Stabilität von kryokonservierten Proben

Johannes Schenkel

Deutsches Krebsforschungszentrum/

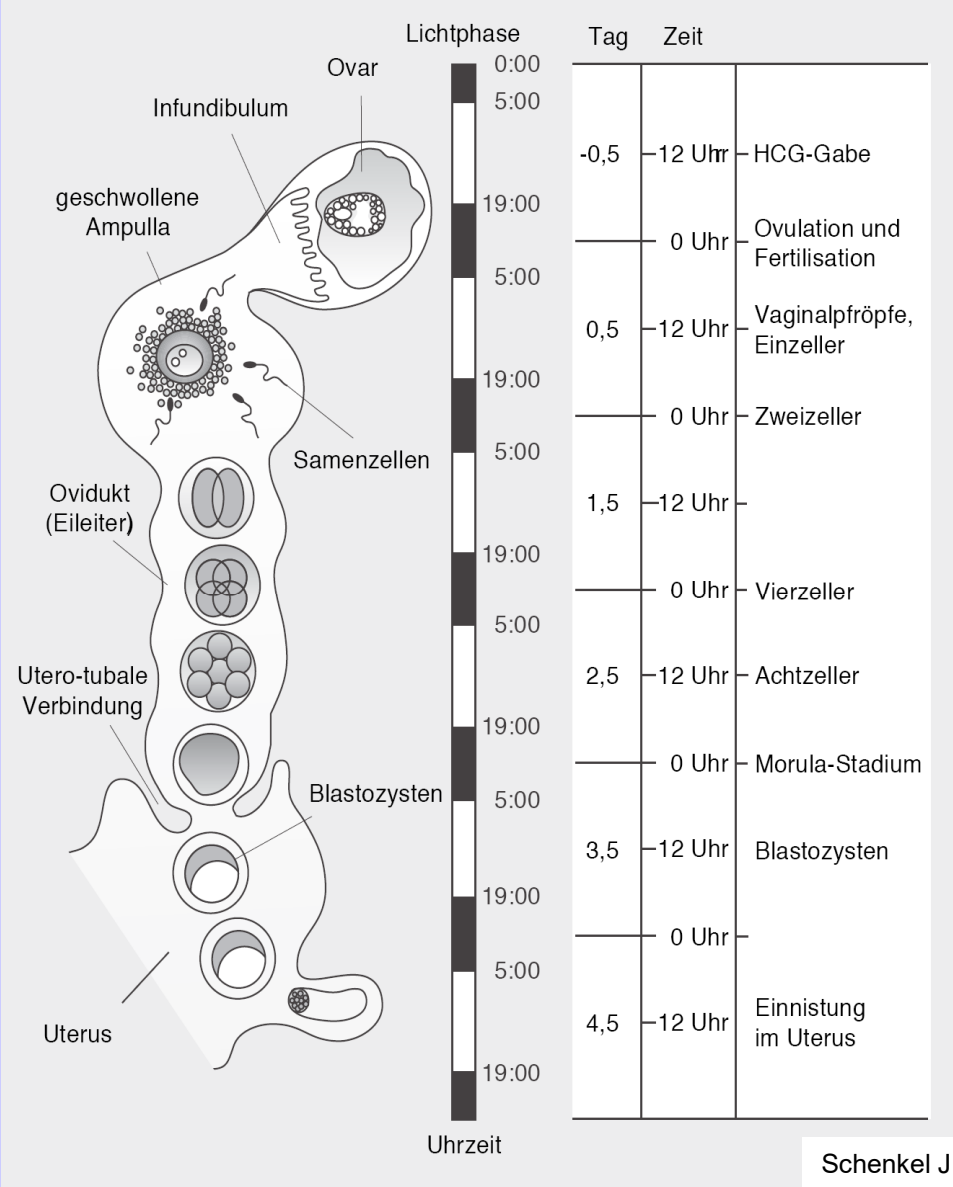
Universität, Heidelberg

j.schenkel@dkfz.de

Arbeiten mit GM Tieren....

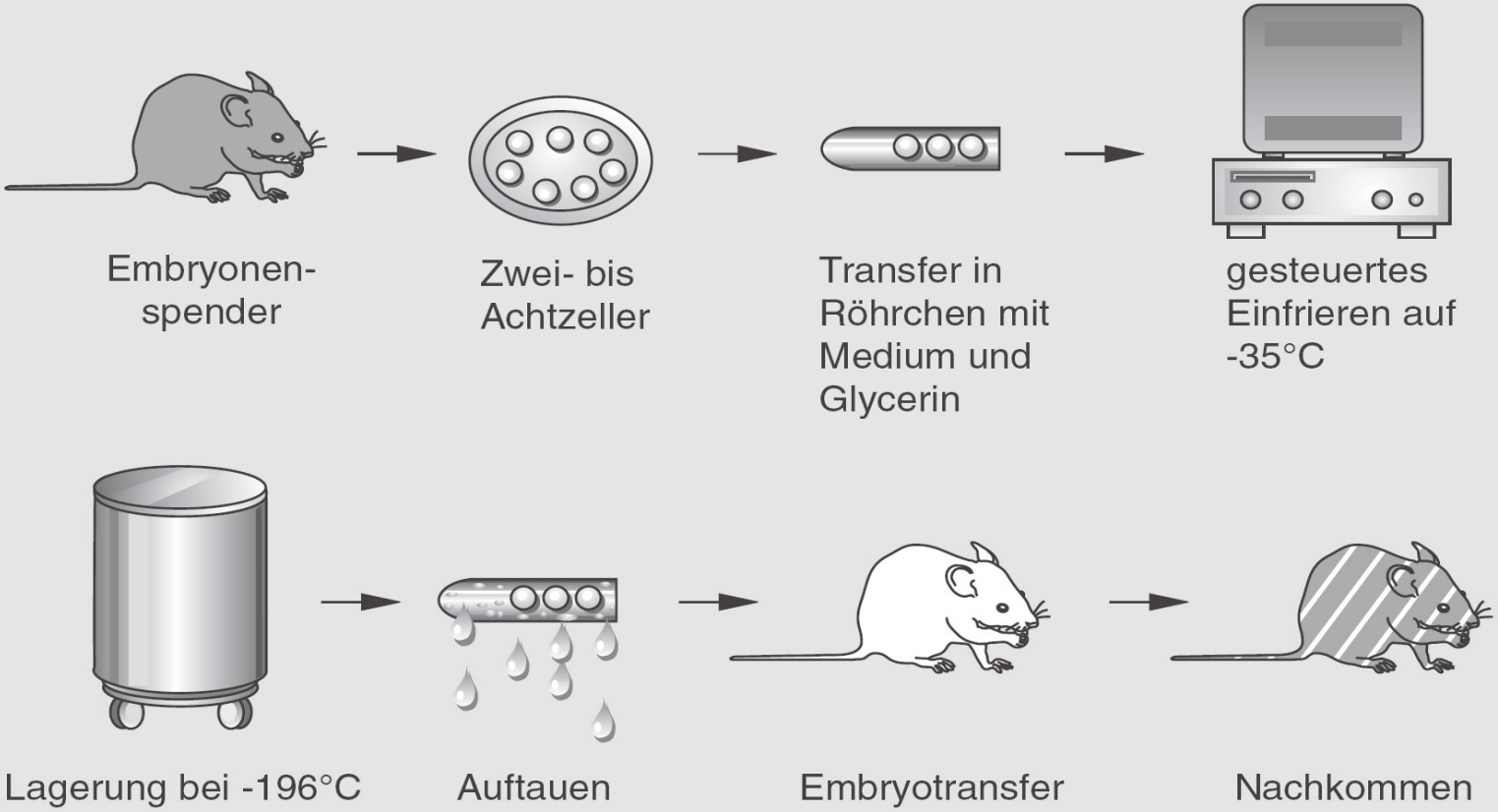
- Gezielte Mutanten von enormen wissenschaftlichem Wert
- Sehr aufwändige Generierung und Charakterisierung
- Erhebliche Zunahme von genetisch/gentechnisch modifizierten (GM) Mauslinien
- Kleine Populationen sehr wertvoller, ingezüchteter Linien
- Linien müssen weitergezüchtet werden, auch wenn sie aktuell nicht benötigt werden, sonst: Verlust
- Reine Erhaltungszucht aus vielen Gründen nicht vertretbar
- Schutz vor unerwartetem Verlust (Unfall, Hygieneeinbruch)
- Austausch von Mutanten zwischen verschiedenen Haltungen
- **Kryokonservierung**
- **Stabile Lagerung und hygienisch einwandfreie Revitalisierung nach Jahren/Jahrzehnten**

Frühe Embryonalentwicklung



Schenkel J Transgene Tiere Springer Verlag 2006

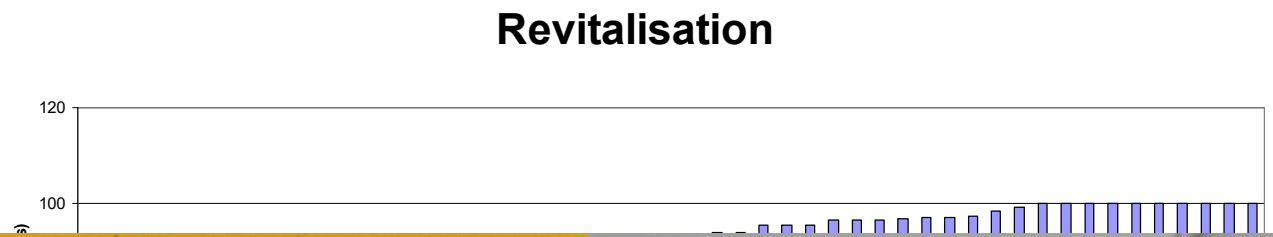
Kryokonservierung/Embryonen

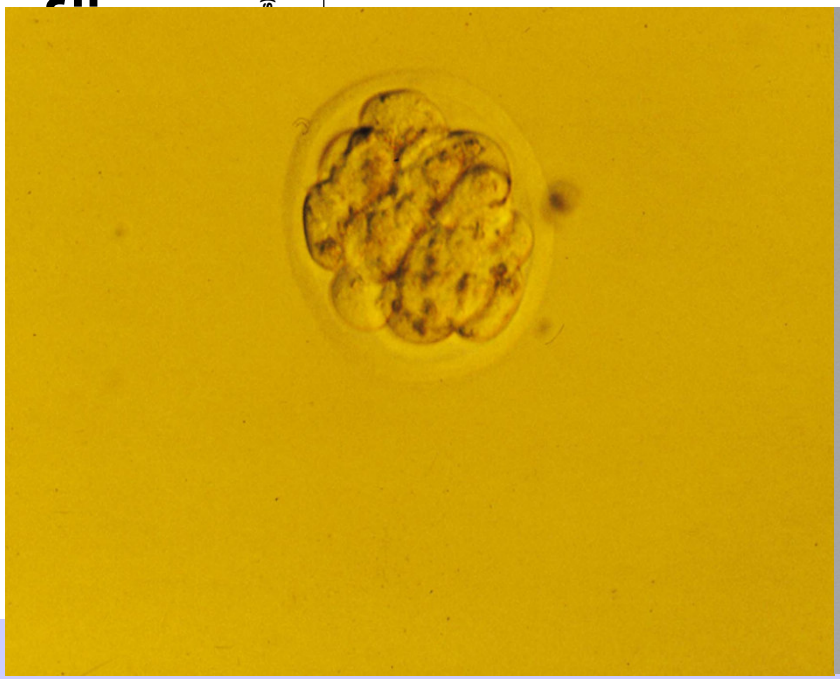


Schenkel J Transgene Tiere Springer Verlag 2006

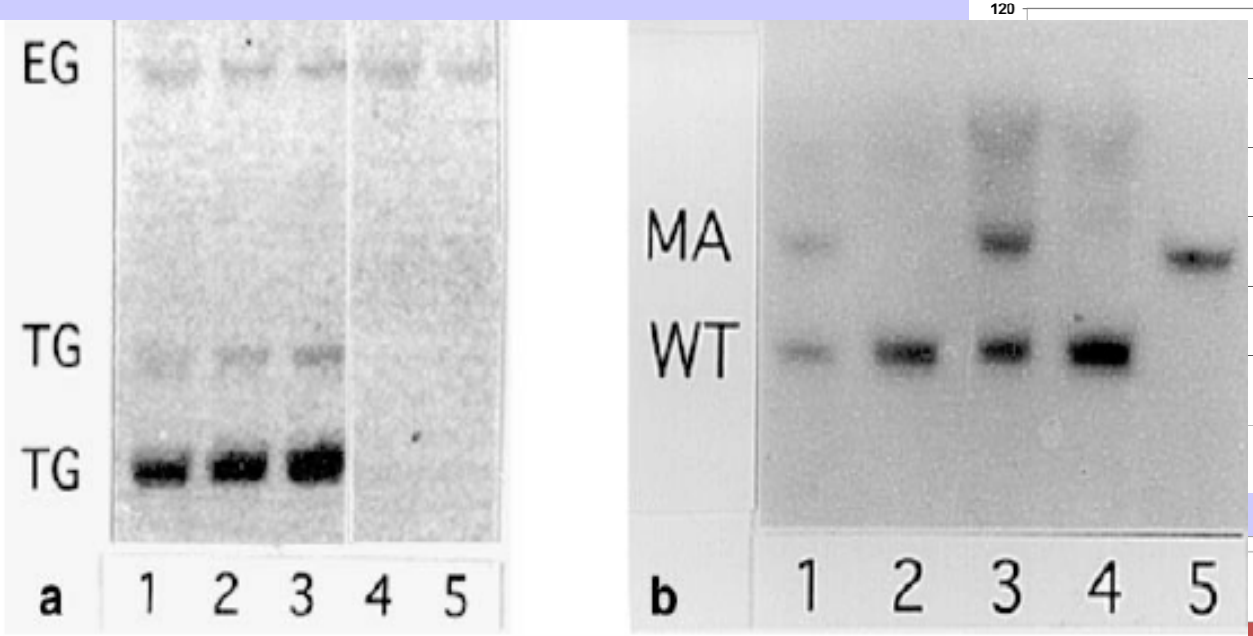
Qualitätskontrolle / genetische Kontrolle

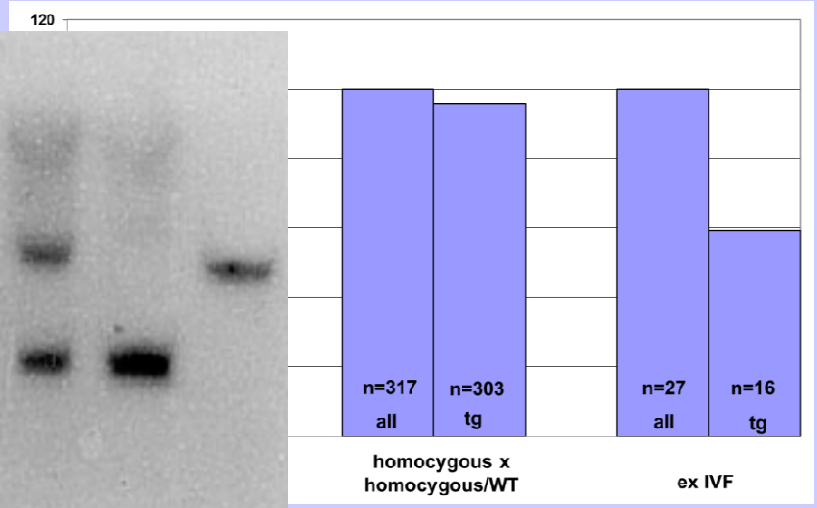
- Rev
- 8-1

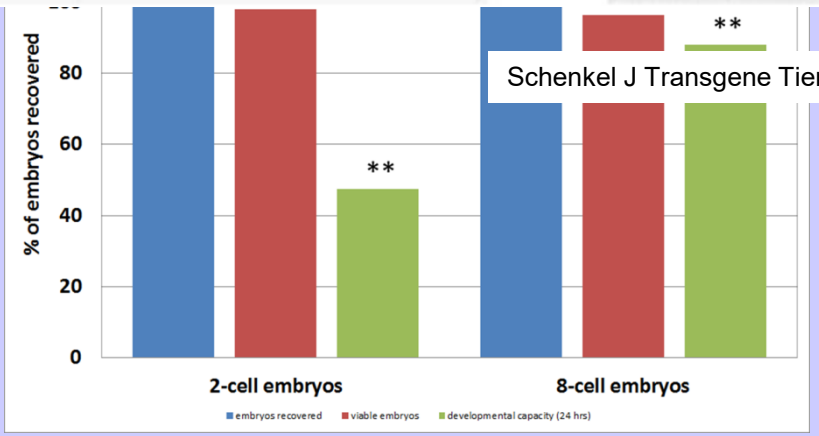




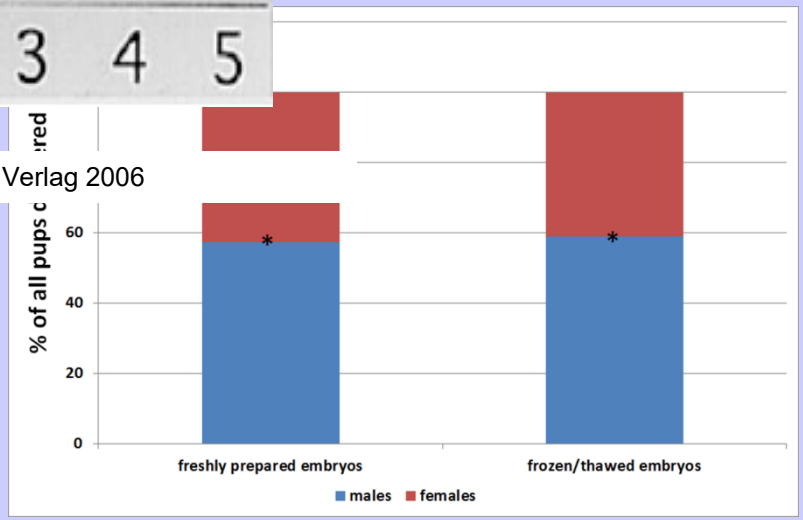
Revitalisierung: Einfluss auf Nachkommen?





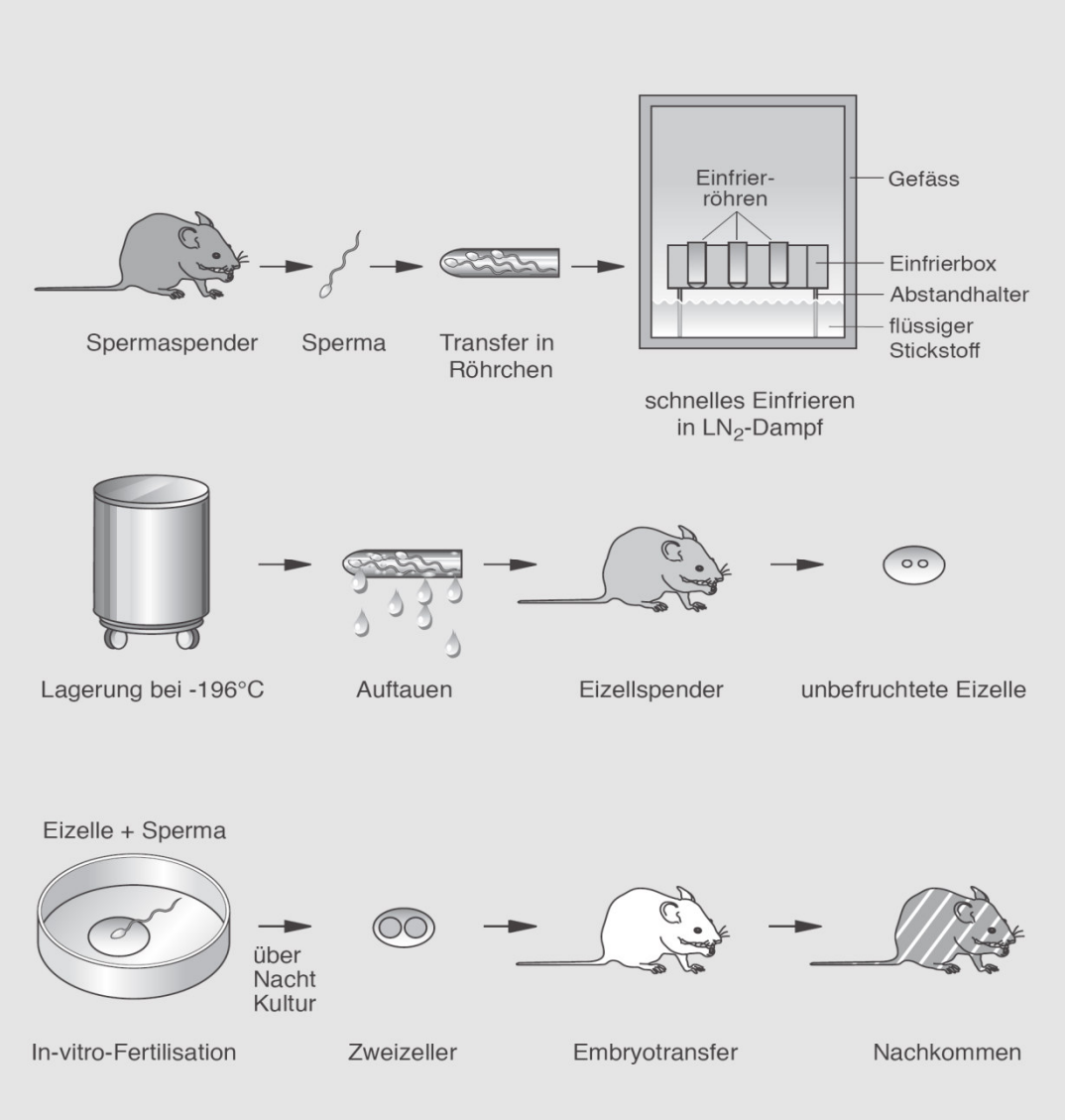


Schenkel J Transgene Tiere Springer Verlag 2006



Ramin et al, 2014 and 2015

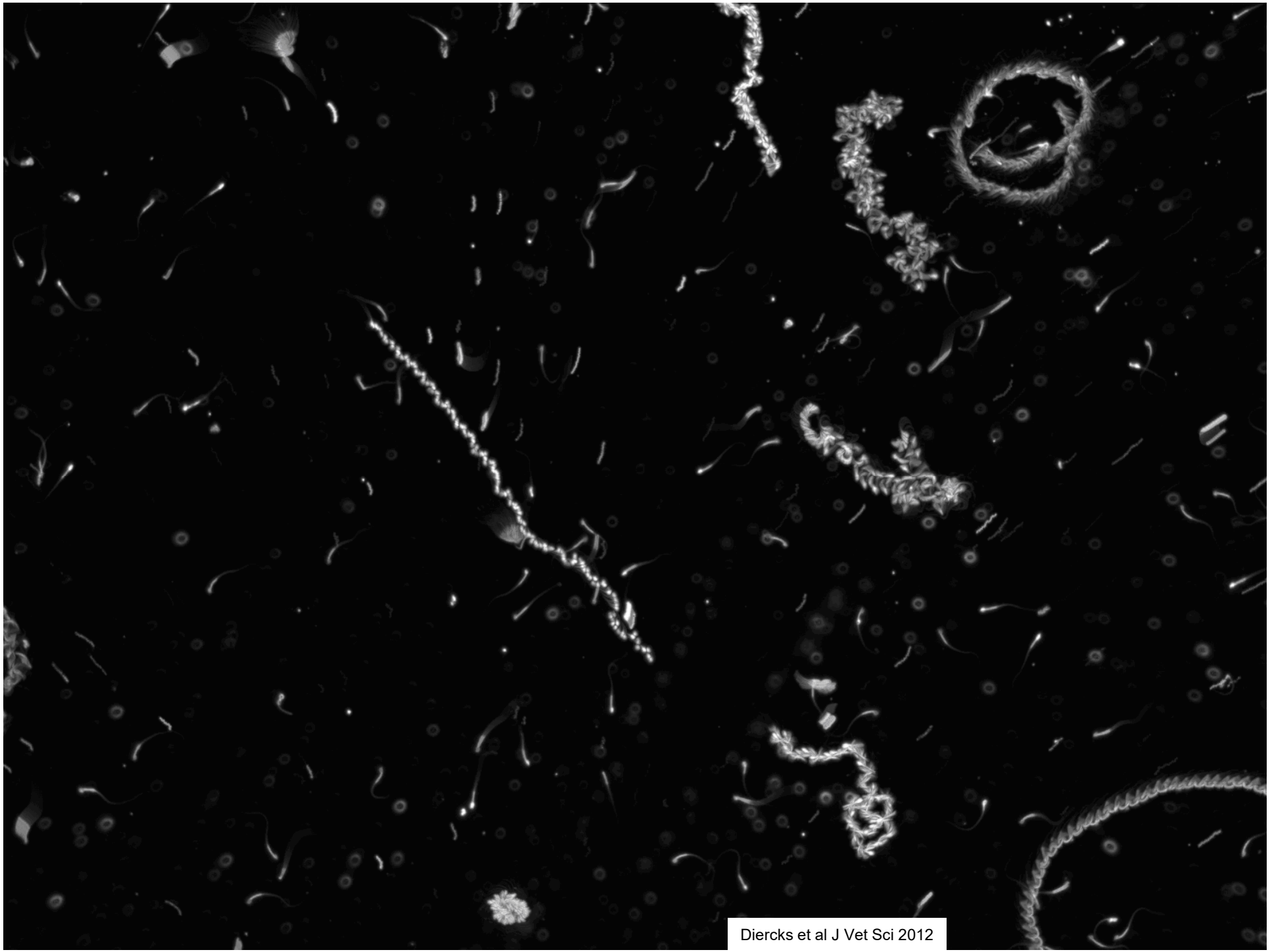
Kryokonservierung/Spermatozoen



Schenkel J Transgene Tiere
Springer Verlag 2006

Qualitätskontrolle

- **Qualität der Proben (jedes Spendertier) muss überprüft werden, Verlust: eine von vielen Proben**
- **Techniken:**
  - Kontroll- *in vitro* Fertilisation (IVF, tierintensiv)
- **Alternative:**
  - Färben (Fluoreszenz)
  - Computer-assisted sperm analysis (CASA): Parameter
    - Morphologie
    - Dichte
    - Motilität
    - Vitalität
- **Scores**

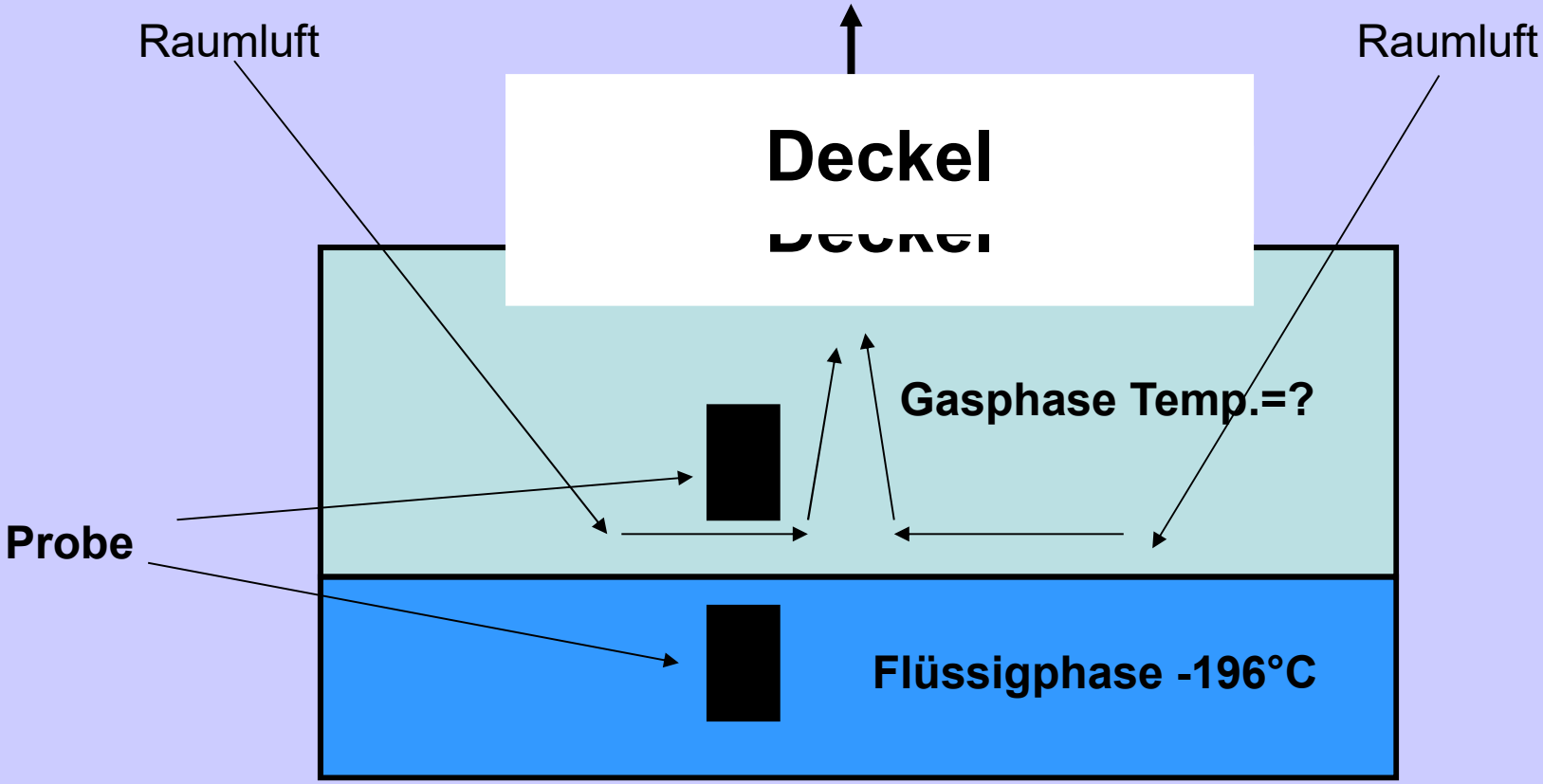


Diercks et al J Vet Sci 2012

Scoring von Spermatozoen

Score	Beschreibung
• 0	• Keine Motilität
• 1	• Langsame Vorwärtsbewegung
• 2	• Partielle Vorwärtsbewegung
• 3	• Schnelle Vorwärtsbewegung
	Berücksichtigung des Anteils der vitalen Zellen
• **Dichte**	**Lichtmikroskopisch, unverdünnte Originalprobe**
• 0	• Keine Zellen
• 1	• Wenige Zellen ($0{,}1 \times 10^6$ Zellen/mL)
• 2	• Eine Zellschicht (1×10^6 Zellen/mL)
• 3	• Mehrere Zellschichten (10×10^6 Zellen/mL)

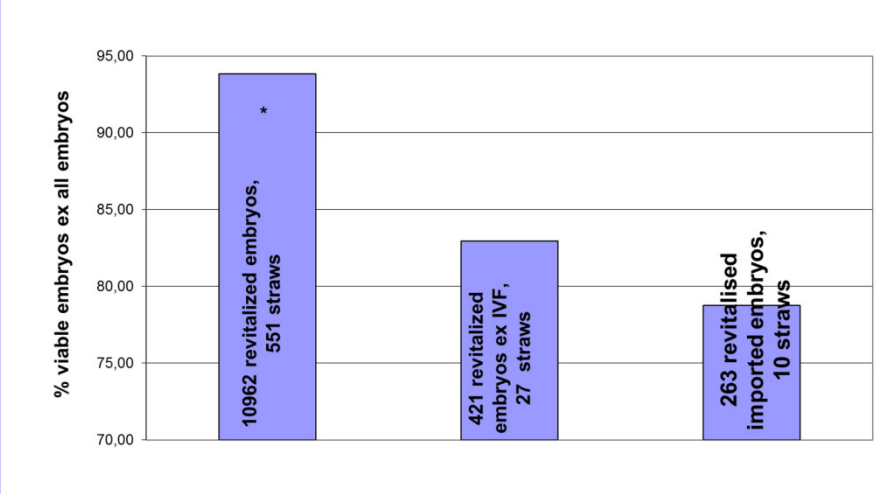
Stabilität der Temperatur: Probe

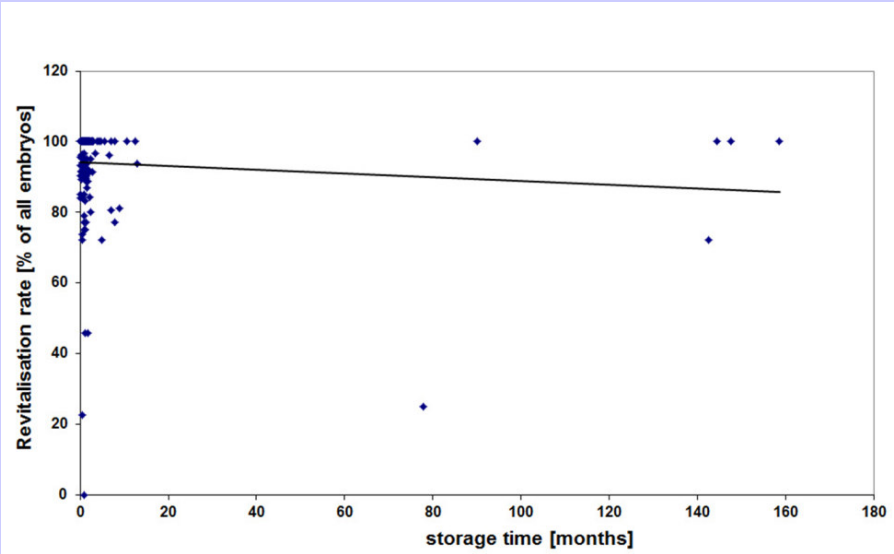


Thermische Stabilität unter -140°C

Probenlagerung, Vitalität

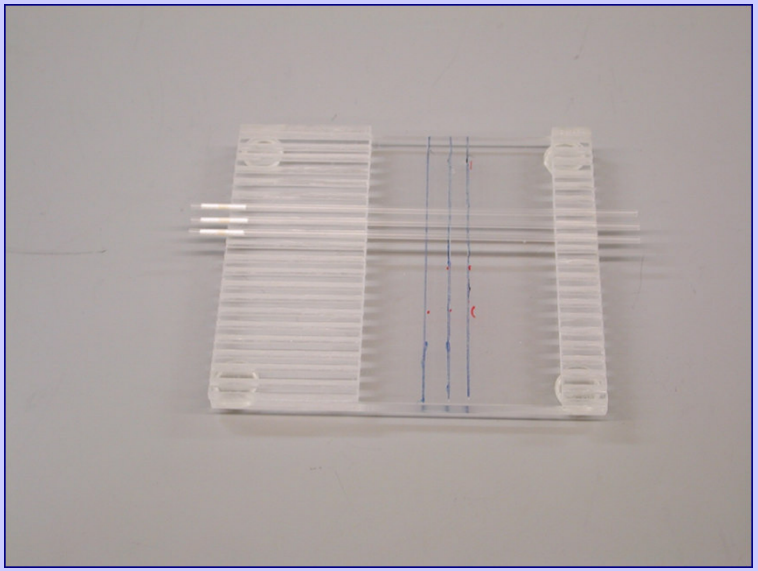
- **Probenlagerung:** Aufgeteilt auf mehrere LN_2-Tanks, an verschiedenen Orten aufgestellt
- **Lagerung** in der Flüssigphase von LN_2

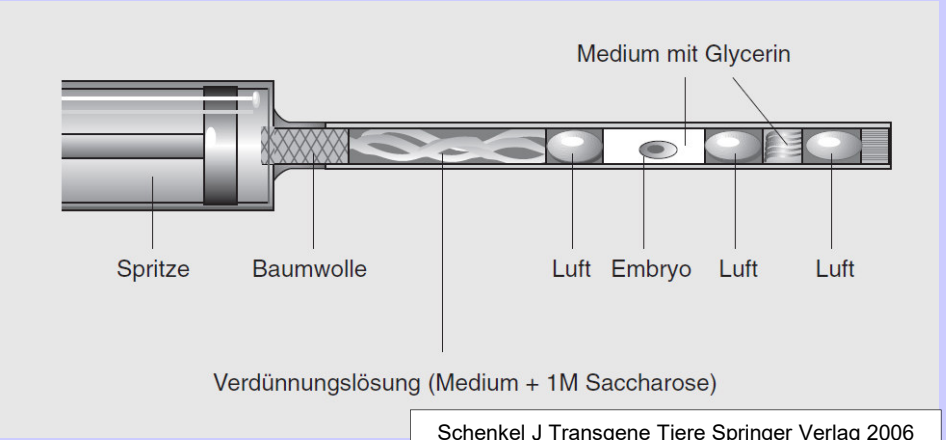




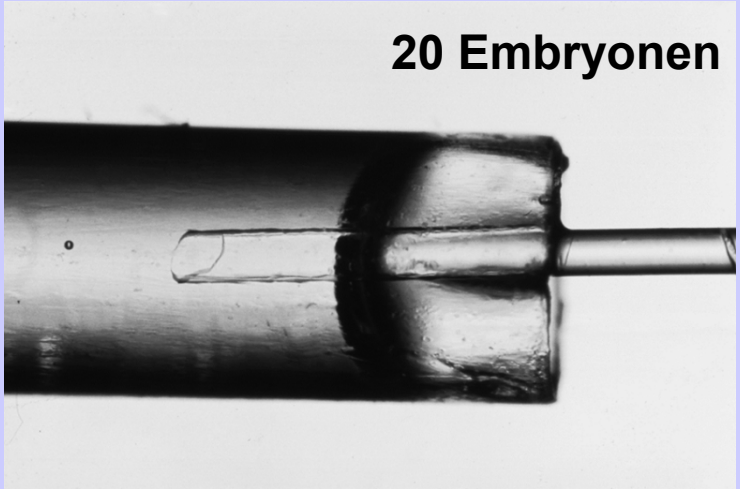
Ramin et al 2014

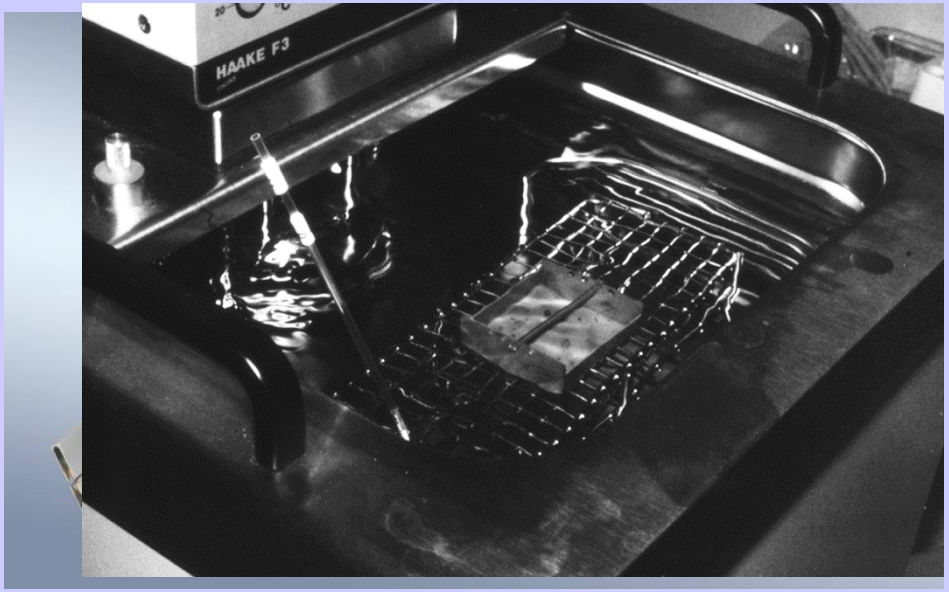
Lagerung: Tubes





Schenkel J Transgene Tiere Springer Verlag 2006





Kontaminationsgefahr

Gemeinschaft Deutscher Kryobanken e.V.

	Umweltkeime	(Maus-) Pathogene
verwendete Medien	-	-
LN_2 Behälter, oben n=20	+	nd
LN_2 Behälter, Boden n=20	+	nd
Dryshipper	+	nd
Gasphase Behälter	nd	nd
Raumluft	+	nd
Spermatozoen n=80	-	-
Embryonen n=28	-	-
ES-Zellen n=12	-	-
Kreuzkontamination	nd	-
Wurf nach Embryotransfer	-	+

BIOPRESERVATION AND BIOBANKING
Volume 12, Number 5, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/bio.2014.0030

Stability of Cryopreserved Samples of Mutant Mice

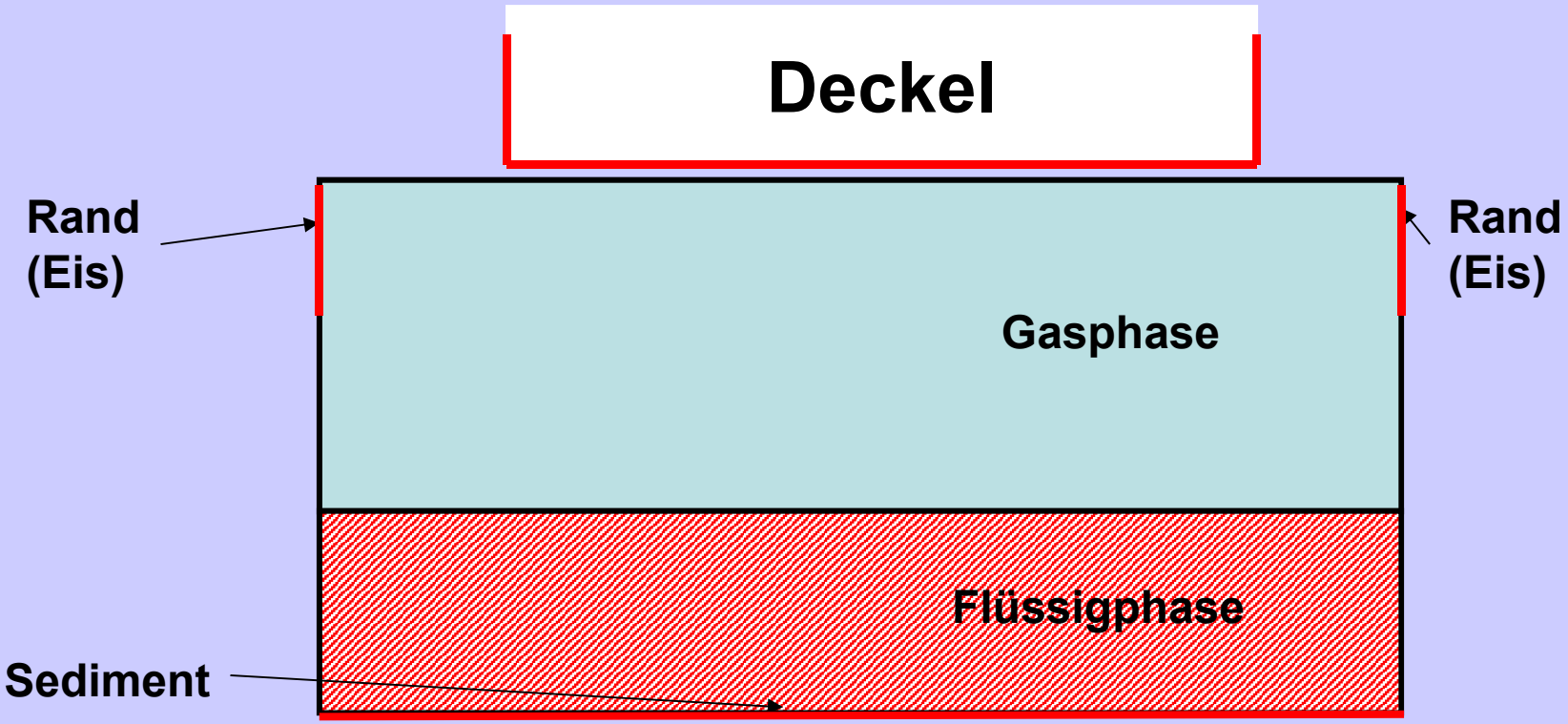
Michael Ramin,[1] Antje Bürger,[2] Andreas Hörlein,[2] Dagmar Kerkau,[3]
Vincent von Walcke-Wulffen,[4] Werner Nicklas,[1] and Johannes Schenkel[1,5]

GDK-Hygieneprojekt Verbundprojekt zur mikrobiol. Last in LN2-Tanks

- Studienteilnehmer:
  - 10 Institute
- Lagerformen
  - Gas/Flüssig
- Probenbehälter:
  - Tubes, Straws, Beutel, Glas
- Asserviertes Material:
  - Human, Nager, Pflanzen, Mikroorganismen, weiteres
- Frequenz der Behälteröffnung:
  - Täglich bis einmal/Monat
- Standzeiten der Behälter:
  - 1 – 30 Jahre
- Lagerorte (Raumtechnik)

GDK Gemeinschaft Deutscher Kryobanken e.V.

Beprobung



Probennahme:

„Eis“ (Deckel, Rand des Behälters)
Flüssigphase
Sediment

Frequenz Kontaminanten über Detektionsgrenze

	Zellen		PCR in mindestens 2 von 3 Replica		
	und Genkopien	oder Genkopien	human	Fungi	Mycoplasma
LN2 flüssig	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13
Eis Deckel/Rand	2/18	8/18	0/18	3/18	3/18
Sediment	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3

Weitere Effekte

	Lagerungszeit	Raumtechnik	Öffnungsfrequenz Deckel	Lagerung Gas/Flüssig
LN2 flüssig	nein	nein	nein	nein
Eis Deckel/Rand	ja	ja	ja	nein
Sediment	n.d.			

Mikrobiologische Last niedrig oder nicht nachweisbar
Gasphase: keine Detektion
Eis und Sediment: max. 10^4Zellen/mL

Bajerski 2020

Applied Microbiology and Biotechnology (2020) 104:131–144
https://doi.org/10.1007/s00253-019-10242-1

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

Factors determining microbial colonization of liquid nitrogen storage tanks used for archiving biological samples

F. Bajerski[1] · A. Bürger[2] · B. Glasmacher[3] · E. R. J. Keller[4] · K. Müller[5] · K. Mühldorfer[5] · M. Nagel[4] · H. Rüdel[6] · T. Müller[7] · J. Schenkel[8,9] · J. Overmann[1,10]

Dry-shipper

***Cave*: Zoll, Veterinär Inspektionen, Röntgen**

Strahlenbelastung bei Flügen

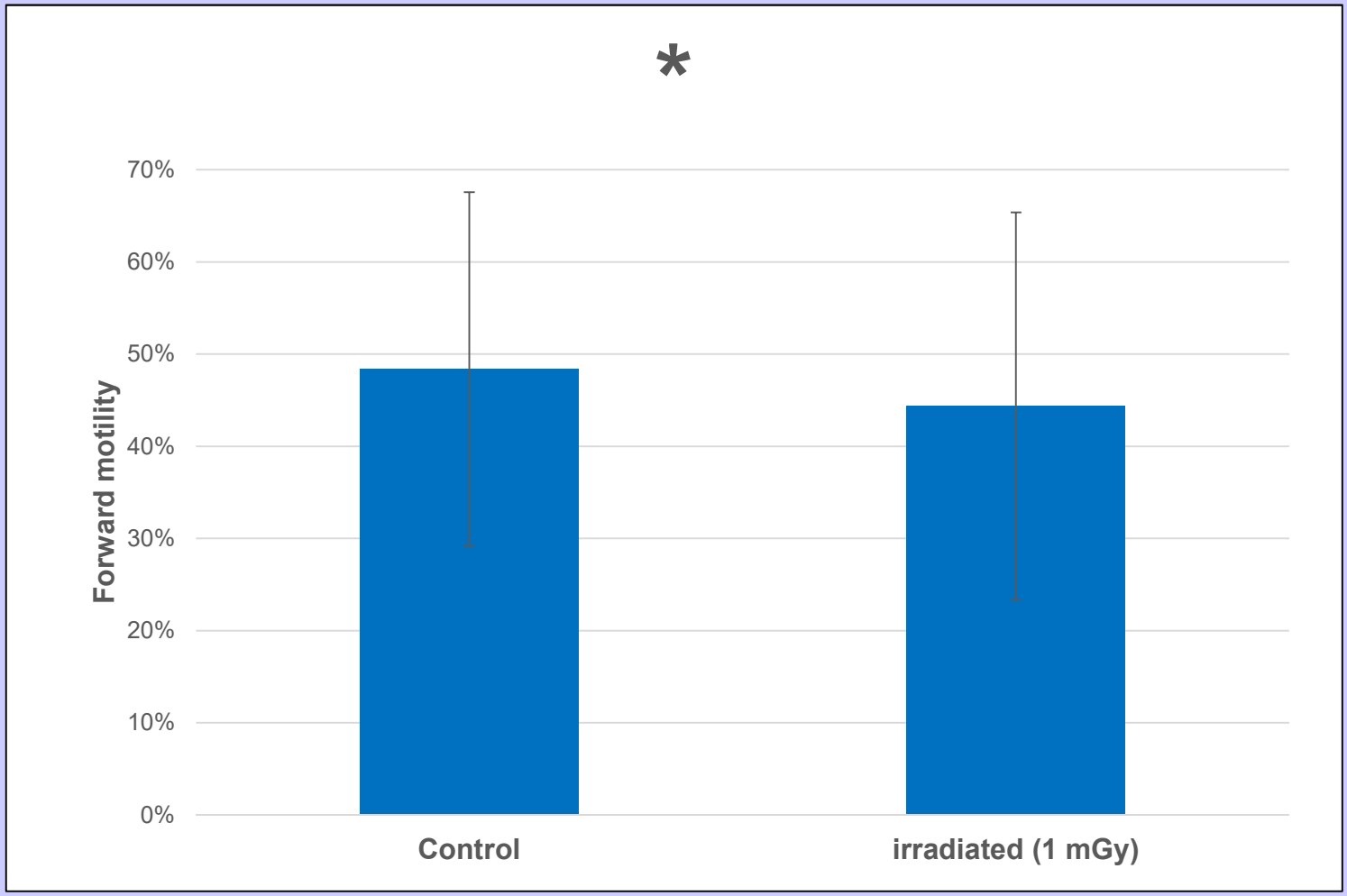
- Sicherheitskontrolle, Umladen(?)
- Zoll
- Höhenstrahlung
- Flug Frankfurt – Seattle – Frankfurt (Dosimetermessung)
  - Aufgegebenes Gepäck 0,5 mSv
  - Bordgepäck <0,05 mSv
  - Person <0,02 mSv
  - -> Versuch mit 1 mSv Exposition

Bestrahlung

Bestrahlung von kryokonservierten 8-Zell-Embryonen und Spermatozoen mit Röntgenstrahlen 1 mGy, entspricht hier 1 mSv.

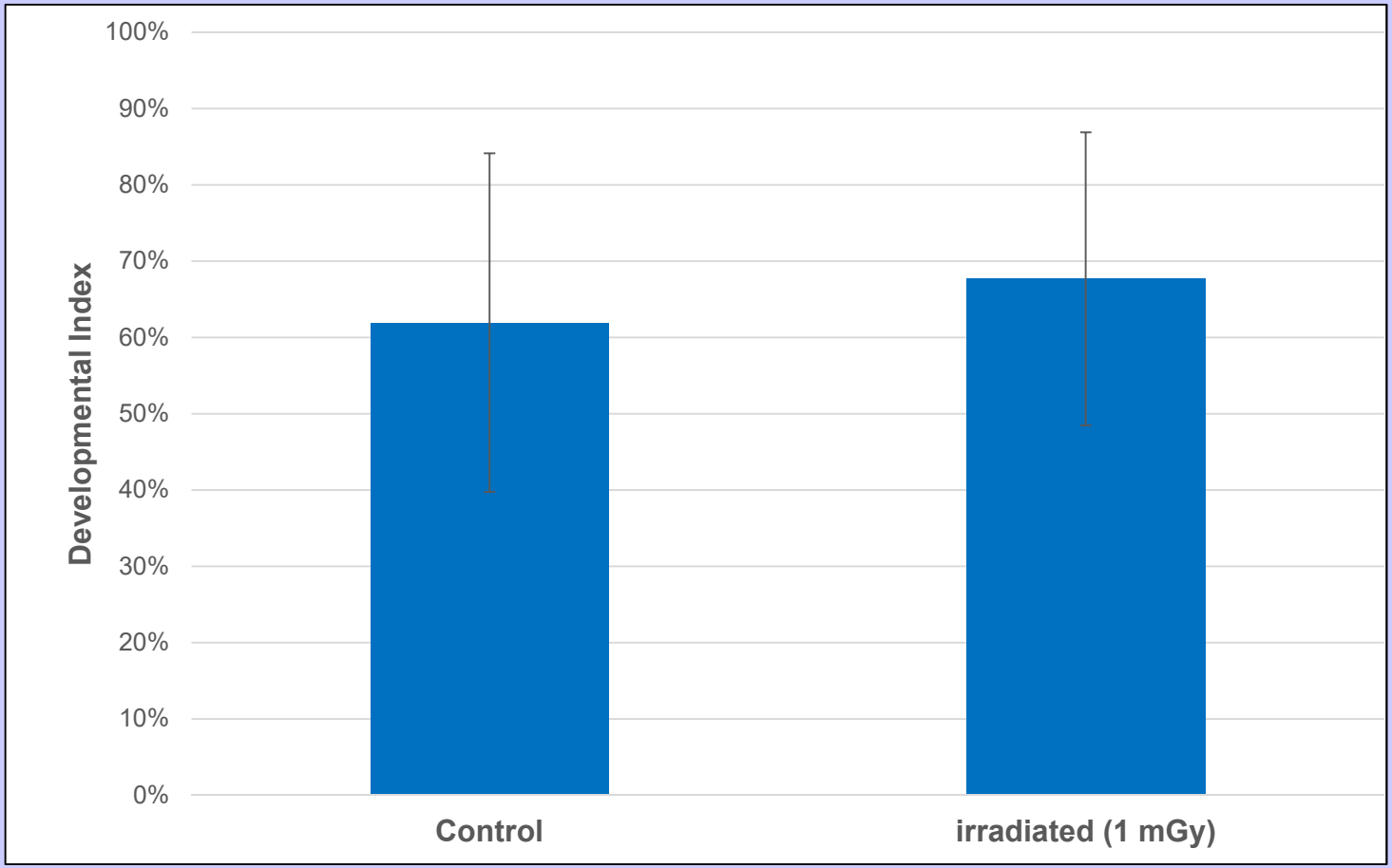
Proben auch während der Bestrahlung in LN2

Vorwärtsbewegung Spermatozoen



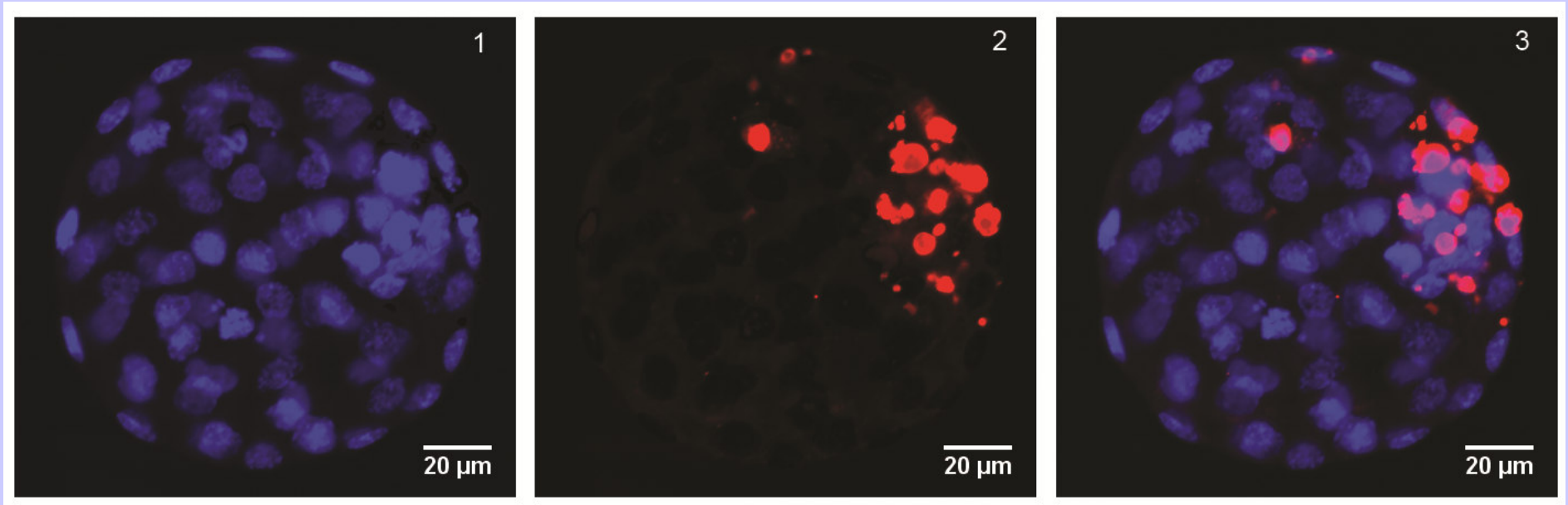
Voggenreiter 2021

Entwicklung von Embryonen



Voggenreiter 2021

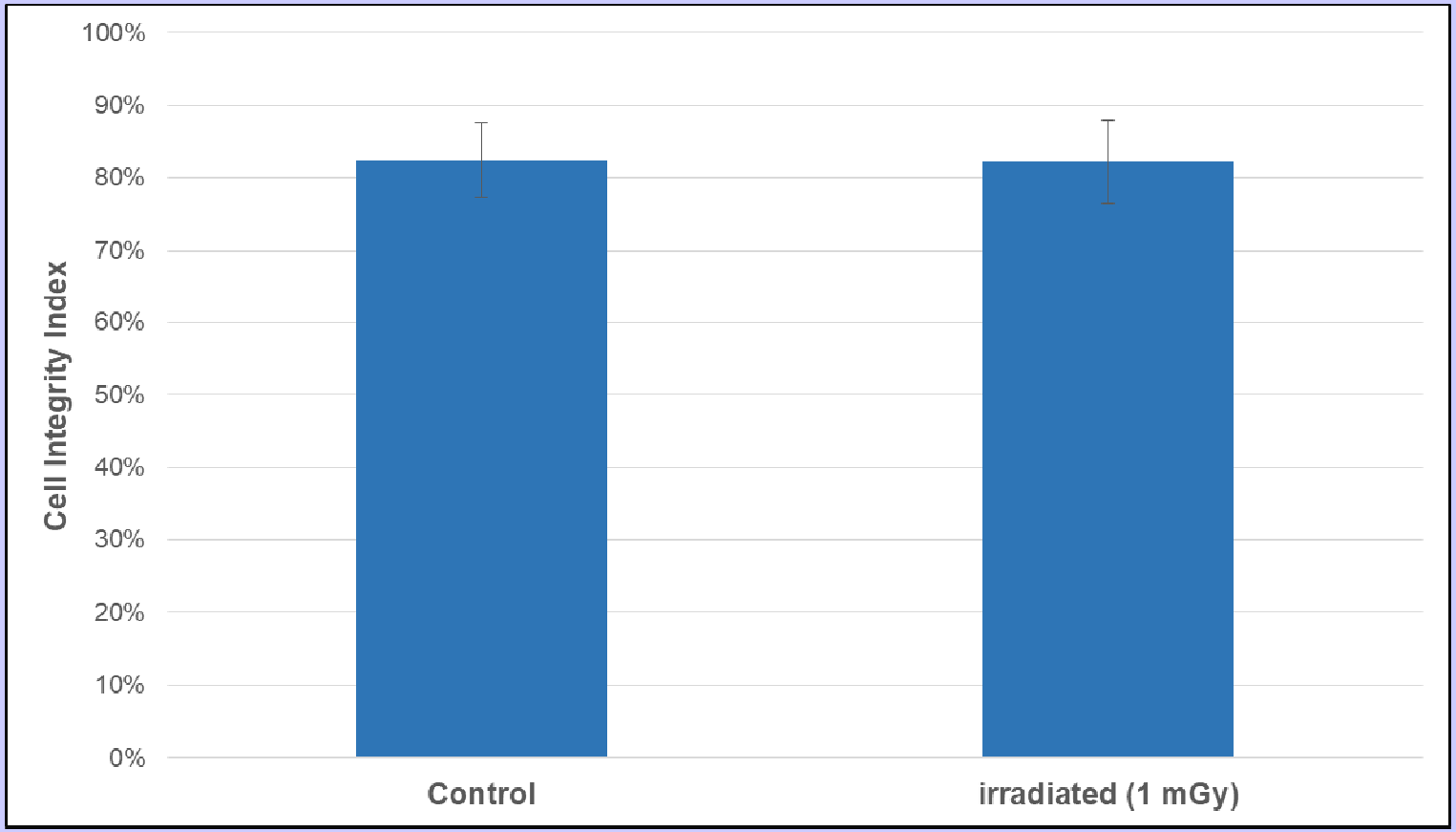
Apoptose



- Kernfärbung mit 4′,6-**D**iamidin-2-**p**henylindol (**DAPI**)
- Apoptose: **TUNEL**-Färbung (**T**erminal Transferase d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling)

Voggenreiter 2021

Zellintegrität



Voggenreiter 2021

Konsequenzen

- Strahlenbelastung bei Transporten gering
- Zur Vermeidung von Mutationen (genetische Drift) in einer Kolonie müssen die genetischen Hintergründe regelmäßig aufgefrischt werden
- *Cave:* Diese Strategie ist bei humanen Proben so nicht möglich!

BIOPRESERVATION AND BIOBANKING
Volume 19, Number 4, 2021
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/bio.2020.0046

Simulation of Air Travel-Related Irradiation Exposure of Cryopreserved Mouse Germplasm Samples

Theresa Voggenreiter,[1] Elke Laport,[1] Barbara Kahn-Schapowal,[2]
Jens Lang,[2] and Johannes Schenkel[1,3]

Zusammenfassung

- Mit der Kryokonservierung können mutante Linien gesichert werden
- Kryokonservierte Linien können aus der Zucht genommen werden
- Qualitätskontrolle erforderlich, z.T. ohne Tierversuche
- Kryokonservierung führt i.d.R. zu Sanierung
- Unter stabilen Bedingungen (unter -140°C) ist die Lagerung langfristig möglich
- „Handling“ kann zu Vitalitätsverlusten führen
- Nur wenige Kontaminationen sind in den Tanks zu finden, aber nicht auszuschließen
- Probengefäße bei korrektem Verschluss unproblematisch
- Einfacherer Transport von tg Linien ohne Belastung der Tiere
- Strahlenbelastung bei Transporten gering, aber nicht zu vernachlässigen

Information

- Wayss K, Klefenz M, Schenkel J (2005) Cryopreservation of transgenic mouse embryos – an eight years experience. *J Exp Anim Sci* 43 (2), 69-85
- Schwab A, Schenkel J (2008) Collection, Cryopreservation, Storage And Revitalization Of Transgenic Mouse Embryos. *Cold Spring Harb Protoc* 3 (12), 1215-1223; doi:10.1101/pdb.prot5111
- Schwab A, Schenkel J (2008) Factors influencing the Yield of Transgenic Mouse Embryos for Cryopreservation. *Scand J Lab Anim Sci* 35 (4), 283-296
- Diercks AK, Schwab A, Rittgen W, Kruspel A, Heuss E, Schenkel J (2010) Environmental influences on the production of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 73, 1238-1243
- Staudt M, Trauth J, El Hindi I, Galuschka C, Sitek D, Schenkel J. Managing major data of genetically modified mice – from scientific demands to legal obligations. *Transgenic Res* 21(5):959-966
- Diercks AK, Bürgers HF, Schwab A, Schenkel J (2012) Improved assessment of frozen/thawed mouse spermatozoa by using fluorescence microscopy. *J Vet Sci* 13(3):315-22.
- Ramin M, Bürger A, Hörlein A, Kerkau D, v. Walcke-Wulffen V, Nicklas W, Schenkel J (2014) Stability of cryopreserved samples of mutant mice. *Biopreserv Biobank* 12(5), 343-350.
- Ramin M, Denk N, Schenkel J (2015) The role of diet and housing-temperature in the production of genetically modified mouse embryos and their developmental capacity after cryopreservation. *Theriogenology* 84(8), 1306-1313
- Ramin M, Holland-Letz T, Schwab A, Schenkel J (2017) Age-Related Yields of Mouse Sperm and Oocytes. J Anim Res Nutr. 2: 22
- Bajerski F, Bürger A, Glasmacher B, Keller ERJ, Müller K, Mühldorfer K, Nagel M, Rüdel H, Müller T, Schenkel J, Overmann J (2020) Factors determining microbial colonization of liquid nitrogen storage tanks used for archiving biological samples. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(1):131–144
- Voggenreiter T, Laport E, Kahn-Schapowal B, Lang J, Schenkel J (2021) Simulation of air travel related irradiation exposure of cryopreserved mouse germplasm samples. *Biopreserv Biobank* 19(4):280-286
- www.kryobanken.de

Acknowledgements

- Anna Schwab, Heidelberg
- Ann-Kathrin Diercks, Heidelberg
- Michael Ramin, Heidelberg
- Theresa Voggenreiter, Heidelberg

- Felizitas Bajerski, Braunschweig

- Marie Schubert, Heidelberg
- Andrea Rausch, Heidelberg
- Helmut Eskerski, Heidelberg
- Beatrix Imkeit, Heidelberg
- Heinrich Steinbauer, Heidelberg

- Finanziert durch BfR/ZEBET, BMBF und GDK

Vielen Dank!