

Schlüsselwörter: Kryomikroskopie · Kryobiologie · Kryokonservierung · Kryotechnik

Die Kryomikroskopie bietet die Möglichkeit unter kontrollierten thermischen Bedingungen eine Vielzahl von Gefrierprozessen zu untersuchen. Für die Kryokonservierung werden thermische Effekte in biologischem Material betrachtet. Es können grundlegende Phänomene untersucht, sowie Frierprotokolle optimiert werden.

Cryomicroscopy: A method for visualisation of freezing processes

Keywords: cryomicroscopy · cryobiology · cryopreservation · cryotechnology

Cryomicroscopy allows the investigation of a variety of freezing processes under controlled thermal conditions. For cryopreservation the thermal effects in biological materials can be observed. Fundamental phenomena can be investigated and freezing protocols can be optimized.

Kryomikroskopie: Eine Methode zur Visualisierung von Gefrierprozessen

Vom Mikroskop zum Kryomikroskop

Die ersten praktischen Labor-Lichtmikroskope wurden im Jahre 1660 von Leeuwenhoek und Hooke erfunden und zum Studium von Mikroorganismen genutzt [1]. Die Mikroskope waren sofort erfolgreich und öffneten Tür und Tor für die folgenden Generationen von Forschern, die nun den Mikrokosmos untersuchen konnten, begrenzt nur durch die optische Auflösung des Lichtes. Mehr als 200 Jahre später untersuchte Julius Sachs mit einem Mikroskop Pflanzenzellen bei tiefen Temperaturen. An einem kalten Wintertag mikroskopierte er an einem offenen Fenster und konnte auf diese Weise das Gefrieren von Pflanzenzellen direkt beobachten [2]. Obwohl diese Studien durch Sachs physische Ausdauer bei den kühlen Temperaturen begrenzt waren, gelang es ihm grundlegende Erkenntnisse von Gefrierprozessen von Pflanzenzellen zu beobachten. Er gilt als Gründer der Pflanzenphysiologie. Ein erwähnenswerter Doktorand von Sachs, Herman Müller aus dem Schweizer Kanton Thurgau, wurde bekannt aufgrund seiner neugezüchteten und kälteresistenten Rebsorte „Rivaner“, aus welcher der gleichnamige Weißwein „Müller-Thurgau“ gewonnen wird. In seinen Gefrier-Experimenten stellte er ein Mikroskop in eine Box mit Eis und Salz und konnte damit die Temperatur der zu untersuchenden Probe unabhängig von der Umgebungstemperatur definieren [3]. Der tschechische Botaniker Hans Molisch gilt heute jedoch als Erfinder des ersten praktischen Labor-Kryomikroskops, dessen Proben temperatur bis -17 °C aktiv kontrollierbar ist. Dieses Kryomikroskop wurde überliefert und steht heute funktionsfähig im Botanischen Institut in der Universität Wien [3].

Kryomikroskop-Systeme

Das Herzstück eines Kryomikroskops ist seine Frierkammer, in der sich die zu untersuchenden Proben befinden. Nach der Art der Wärmeübertragung werden konvektive und konduktive Kammern unterschieden. Für beide Kammer-Arten dient ein Kältemittel (z.B. Flüssigstickstoff, LN_2) dazu, einen Kühlblock mit aufliegender Probe zu küh-

len. Zusammen mit einer verbundenen Widerstandsheizung ist die Kühlblock-Temperatur regelbar. Auf konvektiver Wärmeübertragung basierende Kammern besitzen eine hohe thermische Trägheit, benötigen jedoch einen großen Abstand von der Probe zum Objektiv, den sogenannten Arbeitsabstand. Es müssen daher teure „Long-Distance“-Objektive eingesetzt werden und die optische Vergrößerung ist gering. Umgekehrt verhält es sich mit Kammern, welche auf konduktiver Wärmeübertragung basieren. Hier können gängige hochauflösende Objektive eingesetzt werden. Ein weiterer Kammer-Typ nutzt den Thomson-Effekt. Durch Anwendung von „Stacks“ von Peltier-Elementen können Proben temperaturen bis -60 °C erreicht werden. Die Kühlraten dieser Frierkammern sind jedoch gering (ca. $< 20\text{ K/min}$). Außerdem sind hochauflösende Objektive aufgrund der begrenzten Kondensatorbeleuchtung solcher Kammern üblicherweise nicht einsetzbar.

Verschiedene Anforderungen müssen an ein Kryomikroskop-System gestellt werden, um die einige μL -großen Proben bei tiefen Temperaturen beobachten zu können. Der Wärmedurchgang von der Probe zum temperierten Kühlblock sollte möglichst groß sein, sodass die Proben temperatur der Kühlblocktemperatur im gewünschten Temperaturbereich, z.B. zwischen $40\text{ bis }-196\text{ °C}$, folgt. Hohe, per Software geregelte Kühl- und Heizraten mit linearen und nichtlinearen Temperaturverläufen sollten reproduzierbar ermöglicht werden. Unumgänglich ist, dass die Probe innerhalb einer Schutzgasatmosphäre liegt, um eine Kondensation von Wassertröpfchen aus der Umgebungsluft in dem Strahlengang zu vermeiden. Üblicherweise werden hierzu die Frierkammern mit gasförmigem Stickstoff durchspült. Zusätzlich ist es sinnvoll, die Frierkammern bei zyklischen oder Langzeit-Messungen mit einem Wasserkreislauf auf Raumtemperatur zu halten, um ein Vereisen der Frierkammer an ihrer Außenseite zu vermeiden. In manchen Fällen ist darüber hinaus ein direkter Zugang zur Probe erwünscht, um etwa die Eiskristallbildung manuell auszulösen („seeding“) oder über

Autoren



Dipl.-Ing. Ralf Spindler,



Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher, Institut für Mehrphasenprozesse, Leibniz Universität Hannover



KI Kälte · Luft ·
Klimatechnik
INGENIEURWISSEN IN FORSCHUNG UND PRAXIS



Entdecken Sie weitere interessante
Artikel und News zum Thema auf
ki-portal.de!

Hier klicken & informieren!





1 Modernes Video-Kryomikroskopie-System mit diversen Frierkammern der Firma ZEISS (Axio Imager) und Firma LINKAM (FDSC196, BS196, GS350).

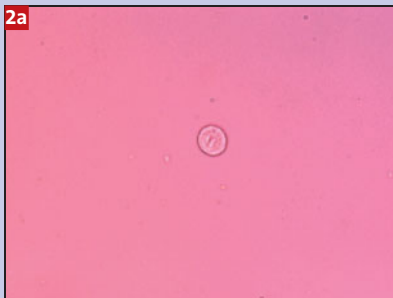
eine Kanüle Kryoadditiv oder Färbemittel hinzuzufügen. Moderne Kryomikroskop-Systeme genügen diesen verschiedenen Anforderungen und bestehen neben den Frierkammern aus wei-

teren Komponenten wie geregelte Flüssigstickstoff-Pumpen, Dewars und aus mindestens einer Temperaturmess- und Regelungseinheit, wie in Abb. 1 dargestellt. Die eingesetzten Mikroskope sind auf die jeweilige Anwendung abgestimmt und ermöglichen Verfahren der Polarisations-, Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Methoden.

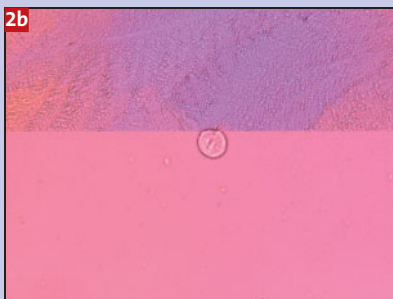
Visualisierung von Gefrierprozessen

Mithilfe von Kryomikroskopen können Gefrierprozesse visuell untersucht werden. Gefrierprozesse treten auf, wenn wasserhaltige Proben bei tiefen Temperaturen Phasenumwandlungen erster Ordnung durchlaufen. Hierzu zählen die Übergänge bei der Nukleation, der Kristallisation, des Annealings, der Devitrifikation und des Schmelzens. Umwandlungen der Eiskristallstruktur vom kubischen in hexagonales Eis oder die Fusion von kleinen Eiskristallen zu größeren, die sogenannte Rekristallisation (siehe Abb. 3a, b, c), sind ebenfalls beobachtbar. Am Beispiel der Kryobiologie soll hier aufgezeigt werden, welche komplexen Gefrierprozesse biologische Zellen bei tiefen Temperaturen begleiten, siehe Abb. 2a, b, c. Werden biologische Zellen zu tiefen Temperaturen gekühlt, so gefriert in der Regel zuerst das Wasser im Extrazellularraum. Abhängig von verschiedenen Prozessparametern wie der Kühl- und Heizrate und der Konzentration von Kryoadditiven kann es aufgrund des Fluxes von Wasser und niedermolekularen Kryoadditiven über der Zellmembran zu einer osmotischen Volumenänderung der Zelle kommen und/oder das intrazelluläre Wasser gefriert [4, 5]. Eine zu große Volumenänderung von Zellen führt zum Zelltod (Apoptose, Nekrose oder Zell-Lyse). Zellen mit intrazellulär gebildetem Eis gelten gemeinhin als zerstört. Eine Ursache für die intrazelluläre Eiskristallbildung kann die Rekristallisation sein. Demgegenüber gelten Zellen, die kein intrazelluläres Eis während des Gefrierprotokolls aufwiesen, als überlebensfähig, wie Abb. 4 demonstriert. Intrazelluläres Eis wird durch ein Verdunkeln der Zellen,

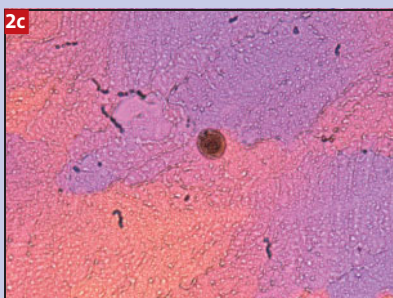
dem sogenannten „darkening“, unter dem Kryomikroskop gut sichtbar. Es wird angenommen, dass dieses Verdunkeln aufgrund einer Lichtstreuung an eingeschlossenen Gasblasen im intrazellulären Eis entsteht.



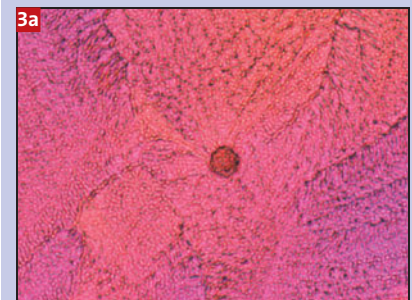
2a Polarisationsaufnahme von einer 293T-Zelle im Kulturmedium ohne Kryoprotektiv (Kühlrate: 5 K/min) siehe unten.



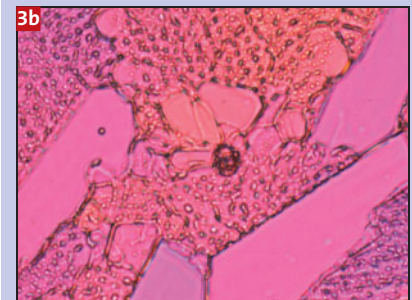
2b Eine planare Eiskristallfront erscheint bei $-19,1\text{ °C}$. Sie wächst im Bild von oben nach unten.



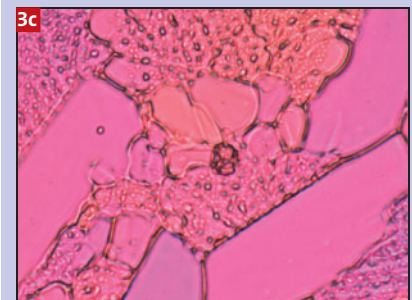
2c In der Zelle hat sich intrazelluläres Eis gebildet. Die dunklen Bereiche sind Gasblasen.



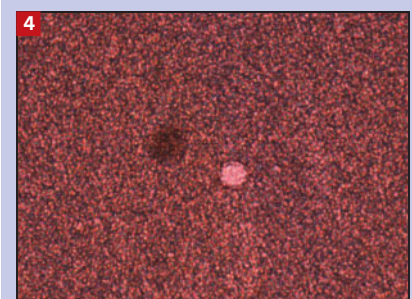
3a Eine 293T-Zelle im Kulturmedium mit Kryoprotektiv bei $-19,6\text{ °C}$ (2,5 Vol.-% DMSO, Kühlrate: 5 K/min).



3b Rekristallisation der Eiskristallstruktur im Extrazellularraum bei $-30,0\text{ °C}$.



3c Obwohl die Temperatur auf -10 °C angestiegen ist, hat sich die Eiskristallstruktur durch Rekristallisation zusammengefügt, bevor sie bei der Schmelztemperatur wieder schrumpfen.



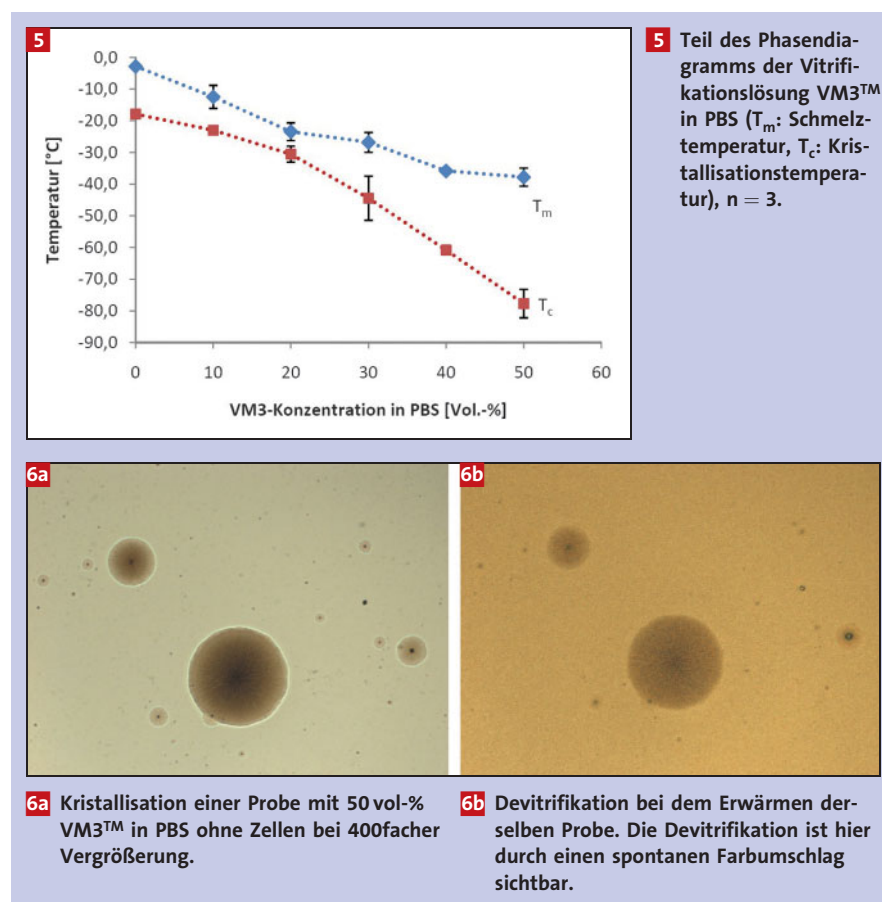
4 Polarisationsaufnahme von zwei 293T-Zellen mit und ohne intrazellulärem Eis mit 400facher Vergrößerung.

Das sogenannte „twitching“ ist eine weitere Möglichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung. Es ist definiert als eine Kristallisation ohne Phasenfront und ist weniger gut beobachtbar.

Kryokonservierte Zellen sollen eine möglichst hohe Vitalität nach der kryogenen Lagerung aufweisen. Hierzu müssen die zelltyp-spezifischen, optimalen Prozessparameter ermittelt werden [6]. Diese optimalen Prozessparameter konnten für verschiedene Zelltypen bestimmt werden und gewährleisten eine hohe Zell-Vitalität nach dem Wiedererwärmen. Bei der Kryokonservierung von humanen Endothelzellen (HPMECs) in Suspension besteht ein Maximum der Zell-Vitalität, wenn das Frierprotokoll unter Verwendung des Frierschutzadditivs Dimethylsulfoxid (5 Vol.-%) eine Kühlrate von 5 K/min aufweist. Über 90% dieser kryokonservierten Endothelzellen sind nach der Wiedererwärmung vital [6, 7, 8]. Es existieren jedoch andere Zelltypen, darunter die Granulozyten, welche eine viel geringere Vitalität nach der Kryokonservierung aufweisen. Unter Verwendung der optimalen Prozessparameter kann nun mittels der Kryomikroskopie festgestellt werden, welche der Zellen intrazelluläres Eis gebildet haben. Der Friervorgang wird sogar für einzelne Zellen verfolgbar. Dies ist nötig, um die Gefrierprozesse bei der Kryokonservierung besser zu verstehen und damit Frierprotokolle verbessern zu können.

Charakterisierung von Kryoadditiven

Eine weitere Anwendung der Kryomikroskopie besteht in der Charakterisierung von Kryoadditiven für die Kryobiologie. Kryoadditiv können die Gefrierprozesse erheblich verändern, die meisten verändern die Nukleations- und Eiswachstumskinetik. Einige, vor allem die membran-permeierenden Kryoadditiv wie Dimethylsulfoxid und Glycerin, ersetzen das intrazelluläre Wasser und senken die Gleichgewichts-Friertemperatur herab. Nicht-membran-permeierende Kryoadditiv wie Zucker und Stärke dehydrieren die Zellen durch Osmose. Viele Kryoadditiv wirken nach dem Prinzip des „preferential exclusion“-Mechanismus, wobei Proteine in ihrem natürlich gefalteten Zustand stabilisiert werden. Werden neue Kryoadditiv getestet, so ist es nötig, ihren temperatur- und konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Gefrierprozesse zu kennen. Hierzu sind sogenannte Phasendiagramme wichtig, die mittels der Kryomikroskopie erstellt werden können. Abhängig von der Anzahl der Stoffkomponenten, aus denen ein Kryoadditiv zusammengesetzt ist, unterscheidet man binäre, ternäre



oder quaternäre Phasendiagramme. Einfache binäre Phasendiagramme wie Dimethylsulfoxid in Wasser existieren in der Literatur [9]. Für die Mehrzahl der Kryoadditiv, die aus mehreren Stoffkomponenten bestehen, sind bisher keine Phasendiagramme verfügbar. Hier besteht Forschungsbedarf. Das Phasendiagramm des Kryoadditiv VM3™ in PBS wurde mit Hilfe eines Kryomikroskops bestimmt, siehe Abb. 5. VM3™ ist eine Vitrifikationslösung bestehend aus den Komponenten Dimethylsulfoxid, Ethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon, Formamid, Eisblockern und einem Phosphatpuffer. PBS (phosphate buffered saline) ist eine isotonische Pufferlösung und besteht aus Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, Natriumdihydrogenphosphat-Puffer und Kaliumchlorid. In diesem Phasendiagramm sind die Phasenübergangstemperaturen beim Schmelzen (T_m) und bei der Kristallisation (T_c) dargestellt. Gefriervorgänge können auch während eines Frierprotokolls zu unterschiedlichen Zeiten auftreten z.B. während des Einfrierens die Kristallisation und während des Auftauens die Devitrifikation, siehe Abb. 6. Devitrifikation ist im allgemeinen für die biologischen Proben schädigend und sollte deshalb vermieden werden.

Spezielle Kryomikroskope

Heutzutage existieren verschiedene spezielle Kryomikroskop-Systeme für unterschiedliche Anwendungen. Mit diesen Systemen wird der Einfluss spezieller physikalischer Parameter wie Temperaturgradienten, elektrostatische Felder oder Ultraschall auf die Gefrierprozesse untersucht. Gradientenkammer-Systeme erzeugen einen linearen Temperaturgradienten G zwischen zwei Kühlkammern, wenn sie die unterschiedlichen Temperaturen T_h und T_c aufweisen. Zwischen den Kühlkammern befindet sich ein Spalt, durch den die zu untersuchende Probe im Durchlicht beobachtet werden kann. Die Probe kann mit Hilfe eines motorisierten Schlittens mit der Schlittengeschwindigkeit v so verfahren werden, dass eine im Spalt der Breite a gebildete Eisfront immer im Gesichtsfeld des Kryomikroskops verbleibt [10]. Die Kühlrate der Probe errechnet sich zu $B = (T_h - T_c) \cdot v/a = G \cdot v$. Bei niedrigen Kühlraten entsteht in der Regel eine planare Eisfront. Bei höheren Kühlraten geht diese dann in eine zungenförmige und schließlich in eine dendritische Struktur über. Enthält die untersuchte Probe biologische Zellen, so werden diese entweder von der wandernden Eisfront eingeschlossen oder vorgehoben. Mit Hilfe von Gradienten-

kammer-Systemen wurde festgestellt, dass die im Eis eingeschlossenen Zellen die Kryokonservierung überleben.

Das Electrofreezing-Friermikroskop ist ein spezielles Kryomikroskop-System, mit welchem das sogenannte Electrofreezing beobachtbar wird [11, 12]. Unter Electrofreezing versteht man das Erhöhen der Wahrscheinlichkeit für eine spontane Eiskristallbildung unterkühlter wässriger Flüssigkeiten durch den Einfluss von hohen elektrostatischen Feldern. Diese Felder können auf „Knopfdruck“ gestartet werden, erreichen die wässrigen Proben über zwei Elektroden bei einer Spannung von 3 KV und haben eine Pulslänge von nur wenigen Millisekunden. Ist die unterkühlte Flüssigkeit nichtleitend, kommt es zu einer Eiskristallbildung. Die Temperatur, bei der die Kristallisation erfolgt, die sogenannte Nukleationstemperatur, wird dadurch kontrollierbar. In der Kryokonservierung von biologischen Proben hat sich gezeigt, dass die Nukleationstemperatur einer der wichtigen Parameter bei den Gefrierprozessen ist.

Mittlerweile werden auch Kryomikroskopkammern kommerziell angeboten, welche die Auswirkung von Ultraschall auf die Eiskristall-Kinetik ermöglichen, sogenannte Sonokristallisations-Systeme [13]. Diese nutzen einen piezoelektrischen Energieumwandler im Frequenzbereich von 20 bis 200 KHz. Aufgrund solcher Systeme wurde der Einfluss von Kavitations-Gasblasen auf die Gefrierprozesse untersucht. Diese Gasblasen entstanden vornehmlich an den Korngrenzen zwischen den Eiskristallen und sie verursachten dort ein vorzeitiges Schmelzen der Eiskristalle.

Kombination mit weiteren Modalitäten

Einige Kryomikroskop-Systeme wurden mit anderen Untersuchungsmethoden in einem System kombiniert, beispielsweise mit der Kalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry, DSC) oder mit der Spektroskopie (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR). Mit Hilfe der DSC können Wärmeströme gemessen werden, die bei Phasenübergängen der Probe auftreten. Die FTIR dagegen misst das molekulare Vibrations-

Spektrum der Probe und ermöglicht damit die Detektion von chemischen Änderungen, zum Beispiel in Zellmembranen aufgrund thermischer Prozesse [14]. Durch die simultane Erfassung der Gefrierprozesse mit einer weiteren Modalität werden Interpretationsunsicherheiten vermieden, die bei der getrennten Messung auftreten können.

Zukünftige Kryomikroskope

Die Entwicklung der Kryomikroskope ist sicher weiterhin stark an die Entwicklung der Mikroskope geknüpft. Einschränkend ist jedoch, dass die optische Betrachtung dicker Proben nach der Kristallisation durch die Lichtstreuung stark beeinträchtigt wird. Dies haben Experimente gezeigt, bei denen Laser-Scanning-Mikroskope und Frierkammern kombiniert wurden [15]. Der gewöhnliche Vorteil der Laser-Scanning-Mikroskope besteht darin, durch Einstellung einer Lochblende in dickere Proben fokussieren zu können. Leider ist dieses Fokussieren nach der Eiskristallbildung nicht mehr möglich. Eine interessante zukünftige Alternative bietet jedoch die Kombination von Frierkammern mit Multiphotonen-Mikroskopen. Zur Anregung der verwendeten Farbstoffe werden hier Femtosekunden-Laserpulse eingesetzt, die eine hohe Photonendichte aufweisen und die Probe bzw. ihren Farbstoff nichtlinear anregen. Der Vorteil dieser Kombination ist, dass aufgrund der hohen Wellenlänge die Proben nicht wie üblich ausbleichen und eine Fokusebene in tiefliegenden Schichten der Proben erzeugt werden kann. Außerdem ist durch die nichtlineare Anregung hier das Problem der Streuung des Lichtes an Eiskristallen, die außerhalb der Fokusebene liegen, gelöst [16].

Danksagung

Wir bedanken uns bei den Studierenden Shu Yu, Holger Zernetsch und Sabrina Jauch für die durchgeführten Studien am Kryomikroskop-System des Instituts für Mehrphasenprozesse.

Auszüge aus dem Fachbeitrag sind bereits bei der DKV-Tagung 2008 vorgestellt worden.

Literatur

- [1] Anderson, M.D.: Through the Microscope. The Natural History Press, Garden City, NY 1965
- [2] Sachs, J.: Crystal Formation during Freezing and Alteration of the Cell Membrane during Thawing of Juicy Plant Sections. Berichte über die Verhandlungen der königlich sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-Physische Classe 12, (1860) 1–50
- [3] Diller, K.R.: Bioheat and mass transfer as viewed through a microscope. Journal of Biomechanical Engineering 127, (2005) S. 67–84
- [4] Mazur, P.: Kinetics of water loss from cells at subzero temperature and the likelihood of intracellular freezing. J. Gen. Physiol. 47 (1984) S. 347–369
- [5] Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E.: Life in a frozen state, Fla, CRC Press, Boca Raton 2004, 1th Edition
- [6] Bernemann, I., et al.: Strategie zur Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen. DKV-Tagungsbericht 2006, Band I, ISBN: 3-932715-40-3
- [7] Bernemann, I., et al.: Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen: Systematische Parameteranalyse. KI Kälte Luft Klimatechnik 44 (2008) 1–2 S. 24–27
- [8] Bernemann, I., et al.: Cryopreservation of human fibroblasts and epithelial cells: Comparison of different freezing methods. Cryobiology 51 (2005) S. 397
- [9] Rasmussen, D.H., Mackenzie, A. P.: Phase diagram for the system water-dimethylsulphoxide. Nature 220 (1968) S. 1315–1317
- [10] Rubinsky, B., Ikeda, M.: A cryomicroscope using directional solidification for the controlled freezing of biological material. Cryobiology 22 (1985) S. 55–68
- [11] Petersen, A., Schneider, H., Rau, G., Glasmacher, B., 2006: A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature. Cryobiology 53 (2), 248–257.
- [12] Spindler R., Hofmann, N., Glasmacher, B.: Controlled ice nucleation during cryopreservation. Cryobiology 57 (2008) S. 337
- [13] Chow, R., Blindt, R., Kamp, A., Grocutt, P., Chivers, R., 2004, The microscopic visualisation of the sonocrystallisation of ice using a novel ultrasonic cold stage. Ultrason Sonochem 11 (3–4): 245–50
- [14] Spindler, R., Wokers, W.F., Glasmacher, G.: Effect of Me₂SO on membrane phase behavior and protein denaturation of human pulmonary endothelial cells studied by *in situ* FTIR spectroscopy. Journal of Biomechanical Engineering, 2008 (submitted)
- [15] Persönliches Gespräch mit Prof. K. Diller (Cryo 2008, Charlotte, USA, 22. 6. 2008)
- [16] Heisterkamp, A., et al., 2008, Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. Optics. Express 13 (10): 3690–3696