

# Kryoforschungsbank & Zentrum für Kryobiotechnologie



**Fraunhofer** Institut  
Biomedizinische  
Technik

# Inhalt

Vorwort	2
Kryotechnologie am IBMT – Neue technologische Lösungen für die Kryokonservierung in der Biotechnologie und Medizin	7
Grundlagenforschung zur Kryokonservierung – Von der Kryobiologie zur Kryotechnologie	10
Anwendungsfelder der Kryotechnologie – Beispiel regenerative Medizin	15
<b>Fraunhofer-Technologieplattform</b>	19
Kryobiophysik & Kryotechnologie – Forschung und Entwicklung am Zentrum für Kryobiotechnologie	19
Kryobiophysik	22
Molekulare Prozesse beim Einfrieren von Zellen	24
Tieftemperaturelektronik	27
Kryobioinformatik / ChameleonLab	29
Kryoequipment & Kryorobotik	31
Kryoforschungs- und Demonstrationsbank – Langzeitlagerung lebender Zellproben	34
<b>Historie</b>	37
<b>Ausstattung, Angebote &amp; Produkte</b>	40
Kryobiophysik & Kryotechnologie	40
Kryoequipment & Kryorobotik	41
Nachwuchsgruppe »Kryo-Nanobiotechnologie« des BMBF	41
Kryoforschungsbank	42
<b>Zusammenfassung der Dienstleistungen am Zentrum für Kryobiotechnologie</b>	44
<b>Möglichkeiten der Unterstützung gemeinnütziger Sammlungen – Kryotankspende &amp; Patenschaft</b>	46
<b>Danksagung</b>	48
<b>So finden Sie uns</b>	49

## Vorwort



Prof. Dr. Günter R. Fuhr  
(Direktor Fraunhofer-Institut für  
Biomedizinische Technik IBMT)

Der Begriff der Kryokonservierung ist den meisten Menschen nicht so geläufig wie andere Bezeichnungen der Biotechnologie und Medizin, beispielsweise das Sequenzieren für die Genomanalyse. Er leitet sich aus dem griechischen Wort »Kryos« ab, was so viel wie »Kälte, Eis« bedeutet. Unter Kryokonservierung versteht man die Lagerung von Zellen und Gewebestücken bei Temperaturen unter  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in der Regel durch Kühlung mittels verflüssigtem Stickstoff. Dabei wird die Vitalität der Zellen aufrecht erhalten, obgleich das biologische System in den Zustand eines Festkörpers übergeht. Abgesehen von der Trocknung einiger Organismen, wie z.B. Bakterien und Pilzen, ist die Tieftemperaturlagerung gegenwärtig die einzige Möglichkeit tierische, pflanzliche und vor allem menschliche Zellen und Zellverbände über nahezu beliebige Zeiträume lebensfähig abzulegen und zu gegebener Zeit zu reanimieren.

Die Atmosphäre der Erde besteht zu ca. 78% aus Stickstoff, einem inerten Gas, das unter Normaldruck bei ca.  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  in den flüssigen Aggregatzustand übergeht. Als Kühlphase hat es sich sowohl aus Sicht der Handhabung, aber auch aus Kostengründen bewährt. Gelagert werden die Proben in großen Stahlbehältern, die nach dem Dewar-Prinzip aufgebaut sind. Zwei Behälter sind unter möglichst geringem Kontakt ineinander montiert und durch einen Vakuumbereich thermisch zueinander isoliert, wobei der innere zu etwa einem Viertel oder auch vollständig mit flüssigem Stickstoff gefüllt wird. Die Zell- und Gewebeproben befinden sich in speziellen Metallregalen und Plastikbehältern in der Regel in der kühlen Gasphase oder verschlossen eingetaucht in der flüssigen Kühlphase. Proben, die auf diese Weise gelagert werden, können über Jahre, Jahrzehnte perspektivisch bis zu Jahrhunderten ohne Einbuße der Lebensfähigkeit überdauern. Der Stoffwechsel der Zellen kommt vollständig

zum Erliegen - alle Lebensvorgänge, d.h. jedwede Biochemie, stehen still.

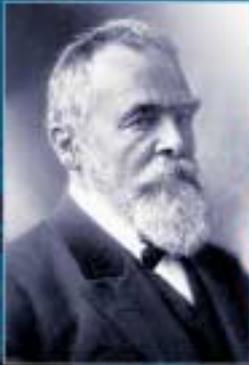
Da sehr oft in diesem Zusammenhang von eingefrorenen Tieren, Menschen, deren Köpfen oder Organen in der Tagespresse die Rede ist, erscheint es notwendig, klarzustellen, was gegenwärtig lebend konserviert werden kann und was nicht. Zunächst ist wichtig zu wissen, dass es sich beim Einfrieren von Zellen bei derart niedrigen Temperaturen nicht um einen Vorgang handelt, der an irgend einer Stelle der Erde natürlich auftritt oder in der Vergangenheit aufgetreten ist. Die Verflüssigung der Gase, maßgeblich durch Carl von Linde in die Technik eingeführt, ist eine Erfindung des Menschen, wengleich wir Planeten und Monde (Pluto, Titan) kennen, auf denen derart tiefe Temperaturen herrschen, dass der Stickstoff in Form flüssiger Seen und Meere auftreten könnte. Das Abkühlen eines Körpers ist durch physikalische Parameter, wie die Wärmeleitung, die Geometrie und die Größe des Körpers, festgelegt und in der Abkühlrate limitiert.

Ohne Gefrierschutzmittel ist eine Lebendkonservierung biologischen Materials zudem nicht möglich. Doch auch das Gefrierschutzmittel muss in alle Zellen hineingelangen. Allein aus der Wärmeleitung und der Diffusion der Kryoprotektiva ergibt sich, dass ganz bestimmte Temperaturverläufe für biologische Proben einzuhalten sind. Beide Prozesse werden mit steigender Größe der einzufrierenden Objekte in ihrer Geschwindigkeit und Verteilungscharakteristik immer langsamer und komplexer, so dass die Lebendkonservierung von zellulärem

Gewebe bereits bei einigen Kubikmillimeter großen Stücken an physikalische Grenzen stößt. Da weltweit, wenn überhaupt gestattet, eine Tieftemperaturkonservierung von Menschen erst nach dem natürlichen Tode stattfinden darf und die Wärme nicht rasch genug aus dem Körper abgeleitet werden kann sowie die Gefrierschutzmittel schlecht in alle Zellen gelangen können, ist mit hoher Gewissheit davon auszugehen, dass die mancherorts eingefrorenen Menschen (z.B. in den USA) niemals wieder zum Leben erweckt werden können. Es müsste neben den Gefrierschäden auch der eingetretene Tod mit den jeweils spezifischen Zell- und Organschädigungen behoben werden, was auch späteren Generationen schwer fallen dürfte. Zudem ging es den entsprechenden Personen nicht um eine genetische Rekonstruktion in Form eines neuen Organismus, sondern um den bislang und wohl auch bis auf Weiteres unerfüllbaren Traum des bewussten Erlebens einer späteren Zeit bei erhaltener Persönlichkeit und vollständiger Rück Erinnerung.

Schädigungen treten bei lebenden makroskopischen Organismen bereits auf, wenn flüssiger Stickstoff die Körperoberfläche berührt. Eine derartige Erfrierung gleicht nach dem Auftauen einer Verbrennung. Ebenso verhält es sich beim Einfrieren von Menschen, deren vor allem dichte Gewebeteile nach dem Auftauen Risse und neben den mikroskopischen auch makroskopische Zerstörungen aufweisen. Gegenwärtig besitzt das Einfrieren von Hunden, Katzen und Menschen mit dem Ziel der Wiederbelebung daher keinen wissenschaftlichen Hintergrund. Auch die Hoffnung auf eine Lösung des Problems in der Zukunft erscheint gering, da insbesondere die dichten Gewebeteile wie das Herz, das Gehirn und andere lebenswichtige Organe am stärksten geschädigt oder zerstört würden und nach dem Auftauen, ähnlich einer Frucht, außen gut erhalten, innen

**Kryokonservierung ist kein natürlicher Prozess!**  
Tiefste Temperaturen auf der Erde:  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Verflüssigung der Luft, eine Erfindung des Menschen:




**Zusammensetzung der Luft:**  
Stickstoff 78% flüssig bei  $-195,82\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Sauerstoff 21% flüssig bei  $-182,96\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Edelgase <1% He bei  $-268,94\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Kohlendioxid 0,03%

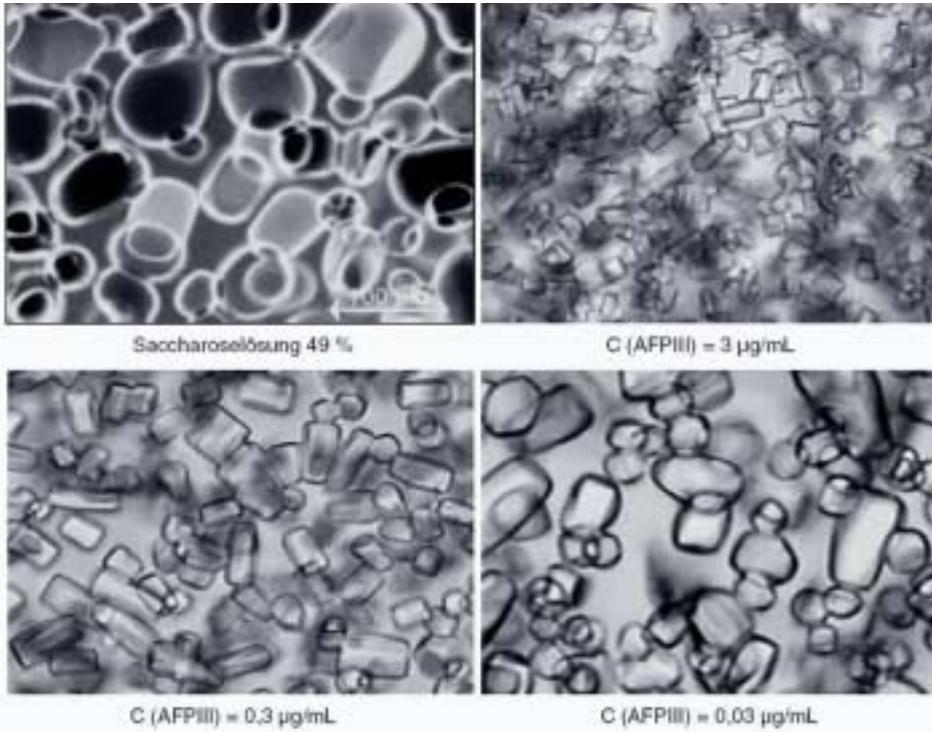


**Linde-Maschine:**  
Nutzung des Joule-Thomson-Effekts im Gegenstrom-Wärmeaustauscherprinzip

aber im Zellverband funktionell unbrauchbar wären. So spektakulär das Einfrieren mit dem Ziel des Weiterlebens in beliebiger Zukunft auch sein mag, der Motor der Wissenschaft, insbesondere auch der Kryobiotechnologie, ist es nicht.

Das häufig beschriebene Einfrieren einiger Organismen im Eis erfolgt nach ähnlichen, am Ende aber doch anderen Prinzipien als die hier behandelte Tieftemperaturkonservierung. Einige wenige Fische, Frösche, Insekten, aber auch Algen sowie Mikroorganismen frieren im Boden oder in wässriger Umgebung bei Temperaturen unter 0 Grad bis zu  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  ein und vermögen diesem Stress über Tage, manchmal sogar

Wochen und Monate zu widerstehen. Ein Frosch im Eisblock ging vor Jahren durch die Medien. Ungeachtet des tiefgefrorenen Anscheins leben diese Tiere dennoch und sind nicht zu einem Festkörper erstarrt, wie die Zellen bei den Temperaturen des flüssigen Stickstoffs. Es wird berichtet, dass die Blutzirkulation derartig unterkühlter Organismen zum Stillstand kommt, Wunden daher nicht bluten und die Frequenz des Herzschlags stark herabgesetzt ist (STOREY & STOREY, Pharmaceutical News, Vol. 6, No. 3, S. 9-14, 1999). Die bezeichneten Tiere nutzen zwei Effekte zum Überleben bei Kälte: zum einen die Entwässerung der Zellen und damit eine Erniedrigung des Gefrierpunkts durch Konzentrierung der gelösten Stoffe (Ionen, Proteine), zum anderen die Produktion spezieller Gefrierschutzsubstanzen, die die Eisstruktur beeinflussen (Verhinderung großer Eisdomänen). Kühlt man sie weiter ab, so frieren sie durch und es gelingt nicht, sie nach dem Auftauen wieder zum Leben zu erwecken.



Eiskristallstrukturen in einer Saccharose-Modelllösung und mit Zusatz unterschiedlicher AFPIII-Konzentrationen (Anti Freeze Protein) nach 70 Stunden Lagerzeit, Lagertemperatur  $-8^{\circ}\text{C}$ . (Quelle: Chemie Ingenieur Technik 2004, 76, No. 4, Volker Gaukel und Walter E. L. Spieß, Einfluss von Antifrierproteinen auf die Rekristallisation von Eis in Modellösungen für Eiskrem, Abbildung 2.)

All das, was bei größeren Geweben und Organismen nicht funktioniert, lässt sich jedoch mit vereinzelt Zellen nahezu problemlos durchführen. Die Größe der meisten unserer Zellen, die bei einigen zehn Mikrometern liegt, erlaubt das definierte Einbringen von Kryoprotektiva (Gefrierschutzmitteln) in die Zellen und ihre Abkühlung zu Temperaturen unter  $-130^{\circ}\text{C}$ , einer kritischen Temperaturmarke, unterhalb der eine Rekristallisation von Eis nicht mehr möglich ist bzw. extrem langsam erfolgt. Somit lassen sich Zellen in suspendierter Form und adhären auf Oberflächen sehr gut und reproduzierbar kryokonservieren und lagern. Im Unterschied zur erläuterten Gefrierschutzerniedrigung einiger kältetoleranter Tiere kommen die Lebensprozesse im Zellinneren hierbei jedoch vollständig zum Stillstand. Die einzige Begrenzung der Lagerdauer liegt in der kosmischen Strahlung begründet, die

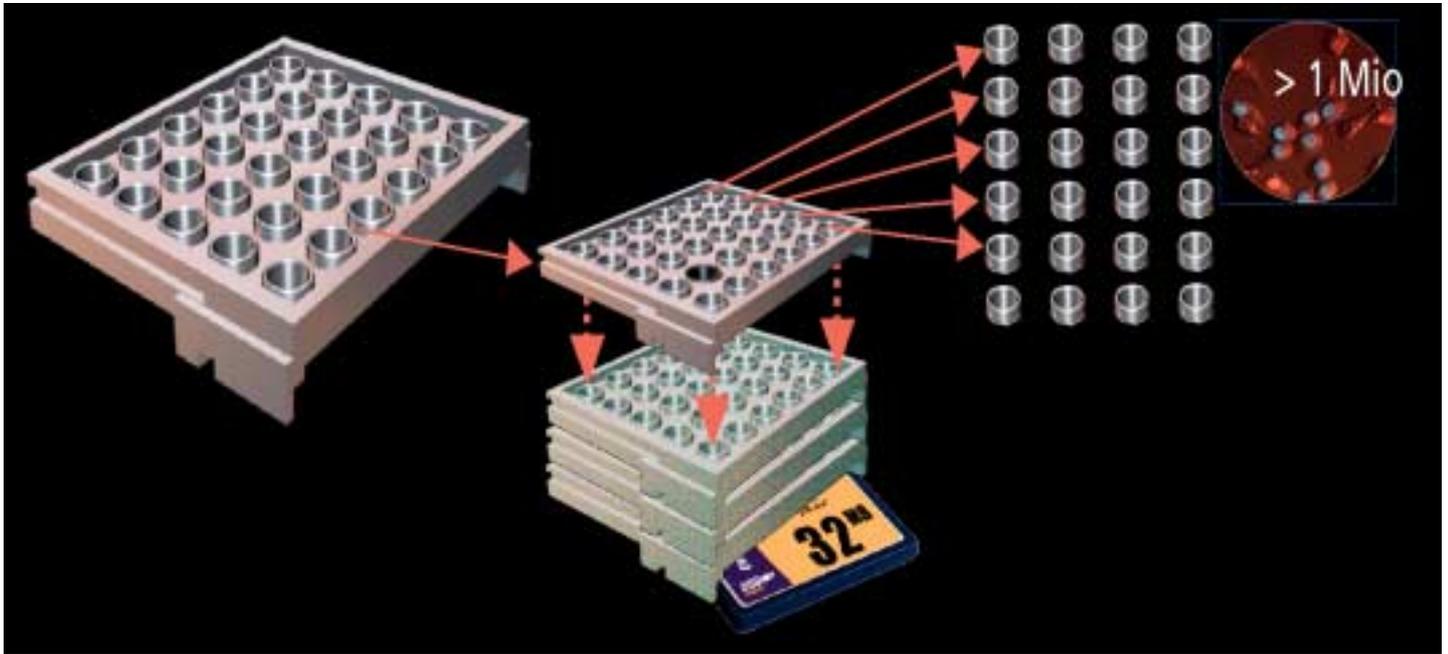
auch die Zellproben im gefrorenen Zustand und im Stahltank permanent trifft. Sie würde sehr langsam nach mehreren zehntausend Jahren zur Zerstörung des Genoms führen. Für die Zwecke der Biotechnologie und Medizin ist dieser Effekt allerdings belanglos.

Womit sich diese Broschüre beschäftigt, ist ausschließlich die Tieftemperaturkonservierung von zellulären Lebendproben für die Biotechnologie, Medizin, den Umwelt-, Arten- und Verbraucherschutz, aber auch die Anlage von Bioressourcen der Zukunft, für die Forschung und zur retrospektiven Untersuchung lebenden Materials für spätere Generationen mit deren, heute noch unbekanntem Messmethoden und Geräten.

Nach eingehender Diskussion und Prüfung hat die Fraunhofer-Gesellschaft in Kooperation mit dem Saarland im Jahre 2001 die Entwicklung der Kryobiotechnologie für vordringlich und fundamental für die Einführung der Biotechnologie in einer industriellen Skalierung eingestuft und beschlossen, unikal in Deutschland und der Welt, diesen Technologiebereich in den nächsten Jahren zu entwickeln. Obwohl nahezu in jedem Biolabor verfügbar und gut etabliert, ist die Kryokonservierung von Zellen dennoch den zu erwartenden Probenzahlen und den Anforderungen der Zukunft bisher technologisch nicht gewachsen. Eine automatische Handhabung von Kryoprobe, Vereisungsfreiheit, nahezu absolute Verwechslungssicherheit und die optimierte Abkühlung bzw. Erwärmung sind unverkennbar Erfordernisse für eine breite Nutzung in Forschung, Wirtschaft und Medizin.

Auch sind die Probenvolumina, die gegenwärtig noch abgelegt werden, für viele Zwecke unverhältnismäßig groß und ungünstig gewählt, was die Kosten in die Höhe treibt und die Kryolagerkapazität begrenzt. Die Bemühungen des Fraunhofer-Instituts für Biomedizinische Technik zielen daher darauf ab, von der Probenahme über die Zugabe von Kryoschutzmitteln sowie das Einfrieren bis zu den Kryotanks und der Entwicklung industriell skalierter Kryogroßbanken die technologischen und biophysikalischen Voraussetzungen für eine sichere und erweiterungsfähige Kryobiotechnologie zu schaffen.

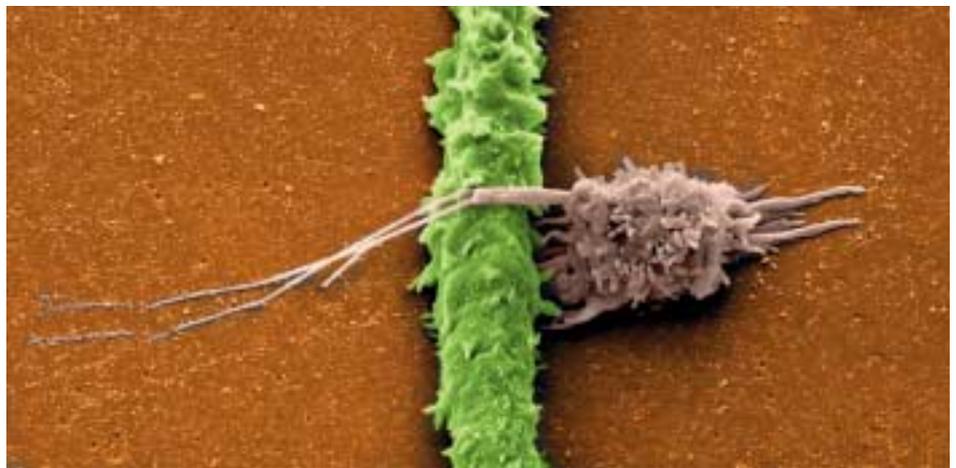
Kernelemente der Fraunhofer-Kryotechnologie des IBMT sind miniaturisierte und im tiefgekühlten Zustand fraktionierbare Kryosubstrate in fester Verbindung mit einem elektronischen Speicherchip, in dem neben einer Kennnummer der gesamte Umfang der Probenbeschreibung, die Rechtslage, die benutzten Datenformate bis hin zu Literaturdaten und Bildserien



Bei tiefen Temperaturen fraktionier- und stapelbares Well-Substrat mit tieftemperaturtauglichem elektronischen Memory-Chip für die Datenablage an der Probe.

gespeichert werden können. Die Verwechslungssicherheit und Versandfähigkeit von Proben sind ebenso optimiert, wie die automatische Aktualisierung der zentralen Datenbank in ihrem Abgleich mit den dezentral in den Kryotanks befindlichen elektronischen Memory-Chips. Hinzu kommt der Schutz der Proben und der Tanks vor Vereisung und Fremdeinflüssen.

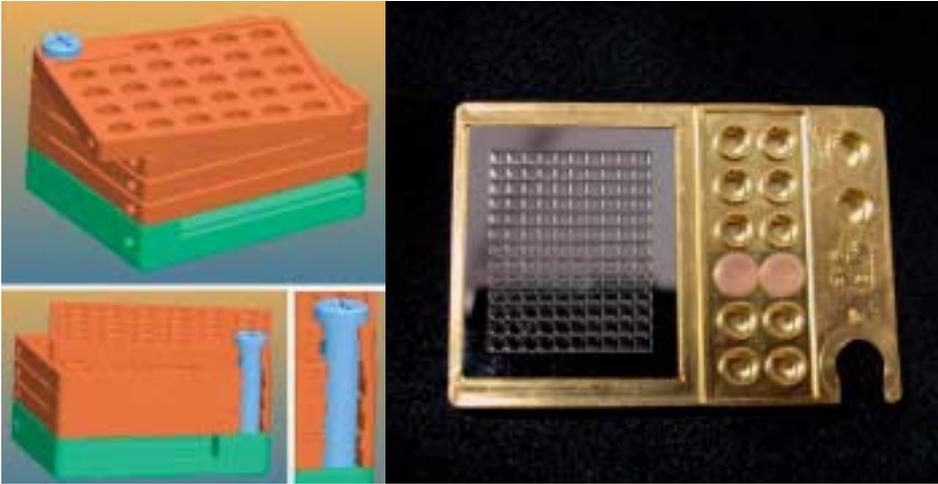
Zur Demonstration der technologischen Entwicklungen, zur Anlage von Kryoprobensammlungen aus allen Bereichen der Forschung und Wirtschaft sowie zur Automatisierung, wie sie in Kryogroßbanken erforderlich sein wird, wurde eine der größten Forschungskryobanken in Sulzbach im Saarland gebaut. In ihr können seit Mitte 2003 auf einer Fläche von mehr als 1 200 m<sup>2</sup> bis zu 150 Kryobehälter eines Fassungsvermögens von jeweils 1 400 l installiert und der Betrieb nach modernsten Lagerkriterien demonstriert werden. In verschiedene Kryobankabschnitte unterteilt, bietet die Demonstrationsbank Raum für die Anlage verschiedener Teilbankbereiche,



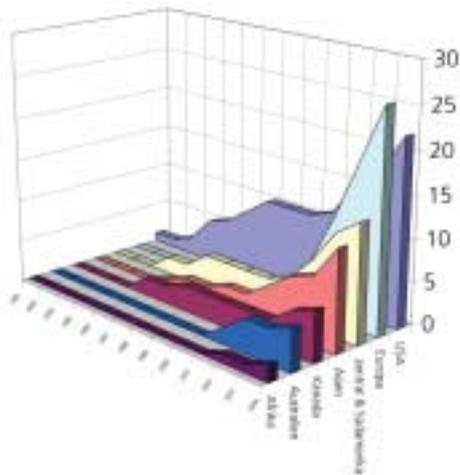
Zelle des Immunsystems auf einem Substrat adhärert, wie sie für die Zelltherapien der zukünftigen Medizin vorrätig gehalten werden müssen (Foto H. Zimmermann & A. Katsen-Globa).

von einer Hochsicherheitsbank bis zu Kleinbanken, wie sie in biologischen Laboren und kleineren medizinischen Einrichtungen auftreten und benötigt werden.

Am Fraunhofer IBMT werden Kryobanken nach Vorgabe der Kunden und Bestimmung entworfen und mit den Auftraggebern realisiert, die für alle Belange der Biotechnologie und Medizin geeignet sind. Eine weltweite Gründungswelle von Kryobanken unterschiedlichster Bestimmung ist zu erkennen und bestätigt die eingeschlagene Forschungs- und Entwicklungsstrategie bereits.



Drehstapel-Hybridssystem aus Silizium und beschichtetem Polyethylen für die miniaturisierte Kryokonservierung zur Ablage einzelner bis zu einigen tausend Zellen pro Well.



Zahl der registrierten kommerziellen Nabelschnurblutbanken seit 1992.  
(Quelle: <http://www.parentsguidecordblood.com>)

Das vorliegende Heft dient der Information und Verbreitung der Kryotechnologie, wie sie in der Fraunhofer-Gesellschaft am IBMT in St. Ingbert und Sulzbach entwickelt wird und nunmehr für wissenschaftliche, öffentliche und industrielle Nutzer zur Verfügung steht. Potenziellen Anwendern und Forschungspartnern wollen wir in stark zusammengefasster Form den Stand und die Perspektiven, in jedem Fall aber die Bedeutung und Möglichkeiten der Kryobiotechnologie vor Augen führen. Wir würden uns freuen, wenn Sie Kontakt zu unserer Einrichtung aufnehmen würden und stehen mit Experten zur Lösung Ihrer Probleme zur Verfügung.

Prof. Dr. Günter R. Fuhr  
Direktor

# Kryotechnologie am IBMT – Neue technologische Lösungen für die Kryokonservierung in der Biotechnologie und Medizin

Am Standort Sulzbach, Industriestraße 5, einem Teil des Fraunhofer-Instituts für Biomedizinische Technik (IBMT), wurde am 9. September 2003 durch den Ministerpräsidenten des Saarlandes, Herrn Peter Müller, den Präsidenten der Fraunhofer-Gesellschaft, Herrn Professor Hans-Jörg Bullinger, im Beisein des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft und Forschung auf Initiative des Wirtschaftsministeriums des Saarlandes und der Fraunhofer-Gesellschaft die Kryoforschungsbank mit angegliedertem Zentrum für Kryobiotechnologie (**eurocryoSaar**) in Betrieb genommen. An diesem Industriestandort soll in den nächsten Jahren ein neuer Zweig der Biotechnologie etabliert werden, der als Tieftemperaturbiotechnologie bezeichnet werden kann.

Geplant und errichtet wurde eine der modernsten Kryobanken für biologische, landwirtschaftliche und medizinische Proben, wie Zellsuspensionen, Einzelzellen und Gewebeprobe, humanen, tierischen sowie pflanzlichen und bakteriellen Ursprungs, verknüpft mit einer für diese Zwecke neuartigen Datenbank, flankiert durch modernste Laboratorien, in denen neue Techniken und Verfahren der molekularen und zellulären Kryokonservierung entwickelt, erprobt und industriell umgesetzt werden. Das Forschungsvorhaben entspricht nicht nur dem wissenschaftspolitischen Auftrag der Fraunhofer-Gesellschaft, neue Technologiefelder vorzubereiten und industriell nutzbar zu machen, sondern auch dem Bestreben der Saarländischen Regierung, die Biotechnologie und in deren Folge eine ortsansässige Biotechnologieindustrie zu befördern.

Die Frage, wozu diese Technologien benötigt werden, lässt sich folgendermaßen beantworten: Zum einen laufen alle Lebensprozesse unaufhaltbar auf molekularer und zellulärer Ebene ab. Alles verändert sich im biologischen System und altert dabei. Eine Grundvoraussetzung für eine robuste und industriell umsetzbare Biotechnologie wird deshalb die Entwicklung von Prinzipien sein, die geeignet sind, diese Vorgänge befristet und kontrolliert anzuhalten, d.h. die Zwischenlagerung und massenhafte Verfügbarkeit von lebenden Zellen der unterschiedlichsten Herkunft, als auch die Fixierung künstlich und natürlich eingestellter Zellzustände zu ermöglichen. Zum anderen greift der Mensch mit der Erforschung des eigenen Genoms, über molekularbiologische Pharmaentwicklungen, die zelluläre Medizin und die Biotechnologie in völlig neuartiger Weise in die Natur ein, deren Bestandteil er selbst ist. Eine der Grundregeln muss deshalb lauten, von allem, bevor es verändert wird, eine Sicherheitskopie abzulegen, damit später durch uns oder nachfolgende Generationen retrospektiv nachvollzogen werden kann, worin die Ursprünge bestanden und was in welchen Schritten verändert wurde. Es ist deshalb ein Gebot der Logik und eine Pflicht gegenüber der Gesellschaft, frühzeitig Referenzbanken und Master-Zellbanken für alle Bereiche der Lebenswissenschaften anzulegen.

Des Weiteren wird die Medizin der nächsten Dekaden und der Zukunft mit hoher Wahrscheinlichkeit nach Prinzipien heilen, wie wir sie vom intakten Immunsystem bereits heute kennen, d.h. über makromolekulare Wechselwirkungen und spezifische, hochgenau agierende Zellen. Es erscheint realistisch, Tumore in Zukunft durch speziell modifizierte, im günstigsten Fall körpereigene Zellen zu bekämpfen und physiologisch abzubauen. Es könnte deshalb in Kürze der Fall sein, dass viele Bürger unseres Lan-



Klassisches Kryoröhrchen für Zellsuspensionen (etwa Originalgröße).

des auf freiwilliger Basis einmalig oder regelmäßig körpereigene Zellen hinterlegen wollen, auf die zu gegebener Zeit auch im Rahmen eines Generationenvertrages, in 10, 20, 40 oder gar 80 Jahren, zurückgegriffen werden kann und mit denen eine medizinische Behandlung erfolgt, von der wir heute noch keine vollständige Vorstellung entwickeln können.

Die einzige Technologie, die sofort Lösungen für die genannten Felder anbietet, ist die Kryokonservierung. Dieses in seinen Grundprinzipien entwickelte Gebiet der Zellaufbewahrung ist bereits Bestandteil sehr vieler medizinischer, biotechnologischer und pharmazeutischer Einrichtungen, jedoch technisch, logistisch und kapazitiv nicht für den massenhaften Probenanfall gerüstet. Betrachtet man beispielhaft einmal nur den diagnostisch-therapeutischen Teil der Medizin und nimmt an, dass jeder fünfte Bürger Deutschlands ein Zelldepot aus 50 Einzelproben einer Größe von wenigen Kubikmillimetern für die Zukunft anlegen möchte, so entspricht das bei 80 Millionen Deutschen einer Menge von 800 Millionen Proben.

Zurzeit erfolgt die Probenablage in 2 bis 10 cm langen Plastikröhrchen oder -beuteln, die in 1 bis 2 m großen Kryobehältern gelagert werden. Wollte man 800 Millionen Proben im Zeitraum von 5 Jahren ablegen (und das ist wahrscheinlich noch niedrig gegriffen), so benötigte man bei Beibehaltung der Plastikröhrchentechnik eine Lagerfläche von mehreren Quadratkilometern und auf dieser einige Tausend

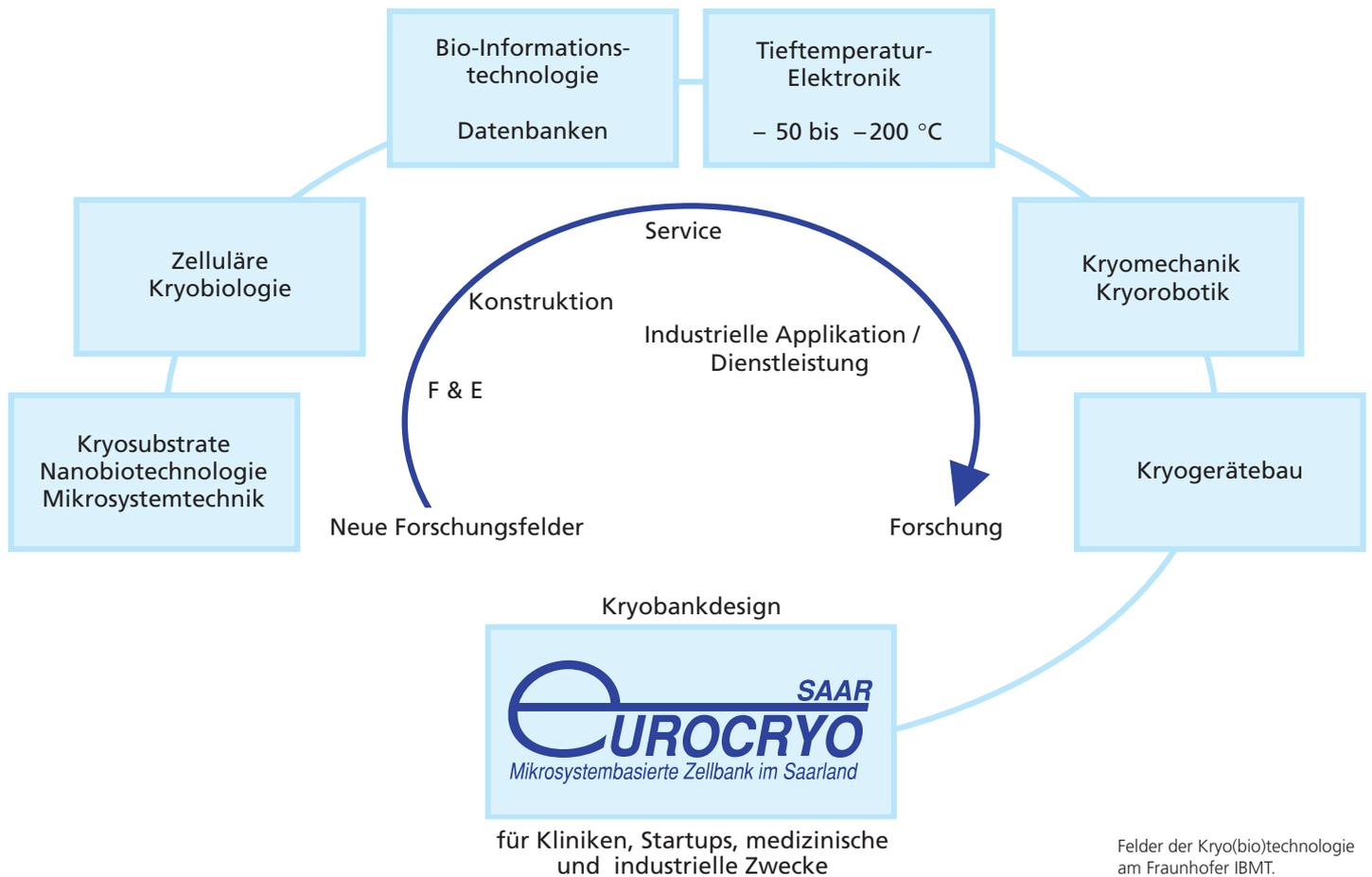
etwa 2 m hohe Kryobehälter, die mit flüssigem Stickstoff als Kühlmittel permanent zu versorgen wären, was weder technisch noch finanziell umsetzbar ist. Zu rechnen ist mit noch 10- bis 100-mal höheren Probenzahlen, da hier nur die medizinische Anwendung und nicht die Proben der Biotechnologie- und Pharmaindustrie, Veterinärmedizin, Landwirtschaft und des Lebensmittelbereiches berücksichtigt wurden.

Es ist also unabdingbar, neue Wege und Lösungen der Kryolagerhaltung zu suchen und kurzfristig umzusetzen. Einer der Ansätze des Fraunhofer-Instituts für Biomedizinische Technik basiert auf der Miniaturisierung, da sich die Frage stellt, ob die Proben wirklich im Milliliter-Bereich liegen müssen. Wenn man berücksichtigt, dass für genetische Nachweise bereits heute einige hundert, in bestimmten Fällen nur eine einzige Zelle genügt und später die Zahl der Zellen über In-vitro-Vermehrung ohnehin expandiert werden muss, benötigt man die großen Volumina für viele Anwendungen nicht.

Für die gleiche Probenmenge, für die gerade noch eine quadratkilometergroße Fläche benötigt wurde, reicht bei reduzierter Probengröße eine Halle von 30 m x 50 m aus, wie sie am Standort Sulzbach zur Verfügung steht. Mehr noch, in Zukunft werden, wie bereits erläutert, für viele Zwecke (z.B. der Analytik oder Diagnostik) nur wenige Zellen erforderlich sein. In langjähriger Vorarbeit hat das Fraunhofer IBMT die notwendigen Basistechnologien nunmehr entwickelt und zum Patent angemeldet, so dass mit der Umsetzung in industriellem Maßstab und einer Nutzung für die Forschung, den Verbraucher- und Umweltschutz sowie die Medizin begonnen werden kann.

Die Ablage von Proben mittels neuer Kryotechnologien ist es jedoch nicht allein, die am Standort Sulzbach erfolgt. Im tiefgekühlten Zustand lässt sich mit den Zellen noch weitaus mehr anfangen. Sie sind zu Festkörpern erstarrt und als solche in vieler Hinsicht robuster als Zellen bei Normaltemperatur. Sie lassen sich auch bei Temperaturen weit unter dem Gefrierpunkt mit vielen gängigen Verfahren vermessen, sortieren und hochpräzise manipulieren. Genau das konnte in einem bereits abgeschlossenen Forschungsprojekt des Bundesministeriums für Bildung und Forschung von Wissenschaftlern und Technikern des IBMT belegt werden.

Was für die weitere Entwicklung dieses neuen Biotechnologiezweiges benötigt wird, ist vor allem Technologieerfahrung, wie sie in der Fraunhofer-Gesellschaft und insbesondere im Bereich der Life Sciences am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik vorliegt. Hervorzuheben ist gleichermaßen die Mikrosystemtechnik-Kompetenz und der Einstieg in die Nanobiotechnologie am IBMT. Des Weiteren ist eine hochkarätige Bioinformatik erforderlich, um die Fülle der Daten effektiv und sicher zu verwalten, und deren wissenschaftliche Inhalte rasch und kontrolliert weltweit über Jahrzehnte lesbar und verfügbar zu machen. Auch auf diesem Gebiet ist das Saarland inzwischen auf dem besten Weg in Deutschland und international eine führende Position einzunehmen. Hinzu kommt die medizinische Anbindung und Relevanz der Forschung, die ebenfalls in hervorragender Ausprägung am Universitätsstandort Homburg vertreten ist. Flankiert wird dies von einem sehr aufgeschlossenen interdisziplinären Feld der Ingenieurwissenschaften, Humanbiologie, Chemie, Physik, Mathematik und Pharmazie an den universitären und außeruniversitären Forschungseinrichtungen der Saar-Lor-Lux-Region. Nicht zuletzt wird ein entwicklungsfähiger Standort



Felder der Kryo(bio)technologie am Fraunhofer IBMT.

benötigt, der schrittweise ausgebaut werden kann. Diese Randbedingungen erfüllt das Saarland und Sulzbach/St. Ingbert mit einem Industriegelände und der Möglichkeit der Ausgründung und Ansiedlung von Start-up-Firmen in bestmöglicher Ausprägung.

Das Feld der visionär entwickelten Kryobiotechnologie basiert auf den langjährigen Erfahrungen des Fraunhofer IBMT im biomedizinischen Bereich sowie der breit gefächerten Grundlagen- und Anwendungsforschung in den Biowissenschaften. Das Saarland und die Fraunhofer-Gesellschaft nutzen mit der Gründung der Kryoforschungsbank **eurocryoSaar** die Chance, dieses international noch nicht besetzte Forschungs- und Wirtschaftsfeld frühzeitig zu gestalten. Ein Forschungsvorhaben dieser Größe und

Ausrichtung kann von der Fraunhofer-Gesellschaft nicht allein, sondern nur in enger Abstimmung mit einem Bundesland und auf Bundesebene initiiert werden. Das IBMT steht in engem Kontakt zu den Instituten des Life Science-Verbundes der Fraunhofer-Gesellschaft, insbesondere zum Fraunhofer IME mit langjährigen Erfahrungen mit der Umweltbundesbank in Schmallenberg, die ebenfalls eine Kryobank moderner Ausprägung ist.

Die Gründung der »Kryoforschungsbank mit geschlossenem Zentrum für Kryobiotechnologie« **eurocryoSaar** ist somit der Grundstock und der Beginn für eine weitere saarlandspezifische Initiative im Feld der Bio- und Ingenieurwissenschaften.

# Grundlagenforschung zur Kryokonservierung – Von der Kryobiologie zur Kryotechnologie



Bärtierchen im Mikroskop.



Bärtierchen (*Tardigradus spec.*). Oben: von der Seite, Länge: 0,9 mm; Unten eingekreist: Dauerform, Länge: 0,3 mm, (sog. Tönnchenstadium) kann große Hitze sowie Kälte ohne Zugabe von Kryoprotektiva überstehen (Fotos: Dr. T. Fixemer, IBMT).

Die Natur bietet für viele Fragestellungen der Kryotechnologie unterschiedliche Lösungsansätze. So zeigt die Evolution mehrere Möglichkeiten der Natur, das Leben auch unter ungünstigen Umständen aufrecht zu erhalten und sogar zur Vermehrung zu bringen. Überlebensstrategien wurden von einer Vielzahl von Organismen entwickelt, um langen Kälteperioden oder extremer Hitze widerstehen zu können. Der kryobiologische Rekord wird bislang von Bakterien gehalten. Diese Einzeller können nicht nur unter extremen Bedingungen leben, nahezu vollständig austrocknen, sondern auch aus dem Zustand des Tiefgefrorenenseins wieder zum Leben erwachen. In Sibirien fanden Wissenschaftler viele Meter unter der Erdoberfläche Bakterien, die in einem mindestens drei Millionen Jahre währenden Permafrosthorizont von  $-10\text{ °C}$  eingefroren gewesen sein sollen. Nach einigen Stunden in der Wärme (ca.  $37\text{ °C}$ ) sollen sie sich wieder geteilt und vermehrt haben.

Das Problem für Bewohner extrem kalter Habitate besteht darin, dass Lebewesen zum Großteil aus Wasser bestehen, das bei Kälte zu Kristallen gefriert, die irreparable Entmischungen und Zerstörungen im Zellinneren anrichten (vgl. Kapitel Molekulare Prozesse beim Einfrieren von Zellen). Während daher Säugetiere im Hochgebirge nur mit dichtem Winterfell, d.h. thermisch gut isoliert überleben, springt der Gletscherfloh agil im Innern von Schnee- und Eismassen umher. Das nur gerade 1,5 mm große Urinsekt ist perfekt an seinen extremen Lebensraum angepasst. Seine Körperflüssigkeit enthält diverse Zuckerarten, die den Gefrierpunkt erniedrigen und Vorbilder für die Gefrierschutzmittel der Kryobiologie abgeben. Bei starker Kälte wird außerdem der Magen entleert, damit sich an den Feststoffen kein Eiskristallwachstum einstellen kann. Spezielle Proteine vervollkommen seine Kälteanpassung, indem entstehende Eiskristallkeime sofort molekular eingepackt werden und somit das Kristallwachstum gestoppt bzw. gesteuert wird. Mit diesen Schutzmechanismen ist es dem Gletscherfloh möglich, unterhalb seiner Vorzugstemperatur von ca.  $0\text{ °C}$ , Temperaturen bis zu  $-16\text{ °C}$  in aktivem Zustand zu überdauern; in Ausnahmefällen und bei langsamer Anpassung überlebt er sogar Temperaturen bis unter  $-25\text{ °C}$ .

Eine völlig andere Strategie hat die Puppe des Schwalbenschwanzes, einer auch in Mitteleuropa beheimateten Schmetterlingsart, realisiert. Dank des klassischen Frostschutzmittels Glycerin übersteht sie in eingefrorenem Zustand Temperaturen bis zu  $-30\text{ °C}$ . Der Schutzeffekt des dreiwertigen Alkohols Glycerin beruht auf der Tatsache, dass Eiskristalle, die in hohen Glycerinkonzentrationen wachsen, kleiner und in der Form günstiger für Zellen sind, so dass Zytoplasmastrukturen nicht zerstört werden. Neben Glycerin und den »Icenucleating-Proteins« nutzen einige Tiere auch die oben erwähnten

Zuckerverbindungen wie Trehalose, Glukose und Fruktose, um das Einfrieren zu steuern und die Form der entstehenden Eiskristalle zu beeinflussen. Gerade die im Mittel 0,3 bis 1 mm langen moosbewohnenden Bärtierchen (wiss. Name Tardigradus = Langsamgeher, engl. water bear) ersetzen das Wasser im Körperinneren durch Trehalose, so dass der Feuchtigkeitsgehalt auf bis zu 2% gesenkt werden kann. In diesem ausgetrockneten Zustand können die Tiere jahrelang Hitze- und Kälteperioden überstehen.

Fische in der Antarktis schützen sich ähnlich wie die bereits beschriebenen Frösche Alaskas vor der Kälte mit zuckerhaltigen Glycoproteinen, die die Eisbildung in den Zellen verhindern. Wie die meisten gefriertoleranten Tiere senken auch die Fische während des Eingefrorenseins ihren Stoffwechsel radikal ab. Herz und Kreislauf stehen im Extremfall sogar ganz still, nur innerhalb der Gewebe wird ein schwacher Stoffwechsel mit Hilfe von Stärke-reserven aufrechterhalten. Auf diese Weise können sie tiefgekühlt Temperaturen bis  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  schadlos überstehen, die nordamerikanische Gallmücke *Eurosta solidaginis* sogar bis  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  bei 65% gefrorener Körperflüssigkeit. Ganz gefrieren können all diese Tiere, wie bereits ausgeführt, lebend jedoch nicht.

Bei einigen eisbewohnenden Kieselalgen fand man heraus, dass die Algenzellen eine 50-mal höhere Konzentration an bestimmten Aminosäuren enthalten, als es normalerweise der Fall ist. Diese Moleküle schützen ebenfalls die Zellstrukturen und fungieren als Frostschutzmittel. In anderen Organismen übernehmen anorganische Ionen diese Funktion.



Frühe embryonale Zellstadien, wie sie in der Reproduktionsmedizin als Embryonen bezeichnet werden. Es handelt sich dabei nicht um ausdifferenziertes Gewebe oder Föten mit einem Blutkreislauf und einem ausgebildeten Nervensystem. Letztere lassen sich bislang nicht kryokonservieren.

(Foto mit freundlicher Genehmigung: Dr. Jan Meyer ([www.meyweb.ch/froschnetz/](http://www.meyweb.ch/froschnetz/)))

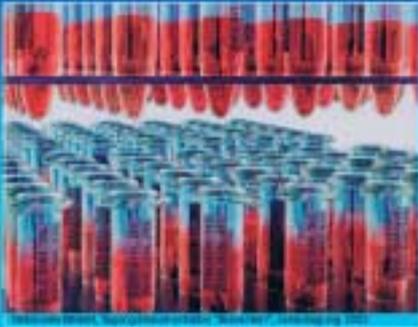
Die Abbildungen zeigen die frühen Entwicklungsstadien eines Froschembryos: 1 = eine befruchtete Eizelle; 2 = Zweizellstadium; 4 = Vierzellstadium; 8 = Achtzellstadium; 16 = 16-Zellstadium; 8 000-16 000 Zellstadium = Blastula; Neur. = Neurulation - Entstehung der Neuralleiste.

Neben den niedrigen Temperaturen stellt ein hoher Salzgehalt harte Anforderungen an Bewohner des Meereises. Das Meereis selbst hat einen geringeren Salzgehalt als das Meerwasser, da es beim Gefrieren aussüßt. Die aktiven eisbewohnenden Organismen halten sich in den wenige Millimeter großen Laugenkanälen des Eises auf, in denen die Salzkonzentrationen ungleich höher sind. Enthält Meerwasser bis zu 39 Promille Salz, so beträgt der Salzgehalt in den Kanälen bis zu 70 Promille, wenn die Temperaturen sehr niedrig sind, sogar bis zu 150 Promille. Die Eisorganismen müssen also bis zu viermal mehr Salz als im Meerwasser tolerieren. Dazu erhöhen sie das osmotische Potenzial ihrer Zellen zur Vermeidung einer massiven Dehydrierung.

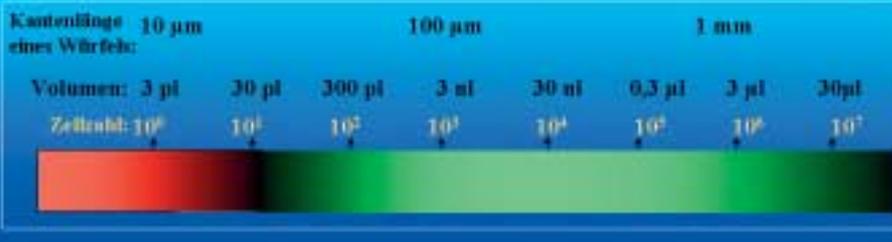
All diese Varianten der Natur werden in der In-vitro-Kryotechnologie seit langem kopiert und modifiziert. Nach der revolutionierenden Entdeckung der Gefrierschutzeigenschaften des Glycerins vor über 50 Jahren (POLGE et al. 1949), versuchten Wissenschaftler mit

tiefgefrorenem Spermia von Bullen oder anderen Nutztieren vergleichbare Fruchtbarkeitsresultate zu erzielen, wie man sie bei den Befruchtungen mit frisch übertragenem Spermia erhält. Heute wird die Kryokonservierung von Spermia und/oder Embryonen im Rahmen des Embryotransfers in der Rinderzucht routinemäßig angewendet. 1998 wurden bereits mehr als 50% aller gewonnenen Rinderembryonen (darunter sind nicht Feten zu verstehen, sondern aus einer oder wenigen Zellen bestehende Frühformen des Embryos) nach Tiefgefrierkonservierung übertragen (THIBIER 1999). Ziel der Kryokonservierung ist dabei die unbefristete Lagerung der Embryonen, ohne die Entwicklungsfähigkeit nach dem Auftauen zu beeinträchtigen. Besonders kritische Phasen für das Überleben der Einzell- oder Mehrzell-Embryonen sind das Einfrieren und das Auftauen mit dem anschließenden Auswaschen des Gefrierschutzmittels.

## Problem gegenwärtig genutzter Kryoröhrchen



- zu großes Volumen
- Temperaturgradienten
- keine Teilentnahme möglich
- hohe Gefrierschutzmittelkonzentration
- geringe Automatisierung



Bereits 1953 gelang die erste Schwangerschaft einer Frau nach einer Befruchtung mit kryokonserviertem Spermia. Vergleichsweise einfach stellt sich heute die Konservierung der relativ widerstandsfähigen Spermien dar. Die Protokolle, nach denen Reproduktionszentren beim Konservieren von Spermia derzeit arbeiten, weichen nur noch in Details voneinander ab - etwa darin, welches Gefrierschutzmittel man dem Ejakulat hinzugibt und wie schnell mit flüssigem Stickstoff auf unter  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und später wieder aufgetaut wird. Mit der sorgfältig getesteten Gefrierflüssigkeit ist die Kryokonservierung eine sehr erfolgreiche Alternative für Menschen, deren Fruchtbarkeit gefährdet ist.

Im Jahre 1971 gelang die erste erfolgreiche Kryokonservierung von Mäuseembryonen (WHITTINGHAM 1971), und zwei Jahre später wurde das erste lebende Kalb nach Transfer eines tiefgefrorenen Rinderembryos geboren (WILMUT u. ROWSON 1973). Von einer praktischen Anwendung war man zu diesem Zeitpunkt jedoch noch weit entfernt. Viele grundlegende Arbeiten zur Kryokonservierung von Mäuseembryonen haben in der Zwischenzeit wichtige Hinweise zur Entwicklung eines praxisnahen Tiefgefrierverfahrens geliefert (WHITTINGHAM 1980).

Fast 25 Jahre nach der Geburt des ersten Retortenbabys, Louise Brown, am 25. Juli 1978 in Oldham sind solche Behandlungen reine Routine. Allein in der Schweiz wurden seit 1993, der Einführung einer genauen Erfassung durch das Nationale Register FIVNAT-CH, rund 3 000 Kinder mit Hilfe der Reproduktionsmedizin geboren.

Die Idee, Zellen und Gewebe vorsorglich aufzubewahren, ist nicht neu. Bereits 1975 begann Kurt Benirschke, Wissenschaftler und heutiger Vize-Präsident des San Diego Zoos, eine DNA-Bank mit Gewebeprobe vom Aussterben bedrohter Tiere anzulegen. »Ich möchte die internationale Gemeinschaft liebend gerne dazu anregen, so viele Zellen wie möglich von so vielen Tieren wie möglich zu sichern«, erklärt Benirschke begeistert. Mit über 4 300 Zelllinien verschiedener Individuen, die von 370 Arten und Unterarten vorwiegend vom Aussterben bedrohter Tiere stammen, unterhält Benirschkes Team am Center for Reproduction of Endangered Species (CRES) des San Diego Zoos die weltweit größte DNA-Bank dieser Art, inzwischen eine wertvolle Bioressource. Durch die Ablage von Stammzellen, ggf. adulte und embryonale, lässt sich der Wert dieser Ablagen durch die Depothaltung von Lebendmaterial noch weiter erhöhen. Gemeinsam mit dem Neunkircher Zoo-park wird am Fraunhofer IBMT gegenwärtig eine derartige Pilotsammlung von Stammzellen seltener Tierarten angelegt.

1984 wurde zum ersten Mal in Australien ein gesundes Mädchen geboren, das aus einem tiefgefrorenen Embryo entstand. Viele Länder erlauben seitdem die so genannte Kryokonservierung in frühen Embryonalstadien nach einer In-vitro-Fertilisation (IVF). Der Vorteil: Bleibt der erste Versuch einer Schwangerschaft erfolglos, können die Frauen in der Folge auf tiefgefrorene Embryonen zurückgreifen, was die Prozedur erheblich vereinfacht - und die Kosten der Behandlung senkt. Überall auf der Welt kommt heute keines der Zentren, in denen die IVF angeboten wird, ohne »Kühltruhe« und ohne flüssigen Stickstoff aus. Der Reproduktionsmediziner Martin Birkhäuser vom Inselspital in Bern: »Ohne Kryokonservierung wäre die IVF zwar denkbar, aber die Erfolgsaussichten wären schlechter«. Dies dürfte für viele Berei-

che der zukünftigen Biotechnologie und Medizin zutreffen.

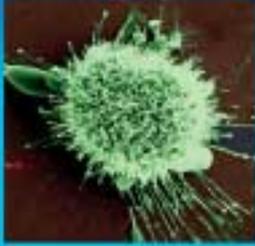
Nach dem Embryonenschutzgesetz dürfen allerdings auch in der Schweiz wie in Deutschland keine menschlichen Embryonen mehr tiefgefroren aufbewahrt werden. Gesetzlich erlaubt ist lediglich die Kryokonservierung von befruchteten Eizellen im Vorkernstadium. Die Samenzelle ist in diesem Stadium zwar schon in die Eizelle eingedrungen, das Erbgut beider Keimzellen jedoch noch nicht miteinander verschmolzen.

Ein Ausweg liegt im Lagern von unbefruchteten Eizellen. Leider überleben unbefruchtete Eizellen eine Kryokonservierung bisher nur schlecht. Insgesamt gelang es bis 1998 weltweit nur achtmal, Schwangerschaften mit solchen Eizellen zu erzielen - vier davon endeten mit vorzeitigem Abort. Das Risiko, dass die Kinder Missbildungen aufweisen, ist zzt. noch hoch. Als einziges Zentrum in der Schweiz bietet das Züricher Universitätsspital an, von Frauen Gewebeproben der Eierstöcke einzufrieren. Damit aus dem kryokonservierten Gewebe reife Eizellen entstehen, muss es der behandelten Frau erneut rücktransplantiert werden. Frauen, denen wegen einer Operation, einer Chemo- oder Strahlentherapie der Verlust der Fruchtbarkeit droht, sollen so in Zukunft die Option erhalten, sich später dennoch einen Kinderwunsch erfüllen zu können.

Doch die Transplantation von gespendeten Eierstöcken gilt nur als erster Schritt: Das Ziel der Mediziner ist die Lebendkonservierung von Eizellen im Gewebeverband. Weltweit forschen Wissenschaftler, wie sie Eierstöcke schützen, aufbewahren oder ersetzen können. Besonders junge Krebspatientinnen, deren Eierstöcke als Nebenwir-

## Neue Kryolösungen und Prozeduren:

### Warum Proben einfrieren und nicht nur Daten sammeln?



Die Kryokonservierung lebender Zellen ist hochredundant und die einzige Möglichkeit der vollständigen Ablage der biologischen Information (Genom, Proteom ...) einer Zelllinie oder eines Organismus. Die Speicherdichte der Daten ist deutlich höher als die bislang technisch in elektronischen Chips erreichbare.



**Weitere Vorteile:**

- retrospektive Analyse möglich
- Reanimation und Vermehrung
- unverändertes lebendes Material
- Bioressourcen der Zukunft
- Back up der Umwelt

10 000 Zellen in 1/8 mm<sup>3</sup>  
10 000-fach redundante Informationsablage

kung einer Chemotherapie oder Bestrahlung geschädigt oder zerstört wurden, könnten davon profitieren.

Der Kryobiologie, der Wissenschaft vom Verhalten der Lebewesen und ihrer Bestandteile bei niedrigen Temperaturen, ist es zu verdanken, dass wir heute den Prozess der Kryokonservierung soweit kontrollieren können, dass einerseits der Schaden, den die Zellen erleiden, auf ein Minimum beschränkt bleibt, und andererseits die Wiederverwendbarkeit stark verbessert ist. Als obligat hat sich der Temperaturbereich unter  $-130\text{ °C}$  herausgestellt. Eine Langzeitlagerung bei ca.  $-150\text{ °C}$  in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs scheint nach heutigem Ermessen sicher. Auch direkt im flüssigen Stickstoff ( $\text{LN}_2$ ) können Proben in vollständiger Umhüllung abgelegt werden, wie einige Nabelschnurblutbanken zeigen.

Doch vieles ist empirischer Natur und nur bedingt als optimiert zu betrachten. Mehr und mehr entwickelt sich die Kryobiophysik zu einer eigenständigen wissenschaftlichen Disziplin, die systematisch die Prozesse der Abkühlung und Erwärmung erforscht.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse versucht man seit einiger Zeit nicht nur Zellen oder Zellsuspensionen, sondern auch ganze Organe einzufrieren, um sie bei Bedarf für Transplantationen verwenden zu können. Es wurden bereits Experimente mit Rattenlebern durchgeführt, die man mit dem Antifrostprotein der Fische und Glycerol behandelte und die nach dem Auftauen und Auswaschen noch wesentliche Elemente der natürlichen Funktion aufwiesen. Jetzt sollen sie in Ratten transplantiert werden. Knochen, Sehnen, Bänder oder Haut, gewonnen aus Gewebespenden, bilden die Grundlage für »Reparaturarbeiten«, die Leben erhalten und Defekte beseitigen sollen. Tumorpatienten, an denen beispielsweise Amputationen vorgenommen werden mussten, könnte mit biologi-

schen Transplantaten viel besser und nachhaltiger geholfen werden, als dies synthetische Hilfsmittel je vermögen. Bisher gelingt die reversible Kryokonservierung von Organen, ja selbst größerer Gewebestücke, noch nicht.

In letzter Zeit sind Blutstammzellen (und Knochenmarkstammzellen) in den Blickpunkt der Kryokonservierung gerückt, da diese sich ohne Gefrierlagerung nicht länger als ein paar Stunden oder Tage lagern lassen bzw. unter aufwendigen Bedingungen und nicht immer erfolgreich permanent kultiviert werden müssten. Gegenwärtig werden diese sehr seltenen Zellen in Teflonbeuteln, die verschweißt und dann tiefgekühlt werden, abgelegt. Die beste Lagerung wird wiederum bei ca.  $-150\text{ °C}$  in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs oder direkt in der Flüssigphase erreicht. Auch hierbei wird den Zellen ein Gefrierschutzmittel zugegeben.

Nach Jahrzehnten im Kryotank sind Zellsuspensionen und Einzelzellen bzw. Stammzellen aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen noch lebensfähig. Die Zellen beginnen sich nach dem Auftauen zu vermehren und können auch in Versuchstieren funktionell eingebaut werden. Daher sind kryokonservierte Zellen vermutlich auch klinisch nutzbar. Mit den im Nabelschnurblut enthaltenen Stammzellen sollen künftig Tumoren und Immunschwächekrankheiten behandelt, ggf. sogar Gewebe regeneriert werden. Inwieweit die Kryoprotokolle diesbezüglich nochmals geprüft und optimiert werden müssen, ist bisher offen und ein Forschungsfeld der nächsten Jahre auch am IBMT. Dies alles erfordert effektive und auf die biologischen Objekte abgestimmte Gerätesysteme und Verfahren.

Die große Zeit der Kryotechnologie steht daher noch vor uns. Die aufstrebende Biotechnologie in Kombination mit der zellbasierten Medizin wird in großem Umfang und hochparallel die Ablage von Proben erfordern. Bedenkt man, dass mehr als 100 000 tierische oder menschliche Zellen in einem Lösungstropfen von nur einem Millimeter Durchmesser Platz haben, so bietet sich angesichts der immer empfindlicher werdenden Analysetechniken eine hochgradige Miniaturisierung der Kryosubstrate an. Den neuen Anforderungen wird man nur entsprechen können, wenn dabei ein hohes Maß an Standardisierung und Automatisierung der Probengewinnung, des Einfrierens, Ablagerns und der Probenhandhabung erreicht wird.

Nicht alle Zellen lassen sich gleichermaßen gut einfrieren und die bislang unvermeidlichen Kryoprotektiva müssen zumindest reduziert werden. Es erstaunt schon, dass seit Jahrzehnten nahezu kein Fortschritt bei der Suche nach biokompatiblen und medizinisch unkritischen Gefrierschutzmitteln zu verzeichnen ist. Dies alles sind Felder der Kryoforschung, wie sie am Fraunhofer IBMT seit nunmehr vier Jahren im Zentrum für Kryobiotechnologie und in der Abteilung Kryobiophysik & Kryotechnologie bearbeitet werden.

## Anwendungsfelder der Kryotechnologie – Beispiel regenerative Medizin



Entwicklung eines »organoiden Gewebekörpers« (dunkler Bereich im Zentrum) aus Stammzellen einer adhärennten In-vitro-Kultur, die aus dem exokrinen Gewebe des Pankreas eines Patienten isoliert wurden.

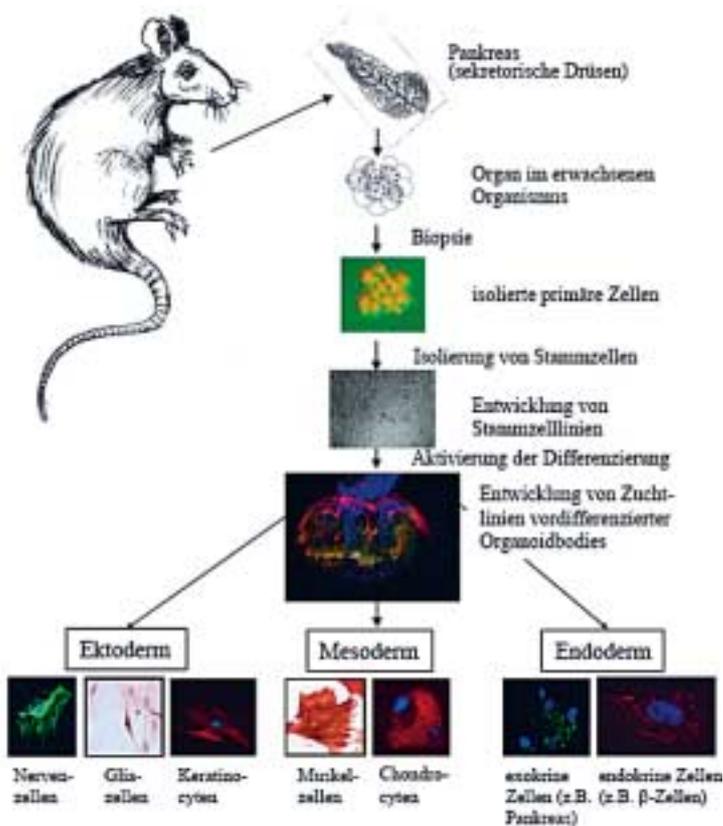
Stammzellen, aber auch Vorläuferzellen gehören wegen ihres enormen Entwicklungspotenzials zu den Hoffnungsträgern in der Medizin. Insbesondere die autologen, aber auch allogenen Zelltherapien sind hierbei von besonderem Interesse. Sie versprechen patientenverträgliche und sehr spezifische Behandlungen bei einer Vielzahl von Erkrankungen, da die Zellen bei der autologen Verabreichung genau aus dem Patienten stammen, in den sie auch wieder implantiert werden.

Man unterscheidet embryonale und adulte Stammzellen, d.h. die Quelle der Stammzellen ist entweder eines der frühen embryonalen Entwicklungsstadien oder der jugendliche bzw. adulte Organismus. Derartige Stammzellen sind weitgehend oder vollständig undifferenziert und können sich in einige, eine Vielzahl oder bei totipotenten Stammzellen in alle der etwa 220 verschiedenen Zelltypen entwickeln, aus denen der Mensch und die höheren Tiere bestehen. Die Zahl der aus dem Organismus gewinnbaren

Stammzellen ist in der Regel (bis auf wenige Ausnahmen) zu gering für eine Charakterisierung, Veränderung und Rückführung der Zellen im Rahmen einer Behandlung. Es werden daher seit Jahren In-vitro-Verfahren getestet, die zur möglichst unbegrenzten Vermehrung der Stammzellen auf und in Nährmedien geeignet sind. Des Weiteren ist die gezielte Differenzierung der Stammzellen eine Grundvoraussetzung zur geordneten Erneuerung von defektem oder gealtertem Gewebe, wie es das Ziel der regenerativen Medizin ist. Hierzu sind bisher weit mehr als 100 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren bekannt und in der Erprobung. Bisher differenzieren die adulten Stammzellen noch nicht in der Weise, z.B. zu Herzmuskel-, Nerven- oder Bauchspeicheldrüsenzellen, wie dies bei embryonalen Stammzellen der Fall und während der Embryogenese gut nachvollziehbar ist. Dennoch werden ständig neue Erkenntnisse bekannt, die zeigen, dass das Potenzial der adulten Stammzellen größer ist, als bisher angenommen wurde.

Die Medizin sieht derzeit drei Möglichkeiten Stammzellen zur Regeneration zu nutzen: 1. Entwicklung eines Embryos bis zum Blastozystenstadium, Zellentnahme und Installation einer embryonalen Stammzellkultur, 2. Aussortieren adulter Stammzellen aus dem Nabelschnurblut oder Gewebeteilen des jugendlichen oder erwachsenen Organismus und 3. Redifferenzierung bereits spezialisierter Zellen aus dem Organismus in Stammzellen.

Aus ethischen Gründen würde man gerne die Nutzung embryonaler Stammzellen vermeiden, was keinesfalls bedeuten kann, jedwede embryonale Stammzellforschung zu verbieten. Die gegenwärtige öffentliche Debatte über die Situation der Stammzellforschung in Deutschland ist charakterisiert durch zwei Lager, das der Befürworter und das der Gegner der embryonalen Stammzellforschung und -nutzung. Unter den Wissenschaftlern herrscht nahezu einheitlich die Auffassung, dass sowohl die embryonale als auch die adulte Stammzellforschung notwendig



Gewinnung und Anlage von Stammzellkulturen am Beispiel der Ratte, deren Differenzierung und Kultivierung bis zu »organoiden Gewebekörpern« sowie Zelltypen aller drei Keimblätter führt.

und zu fördern ist, da man ansonsten im adulten Bereich nicht über die notwendigen Vergleiche verfügt. Was die Nutzung für therapeutische Zwecke betrifft, gehen die Meinungen auseinander und müssen komplexe ethisch-rechtliche Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Das Klonen menschlicher Embryonalzellen ist nach dem Embryonenschutzgesetz in Deutschland verboten.

Es steht außer Frage, dass ethisch-rechtliche Probleme weitgehend vermieden werden könnten, wenn sich die klinische Nutzung auf adulte Stammzellen oder redifferenzierte Zellen beschränken könnte. Diesem Feld gilt daher das besondere Engagement des Fraunhofer IBMT mit seiner externen Arbeitsgruppe »Zelldifferenzierung & Zelltechnologie« an der Universität zu Lübeck und »Biohybride Systeme« in St. Ingbert sowie »Zellmanipulation«

an der Humboldt-Universität zu Berlin (vgl. hierzu das nachfolgende Kapitel »Adulte Stammzellisolate aus exokrinem Gewebe«).

Bei allen adulten Stammzellen, die bisher aus der Blutbahn, dem Knochenmark oder einem anderen Gewebe gewonnen werden, zeigt sich, dass mit wachsendem Alter auch die Differenzierungspotenz und die Vermehrungsfähigkeit der gewonnenen Stammzellen abnimmt. So konnte in der IBMT-Arbeitsgruppe »Zelldifferenzierung & Zelltechnologie« unter der Leitung von Privatdozent Dr. Charli Kruse in Lübeck aus Biopsiegewebe des Pankreas eines 74-jährigen Patienten zwar noch eine Stammzellkultur über fünf Passagen vermehrt werden, die Zellen stellten dann jedoch ihre Vermehrung ein. Andere Zellisolate aus dem exokrinen Pankreas hingegen teilen und vermeh-

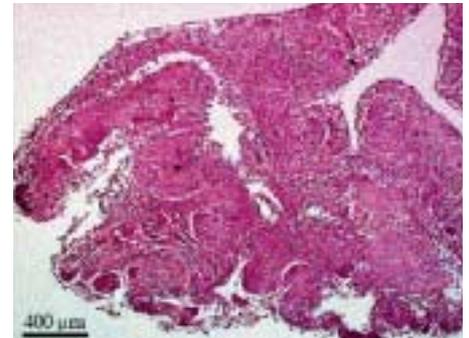
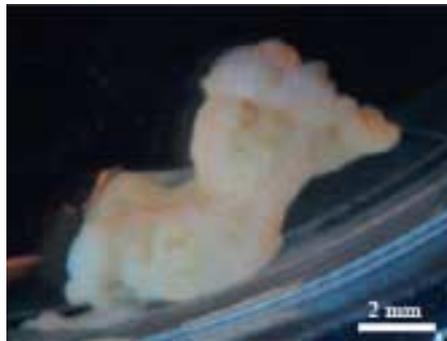
ren sich seit mehr als 2 Jahren nun über mehr als 80 Passagen, was ein Beleg für eine stabile In-vitro-Kultur ist. Daraus muss abgeleitet werden, dass auch die Stammzellen im Körper einem Alterungsprozess unterworfen sind und es somit sinnvoll ist, möglichst jugendliche Stammzellen zu gewinnen und diese personenbezogen für einen späteren Bedarf abzulegen. Dies schließt den Kreis zur Kryokonservierung und begründet die derzeit weltweit im Entstehen befindlichen Nabelschnurblutbanken. Es wäre eine faszinierende Perspektive, wenn es gelänge die Ziele der regenerativen Medizin mittels Stammzellen aus dem Nabelschnurblut zu realisieren, da dieses bisher ungenutzt in ausreichender Menge (beim Menschen etwa 150 ml) anfällt und eine der frühesten gut verfügbaren Stammzellquellen darstellt. Die Zahl der Stammzellen ist allerdings für einen direkten Einsatz zu gering, so dass entweder vor der Kryokonservierung oder zum Zeitpunkt einer späteren Nutzung eine In-vitro-Vermehrung erfolgen muss. Man kann also entweder das Vollblut mit einem Gefrierschutzmittel oder besser die daraus isolierten mononukleären Zellen oder auch noch weiter fraktioniert Stammzellen für eine spätere Nutzung ablegen. Alle drei Varianten bedürfen der Kryokonservierung und bei den zu erwartenden Probenzahlen der hier diskutierten Kryotechnologie.

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Tieftemperaturlagerung von humanen Stammzellen ist die kontaminationsfreie und verlustfreie Ablage bei gleichzeitig höchster Überlebensrate nach dem Auftauen. Die am IBMT dafür entwickelten Kryosubstrate bieten zudem den Vorteil einer Teilentnahme ohne Erwärmung des Restbestandes bei kleinstmöglichem Volumen. Eine regenerative Medizin ohne Kryobanken mit Lagerzeiten über Jahrzehnte ist daher nicht denkbar und praktikabel.

## Adulte Stammzellisolate aus exokrinem Gewebe aus kryotechnologischer Sicht

Bislang wurden adulte Stammzellen unter anderem aus dem Knochenmark, der Leber, dem Gehirn und dem Blut isoliert. Die IBMT-Arbeitsgruppe »Zelldifferenzierung & Zelltechnologie« an der Universität zu Lübeck identifizierte und publizierte eine alternative und neue Quelle für adulte Stammzellen, die exokrinen Drüsen entstammen und neben ihren Wachstums- und Differenzierungseigenschaften sehr gute Ergebnisse bei der Kryokonservierung zeigen. Besonders differenzierungsfreudige Stammzellen wurden aus exokrinen Gewebeteilen der Bauchspeicheldrüse isoliert, die als Stammzellquellen bisher nicht in ausreichendem Maße berücksichtigt wurden. Die daraus isolierten Zellen zeigen jedoch, wie nachfolgend erläutert wird, überaus interessante Eigenschaften.

Die aus Ratten, Mäusen, aber auch menschlichem Gewebe isolierten Zellen werden seit mehr als 2 Jahren im Labor gezüchtet und bilden unter besonderen Bedingungen spontan gewebeähnliche Zellansammlungen aus, die als »organoide Gewebekörper« zu bezeichnen sind. Fluoreszenzanalysen mittels markierter, hochspezifischer Moleküle und hochauflösende elektronenmikroskopische Schnitte wiesen darauf hin, dass sich Gewebetypen wie man sie in Nerven, Muskeln, Knorpeln, Drüsen und der Haut findet herausbilden. Das Besondere an den Zellen gegenüber anderen adulten Stammzellkulturen ist ihre gute und stabile Kultivierbarkeit und ihre hervorragende Kryokonservierbarkeit ohne Einbuße der Differenzierungspotenz. Viele Stammzelllinien ändern ihr Verhalten nach einer Gefrierprozedur, so dass auch dieser Gesichtspunkt bezüglich eines späteren medizinischen Einsatzes berücksichtigt werden sollte. Ihre spontane Differenzierung im hängenden Tropfen bis hin zu »organoi-



Aus den Primärkulturen über spontane Differenzierung sich entwickelnde Gewebekörper in einer Kulturschale (links) und im gefärbten Gewebeschnitt (rechts).

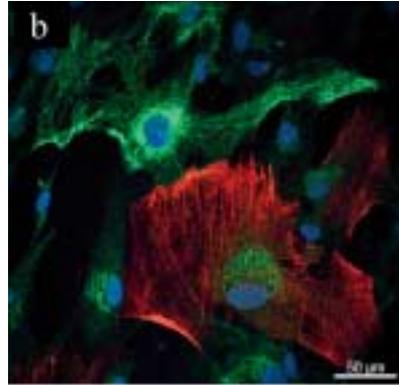
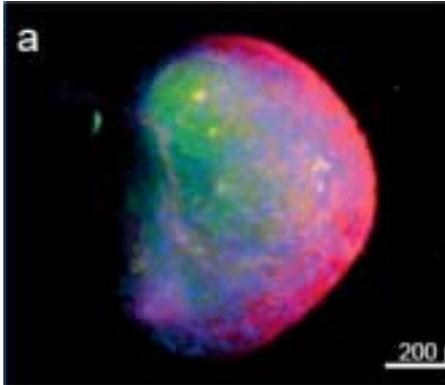


Für die Ablage von Stammzellen und Gewebekörpern geeignete, miniaturisierte Substrate mit elektronischem Speicherchip, denen im tiefgekühlten Zustand einzelne Depots (Wells von einigen µl) entnommen werden können, ohne die Restprobe erwärmen zu müssen. Pro Well lassen sich bis zu 1 Million Zellen unterbringen.

den« Gewebeformationen von mehreren Millimetern Größe, in denen sich Zelltypen aller drei Keimblätter und strukturierte Gewebebereiche ausbilden, macht sie als Studienobjekt und alternative Stammzellquelle außerordentlich interessant.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass über geeignete Kultivierungs- und Differenzierungsschritte sehr definiert die Differenzierung der Zellen induziert werden kann. Wie

sonst nur bei embryonalen Stammzellkulturen beobachtet, bilden die Zellkulturen »dreidimensionale Gewebekörper« aus, die ihrerseits wieder in stabiler, sich selbst vermehrende Differenzierungskulturen überführt werden können. Auch diese immerhin mehrere Millimeter großen Gewebekörper lassen sich kryokonservieren und nach dem Auftauen in Oberflächenkulturen überführen, aus denen sich weitere organoide- und Gewebekörper herausbilden.



(a) Organoider Körper mit ektodermaler Stammzellmarkierung (Pax6 – rot, CD44 – grün), (b) Aus pankreatischen Stammzellen differenzierte Zellen mit zytoplasmatischen Strukturen in hoher lichtmikroskopischer Auflösung, die die gute Differenzierbarkeit belegen.

Bemerkenswert ist, dass diese Gewebeschichtungen in den Kulturschalen über Monate weiter wachsen und Gewebekomposite von einigen Millimetern Größe hervorbringen, in denen sich Zellen und Zellformationen mit Eigenschaften des Meso-, Ekto- und Endoderms finden.

Die Wachstums-, Differenzierungs- und Kryokonservierungsergebnisse besitzen Modellcharakter für die Stammzellforschung, da offensichtlich auch im adulten Stammzellbereich sehr differenzierungsfreudige und pluripotente

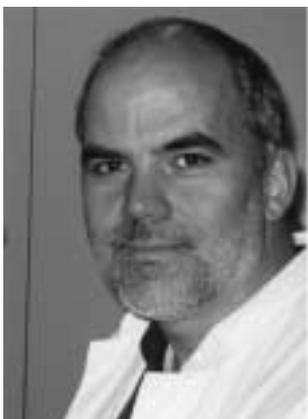
Zelltypen gewonnen, kultiviert und gelagert werden können. Für eine spätere Nutzung spielt es eine untergeordnete Rolle, ob es sich dabei um einen Stammzelltyp oder ein Gemisch verschiedener Precursor-Zellen handelt. Entscheidend ist, dass man in viele Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren kann. Man ist der Vision, von vielen Tieren, aber auch dem Menschen ein expandierbares Stammzelldepot ausreichender Größe für eine spätere landwirtschaftliche, biotechnologische bzw. individuell-medizinische Nutzung anlegen zu können, einen Schritt

näher gekommen. Auch für das Tissue Engineering stehen damit in Kürze neue, adulte Stammzellkulturen und -linien verschiedenster Herkunft zur Verfügung.

In der Kryobank des IBMT in Sulzbach als auch in einer in der Entwicklung befindlichen Tochterbank in Lübeck befindet sich ein wachsender Bestand an Stammzellen, wie er für die Forschung und industrielle Nutzung benötigt wird. Interessenten können Zellkulturen in tiefgefrorener Form über die angegebene Adresse erwerben.

### Ausstattung

- Grundausrüstung zur Isolation und Anlage von beliebigen In-vitro-Kulturen
- Differenzierung und Analyse adulter Stammzellen
- Mikroinjektionstechnik
- Mikrodissektionstechnik
- Kryobank mit Stammzellsammlung



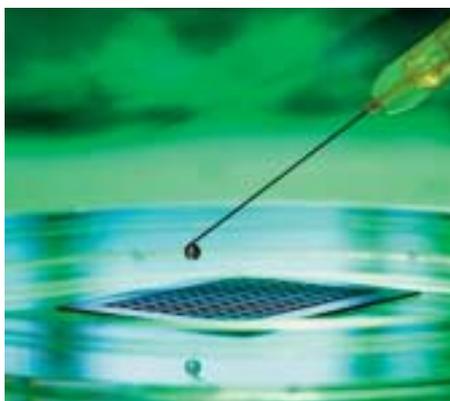
### Kontakt

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT)  
 Zelldifferenzierung & Zelltechnologie  
 Universität zu Lübeck  
 MFC Innovationscampus 1  
 Maria-Goeppert-Straße 1  
 23538 Lübeck  
 Priv.-Doz. Dr. Charli Kruse  
 Telefon: 0451 / 2903-210  
 Fax: 0451 / 2903-213  
 charli.kruse@ibmt.fraunhofer.de

## Kryobiophysik & Kryotechnologie – Forschung und Entwicklung am Zentrum für Kryobiotechnologie

Eine der faszinierendsten Möglichkeiten der Kryokonservierung ist sicherlich die Option der retrospektiven Analyse lebenden biologischen Materials, also eine Verlagerung von der gegenwärtig praktizierten sofortigen oder zeitnahen Stichprobenanalyse und nachfolgenden Ablage der Daten hin zu einer Speicherung der Proben und einer nachgelagerten Analyse bei Bedarf. Neben den ökonomischen und infrastrukturellen Vorteilen bietet sich damit die einzigartige Möglichkeit, im Nachhinein (theoretisch Jahrzehnte später) eine Fragestellung nach aktuellem Wissens- und Technologiestand zu beantworten. Die prophylaktische Probenablage in Bezug auf unbekannte Seuchen, wie sie mit BSE, HIV oder SARS in den letzten beiden Jahrzehnten in Erscheinung getreten sind, macht den Vorteil und die Notwendigkeit einer retrospektiven Analyse biologischer Individualdaten deutlich. Sinnvoll und sicher ist dies aber nur, wenn umfassend beprobt wird (im Idealfall eine vollständige statistische Gesamtheit an Stelle der bisher meist üblichen Stichproben).

Dabei muss berücksichtigt werden, dass Individuenzahlen (sei es im humanmedizinischen, veterinärmedizinischen oder pharmazeutisch-technischen Bereich) zur Ablage kommen,



Mikro-Kryocontainer aus Silizium zur Aufnahme und späteren Fraktionierung von Suspensionströpfchen mit Zellen. In einem solchen Tropfen befinden sich immerhin einige tausend bis zu zehntausend Zellen.



Adaptives, miniaturisiertes Kryosubstrat für ein breites biologisches Probenspektrum. Wesentliche Vorteile des neuen Ablagesystems sind die hohe erreichbare Packungsdichte an biologischen Proben, die Modularisierung des Trägersystems für eine nichtinvasive Entnahme von Einzelproben und die absolut eindeutige Zuordnung von Datensätzen durch physische Kopplung von elektronischen Memory-Chips an die biologische Probe. Die Kopplung der einzelnen Trägersysteme erfolgt durch unterschiedliche, zum Patent angemeldete Verfahren (z.B. Schiebeseystem wie in der Abbildung oder Drehachsen-Substratstapel). In die Mikrocontainer können Zellsuspensionen, bewachsene Gewebe aber auch Biosubstrate abgelegt werden (Kreisbilder rechts).

die bei konservativen Schätzungen im Bereich mehrerer Hunderttausend bis zu Millionen liegen. Derartige Probenzahlen sind mit der aktuellen Probenbehältertechnologie nicht zu bewältigen.

Die sich daraus ergebende zentrale Aufgabenstellung der Forschung am Zentrum für Kryobiotechnologie ist es, Prinzipien und Vorrichtungen für das parallele und auch selektive Einfrieren, Langzeitlagern, Auftauen, der Teilentnahme von Material und das Verwalten einer Vielzahl von biologischen Proben (insbesondere Zellsuspensionen) zu entwickeln und damit im Saarland eine im europäischen Umfeld einzigartige Konstellation aus Forschung und Entwicklung in Form einer Referenz- als auch Evaluations-Kryobank aufzubauen.

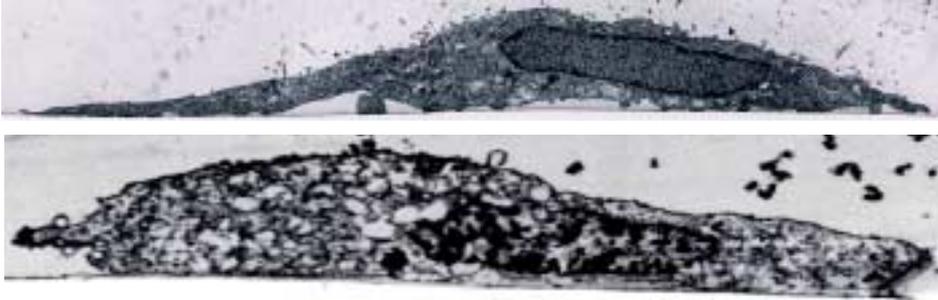
### Arbeitsgebiete und Forschungsfelder

Die gestellte Aufgabe erfordert ein Umdenken in der Kryobiologie. Mit der

seit über 20 Jahren unveränderten Art der Lagerung, nämlich der Ablage von Proben in Volumina im Milliliter-Bereich und darüber, können die Lagererfordernisse der modernen Biotechnologien nicht erfüllt werden. Die Abteilung »Kryobiophysik & Kryotechnologie« hat deshalb den Fokus auf die Entwicklung eines Basissystems (Kryosubstrat für Zellsuspensionen) für eine grundlegend neue Art der Lagerung biologischer Proben gerichtet.

Diese neuen Kryosubstrate weisen folgende Vorteile auf:

- Down-Scaling der Probenablage in den Mikroliter- und Sub-Mikroliter-Bereich
- Entnahme von Teilproben ohne ein Auftauen der Restproben
- Physikalisch gekoppelte Aufbewahrung der biologischen und nichtbiologischen Information, d.h. eine Integration von Probe und Daten
- Verringerung der Temperaturgradienten



Hochauflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch eine Zelle (Fibroblast) auf einem Substrat. Oben: bei 37 °C, unten: im tiefgefrorenen Zustand. Die hellen Bereiche stellen Eisdomänen dar und belegen die weitgehende Entmischung des Zytoplasmas. Die Prozesse der Reorganisation der Zellflüssigkeit nach der Erwärmung sind noch weitgehend unbekannt und ein interessantes Gebiet der Kryobiophysik.

Die Abteilung hat bereits mehrere Systeme zur Kryokonservierung als Funktionsmuster vorgestellt (siehe Abbildungen). Die Systeme bestehen zum einen aus neuen Hightech-Kunststoffen, die für den gesamten Temperaturbereich der Probenlagerung (d.h. +130 °C für die Sterilisation bis -196 °C, also der Siedetemperatur des flüssigen Stickstoffs) geeignet sind. Zum anderen wurden siliziumbasierte Mikrosysteme (siehe Abbildung »Mikro-Kryocontainer aus Silizium«) entwickelt, mit denen eine weitere drastische Miniaturisierung der Proben volumina möglich wird. Auch in diesen kleinsten Containern befinden sich noch Tausende von Zellen mit der Potenz zur späteren Vermehrung oder auch vollständigen Charakterisierung einer Zellart.

Gekoppelt werden diese Substrate mit evaluiertem bzw. modifiziertem elektronischem Flash-Speicher, der Datenmengen bis zu einem Gigabyte (d.h. die Datenmenge von zwei CD-ROMs) aufnehmen und damit alle nur denkbaren Informationen, die die in den Substraten abgelegten Proben charakterisieren und beschreiben können (z.B. mikroskopische Aufnahmen und Videosequenzen, aber auch hochstrukturierte Datensätze), speichern kann. Der offensichtliche Vorteil, der

sich dadurch ergibt, ist die absolut eindeutige, weil physische Verbindung zwischen Probe und Datensatz. Im Gegensatz zu allen herkömmlichen Ansätzen, die aus der rein logischen Kopplung zwischen Probe und Daten durch eine ID (eindeutige Identifikationsnummer) besteht, ist die Zuordnung zwischen Probe und Daten bei dem hier realisierten System zu jedem Zeitpunkt (auch bei Transport der Probe) und unabhängig von der informationstechnischen Infrastruktur (Datenbank) definiert und gegeben. Die technologische Herausforderung liegt allerdings darin, dass der Speicher den gleichen Temperaturen wie die Probe ausgesetzt ist und standhält. Diese Herausforderung wird mit der Entwicklung von Hardware für den Einsatz bei Temperaturen unter -130 °C, also einer Tieftemperatur-Elektronik, beantwortet.

Neben der elektronischen Seite der Entwicklung ergeben sich neue Forschung- und Entwicklungsfelder aus den oben angegebenen vorteilhaften Eigenschaften der neuen Kryosubstrat-Technologien.

### (1) Untersuchung zellulärer Kryoprozesse

Eines der wichtigsten Gebiete der Kryobiophysik ist das Studium der Prozesse beim Einfrieren biologischer Materialien auf molekularer und zellulärer

Gewebeebene. Sie beschäftigt sich mit der Aufbewahrung und den Eigenschaften von lebendem biologischem Material bei tiefsten Temperaturen.

Die moderne Biotechnologie benötigt die Ablage der Proben in Mikrovolumina, was die Entwicklung der neuen mikrosystembasierten Kryosubstrate und entsprechende programmgesteuerte Kryokonservierungsverfahren sowie die Forschung im Gebiet Kryonobiotechnologie erfordert. Die Kryobiophysik ist ein Forschungsgebiet, das, obwohl seit mehr als 50 Jahren existent, seine Bedeutung erst in den nächsten Jahrzehnten voll entfalten und ausbilden wird.

### (2) Tieftemperatur-Elektronik

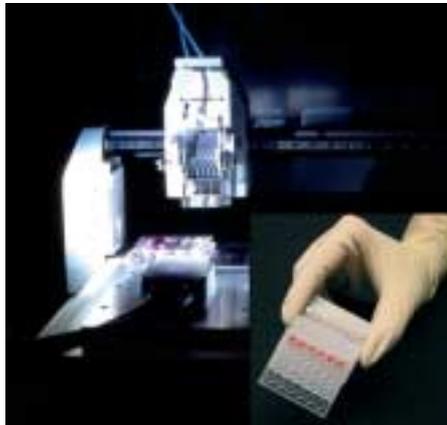
Elektronische Speichermedien, die für eine Lagerung oder sogar einen Zugriff unter kryogenen Temperaturen zertifiziert werden, sind auf dem freien Markt nicht erhältlich und mittelfristig auch nicht zu erwarten, da thermische Optimierung von Elektronik heute hin zu hohen Temperaturen erfolgt. Es war daher notwendig, Messtechniken zu evaluieren und zu modifizieren, um elektronische Speicherschaltkreise und die dazugehörige Schaltungssperipherie unter kryogenen Temperaturen zu untersuchen. Ein Beispiel für eine derartige Messtechnik ist die nun in der Abteilung verfügbare infrarotbasierte Echtzeit-Thermographie, die das Temperaturverhalten von Speichermedien und den zugehörigen Schreib-/Lese-Einrichtungen mit einer Genauigkeit bis zu 0,1 °C bei gleichzeitiger mikroskopischer Auflösung abbilden kann. Diese Messtechnik steht auch für andere Fragen aus der Biologie, Medizin und Technik zur Verfügung. Flankiert werden diese Systeme durch Hochgeschwindigkeitskameras, die es erlauben den Gefriervorgang auch bei der Tropfen- und Schockkühlung zu erfassen.

### (3) Kryobioinformatik

Neben der elektronischen Realisierung von tieftemperaturfähigen Speichereinheiten müssen seitens der Informatik neue Prinzipien entwickelt werden, um die Datenmengen und Informationen sicher und datengeschützt handhaben zu können. Beispielhaft sei hier die Definition von langzeittauglichen Datenformaten, die Entwicklung neuer Modellierungstechniken für hoch dezentralisierte und evolutive Datenbanken oder die Erprobung temperaturoptimierter Kommunikationsprotokolle genannt.

### (4) Kryoequipment & Kryorobotik

Eine besondere Stellung nimmt das Themenfeld und die Arbeitsgruppe »Kryoequipment & Kryorobotik« am IBMT ein. Sie stellt technisch und inhaltlich den Anschluss der neuen miniaturisierten Technologien an die »Makrowelt« einer Kryobank her, indem bisher nicht erhältliche, aber notwendige Technologien und Komponenten zur Manipulation und Lagerung der »Mikro-Kryosysteme« entwickelt und gefertigt werden.



Technologie für das automatisierte Einfrieren von biologischen Proben. Im Hintergrund automatisierte Pipettierstation (GeSIM, Großberkmannsdorf) zur Befüllung der Mikrowellssubstrate (im Vordergrund).

Wir entwickeln preiswerte und hochgenau arbeitende Einfrier- und Auftausysteme, wie sie in den Laboren der Biotechnologie, entsprechender Firmen und Klinika benötigt werden. Die Fraunhofer-Hauben- und N<sub>2</sub>-Inkubator-Technik verhindern die Eisbildung und Entstehung von O<sub>2</sub>-Flüssigablagerungen in den Kryotanks vollständig. In der Folge ist keine Umlagerung der Proben mehr notwendig.



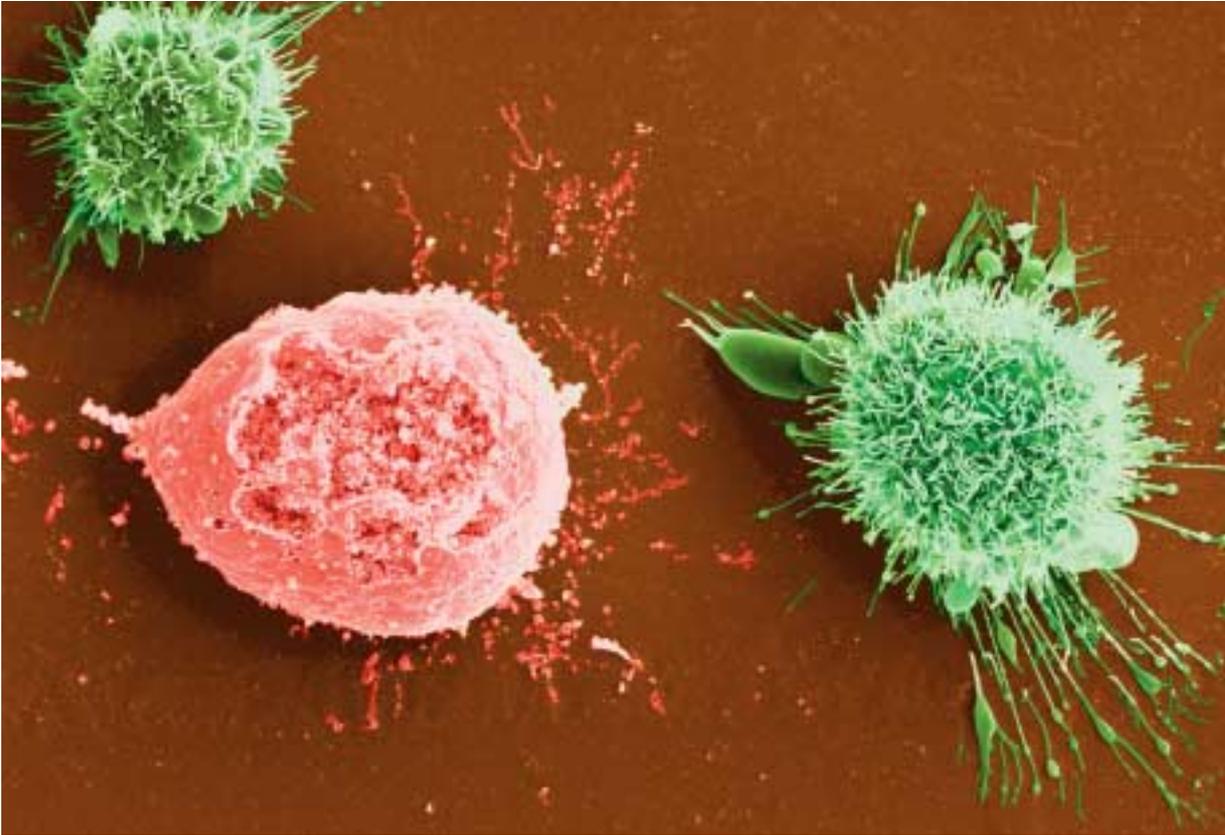
Kryotank der Firma Messer mit Entnahmeturm des Fraunhofer IBMT, der das Vereisen der Proben und des Innenraumes vermeidet und die zur Entnahme ausgewählten Proben über Stunden gekühlt zugriffsbereit hält.

### Kontakt

Prof. Dr. Heiko Zimmermann  
Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
Technik (IBMT)  
Kryobiophysik & Kryotechnologie  
Ensheimer Straße 48  
66386 St. Ingbert  
Telefon: 06894 / 980-257  
Fax: 06894 / 980-400  
heiko.zimmermann@ibmt.fraunhofer.de



## (1) Kryobiophysik



Adhärenz Zellen nach einem vollständigen Einfrier- und Auftauvorgang (digital eingefärbte Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop). Die rot eingefärbte Zelle weist deutliche, irreparable Kryoschäden auf.

Die neu entwickelten Kryosubstrate haben aufgrund ihrer Miniaturisierung andere Einfrier-/Auftaueigenschaften als industriell hergestellte Kryoprobebehälter. Die Kryobiophysik am IBMT beschäftigt sich daher mit der Testung der verschiedenen Kryosubstrate, der Modellierung des Einfrierprozesses, der funktionellen zellspezifischen Charakterisierung der kryokonservierten Zellen, der Beobachtung der Regenerations- und Wachstumsprozesse, aber auch des Absterbens der Zellen (Apoptose und Nekrose) nach dem Auftauen. Die bisherigen Ergebnisse haben eine wesentliche Verminderung

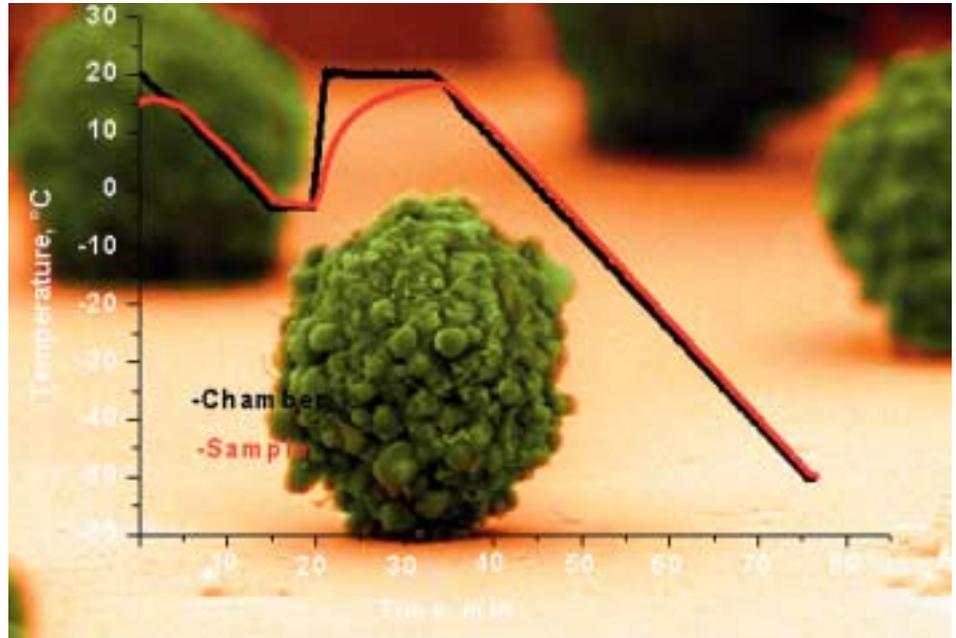
der z.T. toxischen Kryoprotektiva (z.B. des bewährten DMSO) mit gleichzeitigem raschem Wachstum der kryokonservierten Zellen nach dem Auftauen ermöglicht. Diese Art der kryobiophysikalischen Forschung eröffnet neue und breite Anwendungsfelder, insbesondere für die Transplantations- und Stammzellmedizin. Die kryobiologische

Forschung in der Abteilung Kryobiophysik & Kryotechnologie konzentriert sich auf die folgenden Schwerpunkte:

- Forschung und Entwicklung im Bereich der Kryobiotechnologie
- Entwicklung von kundenspezifischen Kryoprozeduren
- Kryokonservierung von biotechnologisch und medizinisch relevanten Zellen
- Optimierung von Kryosubstraten
- Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der kryokonservierten Zellen mithilfe von kombinierten mikroskopischen Verfahren: Lichtmikroskopie (inklusive Fluoreszenz-, Stereo-Fluoreszenz- und Immunofluoreszenzmikroskopie), Raster- (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der gleichen Zellen
- Zellspezifische Testung auf Bio- und Kryokompatibilität
- Tieftemperaturelektronik
- Informatik/Bioinformatik
- Hochgeschwindigkeitsprozesse
- Verkapselungsanlagen
- Immunisierte Alginateverkapselung

### Ausstattung

- Tieftemperatur-Lagersystem mit medizinischer Zulassung
- Programmierbare Einfrierautomaten
- Thermographiesystem
- Nano-Plotter zur Befüllung von Mikro-Kryosubstraten
- Kryomikroskop
- Stereofluoreszenz- und Durchlichtfluoreszenzmikroskop
- Zugang zu REM und TEM
- Zellbiologische Labore



Optimiertes Kryoprotokoll (Graphoptimaler Temperaturverlauf zum Einfrieren tierischer und humaner Zellen). Hintergrund: Einzelzelle auf einem Substrat mit moderaten Kryoschäden.

### Kontakt

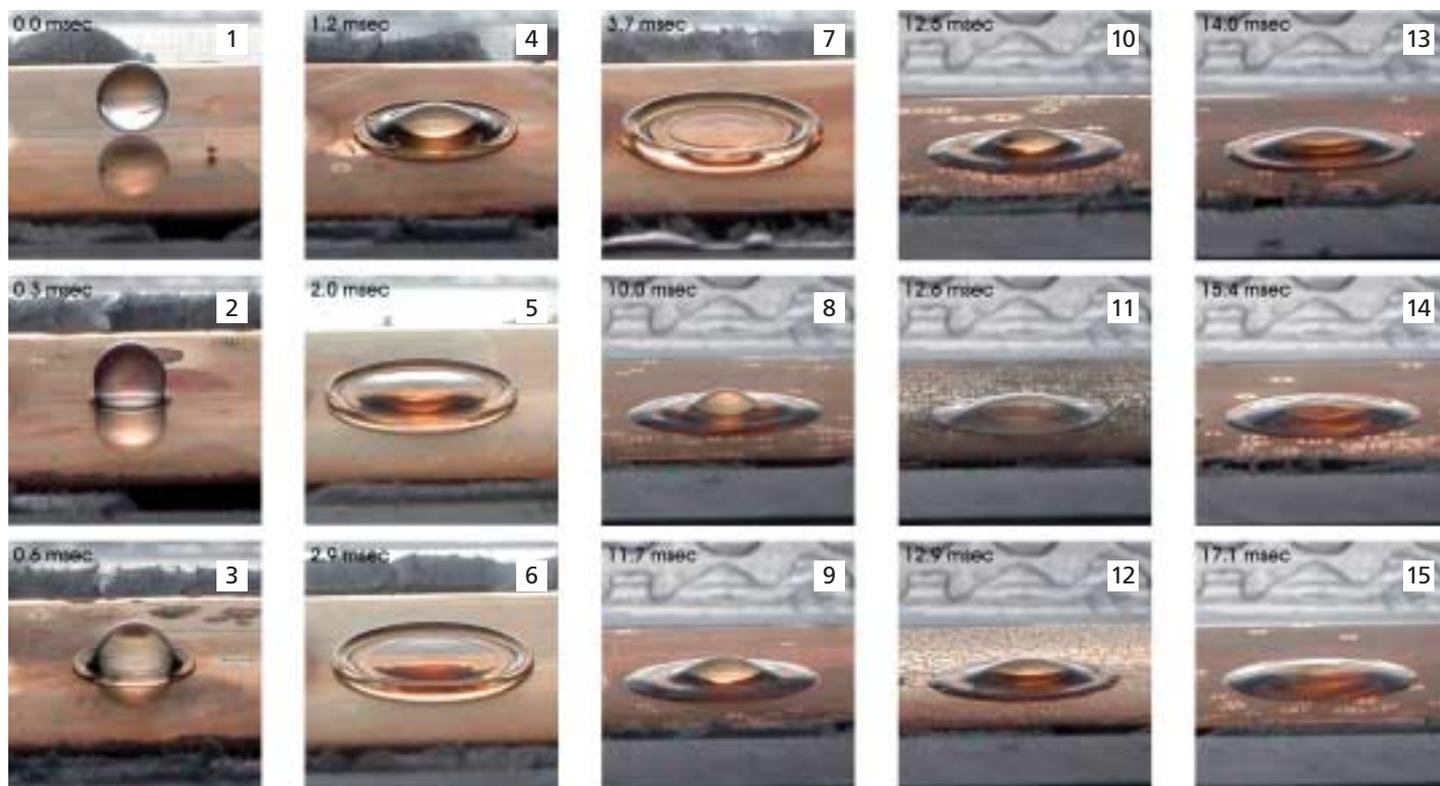
Dr. Alisa Katsen-Globa /  
 Prof. Dr. Heiko Zimmermann  
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
 Technik (IBMT)  
 Kryobiophysik & Kryotechnologie  
 Ensheimer Straße 48  
 66386 St. Ingbert  
 Telefon: 06894 / 980-259  
 Fax: 06894 / 980-400  
 alisa.katsen@ibmt.fraunhofer.de



Dipl.-Biol. Friederike Ehrhart /  
 Prof. Dr. Heiko Zimmermann  
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
 Technik (IBMT)  
 Kryobiophysik & Kryotechnologie  
 Ensheimer Straße 48  
 66386 St. Ingbert  
 Telefon: 06894 / 980-258  
 Fax: 06894 / 980-400  
 friederike.ehrhart@ibmt.fraunhofer.de



## Molekulare Prozesse beim Einfrieren von Zellen



Beispiel für das Auftreffen (2), die nachfolgende Bewegung (3-14) und das Gefrieren (15) eines Suspensionstropfens auf einer tiefgekühlten ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Oberfläche. Wie man der Bildfolge entnehmen kann, erfolgt das Gefrieren nicht sofort, sondern erst nach einem sehr dynamischen Prozess der Tropfenverformung, den man für die Kryokonservierung von Zellsuspensionen nutzen kann, weil er sehr definiert abläuft (Fotoserie S. Schelenz, R. Hagedorn, Humboldt-Universität zu Berlin).

Von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Gefrier- und Auftau-prozeduren sind die physikalischen und biochemischen Prozesse innerhalb und außerhalb der Zellen. Sie sind zwar in ihren Einzelheiten seit mehr als 50 Jahren gut untersucht, die Komplexität des Zytoplasmas als eine makromolekülreiche Gel-Sol-Elektrolytlösung verhindert bislang jedoch ein umfassendes Gesamtverständnis. Im Folgenden sollen kurz die wesentlichen Vorgänge verdeutlicht werden. Sehr gut lassen sich derartige Prozesse beim definierten Auftreffen von Flüssigkeitstropfen auf kalte Oberflächen untersuchen und beeinflussen, weshalb am IBMT umfangreiche Technik zur Mikrotropfenerzeugung und Hochgeschwindigkeitsaufnahme der Tropfenbewegungen und des Gefrierprozesses installiert wurde.

Die Prozesse innerhalb und um eine Zelle beim Einfrieren lassen sich entsprechend den dargestellten Abbildungen in sechs Phasen einteilen.

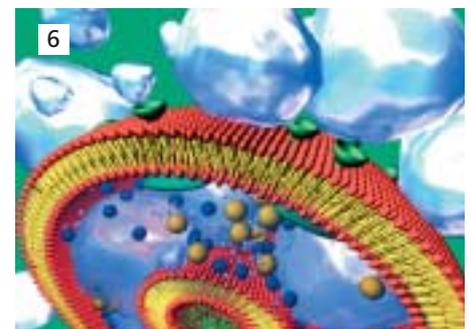
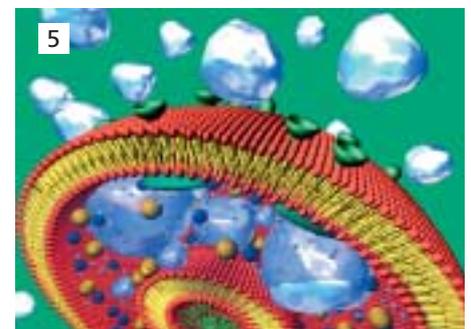
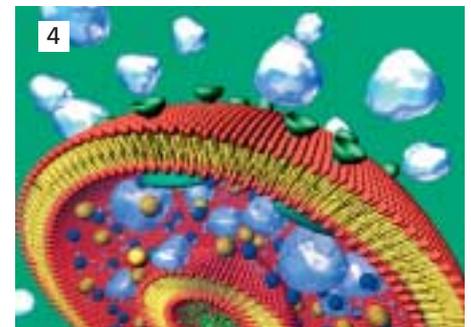
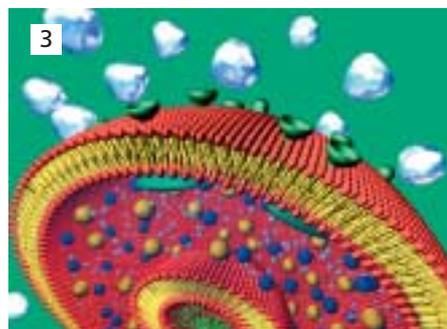
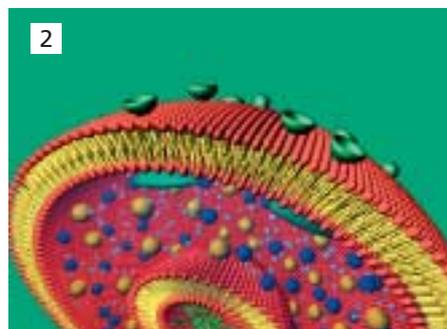
**Phase 1** (Bild 1, Seite 25) zeigt eine tierische Zelle schematisch im physiologischen Temperaturbereich zwischen  $37$  und  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Innen und außen erfolgen die Prozesse der Signalankopplung und chemischen Bindung wohlabgestimmt.

**Phase 2** (Bild 2, Seite 25) zeigt die Zelle in einem Temperaturbereich zwischen  $20$  und  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Funktionsfähigkeit ist stark eingeschränkt. Stoffwechselforgänge laufen wesentlich langsamer ab bzw. werden von den Zellen abgeschaltet. Dieses Temperaturintervall ist daher zur Vorbereitung des Einfrierens einer Zelle von hoher Bedeutung.

**Phase 3** (Bild 3) zeigt die Verhältnisse im Temperaturbereich zwischen  $-2$  und  $-15$  °C. Die Eisbildung beginnt in der Regel an Nukleationskeimen in der Außenlösung. Dies hat zur Folge, dass das Wasser aus der Zelle herausgezogen wird (osmotische Effekte), was zu einer Zelldehydrierung und ihrem Schrumpfen führt. Werden mehr als 30% des Wassers entzogen, treten Schädigungen der Zelle auf, die in der Regel nicht vollständig reversibel sind. Durch die Wahl der Medien und die Abkühlgeschwindigkeit kann dieser Prozess beeinflusst werden, woraus sich die zelltypischen Gefrierprotokolle ergeben.

In **Phase 4** (Bild 4) setzt bei einer Temperatur zwischen  $-15$  und  $-25$  °C die Eisbildung in der Zelle ein. Es bilden sich auch hier Eiskristalle, die zu einer Entmischung und Delokalisierung der Zytoplasmabestandteile führen. Die Zugabe von Kryoschutzmitteln beeinflusst die Wasserstruktur und führt zur Bildung vieler kleiner statt weniger großer Eisbereiche, was sich als günstiger für die Kryokonservierung erweist. Das Volumen der Eiskristalle ist um 1/11 größer als das der vorherigen Wasserphase, was zu mechanischem Stress führt. Die aufkonzentrierten Ionen an den Eisfronten können zu beträchtlichen Potenzialgradienten führen, die ebenfalls schädigende Wirkungen zeigen können (Workman-Reynold-Effekt, dielektrischer Durchbruch der Biomembran).

**Phase 5** (Bild 5) umfasst den Temperaturbereich zwischen  $-25$  und  $-130$  °C. Sie ist geprägt durch das migratorische Wachstum großer Eiskristalle auf Kosten der kleineren. Dieser Prozess der Umkristallisation hat fatale Folgen, auch wenn er mit niedriger werdender Temperatur immer langsamer abläuft. Trotz der tiefen Temperaturen können Wassermoleküle aufgrund der thermischen Stöße entsprechend  $k \cdot T$  (wobei  $k$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die

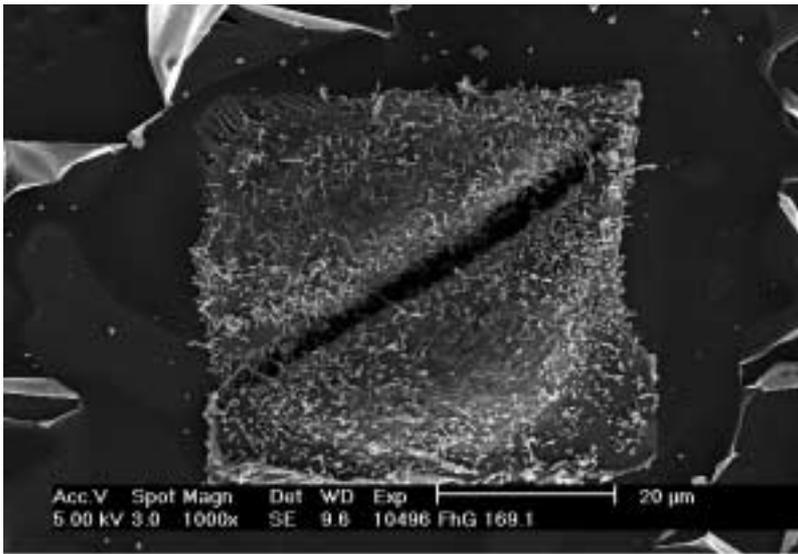
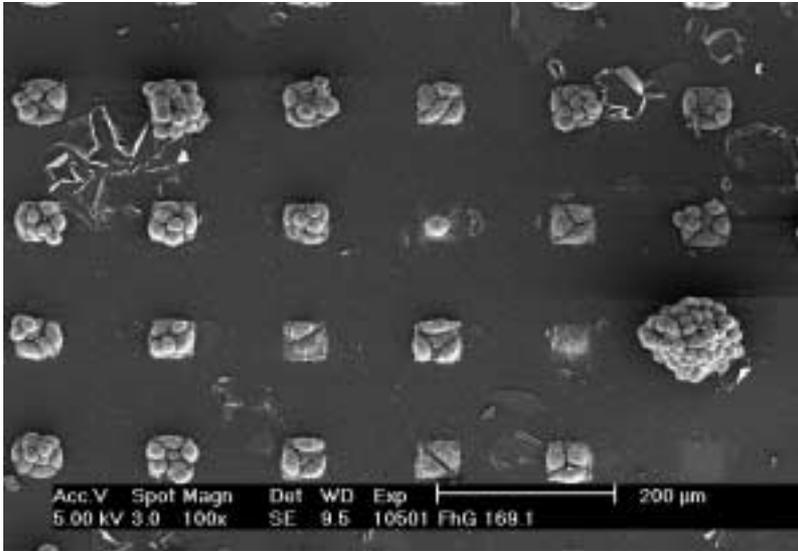


Schematische Darstellung der wesentlichen Prozesse beim Einfrieren einer Zelle (rot) in einer Umgebungslösung (grün).

1. Zelle unter Normaltemperatur (Rezeptorfunktion mit zytoplasmatischer Signaltransduktion).
2. Zelle bei einer Temperatur zwischen  $10$  und  $0$  °C. Reduzierter Stoffwechsel, kein Signaltransfer mehr.
3.  $-2$  bis  $-15$  °C, extrazelluläre Eisbildung und Entwässerung der Zelle.
4.  $-15$  bis  $-25$  °C, intrazelluläre Eisbildung, Entmischung des Zytoplasmas.
5.  $-25$  bis  $-130$  °C, migratorisches Wachstum der Eiskristalle.
6.  $< -130$  °C, Zelle als Festkörper ohne nennenswerte Veränderung über lange Zeiträume.

Temperatur ist) noch immer ihre Position wechseln, wodurch die großen Eisdomänen wachsen. Auch das schädigt die Zellen und ist der Grund, warum man eine Kryoprobe nicht über Monate bei  $-80$  °C aufbewahren sollte. Dieser Temperaturbereich ist daher rasch zu durchlaufen.

In **Phase 6** schließlich (Bild 6) kommen diese Prozesse unterhalb  $-130$  °C nahezu vollständig zum Erliegen. Die Probe ist nun für Jahrzehnte und länger sicher. Daher erfolgen die Langzeitlagerung von Lebendproben bei  $-150$  °C und die Nutzung des flüssigen Stickstoffs mit  $-196$  °C als Kühlmittel.



Neue Substrate für die Kryokonservierung. Test mit adhären wachsenden Zellen auf strukturierten Siliziumsubstraten (Kooperation mit Forschungszentrum Karlsruhe, Bilder: A. Katsen-Globa, A. Welle).

Oben: Überblick über einen etwa 500 µm breiten Ausschnitt mit Zellen, die nur auf vorgegebenen, quadratischen Feldern anhaften können.

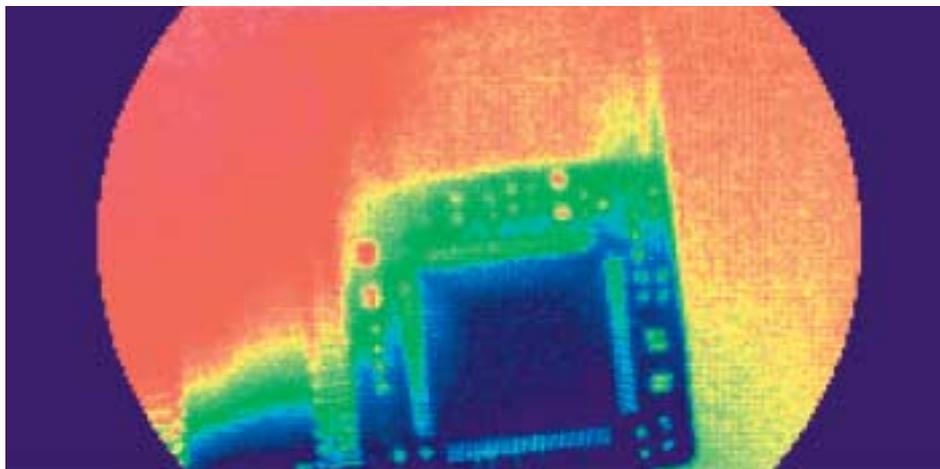
Unten: Die Vorgabe derartiger Anhaftbereiche definiert die Zahl und Form der Zellen.

Leider kehren sich diese Prozesse beim Auftauen nicht um, sondern laufen in und um die Probe erneut in der bereits erläuterten Form ab. Dadurch erhöht sich die Belastung der Zellen nochmals. Bei weitem sind noch nicht alle Effekte bekannt und eine Reihe von Zellen entzieht sich einer Kryokonservierung bis heute vollständig (z.B. große Eizellen, eine Reihe vakuolenhaltiger pflanzlicher Zellen). Dies alles zeigt, wie komplex und wichtig kryobiophysikalische Untersuchungen sind. Ohne eine fundierte Grundlagenforschung, die teils biologisch-biochemisch, teils physikochemischer Natur ist, lässt sich eine definierte und automatisierte Kryokonservierung wohl nicht erreichen. Da die Größe und Beschaffenheit der Zellen eine große Rolle spielen, muss für jede Zellart ein für sie optimiertes Kryoprotokoll erarbeitet werden. In der Abteilung Kryobiophysik & Kryotechnologie stehen Experten und Geräte für nahezu alle Aufgabenstellungen zur Verfügung.

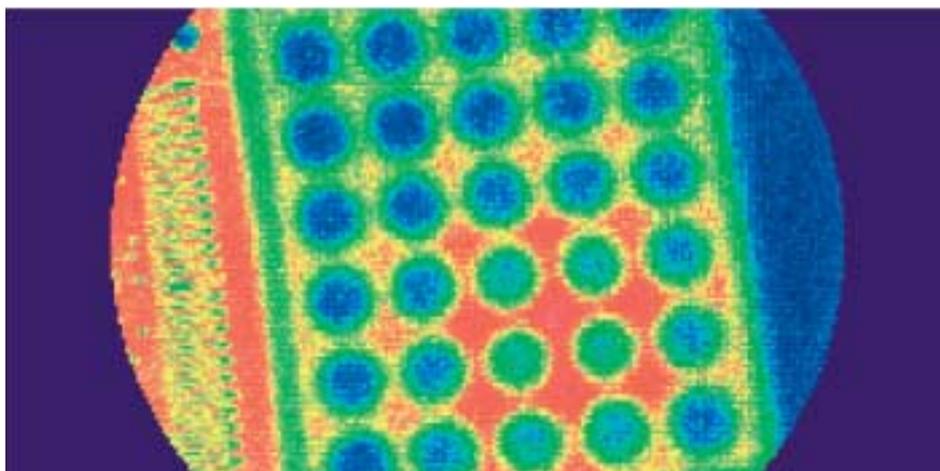
## Kontakt

Prof. Dr. Heiko Zimmermann  
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
 Technik (IBMT)  
 Kryobiophysik & Kryotechnologie  
 Ensheimer Straße 48  
 66386 St. Ingbert  
 Telefon: 06894 / 980-257  
 Fax: 06894 / 980-400  
 heiko.zimmermann@ibmt.fraunhofer.de

## (2) Tieftemperaturelektronik



Kälteausbreitung an einem Mikrocontroller, bei Anlegen eines Temperaturgradienten (rot warm, blau kalt).



Wärmeübertragung von einem Mikrocontroller auf die gekoppelten biologischen Proben. Deutlich erkennt man die Erwärmung durch die Wärmekapazität des elektronischen Chips (rote Fläche unter den Wells (blau)). Auch wenn es sich nur um wenige Grad oder Bruchteile davon handelt, müssen derartige Gradienten eliminiert werden. Ein Echtzeit-Infrarot-Bolometer-System erlaubt dies in bildgebender Weise.

Die Entwicklung eines intelligenten Kryosubstrats für ein neuartiges Kryobankkonzept stellt eine interdisziplinäre Herausforderung dar. Ziel ist es, ein Vertauschen der Proben zu verhindern und eine sich selbst optimierende, auf die Belange der Kryokonservierung ausgerichtete Datenverwaltung zu ermöglichen. Die Hauptaufgabe im Bereich der Tieftemperaturelektronik besteht in der Entwicklung eingebetteter elektronischer Systeme, die als Einheit mit den Probensubstraten eingefroren und dauerhaft unter Kryobedingungen eingelagert werden können.

Neben einem Betriebstemperaturbereich von  $-130\text{ °C}$  bis hinunter zu  $-196\text{ °C}$  müssen die elektronischen Komponenten extreme Temperaturzyklen aushalten und in der Lage sein, die aufkommenden Daten zuverlässig und sicher zu speichern.

Elektronische Speichermedien, die für eine Lagerung oder sogar einen Zugriff unter diesen Umgebungsbedingungen spezifiziert sind, werden im kommerziellen Sektor nicht angeboten. Für die Modifizierung und Evaluierung kommerzieller Elektronik unter tiefen Tem-

peraturen wurde am IBMT umfangreiches Testequipment entwickelt und eingesetzt. Die entsprechende Arbeitsgruppe verfügt über Tieftemperaturlagerungssysteme (bis  $-196\text{ °C}$ ) mit medizinischer Zulassung, in denen Langzeituntersuchungen durchgeführt werden können. Mit eigens modifizierten, programmgesteuerten Einfrierautomaten (bis  $-180\text{ °C}$ ) werden Stressbelastungen simuliert und temperaturabhängige physikalische und funktionale Eigenschaften von elektronischen Bauteilen erforscht. Die messtechnische Ausstattung der Labore umfasst Gerä-



Platine mit elektronischen Speicherchips im vollen Lese-/Schreib-Modus eingetaucht in den flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) eines durchsichtigen Dewargefäßes. Die blaue Leuchtdiode, ebenfalls im Stickstoff, zeigt den gerade angesteuerten Memory-Chip an.

te zur digitalen und analogen Signalanalyse sowie zur Generierung von Testvektoren auf Hardwareebene. Ein Thermographiesystem (bis  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kommt bei der Untersuchung der sich negativ auswirkenden Wärmeübertragung von der Elektronik auf das biologische Substrat zum Einsatz. Selbst entwickelte Heiz-/Kühltsche (Peltier- und Stickstoffkühlung) halten die Kryosubstrate während der Messung unter der Infrarotkamera auf niedriger Temperatur und lassen programmierte T-Verläufe zu. Ausgehend von den Resultaten der Evaluierung wird eine Modifizierung und spätere Zertifizierung von elektronischen Komponenten für den Kryobereich möglich gemacht.



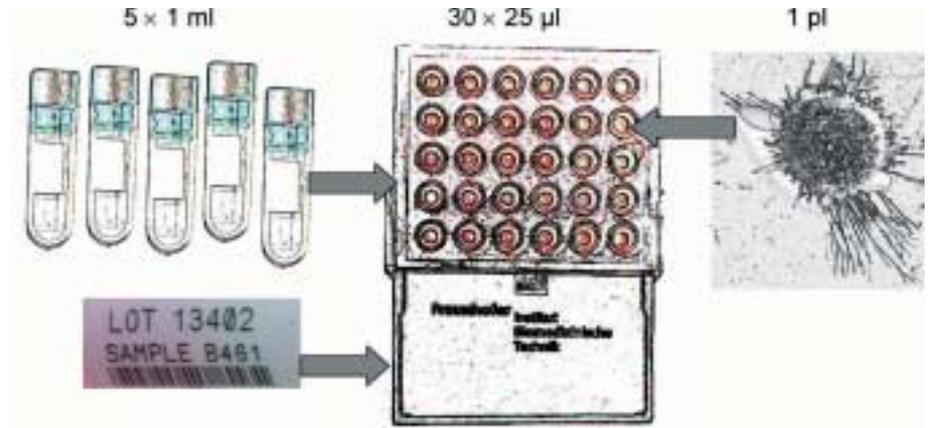
## Kontakt

Dipl.-Ing. Frank Ihmig /  
Prof. Dr. Heiko Zimmermann  
Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
Technik (IBMT)  
Kryobiophysik & Kryotechnologie  
Ensheimer Straße 48  
66386 St. Ingbert  
Telefon: 06894 / 980-258  
Fax: 06894 / 980-400  
frank.ihmig@ibmt.fraunhofer.de

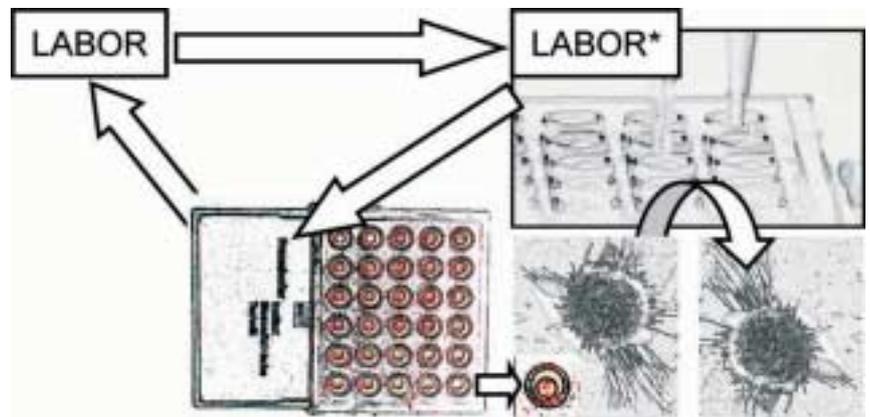
### (3) Kryobioinformatik / ChameleonLab

Die Fortschritte in der Tieftemperatur-elektronik ermöglichen mittlerweile die uneingeschränkte Funktion von Speicherchips unter Kryobedingungen. Damit ist es möglich, jeden Probenträger mit einem elektronischen Speicher zu versehen, der die zu einer Probe gehörenden Daten enthält, und dieses intelligente Kryosubstrat in einem Kryotank für lange Zeit zu lagern. Probe und Information werden also physikalisch miteinander verbunden gelagert. Diese Form der Datenablage gewährleistet die Verwechslungssicherheit von Probe und Information und wird es notwendig machen, bereits in den nächsten Jahren Millionen von dezentralen Datenträgern zu verwalten, die unterschiedliche Informationsstrukturen tragen können, abhängig von Zelltyp und jeweiliger Informationsanforderung zum Zeitpunkt der Probenablage. Schwerpunkt der Kryobioinformatik ist die Entwicklung adaptiver Datenbanken und adaptiver Softwaresysteme, die sich als für das Datenhandling in Kryobanken und Kryolabors erforderlich herausgestellt haben, weil sie die evolutiven Vorgänge in den Informationsanforderungen adäquat umsetzen können.

Vor diesem Hintergrund ist **ChameleonLab** entstanden. In Zukunft werden Labore eine stets wachsende Anzahl verschiedenster Arbeitsabläufe (Workflows) beherrschen müssen, die teils aus neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen hervorgehen werden und teils aus neuen Anwendungsgebieten für kryokonservierte Zellen resultieren werden. Labore werden Proben in einem bisher nicht gekanntem Maß austauschen müssen, woraus sich die Notwendigkeit der Austauschbarkeit und Kompatibilität von Workflow-Definitionen ergibt, aber auch ein hohes Verwechslungsrisiko entstehen kann. Austauschbarkeit von Workflow-Definitionen erfordert Unabhängigkeit von einem bestimmten Labor. Neben dem Austausch von Proben und Workflow-Definitionen spielt der Austausch



Vergleich von konventioneller Kryotechnologie und der vom Fraunhofer IBMT neu entwickelten Kryotechnologie. Während ein durchschnittliches Zellvolumen in der Größenordnung Picoliter liegt, fassen die kleinsten handelsüblichen Kryoröhrchen Volumina im Milliliterbereich. Um das zukünftige Aufkommen an Zellproben zu bewältigen, ist eine Volumenreduktion der Probengröße erforderlich und zudem biologisch sinnvoll. Das gezeigte IBMT-Kryosubstrat enthält 30 Probenröhrchen zu jeweils 25 µl auf einer Grundfläche von 4 x 3 cm. In konventioneller Technologie werden die zu einer Probe gehörenden Daten in einer externen Datenbank gespeichert und über eine entsprechende Probenbeschriftung, beispielsweise einen Barcode, referenziert. Im Gegensatz dazu wird an jedes IBMT-Kryosubstrat ein Speicherchip angekoppelt, der gegenwärtig eine Kapazität bis zu einem Gigabyte erreichen kann. Sämtliche Proben-daten, Vorgaben zu den Arbeitsabläufen und Dokumentationsdaten werden auf diesem Chip gespeichert und können immer eindeutig der angekoppelten Probe zugeordnet werden.



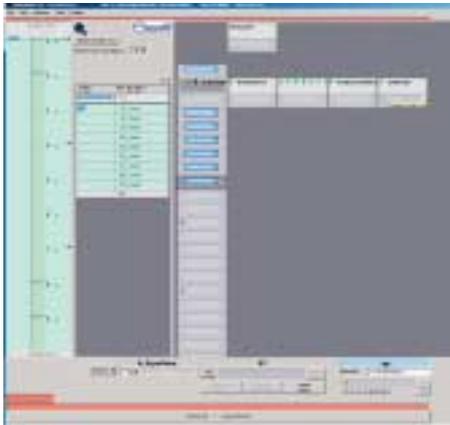
Schematische Ansicht der **ChameleonLab**-Prinzipien. Die Ansicht zeigt einen Probe-Chip-Verbund und eine Zellprobe mit einem zugehörigen Arbeitsablauf (»Workflow«). Die bei der Probe auf dem Chip gespeicherte Workflow-Definition diktiert das »Verhalten« des adaptiven Labors. Vor der Prozessausführung wird das Labor gemäß den Informationen auf dem Chip konfiguriert und initialisiert. Das Labor wird dabei von einem »Standby«-Zustand »LABOR« zu einem definierten Zustand »LABOR\*« hin umkonfiguriert. Eine Kryoprobe mit Chip kann also ein **ChameleonLab**-Labor spezifisch verändern und steuern. Effizienz und Probensicherheit werden signifikant erhöht.

von Labor-Dokumentationsdaten eine weitere wesentliche Rolle.

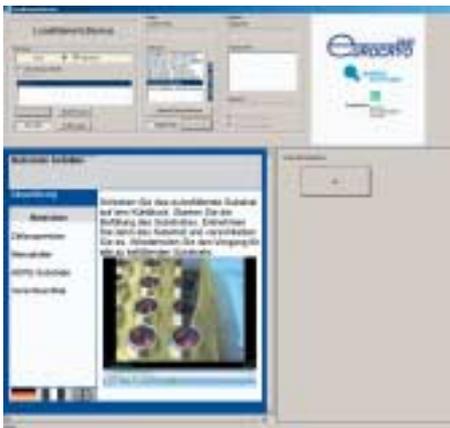
**ChameleonLab** ist ein adaptives Labormanagementsystem, das sich jeder beliebigen Probe anpasst, indem sich das Labor gemäß der Workflow-Definition konfiguriert. Die Ausführung

der Workflows wird durch **ChameleonLab** vollständig gesteuert und überwacht. **ChameleonLab** basiert auf den folgenden drei Prinzipien:

- Die einer Probe zugeordneten Workflow-Definitionen werden bei der Probe gespeichert, konkret beispiels-



Bildschirmfoto des **ChameleonLab**-Servers.



Bildschirmfoto eines **ChameleonLab**-Clients (hier Nanoplotter für DMSO-Zugabe).

weise auf dem angekoppelten Speicherchip.

- Anstatt eine Referenz auf eine existierende Workflow-Definition (beispielsweise in einer Datenbank) zu sein, ist die Workflow-Definition eine detaillierte Definition aller Schritte des Probenworkflows. Das bedeutet, dass jedes Labor, das **ChameleonLab** verwendet, auch solche Workflows ausführen kann, die dem Labor vor Ankunft einer Probe mit der entsprechenden Definition völlig unbekannt waren. Die Workflow-Definition ist so aufgebaut, dass sie auch für direkte Geräteansteuerung verwendet werden kann. Die Probe steuert somit das Verhalten des Labors, von rein manuellen Labors bis hin zu vollautomatisierten Labors.

- Die Dokumentationsdaten jeder Workflow-Durchführung werden bei der Probe gespeichert.

**ChameleonLab** ist seit Herbst 2003 in der Forschungs- und Demonstrationskryobank der Fraunhofer-Gesellschaft **eurocryoSaar** im Einsatz. Alle Kryolaboratorien werden von **ChameleonLab** auf die jeweils aktuelle Probe adaptiert und vollständig während eines Workflows gesteuert. Eine webbasierte Proben Datenbank ist mit **ChameleonLab** verbunden und synchronisiert, die das Definieren von Workflows erlaubt und Tieftemperatur-Speicherchips initialisieren kann.



## Kontakt

Dipl.-Inform. Christopher Durst /  
 Prof. Dr. Heiko Zimmermann  
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
 Technik (IBMT)  
 Kryobiophysik & Kryotechnologie  
 Ensheimer Straße 48  
 66386 St. Ingbert  
 Telefon: 06894 / 980-258  
 Fax: 06894 / 980-400  
 christopher.durst@ibmt.fraunhofer.de

## Kryoequipment & Kryorobotik

Das Konzept der Kryoforschungsbank am IBMT öffnet neue Wege der individuellen als auch massenhaften Kryokonservierung von Zellen. Die Qualität und Zahl der Zellproben stellen neue Anforderungen an die Kryotechnik. Das im Vergleich zu konventionellen Banken geringe Volumen und besonders die hohe Zahl der Proben machen automatisiertes Probenhandling unerlässlich für einen wirtschaftlichen Betrieb der Bank. Gleichzeitig wird die Prozessqualität der Probenlagerung gesteigert.

Die gegenwärtig genutzten Techniken stammen häufig aus dem klinischen Bereich oder der Forschung. Sie sind

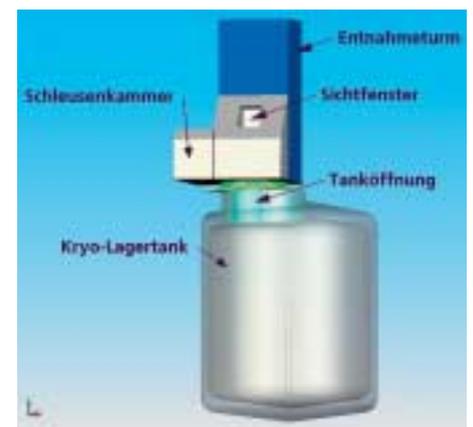
personalintensiv und nicht geeignet für die Bewältigung hoher Probenzahlen. Die Verfügbarkeit von Automatisierungslösungen in diesem Bereich stellt die Basistechnologie für eine Vielzahl neuer Automatisierungsmodelle in der Tieftemperatur-Biotechnologie dar.

Die Weiterentwicklung von Kryoequipment unter diesen Gesichtspunkten schlägt technologisch die Brücke zwischen den biophysikalischen Anforderungen und den produktiven Rahmenbedingungen einer modernen Kryobank. Angefangen von Einfrier-/Auf-taegeräten für parallelen und hohen Probendurchsatz bis hin zu automatisierten Entnahmesystemen reicht die Palette der IBMT-Entwicklungen, die für einen wirtschaftlichen und sicheren Betrieb einer Zellbank notwendig sind. Die Geräte müssen präzise unter Temperaturen funktionieren, die bisher allenfalls für seltene Anwendungsfälle wie die Supraleitung oder die Satellitentechnik erforderlich waren. Die heute am Markt verfügbare Technologie im Bereich Robotik oder Automatisierung ist für Temperaturen unterhalb  $-130\text{ °C}$  nicht einsetzbar und muss an entscheidenden Stellen von Grund auf neu entwickelt werden. Besondere Rahmenbedingungen sind hierbei zum Beispiel der völlige Verzicht auf flüssige Schmiermittel und die Berücksichtigung der unterschiedlichen physikalischen und elastischen Eigenschaften von Stoffen, z.B. Ausdehnungskoeffizient und Versprödung, bei extremen Temperaturänderungen.

Personalintensives Arbeiten mit den Proben ist aufwendig und risikoreich, insbesondere was die Verwechslungssicherheit betrifft. Roboter und Automation verhindern in einer kalten Stickstoffatmosphäre kritische Erwärmung und Kontamination und sichern die Qualität der Prozesse im Umgang mit den Proben in dokumentierbarer Weise.



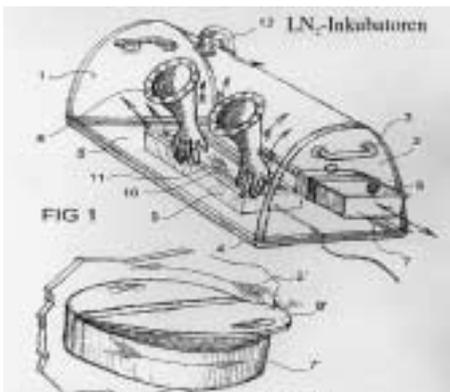
»Klassische« Probenentnahme mit über die Monate akkumulativer Eisbildung auf Oberflächen (Substrat, Container, Tankinneres) und Unterbrechung der Kühlkette.



CAD-Entwicklung eines Entnahmeturms (gekühlt mit »trockener« Stickstoffatmosphäre) mit Schleusenfunktion zur Verhinderung der Eisbildung bei der gekühlten Probenentnahme. Im ersten Automatisierungsschritt auf einem Kryo-Lagertank.



Serienmuster eines Entnahmeturms zur manuellen Entnahme. Über thermisch isolierte Handschuheingriffe kann auf tiefgekühlte Substratcontainer zugegriffen werden, ohne dass diese mit feuchter Atmosphäre in Berührung kommen oder in undefinierter Weise erwärmt werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass bei einer Langzeitlagerung bereits eine Erwärmung über  $-80\text{ °C}$  zu zellschädigenden Umkristallisierungen führt, Proben also auch bei kurzzeitiger Erwärmung im Gefrierbereich Veränderungen unterliegen.



Aus einem Liter flüssigen Stickstoffs bilden sich bei der Verdampfung einige hundert Liter Stickstoffgas. Dieser Effekt wird zur Erzeugung einer Stickstoffatmosphäre benutzt, indem ein Flüssigreservoir an  $\text{LN}_2$  für permanente Kühlung und Stickstoffgasproduktion sorgt, so dass die Hauben nicht gasdicht und dennoch als Steril-Inkubatoren genutzt werden können. Das System ist über Schleusen von der Seite oder oben be- und entsorgt.

## Lösungselemente / Angebote

- Einfrier- und Befüllsysteme wie Pipettierer für
  - Zellsuspensionen (Einbringung in unterschiedliche Substratformen (Schlauch, Töpfchen,...))
  - Kryosubstrate zur Probenaufnahme aus unterschiedlichen Materialien wie Silizium und geeigneten Kunststoffen
- Vereinzlungssysteme für die Proben-separierung aus den Substraten bei tiefen Temperaturen
- Kryotanquipment wie Schleusen-systeme oder Entnahmeturm zur Aufnahme und Bearbeitung der Probensubstrate in der kalten Gasphase des inerten Stickstoffgases (Abbildung)
- Intelligente Storage-Systeme zum sicheren Transport der Probe mit Flüssigstickstoffkühlung inhouse, aber auch zum Versand mit öffentlichen Verkehrsmitteln und Speditionen/Paketdiensten
- Haubensysteme zur Sicherung der Kühlkette und zur Verhinderung von Reif- und Eisniederschlägen auf den tiefkalten Oberflächen der Kryoproben und -tanks
- IT-Systeme zur Datenkommunikation mit den tieftemperaturfesten Speicherchips

Über der interdisziplinären Beantwortung aller ingenieurwissenschaftlichen und physikalischen Fragestellungen stehen die biologischen Anforderungen und damit das Ziel die Zellen mit optimalen Überlebensraten an die Nutzer zu übergeben.

Das IBMT bietet seinen Partnern aus Wissenschaft und Industrie Erfahrung und Kompetenz in den Bereichen Kryoprozesstechnik und Kryoequipment (selbstverständlich auch über den Einsatz in der Kryoforschungsbank hinaus) an.

Angebote sind:

- Entwicklung kryotechnologischer Prozesse im Temperaturbereich  $-196\text{ °C}$  bis  $+40\text{ °C}$
- Entwicklung von Kryoequipment im Temperaturbereich  $-196\text{ °C}$  bis  $-130\text{ °C}$
- Entwicklung von Sensorik zur Prozessüberwachung (Temperatur, Luftfeuchtigkeit,...) im Temperaturbereich  $-196\text{ °C}$  bis  $-130\text{ °C}$
- Prozessentwicklung für Probenlogistik
- IT-Systeme zur Ablage und Kontrolle der Proben Daten

## Forschungs- und Entwicklungslabore

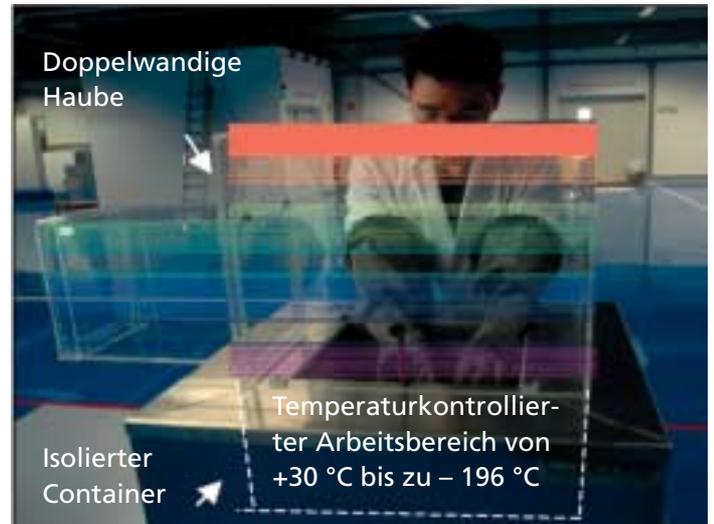
- $160\text{ m}^2$  Laborräume
- Stickstoffanlagentechnik

In der Projektdurchführung sind die Mitarbeiter ein eingespieltes Team, eingebunden in leistungsfähige, interne Instituts-Arbeitsgruppen wie:

- Elektronikentwicklung
- Werkstatt mit durchgängiger CAD/CAM-Struktur
- Informationstechnologie und Softwareentwicklungsgruppe



**eurocryo**-Einfrierautomat unter Verwendung der Haubentechnologie zur Vermeidung von Reif- und Oberflächeneisbildung für Temperaturregelungen bis 0,1 °C Genauigkeit.



Haubentechnologie zum kontaminationsfreien Arbeiten bei frei wählbaren Temperaturen in gut isolierten Kryoboxen ohne Beschlagen der Proben und Nebelbildung, eine Entwicklung des IBMT. Die Hauben-Kühlbox-Systeme können entweder manuell oder automatisch mit flüssigem Stickstoff in einer saugfähigen Matrix über Stunden gekühlt werden. Vom Boden zur Haube entwickelt sich rasch ein stabiler Temperaturgradient von  $-196\text{ °C}$  unten zu  $+20\text{ °C}$  oben. Auf Ablagen in verschiedener Höhe können auf diese Weise Zellproben bei jeder gewünschten Temperatur gelagert und bearbeitet werden. Das System ist preiswert und lässt sich zu einem parallelen Gefrier-/Auftauautomaten erweitern. Es stellt damit ein Grundgerät zukünftiger Kryolabore in Biotechnologie und Medizin dar.

## Kontakt

Dipl.-Phys. Uwe Schön  
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
 Technik (IBMT)  
 Kryoequipment & Kryorobotik  
 Industriestraße 5  
 66280 Sulzbach  
 Telefon: 06897 / 9071-30  
 Fax: 06897 / 9071-99  
[uwe.schoen@ibmt.fraunhofer.de](mailto:uwe.schoen@ibmt.fraunhofer.de)



## Kryoforschungs- und Demonstrationsbank – Langzeitlagerung lebender Zellproben



Ein Blick in die Kryolagerhalle. Jeder Kryo-Lagertank ist an die automatische Versorgung mit flüssigem Stickstoff angeschlossen.



Kryolagerbehälter mit Tankcomputer-Grundeinheit der Kryobanken. Hierin lagern tausende kryokonservierter Zellproben wie in einer überdimensionalen Thermoskanne bei Temperaturen unter  $-130\text{ °C}$  in der Gasphase.

Sollten sich die regenerative Medizin und die sich aus diesem Ansatz entwickelnden Behandlungsmethoden in der Weise entwickeln, wie es sich gegenwärtig abzeichnet, wird – wie bereits erläutert – in naher Zukunft ein enormer Bedarf an vorübergehender als auch langfristiger Lagerung lebender Zellen in Form von Zellsuspensionen und Gewebesegmente bestehen. Neben der medizinischen Nutzung wird unverändertes Zellmaterial für Forschungszwecke, für kommerzielle Nutzungen und für hoheitliche Aufgaben (z.B. Gesundheitsfürsorge), zur Erfassung von Veränderungen im Genom und letztendlich der durch den Menschen beeinflussten Umwelt benötigt. Auf Basis der am Fraunhofer IBMT auf diesem Gebiet entwickelten Technologie können in kurzer Zeit, standardisiert und mit höchster Qualität Kryobanken aufgebaut und mit Referenz zum Zentrum für Kryobiotechnologie (**eurowcryoSaar**) betrieben werden. Nur auf diese Weise kann die enorme Zahl miniaturisierter Einzelproben nach modernsten Richtlinien verarbeitet und verwechslungs- sowie

kontaminationsfrei gelagert werden. Dabei kommen modernste Datenverarbeitungstechnologien zum Einsatz, die alle Auflagen des Datenschutzes (z.B. im Zusammenhang mit dem Umgang mit Patientendaten) erfüllen und einen schnellen und sicheren Proben- und Datenzugriff ermöglichen.

Ohne die Kryokonservierung von Zell- und Gewebeprobe, d.h. die Lagerung lebender Proben, ist die Anwendung einer molekularen oder zellulären Biotechnologie im großindustriellen Maßstab riskant, wahrscheinlich sogar unmöglich. Das Fraunhofer IBMT mit seinem Zentrum für Kryobiotechnologie ist gegenwärtig weltweit die einzige Forschungseinrichtung, die Tieftemperatur-Technologien im industriellen Maßstab für die Biotechnologie und Medizin entwickelt. **eurowcryoSaar**, die Kryobank am Fraunhofer IBMT, fungiert als Referenz-, Forschungs- und Rückstellprobenbank sowie Technologiedrehscheibe für die Forschung und Wirtschaft in Deutschland und Europa. Kryotechnologische Neuerungen, die in der Abteilung Kryobiophysik & Kryotechnologie am Fraunhofer IBMT entwickelt werden, können sofort und im industriellen Maßstab in der Kryobank in Sulzbach erprobt und für Nutzer modifiziert werden. Die Forschungsbank trägt neben der Funktion als Bioressource den Charakter einer Modell- und Demonstrationsbank.

### Ausstattung der Kryobank

Aufgrund der erforderlichen Lagertemperatur unter  $-130\text{ °C}$  ist die Kälteerzeugung aus elektrischer Energie ökologisch und ökonomisch gegenwärtig weniger günstig im Vergleich zur Kühlung mit flüssigem Stickstoff. Die Zellproben dürfen allerdings aus Gründen der Kontaminationsgefahr nicht ohne dichte Umhüllung in den flüssigen Stickstoff eintauchen. Alternativ werden die Proben im Gasraum über einem See aus flüssigem Stickstoff in großen, aus Edelstahl gefertigten

Behältnissen, den Kryolagerbehältern, aufbewahrt.

In der Fraunhofer-Kryobank **eurocryo-Saar** finden Kryolagerbehälter auf über 1 200 m<sup>2</sup> Stellfläche Platz. Die Behälter sind in eine vollautomatische, mehrfach abgesicherte Flüssigstickstoffversorgung eingebunden. Ein zweifach redundantes System verhindert die unerwünschte Überfüllung der Behälter. Alle stickstoffführenden Gefäße, das sind der große Stickstoffvorratsbehälter vor der Halle, die Stickstoffzuleitungen und die Kryolagerbehälter, sind vakuumisoliert, was den Verbrauch an Flüssigstickstoff und den Kälteeintrag in die Kryohalle niedrig hält. Damit ist eine kostengünstige und kühlmittoptimierte Lagerung ein Vorteil der Sulzbacher Kryobank und ein Angebot für Fremdnutzer zur temporären Auslagerung von Proben.

In der Kryohalle ist eine Lüftungsanlage installiert, die pro Stunde viermal das gesamte Luftvolumen der Halle austauscht. Dies ist erforderlich, da die Kryolagerbehälter aufgrund des eingesetzten Kühlverfahrens mit Flüssigstickstoff beständig gasförmigen Stickstoff abgeben.

Im normalen Betriebszustand ist dies völlig unproblematisch, da unsere Atemluft zu 78% aus Stickstoff besteht. Alle Räumlichkeiten, in denen Flüssigstickstoff zum Einsatz kommt, sind mit einer Sauerstoffmangel-Überwachungsanlage ausgestattet. Sollte bei einem i. d. R. äußerst unwahrscheinlichen Störfall vermehrt Stickstoff freigesetzt werden und somit durch die damit verbundene Volumenverdrängung der Atemluft der Sauerstoffgehalt in einen für das Bedienungspersonal gesundheitskritischen Bereich absinken, wird die Lüftungsanlage auf den doppelten bis vierfachen Luftdurchsatz geschaltet und die Stickstoffversorgung unterbrochen. Gleichzeitig gibt das Sicherheitssystem ein optisches und akustisches Warnsignal.

Die Temperaturverläufe an den Proben werden für den Nutzer protokolliert. Für eine qualitätvolle Lagerung von Lebendproben für medizinische Anwendungen sind auch über Jahrzehnte lückenlose Temperatur-Zeitprofile zu fordern, da auch eine kurzzeitige Erwärmung den Verlust der Zellvitalität und die Wertlosigkeit der Probe zur Folge haben kann.

Das Fraunhofer IBMT besitzt umfangreiche Erfahrung bei der Konzeption und der Baubegleitung von Kryobanken, wie sie an medizinischen Einrichtungen, biologischen Instituten, in der Pharma- und Biotechnologieindustrie, für kommerzielle Kryobanken sowie im Bereich öffentlicher Sammlungen benötigt werden.

### Laboreinrichtung

Für alle im Umfeld der Kryotechnologie erforderlichen Anwendungszwecke sind an die Kryobank angegliederte Labore erforderlich. Das sind zum Beispiel Labore zur Präparation medizinischer Proben und Labore für kontaminierte Zellsuspensionen. Hierzu entwickelt das IBMT Mustereinheiten, in denen Neuentwicklungen verifiziert und für den wissenschaftlichen und industriellen Einsatz angepasst werden. In den modularen Laboreinheiten finden GMP-Standards und andere Regelungen beim Umgang mit humanem und tierischem Material Berücksichtigung.

Die eigentliche Behandlung der Zellproben erfolgt in den biologischen Laboren mit S1- bis S2-Sicherheitsstandard. In eigens dafür entwickelten Laboreinheiten lassen sich Proben charakterisieren, Kryoprozeduren erproben, die Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität und anderer biologischer und medizinisch relevanter Parameter untersuchen und für die Tieftemperaturkonservierung vorbereiten.



Vorratsbehälter für flüssigen Stickstoff (25 000 Liter) als Zentralversorgung für industriell skalierte Kryobanken.



Vergleich der kleinen herkömmlichen Kryoproberöhrchen mit den am IBMT entwickelten miniaturisierten und Memory-Chip-kombinierten Substraten.

### Datenbanksystem

Das zu erwartende Probenaufkommen ist ohne die Hilfe eines außerordentlich flexiblen und sich selbst optimierenden (evolutiven) Datenbanksystems nicht handhabbar. Einerseits müssen die Proben in den Kryolagerbehältern systematisch eingelagert und in kürzester Zeit wiedergefunden werden. Andererseits müssen auch die Daten, die an den Proben gespeichert sind, aktualisiert und in einer externen Datenbank



Steuerzentrale der Kryoforschungsbank mit automatischer Überwachung und Versorgung von Kryobehältern.

gespiegelt werden, damit ein schneller Zugriff und eine höchsten Anforderungen genügende Datensicherheit gewährleistet werden können.

#### Angebote

- Einlagerung von biologischem Material für Forschungszwecke
- Erprobung von kundenspezifisch entwickeltem Kryoequipment (Substrate, Heiz-/Kühlische, Mikroskope etc.)
- Erprobung von Kryoprozeduren
- Design und Konzeption von Kryobanken
- Beratung bei der Modernisierung vorhandener Kryobanken
- Erprobung von Kryobankkonzepten

#### Ausstattung

- Mehr als 1 200 m<sup>2</sup> Stellplatz für Kryobehälter
- 25 000 l Vorratstank für Flüssigstickstoff
- Vollautomatisches Nachfüllsystem für Flüssigstickstoff
- Sauerstoffmangelüberwachung
- Vollautomatische Lüftungsanlage
- Notstromversorgung
- Einbruchmeldeanlage mit GSM-Benachrichtigung
- Mehrere physikalische und biologische Labore (Vorbereitung bis Sicherheitsstufe S2)
- Vorbereitung für Laborcontainer (bei Bedarf höherer Sicherheitsstufen)



#### Kontakt

Dr. Frank Obergriesser  
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische  
 Technik  
 Kryoforschungsbank  
 Industriestraße 5  
 66280 Sulzbach  
 Telefon: 06897 / 9701-90  
 Fax: 06897 / 9071-99  
[frank.obergriesser@ibmt.fraunhofer.de](mailto:frank.obergriesser@ibmt.fraunhofer.de)

## Startschuss für die Kryo-Biotechnologie im Saarland

Am 29. Oktober 2002 wurde mit der »Trilateralen Initiative für die Biotechnologie« ein Forschungsbündnis zwischen der Universität des Saarlandes, der Hochschule für Technik und Wirtschaft, der saarländischen Landesregierung und dem Fraunhofer IBMT ins Leben gerufen, das die Förderung der molekularen und zellulären Biotechnologie zum Ziel hat. Im Rahmen dieser Forschungsk Kooperation erhielt auch die Kryotechnologie maßgebliche Impulse.

Bereits vor dem offiziellen Start dieser Initiative wurde vom Wirtschaftsministerium des Saarlandes am Fraunhofer IBMT die Einrichtung einer Kryobank durch den Ausbau des Standortes Sulzbach gefördert.

## Vom Möbellager zum hochmodernen Zellsafe

Vom Beginn der Planung bis zur Einlagerung der ersten Kryotestproben vergingen nur 15 Monate. In dieser Zeit wurde ein ehemaliges Möbellager in eine hochmoderne und bisher weltweit einzigartige Kryobank umgestaltet. Von der alten Halle sind nur das Stahlskelett und die innere Dachfläche erhalten. Das Dach, die Außenhaut, der Boden und die gesamten gebäudetechnischen Installationen wurden durch zeitgemäße Materialien ersetzt. Vor der Halle wurde ein großer Vorratsbehälter für Flüssigstickstoff errichtet, der wegen der technisch einfacheren Flüssigstickstoffversorgung auf einem Beton-Stahlfundament in vier Metern Höhe steht. Diese Modernisierungsmaßnahmen und die zentraleuropäische Lage mit guter Anbindung an drei Autobahnen, den Flughafen und das Eisenbahnnetz bieten eine ideale Voraussetzung, die Funktion einer technologischen Drehscheibe auch auf europäischer Ebene zu spielen.



Unterschrift unter den Vertrag der »Trilateralen Initiative« zur Entwicklung der Biotechnologie im Saarland am 29. Oktober 2002 in der saarländischen Staatskanzlei. Zwischen der Fraunhofer-Gesellschaft, den Hochschulen des Saarlandes, vertreten durch die Universität des Saarlandes und die Hochschule für Wirtschaft und Technik, sowie der Landesregierung wurden die Förderung der Nanobiotechnologie und auch der weitere Ausbau der in Sulzbach befindlichen Kryobiotechnologie-Einrichtung beschlossen.  
(v.l.n.r. Professor Wolfgang Cornetz (Rektor der Hochschule für Technik und Wirtschaft), Jürgen Schreier (Minister für Bildung, Wissenschaft und Kultur des Saarlandes), Professor Hans-Jürgen Warnecke (Alt-Präsident der Fraunhofer-Gesellschaft), Doktor Hanspeter Georgi (Wirtschaftsminister des Saarlandes), Professor Margret Wintermantel (Präsidentin der Universität des Saarlandes).

Am 9. September 2003 stand die Kryohalle mit einer Vielzahl neu entwickelter Kryogerätschaften zur Nutzung bereit. Die Kryobank wurde in einem Festakt vom saarländischen Ministerpräsidenten, Peter Müller, vom Präsidenten der Fraunhofer-Gesellschaft, Professor Hans-Jörg Bullinger, und dem Leiter der Abteilung Gesundheit, Biowissenschaften und Nachhaltigkeit im Bundesministerium für Bildung und Forschung, Ministerialdirektor Reinhard Junker, eröffnet.

Bereits im ersten Jahr der Nutzung besuchten namhafte Wissenschaftler und Politiker die Demonstrationsbank, um sich ein Bild von der am IBMT entwickelten Technologie zu machen.

Einen weiteren Höhepunkt in der kurzen Geschichte der Kryobank stellte der Besuch des Bundespräsidenten, Professor Horst Köhler, am 18. Dezem-

ber 2004 dar. Über einen Vortrag und einen Rundgang in Begleitung der Landesregierung des Saarlandes sowie lokaler politischer Vertreter ließ sich der Bundespräsident die Anforderungen der zukünftigen Biotechnologie und der erwarteten regenerativen Medizin erläutern und demonstrieren. Er würdigte den fortschrittlichen Biotechnologiestandort Saarland und die Technologieplattform des Fraunhofer IBMT.



Kryohalle während der Sanierungsarbeiten der Außenwände und des Halleninnenbereichs.



Außenansicht der Kryoforschungs- und Demonstrationsbank **eurocryoSaar** der Fraunhofer-Gesellschaft am Standort Sulzbach/Saar nach der Fertigstellung.



Die Kryoforschungsbank **eurocryoSaar** am Fraunhofer IBMT. Von der Planung über die Realisierung ein Beispiel gelebten Technologietransfers von der Forschung bis in die Praxis.



Symbolischer Knopfdruck zur Inbetriebnahme der Kryoforschungsbank im Rahmen der Einweihungsfeier am 9. September 2003 durch den Ministerpräsidenten des Saarlandes, Herrn Peter Müller, den Präsidenten der Fraunhofer-Gesellschaft, Herrn Professor Hans-Jörg Bullinger, und den Leiter der Abteilung Gesundheit, Biowissenschaften und Nachhaltigkeit im Bundesministerium für Bildung und Forschung, Herrn Ministerialdirektor Reinhard Junker.



Besuch von Professor Sir George Radda (MRC, CBE, FRS), Universität Oxford, am 3. September 2004, der in einem Vortrag die Bedeutung der Stammzellablage und die Organisation der Britischen Stammzellbank erläuterte (v.l.n.r.: der Ministerpräsident des Saarlandes, Peter Müller, der Gründungsdirektor des IBMT, Professor Klaus Gersonde, Sir George Radda und die Präsidentin der Universität des Saarlandes, Professor Margret Wintermantel).



Besuch des Bundespräsidenten, Professor Horst Köhler, in Begleitung der saarländischen Landesregierung, am 18. Dezember 2004 in der Kryoforschungsbank. Das Bild einer Größe von 2,5 MByte wurde während des Besuches aufgenommen und zur Demonstration der Tieftemperaturtauglichkeit der am Fraunhofer IBMT entwickelten Elektronik fünfzig Mal in elektronische Speicherchips, die sich im flüssigen Stickstoff befanden, abgelegt und wieder ausgelesen. Wie das Bild zeigt, blieb die Datenmenge und damit die Qualität des Bildes unverändert.

(v.l.n.r.: Jürgen Schreier (Minister für Bildung, Wissenschaft und Kultur des Saarlandes), Hans-Werner Zimmer (Bürgermeister der Stadt Sulzbach), Professor Günter Fuhr (Direktor des Fraunhofer IBMT), Frau Eva Luise Köhler, Professor Horst Köhler (Bundespräsident), Frau Astrid Gerke-Müller, Peter Müller (Ministerpräsident des Saarlandes), Hans Ley (Präsident des saarländischen Landtages).

## Kryobiophysik & Kryotechnologie

### Ausstattung & Angebote

- Tieftemperatur-Lagersysteme (bis  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mit medizinischer Zulassung
- Mikrokryosysteme
- Modifizierte, programmierbare Einfrier-Automaten für biologische, materialwissenschaftliche und elektronische Applikationen
- Zellbiologisches Labor
- Modifizierte Forschungsmikroskope
- Invertiertes Kryomikroskop (Eigenentwicklung, Peltier-basiert)
- Kombiniertes Reflexions-/Rasterkraftmikroskop für Messungen biologischer Objekte in wässriger Umgebung
- Test-Equipment (digital/analog) für Tieftemperatur-Elektronik
- Tieftemperatur-Messkammer für Elektronik-/Materialtests
- Thermographiesystem (Temperaturmessbereich  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- Mikropipettiersystem/Automatisierungsplattform
- »ChameleonLab«-basiertes Labormanagement
- Hochgeschwindigkeitskamerasystem für mikrotropfenbasiertes Einfrieren
- Infrarotlasersystem
- Standard-Kryomikroskope
- Tieftemperaturtaugliche Flash-Speichersysteme (lieferbar)



Elektronik zum multiplen Betrieb von tieftemperaturtauglichen elektronischen Speichersystemen. Die Abbildung zeigt einen Zugriff auf Flash-Speicher, die im flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) betrieben werden können. Das IBMT bietet derartige Memory-Chips auch für andere Anwendungen an.



Verschweißgerät für Proben. Das Gerät verschließt die mit einer Folie oder einem Deckel verschlossenen Substrate dauerhaft und robust durch thermisches Verschweißen, ohne die Proben stärker als ein Grad zu erwärmen.



Biomedizinische Ultrahochgeschwindigkeitsfotografie zur Optimierung von Schutzverkapselungen für Zellen für die Kryokonservierung.



Neuartige, platzsparende Kryosubstrate.



Tieftemperatur-Messtechnik und Teststation für Tieftemperaturspeicher.

# Kryoequipment & Kryorobotik

## Ausstattung & Angebote

- Computergesteuerte Einfrier-Automaten
- Kryotank-Entnahmesysteme
- Probenhandling und Schleusensysteme
- Kaltgasgeräte
- Kryotransportbehälter (Eigenentwicklungen)
- 20-Kanal-Kryo-Temperaturmesssysteme
- Kryoroboter zum Probenhandling
- LN<sub>2</sub>-Füllstand-Ultraschall-Messsysteme



Universelle Haubentechnik zum Arbeiten unter trockener Stickstoffatmosphäre und im Temperaturintervall zwischen -196 °C und +40 °C. Low-Cost-Gefrierautomat.



Am IBMT entwickelter Einfrierautomat zum computer-gesteuerten Einfrieren und Auftauen von Proben. Das System ist hochgenau, arbeitet leise und ist auf die Erfordernisse der miniaturisierten Proben optimal angepasst.

## Nachwuchsgruppe »Kryo-Nanobiotechnologie« des BMBF

### Ausstattung & Angebote

- Mikroverkapselungsanlage (Crystal-Gun-Prinzip)
- »Freezing-Spin-Coater« für das Frieren ultradünner Schichten (Eigenentwicklung)
- Infrarotlasersystem für das hoch-lokalisierte und hochdefinierte Erwärmen dünner Schichten



Verkapselungsanlage mit Crystal-Gun für die Alginat-Verkapselung als extrazelluläres Kryoprotektivum.

# Kryoforschungsbank

## Ausstattung & Angebote

Die Forschungs- und Demonstrationskryobank ist durch die folgenden Ausstattungsmerkmale gekennzeichnet:

- Tieftemperaturlagersysteme (–130 bis –196 °C) mit medizinischer Zulassung
- Programmierbare Einfrierautomaten
- Zellbiologisches Labor
- CO<sub>2</sub>-Inkubator
- Nanoplotter
- Ultratiefkühltruhe mit Kohlendioxid-Notkühlung
- Sterilwerkbank
- Zellkulturmikroskop für Hellfeld-, Phasenkontrast und variablen Reliefkontrast sowie Fluoreszenz
- Hochsicherheitscontainer
- Fileserver mit RAID-System
- Test- und Entwicklungsserver
- Datenbankserver mit RAID-Systemen und LTO-Bandlaufwerk
- Sauerstoffmangelüberwachung
- Einbruchmeldeanlage
- Notstromaggregat 15kVA
- Vorrattank für 25 000 Liter Flüssigstickstoff



Konzeption und Design von Kryokleinstbanken für biologische und medizinische Anwendungen.



Die gesamte Kryobank wird von einer Zentrale aus überwacht. Hier laufen alle Signale der Kryolagerbehälter, der Alarmanlage, der Videoüberwachung und der Lüftungsanlage zusammen.



Konzeption und Design von industriell skalierten Kryobanken.



Die Kryolagertanks befinden sich in einem Sicherheitsbereich. Nur wenige Mitarbeiter haben hier Zugang.



Die Kryolagerbehälter sind in ein vollautomatisches Überwachungs- und Befüllsystem eingebunden. Jeder Kryolagerbehälter ist mit einem Überwachungs-PC ausgestattet.



In den biologischen Universallaboren werden die Zellproben unter sterilen Bedingungen in die Lagergefäße verfüllt und versiegelt.



Der Aufbau des Kryolabors orientiert sich am Durchlauf der Proben in der Kryobank. Somit kann ein hoher Probandurchsatz erreicht werden.



Für die manuelle oder auch automatische Befüllung der Kryolagergefäße stehen Sterilbänke und Prozessautomaten zur Verfügung.



**Fraunhofer** Institut  
Biomedizinische  
Technik

## 1. Kontrollierte und dokumentierte Ablage von Proben

Sie besitzen eine eigene Kryobank. Dringend erforderliche Kapazitäten werden durch wenig genutzte Backups oder Reserveproben blockiert. Wir lagern für Sie in einer der modernsten Kryobanken, in Ihren oder in unseren Behältern, Ihre Proben ein. Sie erhalten eine vollständige Dokumentation und Überwachungsprotokolle bei garantiert sachgemäßer und zugangsreglementierter Handhabung und lückenloser Verwaltung.

## 2. Anlage eines Sicherheitsdepots

Sie besitzen besonders wertvolle, nicht ersetzbare Bioproben. Die Lagerung an einem Ort wird mit steigender Probenzahl immer riskanter. Wir legen für Sie eine Sicherheitsbank, ggf. in einer Hochsicherheitstankkonfiguration an. Sie haben jederzeit Zugriff und datengeschützten Zugang über unsere Kundendatenbank. Das IBMT ist führend auf dem Gebiet des geschützten Datentransfers im Bereich der ambulanten und klinischen Medizin. Eine Expertise, die wir in die Kryotechnologie einbringen. Unser Markenzeichen ist PaDok®.

## 3. Modernisierung einer vorhandenen Kryobank

Sie besitzen eine Kryobank konventioneller Technologie und wollen diese modernisieren. Wir bieten Ihnen vorhandene als auch spezifisch für Ihre Anwendung zu entwickelnde Kryosubstrate, Kryoequipment, Kryoautomaten und Kryodatenbanken an. Wir schaffen durch den Einsatz miniaturisierter Substrate mit integrierten elektronischen Speicherchips freie Kapazität, Verwechslungssicherheit der Proben und raschen Zugriff.

## 4. Aufbau einer eigenen Kryobank

Sie haben sich entschlossen, eine eigene Kryobank aufzubauen und benötigen sachkundige Unterstützung bei der Planung, dem Bau und der Entwicklung der Bank an Ihrem Standort. Wir betreuen Sie aus technischer, administrativer, biologischer und medizinischer Sicht. Auf Wunsch erstellen wir Ihnen spezifische Pläne für Ihre Fragestellungen und erläutern Ihnen die Vorteile der am Fraunhofer IBMT entwickelten Kryotechnologie vom zerlegbaren Substrat über die definierte Temperaturprofilierung bis zum Auftauen der Zellen. Ihre Bank wird für längere Zeit zu den modernsten der Welt gehören. Unser Angebot reicht von der Kleinbank im ambulanten Bereich über Forschungsbanken bis zu industriellen Großbanken.

## 5. Anlage einer Sammlung

Sie wollen eine Sammlung anlegen, scheuen jedoch die kostenintensive Installation und den permanenten Betrieb einer Kryobank. Wir stellen Ihnen Fläche und Behälter zur exklusiven Nutzung zur Verfügung. Wenn Sie es wünschen, übernehmen wir auch Ihre Kryotanks komplett. Wir installieren Ihnen eine problembezogene Datenbank mit kundenspezifischer Verwaltung, Suchportal etc.

## 6. Lösung kryomedizinischer und kryobiologischer Aufgaben

Sie wollen ein bestimmtes Zellmaterial lebend ablegen. Dabei treten technische oder biologische Schwierigkeiten auf. Wir stellen Ihnen hochqualifiziertes, interdisziplinär geschultes Personal zur Verfügung. Über das IBMT-Zentrum für Kryobiotechnologie und das Kompetenzzentrum MOTIV suchen wir im Rahmen schrittweise zu absolvierender Forschungs- und Entwicklungsprojekte nach einer Lösung für Sie.

## 7. Referenzen

Sie benötigen eine sachkundige, neutrale Bewertung Ihrer Proben oder Verfahren mit Bezug zur Kryotechnologie. Wir testen und prüfen Ihre Proben, Methoden und Verfahren nach den höchsten verfügbaren Standards und erstellen Prüfberichte, auf die Sie sich stützen können. Sie erhalten Hinweise über Probleme und, wenn möglich, Lösungsvorschläge.

## 8. Datenbankentwicklung und -anpassung

Sie benötigen für den Auf- oder Umbau Ihrer Kryobank ein adäquateres und flexibleres Datenbanksystem, das den Anforderungen hinsichtlich eines schnellen, datengeschützten und verwechslungssicheren Zugriffs genügt. Wir entwickeln in Zusammenarbeit mit Ihnen und/oder externen Partnern ein auf Ihre Bedürfnisse zugeschnittenes Datenbanksystem.

## 9. Öffentlichkeit und wissenschaftliche Kontakte

Die Fraunhofer-Gesellschaft hat einen hohen gesellschaftlichen und wissenschaftlichen Stellenwert sowie internationale Kontakte zur Industrie und Forschung in allen Kontinenten. Als Partner der Fraunhofer-Gesellschaft beweisen Sie nicht nur Ihr Engagement für Wissenschaft und Forschung, sondern erhalten Kontakte und Informationen, die ansonsten nur schwer zu bekommen sind. Mit über 11 000 Angestellten, Ingenieuren und Wissenschaftlern ist die Fraunhofer-Gesellschaft ein wichtiger Wirtschaftsfaktor. Über uns haben Sie hohe Kontaktchancen zu Entwicklern und potenziellen Kunden.

# Fraunhofer-Kryotechnologieplattform



## Kryobiophysik



Verständnis  
Optimierung  
Dokumentation  
der Einfrier- und  
Auftauprozesse

## Kryosubstrate



fraktionierbar  
miniaturisiert  
verwechslungssicher  
automatisierbar  
intelligent

## Kryoequipment



Befüllsysteme  
Heiz-Kühlische  
Kryomikroskope  
Transportbehälter  
Kryotanks

## Kryobank-Design



Konzeption  
Automatisierung  
Datenbanken  
Probenverwaltung  
Sicherheit

Fraunhofer-Institut für  
Biomedizinische Technik (IBMT)

Ensheimer Straße 48  
66386 St. Ingbert

Direktor  
Prof. Dr. Günter R. Fuhr

Telefon 0 68 94/980-100  
Fax 0 68 94/980-110

guenter.fuhr@ibmt.fraunhofer.de  
<http://www.ibmt.fraunhofer.de>

Kryobiophysik & Kryotechnologie  
Prof. Dr. Heiko Zimmermann

Telefon 0 68 94/980-257  
Fax 0 68 94/980-400

heiko.zimmermann@  
ibmt.fraunhofer.de

eurocryoSaar  
Dr. Frank Obergriesser

Industriestraße 5  
66280 Sulzbach

Telefon 0 68 97/90 71-90  
Fax 0 68 97/90 71-99

frank.obergriesser@  
ibmt.fraunhofer.de

## Möglichkeiten der Unterstützung gemeinnütziger Sammlungen – Kryotankspende & Patenschaft



Bereits über Tankspenden finanzierte 1 400 I-Kryotanks in der Kryoforschungsbank in Sulzbach. Auf Basis der neuen Technologie können mehr als 100 000 Lebendproben isolierter Zellen in einem Tank abgelegt werden.

Eine der wichtigsten Aufgaben unserer Generation ist die Anlage von Lebendsammlungen zur Bewahrung und unverfälschten Weitergabe der vorgefundenen einzigartigen biologischen Artenvielfalt an unsere Kinder und Kindeskinder. Neben der Technologieentwicklung und Erarbeitung kryobiophysikalischer Grundlagen legt das Fraunhofer IBMT daher auch wissenschaftliche Sammlungen gefährdeter oder seltener Organismen an. Diese Aktivität können Sie durch eine Spende oder die Finanzierung eines Kryotanks unterstützen.

### Zellsammlungen für die Zukunft

Wir können nicht alles, was die Natur bietet und der Mensch verändert, für die nachfolgenden Generationen dokumentieren und archivieren. Der Weg in das Zeitalter der Genetik und der autologen Medizin erfordert jedoch eine möglichst lückenlose Erfassung der Biosphäre, einmal aus wissen-

schaftlicher Sicht sowie aus Sicherheitsgründen, zum anderen als Reserve, aber auch als Lebendablage für spätere Nutzungen. Die vollständige Datenerfassung eines noch so kleinen Organismus ist bisher noch nicht möglich. Sie gelingt zur Zeit nur, wenn repräsentative lebende Zellen, isoliert aus dem Gewebe oder dem Blut unter Aufrechterhaltung der Vitalität eingefroren werden. Die am Fraunhofer IBMT entwickelte, mikrosystembasierte Kryotechnologie in einer industriell skalierten Musterforschungsbank ermöglicht es nun, Lebend-Zellsammlungen in Form von Zellsuspensionen und kleinsten Gewebeteilen von erheblichem Wert für uns und künftige Generationen anzulegen und kostengünstig zu verwalten. Mit Hilfe derartiger Lebendproben sind Veränderungen im Erbgut, der molekularen Ausstattung von Zellen, an Organellen oder auch der Ursprung von Krankheiten des Menschen, der Tiere oder Pflanzen zurückverfolgbar und somit wesentlich schneller und effektiver erkennen- und korrigierbar. Auch die durch Wissenschaftler veränderten Zellen können so bewahrt, hinterlegt und weltweit verfügbar gehalten werden. Die Kryobank-Technologie wird ohne Zweifel einen der Grundpfeiler der zukünftigen Biotechnologie, der Pharmakologie und der Medizin und damit des Wohlstandes und der Sicherheit unseres Landes bilden.

Trotz der enormen Kostenreduktion durch den Einsatz mikrosystemgestützter, intelligenter Kryosubstrate und automatisierbarer Kryobankabläufe wirft der parallele Aufbau derartiger unikaler, für spätere Generationen essenzieller Lebendzellsammlungen Initialkosten auf, die von einem gemeinnützigen Forschungsinstitut wie dem IBMT nicht vollständig alleine getragen werden können.

Zur Anlage von Bioressourcen der Zukunft rufen wir Unternehmen, Organisationen – aber auch Privatper-

sonen – auf, einen Beitrag zur Förderung der Biowissenschaften, insbesondere im Bereich der molekularen und zellulären Biotechnologie, der Medizin, des Umweltschutzes und der Dokumentation der Biosphäre für unsere Kinder zu leisten. Engagieren Sie sich für die Biowissenschaften des Saarlandes.

Legen Sie durch eine Tankspende den Grundstock für eine Lebendsammlung, werden Sie Kryotankpate!

**Behälterpatenschaft:**

Jeder Kryotankpate erhält eine Spendenbescheinigung der Fraunhofer-Gesellschaft und eine Gründungsplakette der Forschungskryobank des Fraunhofer IBMT. Die Spende ist einmalig, Folgekosten entstehen für Sie nicht. Außerdem wird im Besucherflur der Kryobank eine Messingplakette mit dem Namen bzw. der Firma des Spenders angebracht.

Folgende Tankfinanzierungen werden empfohlen:

gesamter Behälter	20.000,00 €
1/2 Behälter	10.000,00 €
1/4 Behälter	5.000,00 €

Zu jedem Behälter, den Sie finanzieren, trägt das Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik weitere 30 % der Kosten für den sofortigen Anschluss und die Nutzung in der Kryobank bei.

Kryosammlungen dieser Art stehen in direkter Traditionsfolge mit den »Wunderkammern« der Renaissance, den Naturkundemuseen und den zoologischen Gärten. Leisten Sie einen wichtigen Beitrag zur Förderung der Forschung und zum Aufbau wertvoller Zellsammlungen, den Bioressourcen der Zukunft, durch Ihre Beteiligung an einer Lebendsammlung neuer Dimension.



(Hintergrund: Konservierte Amphibien in der Kunst- und Naturalienkammer, Franckesche Stiftungen zu Halle an der Saale © Klaus E. Göltz, Halle.)

## Danksagung

Wir danken den folgenden Organisationen und Einrichtungen für Projektförderung und Unterstützung:

- Landesregierung des Saarlandes
- Ministerium für Wirtschaft des Saarlandes
- Ministerium für Bildung, Kultur und Wissenschaft des Saarlandes
- Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)
- Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.
- Verbund Life Sciences der Fraunhofer-Gesellschaft
- Industrielle Partner

# So finden Sie uns

## Prof. Dr. Günter R. Fuhr

Direktor  
Fraunhofer-Institut für  
Biomedizinische Technik (IBMT)  
Ensheimer Straße 48  
66386 St. Ingbert  
Telefon: 06894 / 980-100  
Fax: 06894 / 980-110  
gunter.fuhr@ibmt.fraunhofer.de  
<http://www.ibmt.fraunhofer.de>

## Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT)

Kryobiophysik & Kryotechnologie  
Ensheimer Straße 48  
66386 St. Ingbert  
Prof. Dr. Heiko Zimmermann  
Telefon: 06894 / 980-257  
Fax: 06894 / 980-400  
heiko.zimmermann@  
ibmt.fraunhofer.de  
<http://www.ibmt.fraunhofer.de>

---

### Auto

#### **Autobahn A 6 /** Ausfahrt

St. Ingbert-West, links abbiegen in Richtung Flughafen Saarbrücken-Ensheim, nach der Ampel links abbiegen in Richtung St. Ingbert-Süd (Ensheimer Straße), nach ca. 1,5 km liegt das Institut auf der linken Seite

**Autobahn A 1 /** bis Autobahnkreuz Saarbrücken, weiter Richtung Karlsruhe/Mannheim auf der A 8 bis Autobahnkreuz Neunkirchen, weiter in Richtung Saarbrücken auf der A 6

**Autobahn A 8 /** bis Autobahnkreuz Neunkirchen, weiter in Richtung Saarbrücken auf der A 6

**Autobahn A 4 /** bis Autobahndreieck Saarbrücken, weiter in Richtung Mannheim auf der A 6

---

### Bahn

ab Saarbrücken-Hbf. mit dem Taxi ca. 15 Minuten; mit dem Bahnbus oder mit dem Zug bis Bahnhof St. Ingbert, von dort mit dem Taxi ca. 1 Minute oder zu Fuß ca. 5 Minuten

---

### Flugzeug

ab Flughafen Saarbrücken-Ensheim mit dem Taxi 5-10 Minuten



# So finden Sie uns

## eurocryoSaar

Industriestraße 5  
66280 Sulzbach  
Dr. Frank Obergriesser  
Telefon: 06897 / 9071-90  
Fax: 06897 / 9071-99  
frank.obergriesser@  
ibmt.fraunhofer.de  
<http://www.ibmt.fraunhofer.de>  
<http://www.eurocryo.de>

### Auto

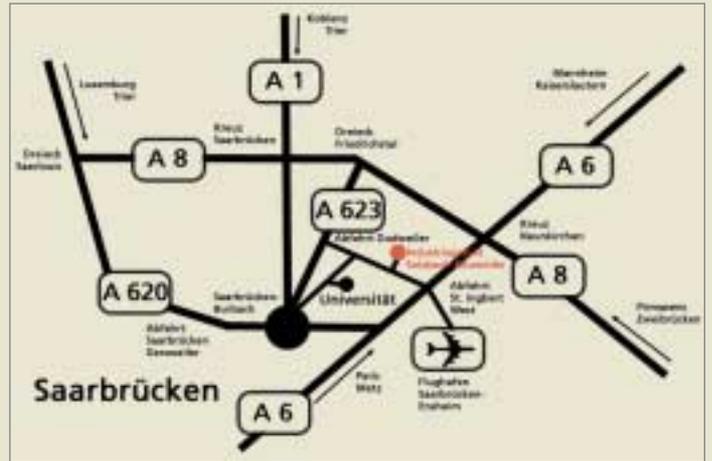
Aus Richtung Köln / Koblenz / Trier  
über die Autobahn A 1

Aus Richtung Frankreich (Paris /  
Metz) über die Autobahn A 6

Aus Richtung Luxemburg über die  
Autobahn A 623

Aus Richtung Mannheim / Kaisers-  
lautern / Karlsruhe über die Auto-  
bahn A 6

Aus Richtung Zweibrücken / Pirma-  
sens über die Autobahn A 8



**Autobahn A 6** Richtung Saar-  
brücken, Ausfahrt St. Ingbert-West,  
Hinweisschild: Richtung Sulzbach  
(ca. 6 km) folgen, vor Sulzbach  
Abfahrt „Industriegebiet Neuwei-  
ler“ nehmen, dem Hinweisschild  
„Fraunhofer-Institut“ folgend unter  
der Brücke durchfahren, erste  
Möglichkeit rechts, Hinweisschild  
„Fraunhofer-Institut“, nach 10 m  
rechts abbiegen, rechter Hand: Ein-  
fahrt durch blaues Doppelflügeltor



### Bahn

ab Saarbrücken-Hbf. mit dem Taxi  
ca. 20 Minuten

### Flugzeug

ab Flughafen Saarbrücken-Ensheim  
mit dem Taxi 10 Minuten

