



Studiengang

**Applied Life Sciences:
Angewandte Bio-, Pharma- und Medizinwissenschaften**

Masterarbeit

**„Simulation von suboptimalen Lagerungsbedingungen und deren Einfluss auf die
mononukleären Zellen des peripheren Blutes“**

vorgelegt von

Stephanie Angel

19.12.2014

Betreuung: Prof. Dr. Marko K. Baller
Zweitkorrektur: Prof. Dr. Dr. Oliver Müller

Kurzfassung

Die Kryokonservierung von biologischem Material wie Zellen, Geweben und Organen gewinnt in der heutigen Zeit immer mehr an Bedeutung. So wird die Kryokonservierung in vielen verschiedenen Bereichen eingesetzt wie z.B. zur Lagerung von Blutkonserven und Nabelschnurblut für die Stammzelltherapie oder auch zur Lagerung von Umweltproben. Vor allem findet die Kryokonservierung in der Reproduktionsmedizin und in klinischen Studien sowie der Impfstoffentwicklung Anwendung. Kryobanken spielen heute somit eine immer größere Rolle.

In der Impfstoffentwicklung werden häufig mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) verwendet. Dabei ist die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen sowie die Standardisierbarkeit zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen und Laboren sehr wichtig.

In einer früheren Publikation wurde gezeigt, dass nicht nur der Einfrierprozess der PBMCs Einfluss auf die Zellen hat, sondern auch die Lagerungsbedingungen. Germann et al. zeigten, dass 400 Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung die PBMC-Recovery, Viabilität sowie die T-Zellfunktionalität verringern.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ab wann Auswirkungen auf die Zellen aufgrund von Temperaturschwankungen nachweisbar sind. Dazu wurden PBMCs aus Buffy Coats isoliert und eingefroren. Mit Hilfe eines automatisierten Robotersystems wurden die Zellen in 50er Schritten 0-350 Temperaturzyklen ausgesetzt, um Ein- und Auslagerungsprozesse, wie sie im Biobanking häufig vorkommen, zu simulieren. Nach der Simulation wurde die PBMC-Viabilität und -Recovery sowohl direkt nach dem Auftauen als auch nach ÜN-Kultur bestimmt. Um einen möglichen Einfluss der Temperaturzyklen auf die T-Zellfunktionalität festzustellen wurde ein IFN- γ ELISpot durchgeführt. Dieser dient zum indirekten Nachweis antigenspezifischer T-Zellantworten.

Sowohl die PBMC-Viabilität als auch die -Recovery nahm mit zunehmender Anzahl von Temperaturzyklen ab. Die PBMC-Viabilität der unbehandelten Proben (N_2) betrug direkt nach dem Auftauen 98,33 %. Mit zunehmender Anzahl von Temperaturzyklen nahm die PBMC-Viabilität ab. Nach 350 Zyklen wurde das Minimum mit 94,03 % erreicht. Ab 200 Zyklen trat ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Proben (N_2) auf. Nach der ÜN-Kultur sank die Viabilität gering und nahm mit zunehmender Anzahl von Temperaturzyklen ab. Die PBMC-Viabilität der unbehandelten Proben (N_2) lag durchschnittlich bei 95,35 %. Bei 350 Zyklen lag die PBMC-Viabilität im Durchschnitt 93,87 %. Ein signifikanter Unterschied zu N_2 trat bei 200, 250 und 350 Zyklen auf.

Die PBMC-Recovery der unbehandelten Proben (N₂) lag direkt nach dem Auftauen im Durchschnitt bei 96,08 % und nahm mit steigender Zyklenzahl ab. Die niedrigste PBMC-Recovery wurde nach 350 Temperaturzyklen mit 74,86 % erreicht. Ab 150 Zyklen trat ein signifikanter Unterschied zu N₂ auf.

Nach der ÜN-Kultur trat ein deutlicher Abfall der PBMC-Recovery im Vergleich zur Messung direkt nach dem Auftauen auf. Die PBMC-Recovery nach der ÜN-Kultur der unbehandelten Proben (N₂) lag durchschnittlich bei 81,41 %. Mit steigender Anzahl von Zyklen nahm diese ab. Nach 350 Temperaturzyklen wurde das Minimum mit 57,74 % erreicht. Nach der ÜN-Kultur trat ein signifikanter Unterschied zu N₂ bereits nach 50 Temperaturzyklen auf.

Neben der Abnahme der PBMC-Viabilität und -Recovery war auch eine Reduktion der antigenspezifischen T-Zellantwort zu beobachten. Sowohl nach der Stimulation mit CEF-Peptiden (Peptidmischung aus Cytomegalievirus, Epstein-Barr Virus und Influenza Virus) als auch mit CMV-Peptiden (Cytomegalievirus) nahm die Immunantwort mit steigender Anzahl von Temperaturzyklen ab. Die Abnahme erreichte nach 350 Temperaturschwankungen mit durchschnittlich -27,70 % nach CEF-Stimulation und -22,52 % nach CMV-Stimulation ihr Maximum. Es trat kein signifikanter Unterschied auf.

In den Bereichen, in denen die Kryokonservierung und Kryobanken eingesetzt werden ist dieses Ergebnis von großer Bedeutung. Möglicherweise verringern die Temperaturschwankungen während der Lagerung im Bereich der Reproduktionsmedizin die Erfolgsquote bei künstlichen Befruchtungen. Des Weiteren können Ergebnisse aufgrund der Auswirkungen von Temperaturschwankungen in klinischen Studien und Multicenter-Studien schwer miteinander verglichen und reproduziert werden. Dies erschwert auch die Impfstoffentwicklung, in welcher PBMCs häufig eingesetzt werden.

Um die Qualität der Zellen aufrecht zu erhalten sollte die Lagerung der Proben besser kontrolliert und dokumentiert werden. Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, dass Temperaturschwankungen auf ein Minimum reduziert werden z.B. durch Aufrechterhaltung der Kühlkette bei der Ein- und Auslagerung von Proben.

Um diese Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung möglichst zu vermeiden sollte ein alternatives Lagerungssystem z.B. das ASKION C-line® hermetic storage-System, das in Kooperation mit dem Fraunhofer IBMT entwickelt wurde, eingesetzt werden. Dieses ermöglicht die Lagerung ohne Temperaturänderungen unterhalb von -150 °C und gewährleistet somit ein gute Qualität des eingefrorenen Materials sowie eine bessere Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen.

“Simulation of suboptimal storage conditions and its influence on peripheral blood mononuclear cells”

Abstract

Cryopreservation of biological materials like cells, tissues and organs is currently of importance. It is employed in many applications e.g. storage of blood and umbilical cord blood for stem cell therapy or storage of environmental samples. Cryopreservation is of major importance for reproductive medicine, clinical studies as well as for the development of vaccines.

In the development of vaccines peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are commonly used. The comparability of results between different research institutions and laboratories is very important.

Previous publications have shown that not only the freezing process of PBMCs has influence on the cells, but also the storage conditions. It was shown that temperature fluctuations during low temperature storage reduce recovery, viability, and the T-cell functionality of the cells.

In the master thesis, it is intended to analyze when temperature fluctuations causing effects on cells are observable. For this purpose, PBMCs will be isolated from buffy coats and frozen. With the help of an automated robotic system, the cells are exposed 350 temperature fluctuations in steps of 50 cycles. After the simulation of temperature fluctuations, the PBMC viability and recovery are determined after thawing as well as after overnight culture. To examine a potential influence of temperature fluctuations on the T-cell functionality an IFN- γ ELISpot was performed. It indirectly detects an antigen-specific T-cell response.

The viability of the cells after thawing decreased from 98,33 % (N₂) to 94,03 % after 350 cycles. The difference became statistically significant after 200 temperature fluctuations. After overnight culture the viability decreased only a little bit. The viability of N₂ was about 95,35 % and decreased to about 93,87 % after 350 temperature cycles. A significant difference was observed after 200, 250 and 350 temperature cycles.

The PBMC recovery as well as the viability decreased with increasing number of temperature fluctuations. After thawing, the recovery was about 96,08 % (N₂) and decreased to about 74,86 % after 350 cycles. A significant difference after thawing occurred past 150 temperature cycles. After overnight rest the recovery of N₂ was about 81,41 % and decreased to about 57,74 %. After overnight culture, a significant difference was already observed after only 50 temperature fluctuations.

In addition to a decrease in the viability and recovery, a reduction of antigen-specific T-cell response was observed. After stimulation with CEF or either CMV peptides the immune response decreased with increasing number of temperature fluctuations. The decrease reached a maximum of about -27,70 % after CEF stimulation and -22,52 % after CMV stimulation after 350 temperature cycles. The difference was not statistically significant.

These results are very important in fields where the cryopreservation and cryobanks are used. Temperature fluctuations during storage may reduce the success rate in reproductive medicine. Furthermore, results of clinical trials and multicenter studies may be affected in their comparability due to the effects of temperature cycles during storage. To ensure the quality of the cells, the storage of the samples should be better controlled and documented. Furthermore, it has to be assured that temperature fluctuations and cycling are reduced to a minimum.

To avoid such temperature fluctuations during low temperature storage an alternative storage system, for example, ASKION the C-line ® hermetic storage system, which was developed in cooperation with the Fraunhofer IBMT should be used. This allows storage without temperature changes below -150 ° C, thus ensures a good quality of frozen material and better comparability and reproducibility of results.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, **Stephanie Angel**, geboren am **07.08.1989** in **Neunkirchen**, ehrenwörtlich, dass ich meine Masterarbeit mit dem Titel:

„Simulation von suboptimalen Lagerungsbedingungen und deren Einfluss auf die mononukleären Zellen des peripheren Blutes“

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als in der Abhandlung angegebenen Hilfen benutzt habe.

Die Übernahme wörtlicher Zitate aus der Literatur sowie die Verwendung der Gedanken anderer Autoren an den entsprechenden Stellen habe ich innerhalb der Arbeit gekennzeichnet.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben kann.

Zweibrücken, den 19.12.2014

Sperrvermerk

Die vorliegende Projektarbeit enthält vertrauliche Daten und Informationen des Fraunhofer Instituts für Biomedizinische Technik. Veröffentlichungen oder Vervielfältigungen -auch nur auszugsweise - sind ohne ausdrückliche schriftliche Genehmigung des Unternehmens nicht gestattet.

Die Arbeit ist nur den Korrektoren sowie erforderlichenfalls den Mitgliedern des Prüfungsausschusses zugänglich zu machen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gern denjenigen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hagen von Briesen sowie Frau Dr. Anja Germann für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit meine Masterarbeit am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in Sulzbach anfertigen zu können. Sie haben durch ihre konstruktive Kritik und Anregungen sowie durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Marko K. Baller für die Betreuung und die Übernahme der Erstkorrektur danken.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Biomedizinische Technik für ihre freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft, insbesondere der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Anja Germann. Dabei möchte ich mich besonders bei Ihr selbst und bei Frau Beatrice Kemp-Kamke für ihre Unterstützung bei den zellbiologischen Arbeiten bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Young-Joo Oh für die Unterstützung bei der Bedienung des Roboters.

Ein weiteres Dankeschön geht an alle hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeiter, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	i
Abstract	iii
Ehrenwörtliche Erklärung.....	v
Sperrvermerk.....	v
Danksagung	vi
Inhaltsverzeichnis.....	vii
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis	x
Abkürzungsverzeichnis	xi
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Isolierung der PBMCs	17
2.2.2 Zellkonzentrations- und Viabilitätsbestimmung der PBMCs.....	19
2.2.3 Lyse der Erythrozyten.....	20
2.2.4 Einfrieren der PBMCs	21
2.2.5 Simulation von suboptimalen Lagerungsbedingungen	22
2.2.6 Auftauen der PBMCs	25
2.2.7 Bestimmung der PBMC-Viabilität und-Recovery	26
2.2.8 Bestimmung der T-Zellfunktionalität mittels IFN- γ ELISpot	27
2.2.9 Statistik.....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die PBMC-Viabilität.....	32
3.2 Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die PBMC-Recovery	35
3.3 Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die T-Zellfunktionalität	39
4. Diskussion.....	45

Literaturverzeichnis	52
Anhang	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Kryobiologie	2
Abbildung 2: Zwei-Faktor Hypothese von Mazur et al., 1972.....	5
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Temperatur innerhalb eines Probenregals nach einer Entnahme aus dem Tank	6
Abbildung 4: Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle	11
Abbildung 5: Dichtegradientenzentrifugation	17
Abbildung 6: Aufbau des Robotersystems	22
Abbildung 7: Bedienung des Simulationsprogramms	23
Abbildung 8: Schema des ELISpots.....	27
Abbildung 9: Layout der ELISpot-Platte	29
Abbildung 10: PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur	33
Abbildung 11: Abnahme der PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur	34
Abbildung 12: PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur.....	36
Abbildung 13: Abnahme der PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur	37
Abbildung 14: Differenz (%) der PBMC-Recovery.....	38
Abbildung 15: Auswertung des ELISpots.....	39
Abbildung 16: Antigen-spezifische Immunantwort auf CEF-Stimulation	40
Abbildung 17: Antigen-spezifische Immunantwort auf CMV-Stimulation	42
Abbildung 18: Abnahme der antigen-spezifischen Immunantwort	44
Abbildung 19: Askion C-line®-System.....	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Material</i>	12
Tabelle 2: <i>Geräte</i>	13
Tabelle 3: <i>Reagenzien</i>	14
Tabelle 4: <i>Puffer und Lösungen</i>	15
Tabelle 5: <i>Software zum Erstellen der Arbeit</i>	16
Tabelle 6: <i>PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur</i>	32
Tabelle 7: <i>Abnahme der PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur</i>	34
Tabelle 8: <i>PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur</i>	36
Tabelle 9: <i>Abnahme der PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur</i>	37
Tabelle 10: <i>Differenz (%) der PBMC-Recovery</i>	38
Tabelle 11: <i>Antigenspezifische Immunantwort nach Stimulation mit CEF-Peptiden</i>	40
Tabelle 12: <i>Antigenspezifische Immunantwort nach Stimulation mit CMV-Peptiden</i>	41
Tabelle 13: <i>Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort nach CEF-Stimulation und nach CMV-Stimulation</i>	43

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CEF	Peptidmischung aus Cytomegalievirus, Epstein-Barr Virus und Influenza Virus
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISpot	Enzyme-linked Immunospot Assay
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
g	Gravitationskraft
h	Stunde
HHV	humanes Herpesvirus
HRP	Merettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IFN- γ	Interferon-gamma
M	molar
max.	maximal
mM	millimolar
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
N ₂	Stickstoff
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran

PHA	Phytohemagglutinin
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Unter Kryokonservierung versteht man die Lagerung von biologischen Proben wie Zellen, Geweben und Organen bei tiefkalten Temperaturen. Das Wort „Kryokonservierung“ stammt von den beiden Begriffen „kryos“ griech. für „Kälte“ und „conservare“ lat. für „aufbewahren“. Die Kryokonservierung wird eingesetzt, um biologische Proben möglichst verlustarm über einen längeren Zeitraum zu lagern und die Lebensfähigkeit und Funktion zu erhalten. Dies ist am besten unterhalb der Glasübergangstemperatur von -130 °C möglich, da unterhalb dieser Temperatur weder biochemische Reaktionen noch Rekrystallisationsprozesse von Wasser, die zur Bildung von Eiskristallen führen, stattfinden. Aufgrund dessen sind die Zellen über einen langen Zeitraum konservierbar (Mazur et al., 1972¹; Friedler et al.², 1988; Meryman, 1963³). Nur mechanische Erschütterungen können die Zellen noch beeinflussen (Mazur et al., 1972⁴; Friedler et al.⁵, 1988; Meryman, 1963⁶).

Obwohl der Begriff der Kryobiologie erst in den 1950er Jahren eingeführt wurde geht diese bis ins 17. Jahrhundert zurück. Bereits im Jahr 1683 untersuchte R. Boyle die Auswirkungen von kryogenen Temperaturen auf lebende Organismen (Muldrew und McGann, 1997⁷). Die moderne Kryobiologie begründete Luyet im Jahr 1938 als er zeigte, dass Hefezellen trotz Einfrierens überlebten. Außerdem stellte er fest, dass die hauptsächliche Schädigung der Zellen durch den Phasenübergang von Wasser zu Eis hervorgerufen wird (Luyet, 1938⁸). Dieser Umstand gilt auch noch heute. Im Jahr 1949 wurde durch Zufall das erste

¹ 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.

² Friedler, S., Giudice, L.C. and Lamb, E.J. (1988) Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 49, 743-64.

³ Meryman, H.T. (1963) Preservation of living cells. *Fed Proc* 22, 81-9.

⁴ 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.

⁵ Friedler, S., Giudice, L.C. and Lamb, E.J. (1988) Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 49, 743-64.

⁶ Meryman, H.T. (1963) Preservation of living cells. *Fed Proc* 22, 81-9.

⁷ Muldrew K., McGann L.E. (1994) The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys J* 66/2, 532-541.

⁸ Luyet B.J., Hodapp R. (1938) Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc Soc Exp Biol NY* 39, 433-434.

Kryoprotektikum Glycerin von Smith und Polge entdeckt (Polge et. al, 1949⁹). 1963 beschrieb Mazur erste mathematische Modelle zur Entstehung von intrazellulärem Eis (Mazur, 1963¹⁰) Im Jahr 1972 folgte die Zwei-Faktor Hypothese (Mazur, 1963¹¹; Mazur et al., 1972¹²). Darin beschreiben Mazur et al. die optimale Kühlrate für eine erfolgreiche Kryokonservierung sowie Schäden, die bei suboptimalen Kühlraten auftreten können.

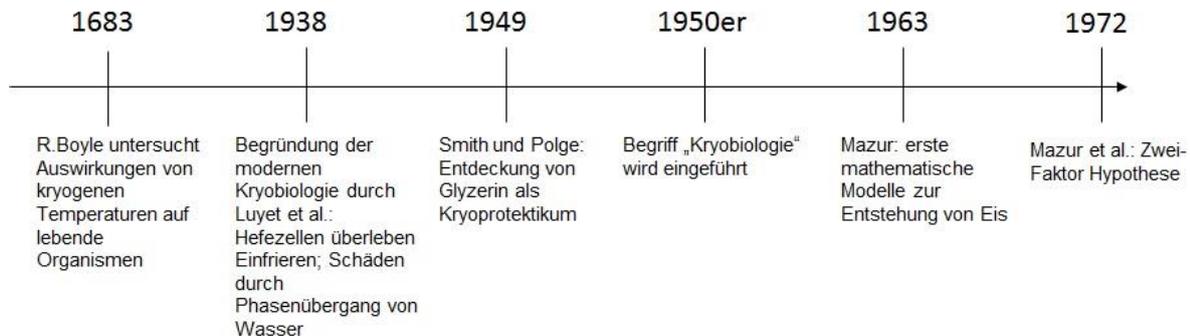


Abbildung 1: Entwicklung der Kryobiologie. Abgebildet sind die wichtigsten Ereignisse während der Entwicklung der Kryobiologie.

Heute ist die Kryokonservierung in vielen Bereichen weit verbreitet. Sie wird beispielsweise zur Lagerung von Blutkonserven sowie Nabelschnurblut für die Stammzelltherapie verwendet. Des Weiteren erlaubt die Tieftemperaturlagerung von Umweltproben retrospektive Studien. Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet ist die Lagerung von biologischem Material für klinische Studien, die Impfstoffentwicklung und Multicenter-Studien (Sambor et al., 2014¹³; Kleeberger et al., 1999¹⁴). Neben diesen Einsatzgebieten findet die Kryokonservierung aber vor allem in der Reproduktionsmedizin ihre Anwendung. Durch das Einfrieren können Spermien, Eizellen und Embryonen in Kryobanken gelagert werden. Gerade in der Zeit des „social freezing“ rücken Kryobanken verstärkt in den Fokus der

⁹ Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.

¹⁰ Mazur, P. (1963) Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 47, 347-69.

¹¹ Mazur, P. (1963) Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 47, 347-69.

¹² 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.

¹³ Sambor A, Garcia A, Berrong M, Pickeral J, Brown S, Rountree W, Sanchez A, Pollara J, Frahm N, Keinonen S, Kijak GH, Roederer M, Levine G, D'Souza MP, Jaimes M, Koup R, Denny T, Cox J, Ferrari G. (2014) Establishment and maintenance of a PBMC repository for functional cellular studies in support of clinical vaccine trials., *J Immunol Methods*.,409:107-16.

¹⁴ Kleeberger C.A., Lyles R.H., Margolick J.B., Rinaldo C.R., Phair J.P., Giorgi J.V. (1999) Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 14–19.

Bevölkerung. Dabei werden unbefruchtete Eizellen ohne medizinische Gründe, sondern meist der Karriere wegen, eingefroren.

Wie schon Luyet im Jahr 1937 beobachtete entstehen Zellschäden vor allem beim Einfrier- und Auftauprozess durch den Phasenübergang von Wasser zu Eis (Luyet, 1937¹⁵).

Das Einfrieren einer wässrigen Lösung erfolgt im Allgemeinen über drei Schritte. Zunächst wird die Temperatur bis unter den Gefrierpunkt abgekühlt. Es erfolgt die sogenannte Unterkühlung. Obwohl die Temperatur unter 0 °C sinkt bilden sich in dieser Phase noch keine Eiskristalle aus. Als nächstes folgt die Nukleation d.h. die Bildung eines Kristallkeims. Ist der Nukleationskeim ausreichend groß beginnt die Kristallisation (Fletcher, 1970¹⁶; Hobbs, 1974¹⁷).

Bei langsamen Kühlraten kommt es zur Phasentrennung von Wassermolekülen und gelösten Stoffen (Luyet, 1937¹⁸). Grundsätzlich unterscheidet man zwei Schädigungsmechanismen, die u.a. Lovelock beschreibt (Lovelock, 1953a¹⁹; Lovelock, 1953b²⁰; Lovelock, 1954²¹; Lovelock, 1955²²). Zum einen die mechanische Schädigung durch Bildung von intrazellulären Eiskristallen (Takamatsu und Rubinsky, 1999²³; Bischof und Rubinsky, 1993²⁴). Zum anderen die osmotische Schädigung durch zu hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen in Folge des Wasserverlusts nach der Kristallisation. Der Wasserverlust hat diverse Folgen, die Farrant als „solution effects“ beschreibt (Farrant, 1977²⁵). Beim Einfrieren bilden sich zunächst extrazellulär Eiskristalle, was zu einer Erhöhung der extrazellulären Stoffkonzentration führt. Es bildet sich ein osmotischer Gradient. In Folge dessen wird der Zelle Wasser entzogen und sie dehydriert. Durch den Wasserentzug bei der Eiskristallbildung wird auch die

¹⁵ Luyet, B.J. (1937) *The vitrification of organic colloids and of protoplasm. Biodynamica* 1, 1-14.

¹⁶ Fletcher N.H., *The Chemical Physics of Ice. Cambridge University Press, London 1970*

¹⁷ Hobbs P.V., *Ice Physics. Clarendon Press, Oxford 1974.*

¹⁸ Luyet, B.J. (1937) *The vitrification of organic colloids and of protoplasm. Biodynamica* 1, 1-14.

¹⁹ Lovelock, J.E. (1953a) *The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta* 10, 414-26.

²⁰ Lovelock, J.E. (1953b) *The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta* 11, 28-36.

²¹ Lovelock, J.E. (1954) *The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. Biochem J* 56, 265-70.

²² Lovelock, J.E. (1955) *Haemolysis by thermal shock. Br J Haematol* 1, 117-29.

²³ Takamatsu H., Rubinsky B. (1999) *Viability of deformed cells. Cryobiology* 39/3, 243-251.

²⁴ Bischof J.C., Rubinsky B. (1993) *Large ice crystals in the nucleus of rapidly frozen liver cells. Cryobiology* 30/6, 597-603.

²⁵ Farrant, J. (1977) *Water transport and cell survival in cryobiological procedures. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278, 191-205.

Phospholipidmembran der Zelle beeinflusst. Die Kohlenwasserstoffketten rücken aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen zusammen. Folglich verliert die Zellmembran ihre Flexibilität und geht vom flüssigen in einen gelartigen Zustand über (Williams et al., 1981²⁶). Dadurch ist die Membran weniger beweglich und empfindlicher gegenüber mechanischen Einflüssen (Crowe et al., 1984²⁷; Williams et al., 1981²⁸). Des Weiteren wird durch den Wasserentzug die Tertiärstruktur von Proteinen beeinflusst. Die intrazelluläre Stoffkonzentration steigt aufgrund des Wasserentzugs an und kann zu einem Funktionsverlust und letztlich zur Denaturierung der Proteine führen. Im Jahr 1972 veröffentlichten Mazur et al. die Zwei-Faktor Hypothese (Mazur et al., 1972²⁹). Darin wird beschrieben, dass die Kühlrate ausschlaggebend für eine erfolgreiche Kryokonservierung ist und für jeden Zelltyp eine optimale Kühlrate existiert. Erfolgt die Abkühlung zu langsam kommt es zu osmotischen Schäden wie z.B. der Denaturierung von Proteinen, da die intrazelluläre Salzkonzentration steigt. Erfolgt das Einfrieren zu schnell wird der Zelle zu wenig Wasser entzogen und es bilden sich intrazellulär Eiskristalle, die zu mechanischen Schäden der Zellen führen. Das Optimum liegt folglich genau dazwischen (siehe Abb. 2).

²⁶ 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.

²⁷ Crowe J.H. Crowe L.M., Chapman D. (1984) *Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. Science* 223/4637, 701-703.

²⁸ 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.

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.

Einleitung

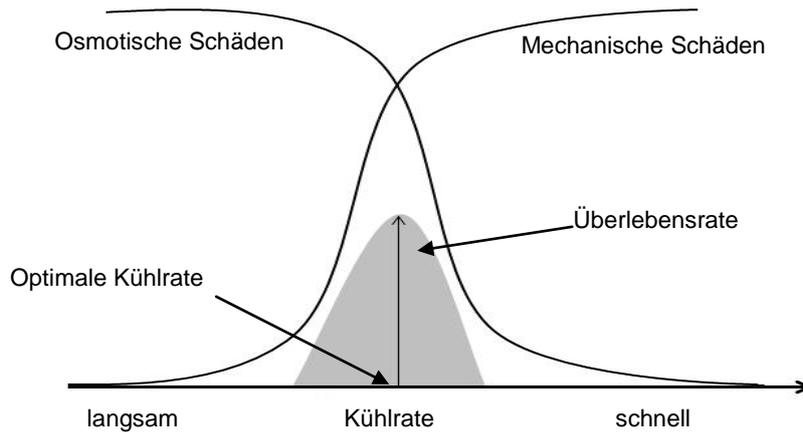


Abbildung 2: Zwei-Faktor Hypothese von Mazur et al., 1972. Erfolgt das Einfrieren der Zellen zu langsam kommt es zu osmotischen Schäden. Ist der Einfrierprozess zu schnell entstehen durch Eiskristallbildung mechanische Schäden. Die optimale Kühlrate liegt genau dazwischen. Abbildung verändert aus Muldrew et al., 2004³⁰.

Ein weiterer Gesichtspunkt, der bei einer erfolgreichen Kryokonservierung eine wichtige Rolle spielt ist der Auftauprozess. Auch bei diesem können die Zellen geschädigt werden. Beim Auftauen der Zellen schmelzen die Eiskristalle nur langsam. Dabei entsteht im Zellinneren eine hohe Stoffkonzentration. Die erhöhte Osmolarität innerhalb der Zelle führt dazu, dass Wasser in die Zelle einströmt. Der hydrostatische Druck auf die Zellmembran steigt an und kann zur Lyse der Zelle führen, wenn diese dem Druck nicht standhalten kann. Um die Zellschäden so gering wie möglich zu halten werden die Zellen mit hohen Auftauraten erwärmt (Wolfe und Bryant, 2001³¹). Dies hat zur Folge, dass die Eiskristalle schneller schmelzen und die Membran wieder schneller flexibel wird (Muldrew und McGann, 1994³²).

Aber nicht nur der Einfrier- und Auftauprozess ist für eine erfolgreiche und verlustarme Kryokonservierung wichtig, auch die Lagerungsbedingungen spielen eine wichtige Rolle (Germann et al., 2013³³). Diese werden in einem gewöhnlichen Kryotank im Vergleich zum Einfrier- und Auftauprozess weniger kontrolliert und dokumentiert. Dabei treten Temperaturerhöhungen häufig durch Ein- und Auslagerung sowie Umlagerung von Proben auf (siehe Abb. 3). Solche Temperaturschwankungen können auch beim Transport von

³⁰ 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.

³¹ Wolfe J., Bryant G. (2001) *Cellular cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects*. *Int J Refrig* 24, 438-450.

³² Muldrew K., McGann L.E. (1994) *The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury*. *Biophys J* 66/2, 532-541.

³³ Germann A, Oh YJ, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. (2013) *Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function.*, *Cryobiology.*, 67(2):193-200

Proben erfolgen, bei dem die Proben beispielsweise auf Trockeneis versendet werden. Dabei kommt es zur Temperaturerhöhung auf über -80 °C , was zu Rekrystallisationsprozessen führen kann (siehe Abb. 3).

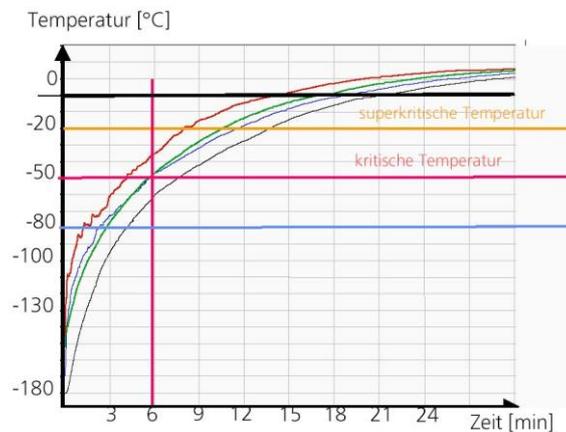


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Temperatur innerhalb eines Probenregals nach einer Entnahme aus dem Tank. Quelle: Fraunhofer IBMT

Im Jahr 2005 zeigten Vysekantsev et al., dass Temperaturschwankungen von -196 °C auf -100 °C die Viabilität der Zellen verringern (Vysekantsev et al., 2005³⁴). Des Weiteren können suboptimale Lagerungsbedingungen Auswirkungen auf den Phänotyp und die Immunantwort der Zellen haben (Constantini et al., 2003³⁵; Kleeberger et al., 1999³⁶; Kreher et al., 2003³⁷; Oldham et al., 1976³⁸; Reimann et al., 2000³⁹; Rosillio et al., 1995⁴⁰; Weinberg et al., 1998⁴¹; Weinberg et al., 2000⁴²)

³⁴ Vysekantsev I.P., Gurina T.M., Martsenyuk V.F., Petrenko T.F., Kudokotseva E.V., Koshchiy S.V., Groshevoy M.I. (2005) Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. *Cryo Letters* 26/6, 401-408.

³⁵ 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.

³⁶ Kleeberger C.A., Lyles R.H., Margolick J.B., Rinaldo C.R., Phair J.P., Giorgi J.V. (1999) Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 14–19.

³⁷ 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.

³⁸ Oldham R.K., Dean J.H., Cannon G.B., Ortaldo J.R., Dunston G., Applebaum F., Mc Coy J.L., Dieu J., Herberman R.B. (1976) Cryopreservation of human lymphocyte function as measured by in vitro assays, *Int. J. Cancer* 18, 145–155.

³⁹ 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.

Germann et. al zeigten im Jahr 2013 anhand von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), dass 400 Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung die PBMC-Recovery, -Viabilität und T-Zellfunktionalität verringern (Germann et al., 2013⁴³). Dies beeinflusst vor allem die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, was sehr wichtig in klinischen Studien ist. Aber auch für die Reproduktionsmedizin und alle anderen Bereichen, in denen die Kryokonservierung und Kryobanken zum Einsatz kommen, kann dies diverse Folgen haben. So könnten Temperaturschwankungen während der Lagerung beispielsweise zur Verringerung der Erfolgsquote in der Reproduktionsmedizin führen. Des Weiteren könnten funktionelle Assays nicht mehr möglich sein oder die Proben könnten durch suboptimale Lagerung und Transport komplett zerstört werden.

Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ab wann Auswirkungen durch Temperaturschwankungen, die durch Einlagern- und Auslagern von Proben und durch suboptimale Transportbedingungen (über -130 °C) entstehen, festzustellen sind.

Als Testsystem sollen mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) verwendet werden. Diese lassen sich einfach aus Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isolieren. PBMCs sind eine Untergruppe der Leukozyten. Diese, auch weiße Blutzellen genannt, sind für die Abwehr von Krankheitserregern und Fremdstoffen zuständig und Teil der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr⁴⁴. Zu den Leukozyten zählen die Granulozyten, Monozyten, Dendritischen Zellen, Lymphozyten sowie die Mastzellen⁴⁵. Die PBMCs sind eine Untergruppe der Leukozyten und umfassen die Zellen, die einen runden Zellkern besitzen und sich im peripheren Blut befinden. Dazu zählen somit die Lymphozyten, Monozyten sowie die Dendritischen Zellen (Arosio et al., 2014⁴⁶). Die Granulozyten werden aufgrund ihrer Granula im Zellinneren von den PBMCs ausgeschlossen. Die PBMCs

⁴⁰ Rosillo M.C., Ortuno F., Rivera J., Moraleda J.M., Vicente V. (1995) Cryopreservation modifies flow-cytometric analysis of hemopoietic cells, *Vox Sang.* 68, 210.

⁴¹ 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 virusinfected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 804-7.

⁴² Weinberg A., Wohl D.A., Brown D.G., Pott G.B., Zhang L., Ray M.G., van der Horst C. (2000) Effect of cryopreservation on measurement of cytomegalovirus-specific cellular immune responses in HIV infected patients, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 25, 109–114.

⁴³ Germann A, Oh YJ, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. (2013) Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function., *Cryobiology.*, 67(2):193-200.

⁴⁴ Neil A. Campbell, James B. Reece, *Biologie, Pearson Studium, 8., aktualisierte Auflage, 2009*

⁴⁵ Neil A. Campbell, James B. Reece, *Biologie, Pearson Studium, 8., aktualisierte Auflage, 2009*

⁴⁶ Arosio B, D'Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, Nicolini P, Rossi PD, Maccarrone M, Mari D. (2014) Peripheral blood mononuclear cells as a laboratory to study dementia in the elderly, *Biomed Res Int.* 2014; 169203.

enthalten somit die wichtigsten Zellen des Immunsystems. Deshalb werden sie oft in der Forschung eingesetzt (Olekuman et al. 2010⁴⁷; Germann et al. 2013⁴⁸). Ihr Einsatzgebiet reicht von der Erforschung von HIV/AIDS und Tuberkulose (Mlotshwa et al., 2010⁴⁹) über Alzheimer (Arosio et al., 2014⁵⁰) bis hin zu Krebs (Malyguine et al., 2012⁵¹). Dabei werden die PBMCs vor allem in der Impfstoffentwicklung (Slota et al., 2011⁵²) und im Immunmonitoring eingesetzt, um die Effektivität eines potenziellen Impfstoffes oder einer Therapie zu testen (Malyguine et al., 2012⁵³).

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ab wann die Temperaturschwankungen die PBMC-Viabilität und -Recovery sowie T- Zelfunktionalität verringern. Dazu sollen die Zellen isoliert und anschließend eingefroren werden. Während der Tieftemperaturlagerung sollen die Proben mit Hilfe eines automatisierten Robotersystems kontrollierten zyklischen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden, die die Ein- und Auslagerung von Proben in Kryobanken und klinischen Studien simulieren. Anschließend sollen die Zellen aufgetaut und die PBMC-Viabilität und -Recovery sowie die T-Zelfunktionalität bestimmt werden.

Die PBMCs sollen aus Buffy Coats gewonnen werden. Zur Isolierung dient dabei die Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll. Diese Methode wurde im Jahr 1968 von Böyum erstmals beschrieben (Böyum, 1968⁵⁴). Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Verfahren, welches verschiedene Bestandteile ihrer Dichte nach auftrennt.

⁴⁷ Olemukan R.E., Eller L.A., Ouma B.J., Etonu B., Erima S., Naluyima P., Kyabaggu D., Cox J.H., Sandberg J.K., Wabwire-Mangen F., Michael N.L., Robb M.L., de Souza M.S., Eller M.A. (2010) Quality monitoring of HIV-1-infected and uninfected peripheral blood mononuclear cell samples in a resource-limited setting, *Clin. Vaccine Immunol.* 17 (6), 910–918.

⁴⁸ Germann A, Oh YJ, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. (2013) Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function., *Cryobiology.*, 67(2):193-200.

⁴⁹ Mlotshwa M, Riou C, Chopera D, de Assis Rosa D, Ntale R, Treunicht F, Woodman Z, Werner L, van Loggerenberg F, Mlisana K, Abdool Karim S, Williamson C, Gray CM; CAPRISA 002 Study Team. (2010) Fluidity of HIV-1-specific T-cell responses during acute and early subtype C HIV-1 infection and associations with early disease progression., *J Virol.*, 84(22):12018-29.

⁵⁰ Arosio B, D'Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, Nicolini P, Rossi PD, Maccarrone M, Mari D. Peripheral blood mononuclear cells as a laboratory to study dementia in the elderly, *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 169203. doi: 10.1155/2014/169203. Epub 2014 Apr 30.

⁵¹ Malyguine AM, Strobl S, Dunham K, Shurin MR, Sayers TJ. (2012) ELISPOT Assay for Monitoring Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) Activity in Cancer Vaccine Clinical Trials., *Cells.*, 1(2):111-26.

⁵² Slota M, Lim JB, Dang Y, Disis ML. (2011) ELISpot for measuring human immune responses to vaccines., *Expert Rev Vaccines.*, 10(3):299-306.

⁵³ Malyguine AM, Strobl S, Dunham K, Shurin MR, Sayers TJ. (2012) ELISPOT Assay for Monitoring Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) Activity in Cancer Vaccine Clinical Trials., *Cells.*, 1(2):111-26.

⁵⁴ Böyum A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 97:7.

Ficoll dient dabei als Auftrennmittel. Es besteht aus Polysucrose und Natriumdiatrizoat und besitzt eine Dichte von 1,007 g/ml⁵⁵. Die Bestandteile mit höherer Dichte wandern durch das Auftrennmittel hindurch und sammeln sich unterhalb davon an währenddessen sich Bestandteile mit geringerer Dichte über dem Ficoll anlagern.

Nach der Isolierung sollen die Zellen kontrolliert mit 1 °C/min eingefroren werden und anschließend kontrollierten Temperaturschwankungen von 0-350 Zyklen mit Hilfe eines automatisierten Robotersystems ausgesetzt werden. Die Simulation erfolgt dabei in 50er-Schritten.

Nach der Simulation werden die Zellen aufgetaut und die Zellkonzentration und Viabilität sowohl direkt nach dem Auftauen als auch nach ÜN-Kultur mit einem automatisierten Zellzähl-System gemessen.

Über den Einfluss der Kryokonservierung auf die T-Zellfunktionalität wird kontrovers diskutiert. Während Owen et al. von einem Verlust der T-Zellfunktionalität nach der Kryokonservierung berichten, haben Kreher et al. den Erhalt der Funktionalität beobachtet (Owen et al., 2007⁵⁶; Kreher et al., 2003⁵⁷). Aus diesem Grund soll auch in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung auf die T-Zellfunktionalität bestimmt werden. Um diese zu untersuchen soll ein ELISpot eingesetzt werden.

Die Abkürzung ELISpot steht für Enzyme-Linked Immunospot Assay (Slota et al., 2011⁵⁸). Dieser ist ein indirekter Test zum Nachweis antigenspezifischer Immunantworten und wurde im Jahr 1983 erstmals von Czerkinsky et al. beschrieben (Czerkinsky et al., 1983⁵⁹). Der ELISpot ist heute einer der meist eingesetzten Immunassays und wird u.a. in der

⁵⁵ http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/10771pis.pdf, abgerufen am 05.10.2014

⁵⁶ Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschhorn 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., Norris P.J., Loss of T cell responses following long-term cryopreservation, *J. Immunol. Methods* 326 (2007) 93–115.

⁵⁷ Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J. Immunol. Methods* 2003;278:79-93. doi:10.1016/S0022-1759(03)00226-6.

⁵⁸ Slota M, Lim JB, Dang Y, Disis ML., ELISpot for measuring human immune responses to vaccines., *Expert Rev Vaccines*. 2011 Mar;10(3):299-306. doi: 10.1586/erv.10.169.

⁵⁹ 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.

Alzheimerforschung (Arosio et al., 2014⁶⁰) sowie in der Krebsimmuntherapie (Malyguine et al., 2012⁶¹) verwendet. Vor allem aber wird er in der Impfstoffentwicklung eingesetzt (Slota et al., 2011⁶²). Der ELISpot ermöglicht das Potenzial eines Impfstoffes durch Quantifizierung der antigenspezifischen Immunantwort zu bewerten. Durch die stetige Weiterentwicklung existieren heute mehrere Formen des ELISpots u.a. ein Granzyme B ELISpot, TGF-beta ELISpot und ein Fluorescent ELISpot (Slota et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit soll eine weitere Form des ELISpots, der IFN- γ ELISpot verwendet werden und so die Immunantwort von zytotoxischen CD8+-T-Zellen quantifiziert werden. Zum Nachweis antigenspezifischer Immunantworten wird das immunologische Gedächtnis der erworbenen Immunität genutzt. Dabei erkennen die Zellen des Immunsystems körperfremde Moleküle, mit denen der Organismus zuvor bereits Kontakt hatte und lösen eine verstärkte und optimierte Reaktion aus⁶³. Die T-Zellen erkennen Antigene mit Hilfe von antigenspezifischen Rezeptoren, die in der Plasmamembran verankert sind. Diese können allerdings keine freien Antigene erkennen, sondern ausschließlich an Antigenfragmente binden, die von speziellen Proteinen, den sog. Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC, engl. major histocompatibility complex), an der Oberfläche der infizierten Zelle den T-Zellen präsentiert werden. Dabei erkennen die zytotoxischen CD8+-T-Zellen Antigenfragmente, die von einem Klasse-I-MHC-Komplex präsentiert werden⁶⁴.

Infiziert ein Erreger eine Zelle werden dessen Proteine im Zellinnern in Antigenfragmente gespalten. Innerhalb der Zellen binden diese an ein MHC-Molekül (siehe Abb. 4). Es bildet sich ein Antigenfragment-MHC-Komplex. Dieser wird an die Oberfläche transportiert und dort präsentiert. Es entsteht eine sogenannte antigenpräsentierende Zelle. In der vorliegenden Arbeit präsentiert diese Zelle CEF- Peptide (Peptidmischung aus Cytomegalievirus, Epstein-Barr Virus und Influenza Virus) und CMV-Peptide (Cytomegalievirus-Peptide), die von zytotoxischen CD8+-T-Zellen erkannt werden. Ein Zusammentreffen einer antigenpräsentierenden Zelle mit einer passenden T-Zelle führt zur Bindung zwischen dem T-Zellrezeptor und dem Antigenfragment-MHC-Komplex und aktiviert dadurch die Zelle (siehe

⁶⁰ Arosio B, D'Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, Nicolini P, Rossi PD, Maccarrone M, Mari D. *Peripheral blood mononuclear cells as a laboratory to study dementia in the elderly*, *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 169203. doi: 10.1155/2014/169203. Epub 2014 Apr 30.

⁶¹ Malyguine AM, Strobl S, Dunham K, Shurin MR, Sayers TJ., *ELISPOT Assay for Monitoring Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) Activity in Cancer Vaccine Clinical Trials.*, *Cells*. 2012 May 10; 1(2):111-26. doi: 10.3390/cells1020111.

⁶² Slota M, Lim JB, Dang Y, Disis ML., *ELISpot for measuring human immune responses to vaccines.*, *Expert Rev Vaccines*. 2011 Mar;10(3):299-306. doi: 10.1586/erv.10.169.

⁶³ Neil A. Campbell, James B. Reece, *Biologie*, Pearson Studium, 8., aktualisierte Auflage, 2009

⁶⁴ Neil A. Campbell, James B. Reece, *Biologie*, Pearson Studium, 8., aktualisierte Auflage, 2009

Abb. 4). Bei den zytotoxischen CD8+-T-Zellen verstärkt der CD8-Rezeptor die Bindung zwischen infizierter Zelle und zytotoxischer Zelle und bleibt während der Aktivierung in Kontakt⁶⁵.

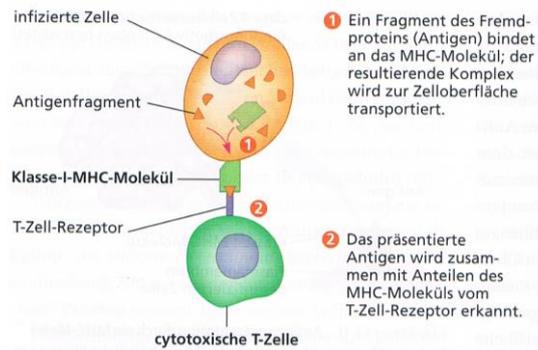


Abbildung 4: Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle. Das Klasse- I - MHC-Molekül präsentiert der zytotoxischen T-Zelle ein Antigenfragment. Es erfolgt eine Bindung zwischen dem T-Zellrezeptor der zytotoxischen T-Zelle und dem Antigenfragment-MHC-Komplex. Abbildung entnommen aus *Biologie*, Neil A. Campbell, James B. Reece.⁶⁶

Die Aktivierung der zytotoxischen Zelle regt diese u.a. zur Ausschüttung von IFN- γ Molekülen an. IFN- γ ist ein Zytokin, welches eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort auf Viren und Bakterien spielt. IFN- γ wird u.a. von TH1 Zellen, einer Untergruppe der T-Helferzellen, und von CD8+ zytotoxischen T-Zellen ausgeschüttet (Roff et al., 2014⁶⁷). Dieses kann im IFN- γ ELISpot indirekt nachgewiesen werden und ermöglicht in der vorliegenden Arbeit die Quantifizierung der CD8+ Immunantwort. Der IFN- γ ELISpot wird vor allem in der Impfstoffentwicklung für HIV/AIDS, Tuberkulose (Mlotshwa et al., 2010⁶⁸) und Malaria (Moorthy et al., 2004⁶⁹) eingesetzt.

Die vorliegende Arbeit ist für alle Bereiche in denen die Kryokonservierung und Kryobanken eingesetzt werden sehr relevant. So könnten Temperaturschwankungen die Erfolgsquote in der Reproduktionsmedizin beeinflussen. Des Weiteren könnten Temperaturschwankungen die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen z.B. in klinischen Studien und Multicenter-Studien erschweren.

⁶⁵ Neil A. Campbell, James B. Reece, *Biologie*, Pearson Studium, 8., aktualisierte Auflage, 2009

⁶⁶ Neil A. Campbell, James B. Reece, *Biologie*, Pearson Studium, 8., aktualisierte Auflage, 2009

⁶⁷ Roff S.R., Noon-Song E.N., Yamamoto J.K., *The significance of interferon- γ in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis*, *Front Immunol.* 2014 Jan 13; 4:498. doi:10.3389/fimmu.2013.00498.eCollection 2014

⁶⁸ Mlotshwa M, Riou C, Chopera D, de Assis Rosa D, Ntale R, Treunicht F, Woodman Z, Werner L, van Loggerenberg F, Mlisana K, Abdool Karim S, Williamson C, Gray CM; CAPRISA 002 Study Team. *Fluidity of HIV-1-specific T-cell responses during acute and early subtype C HIV-1 infection and associations with early disease progression.*, *J Virol.* 2010 Nov;84(22):12018-29. doi: 10.1128/JVI.01472-10. Epub 2010 Sep 8

⁶⁹ Moorthy, V.S., Good, M.F. and Hill, A.V. (2004) *Malaria vaccine developments.* *Lancet* 363, 150-6.

2. Material und Methoden

2.1 Material

In den nachfolgenden Tabellen sind die Materialien sowie Geräte und Reagenzien aufgelistet, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Material. In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Materialien aufgeführt.

Material	Hersteller
10 - 200 µl Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt
MBP 200 G Pure Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt
100 - 1000 µl Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt
ELISpot-Platten „human Interferon-γ precoated Plates (mAB1-D1K)“	Mabtech AB, Hamburg
1,6 ml Cryo Pure Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
5 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
10 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
25 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
sterile 50 ml Polypropylen-Falcons	Greiner Bio One, Frickenhausen
CELLSTAR® Standard Suspensionskultur Flasche	Greiner Bio One, Frickenhausen
Immunoscan CTL PUNCH SUPPLY Kit	CTL, Aalen

Material und Methoden

Tabelle 2: Geräte. In der nachfolgenden Tabelle sind die Geräte aufgeführt, die zur Anfertigung dieser Arbeit genutzt wurden.

Geräte	Hersteller
“automated 96 well plate washer Hydroflex”	Tecan, Crailsheim
“ELISpot-reader Immunoscan”	CTL, Aalen
“hand dispenser“ Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
4 °C Kühlschrank KT1730	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
-20 °C Gefrierschrank GP 1366	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
-80 °C Gefrierschrank HERAfreeze HFU 686 Top	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Kryotank Biosafe	Cryotherm, Kirchen/Sieg
Mehrkanal Pipetten Eppendorf Research plus	Eppendorf, Hamburg
Mikroliter Pipette 10-100 µl Transferpette S	Brand, Wertheim
Mikroliter Pipette 20-200 µl Transferpette S	Brand, Wertheim
Mikroliter Pipette 100-1000 µl Transferpette S	Brand, Wertheim
Einfrierbehälter “Nalgene freezing container”	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
tragbarer elektrischer Pipettenboy Accu-Jet	Brand, Wertheim
Kühlakkus “precooled blue IsoPack for 2ml reaction tubes” Isothermsystem	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ Zellinkubator HERAcell BBD 6220	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Zellinkubator BK4029	Ehret, Emmendingen
CTL Elispot Analyzer	CTL, Aalen
Sterilbank HERAsafe KSP 18, “laminar flow biological safety cabinet class II”	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Vi-CELL™ XR “Cell Analyzer”	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer VV3	VWR, Darmstadt
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge HERAEUS MULTIFUGE 1S-R	Thermo Electron Corporation, Dreieich

Material und Methoden

Tabelle 3: Reagenzien. In dieser Tabelle sind die Reagenzien aufgelistet, die zum Anfertigen dieser Arbeit genutzt wurden und zum Ansetzen von Medien verwendet wurden.

Reagenzien	Hersteller	Lagerung
Aqua bidest.	VWR, Darmstadt	RT
“CEF Peptide Pool Class 1 Peptide Pool classic” (CEF Peptide)	CTL, Aalen	-20 °C
“CMV peptide pool PepMix HCMVA (pp65)” (CMV Peptide)	JTP, Berlin	-20 °C
„Anti-human IFN- γ detector antibody 7-B6-1, biotinylated” (Detektionsantikörper)	Mabtech AB, Hamburg	4 °C
DMSO, Endotoxin getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	RT, lichtgeschützt
Filoceth ^{PLUS} (Einfriermedium)	Fischer Procryotect, Ruedlingen	4 °C
Histopaque-1077 (Ficoll)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	4 °C, lichtgeschützt
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt	4 °C
GlutaMAX™	Invitrogen™, Karlsruhe	RT
1M HEPES Puffer	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt	4 °C
Leitungswasser	-	-
BD Pharm Lyse™ (Lyse)	BD Biosciences, Heidelberg	4 °C
D-PBS without Ca ²⁺ or Mg ²⁺ (PBS)	Invitrogen™, Karlsruhe	RT
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe	4 °C
Phytohemagglutinin PHA-P	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	-20 °C
RPMI 1640 Medium	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt	4 °C
Streptavidin-HRP	Mabtech AB, Hamburg	4 °C
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	RT
Vector® NovaRED™ ”Substrate Kit SK-4800”	Vector, Burlingame, USA	4 °C
Vi-CELL® XR “Quad Pak Reagent Kit”	Beckman Coulter, Krefeld	RT

Material und Methoden

Der nachfolgenden Tabelle sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen zu entnehmen.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen. In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Puffer und Lösungen alphabetisch aufgelistet.

CEF 20x Stocklösung (40 µg/ml)	CEF Peptide Pool Claas 1 Peptide Pool classic + 10 µl DMSO + 40 µl Aqua dest. + 450 µl R10 Medium
CEF 2x Arbeitslösung (4 µg/ml)	150 µl 20x Stocklösung (40 µg/ml) + 1350 µl R10 Medium
CMV 50x Stocklösung (50 µg/ml)	CMV peptide pool PepMix + 40 µl DMSO +460 µl PBS
CMV 2x Arbeitslösung (2 µg/ml)	60 µl 50x Stocklösung (50 µg/ml) + 1440 µl R10 Medium
Detektionsantikörper- Arbeitslösung (2 µg/ml)	5,4 ml PBS + 0,6 ml FCS (10 %) + 12 µl anti-human monoklonaler IFN-γ Antikörper 7B6-1 (1 mg/ml)
1x Lysepuffer	450 ml Aqua bidest. + 50 ml BD Pharm Lyse
PHA-P 80x Stocklösung (40 µg/ml)	2 mg PHA-P + 2,5 ml PBS → 0,8 mg/ml → 1:20 Verdünnung mit PBS
PHA-P 2x Arbeitslösung (1 µg/ml)	80x Stocklösung → 1:40 Verdünnung mit R10 Medium
PBS + 1 % FCS	500 ml PBS - 5 ml PBS + 5 ml FCS (1 %)
PBS-Tween	500 ml PBS - 5ml PBS + 5 ml FCS (1 %) + 250 µl Tween 20

Material und Methoden

R10 Medium	500 ml RPMI 1640 Medium -72,5 ml RPMI 1640 + 50 ml FCS (10 %) + 12,5 ml 1M HEPES Puffer (50 mM) + 5 ml 100x GlutaMAX (1 %) + 5 ml 100x Penicillin/Streptomycin (1 %)
R10-DMSO	10 ml R10 Medium + 32 µl DMSO
Streptavidin-HRP Arbeitslösung	5,4 ml PBS + 0,6 ml FCS (10 %) + 20 µl Streptavidin-HRP
Vector® NovaRED™-Lösung (Substrat)	30 ml Aqua dest + 6 Tropfen Reagenz 1 + 4 Tropfen Reagenz 2 + 4 Tropfen Reagenz 3 + 4 Tropfen Reagenz 4

Zum Erstellen der Arbeit wurde folgende Software verwendet:

Tabelle 5: Software zum Erstellen der Arbeit.

Bezeichnung	Hersteller
CTL ImmunoSpot® 4.0.17	CTL, Aalen
Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim
PowerPoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim
OriginPro 9.0G	OriginLab Corporation, Northampton

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der PBMCs

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus Buffy Coats von vier gesunden CMV-positiven Spendern isoliert. Diese stellte die „Blutspendezentrale Saar-Pfalz gGmbH Am Klinikum Saarbrücken“ zur Verfügung. Die Spender erklärten sich vorab schriftlich dazu bereit, dass ihre Spenden für Forschungszwecke verwendet werden dürfen.

Zur Isolierung der PBMCs wurde die Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll eingesetzt. Dabei wird zunächst das Ficoll mit dem verdünnten Buffy Coat überschichtet (siehe Abb. 5). Während der Dichtegradientenzentrifugation wandern die Zellen mit höherer Dichte durch das Auftrennmittel hindurch auf den Boden des Falcons. Zellen mit geringerer Dichte lagern sich in verschiedenen Phasen über dem Auftrennmittel an. Nach Ablauf der Zentrifugation können verschiedene Zelltypen gewonnen werden.

In der vorliegenden Arbeit entstehen durch die Zentrifugation vier verschiedene Phasen (siehe Abb. 5). Ein Großteil der Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und der Zellschrott sammeln sich am Boden an. Darüber befindet sich die Ficollschicht. Über dieser Schicht lagern sich die PBMCs in einem Zellring an. Darüber folgt das Blutplasma und PBS.

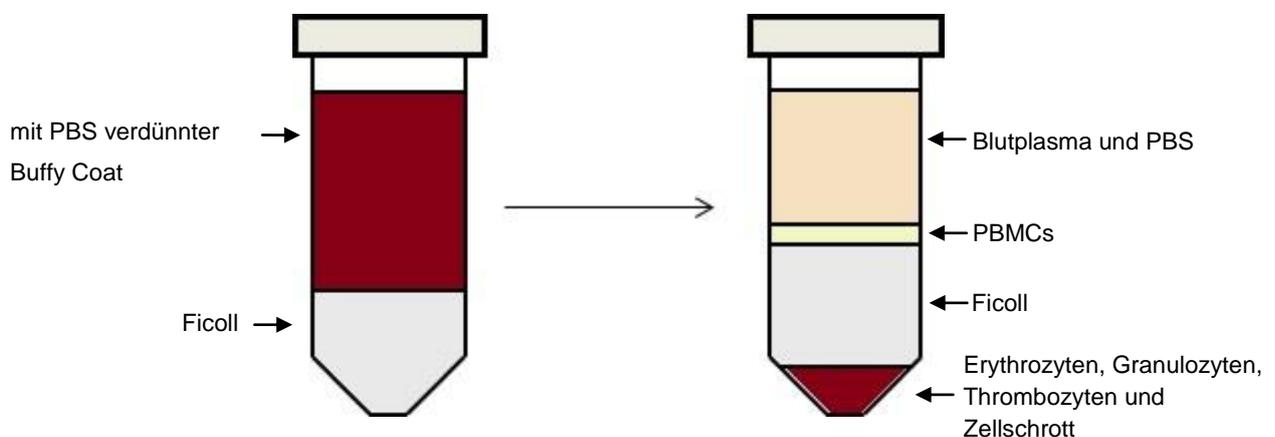


Abbildung 5: Vor der Dichtegradientenzentrifugation (links) sind zwei Phasen vorhanden. Während der Dichtegradientenzentrifugation entstehen vier Phasen. Die unterste Schicht aus einem Großteil von Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Zellschrott, gefolgt von Ficoll und den PBMCs sowie dem Plasma und PBS (rechts).

Die Isolierung erfolgte direkt nach Erhalt der Spende nach folgendem Protokoll:

- Überführen des unverdünnten Buffy Coats in eine Zellkulturflasche
- Verdünnen des Buffy Coats mit PBS (RT) im Verhältnis 1:1
- Mischen
- Überführen von 15 ml Ficoll (RT) in 50 ml Falcons
- Überschichten des Ficolls mit je 30 ml verdünntem Buffy Coat

Bemerkung: Dabei musste auf langsames und vorsichtiges Überschichten geachtet werden, um ein Vermischen der beiden Phasen zu verhindern.

- Dichtegradientenzentrifugation mit 400 xg für 30 min bei RT ohne Bremse

Bemerkung: Um Verschmutzungen und Aerosolbildung vorzubeugen mussten Schutzdeckel angebracht werden.

- Gewinnung der PBMCs durch vorsichtiges Abnehmen des Zellrings mit Hilfe einer 10 ml Pipette

Bemerkung: Dabei musste darauf geachtet werden so wenig wie möglich Ficoll abzusaugen, da dieses toxisch auf die Zellen wirkt.

- Überführen der isolierten Zellen in 50 ml Falcons (max. 20-25 ml)

Um die gewonnenen Zellen zu reinigen wurden sie nach folgendem Protokoll gewaschen:

- Auffüllen mit PBS (RT) bis auf 50 ml
- Zentrifugation mit 400 xg für 6 min bei RT
- Abkippen des Überstandes und Aufklopfen des Pellets
- Resuspension in 10 ml PBS
- Poolen d.h. alle Zellen wurden in ein Falcon überführt
- Auffüllen mit PBS (RT) bis auf 50 ml
- Zentrifugation mit 400 xg für 6 min bei RT
- Abkippen des Überstandes und Aufklopfen des Pellets
- Resuspension in 50 ml PBS (RT)

2.2.2 Zellkonzentrations- und Viabilitätsbestimmung der PBMCs

Zur Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität der isolierten Zellen wurde der Zellzählautomat Vi-CELL™ XR eingesetzt. Das automatisierte System nutzt zur Zellkonzentrations- und Viabilitätsbestimmung die Trypanblau-Färbung. Bei toten Zellen wird die Zellmembran permeabel, sodass der Farbstoff in die Zelle eintreten kann und diese blau anfärbt. Bei intakter Zellmembran bleiben die Zellen ungefärbt. Das Vi-CELL™ XR benötigt für die Messung je Cup ein Probenvolumen von 500 µl. Die Zellsuspension wird aufgesaugt, mit Trypanblau gemischt und anschließend in eine Durchflusszelle gepumpt. Dort fertigt das Vi-CELL™ XR mit einer CCD Kamera je Probe 50 Bilder an. Diese werden in Graustufen angezeigt, sodass die toten Zellen dunkler als die viablen Zellen dargestellt werden. Aus den Bildern kann das Vi-CELL™ XR aufgrund des Kontrastes die Zellkonzentration und die Viabilität errechnen. Das Vi-CELL™ XR gibt die Konzentration mit $\times 10^6$ Zellen/ml und die Viabilität in % an (Vi-CELL™ XR Broschüre⁷⁰).

Die Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Mischen der Probe mit Hilfe einer 10 ml Pipette
- Entnahme von 3x500 µl Zellsuspension je Probe
- Überführen der Zellsuspension in je ein Cup
- Dreifache automatisierte Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität

⁷⁰ Vi-CELL™ XR Broschüre,

http://www.beckmancoulter.de/Life+Science/Durchflusszytometrie+_+Zell+Analyser/Zell+Analyser/Vi-CELL+XR.html, abgerufen am 08.10.2014

2.2.3 Lyse der Erythrozyten

Trotz der Dichtegradientenzentrifugation, bei der ein Großteil der Erythrozyten abgetrennt wurde, sind die isolierten Zellen noch mit einem geringen Anteil an Erythrozyten kontaminiert. Um diese zu zerstören wurde eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Lysepuffer verwendet, der aus einer Ammoniumchloridbasis besteht⁷¹. Das Ammoniumchlorid dringt in die Erythrozyten ein, wird dort umgewandelt und zerstört diese⁷². Um eine erfolgreiche Lyse zu gewährleisten dürfen pro Lyseansatz max. 2×10^8 Zellen enthalten sein.

Die Erythrozytenlyse wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Dreifache automatisierte Zellkonzentrations- und Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ XR wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben
- Entnahme von max. 2×10^8 Zellen pro Lyseansatz
- Zentrifugation mit 400 xg für 6 min bei RT
- Abkippen des Überstandes und Aufklopfen des Zellpellets
- Zugabe von 20 ml 1x Lysepuffer
- Mischen mit Hilfe des Vortexers
- Inkubation für 20 min bei RT im Dunkeln
- Abstoppen der Lyse durch Zugabe von 30 ml PBS + 1 % FCS (RT)

⁷¹ <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/555899.pdf>, abgerufen am 06.10.2014

⁷² <http://www.patent-de.com/20040129/DE69906859T2.html>, abgerufen am 06.10.2014

2.2.4 Einfrieren der PBMCs

In der vorliegenden Arbeit wurden die gewonnenen Zellen direkt nach der Isolierung und der Lyse der Erythrozyten eingefroren, um den Einfluss von Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung auf die PBMC-Viabilität, -Recovery und T-Zellfunktionalität untersuchen zu können.

Nach der Erythrozytenlyse erfolgte das Einfrieren der isolierten Zellen nach folgendem Protokoll:

- Die Einfrierkonzentration betrug 1×10^7 Zellen/ml

Bemerkung: Um den Einfrierprozess zu erleichtern wurden in einem Ansatz immer 18 Kryoröhrchen zusammen in einem Einfrierbehälter "Nalgene freezing container" eingefroren. Dazu wurden pro Ansatz 19×10^7 Zellen in ein Falcon pipettiert.

- Zentrifugation mit 400 xg für 6 min bei RT
- Abkippen des Überstandes und Aufklopfen des Zellpellets
- Resuspension des Pellets in 1 ml Einfriermedium

Bemerkung: Um Zellschäden durch das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu vermeiden wurde das Einfriermedium erst kurz vor Gebrauch aus dem Kühlschrank genommen. Zusätzlich wurden die Kryoröhrchen bei -20 °C vorgekühlt und während des Einfrierprozesses in vorgekühlte Kühlakkus gestellt.

- Hinzugabe von 18 ml Einfriermedium
- Mischen mit Hilfe einer Stabpipette

Bemerkung: Die Endkonzentration betrug nun 1×10^7 Zellen/ml.

- Überführen von je 1 ml Zellsuspension in ein Kryoröhrchen
- Direkte Lagerung in Einfrierbehälter "Nalgene freezing containers", die die Proben ÜN im -80 °C Gefrierschrank mit einer Einfrierrate von 1 °C/min abkühlen
- Nach 24 h erfolgte die Umlagerung der Kryoröhrchen in die Gasphase des flüssigen Stickstoffs (N_2) in einen Kryotank

2.2.5 Simulation von suboptimalen Lagerungsbedingungen

Mit Hilfe eines automatisierten Robotersystems wurden die Proben zyklischen Temperaturschwankungen ausgesetzt. Diese simulieren Temperaturänderungen, die häufig im Biobanking und in klinischen Studien durch Ein- und Auslagern sowie Umlagern von Proben oder Proben transport über -130 °C entstehen. Das System besteht aus einem Roboterarm, der durch Sensoren in einer Referenzprobe temperatur-sowie zeitabhängig gesteuert wird und die vertikale Richtung ändert (siehe Abb. 6).

23 Proben wurden dabei am Roboterarm in einem Probenhalter befestigt. Die Proben wurden zunächst in die Gasphase des flüssigen Stickstoffs gefahren. Die Stickstoffversorgung wurde ständig kontrolliert und Stickstoff automatisch nachgefüllt. Dort verblieben die Proben etwa 1080 s. Nach dieser Zeit führte der Roboter die Proben aus dem Stickstofftank nach oben. Dort verblieben die Proben etwa 5 min bei RT bis in der Referenzprobe eine Temperatur von -60 °C gemessen wurde. Dieser Zyklus stellte eine Temperaturschwankung dar.

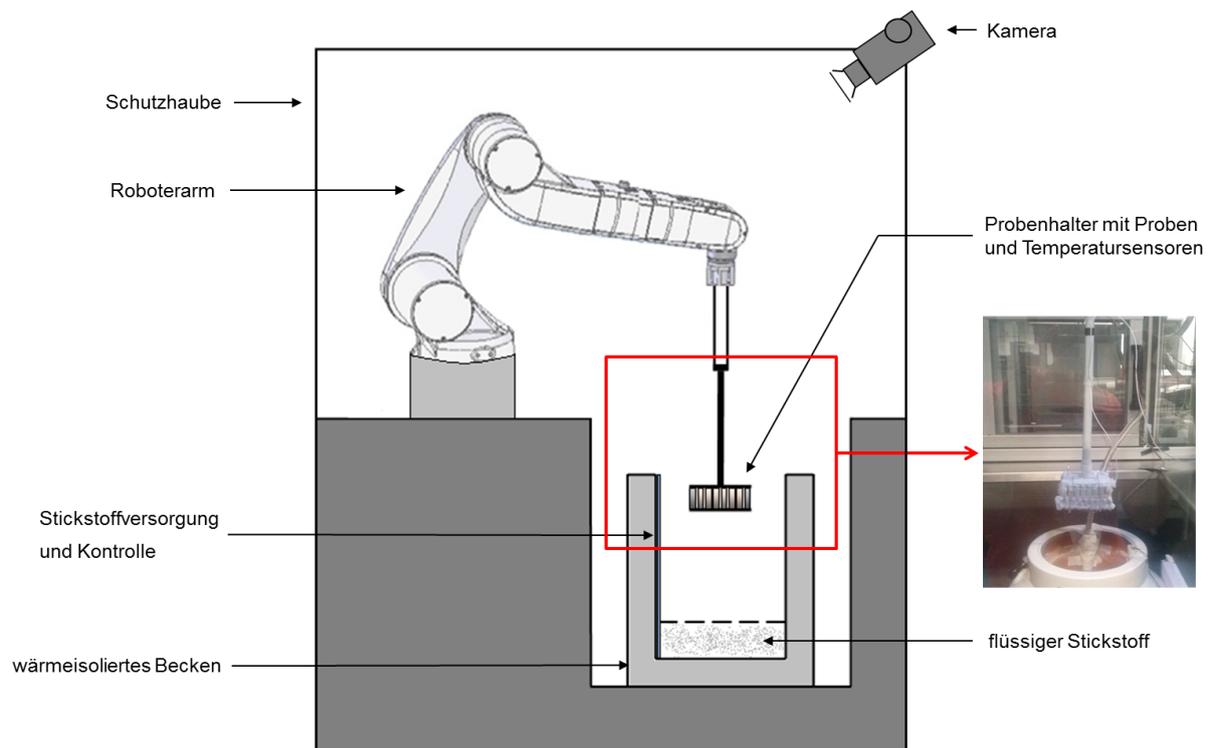


Abbildung 6: Aufbau des Robotersystems. Dieser ist so programmiert, dass er je nach gemessener Temperatur an den Sensoren die vertikale Richtung ändert und somit Temperaturschwankungen simuliert. Abbildung verändert aus Germann et al., 2013.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben insgesamt 350 Temperaturzyklen ausgesetzt. Nach je 50 Zyklen wurden drei Proben entnommen und bis zur weiteren Analyse zur Bestimmung der PBMC-Viabilität, -Recovery und T-Zellfunktionalität ohne Unterbrechung der Kühlkette und ohne weitere Temperaturschwankungen in der Gasphase des flüssigen

Stickstoffs in einem Kryotank gelagert. Als Kontrolle (N_2) dienten drei Proben je Spender, die während der gesamten Lagerungszeit in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs in einem Kryotank ohne Temperaturschwankungen gelagert wurden. Die Temperatur des Kryotanks wurde ständig kontrolliert und war mit einem Alarmsystem gesichert.

Das Einsetzen der Proben und die Simulation der suboptimalen Lagerungsbedingungen wurden folgendermaßen durchgeführt:

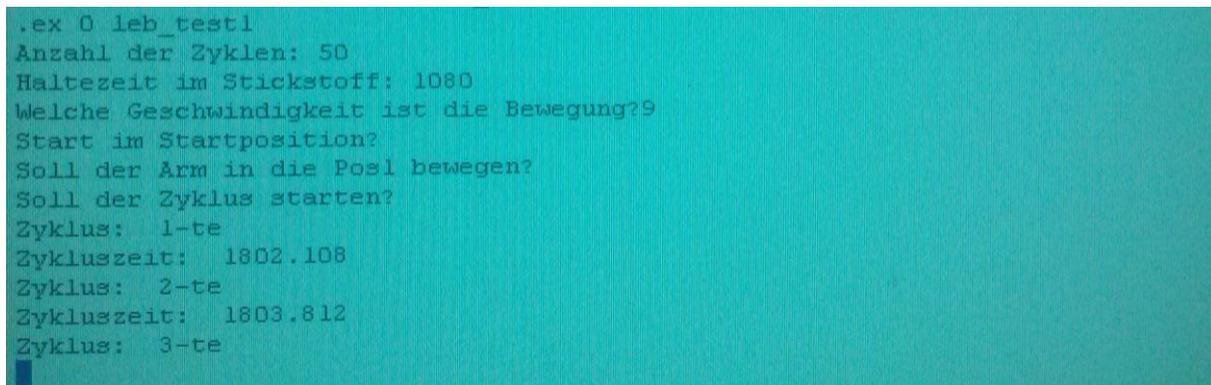
- Einsetzen der Proben in den Probenhalter ohne Unterbrechung der Kühlkette

Bemerkung: Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Temperatur während des Einsetzens nicht höher als auf -100 °C stieg.

- Herunterfahren der Proben in die Gasphase des flüssigen Stickstoffs
- Starten der Simulation (siehe Abb. 7)
 - Auswahl des Programms „ex 0 leb_test1“
 - Eingabe der Zyklenanzahl, der Haltezeit im Stickstoff und der Geschwindigkeit in das System

Bemerkung: Nach Bestätigung der Eingaben führt das Robotersystem die Proben in definierte Positionen (Startposition, Position 1) nach oben

- Starten der Simulation durch Bestätigen mit „Enter“



```
.ex 0 leb_test1
Anzahl der Zyklen: 50
Haltezeit im Stickstoff: 1080
Welche Geschwindigkeit ist die Bewegung?9
Start im Startposition?
Soll der Arm in die Pos1 bewegen?
Soll der Zyklus starten?
Zyklus: 1-te
Zykluszeit: 1802.108
Zyklus: 2-te
Zykluszeit: 1803.812
Zyklus: 3-te
```

Abbildung 7: Bedienung des Simulationsprogramms. Zunächst musste das Programm „ex 0 leb_test1“ ausgewählt werden. Anschließend wurde die Zyklenanzahl, die Haltezeit in Stickstoff sowie die Geschwindigkeit eingegeben. Der Roboter beförderte nach Bestätigung mit der Enter-Taste den Probenhalter in die Startposition sowie in Position 1 und startete den Zyklus.

Nach je 50 Temperaturzyklen wurden drei Proben entnommen und durch sogenannte Dummies ersetzt.

Dies erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Einfrieren von drei Dummies in flüssigem Stickstoff
- Hochfahren der Proben aus der Gasphase des flüssigen Stickstoffs
- Austausch von drei Proben gegen drei Dummies
- Transport der entnommenen Proben ohne Unterbrechung der Kühlkette in einen Kryotank
- Lagerung der Proben bis zum Auftauen zur Bestimmung der PBMC-Viabilität, -Recovery sowie T-Zellfunktionalität in der Gasphase des flüssigen Stickstoff im Kryotank ohne weitere Temperaturschwankungen

Dies wurde so oft wiederholt bis die letzten verbliebenen Proben 350 Temperaturzyklen durchliefen. Somit erhielt man pro Spender je drei Proben, die 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350 Temperaturzyklen ausgesetzt waren. Die Kontrollen (0 Temperaturzyklen) werden nachfolgend als N₂ bezeichnet.

2.2.6 Auftauen der PBMCs

Um den Einfluss der Temperaturschwankungen auf die PBMC-Viabilität und -Recovery sowie die T-Zellfunktionalität zu untersuchen wurden die Zellen aufgetaut. Je Spender wurden die Kryoröhrchen von 0-350 Temperaturzyklen aufgetaut. Die Entnahme und der Transport der Proben bis hin zum Auftauprozess erfolgten ohne Unterbrechung der Kühlkette in einem Probenbehälter mit flüssigem Stickstoff. Um Zellschäden so gering wie möglich zu halten wurden die Zellen mit einer möglichst hohen Auftaurate erwärmt.

Das Auftauen der Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Vorlegen von 8 ml R10 Medium in Falcons
- Erwärmen des Mediums auf 37 °C
- Auftauen der Proben im 37 °C-Wasserbad

Bemerkung: Um Schäden durch das im Einfriermedium enthaltene DMSO vorzubeugen wurden immer nur zwei Kryoröhrchen gleichzeitig aufgetaut.

- Langsame Zugabe von 1 ml R10 Medium zu jeder Probe
- Überführen der Zellsuspension in die vorgelegten Falcons
- Dreifache automatisierte Zellkonzentrations- und Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ XR wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben
- Zentrifugation mit 400 xg für 6 min bei RT
- Abkippen des Überstandes und Aufklopfen des Zellpellets
- Hinzugabe von 10 ml R10 Medium
- Inkubation ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂

Bemerkung: Um eine Zirkulation des CO₂ zu ermöglichen wurden die Deckel der Falcons nur locker angedreht.

- Erneute Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität nach ÜN-Kultur mittels Vi-CELL™ XR wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben

2.2.7 Bestimmung der PBMC-Viabilität und-Recovery

Um des Einfluss der Temperaturschwankungen zu untersuchen wurden die PBMC-Viabilität und die PBMC-Recovery direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur bestimmt. Für jeden Spender (n=4) wurden je drei Proben dreimal für die Versuchsbedingungen 0-350 Temperaturzyklen gemessen.

Bei der Berechnung der PBMC-Viabilität werden zunächst die Zellen gezählt, die nach der Kryokonservierung noch in der Zellsuspension vorhanden sind und als solche detektiert werden können. Komplett zerstörte Zellen werden dabei nicht mehr berücksichtigt, da diese nur noch als Zellschrott vorliegen. Anschließend wird die Viabilität dieser Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

Die PBMC-Viabilität direkt nach dem Auftauen sowie nach ÜN-Kultur wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\%Viabilität = \frac{\text{Anzahl viabler Zellen}}{\text{totale Anzahl der Zellen in der Zellsuspension}} \times 100$$

Die PBMC-Recovery beschreibt die prozentuale Rückgewinnung nach der Kryokonservierung, d.h. wie viele Zellen von den zuvor eingefrorenen Zellen noch vorhanden und gleichzeitig viabel sind.

Die PBMC-Recovery wurde nach folgender Formel berechnet:

PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen:

$$\% Recovery = \frac{\text{Anzahl viabler Zellen direkt nach dem Auftauen}}{\text{Anzahl der eingefrorenen viablen Zellen}} \times 100$$

PBMC-Recovery (%) nach ÜN-Kultur:

$$\% Recovery = \frac{\text{Anzahl viabler Zellen nach ÜN - Kultur}}{(\text{Anzahl der eingefrorenen viablen Zellen}) - (\text{Anzahl der für die Messung nach dem Auftauen entnommenen viablen Zellen})} \times 100$$

2.2.8 Bestimmung der T-Zellfunktionalität mittels IFN- γ ELISpot

Um den Einfluss der Temperaturschwankungen auf die T-Zellfunktionalität zu bestimmen wurde ein IFN- γ ELISpot eingesetzt. Dieser dient zum Nachweis der antigenspezifischen CD8+ T-Zellantwort und somit zur Untersuchung der T-Zellfunktionalität.

In der vorliegenden Arbeit wurden auf eine mit anti-IFN- γ Fängerantikörper beschichtete 96-Well-ELISpot-Platte (siehe Abb. 8A) PBMCs gegeben. Diese wurden durch Zugabe von Peptiden wie CEF und CMV spezifisch bzw. unspezifisch durch PHA-P zum Ausschütten von IFN- γ Molekülen angeregt (siehe Abb. 8B). Das CEF besteht aus einer Mischung von 23 Peptiden (Human cytomegalovirus (HHV-5), Epstein-Barr virus (HHV-4), Influenza A) und der CMV Peptidpool aus 138 Peptiden (Human cytomegalovirus (HHV-5)). Die freigesetzten Zytokine binden an die immobilisierten Fängerantikörper auf der Membran (siehe Abb. 8C). Um die Bindung sichtbar zu machen wurden ein biotinylierter Detektionsantikörper und enzym-gekoppeltes (HRP) Streptavidin hinzugegeben (siehe Abb. 8D). Letzterer bildet mit einem hinzugegeben Substrat einen Farbstoff und macht das gebundene IFN- γ sichtbar (siehe Abb. 8E). Jeder Spot steht dabei für eine IFN- γ sekretierende Zelle.

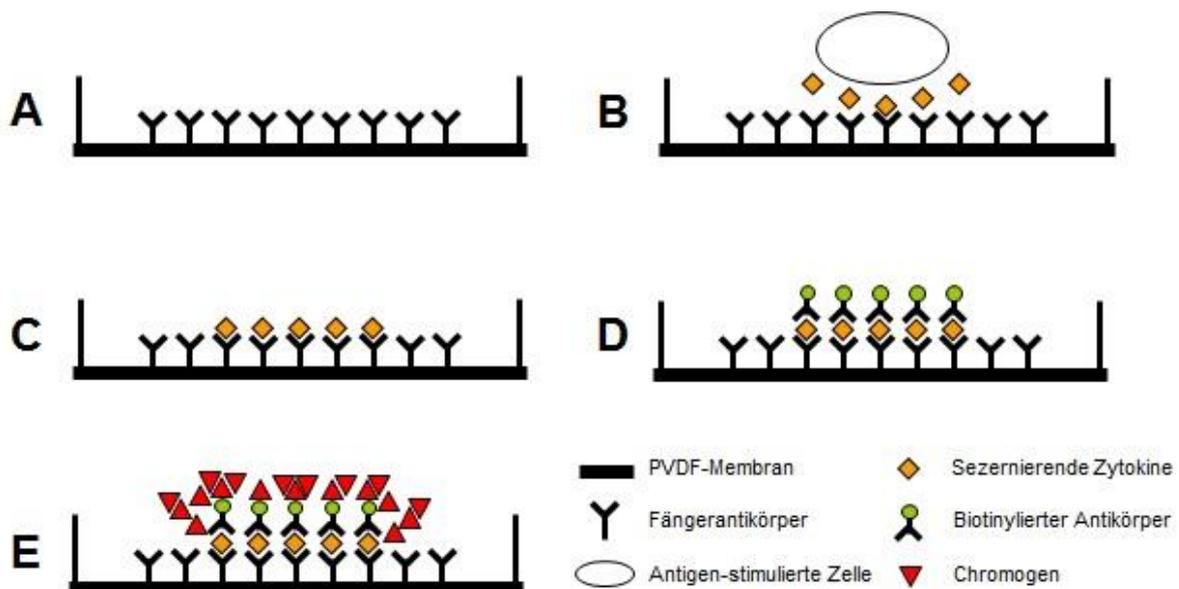


Abbildung 8: Schema des ELISpots. A: PVDF-Membran ist bereits mit Fängerantikörper beschichtet. B: Die Zellen werden angeregt Zytokine zu sezernieren. C: Zytokine werden an Fängerantikörper gebunden. D: Biotinylierter Antikörper wird hinzugegeben, der an die immobilisierten Zytokine bindet. E: Streptavidin-HRP bindet an biotinmarkierten Antikörper und die Nova Red Solution(Substrat) macht die Spots sichtbar.

Der IFN- γ ELISpot wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tag1:

- Auftauen der Zellen wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben
- ÜN-Kultur der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂

Bemerkung: Eine ÜN-Kultur der Zellen nach dem Auftauen war notwendig, da die Zellen nach dem Auftauen gestresst waren und um präapoptotische Zellen aus der Zellsuspension zu entfernen. Beides kann zu unspezifischer Freisetzung von IFN- γ und somit zu unspezifischen Signalen führen.

Tag 2:

- Dreifache automatisierte Zellkonzentrations- sowie Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ XR wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben
- Zentrifugation mit 400 xg für 10 min bei RT
- Abkippen des Überstandes und Aufklopfen des Pellets
- Resuspension des Pellets in 1 ml R10 Medium
- Zweifache Messung der Zellkonzentration sowie Viabilität in einer 1:20 Verdünnung mittels Vi-CELL™ XR
- Einstellen der Zellzahl auf 2x10⁶ Zellen/ml
- Inkubation für 30-60 min bei 37 °C und 5 % CO₂
 - Waschen der ELISpot-Platte mit 3x200 μ l/Well PBS
 - Hinzugabe von 200 μ l/Well R10 Medium in die Wells und Inkubation für 30-60 min bei RT zum Abblocken von unspezifischen Bindungsstellen
 - Ansetzen der Peptide, des PHA-P und des R10-DMSO kurz vor Ende der Inkubation
- Entfernen des R10 Mediums und Trockenklopfen der Platte
- Hinzugabe von je 50 μ l/Well Peptiden, PHA-P als Positivkontrolle und R10-DMSO als Hintergrundkontrolle (siehe Abb. 9)
- Hinzugabe von je 50 μ l/Well Zellsuspension

Bemerkung: Um ein Austrocknen der Platte zu verhindern wurden in die freien Wells je 100 μ l R10 Medium gegeben.

- Inkubation für 20-24 h bei 37 °C und 5 % CO₂

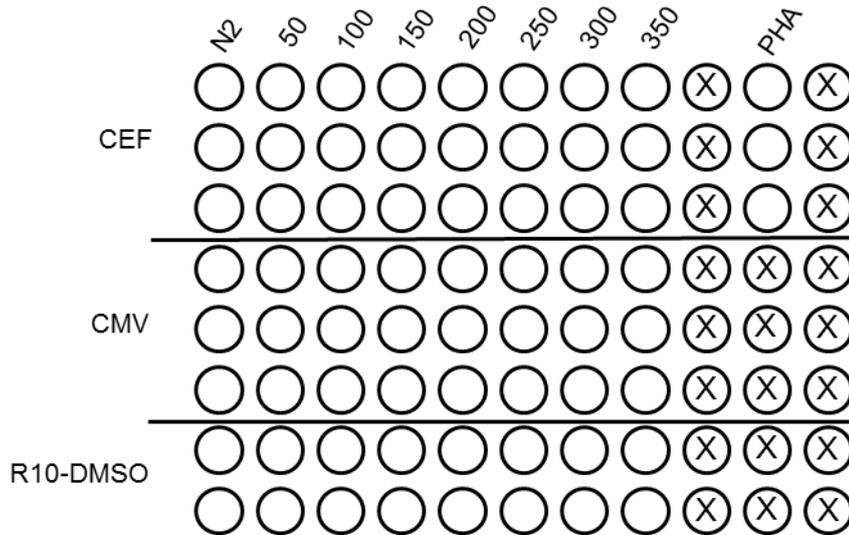


Abbildung 9: Layout der ELISpot-Platte. Zunächst wurden die Peptide, der Hintergrundkontrolle (R10-DMSO) sowie die Positivkontrolle (PHA) hinzugegeben. Darauf wurden dann die Zellen gegeben sowie die Antikörper und die Nova Red Lösung.

Tag 3:

- Entfernen der Zellen durch schnelles Abkippen
- Waschen der Platte mit Hilfe des automatisierten Washers mit 3x200 µl/Well PBS und 3x200 µl/Well PBS-Tween
- Ansetzen des biotinylierten Detektionsantikörper im Verhältnis 1:500 mit PBS + 10 % FCS
- Entfernen des PBS-Tweens durch schnelles Abkippen
- Hinzugabe von 50 µl/Well Detektionsantikörper
- Inkubation bei RT für 3 h im Dunkeln
- Entfernen des Detektionsantikörpers durch schnelles Abkippen
- Waschen mit 6x200 µl/Well PBS-Tween
- Ansetzen des Streptavidin-HRP Komplexes im Verhältnis 1:300 mit PBS + 10 % FCS
- Entfernen des PBS-Tweens durch schnelles Abkippen
- Hinzugabe von 50 µl/Well Streptavidin-HRP
- Inkubation bei RT für 1 h im Dunkeln
- Entfernen des ungebundenen Streptavidin-HRP

- Waschen der Platte mit 6x200 µl/Well PBS-Tween, wobei das PBS-Tween des letzten Waschschrilles nicht entfernt, sondern die Platte bei RT für 15 min im Dunkeln inkubiert wurde
- Ansetzen der Nova Red™-Lösung (Substrat)
- Entfernen des PBS-Tweens durch schnelles Abkippen
- Waschen der Platte mit 3x200 µl PBS
- Hinzugabe von 100 µl/Well des Substrates
- Inkubation für 15 min bei RT im Dunkeln
- Gründliches Waschen der Platte mit Leitungswasser und Aqua dest. von beiden Seiten
- Trockenklopfen der Platte
- Entfernen des Schutzbodens
- Trocknen der Platte ÜN bei RT im Dunkeln

Am nächsten Tag wurde der ELISpot ausgewertet. Dazu wurde die Platte mit Hilfe des CTL Analyzer gescannt und analysiert. Die Wells wurden mit Hilfe des CTL PUNCH SUPPLY Kit ausgestanzt und auf eine Plexiglasplatte gezogen. Diese wurde mit dem CTL Analyzer und der ImmunoScan Professional-Software gescannt. Danach wurden der Messbereich und die Messparameter in der ImmunoSpot® Academic Software eingestellt. Die „spot seperation“ wurde auf null eingestellt und die „counting area“ auf 95 % festgelegt, um unspezifische Verfärbungen am Rand zu entfernen. Das Gating wurde auf 0,0051 mm² - 9,6372 mm² eingestellt. Die Messung erfolgte dann automatisch durch die ImmunoSpot® Academic Software. Nach dem Zählen der Spots erfolgte eine Qualitätskontrolle mit der Quality Control der ImmunoSpot® Academic Software. Dabei wurde jedes Well durch Sichtkontrolle überprüft. Verschmutzungen konnten gegebenenfalls manuell ausgeschnitten werden, sodass diese bei der Messung nicht berücksichtigt wurden.

2.2.9 Statistik

Alle Daten wurden mit Hilfe von Excel 2010 ausgewertet und mit Origin Pro 9.0G auf Signifikanz geprüft. Zur statistischen Überprüfung wurden die Einzelwerte genutzt. Zunächst wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt. Dabei wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Einzelwerte wurden anschließend auf Normalverteilung geprüft. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen (0-350 Temperaturzyklen) wurden mit dem one way-ANOVA Bonferroni errechnet. Für die statistische Auswertung wurden die unbehandelten Proben (N₂) als Vergleichswert genommen und bei der Bestimmung der Abnahme als Ausgangswert definiert. Des Weiteren wurde die Homogenität der Varianzen bei den Abnahmen geprüft. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angegeben. Die Erstellung der Graphen erfolgte unter Verwendung von Origin Pro 9.0G. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die PBMC-Viabilität

Um den Einfluss der Temperaturschwankungen auf die PBMC-Viabilität zu untersuchen wurde diese direkt nach dem Auftauen als auch nach der ÜN-Kultur bestimmt. Bei allen vier Spendern war direkt nach dem Auftauen der gleiche abnehmende Trend zu beobachten, weshalb die PBMC-Viabilität der vier Versuchsreihen in einer Abbildung (siehe Abb. 10A und 10B) dargestellt wurde. Die Daten der einzelnen Spender sind im Anhang zu finden (siehe Anhang Tab. I-1 und I-2 sowie Abb. I-1 und I-2).

Direkt nach dem Auftauen lag die PBMC-Viabilität der unbehandelten Proben (N₂) bei durchschnittlich 98,33 %. Mit zunehmenden Temperaturzyklen nahm die PBMC-Viabilität leicht ab. Das Minimum wurde nach 350 Temperaturzyklen mit 94,03 % erreicht. Ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Proben (N₂) trat nach 200 Temperaturzyklen auf (siehe Tab.6, links und Abb. 10A).

Nach der ÜN-Kultur war die Viabilität gegenüber der Messung direkt nach dem Auftauen leicht verringert und nahm mit zunehmender Anzahl von Temperaturzyklen ab. Die PBMC-Viabilität der unbehandelten Proben (N₂) lag durchschnittlich bei 95,35 %. Nach 200 Zyklen betrug diese 93,66 %. Bei 350 Zyklen lag die PBMC-Viabilität im Durchschnitt 93,87 %. Ein signifikanter Unterschied zu N₂ trat bei 200, 250 und 350 Zyklen auf (siehe Tab.6, rechts und Abb. 10B).

Tabelle 6: PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen (links) und nach ÜN-Kultur (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte der vier Spender und deren Standardabweichungen in Prozent (%).

PBMC-Viabilität direkt nach Auftauen (%)		PBMC-Viabilität nach ÜN-Kultur (%)	
N ₂	98,33 ± 0,65	N ₂	95,35 ± 1,63
50	97,34 ± 1,02	50	94,42 ± 1,84
100	96,70 ± 1,50	100	94,37 ± 1,50
150	96,56 ± 1,04	150	94,05 ± 1,87
200	95,80 ± 1,95	200	93,66 ± 2,71
250	95,52 ± 1,87	250	93,92 ± 1,57
300	95,43 ± 4,03	300	94,09 ± 1,68
350	94,03 ± 5,65	350	93,87 ± 1,83

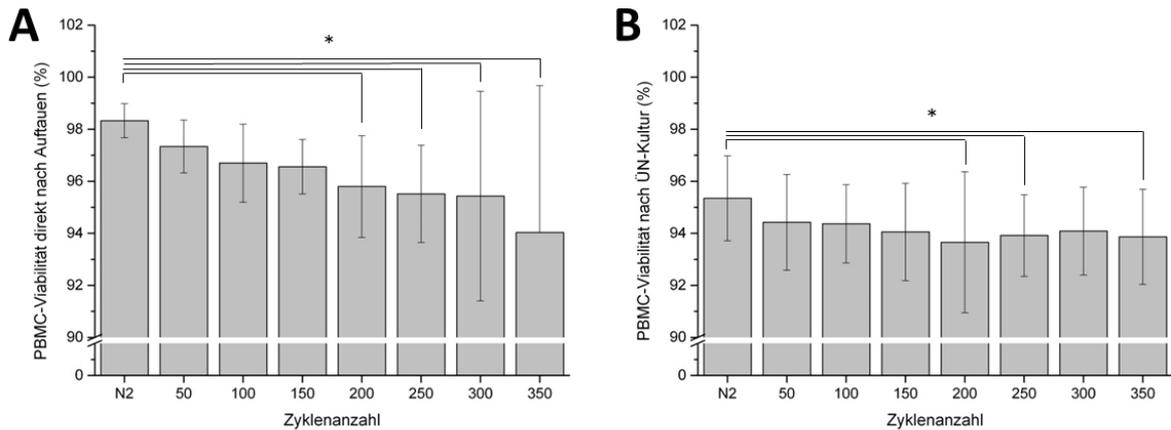


Abbildung 10: PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen (A) und nach ÜN-Kultur (B). Dargestellt sind die Mittelwerte der vier Spender und die Standardabweichungen in Prozent (%). * signifikant gegen N₂ mit $p < 0,05$.

Zusätzlich zu der PBMC-Viabilität wurde deren prozentuale Abnahme im Bezug zu den unbehandelten Proben (N₂) bestimmt. Dazu wurde die PBMC-Viabilität der unbehandelten Proben als Ausgangswert definiert.

Direkt nach dem Auftauen betrug die Abnahme der PBMC-Viabilität nach 50 Temperaturzyklen durchschnittlich -1,04 %. Diese stieg mit zunehmender Anzahl von Temperaturzyklen. Ab 250 Temperaturzyklen trat ein signifikanter Unterschied zu N₂ auf. Bei 250 Zyklen lag die Abnahme im Durchschnitt bei -2,92 %. Die maximale Abnahme wurde nach 350 Temperaturzyklen mit -4,55 % erreicht, wobei bei dort auch die höchste Standardabweichung mit $\pm 3,02$ % auftrat (siehe Tab. 7, links und Abb. 11A).

Nach der ÜN-Kultur nahm die prozentuale Abnahme mit steigender Anzahl von Temperaturzyklen ebenfalls zu. Nach 50 Zyklen betrug die Abnahme im Durchschnitt -0,97 %. Nach 250 Zyklen lag diese bei -1,48 %. Die maximale Abnahme wurde bei 200 Zyklen mit -1,76 % erreicht. Obwohl kein signifikanter Unterschied auftrat, war ein abnehmender Trend mit zunehmender Zykluszahl zu erkennen (siehe Tab.7, rechts und Abb. 11B).

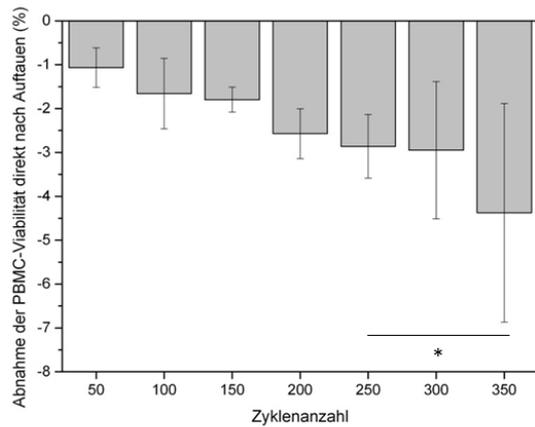
Ergebnisse

Tabelle 7: Abnahme der PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen (links) und nach ÜN-Kultur (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte der Abnahme der PBMC-Viabilität von vier Spendern und deren Standardabweichungen in Prozent (%).

Abnahme der PBMC-Viabilität (%)

	direkt nach Auftauen	nach ÜN-Kultur
50	-1,04 ± 0,55	-0,97 ± 0,49
100	-1,64 ± 0,99	-1,02 ± 0,75
150	-1,72 ± 0,30	-1,68 ± 1,72
200	-2,64 ± 0,67	-1,76 ± 1,15
250	-2,92 ± 0,88	-1,48 ± 1,62
300	-3,30 ± 1,70	-1,31 ± 1,47
350	-4,55 ± 3,02	-1,53 ± 1,91

A



B

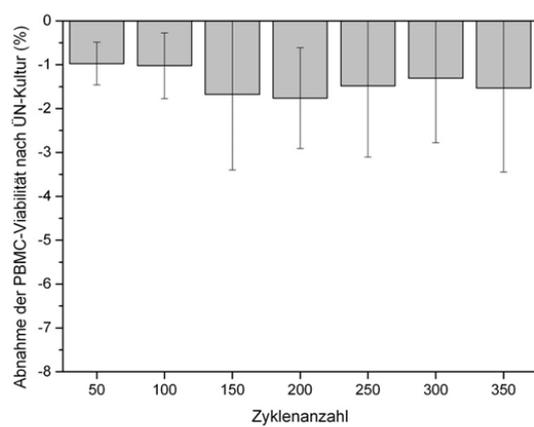


Abbildung 11: Abnahme der PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur. Dargestellt sind die Abnahme nach dem Auftauen (A) und die Abnahme nach ÜN-Kultur (B). Gezeigt werden die Mittelwerte von vier verschiedenen Spendern und die dazugehörigen Standardabweichungen in Prozent (%). * signifikant gegen N_2 mit $p < 0,05$.

3.2 Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die PBMC-Recovery

Um des Einfluss der Temperaturschwankungen auf die PBMC-Recovery zu untersuchen wurde diese direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur der Zellen bestimmt.

Bei allen vier Spendern zeigte sich sowohl direkt nach dem Auftauen als auch nach ÜN-Kultur der gleiche abnehmende Trend. Die PBMC-Recovery nahm mit zunehmender Anzahl von Temperaturzyklen ab. Zur besseren Übersicht wurde von allen vier Versuchsreihen der Mittelwert gebildet und in Abbildung 12 dargestellt. Die Daten der einzelnen Spender befinden sich im Anhang (siehe Anhang Tab. II-1 und II-2 sowie Abb. II-1 und II-2).

Direkt nach dem Auftauen lag die PBMC-Recovery der unbehandelten Proben (N₂) im Durchschnitt bei 96,08 %. Diese nahm mit steigender Zyklenzahl ab. Nach 150 Temperaturzyklen fiel die PBMC-Recovery auf im Durchschnitt 89,47 %. Ab 300 Zyklen sank die PBMC-Recovery unter 80 %. Die niedrigste PBMC-Recovery wurde nach 350 Temperaturzyklen mit 74,86 % erreicht. Ab 150 Zyklen trat ein signifikanter Unterschied zu N₂ auf (siehe Tab. 8, links und Abb. 12A).

Nach der ÜN-Kultur trat ein deutlicher Abfall der PBMC-Recovery im Vergleich zur Messung direkt nach dem Auftauen auf. Die PBMC-Recovery nach der ÜN-Kultur der unbehandelten Proben (N₂) lag durchschnittlich bei 81,41 %. Mit steigender Anzahl von Zyklen nahm diese ab. Nach 50 Zyklen sank die PBMC-Recovery auf im Durchschnitt 75,15 %. Nach 200 Zyklen betrug diese im Durchschnitt 66,44 %. Nach 350 Temperaturzyklen wurde das Minimum mit 57,74 % erreicht. Nach der ÜN-Kultur trat ein signifikanter Unterschied zu N₂ bereits nach 50 Temperaturzyklen auf (siehe Tab. 8, rechts und Abb. 12B).

Ergebnisse

Tabelle 8: PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen (links) und nach ÜN-Kultur (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von vier Spendern in Prozent (%).

PBMC-Recovery direkt nach Auftauen (%)		PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur (%)	
N2	96,08 \pm 6,91	N2	81,41 \pm 6,20
50	92,52 \pm 7,10	50	75,15 \pm 6,87
100	90,42 \pm 7,70	100	73,99 \pm 8,51
150	89,47 \pm 6,10	150	71,60 \pm 7,81
200	85,11 \pm 7,95	200	66,44 \pm 8,19
250	80,06 \pm 7,32	250	62,25 \pm 5,74
300	77,58 \pm 7,97	300	61,83 \pm 6,72
350	74,86 \pm 11,97	350	57,74 \pm 9,94

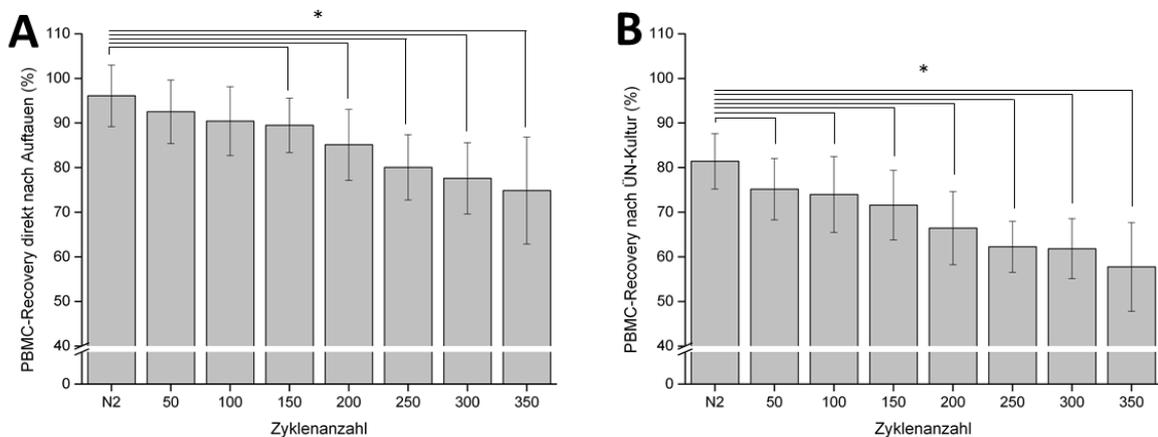


Abbildung 12: PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen (A) und nach ÜN-Kultur (B). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Spender und die jeweilige Standardabweichungen. * signifikant gegen N_2 mit $p < 0,05$.

Zur Bestimmung der prozentualen Abnahme wurde die PBMC-Recovery der unbehandelten Proben (N_2) als Ausgangswert definiert.

Direkt nach dem Auftauen nahm die PBMC-Recovery mit zunehmenden Temperaturzyklen ab. Nach 50 Zyklen lag die Abnahme bei durchschnittlich -4,13 %. Nach 200 Temperaturzyklen betrug die Abnahme bereits über 10 %. Mit -21,79 % erreichte die Abnahme nach 350 Temperaturzyklen ihr Maximum, wobei dort die höchste Standardabweichung mit \pm 8,68 % auftrat. Ab 250 Temperaturzyklen war die Abnahme signifikant gegen N_2 (siehe Tab. 9, links und Abb. 13A).

Nach der ÜN-Kultur nahm auch die prozentuale Abnahme mit steigender Anzahl von Temperaturzyklen ebenfalls zu. Nach 50 Temperaturzyklen lag die Abnahme bei durchschnittlich -7,81 %. Diese erreichte nach 150 Temperaturzyklen mit -12,03 % eine Abnahme über -10 %. Nach 250 Temperaturzyklen betrug diese im Durchschnitt -23,50 % auf. Die höchste prozentuale Abnahme trat nach 350 Zyklen mit durchschnittlich -28,99 % auf. Die Abnahme war ab 200 Temperaturzyklen signifikant (siehe Tab. 9, rechts und Abb. 13B).

Ergebnisse

Tabelle 9: Abnahme der PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen (links) und nach ÜN-Kultur (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte der Abnahme der PBMC-Recovery von vier Spendern und deren Standardabweichungen in Prozent (%).

Abnahme der PBMC-Recovery (%)		
	direkt nach Auftauen	nach ÜN-Kultur
50	-4,13 ± 0,71	-7,81 ± 2,76
100	-5,81 ± 3,49	-9,23 ± 4,25
150	-6,80 ± 2,00	-12,03 ± 4,83
200	-11,29 ± 6,39	-18,32 ± 6,13
250	-16,49 ± 7,07	-23,50 ± 3,86
300	-19,11 ± 3,63	-24,03 ± 3,70
350	-21,79 ± 8,68	-28,99 ± 8,75

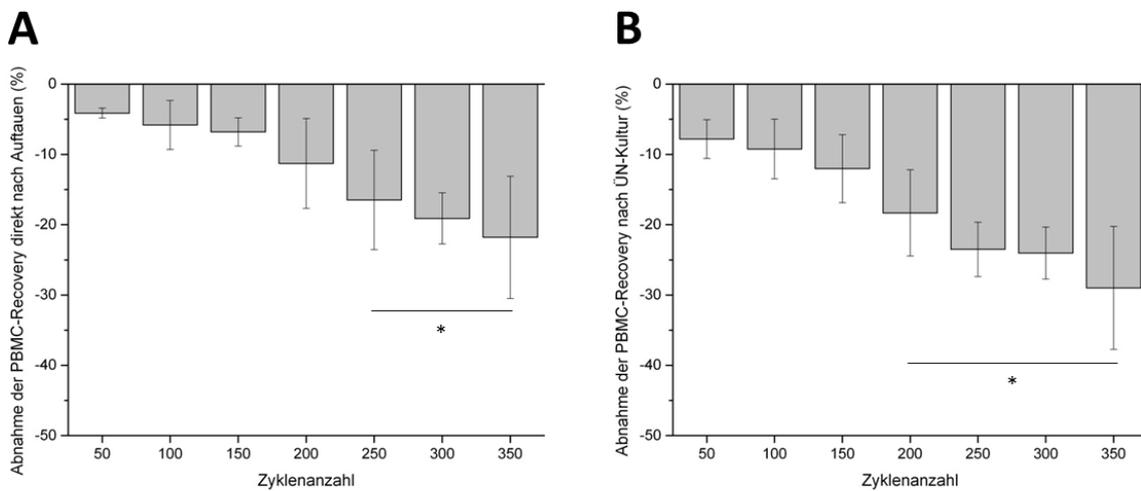


Abbildung 13: Abnahme der PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur. Dargestellt sind die Abnahme nach dem Auftauen (A) und die Abnahme nach ÜN-Kultur (B). Gezeigt werden die Mittelwerte von vier verschiedenen Spendern und die dazugehörigen Standardabweichungen in Prozent (%). * signifikant gegen N_2 mit $p < 0,05$.

Neben der PBMC-Recovery und deren Abnahme wurde auch die Differenz nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen gebildet, um die PBMC-Recovery direkt nach dem Auftauen mit der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur miteinander vergleichen zu können. Die PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur war zwischen -14,68 % und -18,67 % geringer als direkt nach dem Auftauen (siehe Tab. 10, links und Abb.14A). Dabei lag der Mittelwert der Differenz zwischen der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen bei $-16,97 \pm 1,21$ %.

Um festzustellen, ob sich die Differenz der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen auch proportional zu der Anzahl der Zyklen verhält wurde die Differenz der prozentualen Abnahme zwischen der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen gebildet. Dabei lag der Unterschied zwischen der Abnahme direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur zwischen -3,41 % und -7,19 %. Der Mittelwert der Differenz

zwischen der prozentualen Abnahme direkt nach dem Auftauen und nach ÜN-Kultur betrug $-5,64 \pm 1,54$ %. Obwohl kein signifikanter Unterschied nachweisbar war, lag ein Trend vor, dass mit steigender Zyklenzahl eine Erhöhung der Differenz auftrat (siehe Tab 10, rechts und Abb. 14B).

Tabelle 10: Differenz (%) der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen (links) und die Differenz der Abnahme nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier verschiedenen Spendern und deren Standardabweichungen in Prozent (%).

Differenz der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach Auftauen (%)		Differenz der Abnahme der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach Auftauen (%)	
N2	$-14,68 \pm 4,10$	50	$-3,68 \pm 3,15$
50	$-17,03 \pm 2,56$	100	$-3,41 \pm 6,74$
100	$-16,43 \pm 4,49$	150	$-5,22 \pm 5,52$
150	$-17,87 \pm 1,39$	200	$-7,04 \pm 1,96$
200	$-18,67 \pm 3,65$	250	$-7,02 \pm 4,74$
250	$-17,80 \pm 3,76$	300	$-4,93 \pm 5,13$
300	$-15,75 \pm 1,46$	350	$-7,19 \pm 8,46$
350	$-17,12 \pm 4,88$		

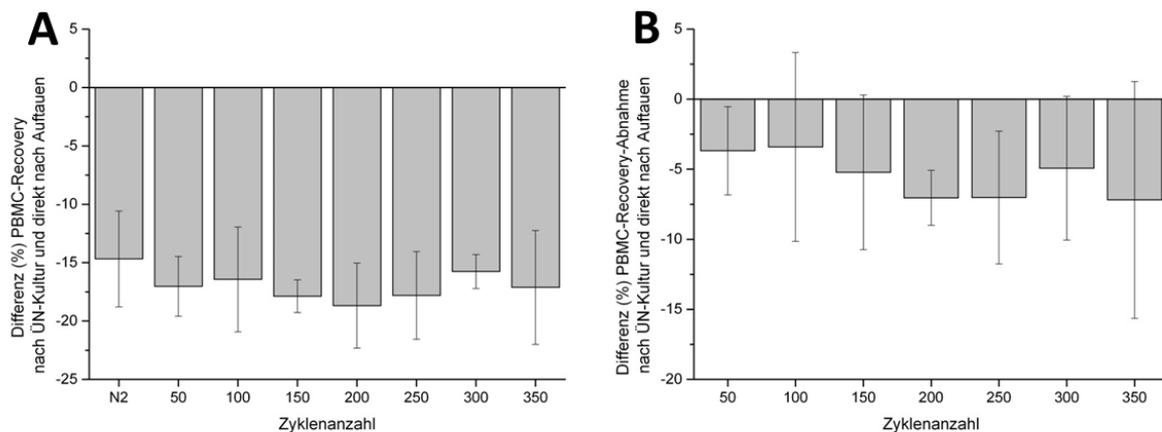


Abbildung 14: Differenz (%) der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen (A) und die Differenz der Abnahme nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier verschiedenen Spendern und deren Standardabweichungen. Es traten keine signifikanten Unterschiede auf.

3.3 Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die T-Zellfunktionalität

Der IFN- γ ELISpot wurde eingesetzt, um die antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantwort zu bestimmen und den Einfluss der Temperaturschwankungen auf die T-Zellfunktionalität zu untersuchen.

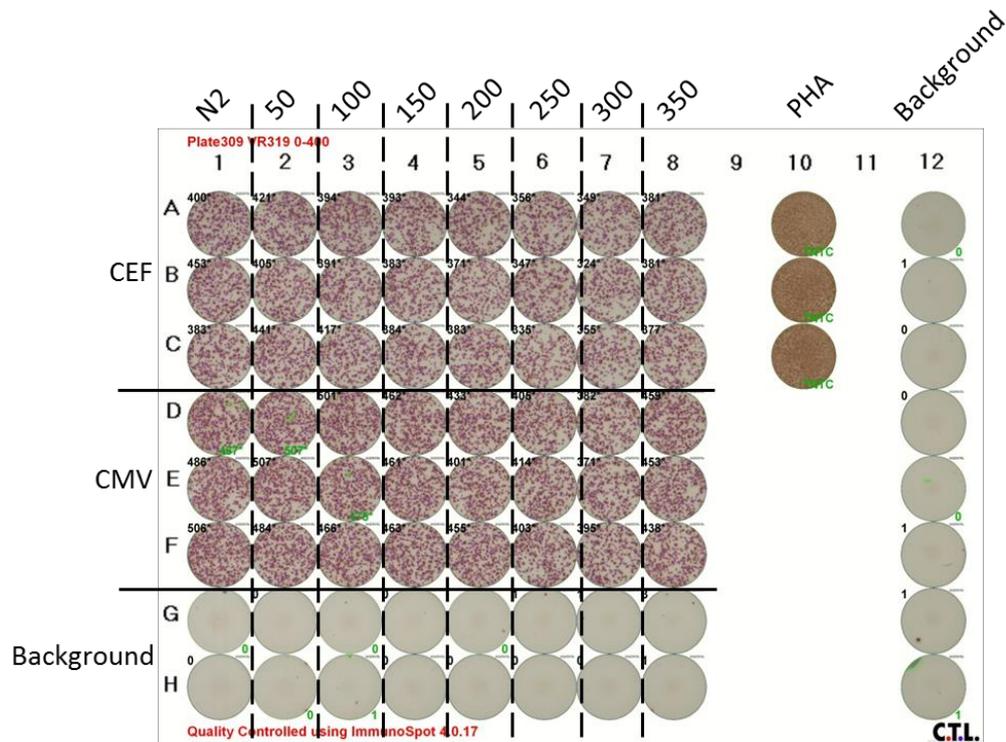


Abbildung 15: Auswertung des ELISpots. Dargestellt wird die Immunantwort von Spender 1 nach der Qualitätskontrolle mit der Software Immunospot® 4.0.17. Die Zellen in den Wells A-C wurden mit CEF-Peptiden stimuliert, D-F mit CMV-Peptiden und bei G und H sowie Reihe 12 handelt es sich um den Background (R10-DMSO). Bei Reihe 10 ist die Positivkontrolle (PHA) zu sehen. In Reihe 1 wurden die Zellen mit N₂ gegeben, in Reihe 2 befinden sich die Zellen mit 50 Temperaturzyklen usw. bis in Reihe 8 die Zellen mit 350 Temperaturzyklen.

Sowohl die Immunantwort nach Stimulation mit CEF-Peptiden als auch mit CMV-Peptiden war spenderspezifisch. Aus diesem Grund wurden nachfolgend die Immunantworten der einzelnen Spender gezeigt. Somit trat auch ein signifikanter Unterschied zu verschiedenen Zeitpunkten auf. Je Bedingung (0-350 Zyklen) wurde der Mittelwert sowohl nach CEF- als auch nach CMV-Stimulation von drei Wells berechnet. Bei allen vier Spendern war der Hintergrund (Background) sehr gering (siehe Abb.15). Bis auf wenige Ausreißer war ein abnehmender Trend mit zunehmenden Temperaturschwankungen zu sehen.

Nach Stimulation mit CEF-Peptiden zeigten Spender 1 und Spender 3 eine starke Immunantwort (siehe Tab. 11 und Abb. 16A und 16C) während bei Spender 2 und Spender 4 eine geringere Immunantwort auftrat (siehe Tab. 11 und Abb. 16B und 16D). Bei allen vier Spendern sank jedoch mit steigender Zyklenzahl die Immunantwort. Ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Zellen (N₂) trat bei Spender 1 bei 250 und 300 Zyklen und bei Spender 3 ab 200 Temperaturschwankungen auf (siehe Abb. 16A und 16C). Bei

Ergebnisse

Spender 2 und Spender 4 trat kein signifikanter Unterschied. Dennoch war ein Trend in der Abnahme der Immunantworten mit Zunahme der Anzahl der Zyklen ersichtlich (siehe Tab11 und Abb. 16B und 16D).

Tabelle 11: Antigen-spezifische Immunantwort von vier verschiedenen Spendern nach Stimulation mit CEF-Peptiden. PBMCs wurden nach Simulation von Temperaturschwankungen mit CEF-Peptiden stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der „spot forming cells (SFC)/ 1×10^6 PBMCs von je drei Wells.

CEF				
	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
N2	4120 ± 365	367 ± 6	1440 ± 269	563 ± 32
50	4223 ± 180	317 ± 90	1217 ± 99	457 ± 71
100	4007 ± 142	320 ± 17	1170 ± 87	570 ± 123
150	3867 ± 55	430 ± 26	1363 ± 0	400 ± 46
200	3660 ± 200	323 ± 70	897 ± 126	417 ± 121
250	3460 ± 105	310 ± 115	810 ± 92	410 ± 62
300	3427 ± 164	267 ± 38	790 ± 30	380 ± 36
350	3797 ± 23	260 ± 50	930 ± 168	347 ± 38

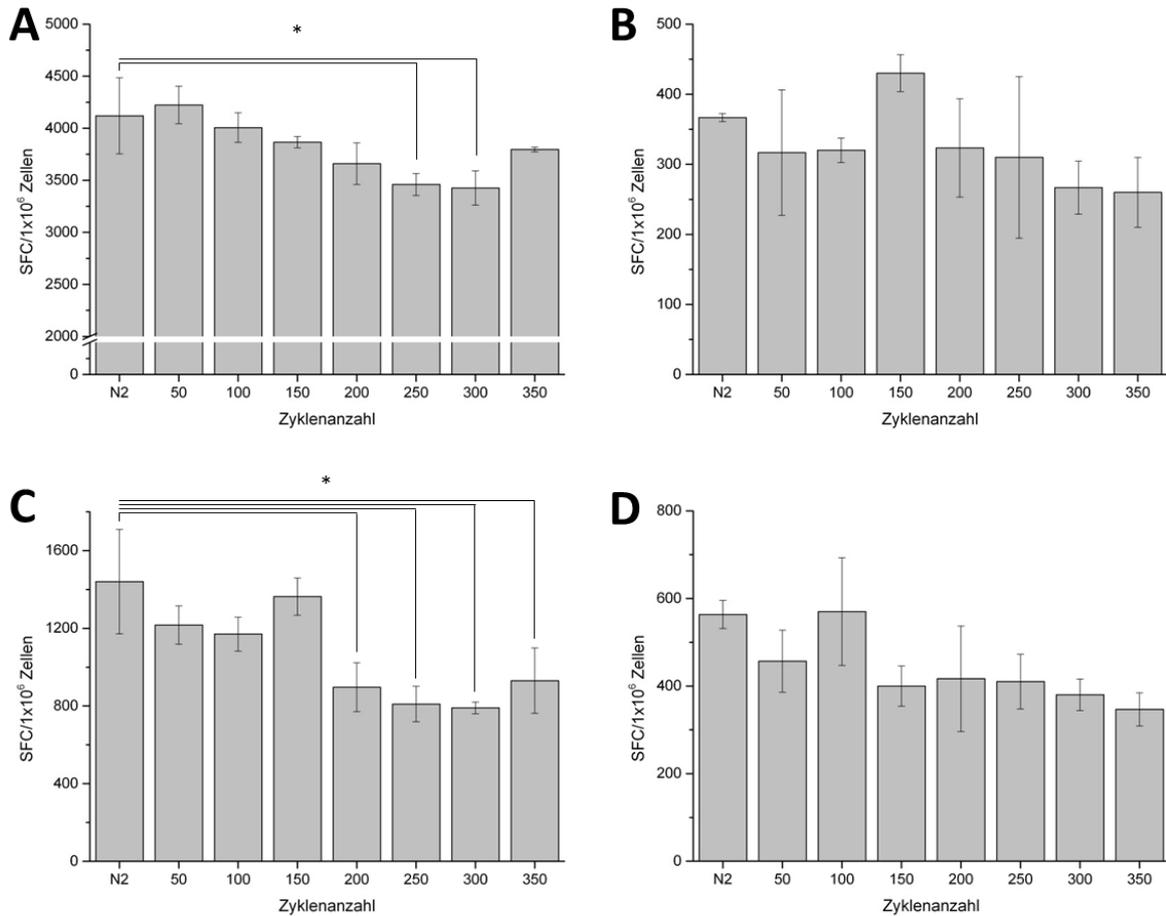


Abbildung 16: Antigen-spezifische Immunantwort auf CEF-Stimulation. A, B, C und D zeigen je einen Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Mittelwerte der „spot forming cells“ SFC/ 1×10^6 PBMCs und die jeweiligen Standardabweichungen von je drei Wells. * signifikant gegen N₂ mit $p < 0,05$.

Die T-Zellaktivität in Antwort auf die Stimulation mit CMV-Peptiden ist in Tabelle 12 und in Abbildung 17 dargestellt. Auf die Aktivierung mit CMV-Peptiden reagierten Spender 1 und Spender 3 stark (Abb. 17A und 17C), während Spender 2 und Spender 4, ähnlich wie bei der Stimulation mit CEF-Peptiden, nur eine schwache Immunantwort zeigten (Abb. 17B und 17D). Bei allen vier Spendern sank die Immunantwort mit steigender Zyklenzahl. Die Abnahme war bei Spender 1 ab 200 Temperaturschwankungen und bei Spender 3 ab 100 Temperaturzyklen signifikant (siehe Abb. 17A und 17B). Bei Spender 2 und Spender 4 trat kein signifikanter Unterschied auf, aber auch hier war der Zusammenhang zwischen Abnahme der Immunantwort mit steigender Zyklenzahl ersichtlich (siehe Tab. 12 und Abb. 17B und 17D).

Tabelle 12: Antigen-spezifische Immunantwort von vier verschiedenen Spendern nach Stimulation mit CMV-Peptiden. PBMCs wurden nach Simulation von Temperaturschwankungen mit CMV-Peptiden stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der „spot forming cells (SFC)/ 1×10^6 PBMCs von je drei Wells.

CMV				
	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
N2	4863 ± 195	187 ± 42	6280 ± 140	237 ± 38
50	4993 ± 133	170 ± 36	5970 ± 125	193 ± 32
100	4807 ± 182	210 ± 50	5807 ± 29	140 ± 35
150	4620 ± 10	170 ± 20	5960 ± 118	200 ± 20
200	4297 ± 272	137 ± 31	5130 ± 159	167 ± 45
250	4073 ± 59	197 ± 81	5697 ± 172	170 ± 20
300	3827 ± 120	153 ± 25	5363 ± 25	177 ± 46
350	4500 ± 108	130 ± 10	5033 ± 171	160 ± 70

Ergebnisse

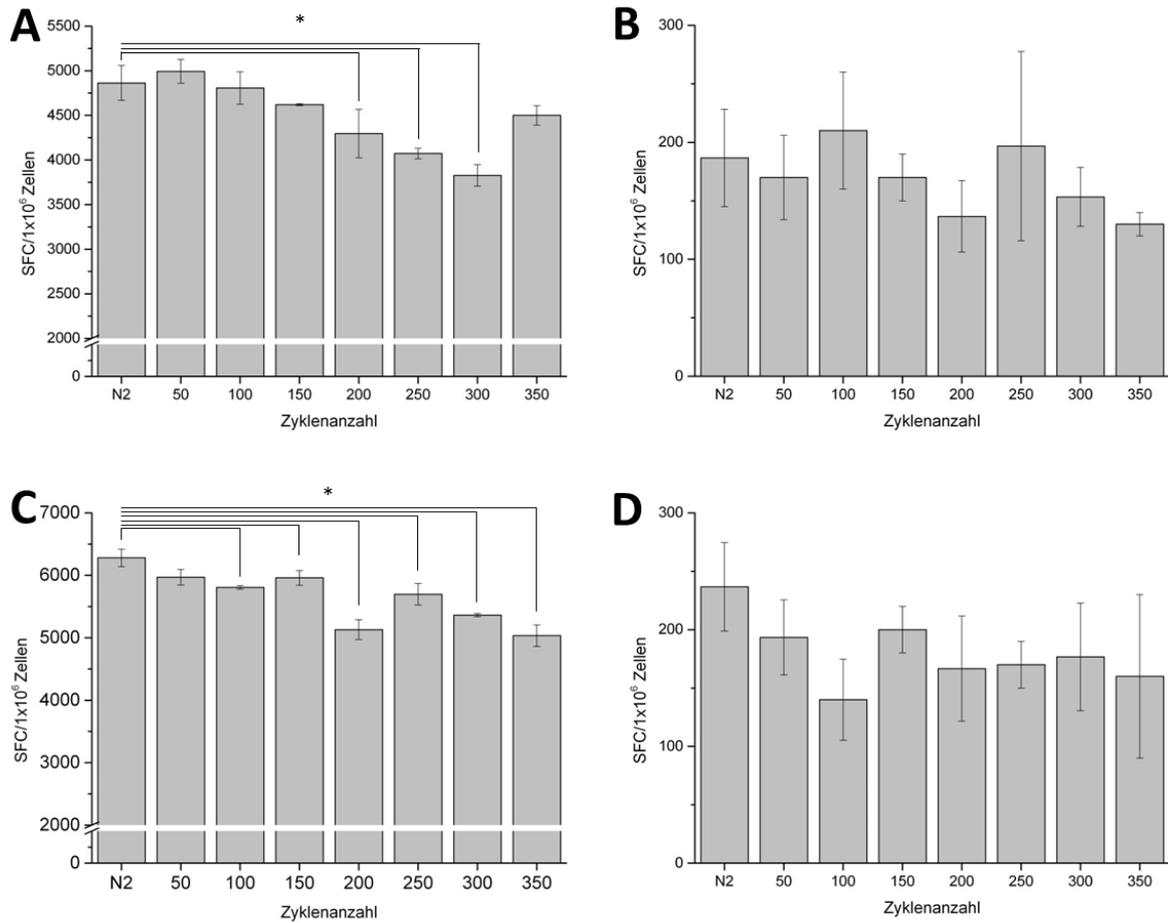


Abbildung 17: Antigen-spezifische Immunantwort auf CMV-Stimulation. A, B, C und D zeigen je einen Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Mittelwerte der „spot forming cells“ SFC/1x10⁶ PBMCs und die jeweiligen Standardabweichungen von je drei Wells. * signifikant gegen N₂ mit p<0,05.

Um die prozentuale Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort zu bestimmen wurden die unbehandelten Proben (N₂) als Ausgangswert definiert. Dargestellt sind nachfolgend die Mittelwerte von allen vier Spendern und deren Standardabweichungen in Prozent (%). Die Einzelwerte sind im Anhang zu finden (siehe Anhang Tab. III-1 und Abb. III-1).

Die Abnahme lag bei der Stimulation mit CEF-Peptiden zwischen -5,80 % und -30,45 %, wobei die Standardabweichungen zwischen 9,12 % und 18,89 % hoch waren (siehe Tab. 13, links). Die hohen Standardabweichungen sind auf die Spenderabhängigkeit zurückzuführen. Wegen der hohen Standardabweichungen trat kein statistisch signifikanter Unterschied auf. Dennoch war ein abnehmender Trend mit steigender Zyklusanzahl zu erkennen. Nach 50 Temperaturzyklen lag die Abnahme bei durchschnittlich -11,39 %. Nach 350 Zyklen betrug diese im Durchschnitt -27,70 % (siehe Tab. 13, links und Abb. 18A).

Auch die Immunantwort nach Stimulation mit CMV-Peptiden wurde nachfolgend mit den Mittelwerten von allen vier Spendern und deren Standardabweichungen dargestellt. Die Einzelwerte befinden sich im Anhang (siehe Tab. III-2 und Abb. III-2)

Die Abnahme der Immunantwort bei der Stimulation mit CMV-Peptiden lag durchschnittlich zwischen -7,38 % und -22,52 % und war mit der Abnahme nach Stimulation mit CEF-Peptiden vergleichbar. Die Standardabweichung lag dabei zwischen 4,62 % und 22,65 % (siehe Tab. 13, rechts). Wie auch bei der Stimulation mit CEF Peptiden sind die hohen Standardabweichungen auf die spenderspezifische Immunantwort zurückzuführen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen trat kein signifikanter Unterschied zu N₂ auf, jedoch war wie bei der Stimulation mit CEF-Peptiden ein Trend mit steigender Zyklusanzahl zu erkennen. Nach 50 Temperaturzyklen betrug die Abnahme im Durchschnitt -7,38 %. Nach 350 Zyklen wurde die maximale Abnahme mit durchschnittlich -22,52 % erreicht (siehe Tab. 13, rechts und Abb. 17B).

Tabelle 13: Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort nach CEF-Stimulation (links) und nach CMV-Stimulation (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Spendern und deren jeweiligen Standardabweichungen in Prozent (%).

Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort (CEF)		Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort (CMV)	
50	-11,39 ± 9,52	50	-7,38 ± 8,73
100	-8,26 ± 9,12	100	-9,26 ± 22,65
150	-5,80 ± 18,89	150	-8,63 ± 4,93
200	-21,69 ± 12,71	200	-21,58 ± 8,17
250	-25,61 ± 13,25	250	-12,09 ± 14,00
300	-30,45 ± 11,77	300	-19,78 ± 4,62
350	-27,70 ± 13,80	350	-22,52 ± 11,44

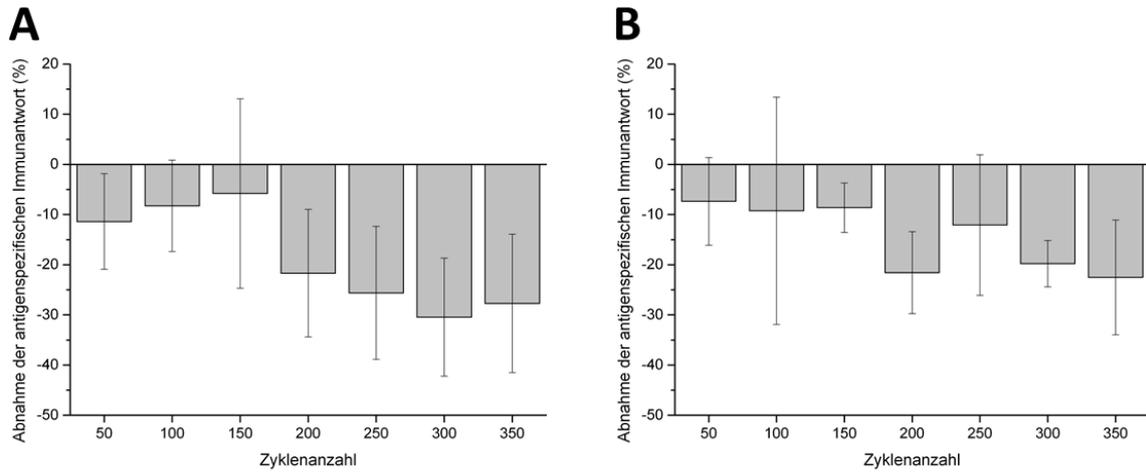


Abbildung 18: Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort. Dargestellt sind die Mittelwerte der Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort nach Stimulation mit CEF-Peptiden (A) und CMV-Peptiden (B) von vier Spendern. Es traten keine signifikanten Unterschiede zu N_2 auf.

4. Diskussion

Die Kryokonservierung von biologischen Proben bei Temperaturen unterhalb von -130 °C ermöglicht die Funktion und Lebensfähigkeit zu erhalten und die Proben in Kryobanken möglichst verlustarm über einen längeren Zeitraum zu lagern (Mazur et al., 1972⁷³; Friedler et al., 1988⁷⁴). Vor allem in der Reproduktionsmedizin und in klinischen Studien sowie Multicenter-Studien sind Kryobanken notwendig.

Es ist bekannt, dass während des Einfrier- und Auftauprozesses beim Phasenübergang die meisten Schäden entstehen. Wie bereits in der Einleitung erläutert kann es dabei zu mechanischen und osmotischen Schäden kommen. Aus diesem Grund ist der Einfrier- und Auftauprozess gut standardisiert, kontrolliert und dokumentiert. Die Lagerungsbedingungen hingegen werden oft vernachlässigt. Jedoch kommt es während der Tieftemperaturlagerung häufig zu unkontrollierten Temperaturschwankungen. Diese werden bei Ein- und Auslagerungsprozesse sowie Umlagerung von Proben und auch bei Probentransport hervorgerufen. Mehrere Studien zeigten bereits, dass suboptimale Lagerungsbedingungen negativen Einfluss auf die Proben haben. Vysekantev et al. zeigten im Jahr 2005, dass Temperaturänderungen von -196 °C auf -100 °C die Viabilität der Zellen verringern (Vysekantev et al., 2005⁷⁵). Smith et al. berichteten 2007 über eine prozentuale Erhöhung von apoptotischen Zellen nach Simulation von Transportbedingungen bei -70 °C . Germann et al. untersuchten 2013 die Auswirkungen von Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung. Dabei setzten sie die Proben 400 Temperaturzyklen aus und untersuchten nachfolgend den Einfluss auf die PBMC-Recovery, -Viabilität und T-Zellfunktionalität. Dabei stellten sie bei allen drei Parametern eine Abnahme fest. (Germann et al., 2013⁷⁶).

⁷³ 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.

⁷⁴ Friedler, S., Giudice, L.C. and Lamb, E.J. (1988) Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 49, 743-64.

⁷⁵ Vysekantsev I.P., Gurina T.M., Martsenyuk V.F., Petrenko T.F., Kudokotseva E.V., Koshchiy S.V., Groshevoy M.I. (2005) Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. *Cryo Letters* 26/6, 401-408.

⁷⁶ Germann A, Oh YJ, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. (2013) Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function., *Cryobiology.*, 67(2):193-200.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ab wann Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung die PBMC-Viabilität, -Recovery und T-Zellfunktionalität signifikant verringern. Dazu wurden in der Arbeit PBMCs verwendet, da diese in vielen Bereichen der Forschung eingesetzt werden und leicht aus Blut gewonnen werden können. Zur Isolierung der Zellen wurde die Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll eingesetzt. Diese Methode zählt zum Goldstandard bei der Gewinnung der PBMCs und gewährleistet bei gut geschultem Personal eine hohe Ausbeute und Viabilität der Zellen (Nilsson et al., 2008⁷⁷). Dieser Umstand ist sehr wichtig, da für nachfolgende funktionelle Assay eine Viabilität > 70 % benötigt wird (Weinberg et al., 2000⁷⁸).

Ebenso wichtig war es die Aufarbeitung der PBMCs so kurz wie möglich zu halten, um eine gute Qualität der Zellen zu garantieren. Bull et al. zeigten, dass der Zeitabstand zwischen Blutentnahme und Zellaufbereitung nicht länger als acht Stunden betragen sollte, um eine gute Qualität der Zellen zu erhalten (Bull et al., 2007⁷⁹).

Um die Zellen kontrollierten Temperaturschwankungen aussetzen zu können wurden die Zellen direkt nach der Isolierung kontrolliert eingefroren. Um die Schäden beim Einfrieren so gering wie möglich zu halten wurden diese mit Hilfe von Einfrierbehältern mit einer definierten Kühlrate von 1 °C/min eingefroren. Während der Tieftemperaturlagerung wurden die Zellen kontrollierten Temperaturschwankungen mit Hilfe eines automatisierten Robotersystems ausgesetzt, die die Bedingungen in Kryobanken und das Ein- und Auslagern von Proben z.B. in klinischen Studien simulieren. Für die Simulation wurde angenommen, dass die Proben in Kryobanken für bis zu 5 min der Raumtemperatur ausgesetzt sind. Dabei erwärmen sich diese auf über -60 °C (siehe Abb. 3). Als kritische Temperatur gilt -80°C, da dort biochemische Reaktionen sowie Rekrystallisationsprozesse möglich sind (Meryman, 1963⁸⁰).

Nach dem Aussetzen von Temperaturzyklen wurden die Zellen aufgetaut und die PBMC-Viabilität, -Recovery und T-Zellfunktionalität wurden bestimmt.

⁷⁷ Nilsson C, Aboud S, Karlén K, Hejdeman B, Urassa W, Biberfeld G. (2008) Optimal blood mononuclear cell isolation procedures for gamma interferon enzyme-linked immunospot testing of healthy Swedish and Tanzanian subjects., *Clin Vaccine Immunol.* 15(4):585-9.

⁷⁸ 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.

⁷⁹ Bull M, Lee D, Stucky J, Chiu YL, Rubin A, Horton H, McElrath MJ. (2007) Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J Immunol Methods.*, 322(1-2):57-69.

⁸⁰ Meryman, H.T. (1963) Preservation of living cells. *Fed Proc* 22, 81-9.

Die PBMC-Viabilität nahm direkt nach dem Auftauen mit steigender Zyklenzahl ab. Die Abnahme war gering und die Viabilität lag deutlich über 70 %, was für nachfolgende funktionelle Assays ein wichtiges Kriterium ist (Weinberg et al., 2000⁸¹). Die PBMC-Viabilität direkt nach dem Auftauen betrug bei den unbehandelten Proben (N₂) im Durchschnitt 98,33 % und nach 350 Zyklen 94,03 %. Ein signifikanter Unterschied trat nach 200 Zyklen auf.

Auch die PBMC-Recovery nahm bei allen vier Spendern mit steigender Zyklenzahl ab. Direkt nach dem Auftauen lag die PBMC-Recovery bei den unbehandelten Proben (N₂) im Durchschnitt bei 96,08 % und nach 350 Zyklen bei 74,86 %. Direkt nach dem Auftauen trat ein signifikanter Unterschied nach 150 Temperaturzyklen auf.

Die gewonnenen Ergebnisse decken sich auch mit denen anderer Wissenschaftler. Kleeberger et. al, Kreher et al. und Olemukan et al. zeigten, dass die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff zu einer guten Recovery und Viabilität führt (Kleeberger et. al, 1999⁸²; Kreher et al., 2003⁸³ und Olemukan et al., 2010⁸⁴). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Bei Lagerung ohne Temperaturschwankungen wurde sowohl eine hohe PBMC-Viabilität (98,33 %, direkt nach Auftauen) als auch eine hohe PBMC-Recovery (96,08 %, direkt nach Auftauen) erreicht.

Ein weiterer Grund für die Abnahme mit steigender Zyklenzahl könnten die biochemischen Reaktionen und Rekrystallisationsprozesse sein, die über einer Temperatur von -80 °C stattfinden. Bei der Rekrystallisation kommt es zur Bildung von Eiskristallen, wodurch die Membran und die Zelle geschädigt werden, was zur Reduktion der PBMC-Viabilität und -Recovery führen kann. Zudem könnten die Temperaturänderungen oxidativen Stress auslösen, der zum Absterben der Zellen führen könnte.

Nach der ÜN-Kultur war sowohl bei der PBMC-Viabilität als auch bei der -Recovery eine Abnahme gegenüber der Messung direkt nach dem Auftauen zu beobachten.

⁸¹ 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.

⁸² Kleeberger C.A., Lyles R.H., Margolick J.B., Rinaldo C.R., Phair J.P., Giorgi J.V. (1999) Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 14–19.

⁸³ 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.

⁸⁴ Olemukan R.E., Eller L.A., Ouma B.J., Etonu B., Erima S., Naluyima P., Kyabaggu D., Cox J.H., Sandberg J.K., Wabwire-Mangen F., Michael N.L., Robb M.L., de Souza M.S., Eller M.A. (2010) Quality monitoring of HIV-1-infected and uninfected peripheral blood mononuclear cell samples in a resource-limited setting, *Clin. Vaccine Immunol.* 17 (6), 910–918.

Die PBMC-Viabilität sank nach der ÜN-Kultur leicht. Nach 50 Temperaturzyklen lag die PBMC-Viabilität der unbehandelten Proben (N₂) bei durchschnittlich 95,35 %. Nach 350 Zyklen betrug diese 93,87 %. Ein signifikanter Unterschied war nach 200, 250 und 350 Zyklen festzustellen.

Auch die PBMC-Recovery sank nach der ÜN-Kultur im Vergleich zur Messung direkt nach dem Auftauen noch weiter und lag bei den unbehandelten Proben (N₂) nur noch bei durchschnittlich 81,41 % und nach 350 Zyklen bei 57,74 %. Ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Proben (N₂) trat bereits ab 50 Temperaturzyklen auf.

Auch die verstärkte Abnahme der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur stimmt mit den Beobachtungen anderer Gruppen überein. Sie vermuteten, dass die Zellen nach dem Auftauen Apoptose- und Nekroseprozesse durchlaufen (Glander et al., 1999⁸⁵; Owen et al., 2007⁸⁶, Kierstead et al., 2007⁸⁷). Diese Hypothese stützen auch Smith et al., die eine prozentuale Erhöhung von apoptotischen Zellen nach Temperaturschwankungen feststellte (Smith et al., 2007⁸⁸). Diese apoptotischen Zellen könnten weitere Signale an die Umgebung abgeben und zur Apoptose benachbarter Zellen führen. Des Weiteren wird vermutet, dass die Temperaturschwankungen die Zellen in einen präapoptischen Zustand versetzen und während der ÜN-Kultur die Apoptose induziert wird (Fowke et al., 2000⁸⁹).

Neben der PBMC-Viabilität und -Recovery wurde auch die antigenspezifische Immunantwort nach dem Aussetzen von Temperaturschwankungen untersucht. Sie spielt vor allem in klinischen Studien und als Indikator für einen potenziellen Impfstoff in der Impfstoffentwicklung eine große Rolle. Da diese oft multizentrisch und retrospektiv durchgeführt werden, ist neben der sachgemäßen und standardisierten Aufarbeitung und

⁸⁵ Glander H.J., Schaller J. (1999) *Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage*, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (2), 109–115.

⁸⁶ Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschorn 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., Norris P.J. (2007) *Loss of T cell responses following long-term cryopreservation*, *J. Immunol. Methods* 326, 93–115.

⁸⁷ Kierstead, L. S., Dubey, S., Meyer, B., Tobery, T. W., Mogg, R., Fernandez, V. R., Casimiro, D. R. (2007). *Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC*. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23, 86–92. doi:10.1089/aid.2006.0129

⁸⁸ Smith J.G., Joseph H.R., Green T., Field J.A., Wooters M., Kaufhold R.M., Antonello J., Caufield M.J. (2007) *Establishing acceptance criteria for cell-mediated immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions*, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (5), 527–537.

⁸⁹ Fowke K.R., Behnke J., Hanson C., Shea K., Cosentino L.M. (2000) *Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells*, *J. Immunol. Methods* 244, 139–144.

Einfrier- sowie Auftauprozedur eine kontrollierte und standardisierte Lagerung nötig, um eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Über den Erhalt der T-Zellfunktionalität während der Kryokonservierung wird kontrovers diskutiert. Während Owen et al. über den Verlust der T-Zellantwort nach der Kryokonservierung berichteten (Owen et al., 2007⁹⁰), beobachteten Kreher et al. den Erhalt der T-Zellfunktionalität (Kreher et al., 2003⁹¹). Mögliche Unterschiede in der Literatur könnten auch auf nicht standardisierte und kontrollierte Lagerungsbedingungen zurückgehen.

Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss von Temperaturänderungen während der Tieftemperaturlagerung untersucht.

Die Bestimmung der antigenspezifischen Immunantwort erfolgte mittels IFN- γ ELISpot. Diese Methode ist sensitiv und wird ebenfalls in klinischen Studien und in der Impfstoffentwicklung eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl nach der Stimulation mit CEF- als auch mit CMV-Peptiden eine Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort mit steigender Zyklenzahl beobachtet. Nach Stimulation mit CEF-Peptiden nahm die antigenspezifische Immunantwort um -27,70 % bei 350 Zyklen ab. Nach Stimulation mit CMV-Peptiden lag die Abnahme nach 350 Zyklen bei -22,52 %.

Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Forscher überein, die eine Reduktion der T-Zellantwort nach der Simulation von Transportbedingungen bei über -20 °C feststellten (Owen et al., 2007⁹²; Smith et al., 2007⁹³). Constantini et al. vermuten, dass die Kryokonservierung von Lymphozyten die Zelloberflächenmoleküle beeinflusst und zu einer Reduktion der T-Zellantwort führt (Constantini et al., 2003⁹⁴). Des Weiteren ist es denkbar, dass die Zellmembran zerstört wird oder intrazelluläre Kompartimente zerstört werden, die

⁹⁰ Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschorn 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., Norris P.J. (2007) Loss of T cell responses following long-term cryopreservation, *J. Immunol. Methods* 326, 93–115.

⁹¹ Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, 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.

⁹² Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschorn 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., Norris P.J. (2007) Loss of T cell responses following long-term cryopreservation, *J. Immunol. Methods* 326, 93–115.

⁹³ Smith J.G., Joseph H.R., Green T., Field J.A., Wooters M., Kaufhold R.M., Antonello J., Caufield M.J. (2007) Establishing acceptance criteria for cell-mediated immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (5), 527–537.

⁹⁴ Costantini a., Mancini S, Giuliodoro S, et al. (2003) Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *J. Immunol. Methods*;278(1-2):145-155.

eine Ausschüttung von IFN- γ Molekülen verhindern. Kreher et al. zeigten, dass der Einfrier- und Auftauprozess die Zytokinsekretion der Zellen verändert (Kreher et al., 2003⁹⁵) Auf Grundlage dessen, vermuteten Germann et al., dass diese auch durch Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung beeinflusst wird (Germann et al., 2013⁹⁶):

Angenommen an jedem Arbeitstag wird eine Probe entnommen. Dabei erwärmt sich der gesamte Probenhalter mit den anderen Proben. Bei 250 Arbeitstagen im Jahr würden die 350 Zyklen nach etwa 1 ½ Jahren erreicht werden. Proben werden aber oftmals über mehrere Jahre kryokonserviert d.h. eine höhere Abnahme bis hin zum Verlust könnte folgen.

Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, dass nicht nur der Einfrier- und Auftauprozess sondern auch die Lagerung kontrolliert und standardisiert wird. Zudem müssen Temperaturschwankungen nach Möglichkeit ganz vermieden oder auf ein Minimum reduziert werden. Nur dann ist die Qualität der kryokonservierten Proben sowie die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen gewährleistet.

Um diese Temperaturschwankungen während der Tieftemperaturlagerung möglichst zu vermeiden wurde vom Fraunhofer IBMT in Kooperation mit der ASKION GmbH eine alternative Lagerungsmöglichkeit entwickelt. Das ASKION C-line® hermetic storage-System ermöglicht die Lagerung ohne Temperaturänderungen unterhalb von -150 °C⁹⁷. Auch für das kontrollierte Einfrieren und Auftauen von biologischem Material wurde eine work bench entwickelt, die eine ununterbrochene Kühlkette gewährleistet, überwacht und protokolliert. Diese ermöglicht auch das Einfrieren nach frei programmierten Einfrierraten und reproduzierbare Einfrierprozesse⁹⁸.

⁹⁵ Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, 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.

⁹⁶ Germann A, Oh Y-J, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. (2013) Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. *Cryobiology*;67(2):193-200.

⁹⁷ http://www.askion.com/page/de/produkte/kryobiotechnologieueberblick/askionc_line_system/askionc_line_hermeticstorage/, abgerufen am 14.12.2014

⁹⁸ http://www.askion.com/page/de/produkte/kryobiotechnologieueberblick/askionc_line_system/askionc_line_workbench/, abgerufen am 14.12.2014



Abbildung 19: Askion C-line®-System ermöglicht die Lagerung sowie das Arbeiten mit tiefkalten Proben ohne Temperaturschwankungen. Links ist das hermetic storage-System und rechts die work bench abgebildet. Abbildungen entnommen von ⁹⁹ und ¹⁰⁰.

Um die Qualität des eingefrorenen Materials zu gewährleisten und die Vergleichbarkeit von Ergebnissen sowie die Reproduzierbarkeit zu garantieren sollte ein solches System in allen Bereichen der Kryokonservierung eingesetzt werden.

⁹⁹ http://www.askion.com/page/de/produkte/kryobiotechnologieueberblick/askionc_line_system/askionc_line_hermeticstorage/, abgerufen am 14.12.2014

¹⁰⁰ http://www.askion.com/page/de/produkte/kryobiotechnologieueberblick/askionc_line_system/askionc_line_workbench/, abgerufen am 14.12.2014

Literaturverzeichnis

- [1] Arosio B, D'Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, Nicolini P, Rossi PD, Maccarrone M, Mari D. (2014) Peripheral blood mononuclear cells as a laboratory to study dementia in the elderly, *Biomed Res Int.* 2014; 169203.
- [2] Bischof J.C., Rubinsky B. (1993) Large ice crystals in the nucleus of rapidly frozen liver cells. *Cryobiology* 30/6, 597-603.
- [3] Bull M, Lee D, Stucky J, Chiu YL, Rubin A, Horton H, McElrath MJ. (2007) Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J Immunol Methods.*, 322(1-2):57-69.
- [4] Böyum A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 97:7.
- [5] Neil A. Campbell, James B. Reece, *Biologie*, Pearson Studium, 8., aktualisierte Auflage, 2009
- [6] 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.
- [7] Crowe J.H. Crowe L.M., Chapman D. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* 223/4637, 701-703.
- [8] 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 gammainterferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 110, 29-36.
- [9] Farrant, J. (1977) Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278, 191-205.
- [10] Fletcher N.H., *The Chemical Physics of Ice*. Cambridge University Press, London 1970.
- [11] Fowke K.R., Behnke J., Hanson C., Shea K., Cosentino L.M. (2000) Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells, *J. Immunol. Methods* 244, 139–144.
- [12] Friedler, S., Giudice, L.C. and Lamb, E.J. (1988) Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 49, 743-64.

- [13] Germann A, Oh YJ, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. (2013) Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function., *Cryobiology.*, 67(2):193-200
- [14] Gilboa, E. (2004) The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 4, 401-11.
- [15] Glander H.J., Schaller J. (1999) Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (2), 109–115.
- [16] Hobbs P.V., *Ice Physics*. Clarendon Press, Oxford 1974.
- [17] Kierstead, L. S., Dubey, S., Meyer, B., Tobery, T. W., Mogg, R., Fernandez, V. R., Casimiro, D. R. (2007). Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23, 86–92.
- [18] Kleeberger C.A., Lyles R.H., Margolick J.B., Rinaldo C.R., Phair J.P., Giorgi J.V. (1999) Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 14–19.
- [19] 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.
- [20] Lovelock, J.E. (1953a) The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10, 414-26.
- [21] Lovelock, J.E. (1953b) The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 11, 28-36.
- [22] Lovelock, J.E. (1954) The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J* 56, 265-70.
- [23] Lovelock, J.E. (1955) Haemolysis by thermal shock. *Br J Haematol* 1, 117-29.
- [24] Luyet, B.J. (1937) The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica* 1, 1-14.
- [25] Luyet B.J., Hodapp R. (1938) Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc Soc Exp Biol NY* 39, 433-434.
- [26] Malyguine AM, Strobl S, Dunham K, Shurin MR, Sayers TJ. (2012) ELISPOT Assay for Monitoring Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) Activity in Cancer Vaccine Clinical Trials., *Cells.*, 1(2):111-26.

- [27] Mazur, P. (1963) Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 47, 347-69.
- [28] 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.
- [29] Mlotshwa M, Riou C, Chopera D, de Assis Rosa D, Ntale R, Treunicht F, Woodman Z, Werner L, van Loggerenberg F, Mlisana K, Abdool Karim S, Williamson C, Gray CM; CAPRISA 002 Study Team. (2010) Fluidity of HIV-1-specific T-cell responses during acute and early subtype C HIV-1 infection and associations with early disease progression., *J Virol.*, 84(22):12018-29.
- [30] Meryman, H.T. (1963) Preservation of living cells. *Fed Proc* 22, 81-9.
- [31] Moorthy, V.S., Good, M.F. and Hill, A.V. (2004) Malaria vaccine developments. *Lancet* 363, 150-6.
- [32] Muldrew K., McGann L.E. (1994) The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys J* 66/2, 532-541.
- [33] 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.
- [34] Muldrew K., McGann L.E. (1997) *Cryobiology – A Short Course*. <http://www.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryocourse/courseoutline.html>, (Version vom 15.01.2008).
- [35] Nilsson C, Aboud S, Karlén K, Hejdeman B, Urassa W, Biberfeld G. (2008) Optimal blood mononuclear cell isolation procedures for gamma interferon enzyme-linked immunospot testing of healthy Swedish and Tanzanian subjects., *Clin Vaccine Immunol.* 15(4):585-9.
- [36] Oldham R.K., Dean J.H., Cannon G.B., Ortaldo J.R., Dunston G., Applebaum F., McCoy J.L., Dieu J., Herberman R.B. (1976) Cryopreservation of human lymphocyte function as measured by in vitro assays, *Int. J. Cancer* 18, 145–155.
- [37] Olemukan R.E., Eller L.A., Ouma B.J., Etonu B., Erima S., Naluyima P., Kyabaggu D., Cox J.H., Sandberg J.K., Wabwire-Mangen F., Michael N.L., Robb M.L., de Souza M.S., Eller M.A. (2010) Quality monitoring of HIV-1-infected and uninfected peripheral blood mononuclear cell samples in a resource-limited setting, *Clin. Vaccine Immunol.* 17 (6), 910–918.

- [38] Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschhorn 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., Norris P.J. (2007) Loss of T cell responses following long-term cryopreservation, *J. Immunol. Methods* 326, 93–115.
- [39] Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
- [40] 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.
- [41] Roff S.R., Noon-Song E.N., Yamamoto J.K. (2014) The significance of interferon- γ in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis, *Front Immunol.*, 4:498.
- [42] Rosillo M.C., Ortuno F., Rivera J., Moraleta J.M., Vicente V. (1995) Cryopreservation modifies flow-cytometric analysis of hemopoietic cells, *Vox Sang.* 68, 210.
- [43] Sambor A, Garcia A, Berrong M, Pickeral J, Brown S, Rountree W, Sanchez A, Pollara J, Frahm N, Keinonen S, Kijak GH, Roederer M, Levine G, D'Souza MP, Jaimes M, Koup R, Denny T, Cox J, Ferrari G. (2014) Establishment and maintenance of a PBMC repository for functional cellular studies in support of clinical vaccine trials., *J Immunol Methods.*,409:107-16.
- [44] Sanchez AM, Rountree W, Berrong M, Garcia A, Schuetz A, Cox J, Frahm N, Manak M, Sarzotti-Kelsoe M, D'Souza MP, Denny T, Ferrari G. (2014) The External Quality Assurance Oversight Laboratory (EQAPOL) proficiency program for IFN-gamma enzyme-linked immunospot (IFN- γ ELISpot) assay., *J Immunol Methods.*,409:31-43.
- [45] Slota M, Lim JB, Dang Y, Disis ML. (2011) ELISpot for measuring human immune responses to vaccines., *Expert Rev Vaccines.*, 10(3):299-306.
- [46] Smith J.G., Joseph H.R., Green T., Field J.A., Wooters M., Kaufhold R.M., Antonello J., Caufield M.J. (2007) Establishing acceptance criteria for cell-mediated immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions, *Clin. Vaccine Immunol.*, 14 (5) 527–537.
- [47] Takamatsu H., Rubinsky B. (1999) Viability of deformed cells. *Cryobiology* 39/3, 243-251.

- [48] Vi-CELL™ XR Broschüre,
http://www.beckmancoulter.de/Life+Science/Durchflusszytometrie+_Zell+Analyser/Zell+Analyser/Vi_CELL+XR.html, abgerufen am 08.10.2014
- [49] Vysekantsev I.P., Gurina T.M., Martsenyuk V.F., Petrenko T.F., Kudokotseva E.V., Koshchiy S.V., Groshevoy M.I. (2005) Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. *Cryo Letters* 26/6, 401-408.
- [50] 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 virusinfected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 804-7.
- [51] Weinberg A., Wohl D.A., Brown D.G., Pott G.B., Zhang L., Ray M.G., van der Horst C. (2000) Effect of cryopreservation on measurement of cytomegalovirus-specific cellular immune responses in HIV infected patients, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 25, 109–114.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] Wolfe J., Byrant G. (2001) Cellular cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. *Int J Refrig* 24, 438-450.
- [55] http://www.askion.com/page/de/produkte/kryobiotechnologieueberblick/askionc_line_system/askionc_line_hermeticstorage/, abgerufen am 14.12.2014
- [56] http://www.askion.com/page/de/produkte/kryobiotechnologieueberblick/askionc_line_system/askionc_line_workbench/, abgerufen am 14.12.2014
- [57] <http://www.humanimmunologyportal.com/protocols/preparing-a-buffy-coat-from-whole-blood/>, abgerufen am 20.10.2014
- [58] <http://www.patent-de.com/20040129/DE69906859T2.html>, abgerufen am 06.10.2014
- [59] <http://www.bdbiosciences.com/ds//pm/tds/555899.pdf>, abgerufen am 06.10.2014

Anhang

I. Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die PBMC-Viabilität

I.1 PBMC-Viabilität direkt nach dem Auftauen

Tabelle I-1: PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen von vier verschiedenen Spendern. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. Angabe in Prozent (%).

PBMC-Viabilität direkt nach Auftauen (%)

	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
N2	98,10 ± 0,66	98,56 ± 0,27	98,90 ± 0,32	97,76 ± 0,63
50	96,54 ± 0,77	97,53 ± 0,32	98,41 ± 0,26	96,63 ± 1,24
100	95,66 ± 1,36	96,71 ± 0,54	98,34 ± 0,86	96,09 ± 1,50
150	96,69 ± 0,65	96,56 ± 0,48	97,22 ± 1,03	95,78 ± 1,36
200	94,74 ± 3,04	96,31 ± 1,34	96,69 ± 0,46	95,46 ± 1,68
250	94,40 ± 2,83	95,63 ± 0,92	96,90 ± 0,94	95,13 ± 1,36
300	92,93 ± 7,66	96,40 ± 1,29	96,47 ± 0,93	95,92 ± 0,60
350	90,22 ± 10,49	95,57 ± 0,65	96,33 ± 1,61	94,00 ± 1,27

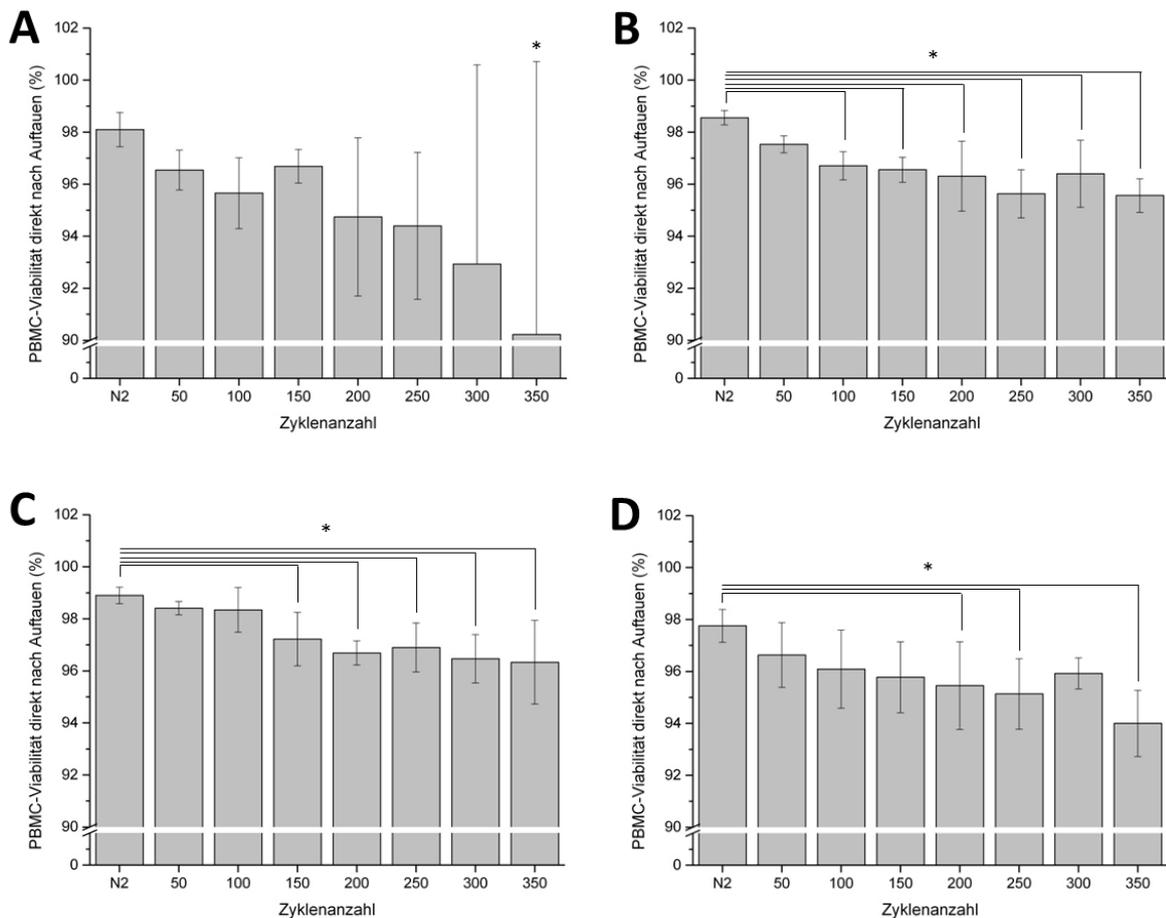


Abbildung I-1: PBMC-Viabilität (%) direkt nach dem Auftauen. A, B, C und D zeigen vier verschiedene Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (%) mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. * signifikant gegen N₂ mit p<0,05.

1.2 PBMC-Viabilität nach ÜN-Kultur

Tabelle I-2: PBMC Viabilität (%) nach ÜN-Kultur. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen von vier verschiedenen Spendern. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. Angabe in Prozent (%).

PBMC-Viabilität nach ÜN-Kultur (%)

	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
N2	93,48 ± 1,66	96,59 ± 0,95	96,37 ± 0,74	94,96 ± 0,66
50	92,67 ± 1,86	94,96 ± 1,43	95,71 ± 0,61	94,33 ± 1,78
100	93,39 ± 1,76	94,90 ± 1,11	95,63 ± 0,66	93,54 ± 1,08
150	93,92 ± 1,77	92,63 ± 2,17	94,86 ± 1,12	94,06 ± 1,60
200	92,73 ± 4,03	93,29 ± 3,44	94,84 ± 0,51	93,77 ± 1,02
250	93,98 ± 2,56	93,68 ± 1,05	93,91 ± 1,30	94,10 ± 1,15
300	94,13 ± 0,89	93,93 ± 2,68	94,51 ± 1,79	93,77 ± 0,94
350	93,92 ± 2,52	92,63 ± 1,37	94,86 ± 1,58	94,06 ± 1,02

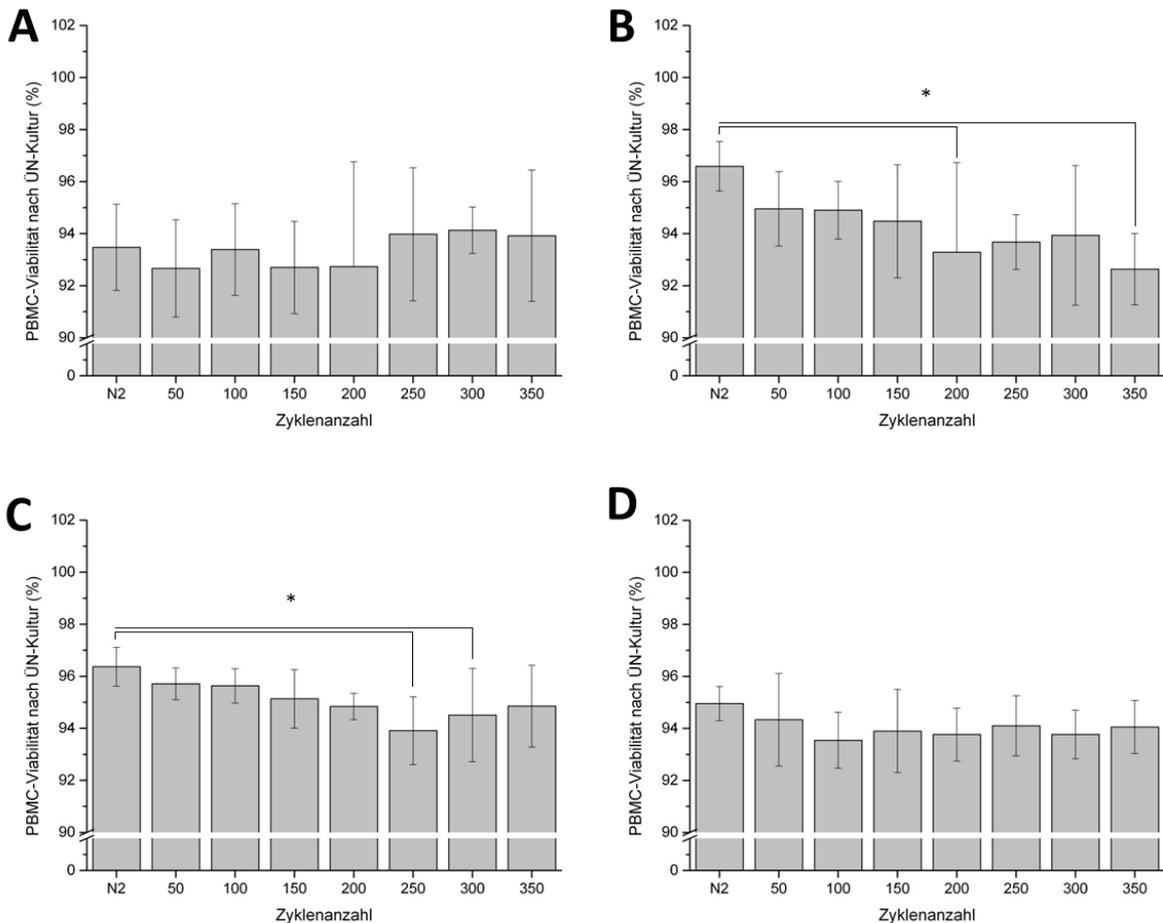


Abbildung I-2: PBMC-Viabilität (%) nach ÜN-Kultur. A, B, C und D zeigen vier verschiedene Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (%) mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. * signifikant gegen N₂ mit p<0,05. Abbildung A und D: keine signifikanten Unterschiede zu N₂.

II. Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die PBMC-Recovery

II.1 PBMC-Recovery direkt nach dem Auftauen

Tabelle II-1: PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen. Dargestellt ist die PBMC-Recovery von vier verschiedenen Spendern. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. Angabe in Prozent (%).

PBMC-Recovery direkt nach Auftauen (%)

	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
N2	102,89 ± 3,82	90,00 ± 4,24	100,00 ± 4,33	91,44 ± 4,72
50	97,78 ± 5,59	86,22 ± 4,15	96,78 ± 4,60	87,67 ± 5,43
100	96,89 ± 7,29	84,11 ± 4,43	90,33 ± 5,96	90,33 ± 7,71
150	94,89 ± 5,88	84,33 ± 4,50	91,11 ± 4,91	87,56 ± 3,71
200	92,89 ± 7,57	79,22 ± 5,72	80,56 ± 2,88	87,78 ± 6,32
250	86,11 ± 8,91	75,56 ± 3,91	74,56 ± 3,84	84,00 ± 3,04
300	81,78 ± 13,53	74,44 ± 4,53	76,56 ± 2,55	77,56 ± 5,94
350	80,67 ± 16,91	77,22 ± 4,89	66,00 ± 12,68	75,56 ± 4,85

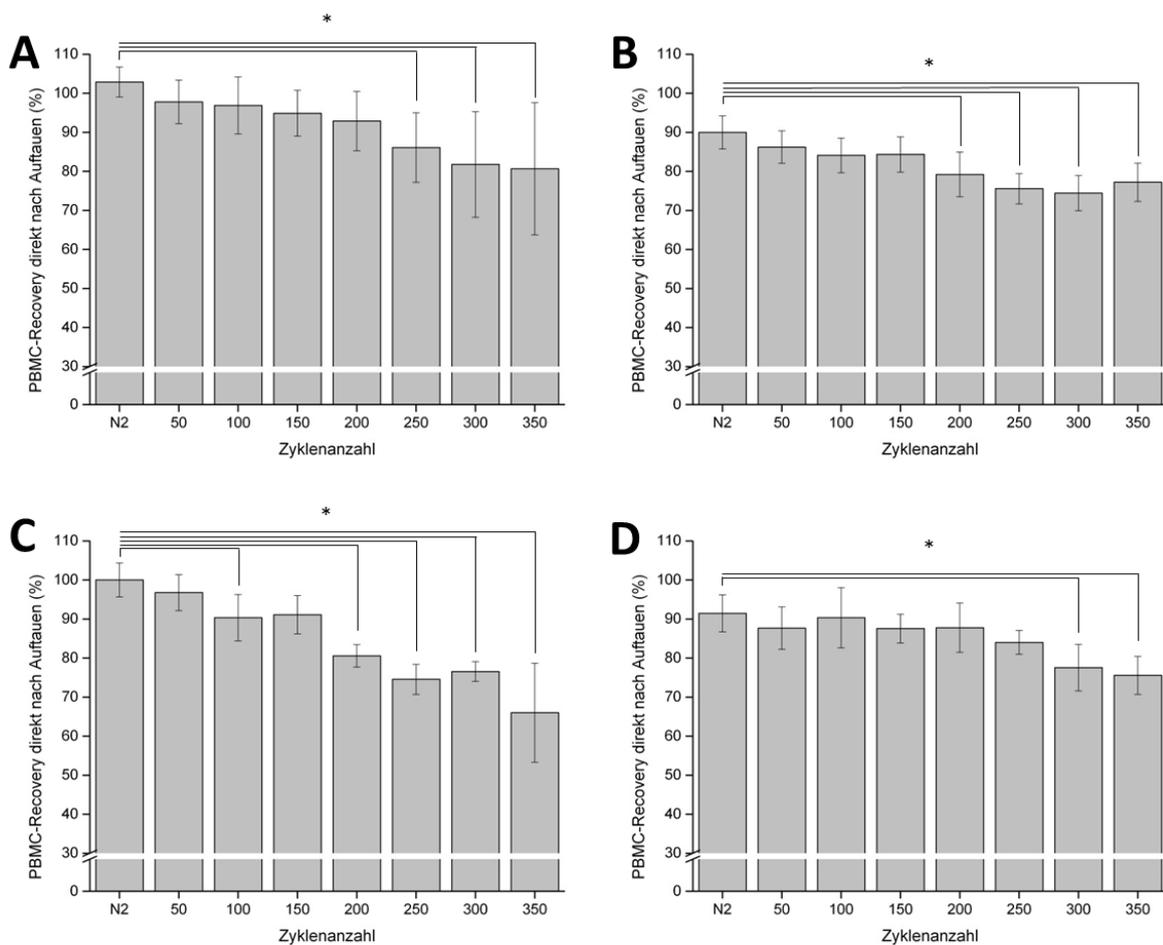


Abbildung II-1: PBMC-Recovery (%) direkt nach dem Auftauen. A, B, C und D zeigen vier verschiedene Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (%) mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. * signifikant gegen N₂ mit p<0,05.

II.2 PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur

Tabelle II-2: PBMC-Recovery (%) nach ÜN-Kultur. Dargestellt ist die PBMC-Recovery von vier verschiedenen Spendern. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. Angabe in Prozent (%).

PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur (%)

	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
N2	82,35 ± 8,65	77,52 ± 3,79	85,62 ± 4,84	80,13 ± 3,97
50	78,56 ± 9,05	68,76 ± 2,89	78,69 ± 3,45	74,31 ± 4,55
100	78,17 ± 8,63	67,06 ± 3,11	80,39 ± 8,98	70,33 ± 4,11
150	78,17 ± 9,56	67,71 ± 4,12	71,90 ± 6,46	68,63 ± 6,44
200	69,02 ± 11,91	60,65 ± 7,21	64,58 ± 3,65	71,50 ± 2,87
250	65,49 ± 8,19	57,12 ± 2,29	62,22 ± 4,65	64,18 ± 2,13
300	66,93 ± 9,35	58,17 ± 5,91	62,22 ± 4,46	60,00 ± 2,70
350	67,06 ± 8,80	53,05 ± 2,88	51,90 ± 12,50	58,95 ± 5,31

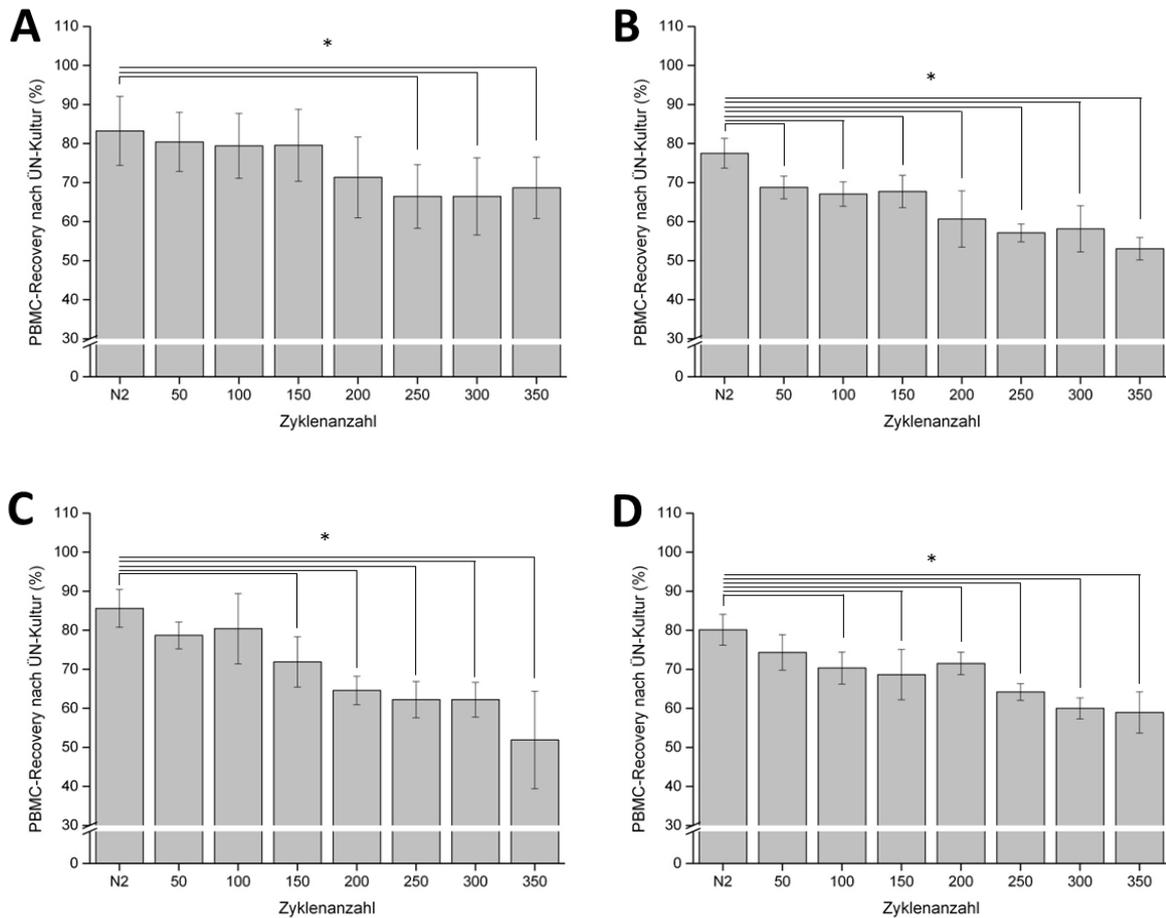


Abbildung II-2: PBMC-Recovery (%) nach ÜN-Kultur. A, B, C und D zeigen vier verschiedene Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (%) mit den jeweiligen Standardabweichungen von je drei Proben. * signifikant gegen N₂ mit p<0,05.

II.3 Differenzen der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach Auftauen

Tabelle II-3: Differenz (%) der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen. Dargestellt sind die Einzelwerte der vier verschiedenen Spender.

Differenz der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach Auftauen (%)

	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
N2	-20,54	-12,48	-14,38	-11,31
50	-19,22	-17,46	-18,08	-13,35
100	-18,72	-17,05	-9,94	-20,01
150	-16,72	-16,62	-19,22	-18,93
200	-23,87	-18,57	-15,98	-16,27
250	-20,62	-18,43	-12,33	-19,82
300	-14,85	-16,27	-14,33	-17,56
350	-13,61	-24,17	-14,10	-16,60

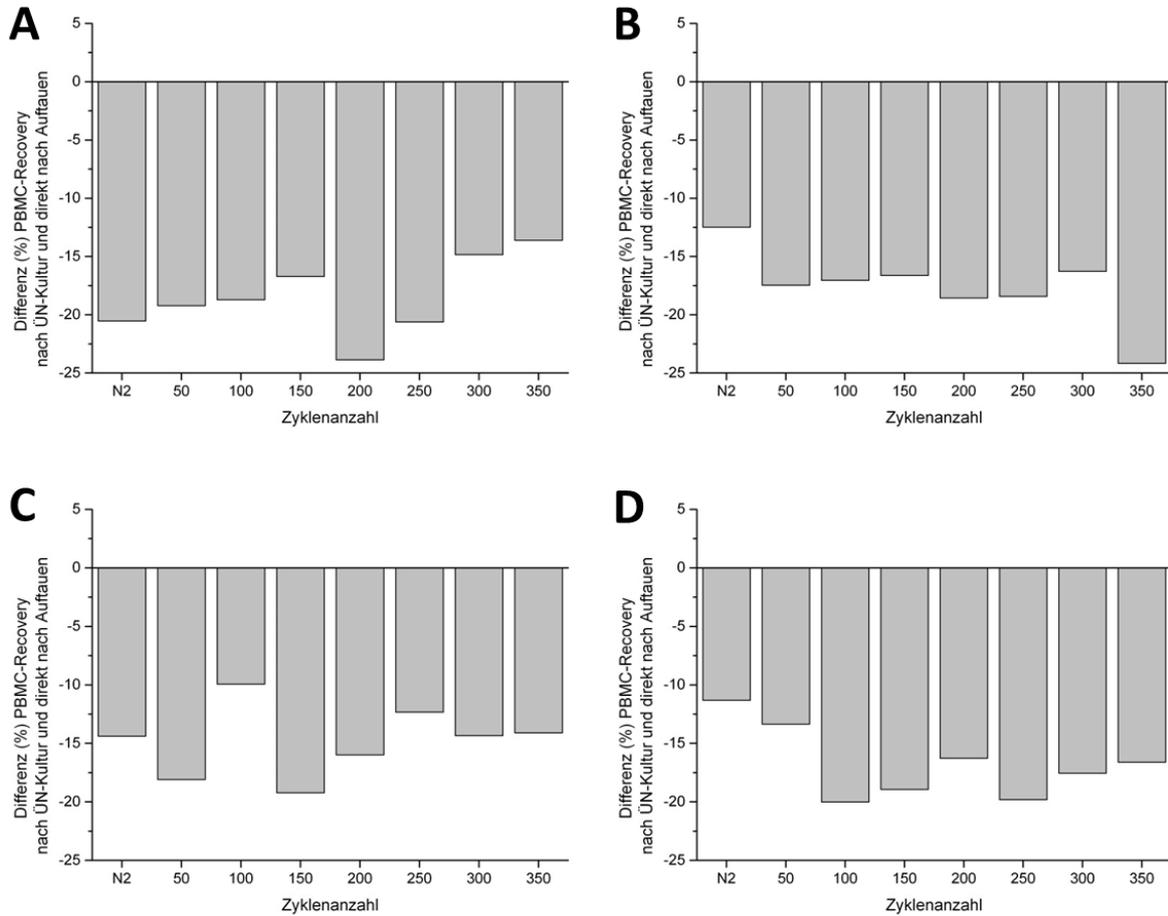


Abbildung II-3: Differenz (%) der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen. Dargestellt sind die Einzelwerte der vier verschiedenen Spender. A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4.

II.4 Differenzen der Abnahme der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen

Tabelle II-4: Differenz (%) der Abnahme nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen. Dargestellt sind die Einzelwerte der vier verschiedenen Spender.

Differenz der Abnahme der PBMC-Recovery nach ÜN-Kultur und direkt nach Auftauen (%)

	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
50	0,36	-7,10	-4,87	-3,13
100	0,75	-6,95	3,56	-11,02
150	2,70	-6,35	-7,14	-10,10
200	-6,47	-9,78	-5,14	-6,76
250	-4,17	-10,26	-1,88	-11,76
300	1,79	-7,67	-3,88	-9,93
350	3,03	-17,36	-5,39	-9,05

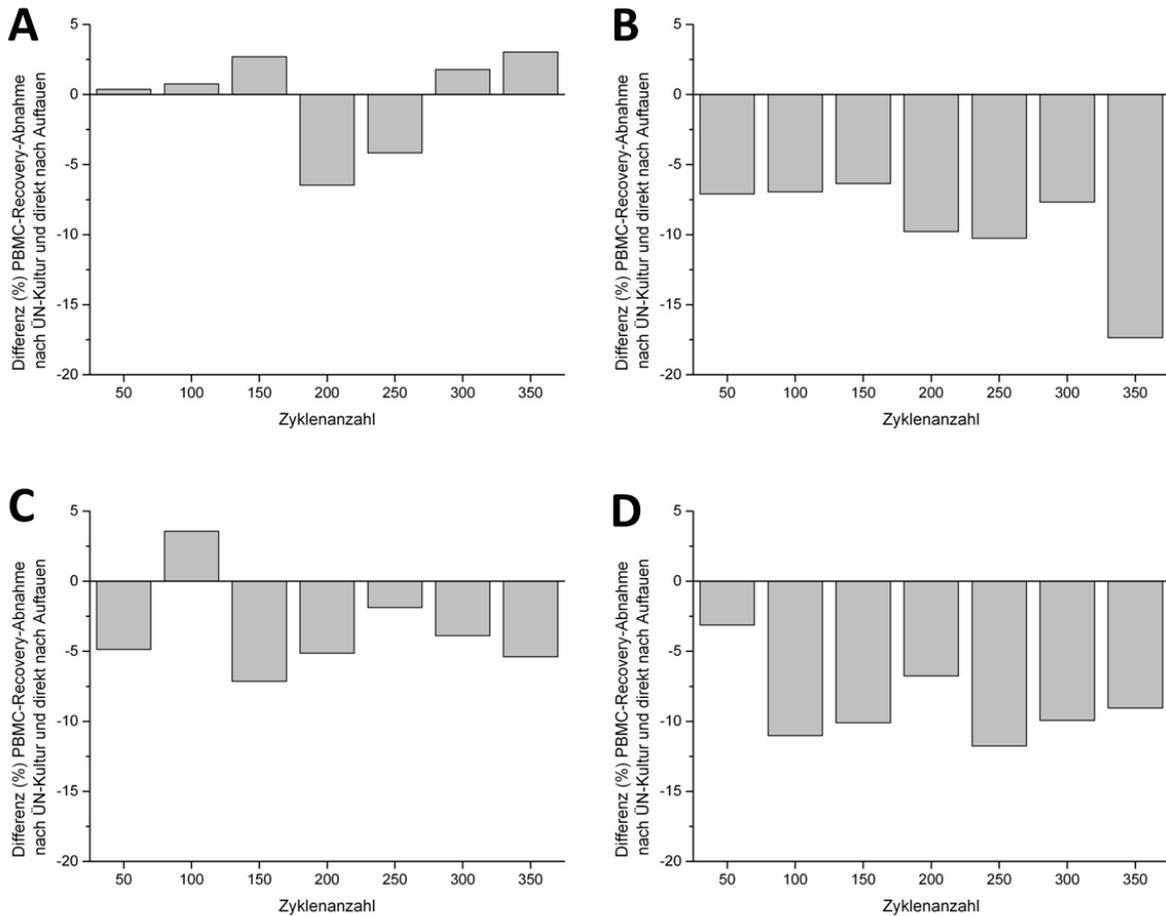


Abbildung II-4: Differenz (%) der Abnahme nach ÜN-Kultur und direkt nach dem Auftauen. Dargestellt sind die Einzelwerte der vier verschiedenen Spender. A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4.

III. Auswirkungen der Temperaturzyklen auf die T-Zellfunktionalität

III.1 Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort nach Stimulation mit CEF-Peptiden

Tabelle III-1: Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort (%) der einzelnen Spender nach Stimulation mit CEF-Peptiden. Dargestellt sind die Einzelwerte der vier verschiedenen Spender.

CEF				
	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
50	2,51	-13,64	-15,51	-18,93
100	-2,75	-12,73	-18,75	1,18
150	-6,15	17,27	-5,32	-28,99
200	-11,17	-11,82	-37,73	-26,04
250	-16,02	-15,45	-43,75	-27,22
300	-16,83	-27,27	-45,14	-32,54
350	-7,85	-29,09	-35,42	-38,46

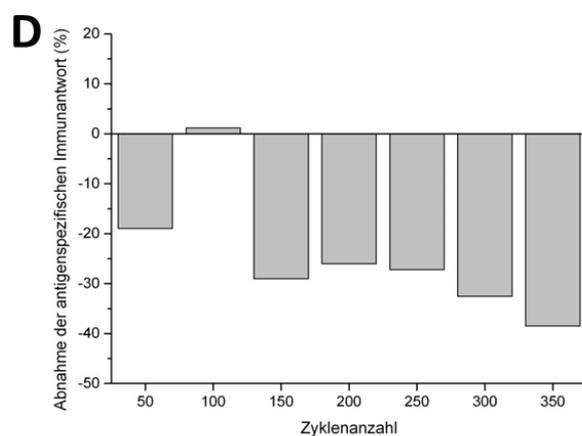
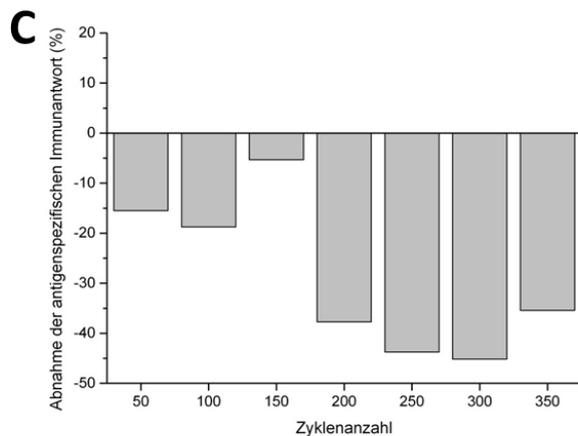
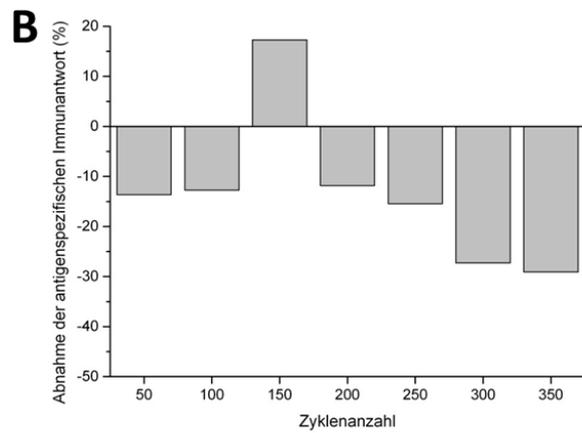
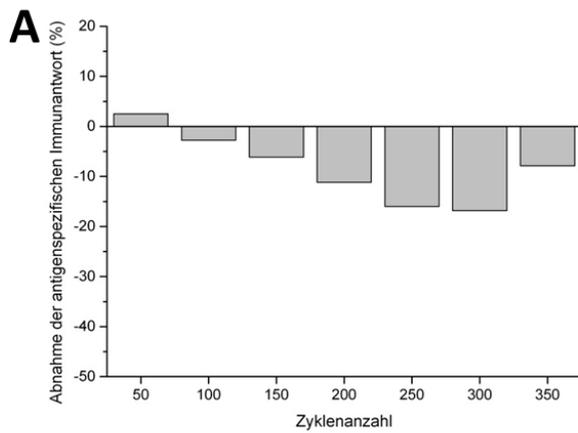


Abbildung III-1: Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort (%) nach Stimulation mit CEF-Peptiden. A, B, C und D zeigen vier verschiedene Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Einzelwerte in Prozent (%) der vier verschiedenen Spendern.

III.2 Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort nach Stimulation mit CMV-Peptiden

Tabelle III-2: Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort (%) der einzelnen Spender nach Stimulation mit CMV-Peptiden. Dargestellt sind die Einzelwerte der vier verschiedenen Spender.

CMV				
	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
50	2,67	-8,93	-4,94	-18,31
100	-1,17	12,50	-7,54	-40,85
150	-5,00	-8,93	-5,10	-15,49
200	-11,65	-26,79	-18,31	-29,58
250	-16,24	5,36	-9,29	-28,17
300	-21,32	-17,86	-14,60	-25,35
350	-7,47	-30,36	-19,85	-32,39

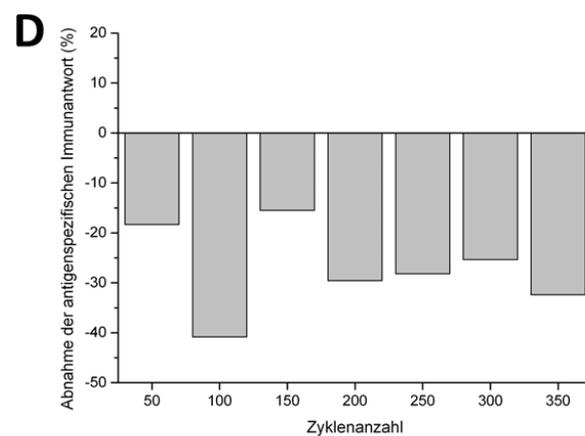
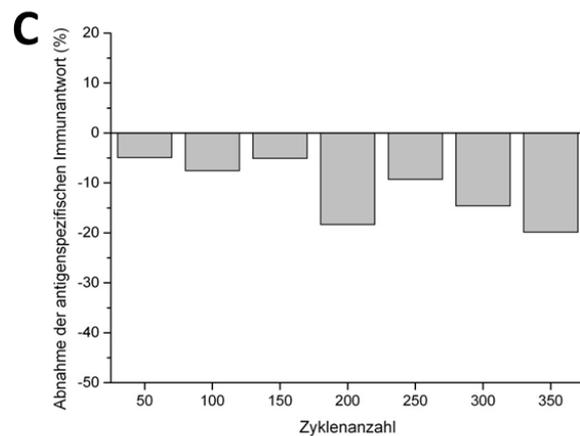
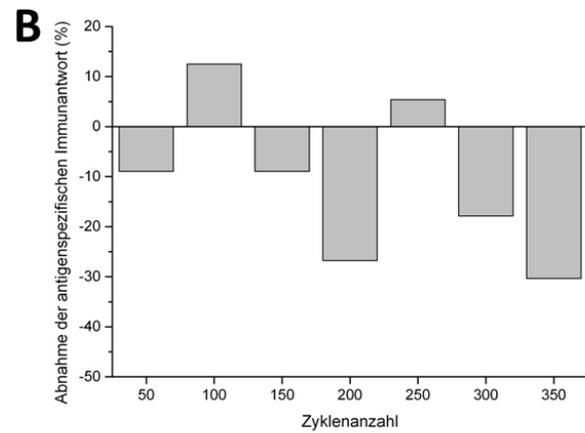
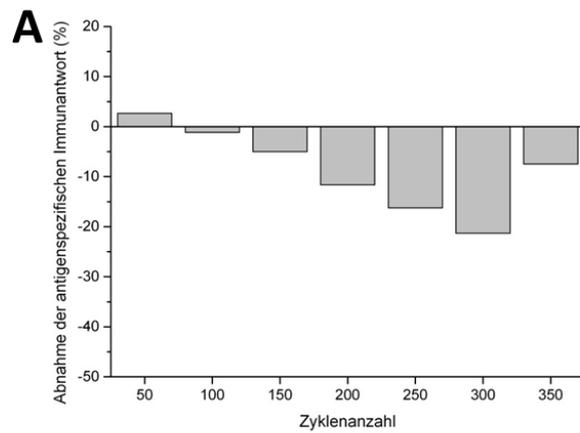


Abbildung III-2: Abnahme der antigenspezifischen Immunantwort (%) nach Stimulation mit CMV-Peptiden. A, B, C und D zeigen vier verschiedene Spender; A= Spender 1, B= Spender 2, C= Spender 3 und D= Spender 4. Dargestellt sind die Einzelwerte in Prozent (%) der vier verschiedenen Spender.