.C., Baunach, J.S., Ehrhart, F., Oh, Y.-J., Schön, U., Kofanova, O., Beier, A.F.J., Wiedemeier, S., Metze, J., Shirley, S.G., Spitkovsky, D., Sachinidis, A., Hescheler, J. and Zimmermann, H. (2008) Towards a Medically Approved Technology for Large-Scale Stem Cell Banks: Tools and Methods. Problems of Cryobiology 18, 468-478.

Katsen, A.D., Vollmar, B., Mestres-Ventura, P. and Menger, M.D. (1998) Cell surface and nuclear changes during TNF-alpha-induced apoptosis in WEHI 164 murine fibrosarcoma cells. A correlative light, scanning, and transmission electron microscopical study. Virchows Arch 433, 75-83.

Korbling, M. and Estrov, Z. (2003) Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? N Engl J Med 349, 570-82.

Korhonen, M. (2007) Culture of human mesenchymal stem cells in serum-free conditions: no breakthroughs yet. Eur J Haematol 78, 167; author reply 168.

Korniski, B., Darr, T.B. and Hubel, A. (1999) Subzero osmotic characteristics of intact and disaggregated hepatocyte spheroids. Cryobiology 38, 339-52.

Kreher, C.R., Dittrich, M.T., Guerkov, R., Boehm, B.O. and Tary-Lehmann, M. (2003) CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. J Immunol Methods 278, 79-93.

Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O. and 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, 119-30.

Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M. and Kemler, R. (1996) A role for cadherins in tissue formation. Development 122, 3185-94.

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A., Fibbe, W. and Ringden, O. (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet 371, 1579-86.

Leberbauer, C., Boulme, F., Unfried, G., Huber, J., Beug, H. and Mullner, E.W. (2005) Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. Blood 105, 85-94.

Lee, J.B., Song, J.M., Lee, J.E., Park, J.H., Kim, S.J., Kang, S.M., Kwon, J.N., Kim, M.K., Roh, S.I. and Yoon, H.S. (2004) Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. Reproduction 128, 727-35.

Leibo, S.P. (1977) Preservation of mammalian cells and embryos by freezing. In: D. Simatos, D.M. Strong and M. Turk (Eds), 62. Cryoimmunologie. Les Colloques de l'Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, Paris: Inserm, p. 311-334.

Leibo, S.P. (1989) Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. Theriogenology 31, 85-93.

Lerou, P.H. and Daley, G.Q. (2005) Therapeutic potential of embryonic stem cells. Blood Rev 19, 321-31.

Lindroos, B., Boucher, S., Chase, L., Kuokkanen, H., Huhtala, H., Haataja, R., Vemuri, M., Suuronen, R. and Miettinen, S. (2009) Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. Cytotherapy 11, 958-72.

Liu, Y., Xu, X., Ma, X., Martin-Rendon, E., Watt, S. and Cui, Z. (2010) Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. Biotechnol Prog 26, 1635-43.

Lovelock, J.E. (1953a) The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta 10, 414-26.

Lovelock, J.E. (1953b) The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta 11, 28-36.

Lovelock, J.E. (1954) The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. Biochem J 56, 265-70.

Lovelock, J.E. (1955) Haemolysis by thermal shock. Br J Haematol 1, 117-29.

Luyet, B.J. (1937) The vitrification of organic colloids and of protoplasm. Biodynamica 1, 1-14.

MacFarlane, D.R. (1987) Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. Cryobiology 24, 181-95.

Maecker, H.T., Moon, J., Bhatia, S., Ghanekar, S.A., Maino, V.C., Payne, J.K., Kuus-Reichel, K., Chang, J.C., Summers, A., Clay, T.M., Morse, M.A., Lyerly, H.K., DeLaRosa, C., Ankerst, D.P. and Disis, M.L. (2005) Impact of cryopreservation on tetramer, cytokine flow cytometry, and ELISPOT. BMC Immunol 6, 17.

Mairhofer, M., Schulz, J.C., Parth, M., Beer, U., Zimmermann, H. and Kolbus, A. (2011) Evaluation of a xeno-free protocol for long-term cryopreservation of cord blood cells. Cell Transplant, submitted.

Malpique, R., Ehrhart, F., Katsen-Globa, A., Zimmermann, H. and Alves, P.M. (2009) Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing. Tissue Eng Part C Methods 15, 373-86.

Mary, S., Charrasse, S., Meriane, M., Comunale, F., Travo, P., Blangy, A. and Gauthier-Rouviere, C. (2002) Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. Mol Biol Cell 13, 285-301.

Mazur, P. (1963) Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. J Gen Physiol 47, 347-69.

Mazur, P. (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology 14, 251-72.

Mazur, P. (1980) Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. Orig Life 10, 137-59.

Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 247, C125-42.

Mazur, P. (1990) Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. Cell Biophys 17, 53-92.

Mazur, P. and Cole, K.W. (1985) Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. Cryobiology 22, 509-36.

Mazur, P. and Cole, K.W. (1989) Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. Cryobiology 26, 1-29.

Mazur, P., Leibo, S.P. and Chu, E.H. (1972) A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. Exp Cell Res 71, 345-55.

Mazur, P., Rall, W.F. and Rigopoulos, N. (1981) Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. Biophys J 36, 653-75.

Mazur, P. and Rigopoulos, N. (1983) Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. Cryobiology 20, 274-89.

McGann, L.E., Yang, H.Y. and Walterson, M. (1988) Manifestations of cell damage after freezing and thawing. Cryobiology 25, 178-85.

McMichael, A.J. and Hanke, T. (2003) HIV vaccines 1983-2003. Nat Med 9, 874-80.

Meier, S.J., Hatton, T.A. and Wang, D.I. (1999) Cell death from bursting bubbles: role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. Biotechnol Bioeng 62, 468-78.

Meryman, H.T. (1963) Preservation of living cells. Fed Proc 22, 81-9.

Meryman, H.T. (1968) Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. Nature 218, 333-6.

Meryman, H.T. (1970) The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: G.E.W. Wolstenholme and M. O´Connor (Eds), The Frozen Cell. Churchill, London, p. 51-64.

Meryman, H.T. (1971) Cryoprotective agents. Cryobiology 8, 173-83.

Miniscalco, B., D'Angelo, A. and Cagnasso, A. (2003) Effect of storage and cryopreservation on the lymphocyte responses to polyclonal mitogens in cattle. Vet Res Commun 27 Suppl 1, 775-8.

Mohamet, L., Hawkins, K. and Ward, C.M. (2011) Loss of function of e-cadherin in embryonic stem cells and the relevance to models of tumorigenesis. J Oncol 2011, 352616.

Moorthy, V.S., Good, M.F. and Hill, A.V. (2004) Malaria vaccine developments. Lancet 363, 150-6.

Morris, G.J. (1981) Liposomes as a model system for investigating freezing injury. Academic Press, New York.

Mueller, P.-J., Roth, M., Hilliger, M., Groth, I., Kummer, C., Martin, K., Schroeckh, V., Metze, J., Koehler, M.J., Henkel, T., Gastrock, G. and Lemke, K. (2003) Methods for Cultivating and Analyzing Microbial Individual Cell Cultures. Deutsches Patent Nr. 10145568.

Muldrew, K., Acker, J.P., Elliott, J.A.W. and McGann, L.E. (2004) The Water to Ice Transition: Implications for Living Cells. In: B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson (Eds), Life In The Frozen State. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 67-108.

Muldrew, K. and McGann, L.E. (1994) The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. Biophys J 66, 532-41.

Narumiya, S., Ishizaki, T. and Uehata, M. (2000) Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. Methods Enzymol 325, 273-84.

Noventa-Jordao, M.A., Couto, R.M., Goldman, M.H., Aguirre, J., Iyer, S., Caplan, A., Terenzi, H.F. and Goldman, G.H. (1999) Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in Aspergillus nidulans germlings. Microbiology 145 (Pt 11), 3229-34.

Odorico, J.S., Kaufman, D.S. and Thomson, J.A. (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells 19, 193-204.

Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 448, 313-7.

Owen, R.E., Sinclair, E., Emu, B., Heitman, J.W., Hirschkorn, D.F., Epling, C.L., Tan, Q.X., Custer, B., Harris, J.M., Jacobson, M.A., McCune, J.M., Martin, J.N., Hecht, F.M., Deeks, S.G. and Norris, P.J. (2007) Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. J Immunol Methods 326, 93-115.

Paynter, S.J., Borini, A., Bianchi, V., De Santis, L., Flamigni, C. and Coticchio, G. (2005) Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. Hum Reprod 20, 1194-9.

Paynter, S.J., Cooper, A., Gregory, L., Fuller, B.J. and Shaw, R.W. (1999) Permeability characteristics of human oocytes in the presence of the cryoprotectant dimethylsulphoxide. Hum Reprod 14, 2338-42.

Pegg, D.E. (2001) The current status of tissue cryopreservation. Cryo Letters 22, 105-14.

Pera, M.F., Laslett, A., Hawes, S.M., Tellis, I., Koh, K. and Nguyen, L. (2006) Isolation and characterisation of human ES cells. In: E. Notarianni and M.J. Evans (Eds), Embryonic Stem Cells. A practical approach. Oxford University Press, Oxford, p. 238-259.

Perez-Moreno, M. and Fuchs, E. (2006) Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. Dev Cell 11, 601-12.

Phinney, D.G. and Prockop, D.J. (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. Stem Cells 25, 2896-902.

Picker, L.J., Hansen, S.G. and Lifson, J.D. (2011) New Paradigms for HIV/AIDS Vaccine Development. Annu Rev Med.

Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164, 666.

Quinn, P.J. (1985) A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. Cryobiology 22, 128-46.

Rall, W.F. (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 24, 387-402.

Ramirez, O.T. and Mutharasan, R. (1990) The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. Biotechnol Bioeng 36, 911-20.

Rasmussen, D.H. and MacKenzie, A.P. (1968) Phase diagram for the system water-dimethylsulphoxide. Nature 220, 1315-7.

Reimann, K.A., Chernoff, M., Wilkening, C.L., Nickerson, C.E. and Landay, A.L. (2000) Preservation of lymphocyte immunophenotype and proliferative responses in cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus type 1-infected donors: implications for multicenter clinical trials. The ACTG Immunology Advanced Technology Laboratories. Clin Diagn Lab Immunol 7, 352-9.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. and Bongso, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 18, 399-404.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Vajta, G. and Trounson, A.O. (2001) Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. Hum Reprod 16, 2187-94.

Richards, M., Fong, C.Y., Tan, S., Chan, W.K. and Bongso, A. (2004) An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells. Stem Cells 22, 779-89.

Ring, R.A. and Danks, H.V. (1998) The role of trehalose in cold-hardiness and desiccation. Cryo Letters 19, 275-82.

Sathananthan, A.H., Trounson, A., Freemann, L. and Brady, T. (1988) The effects of cooling human oocytes. Hum Reprod 3, 968-77.

Saunders, K.M. and Parks, J.E. (1999) Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. Biol Reprod 61, 178-87.

Schafer, R., Dominici, M., Muller, I., Dazzi, F., Bieback, K., Godthardt, K., Le Blanc, K., Meisel, R., Pochampally, R., Richter, R., Skutella, T., Steinhoff, G., Mitterberger, M., Wendel, H., Wiskirchen, J., Handgretinger, R. and Northoff, H. (2007) Progress in characterization, preparation and clinical applications of non-hematopoietic stem cells, 29-30 September 2006, Tubingen, Germany. Cytotherapy 9, 397-405.

Schöler, H.R. (2007) The Potential of Stem Cells: An Inventory. In: N. Knoepffler, D. Schipanski and S.L. Sorgner (Eds), Humanbiotechnology as Social Challenge: An Interdisciplinary Introduction To Bioethics. Ashgate Publishing, Ltd., Hampshire, England, p. 27-53.

Schulz, J.C., Germann, A., Kemp-Kamke, B., Mazzotta, A., von Briesen, H. and Zimmermann, H. (2011a) Towards a xeno-free and fully chemically defined cryopreservation medium for maintaining viability, recovery, and antigen-specific functionality of PBMC during long-term storage. J Immunol Meth, submitted.

Schulz, J.C., Stumpf, P.S., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J. and Zimmermann, H. (2011b) Proof-of-Principle of Successful Surface Based Stem Cell Culture in Hanging Drop Systems: Towards a Screening Platform for Improved Differentiation and Cultivation Conditions, Toxicity and Drug Development. Eng Life Sci, submitted.

Shaw, J.M. and Jones, G.M. (2003) Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. Hum Reprod Update 9, 583-605.

Shaw, J.M., Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R. and Trounson, A.O. (1997) Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. Cryobiology 35, 219-29.

Shaw, J.M., Ward, C. and Trounson, A.O. (1995) Survival of mouse blastocysts slow cooled in propanediol or ethylene glycol is influenced by the thawing procedure, sucrose and antifreeze proteins. Theriogenology 43, 1289-1300.

Shaw, P.W., Fuller, B.J., Bernard, A. and Shaw, R.W. (1991) Vitrification of mouse oocytes: improved rates of survival, fertilization, and development to blastocysts. Mol Reprod Dev 29, 373-8.

Shirley, S.G., Durst, C.H.P., Fuchs, C.C., Zimmermann, H. and Ihmig, F.R. (2009) A large-scale cryoelectronic system for biological sample banking. Cryogenics 49, 638-642.

Sobota, V., Bubenik, J., Indrova, M., Vlk, V. and Jakoubkova, J. (1997) Use of cryopreserved lymphocytes for assessment of the immunological effects of interferon therapy in renal cell carcinoma patients. J Immunol Methods 203, 1-10.

Stacey, G.H., CJ. (2008) Banking Stem Cell Lines for Future Therapies. In: J.M. Polak, S; Harding, SE (Ed) Advances in Tissue Engineering. Imperial College Press, London, p. 229-251.

Storey, K.B., Layne, J.R., Cutwa, M.M., Churchill, T.A. and Storey, J.M. (1993) Freezing survival and metabolism of box turtles, Terrapene carolina. Copeia 1993, 628-34.

Storey, K.B. and Storey, J.M. (1984) Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frog, Rana sylvatica. J Comp Physiol B 155, 29-36.

Stuart, R.K. (1993) Autologous bone marrow transplantation for leukemia. Semin Oncol 20, 40-54.

Sutherland, D.R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R. and Chin-Yee, I. (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother 5, 213-26.

Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Sakata, A., Matsuoka, M., Nishikata, Y., . (1990) Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon in vitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. Theriogenology 34, 1051-7.

Takamatsu, H. and Rubinsky, B. (1999) Viability of deformed cells. Cryobiology 39, 243-51.

Taylor, M.J., Song, Y.C. and Brockbank, K.G.M. (2004) Vitrification in Tissue Preservation: New Developments. In: B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson (Eds), Life In The Frozen State. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 604-41.

Tedder, R.S., Zuckerman, M.A., Goldstone, A.H., Hawkins, A.E., Fielding, A., Briggs, E.M., Irwin, D., Blair, S., Gorman, A.M., Patterson, K.G. and et al. (1995) Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. Lancet 346, 137-40.

Thirumala, S., Wu, X., Gimble, J.M. and Devireddy, R.V. (2010) Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. Tissue Eng Part C Methods 16, 783-92.

Thomson, H. (2007) Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery. Trends Biotechnol 25, 224-30.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. and Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-7.

Timmermans, F., Plum, J., Yoder, M.C., Ingram, D.A., Vandekerckhove, B. and Case, J. (2009) Endothelial progenitor cells: identity defined? J Cell Mol Med 13, 87-102.

Tomlinson, M. and Sakkas, D. (2000) Is a review of standard procedures for cryopreservation needed?: safe and effective cryopreservation-should sperm banks and fertility centres move toward storage in nitrogen vapour? Hum Reprod 15, 2460-3.

Toner, M., Cravalho, G.M., Karel, M. (1990) Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. J Appl Phys 67, 1582-1593.

Trounson, A., Peura, A. and Kirby, C. (1987) Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertil Steril 48, 843-50.

Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. (1997) Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo Letters 18, 191-195.

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T. and Callesen, H. (1998a) Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev 51, 53-8.

Vajta, G., Lewis, I.M., Kuwayama, M., Greve, T. and Callesen, H. (1998b) Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. Cryo Letters 19, 389-392.

Vincent, C., Garnier, V., Heyman, Y. and Renard, J.P. (1989) Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. J Reprod Fertil 87, 809-20.

Vincent, C. and Johnson, M.H. (1992) Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. Oxf Rev Reprod Biol 14, 73-100.

Wagers, A.J. and Weissman, I.L. (2004) Plasticity of adult stem cells. Cell 116, 639-48.

Wagh, V., Meganathan, K., Jagtap, S., Gaspar, J.A., Winkler, J., Spitkovsky, D., Hescheler, J. and Sachinidis, A. (2011) Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing. Stem Cell Rev 7, 506-17.

Ware, C.B., Nelson, A.M. and Blau, C.A. (2005) Controlled-rate freezing of human ES cells. Biotechniques 38, 879-80, 882-3.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Muguruma, K. and Sasai, Y. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 25, 681-6.

Watt, F.M. and Hogan, B.L. (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. Science 287, 1427-30.

Weinberg, A., Betensky, R.A., Zhang, L. and Ray, G. (1998) Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. Clin Diagn Lab Immunol 5, 804-7.

Weinberg, A., Zhang, L., Brown, D., Erice, A., Polsky, B., Hirsch, M.S., Owens, S. and Lamb, K. (2000) Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells. Clin Diagn Lab Immunol 7, 714-6.

Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. and Smith, P.G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet 347, 921-5.

Willhite, C.C. and Katz, P.I. (1984) Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. J Appl Toxicol 4, 155-60.

Williams, R.J., Willemot, C. and Hope, H.J. (1981) The relationship between cell injury and osmotic volume reduction. IV. The behavior of hardy wheat membrane lipids in monolayer. Cryobiology 18, 146-54.

Wolfe, J. and Bryant, G. (1999) Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. Cryobiology 39, 103-29.

Wong, R.C., Pebay, A., Nguyen, L.T., Koh, K.L. and Pera, M.F. (2004) Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells. Stem Cells 22, 883-9.

Wowk, B., Leitl, E., Rasch, C.M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S.B. and Fahy, G.M. (2000) Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. Cryobiology 40, 228-36.

Yoder, M.C. and Ingram, D.A. (2009) The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? Biochim Biophys Acta 1796, 50-4.

Zeisberger, S.M., Schulz, J.C., Mairhofer, M., Ponsaerts, P., Wouters, G., Doerr, D., Katsen-Globa, A., Ehrbar, M., Hescheler, J., Hoerstrup, S.P., Zisch, A.H., Kolbus, A. and Zimmermann, H. (2011) Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. Cell Transplant 20, 1241-57.

Zhou, C.Q., Mai, Q.Y., Li, T. and Zhuang, G.L. (2004) Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. Chin Med J (Engl) 117, 1050-5.

Zimmermann, H., Fuhr, G., Gastrock, G. and Metze, J. (2007a) Verfahren und Vorrichtung zur Tropfenmanipulation. Deutsches Patent Nr. 10 2007 018 056.1.

Zimmermann, H., Shirley, S.G. and Zimmermann, U. (2007b) Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future. Curr Diab Rep 7, 314-20.

Zimmermann, H., Zimmermann, D., Reuss, R., Feilen, P.J., Manz, B., Katsen, A., Weber, M., Ihmig, F.R., Ehrhart, F., Gessner, P., Behringer, M., Steinbach, A., Wegner, L.H., Sukhorukov, V.L., Vasquez, J.A., Schneider, S., Weber, M.M., Volke, F., Wolf, R. and Zimmermann, U. (2005) Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. J Mater Sci Mater Med 16, 491-501.

Zimmermann, U., Klock, G., Federlin, K., Hannig, K., Kowalski, M., Bretzel, R.G., Horcher, A., Entenmann, H., Sieber, U. and Zekorn, T. (1992) Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. Electrophoresis 13, 269-74.

Zimmermann, U., Thurmer, F., Jork, A., Weber, M., Mimietz, S., Hillgartner, M., Brunnenmeier, F., Zimmermann, H., Westphal, I., Fuhr, G., Noth, U., Haase, A., Steinert, A. and Hendrich, C. (2001) A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation. Ann N Y Acad Sci 944, 199-215.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 13, 4279-95.

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AT-MSCs	mesenchymale Stromazellen aus Fettgewebe
BSA	bovines Serumalbumin
CEF	Mischung aus Peptiden des Cytomegalie-, desEpstein-Barr- und des Influenza-Virus
CMV	Cytomegalie-Virus
CLSM	konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
DMEM	Dulbecco´s Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	Ethidiumbromid
ECM	extrazelluläre Matrix
EG	Ethylenglykol
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot
ESchG	Embryonenschutzgesetz
FBS	fetales Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HD	hängender Tropfen (hanging droplet)
HDPE	Polyethylen hoher Dichte
HES	Hydroxyethylstärke
hESCs	humane embryonale Stammzellen
hiPS	humane induziert pluipotente Stammzellen
HSA	humanes Serumalbumin
IFN-γ	Gamma-Interferon
IMDM	Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium
mESCs	murine embryonale Stammzellen
MNC	mononukleäre Zellen
MPLSM	multiphotonen Laser-Raster-Mikroskopie
PBMCs	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin
PMEFs	primäre embryonale Mausfibroblasten
PP	Polypropylen
PVA	Polyvinylalkohol

PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
SFC	Zellen, die IFN-γ ausschütten (spot forming cells)
StZG	Stammzellgesetz
TPX	Polymethylpenten
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
UCB-ECs	erythroide Zellen aus dem Nabelschnurblut
UCB-ECFCs	koloniebildenden Zellen aus dem Nabelschnurblut
vWf	von Willebrand-Faktors

Veröffentlichte Arbeiten

Artikel in Fachzeitschriften (peer-reviewed)

1. Germann, A., Schulz, J.C.*, Kemp-Kamke, B., Zimmermann, H., von Briesen, H. (2011) Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery and Antigen-specific T-cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium. Biopreservation and Biobanking 9, 229-36.

   * äquivalent zum Erstautor

2. 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, 175-85.

   * äquivalent zum Erstautor

3. Schulz, J.C., Germann, A., Kemp-Kamke, B., Mazzotta, A., von Briesen, H., Zimmermann, H. (2011) Towards a xeno-free and fully chemically defined cryopreservation medium for maintaining viability, recovery, and antigen-specific functionality of PBMC during long term storage. Journal of Immunological Methods, eingereicht.

4. Schulz, J.C., Stumpf, P.S., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J., Zimmermann, H. (2011) Proof-of-Principle of Successful Surface Based Stem Cell Culture in Hanging Drop Systems: Towards a Screening Platform for Improved Differentiation and Cultivation Conditions, Toxicity and Drug Development. Engineering in Life Sciences, eingereicht.

5. Mairhofer, M., Schulz, J.C.*, Parth, M., Beer, U., Zimmermann, H., Kolbus, A. (2011) Evaluation of a xeno-free protocol for long-term cryopreservation of cord blood cells. Cell Transplantation, eingereicht.

   * äquivalent zum Erstautor

6. Zeisberger, S.M., Schulz, J.C.*, Mairhofer, M., Ponsaerts, P., Wouters, G., Dörr, D., Katsen-Globa, A., Ehrbar, M., Hescheler, J., Hoerstrup, S.P., Zisch, A.H., Kolbus, A., Zimmermann, H. (2010) Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. Cell Transplantation 20, 1241-57.

   * äquivalent zum Erstautor

7. Ehrhart, F., Schulz, J.C., Katsen-Globa, A., Shirley, S.G., Reuter, D., Bach, F., Zimmermann, U. and Zimmermann, H. (2009) A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. Cryobiology 58, 119-27.

8. Ihmig, F.R., Shirley, S.G., Durst, C.H.P., Schulz, J.C., von Briesen, H. and Zimmermann, H. (2009) The technology of the Global HIV Vaccine Research Cryorepository. Engineering in Life Sciences 9, 376-383.

9. Germann, A., Durst, C.H.P., Ihmig, F.R., Shirley, S.G., Schön, U., Koch, S., Schulz, J., Schmidt, J., Zimmermann, H., Meyerhans, A., von Briesen, H., and GHRC-Consortium (2009).Global HIV Vaccine Research Cryorepository-GHRC. Procedia in Vaccinology 1, 49-62.

Artikel in Fachzeitschriften (nicht peer-reviewed)

1. Katsen-Globa, A., Schulz, J.C., Baunach, J.S., Ehrhart, F., Oh, Y.-J., Schön, U., Kofanova, O., Beier, A.F.J., Wiedemeier, S., Metze, J., Shirley, S., Spitkovsky, D., Sachinidis, A., Hescheler, J., Zimmermann, H. (2008) Towards a Medically approved Technology for Large-scale Stem Cell Banks: Tools and Methods. Problems of Cryobiology 18, 468-78.

Abstracts und Posterbeiträge

1. Schulz, J.C., Gastrock, G., von Briesen, H., Zimmermann, H. Fortschritt in der regenerativen Medizin und der Impfstoffforschung durch den Einsatz mikrofluidischer Konzepte. Beitrag anlässlich des 15. Heiligenstädter Kolloquiums in Heilbad Heiligenstadt (Thüringen), 27.-29.09.2010.
2. Schulz, J.C., Lemke, K., Gepp, M.M., Beier, A.F.J., Auernheimer, V., Quade, M., Gastrock, G., Zimmermann, H. New Microfluidics-based Technologies enable the High-throughput Screening for optimal Cultivation and Differentiation Conditions: First Adaption to Stem Cell Culture. Posterbeitrag anlässlich der 5. Jahrestagung der German Society for Stem Cell Research in Lübeck (Schleswig-Holstein), 30.09.-02.10.2010.
3. Schulz, J.C., Dörr, D., Sébastien, I., Beier, A.F.J., Zimmermann, H. A New Optical Method for Analysing Effects of Ice Formation on the Cryopreservation Success of Human Stem Cells. Posterbeitrag anlässlich des Combined Meeting 2009 of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT in Hannover (Niedersachsen), 20.-25.11.2009.
4. Schulz, J.C., Zimmermann, H., Reich, A., Kemp-Kampke, B., von Briesen, H., Germann, A. Standardized Serum-free Cryomedia have Minimun Cytotoxicity and Maintain Antigen-specific T-Cell Response. Posterbeitrag anlässlich der AIDS Vaccine 2009 Conference in Paris (Frankreich), 19.-22.10.2009.
5. Gepp, M.M., Sébastien, I., Groeber, F.K., Schulz, J.C., Ehrhart, F., Zimmermann, H. Revealing of Medical and Biological Relevant Cellular Processes by Automated Time Lapse Microscopy. Posterbeitrag anlässlich des Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009 in München (Bayern), 07.-12.09.2009 (extended abstract in: O. Dössel, W.C. Schlegel (Eds), WC 2009, IFMBE Proc. 25/10, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 222-25).
6. Schulz, J.C., Groeber, F.K., Beier, A.F.J., Meiser, I., Ehrhart, F., Zimmermann, U., Zimmermann, H. Methods for Encapsulation and Storage of Human Stem Cells in Three-dimensional Alginate Aggregates. Posterbeitrag anlässlich des Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009 in München (Bayern), 07.-12.09.2009 (extended abstract

in: O. Dössel, W.C. Schlegel (Eds), WC 2009, IFMBE Proc. 25/10, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 222-25).

7. Schulz, J.C., Ihmig, F.R., Shirley, S.G., Durst, C.H.P., Germann, A., von Briesen, H., Zimmermann, H. Development and Application of New Storage Technologies for effective and secure Cryobanking. Posterbeitrag anlässlich des Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009 in München (Bayern), 07.-12.09.2009 (extended abstract in: R. Magjarevic (Eds), WC 2009, IFMBE Proc. 25/12, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 261-63).
8. Gepp, M.M., Groeber, F.K.,. Beier, A.F.J, Zimmermann, H., Ehrhart, F., Schulz, J.C. Ein neuer Ansatz zur Untersuchung dynamischer zellulärer Ereignisse mittels Lichtmikroskopie. Posterbeitrag anlässlich des 2. Dresdner Medizintechnik Symposiums in Dresden (Sachsen), 01.-03.12.2008.
9. Schulz, J.C., Ihmig, F.R., Durst, C.H.P., Shirley, S.G., Reich, A., Germann, A., Noah, C., Korioth, F., Kromminga, A., Climaco, M., Zimmermann, H., von Briesen, H. New Modular HIV-Cryosubstrates for Secure and Reliable Sample Identification and DMSO Reduction in Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. Posterbeitrag anlässlich der AIDS Vaccine 2008 Conference in Kapstadt (Südafrika), 13.-17.10.2008.
10. Schulz, J.C., Groeber, F.K., Gepp, M.M., Beier, A.F.J., Zimmermann, H., Katsen-Globa, A. Optimisation of Cryopreservation Protocols for Cryo-banking of Human Stem Cells. Posterbeitrag anlässlich der European BioPerspectives 2008 in Hannover (Niedersachsen), 07.-09.10.2008.
11. Gepp, M.M., Groeber, F.K., Beier, A.F.J., Schulz, J.C., Ehrhart, F., Katsen-Globa, A., Zimmermann H. Towards a massively Parallelized and Scalable Bioimaging Approach for Observation of rare Cellular Events. Posterbeitrag anlässlich der European BioPerspectives 2008 in Hannover (Niedersachsen), 07.-09.10.2008.
12. Meiser, I., Schulz, J.C., Ehrhart, F., Shirley, S.G., Zimmermann, H. Dispersing biologically relevant Fluids by „Kinetic Masking“ and its Applications. Posterbeitrag anlässlich der European BioPerspectives 2008 in Hannover (Niedersachen), 07.-09.10.2008.
13. Ihmig, F.R., Shirley, S.G., Fuchs, C.C., Durst, C.H.P., Schulz, J.C., Zimmermann, H. Development of Electronic Cryovials and Electronic Cryotank Modules for the ´Global HIV Vaccine Research Cryorepository. Posterbeitrag anlässlich des 8th International Workshops on Low Temperature Electronics (WOLTE-8) in Jena/Gabelbach (Thüringen), 22.-25.06.2008.
14. Schulz, J.C., Baunach, J.J.S., Katsen-Globa, A., Winkler, J., Sachinidis, A., Hescheler, J., Zimmermann, H. CRYSTAL – **CRY**o-banking of **S**tem Cells for Human **T**herapeutic **A**pp**L**ications. Posterbeitrag anlässlich der 22nd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference in Toulouse (Frankreich), 02.-05.04.2008.
15. Baunach, J.J.S., Gepp, M.M., Schulz, J.C., Sachinidis, A., Hescheler, J., Zimmermann H. Hydrogel-Membranes and Alginate-encapsulated Feeder Cells as a New Approach for Cultivation and Cryopreservation of Human Adult and Embryonic Cells. Posterbeitrag anlässlich des ITERA Life Science Forum, Stem Cells from Cord, Cord-blood, and Placenta: scientific approaches and clinical applications in Maastricht (Niederlande), 25.-26.10.2007.
16. Katsen-Globa, A., Schulz, J.C., Ehrhart, F., Feilen, P., Weber, M.M., Zimmermann H. Vitality and Functionality of Pancreatic Islets and Multicellular Spheroids after Cryopreservation in Micro-cryosubstrates with Automatic Addition of Cryoprotectants. Posterbeitrag anlässlich des Mikrosystemtechnik-Kongresses in Dresden (Sachsen), 15.-17.10.2007.

17. Baunach, J.J.S., Schön, U., Oh, Y.-J., Fixemer, T., Schulz, J.C., Zimmermann, H. Biological Evaluation of a New Computer-controlled System for Testing Long-time Cyclic Changes in Temperatures from Liquid to Vapour in a Nitrogen-storing Vessel. Posterbeitrag anlässlich des BMT-Kongresses in Aachen (Nordrhein-Westfalen), 26.-29.09.2007.
18. Stark, M., Dörr, D., Ehlers, A., Ehrhart, F., Schulz, J.C., Baunach, J.J.S., Katsen-Globa, A., König, K., Zimmermann H. Multiphoton Fluorescence Imaging at Cryogenic Temperatures. Posterbeitrag anlässlich der Microscopy Conference in Saarbrücken (Saarland), 02.-07.09.2007.

Vorträge

1. Schulz, J.C. Development of a xeno-/protein-free cryomedium for optimal PBMC cryopreservation. Vortrag anlässlich des 6th Annual CAVD Meeting der Bill & Melinda Gates Foundation in Seattle (USA), 06.-09.12.2011.
2. Schulz, J.C. Cryobiotechnology: Tools and Methods for Stem Cell Banking. Vortrag anlässlich des Combined Meeting 2009 of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT in Hannover (Niedersachsen), 20.-25.11.2009.
3. Schulz, J.C., Beier, A.F.J., Baunach, J.J.S., Ehrhart, F., Zimmermann, H. Alginate-encapsulated Spheroids – A New Tumour Model for Optimization of Cryoprotocols. Vortrag anlässlich des BMT-Kongresses in Aachen (Nordrhein-Westfalen), 26.-29.09.2007.

Lebenslauf

Name:	Julia Christiane Schulz
Geburtsdatum:	21. Dezember 1981
Geburtsort:	Coburg
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Schulausbildung

1988 – 1992	Besuch der Grundschule „Heubischer Straße“ (Neustadt b. Coburg)
1992 – 2001	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweigs des Arnold-Gymnasiums (Neustadt b. Coburg)
Juli 2001	Abschluss mit Abitur

Studium

2001 – 2006	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität (Würzburg)
2005 – 2006	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Humangenetik
November 2006	Abschluss mit Diplom
	Diplomarbeit zum Thema: Kryokonservierung Alginat-verkapselter Zellen
	Durchgeführt unter Betreuung von Prof. Dr. U. Zimmermann, Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg
seit März 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer IBMT, St. Ingbert
Oktober 2008	Institut für Gesundheitswissenschaft, Abteilung für medizinische Virologie, Universität Stellenbosch, Kapstadt (Südafrika): Aufbau und Installation einer Kryobank sowie Schulung des Personals in kryobiologischen Prozessen
November 2008	Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Allgemeines Krankenhaus Wien: Forschungsaufenthalt zur Langzeit-Kryokonservierung von Nabelschnurblutzellen
Oktober 2010	Laboratorio de Biodiversidad y Ecología Costera, Universidad Catholica del Norte, Coquimbo (Chile): Untersuchungen zum Einfluss der Ernte und Prozessierung von Braunalgen auf die Gewinnung von ultrahoch viskosem Alginat unter Betreuung von Dr. Julio Vásquez

Sept – Okt 2011	Laboratorio de Biodiversidad y Ecología Costera, Universidad Catholica del Norte, Coquimbo (Chile): Untersuchungen zum Einfluss der Ernte und Prozessierung von Braunalgen auf die Gewinnung von ultrahoch viskosem Alginat unter Betreuung von Dr. Julio Vásquez

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Zimmermann, stellvertretender Institutsleiter und Leiter der Hauptabteilung Kryobiophysik und Kryotechnologie des Fraunhofer IBMT, für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und für die stetige Unterstützung bei der strategischen Konzeption der Arbeit. Die vielen kreativen Ideen und motivierenden, hilfreichen und kritischen Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Heinzle vom Lehrstuhl für Technische Biochemie der Universität des Saarlandes möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Fuhr, Institutsleiter des Fraunhofer IBMT, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am IBMT durchzuführen.

Bei Frau Dr. A. Germann möchte ich mich für die Möglichkeit zur Nutzung der S3-Einrichtung, für die Durchführung der ELISPOT-Analysen und für die hilfreichen Diskussionen im Bereich der PBMC-Kryokonservierung bedanken.

Frau Dr. A. Katsen-Globa danke ich für die Aufnahme der REM-Bilder und für die Hilfe bei der Bildinterpretation, Herrn M.Sc. M. Gepp für die Unterstützung bei der Videomikroskopie und Herrn M.Eng. D. Dörr für die Aufnahme der MPLSM-Bilder.

Bei Frau V. Auernheimer, Herrn F. Groeber, Herrn A. Beier, Herrn D. Primaveßy, Frau H. Lorig und Herrn P. Stumpf, möchte ich mich für die Zuarbeit im Rahmen ihrer Diplom- und Masterarbeiten bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Frau S. Richter, Frau S. Zöllner, Frau B. Kemp-Kamke, Frau A. Mazzotta und Frau A. Reich für die technische Unterstützung, sowie Frau Dipl. Biol. J. Bosold für die Einführung in die Kultur der humanen embryonalen Stammzellen.

Herrn René Fischer (ehemals ETH Zürich) danke ich für die gemeinsamen Experimente zur Herstellung modifizierter Kryomedien auf Basis des Poloxamers 188 und für die hilfreichen Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Sachinidis von der Universität zu Köln möchte ich mich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit im Bezug auf die hESCs bedanken, ebenso bei Frau Univ. Doz. Dr. A. Kolbus von der Medizinischen Universität Wien für die sorgfältige Korrektur mit Fokus auf den adulten Stammzellen und bei Herrn Prof. Dr. H. von Briesen vom Fraunhofer IBMT für die Durchsicht der Arbeit mit Schwerpunkt auf den PBMCs.

Den Kooperationspartnern der EU-Projekte CRYSTAL (FP6-037261) und HYPERLAB (FP7-223011) danke ich für die Bereitstellung von Zellen, Materialien und Protokollen.

Auch danke ich meinen Eltern für die moralische Unterstützung während der letzten Jahre und dafür, dass ihre Tür stets für mich offen stand.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei Michael bedanken, der mich in schweren Zeiten immer aufgefangen hat und mir selbstlos Rückhalt in allen Lebensbereichen gab.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

St. Ingbert, den 20. Dezember 2011

(Julia Schulz)