

Aus dem Institut für Intelligente Systeme in der Medizin (MIISM)
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr.-Ing. Jan Stallkamp)

Entwicklung und Validierung eines mechanischen und
enzymfreien Verfahrens zur teilautomatisierten
Gewinnung von Einzelzellen aus Gewebeproben

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Stefan Scheuermann

aus
Hardheim
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Prof. Dr.-Ing. Jan Stallkamp

Inhalt

1	ABSTRACT	1
2	AUSGANGSSITUATION	2
2.1	EINZELZELLANALYSE ALS BASIS FÜR DIE PERSONALISIERTE MEDIZIN	4
2.2	GEWEBEPROBEN	6
2.2.1	<i>Lebergewebe</i>	8
2.2.2	<i>Synovialgewebe</i>	10
2.2.3	<i>Tumorgewebe</i>	10
2.3	GEWEBEDISSOZIATION	11
2.3.1	<i>Enzymatisch, chemisch und mechanische Gewebedissoziation</i>	12
2.3.2	<i>Explantmethode</i>	13
2.4	AUFBAU DER ARBEIT	14
3	ANALYSE	16
3.1	GRUNDLEGENDE ÜBERLEGUNGEN UND DEFINITIONEN FÜR DIE GEWEBEDISSOZIATION	16
3.1.1	<i>Definition der Methoden zur Bestimmung der Zellqualität</i>	18
3.2	ANALYSE DER PROZESSCHRITTE EINER GEWEBEDISSOZIATION	20
3.2.1	<i>Präanalytische Variablen</i>	22
3.2.2	<i>Analytische Variablen</i>	27
3.3	ANALYSE DER GEWEBEDISSOZIATIONSMETHODEN	28
3.3.1	<i>Explant Methode</i>	29
3.3.2	<i>Mechanische Gewebedissoziation</i>	30
3.3.3	<i>Manuell-mechanische Gewebedissoziation</i>	31
3.3.4	<i>Enzymatische Gewebedissoziation</i>	34
3.3.5	<i>Manuell-Enzymatische Gewebedissoziation</i>	38
3.4	ABLEITUNG VON UNTERSUCHUNGS- UND ENTWICKLUNGSSCHWERPUNKTEN	44
3.5	ANFORDERUNGEN AN EIN SYSTEM ZUR ENZYMFREIEN UND MECHANISCHEN GEWEBEDISSOZIATION	47
4	STAND DER TECHNIK	49
4.1	FOLGERUNGEN AUS DEM STAND DER TECHNIK	50
4.2	ZIEL DER ARBEIT	53
5	LÖSUNGSKONZEPT FÜR EINE MECHANISCHE UND ENZYMFREIE GEWEBEDISSOZIATION	55
5.1	KONZEPT ZUR INTEGRATION DES MECHANISCHEN WIRKORGANS IN EIN STANDARDLABORFORMAT	56
5.2	DAS ZERKLEINERUNGSAKTIVE VOLUMEN IM ROTOR-STATOR-SYSTEM	60
5.3	AUSLEGUNG DER MAHLWERKSDIMENSIONEN IM ROTOR-STATOR-SYSTEM	63
5.4	BERECHNUNG DES ZERKLEINERUNGSAKTIVEN VOLUMENS UND DURCHMESSERS IM ROTOR-STATOR-SYSTEM.....	65

5.5	SCHNEIDEN UND MAHLEN IM ROTOR-STATOR-SYSTEM MITTELS ROTATIONSRICHTUNGSWECHSEL	67
5.6	MATERIALAUSWAHL	72
5.7	TEMPERATURENTWICKLUNG	72
5.8	LÖSUNGSKONZEPT FÜR DIE ANTRIEBSEINHEIT	74
5.9	INTEGRATION IN DEN DIAGNOSTISCHEN GESAMTPROZESS	76
5.9.1	<i>Pipettierschritte pro Prozessschritt im Kontext des Kontaminationsrisikos</i>	79
5.9.2	<i>Zeit pro Prozessschritt</i>	80
5.9.3	<i>Kosten pro Dissoziationsmethode</i>	81
6	VALIDIERUNG	83
6.1	ZELLQUALITÄT	84
6.1.1	<i>Überprüfung der Dissoziationsleistung unterschiedlicher Mahlwerksvarianten</i>	86
6.1.2	<i>Bestimmung der Dissoziationseffizienz</i>	91
6.1.3	<i>Dissoziation von Milzgewebe</i>	93
6.1.4	<i>Dissoziation von Lebergewebe</i>	95
6.1.5	<i>Dissoziation von Sinovialgewebe</i>	97
6.1.6	<i>Viabilität und Zellausbeute von verschiedenen Gewebeproben von der Maus</i>	102
6.2	ANWENDUNGSSPEZIFISCHE VALIDIERUNG	105
6.2.1	<i>Ein Schritt zur enzymfreien Gewebedissoziation</i>	105
6.2.2	<i>Enzymfreie Gewebedissoziation von Tumorproben</i>	114
6.2.3	<i>Zusammenfassung anwendungsspezifischer Validierung</i>	122
7	DISKUSSION	125
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	128
9	LITERATURVERZEICHNIS	130
10	ANHANG	145
11	PUBLIKATIONEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT	148
12	LEBENSLAUF	150
13	DANKSAGUNG	151

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µN	Mikronewton
AFM	Rasterkraftmikroskopie
CCD	charge coupled device
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FLS	Fibroblastenähnliche Synoviozyten
GMP	Gute Herstellungspraxis
GPa	Gigapascal
iPS-Zellen	Induzierte pluripotente Stammzelle
LED	Leuchtdiode
mL	Mililiter
mN	Millinewton
Pa	Pascal
PI	Propidium iodide
RNA	Ribonukleinsäure
SCP	Einzel-Zell-Drucker
scRNA-seq	Einzelzellen-RNA-Sequenzierung

1 Abstract

Primäre Einzelzellen, die aus Gewebeproben gewonnen werden, stellen eine essenzielle Ressource für zahlreiche molekularbiologische Forschungsprojekte dar. Jüngste Fortschritte in der medizinischen Forschung versprechen, dass durch diesen Ansatz die personalisierte Medizin weiter in der klinischen Praxis vorrückt. Allerdings sind die herkömmlichen meist enzym-basierten Probenvorbereitungsmethoden nicht robust und reproduzierbar genug, um die hohe Anzahl an Gewebeproben für diesen Zweck zu prozessieren. Zusätzlich machen die komplexe Beschaffenheit und Vielfältigkeit von Gewebeproben die Gewebedissoziation zu einer Herausforderung. Die Gewebedissoziation erfordert ein präzises Abwägen zwischen dem Auflösen des Gewebes und dem Erhalt der Lebensfähigkeit und strukturellen Integrität der enthaltenen Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit, wurde ein enzymfreies und teilautomatisiertes Gewebedissoziationssystem entwickelt, das robust genug ist, klinisch-relevante Gewebeproben effektiv zu dissoziieren und gleichzeitig die Lebensfähigkeit der Zellen aufrechtzuerhalten. Das entwickelte Verfahren ist mit handelsüblichen Zentrifugenröhrchen kompatibel und dadurch in bestehende Laborabläufe integrierbar und für Pipettierroboter leicht zugänglich. Darüber hinaus können mehrere Gewebeproben parallel in wenigen Minuten (<5 Minuten) verarbeitet werden. Anhand dieses Verfahrens konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Gewebedissoziator eine vergleichbare Zellausbeute und Zellviabilität im Vergleich zu enzym-basierten Systemen erzielt und fragile Zellpopulation erhalten kann. Weiterhin zeigen die Ergebnisse eine Reduzierung der Gesamtprozesszeit, des Kostenaufwands und des Kontaminationsrisikos für die Gewebedissoziation sowie eine hohes Integrationspotential in Laborprozesse.

Der Gewebedissoziator repräsentiert eine teilautomatisierte Plattform zur Erzeugung von Einzelzellen aus Gewebeproben. Diese Plattform bietet einen effizienten und standardisierten Prozess zur Gewinnung lebensfähiger Primärzellen aus unterschiedlichen Gewebetypen. Diese Primärzellen sind wertvolle und unverzichtbare Ressourcen für vielfältige Anwendungen in Bereichen wie Wirkstoffforschung, Biomedizin und personalisierte Medizin. Der Einsatz von Primärzellen in der 3D-Zellkultur ermöglicht die Erstellung biologisch relevanter Modelle von multizellulären Umgebungen in vitro, was die Untersuchung komplexer biologischer Prozesse und zellulärer Interaktionen ermöglicht und dadurch die Genauigkeit und Relevanz der Krankheitsmodelle und Wirkstoffscreenings in verschiedenen Forschungsbereichen erhöhen kann.

2 Ausgangssituation

Krebs gehört in der westlichen Welt mittlerweile zu den häufigsten Todesursachen und nimmt in absoluten Zahlen stetig zu, so dass effektive Behandlungsstrategien dringend benötigt werden.¹ Personalisierte Therapien, bei denen die Behandlung an die individuelle Krankheit angepasst wird, sind in greifbarer Nähe. Entscheidende Voraussetzung hierfür ist jedoch zum Beispiel eine möglichst genaue Vorhersage, welches Medikament bei erkrankten Personen am wirksamsten sein wird. Bei herkömmlichen Ansätzen der Krebstherapie erhalten die meisten Patienten mit einer bestimmten Krebsart ähnliche "one-size-fits-all"-Behandlungen.² In jüngster Zeit hat sich jedoch gezeigt, dass bestimmte Behandlungen bei spezifischen Patientenpopulationen gut funktionieren, bei anderen aber keine vielversprechenden Ergebnisse zeigen.^{3,4} Derzeit verbessern sich die individualisierten Krebsbehandlungen aufgrund einer ergänzenden Charakterisierung der molekularen und pharmakologischen Eigenschaften von Tumoren zunehmend. Dieser neue Ansatz kann als Präzisions- oder personalisierte Krebsmedizin bezeichnet werden.⁵ Allerdings setzt eine solche Therapie zwingend voraus, dass mit dem Nachweis eines Tumors auch eine molekulare Charakterisierung der Krebszellen verbunden wird. Die Voraussetzung für diese molekulare Analyse ist die effiziente Bereitstellung von intakten primären Einzelzellen durch eine standardisierte und automatisierbare Gewebedissoziation. Zentral für den Erfolg der molekularen Diagnostik in der Krebsversorgung ist die Quantität und Qualität der aus Tumorproben gewonnenen primären Einzelzellen.⁶

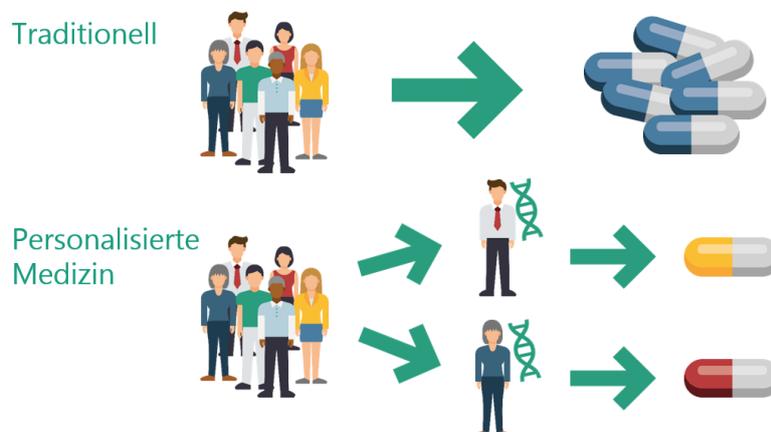


Abbildung 1: Konzept einer personalisierten Medizin. In den traditionellen Modellen der Krebstherapie werden histopathologisch ähnliche Tumore unabhängig vom Subtyp des Tumors oder der Mutation identisch behandelt. Klinische Forscher suchen nun nach Möglichkeiten, die Behandlung auf der Grundlage des Mutationsprofils des Tumors auszuwählen.⁷

Zellen sind die grundlegenden Einheiten von lebenden Organismen.^{8,9} Während ein erwachsener Mensch $\sim 3,72 \times 10^{13}$ kernhaltige Zellen besitzt, ist es weder möglich noch notwendig, sie alle zu untersuchen.^{10,11} Der Schlüssel ist die Kombination von unverfälschten statistischen

Probenahmen, biologischen Anreicherungsreinigungsverfahren und Erkenntnissen aus Studien an Modellorganismen. Bei komplexen festen Geweben ist dies nicht trivial, denn sie erfordern eine mechanische und oder enzymatische Dissoziation.¹² Hierbei sollen die Zellen möglichst lebensfähig bleiben ohne die spezifischen Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen zu verändern.

Die Gewinnung von lebenden Zellen aus Gewebeproben ist eine wertvolle und essenzielle Ressource für Anwendungen im Bereich der personalisierten Medizin.¹³ Die Verknüpfung der personalisierten Medizin mit der zunehmenden Verfügbarkeit von neuartigen diagnostischen Technologien hat die Nachfrage nach ausreichenden Mengen an qualitativ hochwertigen Bioproben weiter erhöht. Die Beurteilung von Tumoren hat sich von der traditionellen morphologischen Bewertung zu einer multimodalen Biomarker-basierten DNA-, RNA- und Proteindiagnostik entwickelt (Abbildung 2).

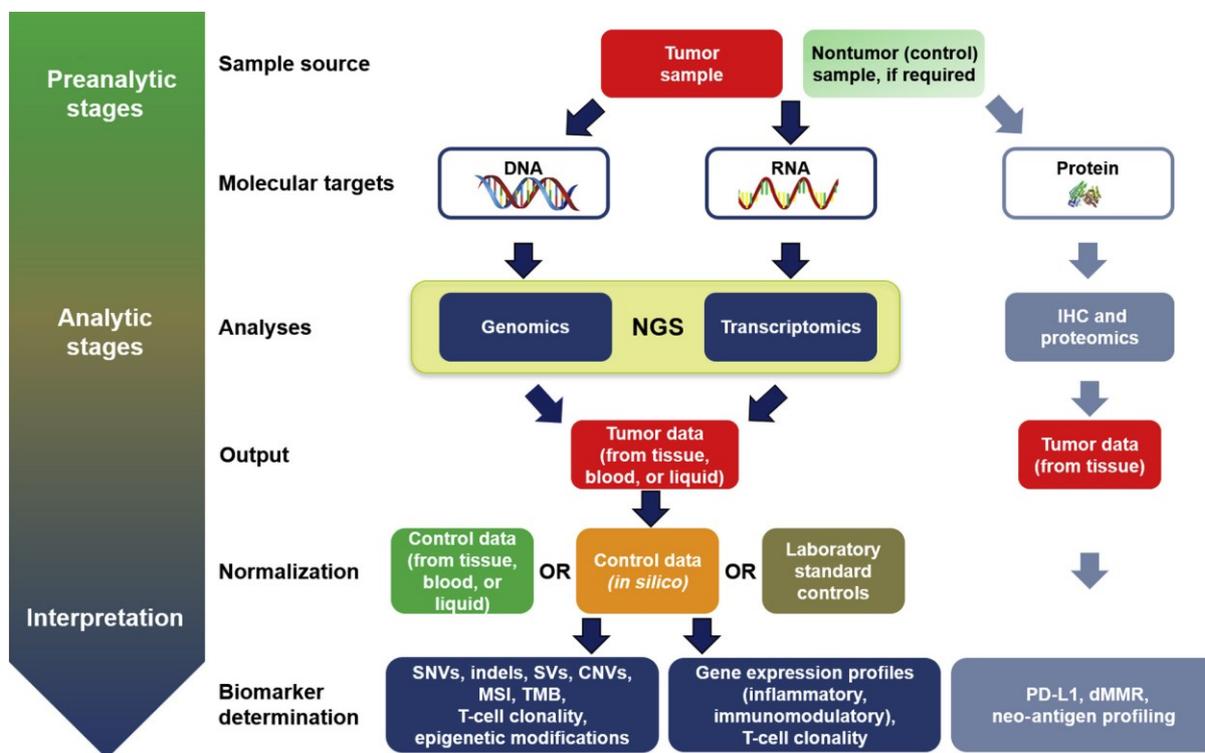


Abbildung 2: Verschiedene Stufen des analytischen Prozesses. Bei der Biomarker-Diagnose werden Protein-, Transkriptom- und Genomtests eingesetzt. Die Vorbereitung der Probe, die molekulare Isolierung, das Probenmanagement, die Materialausbeute und die analytische Normalisierung sind für jede Diagnose von Bedeutung⁶.

Während analytische Bestimmungen in vielen Bereichen in den letzten Jahren deutlich schneller und sensitiver geworden sind, gilt dies nicht für die meist notwendige und unvermeidbare Probenvorbereitung. Extraktionen, Zell- und Gewebeaufschluss, Vermahlungen und Zerkleinerung im Vorfeld der eigentlichen Analyse sind auch heute noch zeitaufwändige Prozesse, die – da sie oft manuell durchgeführt werden – nicht vollständig reproduzierbar sind.

Daher gewinnt die effiziente Extraktion von Einzelzellen aus Patientenproben immer mehr an Bedeutung. Zusätzlich stellt der komplexe Aufbau von verschiedenen Gewebetypen eine Herausforderung für die Handhabung dar.

2.1 Einzelzellanalyse als Basis für die personalisierte Medizin

Gewebe sind hochkomplexe Ökosysteme, die eine Vielzahl von Zelltypen enthalten. Auch innerhalb eines bestimmten Zelltyps kann es aufgrund von Unterschieden im Aktivierungszustand, genetischen Mutationen, epigenetischen Unterschieden, stochastischen Ereignissen und Mikroumfeldfaktoren zu erheblichen Variationen kommen.¹⁴ Dies hat zu einer rasanten Zunahme von Studien geführt, die versuchen, die zelluläre Heterogenität zu erfassen und dadurch ein besseres Verständnis der Gewebe- und Organentwicklung, der normalen Funktion und der Krankheitspathogenese zu erlangen.^{15–18} Im Zusammenhang mit Krebs ist die intratumorale Heterogenität beispielsweise ein Schlüsselindikator für das Fortschreiten der Krankheit, die Metastasierung und die Entwicklung von Arzneimittelresistenzen.^{14,19,20}

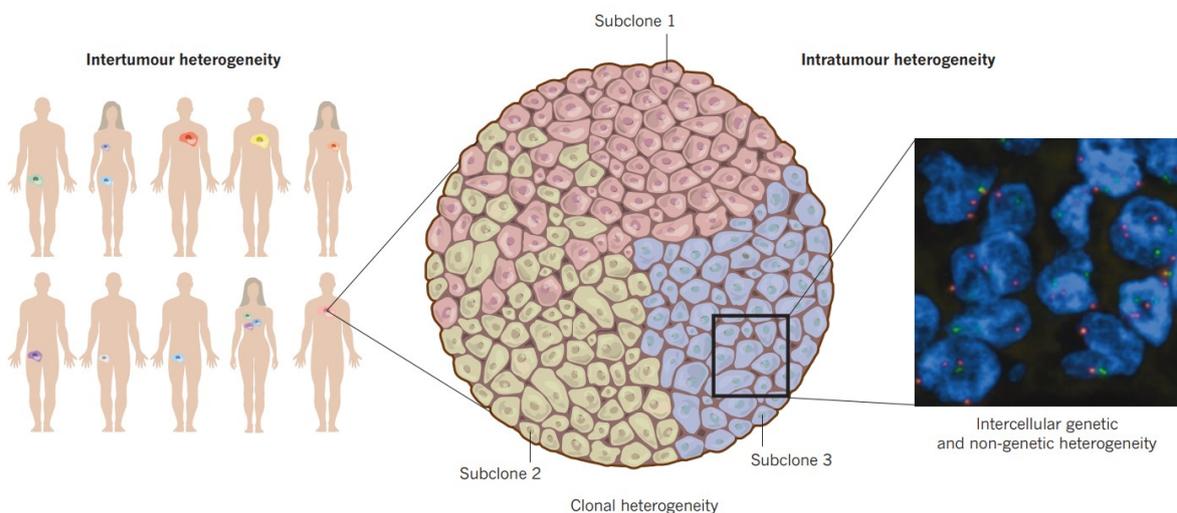


Abbildung 3: Intertumor- und Intratumor-Heterogenität. Genetische und phänotypische Unterschiede werden zwischen Tumoren verschiedener Gewebe- und Zelltypen, sowie zwischen Personen mit demselben Tumortyp beobachtet (intertumorale Heterogenität). Innerhalb eines Tumors kann eine subklonale Vielfalt beobachtet werden (Intratumorheterogenität).²⁰

Hochdurchsatzmethoden zur Einzelzellanalyse wie Durchfluss- oder Massenzytometrie und Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-seq) sind ideal für die umfassende Identifizierung einzelner Zellen auf der Grundlage molekularer Informationen.^{21,22} Diese Methoden haben bereits begonnen, das Verständnis komplexer Gewebe zu verändern, indem sie die Identifizierung bisher unbekannter Zelltypen und -zustände ermöglichen.^{23,24} Während scRNA-seq eindeutig eine leistungsstarke Diagnosemethode ist, können bei der Dissoziation des Gewebes in einzelne Zellen Störfaktoren auftreten, die sich negativ auf die Qualität und Zuverlässigkeit der

Daten auswirken können. Ein Faktor ist die fehlende Standardisierung, die zu erheblichen Unterschieden zwischen verschiedenen Forschungsgruppen und Gewebetypen führen kann. Eine weitere große Herausforderung ist, dass eine unvollständige Aufschlüsselung die Ergebnisse in Richtung der Zelltypen verzerren könnte, die leichter zu dissoziieren sind.²⁵ Eine kürzlich durchgeführte Studie von Wu et al., in der die Einzelzell-RNA-Sequenzierung mit Proben von Mäusenieren durchgeführt wurde, ergab, dass Endothelzellen und Mesangialzellen in den scRNA-seq-Daten unterrepräsentiert waren.²⁶ Schließlich hat sich gezeigt, dass lange enzymatische Verdauungszeiten transkriptomische Signaturen verändern und Stressreaktionen hervorrufen, die die Zellklassifizierung beeinträchtigen. Die Lösung dieser Herausforderungen würde dazu beitragen, die Zukunft der Gewebe-Kartierung und Krankheitsdiagnostik durch das Feld der Einzelzell-RNA-Sequenzierung voranzutreiben.

Ein Hindernis für diese Bemühungen ist die Notwendigkeit Gewebe zunächst zu einer Suspension vereinzelter Zellen zu verarbeiten. Die derzeitigen Methoden beinhalten Zerkleinerung, Verdauung, Disaggregation und Filterung, die arbeitsintensiv, zeitaufwendig, ineffizient und sehr variabel sind.^{12,27} Daher sind neue Ansätze und Technologien dringend erforderlich, um die Zuverlässigkeit und die breite Akzeptanz von Einzelzellanalysemethoden für Gewebe zu gewährleisten. Dies wäre besonders wichtig für die Übertragung der Einzelzell Diagnostik auf menschliche Proben im klinischen Umfeld. Darüber hinaus würde eine verbesserte Gewebedissoziation die Extraktion von Primärzellen für ex vivo Arzneimittelscreening, 3D-Gewebe-konstruktionen und Stamm-/Progenitorzelltherapien schneller und einfacher machen.^{28–30} Die Möglichkeit, komplexe natürliche Gewebe für personalisierte Arzneimitteltests in Organ-on-a-Chip-Modellen nachzubilden, die aus Patientenproben stammen, stellt eine äußerst vielversprechende zukünftige Entwicklung dar. Diese Perspektive könnte durch eine optimierte Gewebedissoziation weiter vorangetrieben werden.^{25,28,31–34} Die Analyse von Einzelzellen ist im Zuge der personalisierten Medizin für viele Forschungs- und Therapieanwendungen (Tabelle 1) unerlässlich.³⁵

Tabelle 1: Überblick über potenzielle Anwendungen für Einzelzellen.

Anwendung	Referenzen
iPS-Zellen	Aasen et al., 2008 ³⁶ , Serra et al., 2012 ³⁷
Mikrofluidik (Lab-on-a-chip)	Kasendra et al., 2018 ³⁸
Einzelzell-Drucker (SCP)	Mironov et al., 2009 ³⁹
Sphäroide (3D-Zellkulturen)	Ivascu et al., 2006 ⁴⁰ , Liu et al., 2017 ⁴¹ , Weiswald et al., 2015 ⁴²
Primäre Zellkultur	Pokrywczynska et al., 2016 ⁴³
Einzelzell-Sequenzierung	MacParland et al., 2018 ¹⁷ , Gawad et al., 2016 ⁴⁴

Alle Therapieentscheidungen bei der Behandlung von Krebspatienten (z.B. Art der operativen Behandlung, Bestrahlung, Notwendigkeit einer Chemotherapie) hängen maßgeblich von der Ausbreitung der Erkrankung ab, also von der Größe des Tumors und der Frage, ob Lymphknoten oder andere Organe befallen sind.⁴⁵ Zusätzlich rückt in Zeiten der personalisierten Medizin die molekulare Charakterisierung einer Krebserkrankung immer mehr in den Fokus, da das Ansprechen zahlreicher Therapien von den molekulargenetischen Veränderungen des individuellen Tumors abhängt. Der Nachweis spezifischer Mutationen oder von Mutationsspektren ist entscheidend für die Auswahl moderner Medikamente zur personalisierten Tumorthherapie.⁴⁶

2.2 Gewebeproben

Das Probenspektrum an tierischen und menschlichen Gewebetypen, welches im Bereich der medizinischen, pharmazeutischen und biologischen Analytik untersucht wird, ist äußerst vielfältig. Aufgrund des breiten Spektrums in der Praxis eingesetzten Proben mit unterschiedlichen Merkmalen, sowie den vielfältigen Einflussfaktoren entlang der Prozesskette ist es schwierig, von den Werkstoffeigenschaften eines Gewebes zu sprechen. Verschiedene Autoren unternehmen den Versuch Materialeigenschaften von verschiedenen Gewebearten zu ermitteln und anzugeben.^{47,48} Diese Untersuchungen erfolgten zum überwiegenden Teil an Zellsuspensionen oder in 2D Zellkulturen. Diese Zelllinien bieten zwar in vielen Fällen die Möglichkeit eines ersten Einblicks in die Zellbiologie, ist aber nicht in der Lage die Interaktionen gesunder bzw. kranker Zellen in vivo widerzuspiegeln oder die Charakteristiken einzelner Zellen patientenspezifisch zu untersuchen.

Die mechanischen Eigenschaften von Zellen wurden zumeist durch Mikromanipulation untersucht. Dabei wird eine einzelne Zelle zwischen zwei Stempel positioniert und anschließend zusammengepresst. Aus dem Kraft-Weg-Diagramm kann daraufhin die Kraft ermittelt werden, die zum Platzen der Zelle notwendig war. Bei der Beanspruchung kommt es zunächst zu einer elastischen Verformung der Zelle. Diese Deformation kann bis zu 50% des Durchmessers der Zelle betragen, ist aber stark von der Osmolarität des Mediums abhängig. Einen weiteren Einfluss auf die Deformation hat die Geschwindigkeit der Beanspruchung. Während des Beanspruchungszeitraums verlieren die Zellen Wasser. Versuche, in denen der Stempel angehalten wurde, zeigten, dass die Kraft auf den Stempel geringer wurde. Auf die Kräfte, die zum Bersten der Zellen notwendig sind, hat die Geschwindigkeit im untersuchten Bereich (zwischen 1,03 und 1,68 $\mu\text{m/s}$) keinen Einfluss.⁴⁹ Die Berstkräfte, die von verschiedenen Autoren gemessen wurden, sind in Tabelle 2 angegeben.⁵⁰ Die Höhe der Berstkraft ist von vielen Faktoren abhängig. Neben der Art des Ursprungsgewebes spielen auch der Zelltyp, die Wachstumsphase und der osmotische Druck des umgebenden Mediums eine große Rolle.

Tabelle 2: Literaturdaten zur Berstkraft von Zellen (adaptierte Abbildung).⁵⁰

Berstkraft	Anmerkungen	Literaturstelle
Hefe; 45-145µN	Berstkraft unabhängig vom Zelldurchmesser	Smith et al., 2000 ⁴⁹
<i>E. coli</i> ; 3,6µN	Gram negativ	Shiu et al., 1999 ⁵¹
Staphylococcus; 13,8µN	Gram positiv	Shiu et al., 1999 ⁵¹
Tomatenzellen; 5mN	Wurzelzellen, in Suspension gezüchtet	Thomas et al., 2000 ⁵²
Säugerzellen; 1,5-4,5µN	---	Mashmously et al., 1998 ⁵³

Eine weitere Vorgehensweise zur Messung der mechanischen Stabilität von Zellen ist die Beanspruchung in einem Rotationsviskosimeter.⁵² Aus den Kraft-Weg Kurven ist es mit Hilfe eines linearen, elastischen Modells möglich, das Elastizitätsmodul zu bestimmen.⁵⁴ Die Elastizitätsmodule von verschiedenen Gewebetypen ist in Abbildung 4 dargestellt und umspannen einen Bereich von 10 Pa (Mucus) bis zu 1 GPa (Knochen).

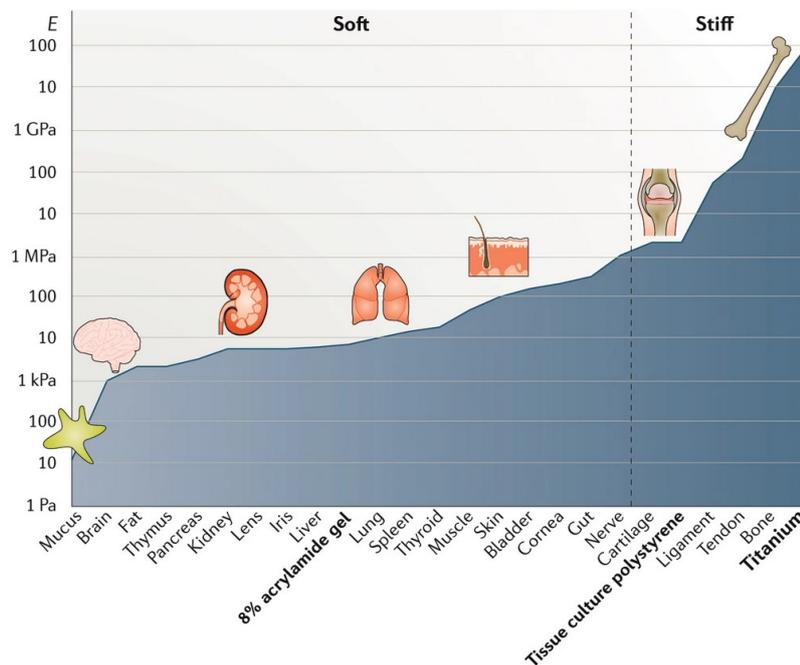


Abbildung 4: Übersicht über Elastizitätsmodule von Gewebetypen. Die Elastizität von lebendem Gewebe umfasst den gesamten Bereich von Pascal bis Gigapascal. Die in der Literatur beschriebenen Elastizitätsmodule (E) verschiedener Gewebetypen sind auf der logarithmischen Skala angegeben. Die Gewebe sind nach aufsteigender Festigkeit geordnet. Die Gewebe des Zentralnervensystems, sowie die meisten Bauchorgane und die Haut haben Moduli im Submegapascal-Bereich und werden daher im Allgemeinen als Weichgewebe (im biologischen Sinne) bezeichnet. Knorpel, Bänder, Sehnen und Knochen sind die steifsten Gewebe des menschlichen Körpers. Zum Vergleich sind die Moduli einiger gängiger Tissue-Engineering-Materialien in der Grafik enthalten: 8 % Acrylamid-Gel.^{48,55}

Die ermittelten Werte und Kenngrößen sind jedoch aufgrund der biologischen Varianz der Proben und der genannten Einflüsse breit gestreut. Hinzu kommt, dass die unterschiedlichen Randbedingungen bei den Messungen nur schwer miteinander vergleichbar sind. So ist beispielweise bei Muskeln entscheidend in welcher Richtung eine Messung in Bezug zur Sehnenausrichtung stattfindet. Des Weiteren ist bei der Ermittlung von Spannung-Dehnungs-Zusammenhängen der Probenquerschnitt von Bedeutung. Dieser ist jedoch bei biologischen Präparaten schwer zu bestimmen und zudem zeitabhängig. Untersuchungen im Bereich der Biomechanik zum Verhalten von biologischen Geweben unter Belastung betrachten nur Verformungen von Geweben bis zum Stadium der pathologischen Veränderung auf Gewebeebene. Meist wird hierzu ein histologischer Nachweis geführt. Die Heterogenität der zellulären Strukturen, insbesondere bei Tumorproben ist hierbei der limitierende Faktor.⁵⁶ Unterschiede bestehen nicht nur zwischen Tumoren des gleichen Typs bei verschiedenen Patienten, sondern auch zwischen Zellen innerhalb eines Tumors. Daher werden allgemeine Begriffe wie "weich", "starr" oder "verformbar" häufig zur Charakterisierung der Zellmechanik von Gewebe verwendet, auch wenn sie keinen tatsächlichen rheologischen Parameter darstellen. Im Folgenden werden beispielhaft drei unterschiedliche Gewebeprobenarten (Leber (weich), Synovial (starr) und Tumor (verformbar)) und deren Zusammensetzung betrachtet. Diese Proben sind repräsentativ für die unterschiedlichen mechanischen und strukturellen Probeneigenschaften (weich bis verformbar) von Gewebeproben, die im klinischen Forschungsbetrieb vorkommen können.

2.2.1 Lebergewebe

Primäre menschliche Leberzellen können die vollständige Funktionalität der Leber in vivo widerspiegeln, weshalb sie für die pharmakologische und toxikologische in-vitro Forschung von großer Bedeutung sind. Die Leber besteht aus zwei Zelltypen: Parenchymzellen epithelialen Ursprungs und nicht-parenchymale Zellen. Parenchymzellen bilden die Hauptlebermasse und haben einen Anteil von bis zu 70 % Hepatozyten und 3 - 5 % Cholangiozyten an den gesamten Leberzellen.⁵⁷ Hepatozyten zum Beispiel weisen, wie aus Abbildung 5 zu entnehmen ist, eine charakteristische Größe von 25-40µm auf und zählen somit zu den großen epithelialen Zellen. Im Gegensatz zu anderen Zelltypen neigen Hepatozyten bei der Zellisolation dazu, leicht beschädigt zu werden.¹⁷ Sie sind für die meisten Leberfunktionen, wie Energiestoffwechsel, Proteinsynthese und Biotransformation, verantwortlich.^{58,59} Zu den nicht-parenchymalen Zellen gehören hauptsächlich Kupffer-Zellen, Leberendothelzellen und hepatische Stellatazellen.

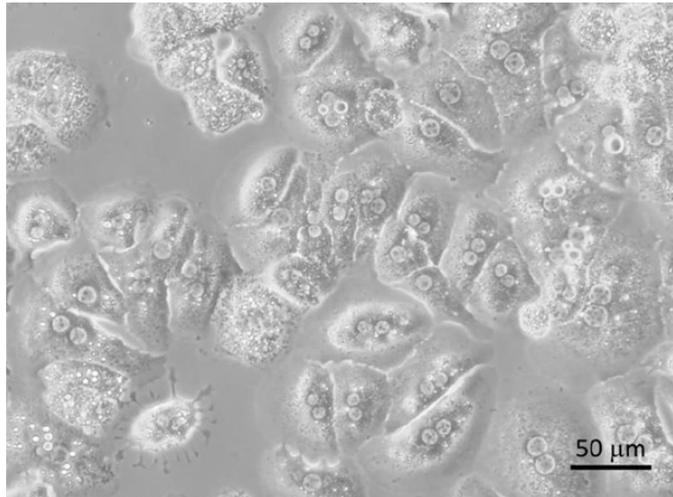


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahme aufgereinigter Hepatozyten mit einer charakteristischen Zellgröße von 25-40μm auf. Erkennbar sind zusätzlich Zellen reich an Organellen und mit zwei Zellkernen.⁶⁰

Die Hauptquellen der Variation, die die gemessenen mechanischen Eigenschaften der Leber beeinflussen, sind gruppiert in Variablen, die von der Probe abhängen und Variablen, die von den Test- und Analysemethoden abhängen.⁵⁸ Tatsächlich hängt das mechanische Verhalten von Lebergewebe, wie bei jedem anderen Weichgewebe auch, von seiner Herkunft, dem Ort und der Art der Entnahme und schließlich von der Behandlung nach der Entnahme ab (Abbildung 6).⁶¹

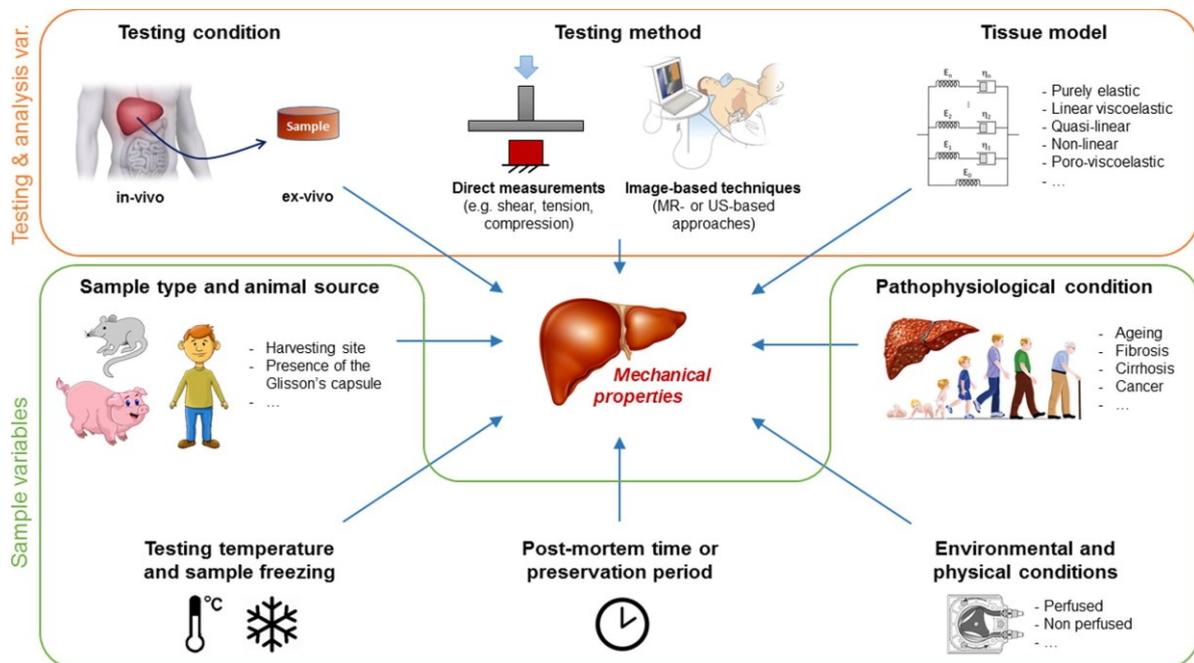


Abbildung 6: Einflussfaktoren auf die mechanischen Eigenschaften von Lebergewebe.⁶¹ Die Faktoren, die die mechanischen Eigenschaften der Leber beeinflussen, werden in Variablen unterteilt, die von der Probe abhängen, und in Variablen, die von den verwendeten Prüf- und Analyseverfahren abhängen.

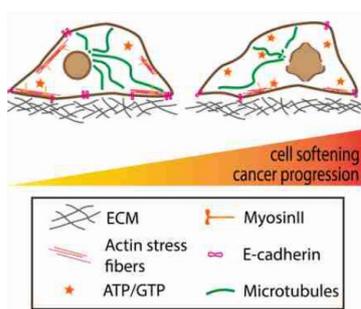
2.2.2 Synovialgewebe

Jede Gelenkhöhle wird durch eine Gelenkkapsel nach außen hin begrenzt. Sie besteht auf der Außenseite aus einer Faserschicht, der Membrana fibrosa und wird gelenkseitig durch die Membrana synovialis ausgekleidet. In Kombination stabilisieren sie das Gelenk und verhindern das Eindringen von Fremdpartikeln, sowie das Austreten der Synovialflüssigkeit, welche von der Synovialmembran in den Gelenkspalt sezerniert wird. Die Synovialis ist zudem von Gefäßen, Nerven und elastischen Fasern durchsetzt.⁶² Sie gehört damit zu einer der vier Oberflächenstrukturen⁶³ auch wenn typische Merkmale von Epithelen, wie die Basallamina und eine vollständig flächige Bedeckung des Gewebes mit fibroblastenähnliche Synoviozyten (FLS, *fibroblast like synoviocytes*), nicht vorhanden sind. Charakteristisch für die Morphologie der Synoviozyten sind lange zytoplasmatische Ausläufer, mit denen sie sich untereinander verbinden. So können Zellen aus der obersten Schicht mit entfernteren Zellen in Verbindung treten. Eine universelle Synovialzellenform gibt es nicht. Die FLS können morphologisch von kubisch-rundlich bis zu sternförmig-polygonal auftreten.⁶⁴

2.2.3 Tumorgewebe

Während den verschiedenen Stadien einer Krebserkrankung nehmen die Tumorzellen Eigenschaften an, die in normalen Zellen nicht vorkommen. Diese abnormale Veränderung äußern sich intra- sowie extrazellulär, wie zum Beispiel veränderte mechanische Eigenschaften der extrazellulären Matrix. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob alle Krebszellen ähnliche Materialeigenschaften besitzen oder ob die mechanischen Eigenschaften vom Tumortyp abhängen.⁶⁵ Bei einem fortschreitenden Krebsverlauf, scheinen einige Subpopulation von Tumorzellen weicher zu werden. Dieses Phänomen wird immer noch kontrovers diskutiert.⁶⁶

A)



B)

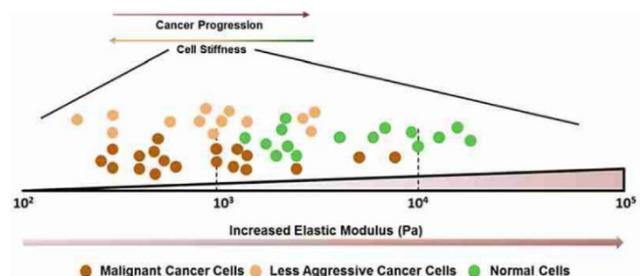


Abbildung 7: Mechanische Eigenschaften von Tumorgewebe. A) Eine wachsende Zahl von Studien zeigt, dass einzelne Krebszellen verformbarer sind als ihre gesunden Vergleichszellen und dass eine Erweichung der Zellen während der Krebsprogression auftritt. Die mechanischen Unterschiede zwischen normalen und Krebszellen könnten in erster Linie auf Modifikationen des Zytoskeletts zurückzuführen sein, aber auch andere Faktoren, wie die Mikroumgebung der Zelle oder interner Membranverkehr.⁶⁶ B) Das Elastizitätsmodul von Krebszellen wurde mit AFM gemessen und ist Studien zufolge niedriger als bei normalen Zellen, die aus Brust, Leber, Eierstock, Blase und Niere isoliert wurden.⁶⁶ Die Steifigkeit der Krebszellen nimmt ab, während die Steifigkeit des Gewebes mit dem Fortschreiten des Krebses zunimmt.⁶⁷

Es gibt zahlreiche Gewebe, die hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften noch nicht umfassend erforscht wurden. Obwohl Gewebe wie periphere Nerven, Bänder, Darmgewebe und Milz auf Makroskala analysiert wurden, fehlen weitere Untersuchungen auf der Nano- oder Mikroskala-Ebene. Für viele andere Gewebe wurden bisher keine oder nur wenigen Untersuchungen zur Mechanik durchgeführt.⁵⁵

2.3 Gewebedissoziation

Der Begriff Gewebedissoziation (auch: Gewebeaufschluss, Gewebeaufarbeitung) beschreibt die Auflösung eines Gewebeverbundes mit dem Ziel, die zellulären Bestandteile des betreffenden Gewebes zu vereinzeln, ohne sie in ihrer Zellintegrität zu beschädigen. Hierbei soll ausschließlich der Gewebeverbund aufgeschlossen werden, nicht aber die einzelnen Zellen. Die Gewebedissoziation ist daher ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Auflösen des Gewebes und Erhalt, der darin befindlichen Zellen.¹³

Dekonstruktion der komplexen Zusammensetzung von soliden Tumoren auf Einzelzellebene können helfen, biologische Zusammenhänge besser zu verstehen. Jenseits der sich schnell entwickelnden Bereich der Einzelzellgenomik⁴⁴, ist die Isolierung von Einzelzellen ein entscheidender Schritt für die Etablierung von primären Zelllinien. Durch aseptische Entnahme von gewöhnlichem, embryonalem oder bösartigem Gewebe sowie von Organen mittels chirurgischer oder enzymatischer Verfahren können primäre Zellkulturen erzeugt und in eine unterstützende Kultivierungsumgebung überführt werden.⁶⁸ Die erste Gewebedissoziation mit einem apparativen Aufbau wurde 1948 von Richard D. Northcraft beschrieben.⁶⁹

Der erste Schritt bei der Isolierung einzelner Zellen aus Primärproben ist die Herstellung einer Suspension lebensfähiger Einzelzellen. Dies ist nicht trivial, wenn mit komplexen festen Geweben gearbeitet wird, die eine mechanische oder enzymatische Dissoziation erfordern, die die Zellen lebensfähig hält, ohne sie für bestimmte Subpopulationen zu belasten.¹² Gewebe ist ein Zellverbund bestehend aus Zellen, die in eine ECM eingebettet sind. Innerhalb dieser Matrix sind die Zellen durch Zell-Zellverbindungen miteinander verankert.⁷⁰ Die ECM von Säugetiergewebe besteht aus einem komplexen Gemisch von konstitutiven Proteinen. Diese Matrix muss aufgebrochen werden, um einzelne Zellen für die Kultur und/oder Analyse effektiv zu gewinnen und bereitzustellen.

Die Gewebedissoziation ist ein zentraler Prozess in vielen Forschungsbereichen.⁷¹ Die derzeitigen Dissoziationsmethoden sind meist ineffizient, so dass ein erheblicher Teil des Gewebes als Aggregate zurückbleibt, die herausgefiltert werden oder zu verzerrenden Ergebnissen führen. Neben der überwiegend manuellen Gewebedissoziation gibt es drei primäre Methoden für die Gewebedissoziation. Dazu gehören: enzymatische, chemische und mechanische Dissoziation.⁷² Im Falle einer molekularen Analyse ist der mechanische Ansatz das bevorzugte

Verfahren. Behandlung mittels chemischen oder enzymatischen Reagenzien ist unzweckmäßig, da sie auch die Proteine angreifen, die später für eine Markierung oder Färbung und eine molekularbiologische Analyse benötigt werden.⁷³

Des Weiteren sind klinische Gewebeproben zur Gewinnung von Primärzellen oftmals nur in geringen Mengen verfügbar. Bedingt durch den hohen Bedarf an Primärzellen und die limitierte Probenverfügbarkeit von Gewebeproben, sollte die Gewinnung von Primärzellen möglichst effizient erfolgen.⁷⁴ Untersuchungen im Bereich der Biomechanik zum Verhalten von biologischen Geweben unter mechanischen Belastungen betrachten bislang nur Verformungen von Geweben bis zum Stadium der strukturellen und physikalischen Veränderung auf Gewebeebene und nicht in Bezug auf die Ausbeute und Integrität der generierten Einzelzellen.⁷⁵ Ein allgemeiner Zusammenhang zwischen den Materialeigenschaften von Gewebe und deren mechanischer Dissoziation ist daher bislang nicht bekannt.

2.3.1 Enzymatisch, chemisch und mechanische Gewebedissoziation

Zu den Methoden der Gewebedissoziation aus festen Gewebeproben gehören der enzymatische Verdau, die chemische und mechanische Dissoziation (Abbildung 8).

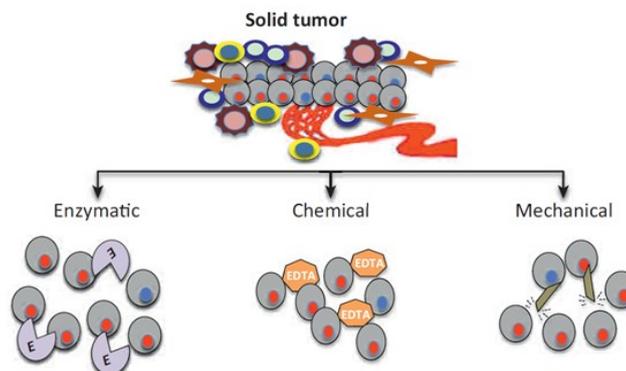


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Verfahren zur Herstellung von Einzelzellen aus einer primären Tumorgewebeprobe. Die solide Gewebeprobe wird je nach Gewebeursprung oder Analyseverfahren entweder durch enzymatische, chemische oder mechanische Verfahren dissoziiert.⁷³

Enzymatisch: Die gebräuchlichste Methode zur Zellisolierung ist der enzymatische Verdau. Bei diesem Verfahren wird eine Zellsuspension erhalten, indem die Gewebeprobe in kleine Fragmente geschnitten wird, gefolgt von der Behandlung mit proteolytischen Enzymen (auch als Peptidasen, Proteasen und Proteinasen bezeichnet).⁷⁶ Proteolytische Enzyme sind in der Lage, Peptidbindungen in Proteinen zu hydrolysieren.⁷⁷ Der Zweck ist, dass diese Enzyme Bindegewebe und die Komponenten der umgebenden extrazellulären Matrix verdauen, was die Freisetzung von Zellen aus einer großen Vielzahl von Geweben erleichtert. Ferner kann die enzymatische Dissoziation unter Verwendung verschiedener Proteasen differentielle Ausbeute und Lebensfähigkeit von Zellen erzeugen, da sich Proteasen in ihren Spezifitäten unterscheiden.⁷⁸ Die Wirksamkeit von Enzymen kann auch in Abhängigkeit von nicht nur der Art

des Gewebes und des Alters, sondern auch aufgrund der Schwankungen in der Lagerzeit und der Temperatur variieren. Daher sind diese kommerziell erhältlichen Enzyme nicht für jeden Gewebetyp geeignet. Bedingt durch diese nicht immer kontrollierbaren Einflussfaktoren, muss für jeden Gewebetyp für eine erfolgreiche Primärkultur eine optimierte Methode entwickelt werden.

Chemisch: Die chemische Dissoziation wird häufig in Verbindung mit mechanischen oder enzymatischen Verfahren eingesetzt. Der chemische Aufschluss erfolgt meistens mit EDTA oder EGTA.⁷³ Diese Chemikalien sind in der Lage, die Kationen zu binden, die an den intrazellulären Bindungen und der intrazellulären Matrix beteiligt sind. Durch die Bindung der Kationen werden die interzellulären Bindungen aufgebrochen. Zur Solubilisierung biologischer Membrane, also das Auflösen von wasserscheuen (hydrophoben) Stoffen wie beispielsweise Lipiden, werden milde Detergenzien eingesetzt. Durch den Einsatz werden Fette oder fettähnliche Substanzen, die sich in der Zellwand befinden, aufgelockert oder sogar gelöst.⁷⁹ Wie bei dem enzymatischen Aufschluss können auch nach einem chemischen Aufschluss keine oder nur eingeschränkt weitere Analysemethoden, wie die Färbung der Zelle durchgeführt werden. Dissoziationsprotokolle müssen für jeden Gewebetyp individuell angepasst werden.

Mechanisch: Die mechanische Dissoziation von Gewebe kann wiederholtes Zerkleinern mit Scheren oder scharfen Klingen, Abschaben der Gewebeoberfläche, Homogenisieren, Filtrieren durch ein Nylon- oder Stahlnetz, Vortexen, wiederholtes Ansaugen durch Pipetten oder Nadeln mit kleinem Durchmesser oder eine beliebige Kombination dieser Techniken bedeuten.^{80–82} Durch Drücken des Gewebes durch ein Sieb oder eine Spritze können einzelne oder kleine Zellklumpen aus der Masse des Gewebes erhalten werden. Obwohl diese Technik eine Zellsuspension schneller als andere Verfahren erzeugt, wird manchmal ein Adhäsionsfaktor benötigt, um ihre Befestigung an dem Substrat zu unterstützen, da die Fähigkeit der Zellen zum Anhaften reduziert ist.⁸³ Außerdem kann dieses Verfahren einen großen mechanischen Schaden verursachen und dadurch weniger lebensfähige Zellen als andere Methoden erzielen.⁸⁴ Diese Methoden führen zu unterschiedlichen Zellausbeuten und Zellviabilitäten.

2.3.2 Explantmethode

Die Kultivierung von Zellen, bei der die Explantationsmethode angewendet wird, dominierte das Gebiet der Gewebekultur für mehr als 50 Jahre.^{85,86} Dies ist eines der einfachsten Verfahren, bei dem das Gewebe in kleine Fragmente (Explantate) von nicht mehr als 1 bis 2 mm³ fein zerhackt wird. Die Explantate werden in einen Glas- oder behandelten Plastikkulturkolben gegeben und mit Zellkulturmedium vollständig bedeckt.⁸⁷ Sofern erfolgreich, wandern die Zel-

len aus den Explantaten heraus und bedecken die freie Wachstumsoberfläche in den Kulturgefäßen. Dies wird als primäre Zellkultur bezeichnet. Dies ist das Stadium der Kultur nach der Isolierung, aber vor der ersten Subkultur oder Passage der Zellen.

Die Anforderungen an Technologien zur Dissoziation einzelner Zellen von Gewebeproben unterschiedlicher Natur sind so heterogen wie der Zweck, für den die Zellen nach dem Dissoziationsprozess verwendet werden. Es besteht also ein kritischer Bedarf für die Entwicklung neuer Technologien, die es ermöglichen einzelne Zellen aus biologischem Gewebe in einer schnellen, effizienten und schonenden Weise freizusetzen. Diese Technologien müssen ebenfalls Schlüsselkriterien, wie Skalierung, Automatisierung und Standardisierung erfüllen, um für den Eintritt in die Routinediagnostik geeignet zu sein.

2.4 Aufbau der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen systematische wissenschaftliche Grundlagen und Lösungen für ein neues und teilautomatisiertes Verfahren für den enzymfreien und mechanischen Gewebeaufschluss entwickelt, validiert und getestet werden. Dieses Vorhaben ist in vier Teilschritte gegliedert:

1. Analyse

Aus der Analyse der derzeit eingesetzten Methoden für die Gewebedissoziation und Anwendungsbereiche, werden die Anforderungen an ein Verfahren für ein mechanisches und enzymfreies Gewebeaufschlussverfahren abgeleitet. Hierzu werden die Randbedingungen der Gewebedissoziation und das zu entwickelte Gewebeaufschlussverfahren analysiert und charakterisiert. Basierend auf dieser Analyse werden die allgemeinen Untersuchungs- und Entwicklungsschwerpunkte an ein enzymfreies, mechanisches und teilautomatisiertes Verfahren für die Gewebedissoziationsverfahren abgeleitet und definiert.

2. Stand der Technik

Als Basis für die Auslegung eines enzymfreien und mechanischen Verfahrens zur teilautomatisierten Gewebedissoziation sollen die derzeit verfügbaren Technologien zur Prozessierung von Gewebeproben analysiert werden. Dabei werden die aus dem vorgegangenen Kapitel abgeleiteten Kriterien bewertet und gegenübergestellt. Dazu werden konkrete Details ausgearbeitet, sowie Randbedingungen und Schnittstellen zwischen den verschiedenen Prozessbestandteilen festgelegt. Prozessschritte, welche im Rahmen des Arbeitsablaufs nicht (teil-)automatisiert durchgeführt werden, werden hinsichtlich der bereits bestehenden, geeigneten Systeme zur Prozessierung analysiert und die Schnittstellenspezifikation fließt in die Entwicklung ein. Der Prozessablauf bei der Probenvorbereitung richtet sich nach der Probe, deren

Merkmale sowie nach den zu analysierenden Zielstrukturen und der Fragestellung und Methode der Analyse. Aus diesen Spezifikationen der Anwendungen lassen sich anwendungsspezifische Anforderungen an zum Beispiel die Menge, Zellausbeute, Aufschlussgrad und Qualität der zu gewinnenden Zellen ableiten.

3. Entwicklung eines Lösungsansatzes

In diesem Kapitel werden unter Berücksichtigung der festgelegten Randbedingungen und im Hinblick auf die gerätetechnische Umsetzung die Grundlagen des Lösungskonzeptes für ein enzymfreies, mechanisches und teilautomatisiertes Verfahren erarbeitet. Im Einzelnen handelt es sich um die theoretische Betrachtung und Auslegung des mechanischen Wirkorgans, Entwicklung und Optimierung des Verfahrens, die parallelisierte Gewebeaufbereitung und die Evaluierung des entwickelten Verfahrens unter Berücksichtigung der Entwicklungs- und Forschungsschwerpunkte.

4. Validierung

Das konkrete Ziel der Validierung der enzymfreien, mechanischen und teilautomatisierten Gewebedissoziation ist die Abgrenzung zum enzymatischen und manuellen oder teilautomatisierten Dissoziationsprozess bezogen auf Effizienz und Qualität der generierten Einzelzellen. Durch den Aufbau eines Demonstrators und dessen Erprobung in klinisch relevanten Einsatzfällen mit repräsentativen Gewebeproben wird der Nachweis der technischen Machbarkeit erbracht und eine Überprüfung und Bewertung der Forschungsarbeit ermöglicht. Das prototypische System soll mit Hilfe eines zweistufigen Testplans validiert werden. Die erste Stufe umfasst Funktionstests, darunter mechanische und biologische Tests mit verschiedenen Gewebetypen. Hier wird die technische Integration der Komponenten sowie die biologische Robustheit und Machbarkeit des Systems überprüft. Nachfolgend wird die entwickelte Gewebedissoziation in definierten anwendungsspezifischen Szenarien validiert, um unter realen Bedingungen die Systemtauglichkeit und Vorteile im Vergleich zum aktuellen Stand der Technik zu demonstrieren.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit ein System für die bisher fehlende enzymfreie und teilautomatisierte Gewebedissoziation entwickelt. Dabei soll ein Prototyp zur Gewebedissoziation entwickelt werden, der die dissoziierten Zellen im Gegensatz zu gängigen Verfahren möglichst wenig in ihrer molekularen Integrität schädigt und damit robuste Analysen bei einer hohen Parallelisierung ermöglicht. So werden einerseits die jeweiligen Teilsysteme hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit (z.B. Zellviabilität, Zellausbeute, Dissoziationseffizienz) charakterisiert und getestet und andererseits Trockentests der Systemabläufe im Rahmen der Integration durchgeführt.

3 Analyse

In diesem Kapitel werden die benötigten Verfahrensschritte, Verfahrenskonzepte und Spezifikationen zur Realisierung des kompletten Arbeitsablaufs in und um den Demonstrator identifiziert, analysiert und am Ende zu einem Gesamtverfahren zusammengefasst. Insbesondere stehen der Gewebedissoziationsprozess mit (prä)-analytische Variablen und die verschiedenen Dissoziationsmethoden (Explantmethode, mechanische und enzymatische Gewebeaufbereitungsverfahren) im Fokus der Analyse.

3.1 Grundlegende Überlegungen und Definitionen für die Gewebedissoziation

Die Gewebedissoziation bedient sich verschiedener Methoden, um eine Vereinzelung der zellulären Gewebestandteile zu erreichen. In der vorliegenden Arbeit wird auf die hauptsächlich angewandten Methoden des nicht-enzymatischen, der enzymatischen und mechanischen Dissoziation eingegangen. Die Methoden werden, je nach Anwendung, eigenständig oder in Kombination genutzt. Unabhängig von der angewandten Methodik bleiben die grundlegenden Anforderungen an den Dissoziationsprozess konstant. Das Ziel der Gewebedissoziation ist die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus einer Gewebeprobe (Abbildung 9). Die Gewebeverarbeitung stellt im analytischen Prozess ein zentraler Baustein dar. Eine damit zusammenhängende Herausforderung ist zum Beispiel die unterschiedliche Zugänglichkeit spezifischer Zelltypen für verschiedene analytische Tests.⁸

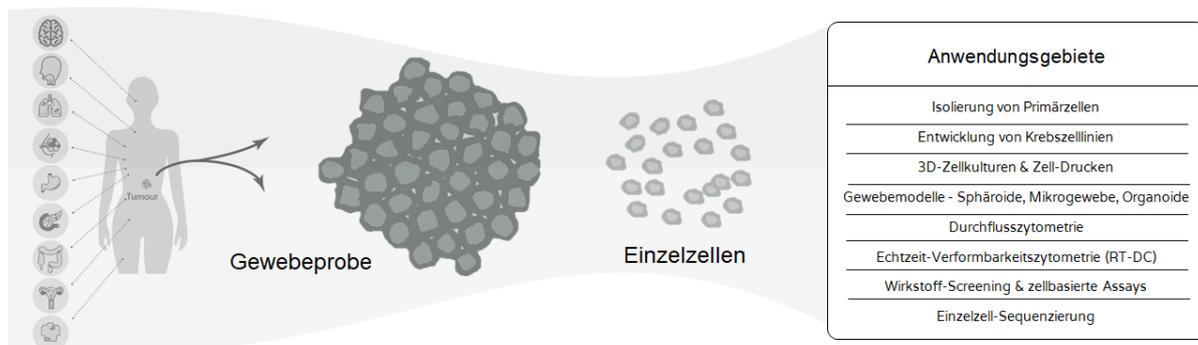


Abbildung 9: Zentrales Dogma der Gewebedissoziation.^{88,89} Die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus unterschiedlichen Gewebeproben ist der zentrale Kern der präanalytischen Phase. In der analytischen Phase werden die Einzelzellen mittels verschiedener Methoden untersucht und weiterverarbeitet.

Hieraus leiten sich zwei maßgebliche Anforderungen an die Gewebedissoziation ab: eine möglichst vollständige Auftrennung der Gewebeprobe in Einzelzellen, sowie eine hohe Viabilität der dissoziierten Zellen. Im Idealfall vereinzelt ein Verfahren die zellulären Bestandteile der Gewebeprobe, ohne dabei die Zellen selbst aufzuschließen. Zusätzliche Anforderungen werden in der Einsetzbarkeit bei verschiedenen Gewebearten, geringem Material- und Zeitauf-

wand, Analysemethode sowie im Grad der möglichen Automatisierung gesehen. Insbesondere die Automatisierung ist im Hinblick auf den steigenden Kostendruck in der Diagnostik, zunehmende Anforderung an die Standardisierung von Prozessen und der Wunsch nach vernetzbaren Prozessen von steigender Bedeutung.⁹⁰

Die Aufgabe der Dissoziation von Gewebe zu einer vereinzelt Zellpopulation kann auf folgendes Grundprinzip vereinfacht werden: auf eine Gewebeprobe wird mit Hilfe einer geeigneten Technologie oder Verfahren mittels mechanischer Kräfte und Unterstützung von Enzymen oder chemischen Zusätzen eingewirkt. Ein genauerer Blick jedoch zeigt, dass es bestimmte Aspekte zu berücksichtigen gibt, die unabhängig von der Technologie oder des Verfahrens über die Qualität und Effizienz der Gewebedissoziation bestimmt. Qualität in diesem Zusammenhang sollte nicht einen Rang zwischen überlegener oder schlechter Leistung bedeuten, sondern sich auf die charakteristischen Eigenschaften eines bestimmten Dissoziationsprozesses beziehen und auf die nachgeschaltete Analysemethode abgestimmt sein. Die drei kritischen Parameter, die nach der Gewebedissoziation von festem Gewebe bewertet werden müssen, sind:

- (i) die Lebensfähigkeit der Zellen,
- (ii) die Zellausbeute und
- (iii) die Effizienz der Dissoziation.

Deshalb muss jede Dissoziation hinsichtlich dieser Parameter abgestimmt werden, um ein optimales Ergebnis zu gewährleisten. Kennzeichen einer optimierten Dissoziation sind eine hohe Viabilität, sowie eine hohe Ausbeute an Einzelzellen unter vollständige Dissoziation der Gewebeprobe (Abbildung 10).

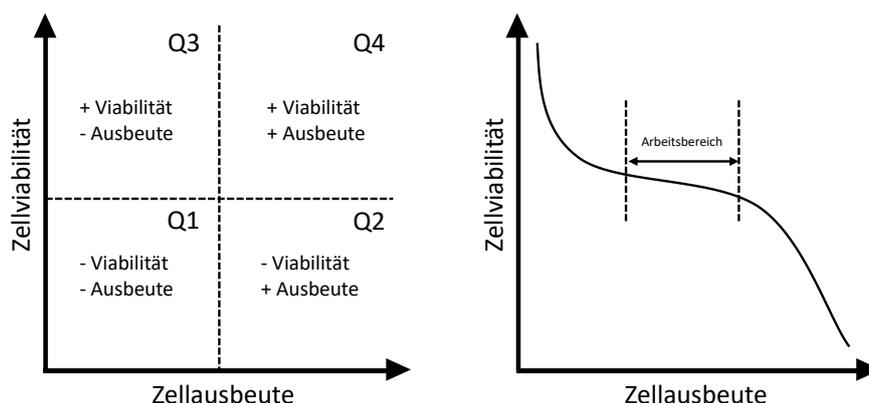


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Zellausbeute und Zellviabilität bei einer Gewebedissoziation.⁹¹

Die Notwendigkeit der Erfüllung eines bestimmten qualitativen oder quantitativen Leistungskriteriums variiert je nach Anwendungsfall. Eine hohe Wiederfindungsrate ist zum Beispiel für

Anwendungen mit seltenen Zielzellen entscheidend (z.B. Tumorzelldetektion in Lymphknoten). Für die meisten Anwendungen ist auch der Durchsatz wichtig, um eine große Menge an Gewebeprobe in einer bestimmten Zeit zu prozessieren. Sehr oft können die quantitativen Leistungsparameter aus technischen oder konzeptionellen Gründen nicht gleichzeitig maximiert werden. Daher sind solche quantitativen Leistungsparameter oft entscheidend für die Wahl einer bestimmten Dissoziationstechnik.

Für die Dissoziation von Gewebe gibt es verschiedene Verfahren. Besonders der enzymatische und mechanische Aufschluss haben sich in den letzten Jahren etabliert. Häufig kommen auch Kombinationen aus beiden Verfahren vor. Die Auswahl der entsprechenden Gewebeaufschlussmethodik ist abhängig von den Gewebeeigenschaften. Im Folgenden werden die Begriffe "soft", "medium" oder "harsch" verwendet, um zelluläre Materialien von niedriger bis hoher Elastizität zu qualifizieren (siehe Abschnitt 2.2).

3.1.1 Definition der Methoden zur Bestimmung der Zellqualität

Abgesehen von den qualitativen Unterschieden zwischen den verschiedenen Dissoziationstechnologien, gibt es auch quantitative Leistungskriterien, die für jede beliebige Technologie herangezogen werden können.

Zellviabilität und Gesamtzellzahl: Die Zellviabilität in einer einzelnen Zellsuspension kann leicht mit dem Trypanblau-Zellviabilitätsausschlusstest überprüft werden, bei dem tote Zellen den Farbstoff Trypanblau in ihr Zytoplasma absorbieren, während lebende Zellen ihre selektiv permeable Membran behalten und den Trypanblaufarbstoff am Eindringen in das Zytoplasma hindern⁹². Die relative Menge an lebenden und toten Zellen in der Einzelzellsuspension kann dann mittels Lichtmikroskopie oder automatisierten Systemen (wie zum Beispiel Countess3® oder NucleoCounter® NC-202™) ausgewertet werden. Die Countess 3 ist eine automatisierte Version der Neubauer Zählkammer. Als weitere Methode zur Bestimmung der Zellviabilität und Zellzahl wurde der Nucleocounter eingesetzt. Dieser automatisierte Zellzähler verwendet ein integriertes Fluoreszenzmikroskop zum Nachweis von DNA gebundenem Propidiumiodid (PI). Die Zelllösung wird in die NucleoCassette™ geladen, in der PI auf der Innenseite immobilisiert ist. Dies führt dazu, dass sich PI auflöst und die DNA der Zellen in der Lösung anfärbt. Nach dem Einlegen der Kassetten in den Nucleocounter regt grünes LED-Licht die PI-DNA-Wechselwirkung an. Dies führt zur Emission von rotem Licht, das von der CCD-Kamera erfasst und in eine Zellzahl umgerechnet wird. Zelltrümmer und Zellaggregate können ebenfalls lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Die Zugabe einer Kernfärbung unterscheidet intakte Zellen von Zelltrümmern, und die Zugabe eines Lebensfähigkeitsfarbstoffs ermöglicht die Quantifizierung des prozentualen Anteils der toten Zellen⁷⁰.

Die Viabilität und Gesamtzellzahl werden im Lichtmikroskop mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt.⁹³ Hierzu werden je 10 µl Zellsuspension und 10 µl 0,4 %ige Trypanblaulösung gemischt und 10 µl auf die Zählkammer pipettiert. Es werden vier Großquadrate ausgezählt.

Die Gesamtzellzahl pro Milliliter Zellsuspension wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right] = n * 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} * 10^4$$

Formel 1: Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Neubauerzählkammer.

n entspricht dem Mittelwert aller gezählten Zellen aus den vier Großquadraten. Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wurden im Mikroskop ausschließlich nicht blau erscheinende Zellen gezählt und nach der gleichen Formel berechnet. Die Berechnung der Viabilität der Zellpopulation erfolgte nachfolgender Formel:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl/ml}}{\text{Gesamtzellzahl/ml}} \times 100$$

Formel 2: Bestimmung der Viabilität

Dissoziationseffizienz: Um den prozentualen Aufschlussgrad nach der Gewebedissoziation zu erhalten, ist es wichtig, die verwendeten Probengefäße vorher auszuwiegen. Zunächst wird das eigentliche Probengewicht im Mahlwerk berechnet, da beim Überführen der Gewebeprobe in das Mahlwerk mit Probenverlust gerechnet werden muss. Dafür wird das mit Gewebeprobe und Puffer befüllte Mahlwerk mit Filter ausgewogen und davon das Leergewicht von Mahlwerk und Filter subtrahiert.

$$\text{Dissoziationseffizienz} = \frac{(\text{Gewebemenge [mg]} - \text{Restgewebe [mg]})}{\text{Gewebemenge [mg]}} \times 100 \text{ [\%]}$$

Formel 3: Bestimmung der Dissoziationseffizienz definiert durch die Differenz zwischen dem Eingangsgewicht und dem nach der Verarbeitung in den Röhrchen verbleibenden Gewebe.

Fluoreszenzmikroskopie: Fluoreszenzmikroskopie ist eine Technik, die verwendet wird, um unter anderem Oberflächenmoleküle zu untersuchen und zu visualisieren. Dabei werden die Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die bei Anregung durch Licht eine sichtbare fluoreszierende Strahlung emittieren. Die markierten Moleküle werden dann unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Auf diese Weise können die Oberflächenmoleküle sichtbar gemacht und untersucht werden.

Western Blot: Western Blot ist eine Technik, die in der Molekularbiologie verwendet wird, um Proteine in einer Probe zu identifizieren. Dabei werden die Proteine auf einer Membran fixiert und dann mit speziellen Antikörpern markiert, die spezifisch für das Protein sind, das unter-

sucht wird. Anschließend werden die markierten Proteine sichtbar gemacht, indem ein Fluoreszenzfarbstoff an die markierten Antikörper bindet. Die markierten Proteine können dann unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die Western Blot-Technik wird häufig verwendet, um die Expression von Proteinen in verschiedenen Zellen oder Geweben zu untersuchen und Veränderungen in der Proteinmenge im Laufe der Zeit zu verfolgen.

Ein Western Blot Apoptose Assay ist ein Verfahren, das verwendet wird, um die Menge von Proteinen zu bestimmen, die während des programmierten Zelltods gebildet werden. Auf diese Weise kann die Apoptose-Rate in der Zellpopulation bestimmt werden und einen Einblick in das Stresslevel der Zellen zu erhalten.

Resazurrin Assay: Resazurrin Assay ist eine Technik, die in der Zellkultur verwendet wird, um die Zellviabilität zu bestimmen. Dabei wird Resazurrin, ein blaues Farbstoffmolekül, in die Zellkultur gegeben. Lebende Zellen können Resazurrin reduzieren und es in ein rosa Farbstoffmolekül namens Resorufin umwandeln. Die Menge an Resorufin, die gebildet wird, kann dann gemessen werden, um die Zellviabilität zu bestimmen. Ein höherer Resorufin-Gehalt bedeutet, dass eine größere Anzahl von Zellen lebendig ist und Resazurrin reduzieren kann. Auf diese Weise kann die Zellviabilität in verschiedenen Zellkulturen verglichen und Veränderungen in der Zellviabilität im Laufe der Zeit verfolgt werden.

Die molekularbiologischen Versuche wurden – wenn nicht an entsprechender Stelle anders vermerkt oder ergänzt – mit den hier genannten Methoden durchgeführt.

3.2 Analyse der Prozessschritte einer Gewebedissoziation

In diesem Abschnitt werden verschiedene Faktoren untersucht, die die Effizienz und die Qualität der Gewebedissoziationsmethoden beeinflussen können, wie zum Beispiel die Art des verwendeten Gewebes, die Art der Dissoziationslösung, die Dauer der Dissoziation, die Temperatur und andere Faktoren. Die Prozessanalyse der Gewebedissoziationsmethoden kann verwendet werden, um geeignete Bedingungen für die Dissoziation von Geweben zu bestimmen und um die Qualität und Integrität der dissoziierten Zellen zu verbessern.

Der Prozessablauf bei der Probenvorbereitung richtet sich nach der Probe, deren Merkmale sowie nach den zu analysierenden Zielstoffen und der Fragestellung und Methode der Analyse (Abbildung 11). Aus diesen Spezifikationen der Anwendungen lassen sich die Anforderungen an die Menge und Qualität der zu gewinnenden Zellinhaltsstoffe ableiten. Die Gestaltung des Prozessablaufs und die Auswahl der Verfahren, das heißt der Methoden und Hilfsmittel richtet sich zudem nach der Probenanzahl und dem gewünschten Probendurchsatz pro Zeiteinheit. In der Praxis spielen zusätzlich die Fertigkeiten des Anwenders sowie die Verfügbarkeit von Hilfsmitteln und Geräten im Labor eine Rolle.

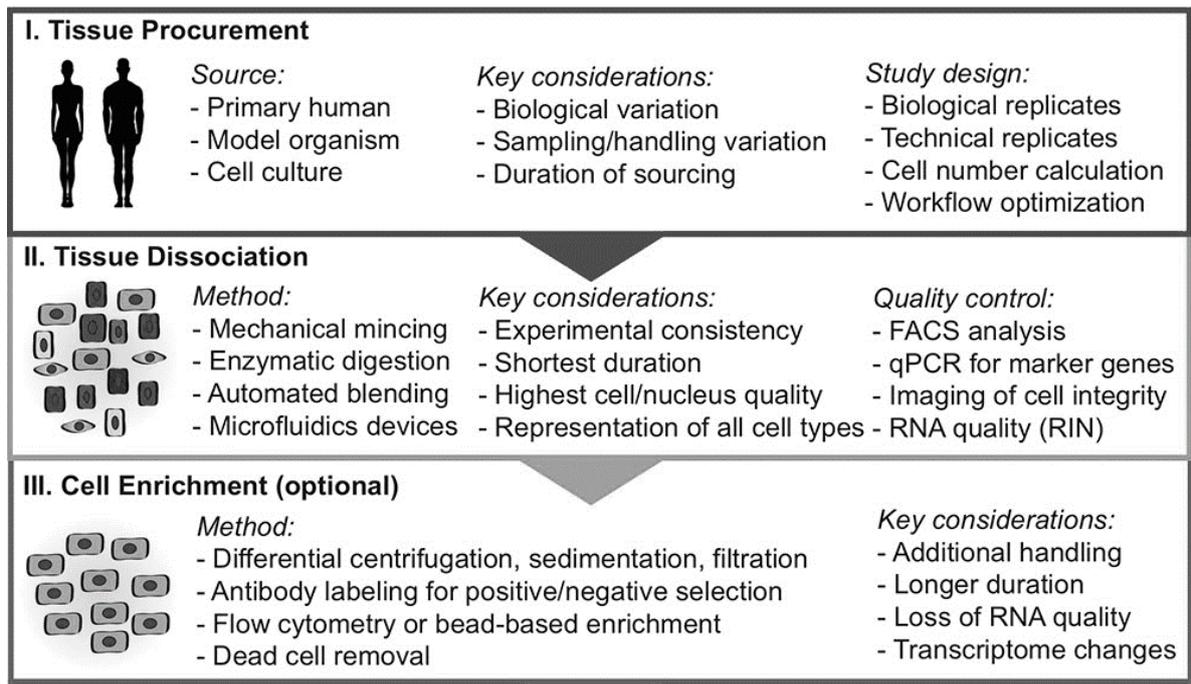


Abbildung 11: Überblick über die schrittweise Vorgehensweise und Schlüsselfaktoren bei der Einzelzellanalyse.²⁷

Zusätzlich zu der hohen Arbeitsintensität, erhöhen lange Dissoziationsprotokolle mit vielen Pipettier- und Prozessschritten das Kontaminationsrisiko erheblich, hinzu kommen noch Bedienfehler und Variabilität von verschiedenen Nutzern.⁹⁴ Verschleppung und Kontamination können sowohl die Genauigkeit und Präzision einer Methode beeinträchtigen und sollten während der Methodenentwicklung minimiert oder eliminiert werden.⁹⁵ Bei bioanalytischen Tests sind Verschüttungen, Aerosole und Tropfen während der Flüssigkeitstransferphasen die Hauptursachen für Kreuzkontaminationen während der Probenvorbereitung (Abbildung 12).

Preparation Steps	Carryover	Cross-Contamination	SPE	LLE	PPT
Aliquot sample, addition of internal standard and reagent, mixing	Medium	Medium	√	√	√
SPE elution	Low	High	√	√	—
Vigorous mixing	High	High	—	√	√
Transfer of supernatant/extract	Medium	High	—	√	√
Evaporation of extract	Medium	High	√	√	√
Dilute extraction and mixing	Medium	Medium	√	—	√

*SPE indicates solid phase extraction; LLE, liquid-liquid extraction; PPT, protein precipitation. Check marks (√) indicate the at-risk steps involved in SPE, LLE, or PPT.⁵

Abbildung 12: Übersicht über das Risiko einer Verschleppung und Kreuzkontamination während der Probenvorbereitung.⁹⁵

In Abbildung 13 ist in einer Prozessübersicht dargestellt, welche typischen Prozessschritte bei einem mechanisch/enzymatischen Gewebedissoziationsprotokoll Anwendung finden. Dieses Protokoll beschreibt beispielhaft die standardmäßige Herstellung von Einzelzellsuspensionen

aus menschlichen Geweben. Es ist anzunehmen, dass dieses Protokoll auch bei anderen menschlichen Gewebe- und Krebsarten sowie bei festen Geweben anderer Spezies funktionieren wird.

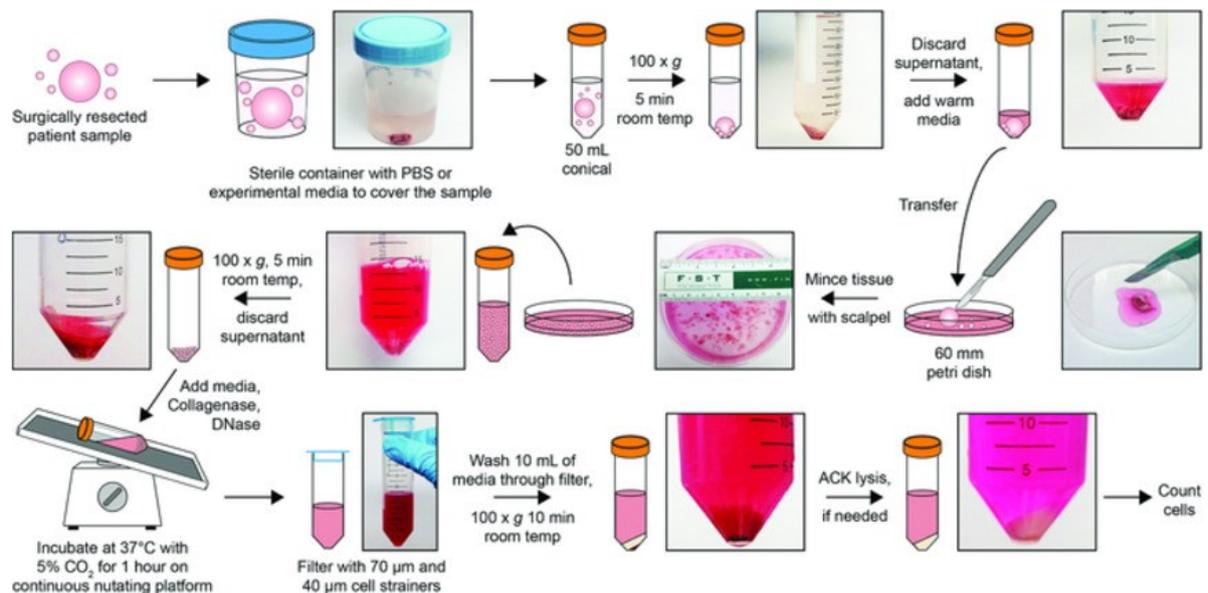


Abbildung 13: Schritt-für-Schritt-Darstellung eines allgemeingültigen Protokolls zur Gewebedissoziation. Chirurgisch resezierte Patientenproben wurden in PBS, normaler Kochsalzlösung oder in einem experimentellen Medium bei Raumtemperatur transportiert. Auf die mechanische Dissoziation folgte eine 1-stündige enzymatische Dissoziation unter Verwendung von Collagenase II und DNase I. Die ACK-Lyse wurde zur Erythrozytenlyse vor der Zellzählung und Kryokonservierung oder dem Experiment eingesetzt.⁹⁶

Unter Vorbehandlung ist das Zerteilen der Probe in ein für das Aufschlussystem geeignetes Gefäß, optional das Abwiegen und eine Vorzerkleinerung zu verstehen. Dabei werden Messer, Scheren oder Skalpelle eingesetzt, die Probe befindet sich meist in einem flächigen Gefäß, beispielweise einer Petrischale. Als Hilfsmittel zur Handhabung der Probe kann eine Pinzette dienen. Zellen aus Gewebeproben, wie z.B. Biopsien von soliden Tumoren, sind oft schwer zu dissoziieren und in Suspension zu bringen, insbesondere wenn die Zellintegrität erhalten bleiben soll.⁹⁷ Typische Belastungsfaktoren sind eine unzureichende Temperatur, suboptimale Pufferbedingungen, enzymatische Dissoziation von Zellen oder mechanische Belastung bzw. Schäden durch Zentrifugation, Resuspension oder Vortexing der Zellen. Dabei sind die Auswirkungen auf die Zellen oft abhängig von der Einwirkzeit dieser Faktoren sowie auf die Prozess- und Lagerzeiten vor dem eigentlichen Gewebedissoziationsprozess. Im folgenden Abschnitt werden präanalytische und analytische Variablen aufgeführt und im Detail analysiert, die den Gewebedissoziationsprozess beeinflussen können.

3.2.1 Präanalytische Variablen

Präanalytische Variablen (wie z.B. Gewebeverfügbarkeit, Handhabung und Verarbeitung, Temperatur und Qualität), die während des analytischen Prozesses von Probenempfang bis

hin zur Analyse auftreten, beeinflussen das klinische Verwertungsergebnis⁶. Jeder dieser Variablen kann als individueller Ansatzpunkt für die Möglichkeit einer Standardisierung des präanalytischen Prozesses gesehen werden. Die Variabilität in der präanalytischen Phase kann die Qualität der Gewebeerarbeitung beeinflussen, da sich die molekularen Profile der Zellen während der Gewinnung, Lagerung und Verarbeitung der Proben verändern können.⁹⁸ Längere Zeitabstände zwischen Gewebeentnahme und Prozessierung trägt auch zur Gewebeschämie bei, die Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression induzieren kann, wie z.B. eine verminderte Östrogenrezeptorexpression im Brustkrebsgewebe.⁹⁹ Daher sollten bei der Bewertung der analytischen Ergebnisse Variablen der Probenverarbeitung berücksichtigt werden. Einige der wichtigsten probenabhängigen Variablen werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

Zustand des Gewebes: Bei der Auswahl von Gewebe für weitere molekulare Tests sind eine Reihe von Details zu beachten: die Gewebequelle, welches für molekulare Tests verwendet werden soll, die Art der Entnahme und Verarbeitung, einschließlich des verwendeten Fixiermittels, die Gesamtmenge des Tumors in diesem Gewebe und der prozentuale Anteil der Tumorzellen. Während Gewebeproben theoretisch innerhalb von ca. 15 Minuten nach der chirurgischen Entnahme entnommen, verarbeitet und eingefroren werden könnten, erfordert dies in der Regel speziell zugewiesenes Personal und spezifische Ressourcen sowie eine effiziente und personell gut ausgestattete Chirurgie und Pathologie.¹⁰⁰ Sobald die Probe dem Patienten entnommen wurde, ist es wichtig, grob nekrotische oder verbrannte Bereiche schnell abzuschneiden und die Probe in kaltes serumfreies Medium zu tauchen. Die Probe ist während der gesamten Verarbeitungszeit auf Eis zu halten, mit der einzigen Ausnahme während der Inkubation mit Verdauungsenzymen und der Lyse der roten Blutkörperchen.¹⁰¹ Empfohlen wird die Proben nach der Entnahme bis zur Verarbeitung bei ca. 4 °C (feuchtes Eis), aber nicht gefroren, aufzubewahren. Die Zeit bis zur Lagerung sollte so kurz wie möglich sein; es kann jedoch immer zu Verzögerungen bei der Verarbeitung kommen, wenn eine sehr große Probe oder mehrere Proben gleichzeitig verarbeitet werden müssen.¹⁰²

Spezies und Alter der Gewebeprobe: Jede Gewebeprobe kann sehr unterschiedlich sein, von einfachen Paraffinschnitten einer Krebsart (z. B. Brustkrebs) über frisches, gefrorenes und fixiertes festes Gewebe, bis hin zu Körperflüssigkeiten von Patienten mit einer Vielzahl von Krankheiten.¹⁰² Neben den Variationen zwischen Spezies, pathophysiologischen Bedingungen und dem Entnahmeort, kann sich das mechanische Verhalten der Gewebeprobe und der daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften aufgrund des Zustands der getesteten Probe ändern. Hierbei spielen insbesondere Spezies und Alter des Spenders der Gewebeprobe eine Rolle.

Dissoziationsmedium und Verunreinigungen in den Enzymmischungen: Gewebedissoziation und Primärzellisolierung sind Hauptanwendungen für Enzyme in der Gewebekulturforschung und bei zellbiologischen Studien. Trotz des weit verbreiteten Einsatzes von Enzymen für diese Anwendungen im Laufe der Jahre sind ihre Wirkmechanismen bei der Dissoziation und Zellisolation nicht vollständig verstanden. Infolgedessen ist die Wahl einer Dissoziations-technik gegenüber einer anderen oft willkürlich und basiert mehr auf experimentellen Erfahrungen als auf dem Verständnis, warum die Methode funktioniert und welche Modifikationen zu noch besseren Ergebnissen führen könnten. Einen Weg um die hohe Variabilität der Ergebnisse zu adressieren, ist zum Beispiel ein standardisiertes Herstellungsverfahren für Enzyme. Hierzu werden in den letzten Jahren Protokolle basierend auf der Guten Herstellungspraxis (GMP) oder frei von tierischem Ursprung (AOF) Rohmaterialien eingeführt. AOF-Materialien werden bevorzugt eingesetzt, da sie die Kontamination mit Viren und Prionen tierischen Ursprungs minimieren. Trotz allen Vorkehrungen bleibt ein Restrisiko bei der Benutzung von Enzymen erhalten.

Temperatur: Die Temperatur muss unabhängig von der Art der zu verarbeitende Probe während aller Prozessschritte reguliert, mindestens kontrolliert, werden. Dies ist vor allem wichtig zur Prävention der Zellyse und Erhalt der Zellintegrität. Da die Zellen nicht nur aus struktureller Sicht, sondern auch aus molekularer Sicht intakt bleiben müssen. Eine niedrige Temperatur bei ca. 4 °C trägt dazu bei, die Stoffwechselaktivitäten zu verlangsamen, die zu biochemischen Veränderungen führen können, die die Genexpression, die Transkription und die daraus resultierenden Proteinprofile verändern (Tabelle 3). Auch Gefrier-/Auftauzyklen müssen in dieser Phase vermieden werden, da die Zellen sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren können. Für die meisten Protein- und DNA-Durchflusszytometrie-Assays kann das Gewebe bei Raumtemperatur entnommen und in ein sauberes (wenn möglich steriles) Gefäß mit Wachstumsmedium gegeben werden. Die Probe wird auf Eis gelegt und ins Labor transportiert.¹⁰³

Tabelle 3: Bedingungen für die Probenahme und den Transport von verschiedenen Probenmaterialien.¹⁰³

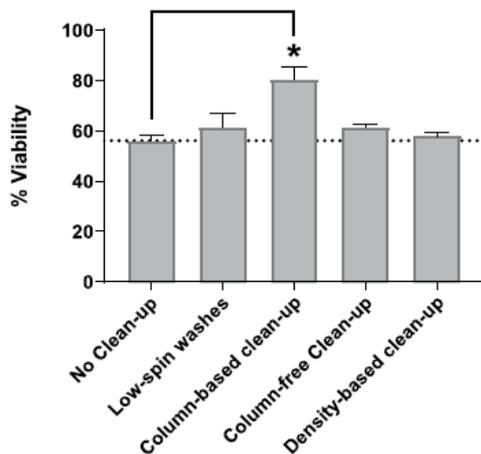
Probenmaterial	Zustand	Transportbedingungen
DNA	frisch	Bei 4 °C
Proteine	frisch*	Bei 4 °C*
Oberflächenproteine	frisch*	Bei 4 °C*
RNA	sofort einfrieren	In flüssigem Stickstoff

**Je nach Art der Proteine (z. B. Enzyme) können die Bedingungen für den Transport variieren und das Einfrieren erfordern.*

Probenaufreinigung: Sobald die Lebensfähigkeit einer Zellsuspension festgestellt ist, wird entschieden, ob mit dem Einzelzell-Arbeitsablauf direkt fortgefahren wird oder eine Methode zur Entfernung toter Zellen zur Anwendung kommt, um die Probe zu reinigen. Wie bereits erwähnt, wird eine Lebensfähigkeit von >60 % oder mehr häufig als Grenzwert für die Durchführung von Einzelzellarbeitsabläufen erachtet. Darüber hinaus führt jede Verbesserung der Lebensfähigkeit zu einer besseren Datenqualität aufgrund einer geringeren Hintergrundkontamination.

Sobald eine genaue Zellzahl ermittelt wurde, kann eine Probenreinigung erforderlich sein, um die Lebensfähigkeit der Probe zu erhöhen. Schritte zur Entfernung toter Zellen können zu einem erheblichen Verlust der Gesamtzahl der Zellen führen. In einer Studie von Hanamgar et al. wurden vier verschiedenen Aufarbeitungsmethoden getestet, um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.¹⁰⁴ (1) Low-Speed-Spin-Waschungen, (2) Magnetsäulen-basiertes Dead Cell Removal Kit, (3) Debris Removal Solution und (4) Säulenfreies Kit zur Entfernung von toten Zellen. Wie in Abbildung 14 dargestellt, führten alle Methoden zu einem allgemeinen Zellverlust nach der Reinigung, wobei der größte Zellverlust bei den beiden Magnetseparationsmethoden und der geringste bei den Waschungen allein zu verzeichnen war. Es wurde keine Verschiebung der Zellgrößenverteilung beobachtet, und es wurden hauptsächlich tote Zellen entfernt, im Gegensatz zu Zelltrümmern.

A)



B)

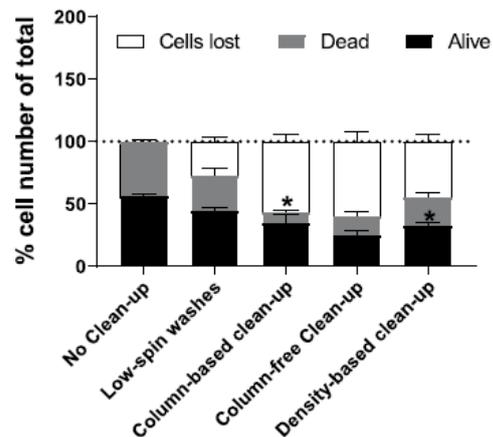


Abbildung 14: Quantifizierung des Zellverlusts und der Lebensfähigkeit nach Zellaufreinigungsschritten.¹⁰⁴ Menschliche PBMCs wurden in 5 gleiche Teile aufgeteilt und 4 Aliquots wurden jeweils einer anderen Methode zur Entfernung toter Zellen unterzogen. Ein Aliquot wurde als "Nicht-Säuberungskontrolle" zurückbehalten. Die Zellzahlen wurden mit einem manuellen Hämacytometer vor und nach der Entfernung der toten Zellen bestimmt. A) % Lebensfähigkeit vor und nach der Reinigung. B) % verlorene Zellen, % tote Zellen und % lebende Zellen der Gesamtzahl bei verschiedenen Reinigungsmethoden.

Bei der Maximierung des Anteils an lebensfähigen Zellen in einer verarbeiteten Probe ist es auch wichtig, Zellklumpen und Trümmer in der Suspension zu vermeiden.¹⁰⁵ Um das Vorhandensein von zellulären Aggregaten zu minimieren, ist es unerlässlich, das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen vor der enzymatischen Dissoziation zu erhöhen, indem die Probe in kleine Stücke von 3-4 mm³ geschnitten wird.¹⁰¹

Die Durchführung des Erythrozytenlyseschrittes nach der Dissoziation ermöglicht eine weitere Reinigung der Probe. Eine Kontamination mit roten Blutkörperchen (RBC) kann die Zellzählung und Zellfärbung noch schwieriger machen. Die Hinzufügung eines zweiten Filtrationschritts nach der Erythrozytenlyse dient dazu, den größten Teil der Trümmer und zellulären Aggregate aufzufangen, die während der ersten Filtration dem Filter entkommen sind. Schließlich sollten tote Zellen aus der Zellsuspension aussortiert werden, sobald die Verarbeitung abgeschlossen ist, was durch säulenbasierte oder durchflusszytometrische Sortierung erreicht werden kann.¹⁰¹

Zellwaschschritte sind auch in paucizellulären Umgebungen von entscheidender Bedeutung, da Zellpellets nicht sichtbar sind und die Gefahr, sie nach der Zentrifugation versehentlich zu verwerfen, gegeben ist. Dennoch müssen die Zellen immer in einer Pufferlösung gewaschen werden, um Zelltrümmer, Verunreinigungen und/oder BSA/ FCS-haltiges Medium zu entfernen. Außerdem muss die Zentrifugationsgeschwindigkeit an den Zelltyp angepasst werden. Die allgemein akzeptierte Empfehlung für Säugetierzellen lautet, bei 300-500 g für 5 Minuten zu zentrifugieren, um ein Aufbrechen der Zellen zu vermeiden. Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass diese sehr niedrige Geschwindigkeit zu losen Zellpellets und anschließendem Probenverlust führen kann, weshalb beim Waschen äußerste Vorsicht geboten ist. Gängige Praxis bei den der Probenvorbereitung folgenden Prozessen ist, Einwegkomponenten aus Kunststoff zu verwenden, die nach Gebrauch entsorgt werden, so dass der Reinigungsaufwand entfällt und gleichzeitig das Risiko der Kreuzkontamination minimiert wird.

Um Zelltod und Probenverlust zu vermeiden wird folgendes Vorgehen empfohlen:¹⁰⁶ (a) frische Zellproben so schnell wie möglich verarbeiten; (b) die Zellen in einem Medium mit dem richtigen Verhältnis zwischen zusätzlichen Molekülen (z. B. Protease-/Phosphatase-Inhibitoren), zusätzlichem Proteingehalt und lebensfähiger Zellumgebung (z. B., RPMI + 10 % FCS); (c) zwischen den Schritten die Zellen bei 4 °C halten und Gefrier-/Auftauzyklen vermeiden; (d) die Zellen bei 300 g für 5 Minuten in kaltem PBS für maximal 3 Durchgänge waschen; und (e) sofort mit dem nächsten Schritt fortfahren oder die Zellpellets bei -80 °C unter Verwendung von Schnellgefrierverfahren lagern.

Die ersten beiden Punkte der präanalytischen Variablen (Zustand des Gewebes, Spezies und Alter der Gewebeprobe) sind in der Regel nicht frei wählbar. Nichtsdestotrotz wird für die

Verfahrensentwicklung eine Erfassung von qualitativen und (semi)-quantitativen Probeneigenschaften (Gewebestruktur, Gewicht, Historie, Gewinnung; Lagerung /Transport Behandlung und Zustand) erfolgen, die zur Evaluierung beitragen könnten. Eine allgemeine Regel für die Handhabung von Gewebeproben ist, dass, wenn ein Parameter nicht kontrolliert werden kann, dennoch eine Aufzeichnung über die Variabilität solcher Parameter für jede Probe geführt werden sollte.

3.2.2 Analytische Variablen

Umfassende Charakterisierung von Zellen ist der Schlüssel zum Verständnis biologischer Prozesse, insbesondere bei Krankheiten und bei Reaktionen auf eine Behandlung. Erhebliche Fortschritte in den letzten Jahren wurden in den Bereichen Genomik und Transkriptomik gemacht, die eine sehr detaillierte Beschreibung von Genen und Transkripten auf Einzelzellebene ermöglicht.^{107–109} Allerdings ist die Einzelzellanalyse in diesem Umfeld und selbst bei sehr geringen Zellzahlen immer noch eine Herausforderung.¹⁰⁶ Von der Entnahme der Gewebeproben bis zur Analyse der Einzelzellen können mehrere Verarbeitungsschritte zu Probenverlusten, einer geringeren Zellqualität und einer eingeschränkten Zelltypidentifizierung führen. Diese Einschränkungen werden bei der Arbeit mit komplexen klinischen Proben noch wichtiger.

In den letzten zehn Jahren wurden mehrere Technologien zur Erstellung von Einzelzellprofilen entwickelt und in verschiedenen Anwendungen eingesetzt, die viele neue Erkenntnisse zutage brachten.¹¹⁰ Die Probenvorbereitung und die Isolation einzelner Zellen sind die schwierigsten Schritte bei der Einzelzellanalyse.¹¹⁰ Die Basis für sämtliche analytische Protokolle zur Einzelzelluntersuchung ist eine Zellsuspension. In diesem Abschnitt werden die variablen Elemente der Gewebedissoziationsmethoden in Abhängigkeit der analytische Anforderungen beschrieben. Ein besonderes Augenmerk liegt auf den Hauptfaktoren, die die endgültige Qualität der Einzelzelldaten beeinflussen können – insbesondere die Stresssignaturen, die potenziell die Interpretation dieser Daten verzerren könnten. Aktuelle systematische und zeitliche Analysen zu Dissoziations-induziertem Stress legen nahe, dass mit genügend Zeit jede Zelle durch die Dissoziationsverfahren verändert wird und dass jeder Zelltyp dynamisch darauf reagiert. Während scRNA-seq eindeutig eine leistungsstarke Diagnosemethode ist, kann der Prozess der Zerlegung des Gewebes in einzelne Zellen störende Faktoren einführen, die die Datenqualität und -zuverlässigkeit negativ beeinflussen können.¹¹¹ Ein Faktor ist die fehlende Standardisierung, die zu erheblichen Unterschieden zwischen verschiedenen Forschungsgruppen und Gewebetypen führen kann.¹¹² Ein weiterer bedeutender Faktor ist, dass eine unvollständige Aufschlüsselung die Ergebnisse in Richtung der Zelltypen, die leichter zu dissoziieren sind, verzerren könnte. Eine kürzlich durchgeführte Studie, die snRNA-seq mit Nierenproben von Mäusen verwendete, fand heraus, dass Endothelzellen und Mesangialzellen in den scRNA-seq-

Daten unterrepräsentiert waren.⁸⁰ Schließlich wurde gezeigt, dass lange enzymatische Verdauungszeiten die transkriptomischen Signaturen verändern und Stressreaktionen hervorrufen, die die Zellklassifizierung beeinträchtigen. Die Behebung dieser Bedenken würde dazu beitragen, das Feld der scRNA-seq in der Zukunft für die Gewebe-Kartierung und Krankheitsdiagnostik voranzutreiben.²⁵ Die Bemühungen um eine Standardisierung der Einzelzell-Quantifizierungsmethoden (wie zum Beispiel quantitative PCR) eröffnen die Möglichkeit, die Einzelzellanalyse von spezialisierten Forschungseinrichtungen in Standard-Forschungslabore zu verlagern.

Die Analyse der Prozessabläufe zeigt, dass der derzeitige manuelle oder teilautomatisierte und enzymatisch durchgeführte Gewebedissoziationsprozess aufgrund der Vielzahl an eingesetzten Probenträgern und Hilfsmitteln mit einem erheblichen Handhabungsaufwand verbunden ist. Der Einsatz einer Vielzahl von Probenträgern und Hilfsmitteln führt zu einem hohen Querkontaminationsrisiko, sowie zu einem hohen Rüst- und Reinigungsaufwands. Aufgrund der fehlenden Standardisierung, sowohl des Prozessablaufs als auch der Hilfsmittel ist keine hohe Reproduzierbarkeit von Aufarbeitungsergebnissen gegeben.

Ein neues zu entwickelnde mechanische Gewebeaufschlussverfahrens sollte zur Reduzierung des Handhabungsbedarfs beitragen, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten und Risiko der Kreuzkontamination minimieren. Dies führt zur Forderung nach Reduktion der Schnittstellen und Minimierung von Probenträgerwechseln und somit zu der Forderung nach einem möglichst durchgängigen (über einige Prozessschritte hinweg) verwendbarem System.

3.3 Analyse der Gewebedissoziationsmethoden

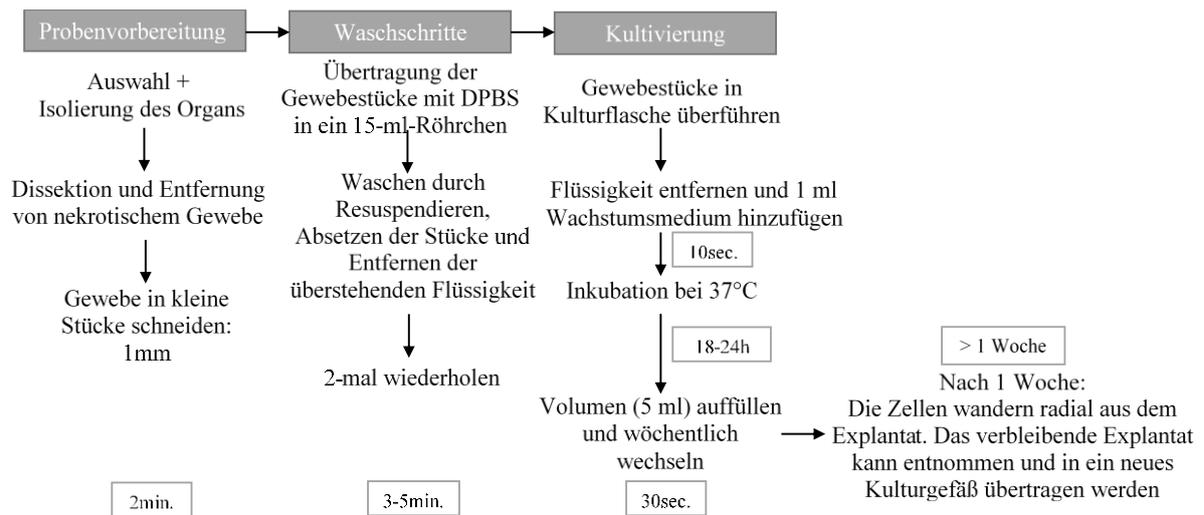
Es gibt verschiedene Arten von Gewebedissoziationsmethoden, einschließlich mechanischer, enzymatischer Dissoziation (manuell oder teilautomatisiert durchgeführt) und der Explant-Methoden. Jede Methode hat ihre eigenen Vor- und Nachteile und wird in verschiedenen Anwendungen verwendet. Beispielsweise werden mechanische Verfahren oft eingesetzt, um Gewebe wie Knochen oder Muskelgewebe zu prozessieren. Im Gegensatz dazu finden enzymatische Methoden häufig Anwendung, um weiches Gewebe wie Leber zu dissoziieren.

Der Prozess der Gewebedissoziation ist die größte Quelle für unerwünschte technische Variation und Chargeneffekte in Einzelzellstudien.¹¹³ Unterschiedliche Gewebe können sich in der Zusammensetzung der ECM, der Zellularität und der Steifigkeit erheblich unterscheiden, weshalb Dissoziationsprotokolle für den jeweiligen Gewebetyp optimiert werden müssen. Herkömmliche Protokolle für die Einzelzellpräparation umfassen typischerweise die folgenden Schritte: (1) Gewebedissektion, (2) mechanische Zerkleinerung, (3) enzymatischer/proteolytischer ECM-Abbau (z. B. Disase, Kollagenase, Trypsin), oft begleitet von mechanischer Bean-

spruchung und (4) optionale Anreicherung für die interessierenden Zelltypen durch Durchflusszytometrie, beadbasierte Immunselektion, differentielle Zentrifugation oder Sedimentation. Jeder Schritt kann die Expressionssignaturen der Zellen beeinflussen und sollte daher sorgfältig optimiert werden, um so wenig Artefakte wie möglich zu erzeugen. Ein optimales Gewebedissoziationsprotokoll liefert so viele lebensfähige Zellen wie möglich in der schnellst möglichen Zeit, ohne die Häufigkeit bestimmter Zelltypen bevorzugt zu vermindern oder signifikant zu verändern.²⁷

3.3.1 Explant Methode

Die einfachste und kostengünstigste, aber gleichzeitig auch langwierigste Dissoziationsmethode stellt die Explantmethode dar. Diese Methode ist die ursprüngliche Methode zur Isolierung von Krebszellen aus primärem Tumorgewebe. Hierbei wird chirurgisch entferntes Tumorgewebe in feine Stücke geschnitten und in Nährmedium unter 37 °C inkubiert. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in Abbildung 15 verdeutlicht. Ein Vorteil dieser Methode ist die einfache Entfernung von Gewebe, aus dem vornehmlich Fibroblasten herauswachsen. Allerdings wird für das Zellwachstum eine häufige Subkultivierung bzw. regelmäßiger Mediumswechsel benötigt. Die primäre Explantationstechnik ist besonders nützlich für die Aufspaltung kleiner Mengen von Gewebe (z. B. Hautbiopsien). Die Beschränkung der Explantationstechnik liegt in der schlechten Adhäsionsfähigkeit bestimmter Gewebe an der Wachstumsoberfläche und in der Heterogenität der Zellen im Auswuchs.



Prozessschritt	Beschreibung	Materialien	Pipettierschritte	Dauer
Probenvorbereitung	Auswahl + Isolierung des Organs			30sec. -1min.
	Entfernung von nekrotischem Gewebe			30sec. -1min.
Waschschritte	Gewebe in kleine Stücke schneiden			30sec. -1min.
	Übertragung der Gewebestücke mit DPBS in ein 15-ml-Röhrchen	-Zugabe DPBS	1	20sec.
	3x: Waschen durch Resuspendieren, Absetzen der Stücke und Entfernen der überstehenden Flüssigkeit	-Resuspension -Entfernen	2 for each washing step Total: 6	1-2min.
Kultivierung	Übertragung der Stücke in die Kulturflasche		1	5sec.
	Flüssigkeit entfernen und 1 ml Wachstumsmedium hinzufügen	-Entfernen -Medium hinzufügen	2	15sec.
	Inkubation			18h – 24h
	Medium auf das übliche Volumen auffüllen und wöchentlich wechseln	-Medium hinzufügen -Mediumwechseln: Entfernen und Hinzufügen	1 2	20sec.
	Restliches Explantat entfernen			5sec.
	Total		13	

Abbildung 15: Prozessanalyse der Explantmethode. Die einfachste und kostengünstigste, aber gleichzeitig auch langwierigste Methode stellt die Explantmethode dar. Das Gewebe wird in feine Stücke geschnitten und in eine mit Medium gefüllte Petrischale, mit einem hohen Serumanteil, gegeben. Innerhalb der Kultivierungszeit von etwa einer Woche sind migrierende Zellen aus dem Gewebe sichtbar.

3.3.2 Mechanische Gewebedissoziation

Die mechanische Auftrennung von Gewebe bedient sich verschiedener mechanischer Methoden, um den Zellverband aufzulösen. Hierbei werden keine Enzyme oder andere Chemikalien eingesetzt, um eine Zellsuspension zu generieren. Die mechanische Auftrennung erfolgt dabei durch Scherbeanspruchung des Gewebes. Hierdurch werden die Bestandteile der ECM, welche für Zell-Zell Verbindungen verantwortlich sind über ihre Festigkeitsgrenzen hinaus beansprucht.¹¹⁴ Bei Anwendung mechanischer Methoden zum Zellaufschluss reißen die entstehenden Spannungen und Dehnungen die Zellwände der Mikroorganismen auseinander. Bei der mechanischen Beanspruchung von Partikeln werden Kräfte von den Zellaufschlussgeräten auf die Partikel übertragen. Nach Rumpf¹¹⁵ können vier Beanspruchungsarten definiert werden. Beim mechanischen Zellaufschluss treten hauptsächlich die Beanspruchungsarten "Druck-

und Scherbeanspruchung" und "Beanspruchung durch das umgebende Medium" auf. Es entsteht in allen Fällen ein dreidimensionaler Spannungszustand mit Zug-, Druck- und Schubspannungen, der sich nur in Sonderfällen, die in der Praxis kaum Bedeutung haben, berechnen lässt.¹¹⁶ Diese Belastung kann beispielsweise durch Schneiden, Differenzgeschwindigkeit des umgebenden Mediums und rapide Druckänderungen aufgebracht werden.

3.3.3 Manuell-mechanische Gewebedissoziation

Die mechanische Dissoziation erfolgt in der Regel nur partiell. Die am häufigsten verwendete Methode zur mechanischen Dissoziation ist das Schneiden von Gewebeprobe mit einer Schere oder einem Skalpell auf eine Größe von 1-2 mm³ oder das wiederholende resuspendieren einer Gewebeprobe mittels Pipette.¹¹⁷⁻¹¹⁹

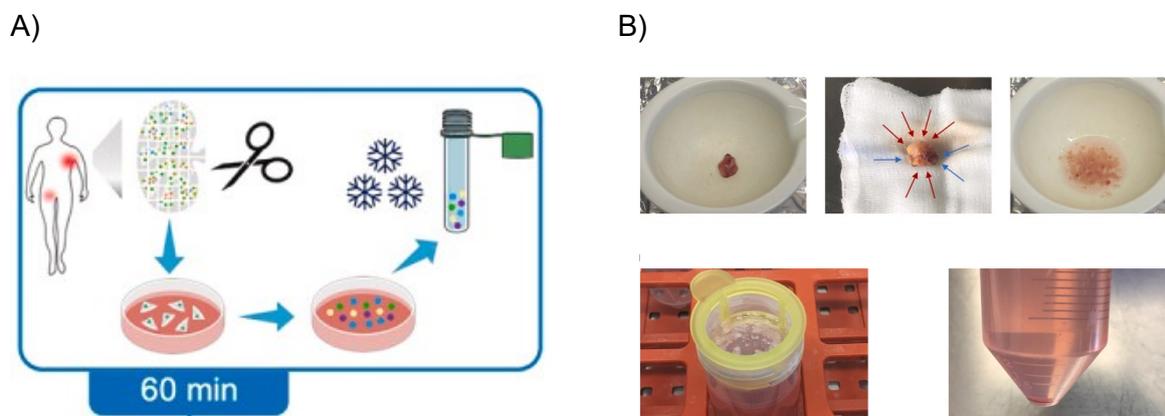


Abbildung 16: Protokolle für eine manuelle Gewebedissoziation. A) Schematische Darstellung einer manuellen mechanischen Gewebedissoziation. B) Die wichtigsten Schritte der Lymphknotenverarbeitung. Zwei verschiedene repräsentative Lymphknoten in einem Mörser bzw. auf einer mit Kochsalzlösung getränkten Kompressen unmittelbar nach der Exzision. Der Lymphknoten bzw. das überschüssige Fettgewebe ist durch blaue bzw. rote Pfeile hervorgehoben. Lymphknoten in Zellkulturmedium, nachdem er in kleine Stücke geschnitten wurde. Lymphknotenstücke in einem Zellsieb. Das Röhrchen ist mit etwa 50 ml Medium gefüllt, das die aus dem Lymphknoten stammenden Zellen enthält. Pellet der aus dem Lymphknoten stammenden Zellen nach der Zentrifugation. Die rötliche Färbung zeigt eine leichte Kontamination mit Erythrozyten an.¹²⁰

Die vorbereiteten Proben können danach in eine Petrischale platziert werden, wo sie mithilfe einer Explantationsmethode kultiviert werden. Alternativ kann die mechanische Zerkleinerung in Verbindung mit einem enzymatischen Verfahren angewendet werden, um verbesserte Resultate zu erzielen.¹²¹ Alternativ können auch mikrofluidische Geräte zur mechanischen Dissoziation von Gewebeprobe verwendet werden.¹²²

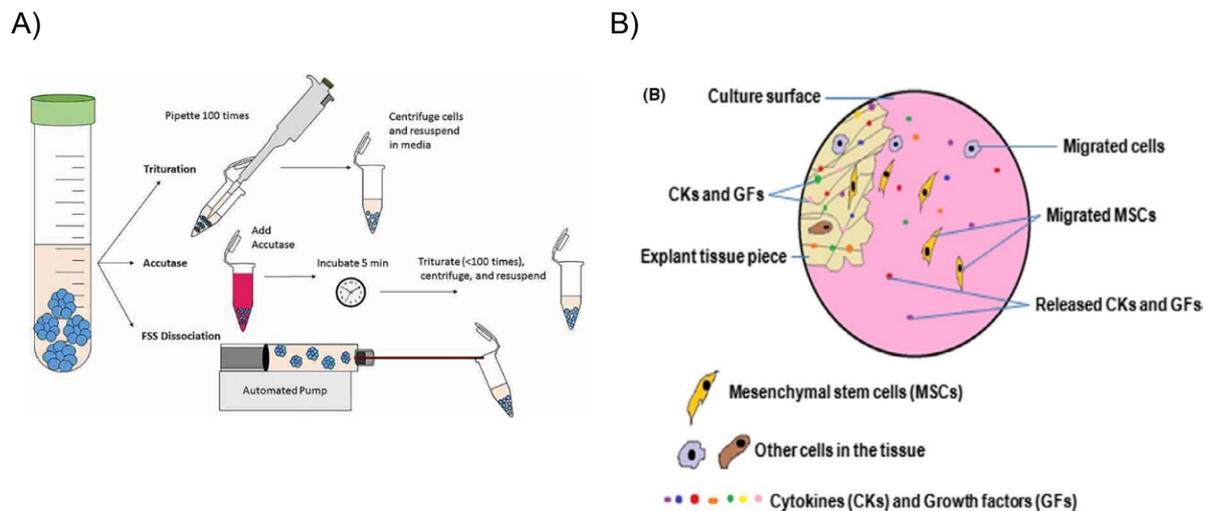
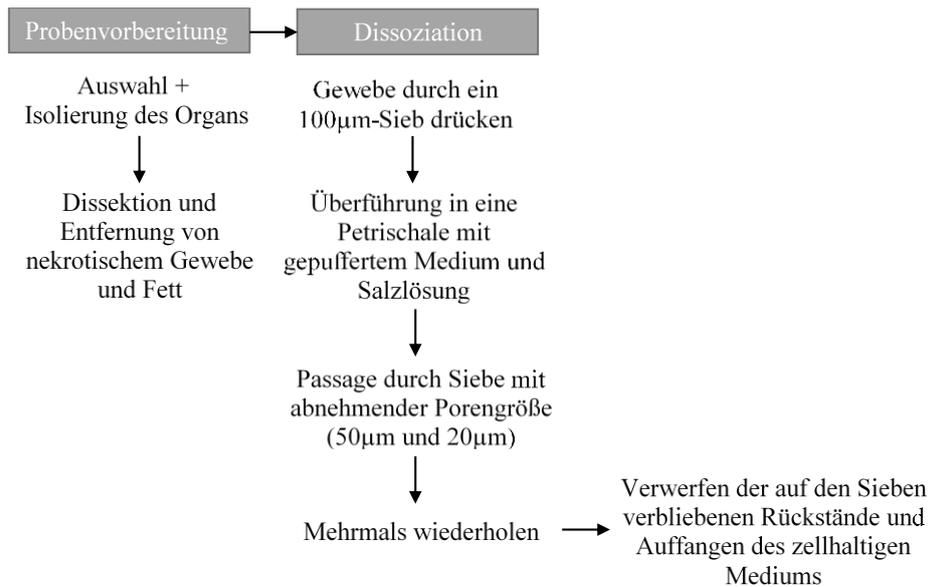


Abbildung 17: Methodenübersicht zur mechanischen Gewebedissoziation. A) Die manuelle Dissoziation erfolgte durch wiederholtes Pipettieren von suspendierten Sphäroiden mit einer 100mL Pipette (ca. 100x). Der Vorgang wurde nach einer kurzen Zentrifugation wiederholt, um eine vollständige Dissoziation sicherzustellen. Die enzymatische Dissoziation wurde mit Accutase (ThermoFisher Scientific) durchgeführt, wobei die Sphäroide mit 1mL Accutase für 5min inkubiert wurden, bevor sie manuell verrieben wurden.⁸² B) Explantatkultur zur Isolierung von MSC: Händisch vorzerkleinerte Gewebestücke werden ohne Verdauungsschritt in die Kulturschale gelegt.¹²³

Zur manuellen mechanischen Dissoziation gibt es neben Skalpell, Schere und feinem Drahtnetz nur wenige methodische Ansätze. Vorteilhaft ist hierbei gegenüber anderen Gewebedissoziationsmethoden, dass keine Vorbehandlung des Gewebes notwendig ist, wodurch der Kosten- und Zeitaufwand am geringsten gehalten wird (Abbildung 18). Dennoch besteht während dieses Prozesses gleichzeitig das höchste Risiko unerwünschter Kontaminationen und einer Verringerung der Vitalität aufgrund der auftretenden Scherkräfte. Obwohl die mechanische Aufspaltung das Risiko einer Zellschädigung birgt, ist das Verfahren weniger teuer, schnell und einfach. Diese Technik ist besonders nützlich, wenn das Gewebe in ausreichender Menge zur Verfügung steht und die Effizienz der Ausbeute nicht sehr wichtig ist.



Prozessschritt	Beschreibung	Materialien	Pipettierschritte	Dauer
Probenvorbereitung	Auswahl + Isolierung des Organs			30sec. -1min.
	Entfernung von nekrotischem Gewebe			
	Waschen mit DPBS	-Hinzufügen DPBS -Entfernen von DPBS	2	20sec.
Dissoziation	Durch ein 100µm-Sieb drücken			1min.
	Überführung in eine Petrischale mit Medium und Salzlösung	-Lösung hinzufügen -Medien hinzufügen	2	20sec.
	Passage durch Siebe mit abnehmender Porengröße (50µm und 20µm)			1min.
	Mehrmals wiederholen			5-10min.
	Verwerfen der auf den Sieben verbliebenen Rückstände und Auffangen des zellhaltigen Mediums	-Medium sammeln	1	30sec.-1min.
	Total		5	

Abbildung 18: Prozessanalyse der manuellen mechanischen Gewebedissoziation. Zur manuellen mechanische Gewebedissoziation gibt es neben Skalpell, Schere und feinem Drahtnetz nur wenige methodische Ansätze. Vorteilhaft ist hierbei gegenüber anderen Gewebedissoziationsmethoden, dass keine Vorbehandlung des Gewebes notwendig ist, wodurch der Kosten- und Zeitaufwand am geringsten gehalten wird.

Vorteile des mechanischen Gewebeaufschlusses ist der geringe Zeitaufwand, da Inkubationszeiten wegfallen, sowie im Vergleich zum enzymatischen Aufschluss geringeren Empfindlichkeit gegenüber Störgrößen auftreten. Ein wesentlicher Nachteil besteht darin, dass bei sämtlichen mechanischen Verfahren die Zellen während des Aufschlussprozesses durch einwirkende Kräfte geschädigt werden. Es ergeben sich im Vergleich zu enzymatischen Methoden im Allgemeinen deutlich niedrigere Viabilitätsraten.¹²⁴ Entscheidender Vorteil des rein mechanischen Aufschlusses ist es, dass dieser ohne den Einsatz von Enzymen auskommt. Mechanische Behandlungen sind im Allgemeinen für die Isolierung von Zellen aus klassischen immunologischen Geweben wie Blut, Milz, Lymphknoten oder Thymus ausreichend. Die Auf-

reinigung von vitalen Zellen mit hoher Ausbeute aus Schleimhaut- oder anderen soliden Geweben benötigen jedoch oft den kombinierten Einsatz von mechanischer und enzymatischer Gewebedissoziation.¹²⁵

3.3.4 Enzymatische Gewebedissoziation

Der enzymatische Gewebeaufschluss nutzt Enzyme um einzelne Zellen aus der Gewebestruktur zu lösen. Hierbei kommen verschiedene Enzyme oder Enzymgemische zum Einsatz. Solche Verfahren spalten Komponenten der ECM auf, darunter Collagene, Glykosaminoglykane und auch Zelladhäsionsmoleküle (CAMs). Somit werden Zell-Zell und Zell-Matrix Bindungen unterbrochen und die im Gewebe enthaltenen Zellen vereinzelt. Der enzymatische Aufschluss wird für viele Anwendungen als die Methode der Wahl betrachtet, da in Bezug auf andere Methoden vergleichsweise große Mengen an Einzelzellen gewonnen werden. Weiterhin können über einen enzymatischen Aufschluss hohe Zellviabilitätswerte der vereinzelteten Zellen erreicht werden.

Vor der Zugabe von Enzymen ist es wichtig, die Oberfläche des Gewebes so weit wie möglich zu vergrößern, indem das Gewebe mit Instrumenten wie einem Skalpell, einer Rasierklinge oder einer Schere zerkleinert wird. Durch diese Vergrößerung der Oberfläche wird das Gewebe dem Enzym stärker ausgesetzt, während gleichzeitig die für die Verdauung erforderliche Zeit minimiert wird. Typische Enzyme (siehe Tabelle 4), die für den Gewebeaufschluss verwendet werden, sind Collagenase und Dispase I, oft in Kombination mit DNase, EDTA und DTT zur Minimierung der Zellverklumpung und zur Unterstützung der Dissoziation (Abbildung 19).

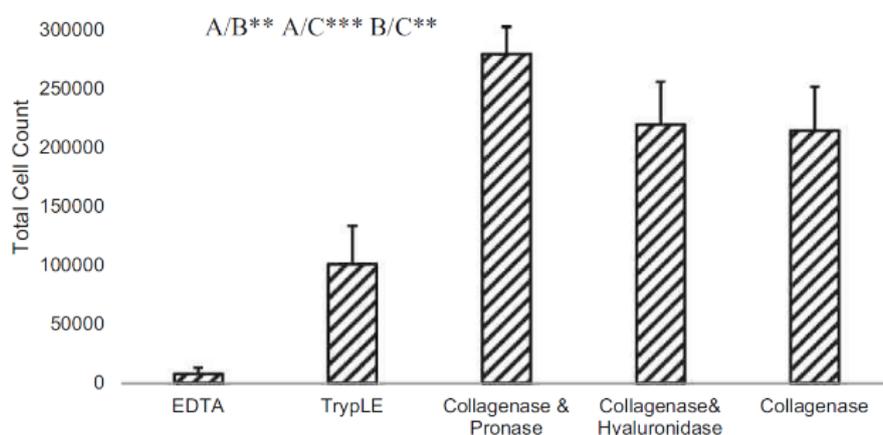


Abbildung 19: Wirksamkeit der verschiedenen enzymatisch-chemischen Dissoziationsprotokolle. Nachweis erfolgt durch die Gesamtzahl der Zellen in der Durchflusszytometrie. N=10. P-Werte: ** = 0.05, *** = 0.01.⁷⁹

Die verwendeten Enzyme hängen vom aufzuschließenden Gewebetyp ab, da sich die Bestandteile der ECM und deren Verteilung von Gewebe zu Gewebe unterscheiden. Trypsin beispielsweise wird unter anderem bei Brust-, Magen- und Darmgewebe verwendet, während Pepsin etwa bei Lungengewebe Anwendung findet.

Tabelle 4: Verdauungsenzyme bei der Aufspaltung von festem Gewebe.⁷⁰

Enzym	Anwendungszweck
Dispase	-Bricht die extrazelluläre Matrix auf -Löst Zellkolonien ab
Kollagenase	-Spaltet die Bindungen zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix -Bricht die Peptidbindungen im Kollagen auf
Hyaluronidase	-Bricht die extrazelluläre Matrix auf -Spaltet die glykosidischen Bindungen von Hyaluronan
Papain	-Baut Proteine ab, die feste Verbindungsstellen zwischen Zellen bilden
Dnase-I	-Verdaut freie DNA -Verhindert Zellaggregation
Accutase	-Proteolytisch und Dnase-Aktivität
TrypLE	-Spaltet Zell-Zell Verbindungen -Verändert nicht, wie bei Trypsin, die Antigen-Expression

Die standardmäßigen Probenvorbereitungsmethoden für festes Gewebe erfordern eine enzymatische Dissoziation, und je nach Herkunft, Dichte, Krankheitszustand, Elastin- oder Kollagengehalt des Gewebes kann ein langer enzymatischer Verdau erforderlich sein. Die Kombination aus hoher Temperatur und Stress, der durch eine längere Exposition gegenüber dissoziativen Enzymen hervorgerufen wird, induziert zelluläre Stressreaktionen, die zum Zelltod oder zur Hochregulierung von transkriptionellen Signaturen führen.¹⁰¹ Die Transkriptionsmaschinerie bleibt bei 37 °C aktiv und eine längere Inkubation für enzymatische Dissoziationsprozessen bei hohen Temperaturen kann zu Artefakten bei der Genexpression führen, unabhängig von der Biologie zum Zeitpunkt der Entnahme.¹²⁶ Darüber hinaus kann eine längere Inkubation bei höheren Temperaturen ohne Nährstoffe eine Apoptose oder Anoikis auslösen.¹²⁷ In der Studie von O'Flanagan et al. wurde ein konserviertes Kollagenase-assoziiertes Transkriptionsmuster identifiziert, das die Induktion von Stress- und Hitzeschockgenen einschließt und mit einer Transkriptionsreaktion übereinstimmt, die in einer Untergruppe von Muskelstammzellen identifiziert wurde.¹²⁸ Die Transkription dieser Gene als Ergebnis der Probenvorbereitungsmethoden kann ihre Induktion durch andere Mittel überdecken. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass alle Zelltypen eine gewisse Stressreaktion auf die

Dissoziation mit Kollagenase zeigen. Diese Stressreaktionen, die die Interpretation von scRNAseq-Daten erheblich beeinflussen können, werden durch Dissoziation bei kalten Temperaturen minimiert.¹²⁶ Eine weitere Studie von Mattei et al. zeigte, dass ein standardmäßiger enzymatischer Aufschluss von Hirngewebe bei 37 °C im Vergleich zu einem optimierten mechanischen Dissoziationsprotokoll bei 4 °C zu tiefgreifenden und konsistenten Veränderungen im Transkriptom und Proteotyp von neuronalen und glialen Zellen führt.¹²⁹ Diese Ergebnisse unterstreichen das Risiko von technischen Verzerrungen und biologischen Artefakten bei der Anwendung von auf enzymatischem Verdau basierenden Isolierungsmethoden und die damit einhergehenden Temperaturschwankungen während der Probenvorbereitung.¹³⁰

Als zusätzliche Schwierigkeit des enzymatischen Ansatzes ist eine mögliche Schädigung von Zellmembranen und Oberflächenproteinen durch längeren Kontakt mit Enzymen anzusehen. Die enzymatische Dissoziation kann die Expression von Oberflächenmarkern durch unterschiedliche Proteaseaktivität beeinträchtigen.^{131–133} Dies kann die Verwendung für bestimmte nachgeschaltete Assays (z. B. Immunphäotypisierung mittels Durchflusszytometrie) einschränken, wenn die nachzuweisenden Marker durch die proteolytische Spaltung des Enzymcocktails geschädigt sind.¹³⁴

Die verringerte Häufigkeit von bestimmten Zelloberflächenmarkern, bedingt durch den Einsatz von Enzymen, kann ein möglicher Grund für die oft beobachtete Diskrepanz zwischen Daten, die durch immunhistochemische Färbung von intaktem Gewebe gewonnen wurden und Genexpressionsdaten, die durch Durchflusszytometrie nach der Oberflächenfärbung von Zellen erhoben wurden, sein. Da Oberflächenmoleküle zudem wichtige immunologischen Funktionen wie Zelladhäsion, Erregererkennung und Outside-in-Signaling vermitteln, ist die fehlende oder reduzierte Oberflächenexpression bestimmter Moleküle nachteilig für nachfolgende in vitro Zellkulturtests und Assays. Die Expressionshäufigkeit von Oberflächenmarkern (Abbildung 20) weisen darauf hin, dass der enzymatische Gewebeaufschluss tiefgreifende Auswirkungen auf einer Vielzahl von Zelloberflächenmolekülen hat. Dies wirkt sich direkt auf phänotypische Analyse, FACS- und MACS-basiertes Ziel Zellisolation und die Funktion von Immunzellen in Zellkulturexperimenten aus.¹²⁵

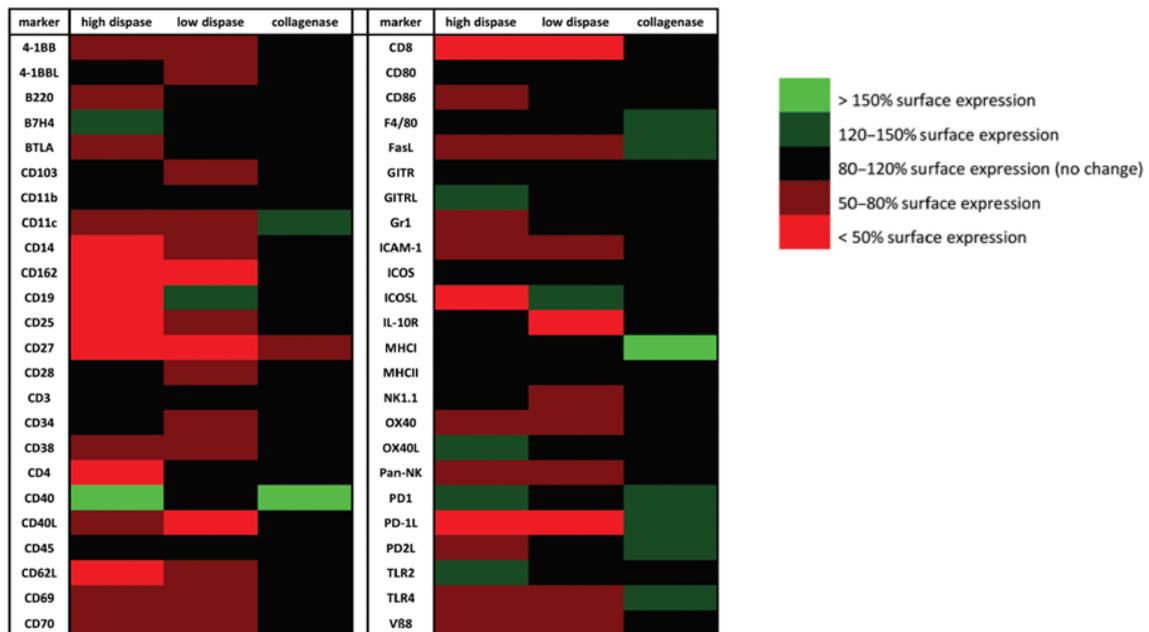


Abbildung 20: Einfluss des enzymatische Verdau auf die Expression von Oberflächenmarkern. Anti-körperfärbung von 48 ausgewählten Oberflächenmarkern und einer FACS-Analyse. Grüne Farbe bedeutet erhöhte Oberflächenexpression nach enzymatischem Verdau, rote Farbe bedeutet verringerte Oberflächenexpression; schwarz bedeutet keine Veränderung der Oberflächenexpression.¹²⁵

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit von Waschschritten bzw. der Zugabe von Enzyminhibitoren, um die Enzymaktivität nach erfolgtem Gewebeaufschluss zu minimieren. Der enzymatische Gewebeaufschluss ist wegen der möglichen Schädigung von Oberflächenproteinen nur bedingt für Verfahren geeignet, in denen nachfolgende Arbeitsschritte sich auf Oberflächenproteine beziehen. Ein weiterer Nachteil ist die Einwirkzeit, die die Enzyme brauchen, um ihre volle Wirkung zu entfalten, um einen kompletten Gewebeaufschluss zu gewährleisten. Außerdem ist eine Automatisierung dieses Verfahrens schwierig, da je nach Gewebetyp eine andere Enzymzusammensetzung benötigt wird.

3.3.5 Manuell-Enzymatische Gewebedissoziation

In Abbildung 21 ist eine repräsentative Prozessübersicht eines manuellen enzymatischen Versuchs dargestellt. Dieser Prozess umfasst in der Regel folgende Schritte:

- **Zerkleinerung des Gewebes:** Das Gewebe wird in kleine Stücke zerkleinert, um die Enzyme besser auf das Gewebe wirken zu lassen. Dies kann mit verschiedenen Methoden erfolgen, zum Beispiel durch Schneiden oder Zerreiben des Gewebes mit einem speziellen Gerät.
- **Zugabe von Enzymen:** Nachdem das Gewebe zerkleinert wurde, werden Enzyme hinzugefügt, die das Gewebe weiter zersetzen und die Zellen voneinander trennen.
- **Inkubation:** Im Anschluss wird die Gewebeprobe inkubiert, damit die Enzyme die Zellen aus dem Gewebe lösen können. Die Inkubation kann bei verschiedenen Temperaturen und für verschiedene Zeiträume erfolgen, je nachdem, welche Art von Gewebe und welche Enzyme verwendet werden.
- **Zentrifugation:** Nach der Inkubation wird die Gewebeprobe in einer Zentrifuge zentrifugiert, um die Einzelzellen von den anderen Bestandteilen des Gewebes zu trennen. Die Zentrifugation ermöglicht es, die Einzelzellen in einer Suspension zu sammeln, die für weitere Analysen verwendet werden kann.
- **Aufbewahrung und Analyse der Suspension:** Zum Schluss wird die Einzelzellsuspension aufbewahrt, bis sie für weitere Analysen oder Experimente verwendet wird. Die Aufbewahrung kann bei verschiedenen Temperaturen und für verschiedene Zeiträume erfolgen, je nachdem, welche Anforderungen an die Suspension gestellt werden.

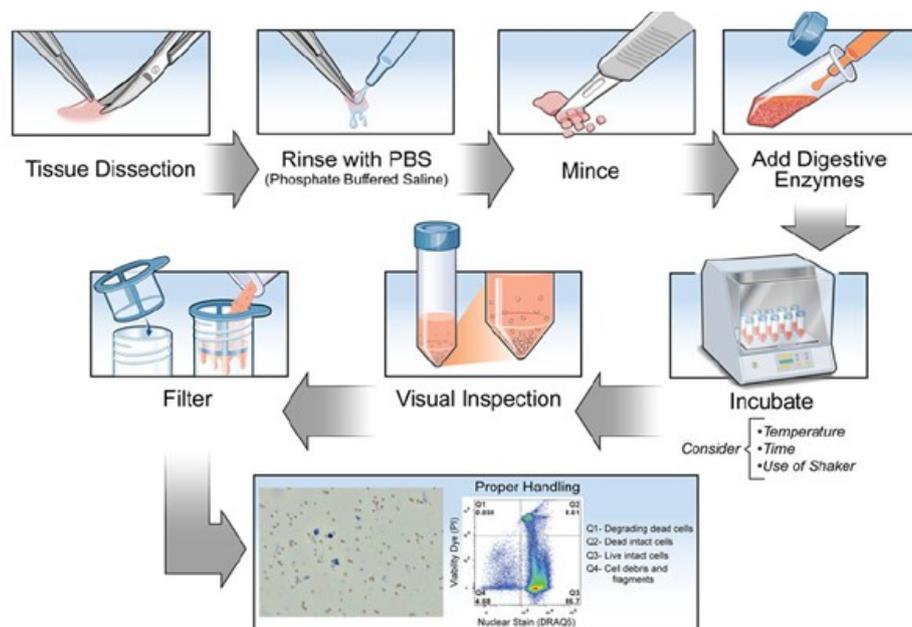
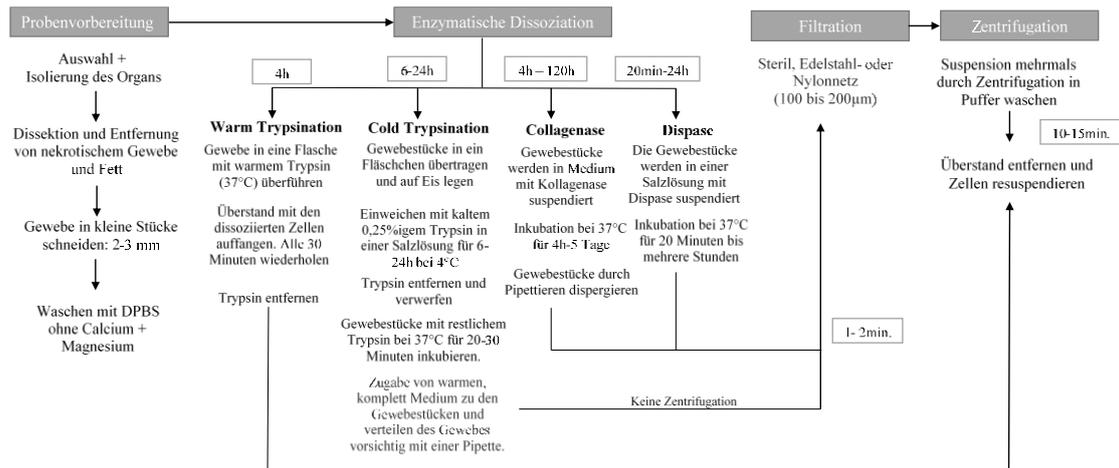


Abbildung 21: Manuell-enzymatischer Arbeitsablauf zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus festem Gewebe.⁷⁰

Als Nachbehandlungsschritt wird sehr häufig die Zentrifugation und Filtration eingesetzt, um größere Gewebereste und Partikel in der Lösung zu sedimentieren. Der Einsatz einer Zentrifuge gilt als Standardmethode um Zellen und enzymatische Bestandteile voneinander zu trennen. Die Probe wird in einem Zentrifugengefäß im Rotor platziert und von einem Motor auf hohe Umdrehungsgeschwindigkeiten beschleunigt. Nach der Zentrifugation wird die Enzymlösung durch Absaugen des Überstandes von den Zellen getrennt. Dieser manuell-enzymatischer Gesamtprozess ist in der folgenden Prozessübersicht (Abbildung 22) dargestellt:



Prozessschritt	Beschreibung	Materialien	Pipettierschritte	Dauer	
Probenvorbereitung	Auswahl + Isolierung des Organs				
	Entfernung von nekrotischem Gewebe			30sec. -1min.	
	Gewebe in kleine Stücke schneiden			30sec. -1min.	
	Waschen mit DPBS	-Hinzufügen DPBS -DPBS entfernen	2	20 sec.	
Enzymatische Dissoziation					
	Warm Trypsination	Gewebe in Kolben mit warmem Trypsin überführen	-Trypsin in den Kolben geben	1	10sec.
		Alle 30 Minuten den Überstand auffangen und 4 Stunden lang frisches Trypsin zugeben	-Überstand auffangen -Frisches Trypsin zugeben	2 each 30min. Total: 16	4h + 1min.
		Trypsin entfernen		1	5 sec.
	Cold Trypsination	Gewebestücke in ein Fläschchen geben			10sec.
		Mit Trypsin in einer Salzlösung tränken	-Trypsin in den Puffer geben -Umfüllen in Fläschchen	2	6-24h + 10sec.
		Trypsin entfernen und werfen		1	5 sec.
		Gewebestücke inkubieren			20min. -30min.
	Collagenase	Warmes, komplett Medium zu den Gewebestücken geben und das Gewebe vorsichtig mit einer Pipette verteilen	-Medien zugeben -Dispergieren	2	30sec. - 1min.
		Übertragung der Gewebestücke in den Kolben mit vollständigem Medium und Kollagenase	-Kollagenase zum Medium hinzufügen -Umfüllen in Kolben	2	20sec.
		Inkubation			4h-5d
	Dispase	Gewebestücke durch Pipettieren dispergieren		1	30sec. - 1min.
Überführung der Gewebestücke in den Kolben mit Salzlösung und Dispase		-Dispase zum Puffer zugeben -Übertragung des Puffers in den Kolben	2	20sec.	
Filtration Zentrifugation	Inkubation			20min. - 24h	
	Probe das Zellsieb filtrieren			1-2min.	
	Suspension mehrmals durch Zentrifugation in Puffer waschen	-Puffer z.B. 3 mal zugeben	3	15min.	
	Überstand abnehmen und Zellen resuspendieren	-Entfernen von -Resuspendieren	2	20sec.	
		Total	Warm Tryps.: 25 Cold Tryps.: 12 Collagenase: 10 Dispase: 9	Warm Tryps.: ca. 4h Cold Tryps.: ca. 6-24h Collagenase: ca. 4h-5d Dispase: ca. 0,3-14h	

Abbildung 22: Prozessanalyse der manuell-enzymatischen Gewebedissoziation. Die manuell-enzymatische Methode lässt sich aufgrund der verwendeten Enzyme, Trypsin, Kollagenase und Dispase, nochmals in vier Verfahren unterscheiden. Die enzymatische Methode kann Bearbeitungs- und Inkubationszeiten von mehr als vier Stunden benötigen.

Um den Herstellungsprozess der Einzelzellsuspension aus Gewebe mittels Enzymen zu vereinfachen und zu beschleunigen, können teilautomatisierte Systeme eingesetzt werden. Diese Systeme können verschiedene Schritte des Prozesses übernehmen und somit die Arbeitsbelastung des Personals reduzieren.

Ein Beispiel für ein teilautomatisiertes System für die Gewebedissoziation ist der sogenannte gentleMACS® von Milteny Biotec, welcher aufgrund seiner weitläufigen Verfügbarkeit in der Praxis sehr häufig eingesetzt wird. Hier besteht der erste Prozessschritt aus einem enzymatischen Verdau und der zweite Prozessschritt aus einem mechanischen Aufschluss mit speziell entwickelten Reaktionsröhrchen und einer Schneidklinge. Für die weitere Betrachtung und detaillierten Analyse wurde dieses Gerät stellvertretend für die marktverfügbaren, teilautomatisierten und enzymatischen Methoden tiefergehend betrachtet.

Das gentleMACS®-System stellt ein Benchtop-System zum Aufschluss oder zur Homogenisierung von Gewebe dar. Das System besteht aus einem programmierbaren Basisgerät, welches über eine angetriebene Welle verfügt. Diese treibt das Schneidwerk in den als C- oder M-Tubes bezeichneten Aufschluss-Gefäßen an (Abbildung 23).

A)



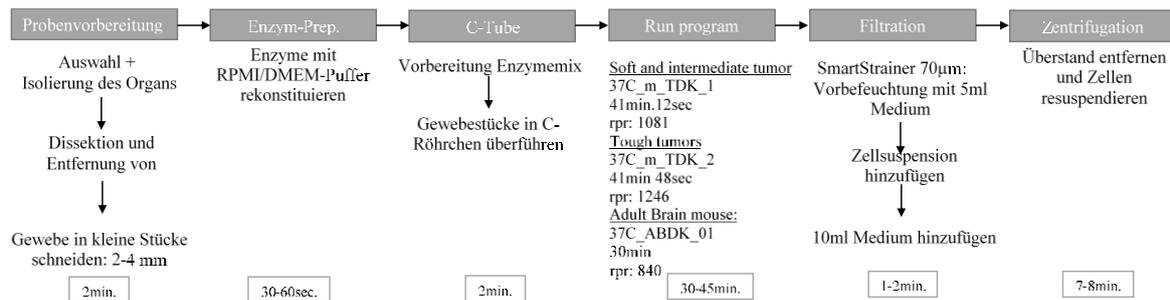
B)



Abbildung 23: gentleMACS®-System. A) Betriebseinheit des gentleMACS® mit aufgesetzten Disposables und Heizelementen (Miltenyi Biotec 2021d). B) C-Tube Disposables für den GentleMACS.

Dabei sind die C-Tubes zum Gewebeaufschluss und die M-Tubes zur Gewebekomogenisierung ausgelegt. Mittels des weißen Mitnehmers wird die Gewebeprobe den Zähnen des Schneidwerks zugeführt und so aufgeschlossen. Verschiedene Gewebetypen können gleichzeitig verarbeitet und jederzeit neue Proben hinzugefügt werden. Durch die zusätzlichen Heizelemente kann eine enzymatische Behandlung direkt im C-Tube erfolgen. Um eine Einzelzellsuspension mit dem enzymatischen Verfahren mittels gentleMACS® isolieren zu können, müssen zunächst die im Kit enthaltenen Enzyme vorbereitet werden. Hierfür wird den einzelnen Vials, abhängig vom Enzym, ein gewisses Volumen an DMEM mit stabilem Glutamin zugegeben. Die Enzyme müssen sich vollständig lösen und anschließend aliquotiert werden, um

sowohl Kontaminationen als auch ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, was die Enzymaktivität beeinträchtigen kann. Das C-Tube wird fest verschlossen und umgekehrt auf die Portstelle des gentleMACS® aufgesetzt. Zusätzlich wird das Heizsystem aufgesetzt und das gewünschte Programm durchgeführt. Nach Beendigung des Aufschlusses wird das Tube vom Gerät abgenommen und muss vor der Zentrifugation separat gefiltert werden. Nach der Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in der gewünschten Volumenmenge Medium resuspendiert. In Abbildung 24 ist eine Übersicht über die Arbeitsschritte, die benötigte Zeit und die Anzahl der Pipettierschritte dargestellt.

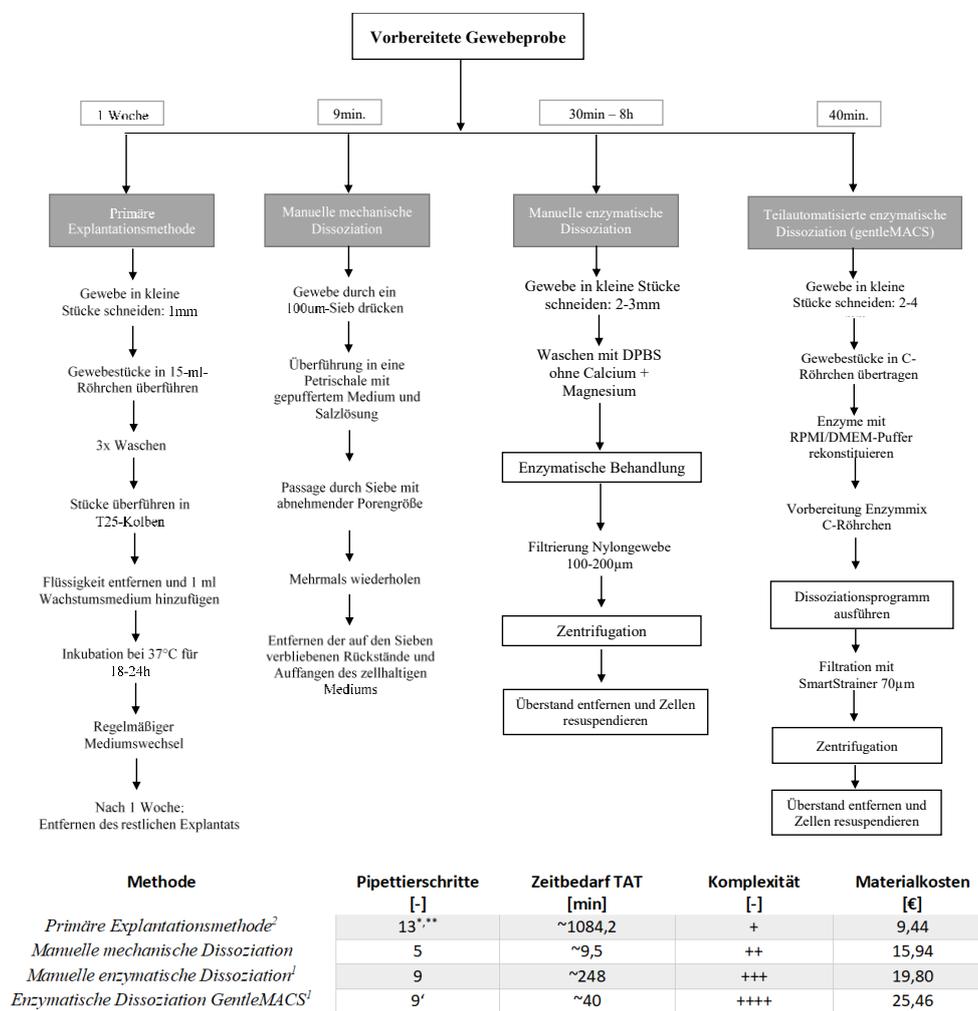


Prozessschritt	Beschreibung	Materialien	Pipettierschritte	Dauer
Probenvorbereitung	Auswahl + Isolierung des Organs			
	Entfernung von nekrotischem Gewebe			30sec. -1min
	Gewebe in kleine Stücke schneiden			30sec. -1min
Enzymatische Vorbereitung	Waschen mit DPBS	-Hinzufügen DPBS -Entfernen DPBS	2	20sec.
	Enzyme mit Medium oder Puffer rekonstituieren	-ca. 1-5 Enzyme	1-5	30sec.
C-Tube Vorbereitung	Vorbereitung Enzymmischung	-ca. 1-5 Enzyme	1-5	30sec.
	Übertragung der Gewebestücke in ein C-Röhrchen			20sec.
Start Dissoziationsprogramm				30min. -45min.
Filtration	Vorbereitung Smartstrainer		1	5sec.
	Zellsuspension hinzufügen		1	5sec.
	10ml Medium zugeben		1	5sec. +30sec.
Zentrifugation	Überstand entfernen und Zellen resuspendieren	-Entfernen -Resuspendierung	2	5min. 20sec.
		Total	9-17	

Abbildung 24: Prozessanalyse der Gewebedissoziation mittels GentleMACS®. Der Aufschluss erfolgt über optimierte, vordefinierte Programme in Zusammenarbeit mit speziell erstellten Enzym-Kits mit einer unbekanntens Zusammensetzung an Enzymen. Der Zusatz der Heizelemente stellt eine Optimierung des Enzymverdaus dar, indem die Temperatur bei 37 °C, dem Aktivitätsoptimum der meisten Enzyme, konstant gehalten und direkt im Gerät ermöglicht wird, ohne zwischenzeitliche Inkubation im Wasserbad.

Zusammenfassend werden folgende Herausforderungen für den Gewebeaufschluss definiert. Einzelzellsuspensionen können mit Hilfe enzymatischer und/oder mechanischer Verfahren aus Geweben gewonnen werden. Zahlreiche Protokolle, einschließlich verschiedener Enzyme und physikalischer Aufschlussstrategien wurden in diesem Abschnitt beschrieben. Gewebe enthalten viele verschiedene Zelltypen, aber auch unterschiedliches extrazelluläres Material. Selbst innerhalb eines scheinbar homogenen Gewebes variiert die Zellzusammensetzung und die umgebende Matrix. Dies macht es sehr schwierig, Dissoziationsprotokolle zu entwickeln, die eine vollständige Charakterisierung von Geweben ermöglichen.

Die nachfolgend Abbildung 25 und Abbildung 26 geben zusammenfassend Auskunft über die wichtigsten charakteristischen Prozesseigenschaften bezüglich unterschiedlicher Parameter der einzelnen analysierten Dissoziationsmethoden.



*3x Waschschrte

** beinhaltet Kultivierung mit Wechsel des Mediums

¹Aufreinigung mit empfohlenem Smartstrainer

Hinweis zu enzymatischen Methoden: Pipettierschritte sind abhängig von Art und Anzahl der verwendeten Enzyme

¹ enzymabhängig

² inkl. Kultivierung

Abbildung 25: Übersicht über die analysierten Methoden zur Gewebedissoziation.

Die Explantmethode, die unter die manuelle Gewebedissoziation fällt, ist das kostengünstigste Verfahren mit einem Preis von 9 € pro Probe. Allerdings ist sie auch die zeitaufwändigste Methode, da sie bis zu einer Woche in Anspruch nehmen kann und birgt ein erhöhtes Risiko für Kontamination. Die enzymatisch-chemische Methode kann, abhängig von der Art und Anzahl der verwendeten Enzyme, Kosten von mindestens 18 € verursachen und zählt gelegentlich zu den teuersten Verfahren. Im Vergleich zur Explantmethode ermöglicht die Herstellung einer Einzelzellsuspension mittels dieser Methode bereits innerhalb von vier Stunden Ergebnisse. Allerdings geht dies mit der Zerstörung von Oberflächenantigenen und Zellstrukturen einher. Die manuell-mechanische Methode ist die wirtschaftlichste und schnellste Art der Gewebedissoziation. Sie ist jedoch ebenso wie alle arbeitsintensiven Methoden anfällig für erhöhte Kontaminationsrisiken, was in der folgenden Kultivierung der Zielzellen problematisch sein kann.

Im Gegensatz dazu zeigt die teilautomatisierte Methode, die ein geschlossenes System verwendet, ein erheblich verringertes Risiko für Kontaminationen. Besonders bemerkenswert ist neben der reduzierten Kontaminationsgefahr auch die Fähigkeit, mehrere Proben gleichzeitig zu verarbeiten, was eine Hochdurchsatzverarbeitung ermöglicht. Die enzymatisch-teilautomatisierte Methode unter Verwendung von gentleMACS® stellt, je nach den ausgewählten Enzymen, die kostspieligste Methode dar. Obwohl sie mit einer Prozessdauer von knapp einer Stunde im Vergleich zur manuell-enzymatischen Methode wesentlich schneller ist, bleibt sie im Vergleich zur mechanischen Methode dennoch um das Fünffache zeitaufwändiger. Wie in Abbildung 26 dargestellt, ist der hohe Zeitaufwand hauptsächlich in der enzymatischen Gewebedissoziation und den damit verbundenen Inkubationszeiten begründet.

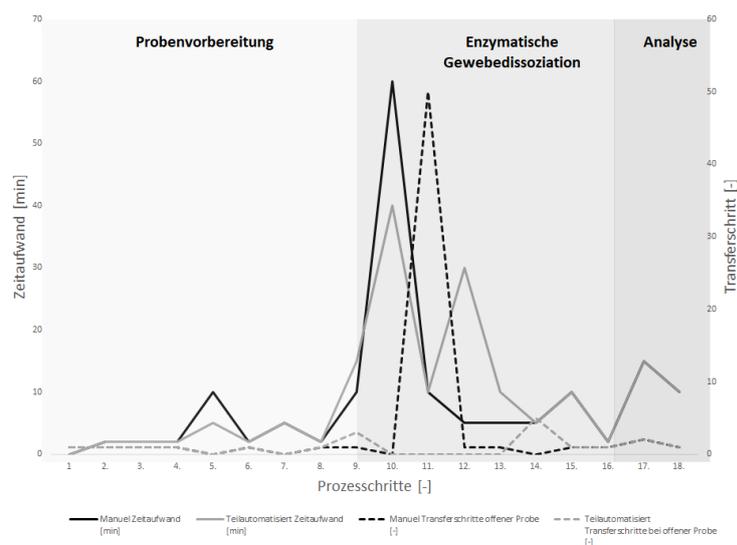


Abbildung 26: Graphische Darstellung des Zeitaufwands und der Anzahl der Transferschritte für ein enzymatisches Dissoziationsprotokoll. Die Analyse basiert auf einer Schritt-für-Schritt-Darstellung eines Gewebedissoziationsprotokolls. Chirurgisch resezierte Patientenproben wurden in PBS, normaler Kochsalzlösung oder Medium bei Raumtemperatur transportiert. Auf die mechanische Dissoziation folgte eine 1-stündige enzymatische Dissoziation mit Kollagenase II und DNase I.⁹⁶

Die momentan angewandten Methoden zur Gewebedissoziation umfassen Prozesse wie Zerkleinerung, enzymatische Verdauung, Disaggregation und Filterung. Diese Verfahren sind arbeitsaufwändig, zeitintensiv, ineffizient und zeigen eine hohe Variabilität. Es besteht daher ein dringender Bedarf an neuen Ansätzen und Technologien, um diese Herausforderungen zu bewältigen. Diese Herausforderungen werden im folgenden Kapitel aus der Analyse der Gewebedissoziationsmethoden abgeleitet und zusammenfassend dargestellt.

3.4 Ableitung von Untersuchungs- und Entwicklungsschwerpunkten

Das Ziel der meisten Gewebedissoziationsverfahren ist es, möglichst lebensfähige Zellen zu erhalten und sicherzustellen, dass die Methode keine negativen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit oder Funktion der Zellen hat. Die Forscher und Techniker müssen die richtige Kombination von Dissoziationsmethoden wählen, um erfolgreich zu sein. Die meisten verlassen sich dabei auf Literaturrecherchen, stoßen aber oft auf widersprüchliche Informationen und Hinweise. Die Gründe für die widersprüchlichen Daten lassen sich häufig auf unterschiedliche Protokolle und inkonsistente und/oder unreine Enzyme zurückführen. Unstimmigkeiten können die Fähigkeit der Forscher beeinträchtigen, die Daten in ihren eigenen Experimenten genau zu interpretieren und sie können es anderen unmöglich machen, das Experiment zu wiederholen. Diese Variabilität im Dissoziationsprozess kann sich auch negativ auf die Verwendung dieser Zellen in Transplantations- oder Zelltherapieanwendungen auswirken.

Eine Möglichkeit, der Variabilität zu begegnen, besteht darin, ein standardisiertes Protokoll für die Gewebedissoziation zu erstellen. Bei der enzymatischen Dissoziation zum Beispiel kann es Probleme bei der Bestimmung der richtigen Enzymkonzentration, der richtigen Inkubationszeit und der richtigen Temperatur geben; wenn diese Faktoren nicht stimmen, kann es zu Zellschäden oder unvollständiger Dissoziation kommen. Ein weiterer wichtiger Schlüssel zum Umgang mit der Variabilität ist die Qualität der Enzyme. Enzyme sind in vielfältigen Qualitätsstufen verfügbar, die Reinheit, Qualität (gemäß den GMP-Richtlinien für gute Herstellungspraxis), Enzymkonzentration und Herkunft (frei von tierischen Bestandteilen) umfassen. Die Variabilität dieser Produkte sowohl zwischen den verschiedenen Qualitäten als auch innerhalb der Chargen stellt für die Forscher eine Herausforderung dar. Die Variabilität führt häufig zu widersprüchlichen oder nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Dies kann mit enzymfreien Dissoziationsprozessen direkt umgangen werden.

Im folgenden Abschnitt ist eine Übersicht über potentielle Probleme bei der Gewebeaufarbeitung dargestellt, die durch die Analyse in Kapitel 3 herausgearbeitet wurden:

- Insbesondere heterogenes Gewebe stellt spezifische Anforderungen an die Dissoziationsmethode. So ist es mit der enzymatischen Methode kaum möglich, stark adhärenente Zellen konsequent zu isolieren, gleichzeitig aber Beeinträchtigungen (vor allem der Oberflächenmoleküle) an fragilen Zellen zu vermeiden.
- Ein Nachteil der enzymgestützten Dissoziation liegt in der Anzahl der unterschiedlichen, manuell durchzuführenden, Schritte innerhalb der Protokolle sowie den benötigten Enzymmischungen, die für die verschiedenen Gewebe und zu isolierenden Zelltypen benötigt werden. Die Wahl der Methoden ist stark an den Aufbau und Ablauf der nachfolgenden Analytik sowie der Beschaffenheit der dargereichten Probe gebunden. So ist zu beachten, dass die Enzyme nicht nur die extrazelluläre Matrix verdauen, sondern auch Oberflächenmoleküle der Zellen angreifen. Sollen diese, im Anschluss an den Gewebeaufschluss, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, können Abweichungen im Dissoziationsprotokoll schnell zu qualitativ wie quantitativ unregelmäßigen Untersuchungsergebnissen führen.
- Bei der enzymatischen Methode können Probleme mit der Enzymkonzentration, Inkubationszeit und der optimalen Temperatur auftreten. Bei Fehleinschätzungen dieser Parameter kann es zu erheblichen Zellschäden und zu einer unzureichenden Gewebedissoziation kommen. Darüber hinaus spielt die Enzymqualität eine entscheidende Rolle, die zwischen unterschiedlichen Chargen sehr stark variieren kann. Dies kommt vor allem im GMP reguliertem Umfeld zum Tragen.
- Im Zuge der voranschreitenden Personalisierung der Medizin und damit verbundenen höheren Proben und Analyseaufkommen, wird der Einsatz von teilautomatisierten Geräten zunehmend notwendiger. Diese haben neben einer steigenden Effizienz den Vorteil, dass Ergebnisse, aufgrund weniger individueller Arbeitsschritte, reproduzierbarer werden.

Zusammenfassend ist die Fähigkeit, einzelne Zellen aus Geweben zu gewinnen ein Engpass für zellbasierter Diagnostiktechnologien. Die Gewebeprobe wird typischerweise durch proteolytische Verdauung und verschiedene mechanische Behandlungen aufgeschlossen, aber der Erfolg war aufgrund langer Verarbeitungszeiten, geringer Ausbeute und hoher manueller Arbeitsbelastung begrenzt. Pathologische Gewebeprobe können eine unterschiedliche Dissoziationskinetik im Vergleich zu gesunden Gewebeprobe aufweisen. Zudem kann es Unterschiede in der Dissoziationsleistung zwischen verschiedenen Gewebeprobe derselben Krankheit geben. Bei der mechanischen Dissoziation von Gewebeprobe und der Erzeugung

von Einzelzellen entsteht eine mechanische Belastung. Mit verbesserten Verfahren und Technologien kann dieser Einfluss jedoch auf ein Minimum reduziert werden, um möglichst körpereigene und unverfälschte Zellen zu erhalten, so dass die daran durchgeführte Diagnostik effektiver ist und leichter übertragen werden kann. Der Einsatz von chemischen oder enzymatischen Reagenzien ist ungeeignet, da diese auch die Proteine beeinflussen, die später für die Markierung/Färbung und molekularbiologische Analyse benötigt werden. Hinzu kommt, dass klinische Gewebeproben für die Gewinnung von Primärzellen oft nur in kleinen Mengen verfügbar sind. Aufgrund des hohen Bedarfs an Primärzellen und der begrenzten Verfügbarkeit von Gewebeproben sollte die Gewinnung von Primärzellen so effizient wie möglich sein. Die Möglichkeit, einzelne Zellen aus Gewebeproben zu extrahieren, ist derzeit ein Engpass für zellbasierte diagnostische Technologien und bleibt ein entscheidender Faktor in den fortschreitenden Ansätzen der personalisierten Medizin. Aus diesen Gründen soll im Rahmen dieser Arbeit ein neues teilautomatisiertes Verfahren für den enzymfreien und mechanischen Gewebeaufschluss entwickelt, getestet und validiert werden. Die speziellen Anforderungen für ein solches Verfahren werden im nachfolgenden Kapitel detailliert aufgezeigt.

3.5 Anforderungen an ein System zur enzymfreien und mechanischen Gewebedissoziation

Abgeleitet aus der Analyse ergeben sich folgenden Anforderungen an ein mechanisches und enzymfreies Verfahren zur teilautomatisierten Gewinnung von Einzelzellen aus Gewebeproben (Tabelle 5). Prozessschritte, welche im Rahmen des Workflows nicht automatisiert durchgeführt werden, werden hinsichtlich der bereits bestehenden, geeigneten Systeme zur Prozessierung analysiert und die Schnittstellenspezifikation fließt in den Demonstrator ein. Dabei wird differenziert zwischen Pflicht-Anforderung und Wunsch-Anforderung:

Tabelle 5: Anforderungen an ein mechanisches und enzymfreies Verfahren zur teilautomatisierten Gewinnung von Einzelzellen aus Gewebeproben.

Prozess	Merkmal	Anforderung	Kriterien	Pflicht (P) / Wunsch (W)
Biologische Prozessparameter	Biologische Qualität der Zielzellen	<u>Zellviabilität</u> <i>Vergleichbare Viabilität im Vergleich zum enzymatischen Prozess</i> <u>Zellintegrität</u> <i>hohe Lebendzellzahl (intakte Zellen)</i> <u>Zellausbeute</u> <i>Vergleichbare Viabilität im Vergleich zum enzymatischen Prozess</i> <u>Heterogenität</u> <i>Erhalt von möglichst vielen verschiedenen Zelltypen (z.B. Hepatozyten)</i>	>60% Vergl. enzymatischer Prozess	P P P P
	Prozessierbares Probenspektrum	<u>Eignung für folgende Gewebearten</u> <i>Herkunft: Wirbeltiere (human, murin)</i> <i>Art: Verschiedene feste Gewebetypen</i> <i>Gewinnung: Gewebeschnitt, Biopsie</i> <i>Vorbehandlung: Keine Vorbehandlung</i> <i>Lagerung: Puffer oder Flüssigkeit</i> <i>Zustand: frisch</i> <i>Gewebemenge: Im Bereich von klinischen Gewebeproben</i> <u>Dissoziationseffizienz</u> <i>Möglichst vollständige Dissoziation der eingebrachten Gewebeprobe</i>	10 Pa - 1GPa E-Modul 5-400mg >90%	P P

Technische Prozessparameter	Automatisierbarkeit	<u>Prozesszeit (TAT)</u> <i>Möglichst kurze Prozessierung</i>	<15 Min/Probe	P	
		<u>Kosten</u> <i>Minimaler Kostenaufwand</i>	<20€/Probe	W	
		<u>Rüstzeit</u> <i>Minimaler manueller Zeitaufwand für Hilfsprozess</i>	<10 Min	P	
		<u>Kontamination</u> <i>Minimales Kontaminationsrisiko</i>	Einwegsystem	P	
		<u>Filtration</u> <i>Integration eine Filterfunktion</i>		W	
		<u>Reproduzierbarkeit</u> <i>Gewährleistung einer hohen Reproduzierbarkeit durch</i>	Nutzerunabhängige Protokolle / computergesteuert	P	
		<u>Temperatur</u> <i>Minimale Temperaturentwicklung während der Prozessierung</i>	Max 1°C	P	
Prozessdurchgängigkeit	<u>Parallelisierbarkeit</u> <i>Mehrere Proben können parallel verarbeitet werden</i>	2-4 Proben parallel	W		
	<u>Baugröße</u> <i>Einfacher Transport zum Ort der Probenahme</i>	<10kg, 30x30x30cm	W		
	<u>Schnittstelle zu automatisierten Pipetiersystem</u> <i>Verwenden eines Standardlaborformats um Prozessintegration zu ermöglichen</i>	Multwellplatte oder Zentrifugenröhrchen	P		

4 Stand der Technik

Im Bereich der bioverfahrenstechnischen Forschungsarbeiten existieren Untersuchungen und Lösungen zur Optimierung von Aufschlussverfahren für biologische Proben. Diese Arbeiten beziehen sich jedoch vorwiegend auf den Zellaufschluss im großtechnischen Maßstab, beispielsweise auf den Aufschluss von Mikroorganismen für die Pharmaproduktion. Ein guter Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten zum Zellaufschluss findet sich bei einigen Veröffentlichungen^{135,136}. Bei Anwendung mechanischer Methoden zum Zellaufschluss reißen die entstehenden Spannungen und Dehnungen die Zellwände der Mikroorganismen auseinander. Diese Methoden werden immer dann benötigt, wenn intrazelluläre Stoffe das Zielprodukt sind. Grundsätzliche Untersuchungen von mechanischen und enzymfreien Aufschlussverfahren für den teilautomatisierten Aufschluss von Gewebeprobe zur Erhaltung der Zellintegrität im Labormaßstab sind nicht bekannt. Dabei wird bezüglich der mechanischen Gewebeaufschlussverfahren meist vom Stand der aktuellen Gerätetechnik für den Zellaufschluss und nicht von den speziellen Anforderungen für die Gewebedissoziation ausgegangen. In dem folgenden Abschnitt zur Analyse des Standes der Technik wird auf die hauptsächlich angewandten Methoden des enzymatischen und mechanischen Aufschlusses eingegangen.

Da der Fokus bei einer Gewebedissoziation auf der Auflösung der Zell-Zell-Kontakte liegt, darf es mit einem Zellaufschluss nicht verwechselt werden. Die Liste der Zellaufschlussgeräte ist umfangreich.¹³⁷ Für die Gewebedissoziation hingegen sind nur wenige Tischgeräte bekannt. Diese sind die MediMachine® (BD), der Singulator® (S2 Genomics), der Python® (Singeron) und der gentleMACS® (Mitenyi). Diese Tischgeräte arbeiten auf Basis eines enzymatischen Verdau der Gewebeprobe mit einer anschließenden mechanischen Prozessierung. Die mechanische Prozessierung der genannten Geräte basiert auf einem Rotor-Stator-Prinzip. Bei diesem Prinzip wird die Probe nach dem enzymatischen Verdau durch hydraulische und mechanische Scherung aufgeschlossen. Dieses Verfahren wird häufig aufgrund seiner Effizienz und der Aufschlusszeit eingesetzt. Hauptnachteil ist jedoch wie bereits in Abschnitt 3.3.5 und 3.2.2 der Einsatz von Enzymen. Einzig die MediMachine arbeitet auf Basis eines metallischen Siebes ohne enzymatischen Einsatz. Einer der Hauptkomponenten ist die Einweg-Kammer, welches „Medicon“ genannt wird. Im Medicon befindet sich ein Edelstahlelement, das die Gewebeprobe während einer Kreisbewegung durch die Bohrlöcher drückt. Die Bohrlöcher sind mit Mikroklingen umrandet. Die Antriebswelle wird durch einen Motor zwischen 10 Sekunden bis 4 Minuten angesteuert. Die Suspension sammelt sich unterhalb des Siebs. Nach der Aufbereitung wird die Suspensionsflüssigkeit mittels einer Pipette aufgesaugt und in ein Probengefäß transferiert. Dieses System ist kaum automatisierbar, nicht adaptierbar für unterschiedliche Gewebetypen und kann nur eine Gewebeprobe pro Durchlauf aufarbeiten.

Die Technologien für Gewebeaufbereitung zur Erhaltung der Viabilität und Zellintegrität ist derzeit nicht weit vorangeschritten. Sie erfolgt überwiegend per Hand mit einem Skalpell und einem Zellsieb (siehe Abschnitt 3.3.2). Einzig einige mikrofluidische Ansätze sind bekannt. Die mikrofluidische Gerätetechnologie zielt darauf ab, die mechanische Dissoziation von Gewebe zu verbessern, die Dauer des Verfahrens zu verkürzen, die Zellrückgewinnung zu verbessern und die Probenreinheit zu erhöhen. Dieser Ansatz ermöglicht eine schnelle und schonende Dissoziation mit geringem oder gar keinem Enzymeinsatz. Ein mikrofluidisches Instrument besteht aus einem Netz von verzweigten Kanälen, deren Breite allmählich abnimmt. Die Kanäle weisen wiederholte Ausdehnungen und Verengungen auf, die einen Flüssigkeitsausstoß bewirken und die für die Zelltrennung erforderliche Scherkraft erzeugen.^{80,138,139} Diese mikrofluidischen Verfahren können jedoch nur für sehr geringe Probenmengen im Bereich von <1 mg eingesetzt werden.

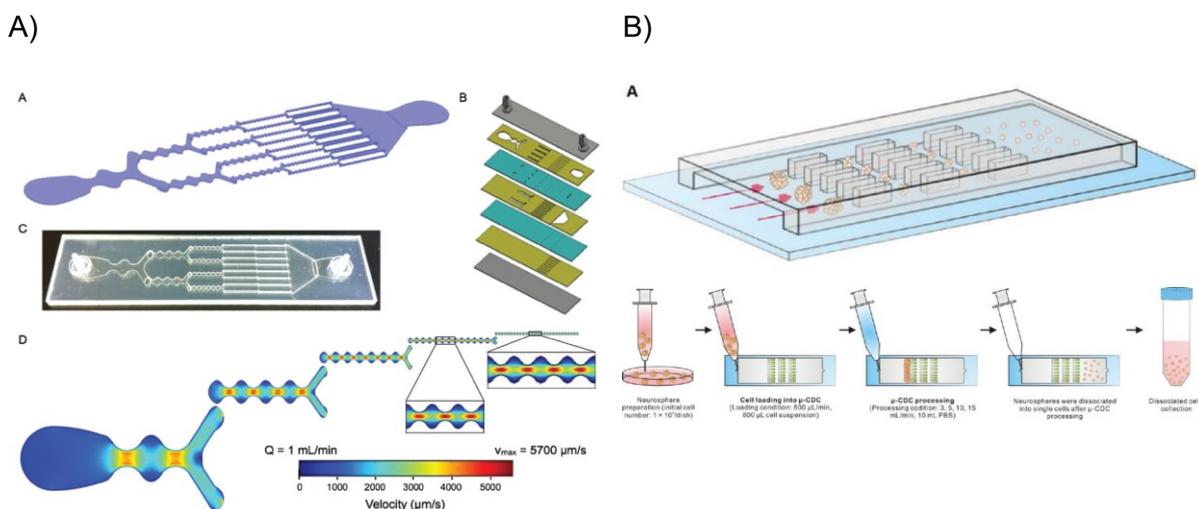


Abbildung 27: Mikrofluidische Dissoziationsvorrichtungen. A) Schematische Darstellung des verzweigten Kanals mit abwechselnden Verengungs- und Erweiterungsbereichen für eine mikrofluidische Gewebedissoziationsvorrichtung.¹³⁹ B) Schematische Darstellung des mikrofluidischen Zelldissoziations-Chips (μ-CDC).¹⁴⁰

4.1 Folgerungen aus dem Stand der Technik

Kommerziell erhältliche Systeme, mit denen Gewebe aufgeschlossen werden können, sind bereits am Markt vorhanden. Aus der Analyse der derzeit verfügbaren Systeme zur Automatisierung der Probenvorbereitung ergibt sich als Anforderung ein neuartiges, zu entwickelndes Verfahren, das auch eine Schnittstelle zu am Markt üblichen automatisierten Pipettiersystemen, vorzugsweise Pipettierroboter, vorzusehen ist, so dass die nachfolgenden, auf Flüssigkeitshandhabung basierenden, biochemischen Prozessschritte mit am Markt verfügbaren Verfahren durchgeführt werden können. Die derzeitigen Geräte zum enzymatischen und mechanischen Gewebeaufschluss genügen diesen Anforderungen nicht. Diese Limitierungen in den

Bereichen Prozessdurchgängigkeit, Systemgestaltung aus Einwegkomponenten sowie bei der Automatisierbarkeit müssen durch Entwicklungsarbeiten aufgearbeitet werden.

Eine Analyse zum Stand der Technik ergibt zusammenfassend, dass aufgrund der nachfolgenden aufgelisteten Gründe derzeit noch keine ausreichende Lösung für die teilautomatisierte, enzymfreie und mechanische Gewebedissoziation vorhanden ist.

- **Manueller Prozessaufwand:** Manuelle Bearbeitung und Verwendung vieler unterschiedlicher Probenträger, Methoden und Geräte erhöhen den Aufwand für die Durchführung und erschweren reproduzierbare Ergebnisse. Bisher gibt es noch keine Dissoziationsmethode mit einem durchgängigen Arbeitsablauf in einem geschlossenen System zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen.
- **Variierendes Probenspektrum:** Bei der Entwicklung von mechanischen Gewebedissoziationsverfahren kann aufgrund des breiten Probenspektrums und der entsprechenden Komplexität der Gewebeeigenschaften nicht auf theoretische Materialwerte zurückgegriffen werden. Für einen automatisierten Gewebeaufschluss wäre deshalb ein möglichst breites prozessierbares Probenspektrum wünschenswert, über die die marktetablierten Geräte bisher nicht verfügen.
- **Parallelisierung:** Nachgelagerte molekularbiologische Analysen erfordern ein hohes Maß an Sterilität und molekulare Integrität der Zielzellen. Derzeit ist noch kein parallelisierbares System zur Gewebeaufbereitung am Markt verfügbar, welches enzymfrei und damit kompatibel und universell zu nachfolgenden molekularbiologischen Analysen angewandt werden kann. Die derzeitigen nachgeschalteten Analysemethoden stellen strenge Anforderungen an die Eingangsprobe: Die meisten Methoden erfordern (i) eine Suspension von Einzelzellen in (ii) einer Flüssigkeit mit physikalischen Eigenschaften (Viskosität, Oberflächenspannung) innerhalb eines bestimmten Bereichs und (iii) eine Zellkonzentration innerhalb eines bestimmten Bereichs.
- **Standardisierung:** Wissenschaftler müssen die richtigen Kombinationen der Aufschlussmethoden auswählen. Die Auswahl basiert auf Erfahrungswerten und Literaturrecherche. Dadurch kommt es zu inkonsistenten Ergebnissen. Dies führt wiederum zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Als Folge der mangelnden Standardisierung, der erwähnten manuellen Gewebeaufschlussmethoden, wurden verschiedene teilautomatisierte Systeme entwickelt (siehe Kapitel 4). Ziel ist es, die Stabilität des Aufschlussprozesses zu erhöhen. Die Prozessstabilität beschreibt die Fähigkeit des Prozesses, bei gleichbleibenden Parametern konstante und vorhersagbare Ergebnisse zu liefern. Durch die hierdurch erhöhte Standardisierung sollen Ergebnisse zwischen beispielsweise verschiedenen Laboren oder Veröffentlichungen vergleichbar gemacht werden.

Weiterhin soll der personelle Aufwand verringert werden, indem das Gerät die zeitaufwändige Vereinzelung der Zellen übernimmt und so Personal für andere Aufgaben freistellt.

Es sind nur wenige Systeme bekannt, bei denen mechanische Aufschlussverfahren in Laborautomaten integriert werden. Dies sind Sonderlösungen, bei denen bekannte, am Markt verfügbare mechanische Aufschlussverfahren in Laborautomaten integriert werden. Die Integration, zum Beispiel einer Zentrifuge, in eine automatisierte Anlage ist nur unter erschwerten Bedingungen möglich. Zusätzlich zu hohen Investitionskosten wird viel Platz benötigt, der in einer automatisierten Plattform oft sehr begrenzt ist. Für die Automatisierung eines Zentrifugationsvorgangs müssten das Probengefäß mithilfe eines Roboterarms verschlossen und der Rotor beladen werden. Nach der Zentrifugation müsste die Position der Probe bestimmt, diese aus der Halterung herausgenommen, geöffnet und der Überstand sicher abgesaugt werden. Letzteres ist besonders auf Grund der unterschiedlichen Größe der Zellpellets schwierig. Durch diesen Prozess ist es zwar möglich Zellkulturmedium oder Waschlösungen und Zellen voneinander zu trennen, eine Automatisierung wäre allerdings zu kostenintensiv, weshalb eine Alternative gefunden werden sollte.

Die Analyse zeigt, dass für ein enzymfreies und mechanisches Verfahren für die Dissoziation von Gewebeprobe ein Rotor-Stator-System in Betracht zu ziehen ist. Für eine enzymfreie Nutzung dieses Verfahrens ist jedoch eine zellschonende Weiterentwicklung notwendig, welche aktuell nicht am Markt verfügbar ist. Es müsse Entwicklungsarbeiten in Bezug auf das mechanische Wirkorgan, den Wirkmechanismus zu Prozessdurchgängigkeit, in Bezug auf die Ergebnisqualität und die Automatisierbarkeit durchgeführt werden. Die Notwendigkeit, eine große Anzahl von Proben zu verarbeiten, erfordert einen Kompromiss mit dem Grad der effektiven Dissoziation.

Neben diesen wichtigsten allgemeinen Kriterien für die Bewertung der verschiedenen Technologien, bringen die Anwendung zusätzliche spezifische Anforderungen mit sich, die sorgfältig geprüft werden müssen. Für Anwendungen mit lebenden Zellen werden oft sterile Betriebsbedingungen gefordert, welche wiederum Technologien erfordern, die auf austauschbaren Einwegkomponenten angewiesen sind (z. B. mikrofluidische Chips).

Folglich sollte ein neues Verfahren entwickelt werden, das sowohl durch die Qualität der generierten Einzelzellen und Automatisierung als auch durch geeignete Gestaltung der Hilfsmittel und des Prozessablaufs zur Erhöhung der biologischen Qualität und Reproduzierbarkeit des Aufschlussergebnisses und zur Reduzierung des Handhabungsaufwandes beiträgt. Bezüglich der Prozesszeiten muss das neue, zu entwickelnde System den Gewebeaufschluss in

vergleichbarer oder schnellerer Prozesszeit wie die als Vergleichsverfahren gewählte gentle-MACS®-System erreichen. Zusätzlich ergibt sich bei der Analyse der Prozesszeit beim derzeitigen manuellen Ablauf zudem die Anforderung die Zeitaufwände für Rüsten und Reinigen zu minimieren.

In diesem Projektabschnitt werden unter Berücksichtigung der festgelegten Randbedingungen und im Hinblick auf die gerätetechnische Umsetzung die Grundlagen der Teilverfahren erarbeitet. Im Einzelnen handelt es sich um die Entwicklung eines mechanischen Wirkorgans zur enzymfreien Dissoziation von klinischen Gewebeproben und die Entwicklung und Optimierung des Dissoziationsprozesses für teilautomatische und parallelisierte Integration in den diagnostischen Gesamtprozess. Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz zielt speziell darauf ab, die mit soliden Biopsien verbundenen Verarbeitungsprobleme zu lösen, einschließlich der vollständigen Prozessintegration und des möglichst vollständigen Schutzes vor Prozesskontaminationen. Diese Eigenschaften werden durch den Einsatz von Mikrofabrikationstechniken erreicht. Hierbei ist es das Ziel, integrierte mikrofabrizierte Mahlwerke zu entwickeln, die in ein gängiges Labormaß passen und somit problemlos in bestehende Laborabläufe integriert werden können. Das daraus resultierende System sowie die gewünschte Einwegnutzung sollen die Verarbeitung von Biopsien mit einem Volumen im Bereich von 5-400 mg ermöglichen und münden damit in einer teilautomatisierten Probenverarbeitungstechnologie für die klinische Forschung.

4.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es ein mechanisches Dissoziationsverfahren ohne den Einsatz von Enzymen oder Chemikalien für eine große Anzahl an Gewebetypen zu entwickeln. Beim Schritt der Gewebedissoziation können verschiedene mechanische Verfahren eingesetzt werden. Als Kriterien zur Auswahl des Verfahrens werden die Effizienz des Verfahrens, die erreichbare Qualität des Ergebnisses, sowie die Prozesszeit, Kosten und Kontaminationsrisiko herangezogen. Die mechanische Dissoziation der Gewebeprobe soll mittels Rotor-Stator-Zerkleinerung durchgeführt werden. Rotor-Stator-Homogenisatoren (auch Kolloidmühlen oder Willems-Homogenisatoren genannt) sind in der Regel leistungsfähiger als reine Schneidmischer und eignen sich gut für pflanzliches und tierisches Gewebe. Der Rotor-Stator-Homogenisator wurde zunächst für die Herstellung von Dispersionen und Emulsionen entwickelt, und die meisten biologischen Gewebe werden mit diesem Gerät schnell und gründlich homogenisiert¹⁴¹. Da es das Kernziel dieser Arbeit ist Zellen möglichst intakt zu halten und nicht zu schädigen, müssen die bestehenden Konzepte auf diese Anforderung angepasst werden. Der Zellaufschluss mit dem Rotor-Stator-Homogenisator erfolgt durch hydraulische und mechanische Scherung. Bei der mechanischen Dissoziation (Rotor-Stator) wird das Mahlwerk (Rotor) mit kleiner bis mittlerer Geschwindigkeit im Bereich kleiner 50 rpm durch die Flüssigkeit

und Gewebeprobe bewegt, wodurch Schneid- und Mahlkräfte entstehen, die die Zell-Zell Verbindungen in einen Gewebekomplex aufbrechen können, ohne die Einzelzellen in ihrer Integrität zu schädigen. Um ein solches Rotor-Stator Mahlwerk auszulegen und diesen in einen teilautomatisierten Laborprozess zu überführen sind verschiedene theoretische Überlegungen notwendig, die im folgenden Abschnitt behandelt werden.

Im folgenden Kapitel werden auf Grundlage dieser Anforderungen ein mechanisches Wirkorgan zur enzymfreien Gewinnung von Einzelzellen aus Gewebeproben entwickelt. Dieses Wirkorgan wird anschließend in ein teilautomatisiertes Gesamtsystem integriert und ein Prozessablauf erstellt.

5 Lösungskonzept für eine mechanische und enzymfreie Gewebedissoziation

Ein Rotor-Stator-Wirkorgan ist ein mechanisches Gerät, das verwendet werden kann, um eine Gewebedissoziation durchzuführen. Es besteht aus einem rotierenden Rotor und einem statischen Stator. Die Gewebedissoziation mittels Rotor-Stator beruht auf der Erzeugung von Mahl- und Scherkräften, indem die Probe zwischen zwei harten, gegeneinander gleitenden Oberflächen mechanisch beansprucht wird. Durch die Rotation des Rotors, wird das Gewebe durch eine Kombination aus Turbulenz und mechanischer Scherung, die in dem engen Mahlspace zwischen Rotor und Stator auftritt, dissoziiert. Diese Kraft kann durch die Wahl des Rotor-Stator-Abstands, der Rotationsgeschwindigkeit und der Form des Rotors und des Stators variiert werden. Rotor-Stator-Wirkorgane werden in der Biotechnologie, der Pharmazie und der Lebensmittelindustrie verwendet, um Gewebe zu zerkleinern, zu homogenisieren und zu dissoziieren. Es ist geeignet für die enzymfreie Gewebedissoziation, da es die Zellen mechanisch zerkleinert, anstatt auf chemische Zusätze oder Enzyme zurückgreifen zu müssen. Dies hat den Vorteil, dass es das Gewebe schonend behandelt und die Aktivität von Enzymen, die sich im Gewebe befinden, minimiert. Die Herausforderung bei der Verwendung eines Rotor-Stator ist das Gewebe aufzuschließen, ohne dabei die strukturelle Integrität und Viabilität der Zielzellen negativ zu beeinflussen. Hier beschreiben wir einen Ansatz, der durch die Mikrofabrikation von Schneid- und Mahlzähnen in einem rotierenden Scheibenformat ermöglicht wird.

Die Grundannahme hinter der Entwicklung der Gewebedissoziations-Technologie ist, dass mikrogefertigte gegenläufige Mahlkörper den Aufspaltungsprozess enzymfrei, schneller und gleichmäßiger durchführen können als herkömmliche Methoden, bei denen ein geschulter Techniker ein einzelnes Skalpell und Zellfilter verwendet oder ein enzymatischer Ansatz mit einem teilautomatisierten, auf dem Markt erhältlichen Gerät (siehe Kapitel 4). Bei dem zu entwickelten Rotor-Stator ist die wichtigste Komponente das mechanische Wirkorgan, das Schneid-Mahlwerk. Die Schneid- und Mahlwerkszähne besitzen eine flossenförmige Gestalt. Zu einer Seite hin laufen sie spitz zu, während die Ecken der anderen Seite abgerundet sind. So ist es möglich das Gewebe zu schneiden, wenn die spitzen Seiten zueinander zeigen, sowie das Gewebe zu Mahlen, wenn die stumpfen Seiten zueinander zeigen. Dieses Verhalten lässt sich über die Drehrichtung beeinflussen. Darüber hinaus wird dadurch das Probenmaterial effektiv in die zerkleinerungsaktiven Zonen zwischen den Mahlkörpern geleitet. Der Gewebeaufschluss an sich wird mittels zweier gegenläufiger Mahlwerke (Rotor und Stator) realisiert (Abbildung 6). Die Einsätze sind mit Schneid- und Mahlzähnen ausgestattet, welche so angeordnet sind, dass sie aneinander vorbei rotieren können ohne sich zu berühren. Dabei wird das Gewebe zwischen den beiden mit Schneidzähnen ausgestatteten Einsätzen durch die

Rotationsbewegung der Einsätze zueinander aufgeschlossen. Größere Gewebestücke werden direkt durch die Schneidzähne zerkleinert, während kleine Gewebefragmente durch differenzgeschwindigkeitsinduzierte Scherung weiter aufgeschlossen werden. Der Umschlag von einer laminaren zu einer turbulenten Grenzschicht lässt sich durch künstliche Hindernisse, sog. Strombrecher, erzwingen. Ein Strombrecher soll eine turbulente Strömung unterstützen, so dass eine bessere Durchmischung der Probe stattfindet.

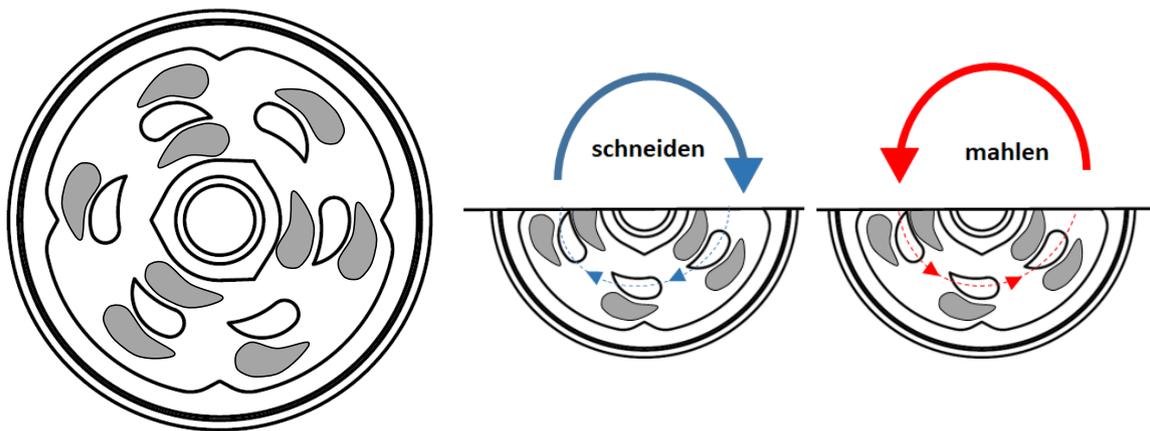


Abbildung 28: Schematische Darstellung der gegenläufigen Schneid- und Mahlzähne.¹⁴² Der Rotor wird über einen Motor in Rotation versetzt, während der Stator in Position gehalten wird. Durch die Bewegung der Zähne zueinander wird der Gewebeaufschluss erreicht.

5.1 Konzept zur Integration des mechanischen Wirkorgans in ein Standardlaborformat

Nach der konzeptionellen Auslegung des mechanischen Rotor-Stator Wirkorgans ist der nächste Schritt die Umsetzung der Systemstandardisierung für die Prozessintegration. Die modulare Integration ermöglicht es, spezialisierte Automatisierungseinheiten in vorhandene Laboreinrichtungen einzuführen, ohne den gesamten Arbeitsablauf umstrukturieren zu müssen. So kann beispielsweise ein Roboterarm mit präzisen Greifern nahtlos in den bestehenden Prozess integriert werden, um bestimmte Schritte effizienter auszuführen, wie zum Beispiel die genaue Platzierung von Proben oder Flüssigkeitsabgabe. Dadurch können Labore ihre Effizienz steigern und Arbeitsabläufe optimieren, ohne teure und komplexe Verarbeitungsgereäte anschaffen zu müssen. Ein Hauptvorteil der modularen Integration ist die Entkopplung der Laborautomatisierung von der hohen Investition für ein spezifisches Verarbeitungsgerät, was vermutlich die Markteintrittsbarriere und Akzeptanz im Nutzerumfeld im Vergleich zu anderen Plattformen senkt. Auf diese Weise können eine größere Anzahl von Forschern und Laboren von den Vorzügen der Automatisierung profitieren und ihre Arbeitsprozesse effizienter gestalten.¹⁴³ Daher wäre es vorteilhaft das Wirkorgan in ein Standardlaborformat zu integrieren, da Automatisierungssysteme am effektivsten arbeiten, wenn die Eingangsmaterialien oder Verbrauchsmaterialien standardisiert sind. Ein Beispiel für standardisierte Laborformate sind die

weitgehend standardisierten Außenmaße von Multiwell-Platten und von Zentrifugenröhrchen, die die Automatisierung von Mikroskopie- und Plattenleseverfahren und die Zentrifugation mit Standardlaborzentrifugen ermöglicht haben.¹⁴⁴ Eine sorgfältige Überprüfung der Kompatibilität der automatisierten Module mit den spezifischen Laborbedingungen und verwendeten Materialien ist unerlässlich, um eine reibungslose Funktionalität während der modularen Integration zu gewährleisten. Daher soll das Mahlwerk in ein Standardlaborformat, wie eine Multiwellplatte oder ein Zentrifugenröhrchen, integriert werden. In Tabelle 3 ist eine Bewertungsmatrix dargestellt, die verschiedene Kriterien für die Implementierung des Mahlwerks in ein Standardlaborformat enthält. Zur Bewertung stehen ein Zentrifugenröhrchen und eine Multiwellplatte zur Auswahl. Die Bewertungskriterien sind Spritzgusskompatibilität, Durchsatz, Sterilität, Benutzerfreundlichkeit, Potential zur Integration von weiteren Funktionalitäten neben der eigentlichen Gewebedissoziation und dem Automatisierungspotential.

- Die Spritzgusskompatibilität bezieht sich auf die Fähigkeit des Laborsystems, mit Spritzgusstechniken kompatibel zu sein, um standardisierte Proben oder Vorrichtungen herzustellen. Eine hohe Spritzgusskompatibilität ermöglicht die effiziente Herstellung von repräsentativen Proben oder Trägerstrukturen, die für die Untersuchungen mit dem Wirkorgan verwendet werden.
- Der Durchsatz bezieht sich auf die Menge der Proben, die das Laborsystem pro Zeiteinheit verarbeiten kann. Ein höherer Durchsatz bedeutet, dass das System effizienter arbeitet und eine größere Anzahl von Experimenten oder Analysen in kürzerer Zeit durchgeführt werden kann. Ein hoher Durchsatz ist besonders wichtig, wenn das Wirkorgan für groß angelegte Studien oder Hochdurchsatz-Screenings verwendet werden soll.
- Die Sterilität ist ein entscheidender Aspekt, wenn das Wirkorgan für medizinische oder pharmazeutische Anwendungen verwendet wird. Das Laborsystem sollte so konstruiert sein, dass es eine sterile Umgebung gewährleisten kann, um Kontaminationen zu vermeiden und zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.
- Die Benutzerfreundlichkeit beschreibt, wie einfach und intuitiv das Laborsystem zu bedienen ist. Ein benutzerfreundliches System reduziert die Einarbeitungszeit für das Personal und minimiert potenzielle Bedienfehler. Klare Anweisungen, gut gestaltete Benutzeroberflächen und automatisierte Prozesse tragen zur verbesserten Benutzerfreundlichkeit bei.
- Das Laborsystem sollte über das Potenzial verfügen, zusätzliche Funktionalitäten neben der eigentlichen Gewebedissoziation zu integrieren. Dies könnte die Integration von Aufreinigungs- oder Analyseeinheiten sein, die eine weiterführende Aufreinigung

und umfassendere Charakterisierung des Wirkorgans und der damit verbundenen Prozesse ermöglichen.

- Das Automatisierungspotenzial bezieht sich auf die Fähigkeit des Laborsystems, verschiedene Prozesse und Schritte automatisch auszuführen, ohne menschliches Eingreifen. Ein hohes Automatisierungspotenzial erhöht die Effizienz, verringert die Arbeitsbelastung des Personals und minimiert potenzielle Fehlerquellen.

Tabelle 6: Auswahl eines Standardlaborformats zur Integration des Mahlwerks anhand von festgelegten Bewertungskriterie.

Laborformat	Form	Spritzgusskompatibel	Durchsatz	Sterilität	User-friendly	Integration Funktionalitäten	Automatisierungspotential	Gesamt
Zentrifugenröhrchen (50ml)		+++	+	+++	+++	+++	++	+++
24-Multiwellplatte		-	++	+	-	-	+	+

+++ sehr hoch + moderat
 ++ hoch - niedrig

Die Bewertungsmatrix hat zum Ergebnis, das Zentrifugenröhrchen im 50 ml Format für die Mahlwerksintegration zu verwenden. Bei dem Zentrifugenröhrchen kann die Integration einer Filtereinheit als zusätzliche Funktionalität betrachtet werden. Dies führt zu einer unmittelbaren Aufreinigung der Zellsuspension direkt nach der Gewebedissoziation, was zu geringem Zeitaufwand und minimiertem Kontaminationsrisiko führt. Die Dimensionen dieser präzisionsgefertigten Komponente (Rotor und Stator) auf Basis eines 50 ml Zentrifugenröhrchens beträgt im Durchmesser 21,0 mm mit einem Probenvolumen bis hin zu 1,1 ml. Die Rotordrehzahl kann zwischen 0-120 U/min variieren. Der Mahlpalt zwischen den rotierenden Mahl- und Schneidezähnen hat einen definierten Abstand von 100 µm (Abbildung 29).

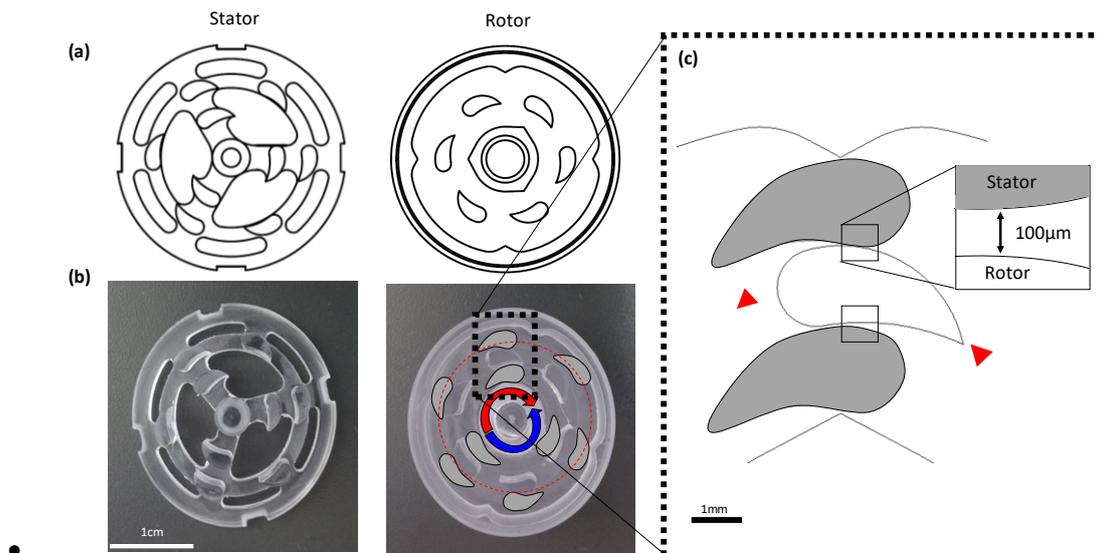


Abbildung 29: Schnid-Mahlwerk des Dissoziationssystems mit Darstellung des definierten Mahlspalts von 100µm. (a) Das Kernstück besteht aus einem Rotor- und einem Statoreinsatz, die mit gegenläufigen Mahlzähnen ausgestattet sind. (b) Abbildung der gefertigten Mahl- und Schneidwerkzeuge. (c) Schematische Darstellung der Abmessungen des Mahlspalts zwischen den Schneid- und Mahlzähnen.¹⁴⁵

Das Dissoziations-Röhrchen mit integriertem Mahlwerk und Filtereinheit für die enzymfreie Gewebedissoziation ist in Abbildung 30 schematisch dargestellt. Das Dissoziations-Röhrchen besteht aus einem Zentrifugenröhrchen mit Deckel, einem Zellfilter und dem Mahlwerk. Das Mahlwerk besteht aus zwei Teilen, die miteinander interagieren und das Gewebe mittels Schneid- und Mahlbewegungen aufschließen. Der obere Teil wird im Deckel des Zentrifugenröhrchens befestigt. Der Durchmesser des Loches im Deckel ist dabei genau abgestimmt auf die Abmessungen des Zapfens, der sich am oberen Teil des Rotors befindet. Dieser Zapfen dient als Adapter und Motorwelle zwischen Motorelementen und Dissoziationselementen. Der andere Teil des Mahl- und Schneidwerks wird im Sieb befestigt. Beim Zusammensetzen des Dissoziationsröhrchens fügen sich oberer und unterer Teil so bündig zusammen. Bei der Dissoziation wird nur der Rotor des Mahlwerkes bewegt, während der andere Teil, der Stator, unbeweglich bleibt.

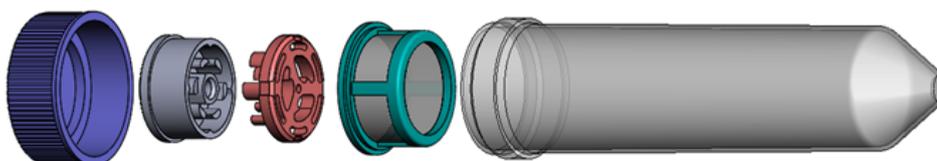


Abbildung 30: CAD-basierte Darstellung der Dissoziationsröhrchen mit den Kernkomponenten. Die CAD-Entwürfe aller Dissoziationskomponenten wurden so konstruiert, dass sie mit einer Spritzgussherstellung kompatibel sind.

Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, dass das Dissoziationsröhrchen als geschlossenes System konzipiert wurde. Die Filtration der generierten Einzelzellen kann innerhalb des Röhrchens im direkten Anschluss an die Dissoziation erfolgen, wodurch keine weiteren Pipettierschritte benötigt werden und das Kontaminationsrisiko auf ein Minimum herabgesetzt wird.

5.2 Das zerkleinerungsaktive Volumen im Rotor-Stator-System

Ein Rotor-Stator-System besteht aus einem sich bewegenden Rotor und einem feststehenden Stator. Zwischen beiden Teilen befindet sich ein schmaler Mahlspalt. Durch die rotierende Bewegung entstehen im Spalt hohe Scherraten auf engstem Raum. Die Simulation der Bewegung von Mahlkörpern bei laminaren Strömungsverhältnissen in Rührwerk-mühlen konnte zeigen, dass bei laminaren Strömungen die maximalen Scherraten im Fluid in der Nähe der Rührscheibe und an der Mahlraumwand auftreten.¹⁴⁶ Dieses Verhalten konnte auch durch eine Strömungssimulation des konzeptionellen Mahlwerks mit COMSOL™ gezeigt werden (Abbildung 31).

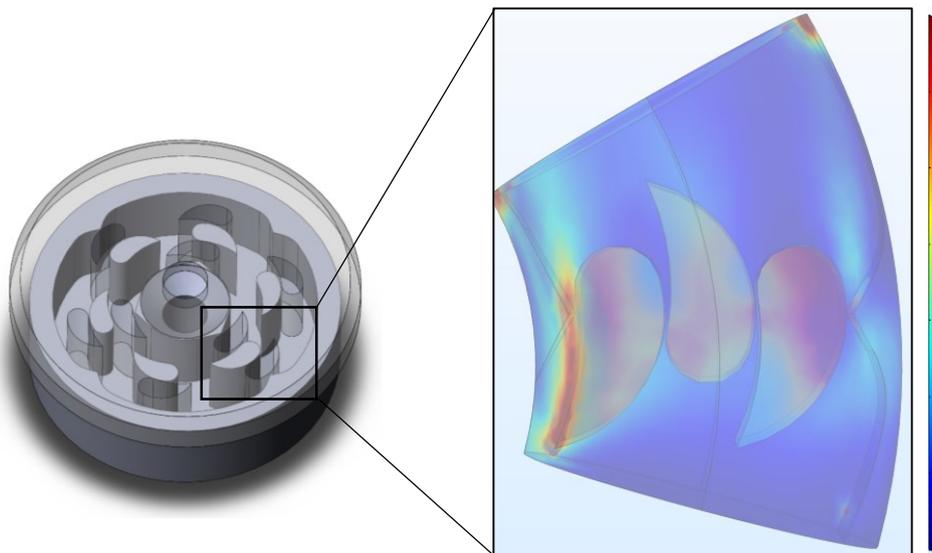


Abbildung 31: Qualitative Darstellung der relativen Scherkräfte (1/s) zwischen den Mahlzähnen und der Mahlraumwand bei einer laminaren Anströmung (1m/s). Simulation wurde mittels COMSOL Multiphysics® Software erstellt. Gelbrot stellen Bereiche mit erhöhten Scherkräften dar.

Die Zerkleinerung von Partikeln erfolgt durch mechanische Beanspruchungen zwischen den Mahlkörpern, sowie zwischen Mahlkörpern und Mahlraumwand.¹⁴⁷ Dieser räumliche Abschnitt in einem Stator-Rotor System wird als zerkleinerungsaktives Volumen bezeichnet. Um eine Zelle zu beanspruchen, muss sie zwischen zwei Mahlkörpern bzw. einem Mahlkörper und der Wand eingefangen werden (Abbildung 32).

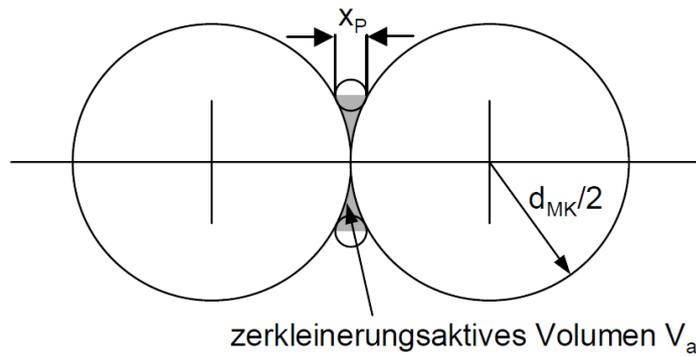


Abbildung 32: Darstellung des zerkleinerungsaktiven Volumens zwischen zwei Mahlkörpern.⁵⁰

Zwischen den Oberflächen der Mahlkörper können mehrere Zellen oder Zellagglomerate eingefangen werden, wobei jede dieser Zellen am Ende des Beanspruchungsprozesses Kontakt zu beiden Mahlkörpern hatte. Bei der Annäherung der Mahlkörper werden alle Zellverbände eingefangen und mit der gesamten zur Verfügung stehenden Energie (volumenbezogene Energie) beansprucht. Bei einem Mahlkörper-Gewebe-Mahlkörper-Kontakt kommt es also zu mehreren Einzelpartikelbeanspruchungen mit unterschiedlichen Beanspruchungsenergien.

Wie viele Zellverbände pro Mahlkörperkontakt eingefangen werden, hängt unter anderem von der Beladung des Mahlwerks und der Größe der Zielzellen, sowie der Größe und Anzahl der Mahlkörper im Mahlwerk ab. Eine Zielzelle mit dem Durchmesser x_P kann ausschließlich in einem aktiven Volumen zwischen zwei Mahlkörpern des Durchmessers d_{MK} beansprucht werden, in dem der Abstand zwischen den Mahlkörperoberflächen kleiner ist als der Partikeldurchmesser x_P . Für die Berechnung des zerkleinerungsaktiven Volumens zwischen zwei Mahlkörpern $V_{akt,MK}$ lässt sich folgende Gleichung (Herleitung der Gleichung siehe Abbildung 73 im Anhang) verwenden:

$$V_{akt,MK} = \pi \cdot \frac{x_P^2}{4} \cdot \left(d_{MK} + \frac{4}{3} \cdot x_P \right)$$

Formel 4: Formel zur Berechnung des zerkleinerungsaktiven Volumens.

Hinzu kommen noch Einflüsse durch die Anzahl der Zahnkränze und deren geometrischer Ausbildung. Das aktive Volumen des gesamten Mahlraums $V_{akt,MR}$ ist proportional dem Produkt aus aktivem Volumen $V_{akt,MK}$ und der Mahlkörperanzahl n_{MK} .

$$V_{akt,MR} \propto n_{MK} \cdot V_{akt,MK}$$

Formel 5: Berechnung des gesamten zerkleinerungsaktiven Volumens des Mahlraums.¹⁴⁸

Ein weiterer bedeutender Faktor zur Beschreibung der Effizienz einer Gewebedissoziation unter Verwendung einer bestimmten Mahl- und Schneidwerksgeometrie ist der zerkleinerungs-

aktive Durchmesser. Der Durchmesser des zerkleinerungsaktiven Volumens hängt vom Mahlkugeldurchmesser d_{MK} , der Zielzellgröße x und vom Abstand der Mahlkörper bzw. von Mahlkörper und Mahlwerkswand a ab.

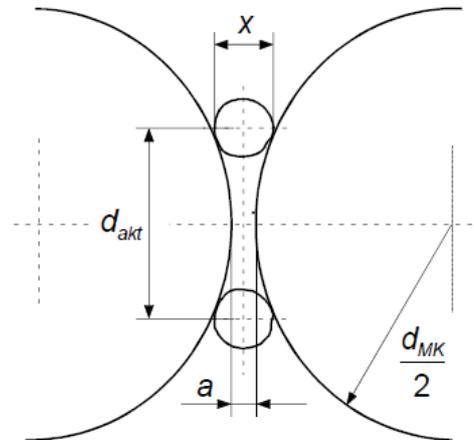


Abbildung 33: Darstellung des zerkleinerungsaktiven Durchmessers zwischen zwei Mahlkörpern.

In erster Linie bezieht sich diese Formel auf einen kugelförmigen Mahlkörper. Nach Abbildung 33 ergibt sich der Durchmesser des zerkleinerungsaktiven Volumens für zwei Mahlkörper nach Formel 6.

$$d_{akt} = \sqrt{2 \cdot d_{MK} \cdot (x-a) + x^2 - a^2}$$

Formel 6: Berechnung des Durchmessers des zerkleinerungsaktiven Volumens zwischen zwei Mahlkörpern.¹⁴⁹

In dem der d_{MK} graduell vergrößert wird, können auch unterschiedliche Geometrien von Mahlkörpern mit dieser Formel abgebildet werden und damit den zerkleinerungsaktiven Durchmesser näherungsweise für eine flossenförmige Geometrie berechnet werden (Abbildung 34).

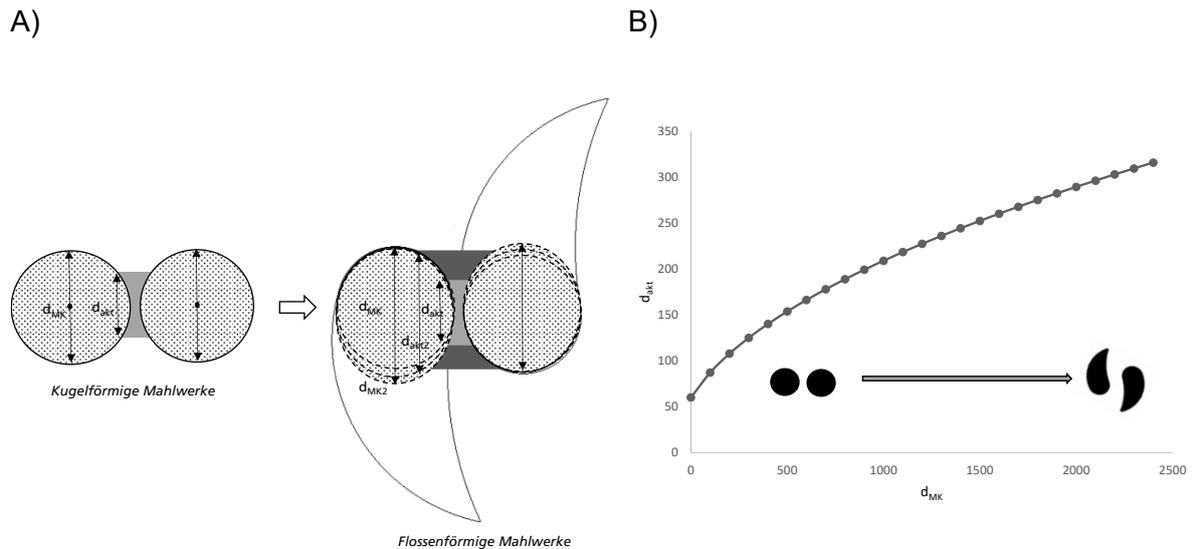


Abbildung 34: Berechnung des zerkleinerungsaktiven Durchmessers für verschiedene Schneid- und Mahlzahngeometrien am Beispiel von kugelförmigen und flossenförmigen Mahlwerksgeometrien. A) Schematische Darstellung der d_{MK} Veränderung bei unterschiedlichen Mahlwerksgeometrien. B) Graphische Auswertung der Veränderung des zerkleinerungsaktiven Durchmessers bei gradueller Änderung des Mahlkörperdurchmessers.

Die Kennwerte, die auf das zerkleinerungsaktive Volumen und den Durchmesser Bezug nehmen, definieren den verfügbaren Raum, der für die Übertragung der Energie in das Probenmaterial zur Verfügung steht. Diese Kennwerte könnten als Parameter für die Gestaltung und Optimierung eines Dissoziationsprozesses genutzt werden. Die zu erzielende Zielzellgröße lässt sich somit näherungsweise über eine Einstellung der aktiven Volumina und Durchmesser, sowie Mahlkörperabstand und -größe variieren. Die Anzahl der Zahnkränze wirken sich dabei auf das Mahlergebnis aus.

5.3 Auslegung der Mahlwerksdimensionen im Rotor-Stator-System

Ausgehend von den ausgewählten flossenförmigen Mahlzähnen sind unterschiedliche Mahlgrößendurchmesser in Bezug auf das zur Verfügung stehende Mahlraumvolumen denkbar. Das zur Verfügung stehende Mahlraumvolumen soll mit mehreren Mahl-Schneid-Werkzeugen bestückt werden, die freilaufend -auch in gegenläufiger Richtung- aneinander vorbei gleiten können. Infolgedessen ergeben sich in Verbindung mit den gegenläufig rotierenden Schneid- und Mahlwerkszähnen günstige Probeneinzugsbedingungen der Gewebeproben in die zerkleinerungsaktiven Zonen. Die Auslegung der Dimensionen für das Mahl- und Schneidwerk sind direkt abhängig von den Dimensionen des 50 ml Zentrifugenröhrchens. Daraus ergeben sich für den Innendurchmesser des Mahlwerks ein zur Verfügung stehender Durchmesser von 21,0 mm und ein Gesamtvolumen, ohne Berücksichtigung der flossenförmigen Schneid- und Mahlwerkszähnen von 1175,9 mm³. Zur Dimensionsauslegung des Mahlwerks wurden fol-

gende Annahmen getroffen und festgelegt. Zwischen den gegenläufigen Zahnreihen entstehen Mahlzonen, in welchen die Gewebedissoziation vorwiegend stattfindet. Diese Mahlzonen haben einen definierten Abstand, den sogenannten Mahlpalt, von $100\ \mu\text{m}$ zwischen den Schneid- und Mahlzähnen und den Schneid- und Mahlzähnen zu den Strombrechern am inneren und äußeren Rand des Mahlwerks. Die $100\ \mu\text{m}$ Abstand ergeben sich daraus, dass innerhalb dieser Größenordnung theoretisch alle bekannten Zelltypen in Abhängigkeit ihres in der Literatur beschriebenen Zelldurchmessers (Tabelle 7) durch den Mahlpalt hindurchgleiten können -unter Berücksichtigung der Elastizität von eukaryotischen Zellen- ohne in ihrer zellulären Integrität geschädigt zu werden.

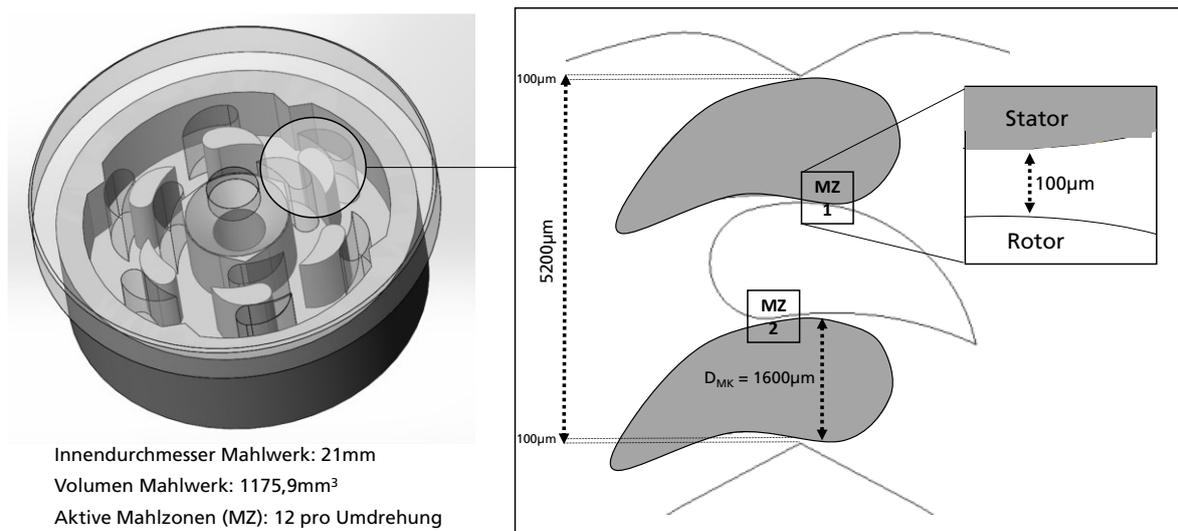


Abbildung 35: Dimensionsauslegung des Mahlwerks, Mahlpalts und der Mahlzähne.

Zusätzlich ist die Dimension des Mahlpalts noch mit einem Sicherheitsfaktor von 20% beaufschlagt, da mit einer geringfügigen Abweichung von den Sollmaßen bei dem Herstellungsprozess zu rechnen ist. Nachdem die Abmaße des Mahlpalts definiert wurden, können die Dimensionen der Mahlkörper (MK) festgelegt werden. An der breitesten Stelle haben die flossenförmigen Mahlkörper einen Mahlkörperdurchmesser (D_{MK}) von $1600\ \mu\text{m}$. In dem gesamten Mahlkörpervolumen können insgesamt 6 Mahl- und Schneidzähne im Rotor und 9 Mahl- und Schneidzähne im Stator angeordnet werden. Dadurch ergeben sich pro vollständiger Umdrehung des Rotors 12 Mahlzonen (Formel 5). Aus dieser Dimensionsauslegung des Mahlraums können im nächsten Schritt die Kennwerte des zerkleinerungsaktiven Volumens und des zerkleinerungsaktiven Durchmessers berechnet werden.

5.4 Berechnung des zerkleinerungsaktiven Volumens und Durchmessers im Rotor-Stator-System

Das Volumen, in dem Zellverbände von Gewebeproben eingefangen und beansprucht werden können, wird als zerkleinerungsaktives Volumen bezeichnet. Wie in Abschnitt 5.2 kann das zerkleinerungsaktive Volumen durch Formel 4 berechnet werden. Auf Basis dieser Formel kann das zerkleinerungsaktive Volumen in Abhängigkeit des Zielzelldurchmessers x_p in einer Mahlzone berechnet werden. In Abbildung 36 wurden beispielhaft die zerkleinerungsaktiven Volumina einer Mahlzone für die Mahlkörperdurchmesser von 800 μm , 1600 μm und 2400 μm für einen Zielzelldurchmesser von 0-120 μm berechnet.

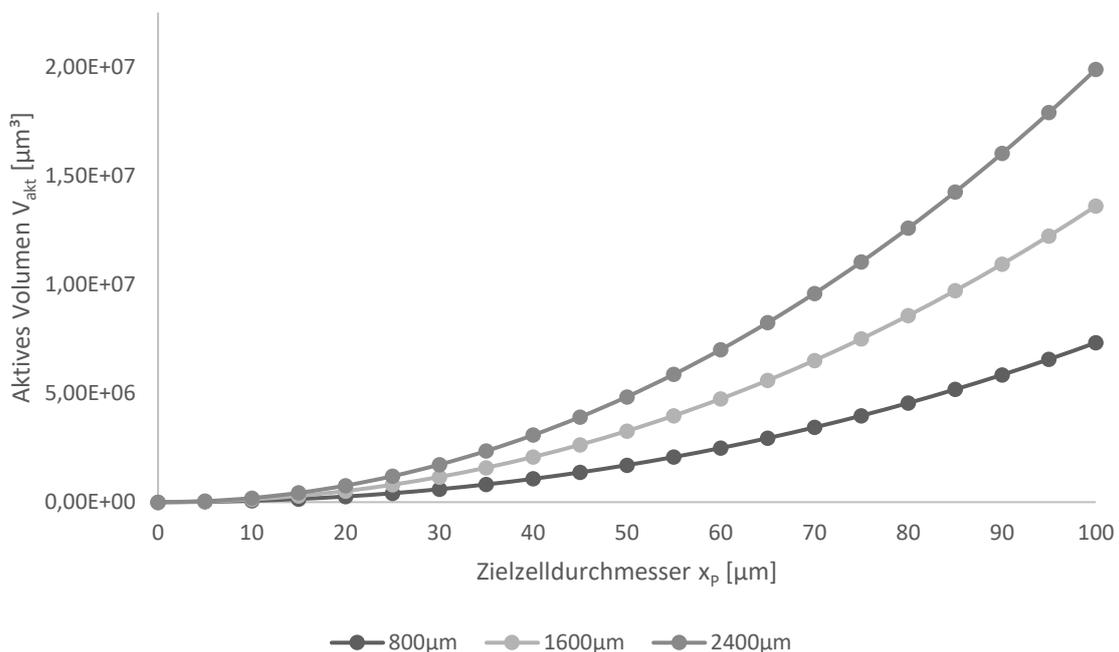


Abbildung 36: Berechnung des aktiven Volumens in Abhängigkeit vom Zielzelldurchmesser x_p .

Die Auslegung der Dimensionen in Abhängigkeit des Mahlspaltes von 100 μm hat einen optimalen Mahlkörperdurchmesser von 1600 μm ergeben. In Tabelle 7 ist eine Übersicht über die aktiven Volumina für einen Mahlkörperdurchmesser von 1600 μm , die für die Beanspruchung von spezifischen Zielzellgrößen theoretisch zur Verfügung steht. Aus diesen aktiven Volumina kann im nächsten Schritt berechnet werden, wie viele Zellen von einem bestimmten Zelltyp im Mahlspalt beansprucht werden könnten. Tabelle 7 verdeutlicht, dass das aktive Volumen bei einem D_{MK} von 1600 μm ausreichend ist, um für jeden Zelltyp im Bereich von 1-100 μm mindestens eine Zielzelle beanspruchen zu können. Diese theoretischen Annahmen basieren auf einem vereinfachten Gewebemodell, das lediglich einen einzigen Zelltyp umfasst.

Tabelle 7: Übersicht der Zellvolumina und Zellgrößen der zu beanspruchten Zelltypen im Bereich bis zu 100 μm Zelldurchmesser.¹⁵⁰

Zelltyp	Zellvolumen [μm^3]	Zielzellgröße [μm]	Aktives Volumen $d_{\text{mk}}=1600 \mu\text{m}$ [μm^3]	Anzahl beanspruchte Zellen im aktiven Volumen [-]
rote Blutkörperchen	100	6,0	45442,1	454,4
Lymphozyt	130	11,0	153369,1	1179,8
Neutrophile	300	8,4	89243,7	297,5
Betazelle	1000	9,1	105492,8	105,5
Enterozyt	1400	12,0	182672,6	130,5
Fibroblast	2000	18,0	413048,2	206,5
Hela	3000	17,0	368126,3	122,7
Har-Zelle (Ohr)	4000	19,0	460595,1	115,1
Osteoblast	4000	20,0	510773,3	127,7
Alveolarmakrophage	5000	21,2	574469,4	114,9
Hepatozyt	7000	40,0	2076586,7	296,7
Kardiomyozyt	15000	25,0	801354,2	53,4
Megakaryozyt	30000	50,0	3270833,3	109,0
Fettzelle	600000	100,0	13606666,7	22,7

Auf Grundlage dieser Daten kann berechnet werden, wie viele Durchgänge der Gewebeprobe notwendig sind, um jede Zielzelle in der Probe zu beanspruchen und damit aus der umliegenden Gewebematrix zu lösen. In einer Lebergewebeprobe von 150 mg ist theoretisch eine Gesamtzellzahl von $1,50\text{E}+06$ enthalten (unter der Annahme von einer Gesamtzellkonzentration laut Literatur von $1,0\text{E}+07$ Zellen/g).¹⁵¹ Ausgehend von einer Hepatozytenanzahl in der Leber von 60-70 %, ergeben sich eine Anzahl von $9,0\text{E}+05$ Hepatozyten in der betrachteten Lebergewebeprobe. Bei einer Beanspruchung von 296 Hepatozyten pro zerkleinerungsaktivem Volumen und bei 12 vorhanden Mahlzonen (siehe Abschnitt 5.3) würde es ca. 253 Mahlzonendurchgänge benötigen, um theoretisch jeden Hepatozyten zu beanspruchen. Diese 253 Mahlzonendurchgänge würde, bei einer angenommenen Umdrehungsgeschwindigkeit von 10 rpm und einer Prozessdauer von 96 s, nach insgesamt 20 Umdrehungen des Rotors pro Dissoziationsprotokoll erfolgt sein. Dieses Protokoll wurde in einem Vorversuch durchgeführt. Es konnten mit dem oben beschriebenen Protokoll eine Dissoziationseffizienz von >90 % erreicht und eine Gesamtzahl von $6,65\text{E}+06$ Zellen/mg mit einer Hepatozyten Ausbeute von $1,73\text{E}+06$ Zellen/mg erzielt werden. Daher können die theoretische Auslegung als valide und sinnvoll für die weitere Dissoziationsprotokollauslegung angesehen werden. Eine ausführliche Versuchsbeschreibung ist in Abschnitt 6.1.4 zu finden.

Die Anzahl der beanspruchten Zellen im zerkleinerungsaktiven Volumen können als Grundlage für weitere Prozessparameter, wie Beanspruchungsdauer der Gewebeprobe und der Dissoziationseffizienz, dienen. Gerade wenn es sich um die Etablierung eines neuen Dissoziationsprotokolls für ein nicht getestetes Gewebe handelt. Jedoch gibt es hierbei einige Limitationen zu beachten. Gewebeproben sind sehr komplexe Gebilde, welche sehr selten aus nur einem Zelltyp aufgebaut sind und besitzen unterschiedliche mechanische Eigenschaften. Des Weiteren wird in diesem Modell die dynamische Gewebedissoziation während des Prozesses nicht berücksichtigt. Die Kapazität des Rotor-Stators sollte auf die Viskosität und das Volumen des Mediums sowie auf die Art und Menge des zu verarbeitenden Gewebes abgestimmt sein. Die Größe der Probe muss vor der Verarbeitung mit dem Rotor-Stator-System klein genug sein, um in den Stator gezogen zu werden. Daher müssen die Proben oft vorzerkleinert, geschnitten oder vorfragmentiert werden.

Neben der Berechnung des zerkleinerungsaktiven Volumens, kann die Berechnung des zerkleinerungsaktiven Durchmessers durchgeführt werden. Der Durchmesser des zerkleinerungsaktiven Volumens hängt vom Mahlwerksdurchmesser d_{MK} , der Zellgröße x und vom Abstand der Mahlwerke voneinander ab. Dieser Zusammenhang wird mittels Formel 6 ausgedrückt.

Mit dieser Formel konnte das Mahlwerk theoretisch auf einen zerkleinerungsaktiven Durchmesser d_{akt} von 365,51 μm ausgelegt werden. Dieser entspricht weitestgehend dem real gemessenen Wert von 360 μm mit einer Abweichung von 5,51 μm an dem gefertigten Mahlwerkprototyp. Die geringe Abweichung spricht dafür, dass anhand dieses Parameters eine Optimierung und Kennzahl für den Vergleich von verschiedenen Geometrien von Mahlwerksköpfen vorliegt. Da in der vorliegenden Arbeit nur eine Geometrie (weitere Mahlwerksgeometrien konnten aufgrund der Herstellungskosten nicht realisiert werden) untersucht wird, findet dieser Kennwert für die weitere Beurteilung des enzymfreien und teilautomatisierten Dissoziationsprozesses keine weitere Anwendung.

5.5 Schneiden und Mahlen im Rotor-Stator-System mittels Rotationsrichtungswechsel

Zur weiteren Charakterisierung des Dissoziationsprozesses, insbesondere der Bewertung der Annahme, dass durch die Änderung der Rotationsrichtung verschiedene Kräfte in die Gewebeprobe eingebracht werden können, wurde das auf die Motorwelle aufgebrachte Drehmoment gemessen. Die Drehmomentdaten geben Aufschluss über die Reibungs- und Scherkräfte, die während der Verarbeitung auf das Material einwirken sowie über die Energie, die zum Drehen des Rotors im Mahlwerk benötigt wird. Während dem Prozess wird dem Proben-

material Energie zugeführt, die für die Gewebedissoziation erforderlich ist. Aufgrund des hohen Anteils am Gesamtenergieeintrag wird daher die spezifisch mechanische Energie (SME) als Maß für den Energiebedarf der Dissoziation angesetzt. Die spezifische mechanische Energie ist ein Rechenwert, der aussagt wie viel mechanische Energie in die Gewebeprobe eingetragen wird und somit die Produktcharakteristik und den Dissoziationsprozess beeinflusst. Der SME lässt sich aus der Leistungsaufnahme und dem benötigten Drehmoment des Motors berechnen. Zur Berechnung der spezifischen mechanischen Energie, einem skalenunabhängigen Maß für die während des Dissoziationsprozesses in das System eingebrachte Energie, wurde die folgende Formel verwendet:

$$SME = \frac{ML_{Max} \times \text{Motorauslastung} \times E_G \times \left(\frac{UPM_{Ver}}{UPM_{Maximal}} \right)}{\text{Beladung}}$$

Formel 7: Berechnung der spezifischen mechanischen Energie (SME) in [kWh/kg]; Getriebeeffizienz E_G ; Maximale Motorleistung ML_{Max} in [kW]; verwendete Drehzahl in [min^{-1}]; maximal mögliche Drehzahl $UPM_{Maximal}$ in [min^{-1}]; Beladung in [kg]; Motorauslastung in [%].¹⁵²

Aus der Gleichung wird ersichtlich, dass die spezifische mechanische Energie, die in das Material eingebracht wird, hauptsächlich von zwei Größen abhängt: zum einen von der Drehzahl und zum anderen von der Beladung des Mahlwerks pro Dissoziation. Langsame Drehzahlen bei hohem Durchsatz bedeuten bei gleichbleibender Motorauslastung einen niedrigeren Energieeintrag in das Probenmaterial als hohe Drehzahlen mit geringer Beladung. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Erhöhung der Drehzahl bei gleicher Beladung die Aufschlussrate steigert. Jedoch führt dies zu intensiveren Scherbeanspruchungen und einer erhöhten thermischen Belastung der Gewebeprobe. Eine Erhöhung der Drehzahl kann daher nicht unbegrenzt erfolgen. In einem realen Dissoziationsprozess werden die Gewebeprobe unterschiedlich oft mit verschiedenen großen Energien beansprucht. Bei der Zerkleinerung in Rührwerkskugelmöhlen wird nur ein Teil der in den Mahlraum eingetragenen Energie zur Beanspruchung der Mahlgutpartikeln genutzt. Ein Großteil dieser Energie wird z. B. durch Reibungsvorgänge an der Mahlraumwand, durch die Fluidverdrängung zwischen sich annähernden Mahlkörpern, durch Verformung und Verschleiß von Mahlkörpern oder durch Mahlkörperkontakte ohne Beanspruchung von Mahlgutpartikeln dissipiert. Die tatsächliche Energie, mit der eine Gewebeprobe während eines Zerkleinerungsprozesses beansprucht wird, ist messtechnisch nicht erfassbar. Sie hängt unter anderem von den in verschiedenen Zonen der Mühle vorherrschenden Beanspruchungsmechanismen ab. Daher wurde eine Methode zur indirekten Erfassung der eingebrachten Energie während des Dissoziationsprozesses getestet.

Diese Methode basiert auf einem integrierten Drehmomentsensor, der während des Dissoziationsprozesses kontinuierlich Informationen über die Integrität der Gewebestruktur liefert. Hierzu wurden die relevanten Komponenten des Gewebedissoziators auf einem optischen

Steckbrett befestigt. Der Motor sitzt am Boden. Zwischen dem Lager des Motors und dem Lager des Drehmomentsensors ist eine Kupplung installiert. Der Drehmomentsensor ist an einer Kunststoffplatte angeschraubt, die als Stützwand dienen soll, um mögliche Aufschubbewegung zu vermeiden. Eine zweite Kupplung sorgt für die Verbindung zwischen dem Lager des Drehmomentsensors und einem Adapter, worauf das Dissoziationsröhrchen aufgesteckt wird. Der Testaufbau in Abbildung 37 mit integriertem Drehmomentsensor soll helfen, die Größenverhältnisse der auftretenden Kräfte zu bestimmen, die bei den verschiedenen Mahl- und Schneidvorgängen während dem Dissoziationsprozess auftreten.

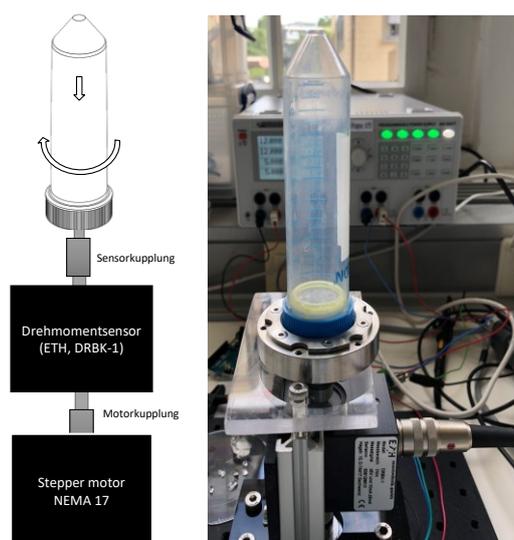


Abbildung 37: Versuchsaufbau zur Bestimmung des Drehmoments während des Dissoziationsprozesses.

Zunächst wurden Referenzmessungen durchgeführt, um eventuelle Abweichungen der beladenen Dissoziationsröhrchen festzustellen und um somit einen konkreten Vergleich zu darauffolgenden Messungen zu erhalten. Das Mahlwerk weist eine Vielzahl von Mahlzonen auf (siehe Abschnitt 5.3). Jede von ihnen hat die Möglichkeit, mit jeder Umdrehung das Gewebe zu dissoziieren. Dieser Vorgang wiederholt sich fortwährend. Mit fortschreitender Dissoziation sinkt die strukturelle Integrität der Gewebeprobe und damit einhergehend ist eine Reduktion der Widerstandskraft messbar. Diese Änderung der Kraft wird anhand des Drehmomentsensors wiedergeben und aufgezeichnet. Zur systematischen Untersuchung dieser Vorgänge während des Mahlprozesses wurde ein Versuchsplan erstellt, um das Drehmoment bzw. den SME mit unterschiedlichen Prozessparametern (in Abhängigkeit von Umdrehungsgeschwindigkeit und Beladungszustand der Mahlwerke) zu ermitteln (Abbildung 38). Für die Durchführung der Experimente wurde ballistische Gelatine (Clear Ballistics LLC, 608729261421) eingesetzt, um die mechanischen Eigenschaften des menschlichen Gewebes annäherungsweise zu simulieren und um reproduzierbare Versuchsbedingungen für die sensitive Messung des Drehmomentsensors zu gewährleisten.

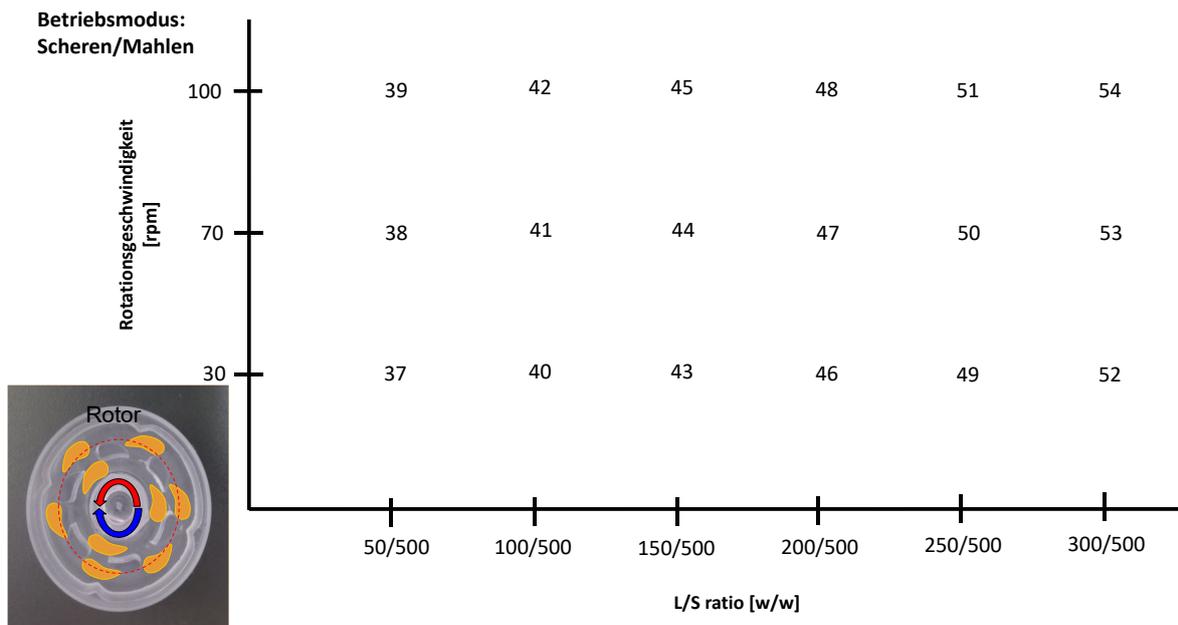


Abbildung 38: Arbeitsmatrix der Versuchsanordnung für die Drehmomentmessung am Beispiel Betriebsmodus: Scheren/Mahlen. Hierbei wurden in Zeitintervallen von 10 s die Rotationsrichtung gewechselt. Es wurde eine analoge Arbeitsmatrix für die Betriebsmodi: Mahlung und Scheren erstellt (siehe Anhang). Nr. 37-54 stellen jeweils eine Versuchsdurchführung dar. L/S ratio stellt das Verhältnis von Flüssigkeit (PBS in mg) zur festen Probe (ballistische Gelatine in mg) dar.

In Abbildung 39 sind die Ergebnisse der systematischen Dissoziationsversuche mit den gemessenen Drehmomentwerten und den daraus berechneten SME aufgetragen. Negative Drehmomentwerte sind durch einen Umdrehungswechsel der Rotationsrichtung des Stators zum Mahl-Modus begründet. Zu erkennen ist, dass das Drehmoment bei Drehzahlerhöhung bei allen Versuchsreihen steigt. Bei der Versuchsdurchführung mit einem frequenten Rotationsmodus (Scheren/Mahlen) wurden die größten Drehmomente bei maximaler Beladung des Mahlwerks (300/500 L/S) erzeugt. Ein hoher Beladungszustand erhöhte die Belastung der Mahlzähne, aber eine niedrige Umdrehungszahl führte zu einer geringen Dissoziationsleistung. Bei niedrigen Umdrehungszahlen war der Einfluss der verschiedenen Parameter auf das Drehmoment deutlicher zu erkennen. Wurde hingegen die Umdrehungszahl erhöht oder das L/S-Verhältnis verringert, sank das Drehmomentniveau. Mit der Formel 7 können die gemessenen Drehmomentwerte in einen spezifischen mechanischen Energieeintrag überführt werden. Hierdurch wird ein Kennwert für den Energieeintrag in eine Gewebedissoziation erzeugt, der auch für unterschiedlich verwendete Motoren herangezogen werden kann.

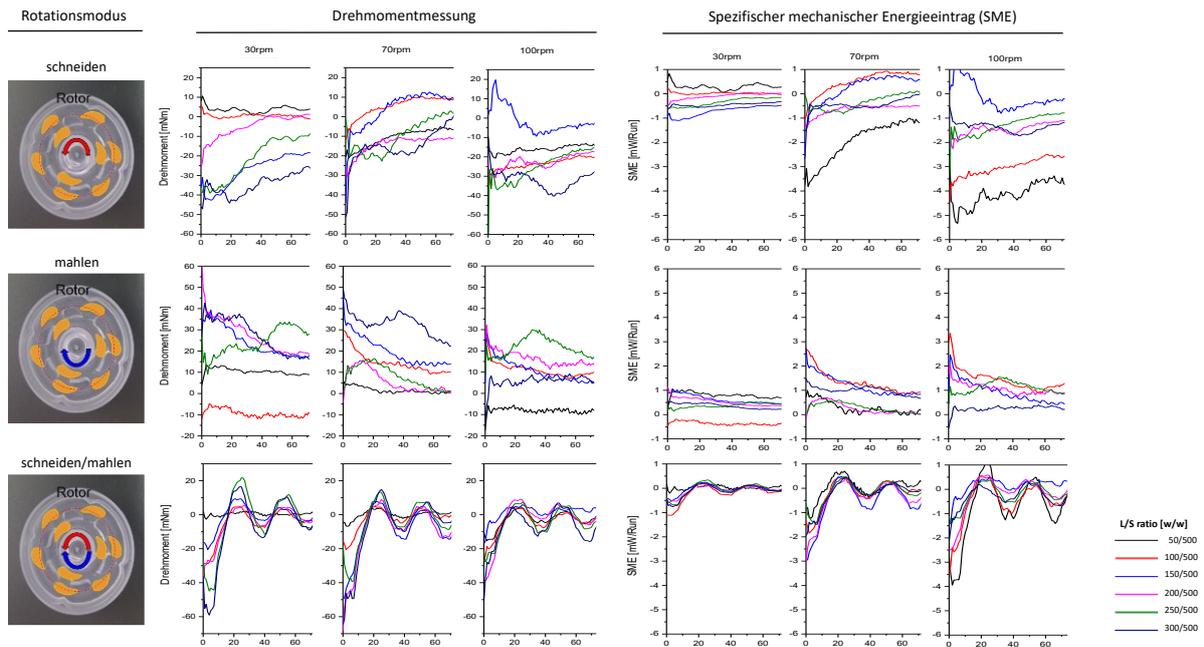


Abbildung 39: Bestimmung des Drehmoments und der spezifischen mechanischen Energie bei unterschiedlichen Rotationsmodi und in Abhängigkeit unterschiedlicher Rotationsgeschwindigkeiten und Beladungszuständen im Zeitfenster von 0-60 s.

Bei Voraussetzung eines konstanten spezifischen Energieeintrags muss bei einer Erhöhung der Drehzahl die Beanspruchungszahl sinken. Da durch die Erhöhung der Drehzahl auch die Anzahl der Beanspruchungsvorgänge pro Zeiteinheit zunimmt, ist dies nur durch eine Verkürzung der Versuchsdauer möglich.¹⁵³ Als Annäherung kann angenommen werden: Je höher die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Zellverbund auf eine Mahlzone trifft, umso besser ist das Dissoziationsergebnis. Unter diesem Aspekt ist es nachvollziehbar, dass sich bei Zellsuspensionen mit zusätzlichen Produktdurchgängen, zum Beispiel in Zellhomogenisatoren, das Aufschlussresultat merklich verbessern lässt. Die Fortschritte pro Passage und bei Drehrichtungsänderungen zwischen Schneiden und Mahlen sind deutlich messbar. Sie werden jedoch beim jeweils nachfolgenden Durchgang immer kleiner und nähern sich asymptotisch einem Grenzwert an. Hierbei liegt es am ausführenden Nutzer, festzulegen, welche Anzahl von Passagen unter wirtschaftlichem bzw. produktspezifischem Aspekt vertretbar sind. Durch die geschlossene Konfiguration des Gewebedissoziators und sequentiellen Drehrichtungsänderungen des Rotors, wird das Produkt wiederholt umgewälzt und effizient dissoziiert. Das Verfahren ist schnell, und je nach Elastizität der Gewebeprobe werden die gewünschten Ergebnisse in der Regel in 60-180 Sekunden erzielt (vollständige Messkurven des Drehmoments und SME im Anhang unter Abbildung 74 zu finden). Für die Gewinnung von Einzelzellen aus verschiedenen Gewebetypen mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften werden anpassbare Zeitintervalle und Geschwindigkeiten des Rotors verwendet und die Rotordrehzahl und Rotordrehrich-

tung entsprechend angepasst. Für Versuche mit klinischen Gewebeproben konnte der vorliegende Drehmomentsensor nicht eingesetzt werden, da die Messsensitivität des Sensors für die relevanten Gewebeproben nicht ausreichend war, um den Dissoziationsfortschritt über der Zeit zu erfassen. Nichtsdestotrotz stellt die Bestimmung des SME einen wichtigen Parameter dar, um die Basis für eine gewebespezifische Protokollentwicklung zu legen.

5.6 Materialauswahl

Das Material der Einwegkomponenten, die bei der Probenverarbeitung für die Einzelzellanalyse, insbesondere in der Einzelzellsequenzierung, verwendet werden, ist ein wichtiger Aspekt, der oft vernachlässigt wird. Bedingt durch mechanische Grenzen wie Festigkeit und strömungstechnische Restriktionen, wie Kavitation können in einem Dissoziationsgerät nicht unendlich viele Dissoziationszonen mit unendlich hoher Umfangsgeschwindigkeit untergebracht werden. Hinzu kommen zusätzliche unerwünschte Nebeneffekte wie z.B. Materialabrieb, die für den Einsatz in einer hochregulierten GMP-Produktion nicht vernachlässigbar sind. Durch diese Einschränkungen sind die mit Rotor-Stator-Systemen einsetzbare Materialien nicht beliebig wählbar. Die Rotor- und Statoreinsätze wurden aus Polycarbonat (PC) hergestellt, um die Anforderungen an die chemische und mechanische Stabilität sowie die Kostenanforderungen für ein Einwegprodukt zu erfüllen. Des Weiteren kommt hinzu, dass bei dem Durchlauf durch den Mahlpalt ein großer Teil der eingetragenen Energie in Form von Wärme freigesetzt wird. Somit kann auch eine Temperaturobergrenze die Anzahl der möglichen Passagen beschränken.

5.7 Temperaturentwicklung

Um eine mögliche Schädigung der Zellsuspension durch Temperaturerhöhung zu betrachten, kann diese näherungsweise berechnet verwendet werden. Hierzu wird die Formel für die spezifische Wärmekapazität verwendet, um die Erwärmung der Suspension durch den Energieeintrag des Gewebedissoziators zu berechnen.

$$\Delta Q [J] = m[kg] \cdot c \left[\frac{J}{kg \cdot K} \right] \cdot \Delta T [K]$$

Formel 8: Formel für die spezifische Wärmekapazität. ΔQ = Änderung der Wärmeenergie, m =Masse des zu erwärmenden Materials; c = spezifische Wärmekapazität, ΔT = Temperaturänderung.

Die Berechnung erfolgt mittels einiger vereinfachender Annahmen. Die an der Spannungsquelle gemessene Leistungsaufnahme des Motors beträgt $P=1,7$ Watt bei 120 U/min. Diese Leistung wird dem Wärmeenergieeintrag gleichgesetzt, obwohl in Wirklichkeit der Wärmeeintrag niedriger anzusiedeln ist. Zudem wird vereinfachend für die Zellsuspension die von Wärmekapazität und Dichte von reinem Wasser angenommen. Die Masse wird für 500 μ L Zellsuspension somit mit 0,5 g angegeben.

Bei einer Aufschlussdauer von 2 min ergibt sich ΔQ zu:

$$\Delta Q = P \cdot t = 1,7W \cdot 2 \text{ min} = 1,7 \frac{J}{s} \cdot 120s = 204 J$$

Es ergibt sich mit $m=0,0005 \text{ kg}$; $\Delta Q=204 \text{ J}$; $c= 4190 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$:

$$\Delta T [K] = \frac{\Delta Q [J]}{m[\text{kg}] \cdot c \left[\frac{J}{\text{kg} \cdot K} \right]} = \frac{204 J}{0,0005 \text{ kg} \cdot 4190 \frac{J}{\text{kg} \cdot K}} = 2,095 K = 2,095 ^\circ C$$

Selbst unter der idealistischen Annahme einer vollständigen Umwandlung der aufgenommenen Leistung des Gewebedissoziators in eine Erwärmung der Zellsuspension, ergibt sich eine maximale Temperaturerhöhung von etwa $2 \text{ }^\circ\text{C}$ innerhalb der Dissoziationsdauer. Eine Schädigung durch eine stark steigende Temperatur bei zunehmenden Umdrehungszahlen erscheint somit unwahrscheinlich. Diese theoretischen Annahmen, konnte experimentell durch einen Versuchsaufbau mit einer Wärmebildkamera (Wärmebildkamera FLIR, Teledyne) bestätigt werden. Hierbei wurden Gewebeprobe mit unterschiedlichen Dissoziationsprotokollen prozessiert. Die Temperaturentwicklung wurde während der Dissoziation mit einer Wärmebildkamera aufgezeichnet. Die Temperaturentwicklung nach 10 s, 60 s und 100 s sind in Abbildung 40 dargestellt. Es konnte bei keinem Dissoziationsprotokoll eine Temperaturerhöhung von über $2 \text{ }^\circ\text{C}$ festgestellt werden.

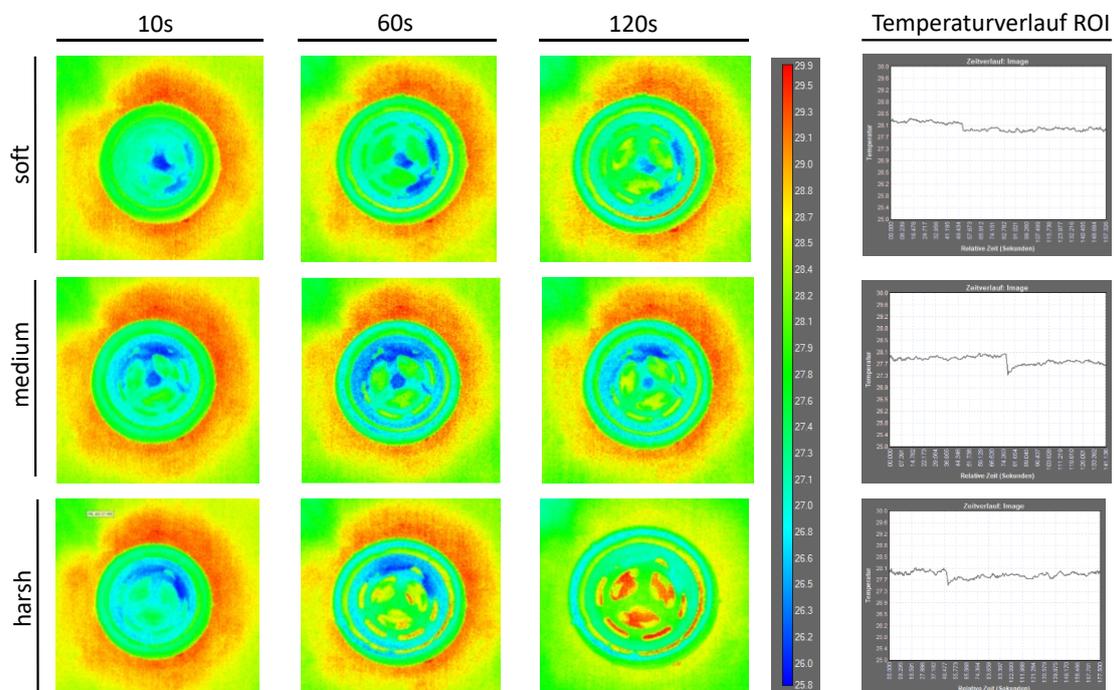


Abbildung 40: Temperaturmessung mittels Wärmebildkamera (Wärmebildkamera FLIR IR 320x256 px, 60Hz) für unterschiedliche Dissoziationsprotokolle. Für die Messung des Temperaturverlaufs wurde eine Region of Interest (ROI) im Mahlwerk definiert.

Generell sollte der Zellaufschluss nicht länger als notwendig durchgeführt werden, da die eingetragene Energie in Wärme dissipiert und so bei unzureichender Kühlung die Suspension bis zu einem Punkt erwärmt werden kann, an dem potentiell temperaturinstabile Proteine denaturieren oder Zellschädigungen auftreten können. Ferner können Proteine und Zellen durch übermäßige mechanische Beanspruchung ihre Funktion verlieren oder genetische und/oder metabolische Reaktionskaskaden auslösen, die die Zellintegrität verändern.

5.8 Lösungskonzept für die Antriebseinheit

Nach der konzeptionellen Entwicklung des mechanischen Wirkorgans und der Einbettung in ein standardisiertes Laborformat, wird die Frage der Parallelisierung von Proben in diesem Abschnitt behandelt. Es wurde ein teilautomatisierter Teststand für die Dissoziation von Biopsien konzeptioniert, der während der Dissoziation die Umdrehungsgeschwindigkeit, Dauer und Rotationsrichtung steuert. Die Geschwindigkeit des Motors ist stufenlos regelbar, so dass die auf die Gewebeprobe wirkenden Mahl- und Scherkräfte optimal eingestellt werden können. Die als Tischgerät ausgeführte Antriebseinheit ist vollständig gekapselt, um den hygienischen Anforderungen im Labor zu entsprechen. An der Oberseite des Geräts sind vier Stützen vorhanden. In jede dieser Öffnungen kann ein Zentrifugenröhrchen mit einer komplett montierten Mahleinheit eingesetzt werden. Die Mahleinheit (Rotor) wird von jeweils einem Schrittmotor (NEMA17 Stepper Motor) angetrieben. Der Zapfen des Rotors wird auf die Motorantriebswelle gesetzt und der Deckel des Zentrifugenröhrchens wird durch eine umlaufende Gummilippe gegriffen und fixiert. Aseptische O-Ring-Abdichtungen schließen sämtliche verschraubten Maschinenteile zur Produktseite hin ab und verhindern somit versteckte Ablagerungen. Jedes Zentrifugenröhrchen kann separat gesteuert und betrieben werden. Das Rotationsprofil des Rotors wird computergesteuert ausgeführt, was komplexe und wiederholbare Protokolle ermöglicht. Die Komponenten dieser Testplattform sind in einer detaillierten Darstellung in Abbildung 41 dargestellt. Das System besteht aus den folgenden Komponenten: Dissoziationsröhrchen, Antriebs- und Steuereinheit, Externe Stromversorgung, 24V DC / 5A, USB-Kabel (USB A auf USB B) und Steuerungssoftware.

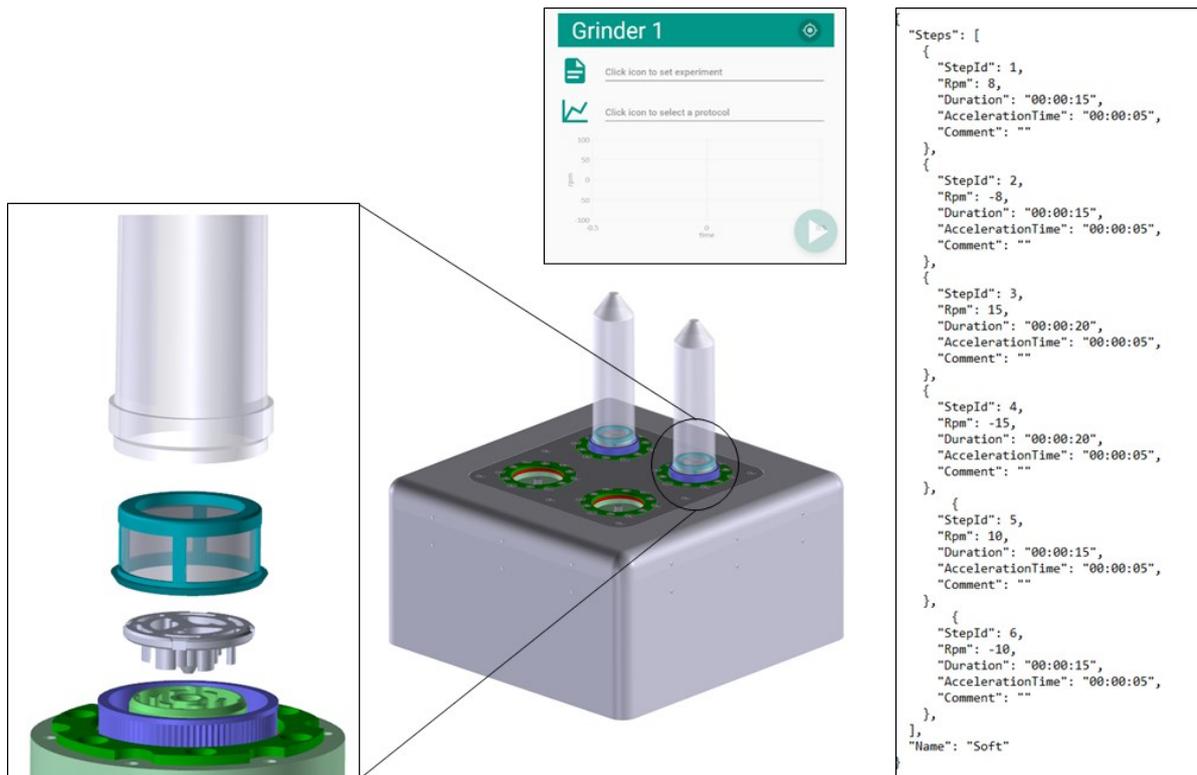


Abbildung 41: Gewebedissoziator Benchtop und Software mit Protokoll. Die Steuerung des Gerätes erfolgt über eine Software, wobei die Prozessparameter Zeit (Duration), die Drehrichtung und Drehgeschwindigkeit (+/- Rpm) die Beschleunigung (AccelerationTime) und die Anzahl an Prozessschritten individuell gestaltet und an diverse Gewebetypen angepasst und optimiert werden können.

Für den Betrieb wird ein PC mit einem Windows 10 (Microsoft .NET Framework 4.7.1 oder höher) Betriebssystem und einer USB-Schnittstelle benötigt, die mit einem Embedded Controller kommuniziert. Die Steuerungssoftware ist in der C++ geschrieben und unterstützt vom Benutzer wählbare Parameter für Steuerung der Dissoziation, der Anzahl der Rotorumdrehungen und der Rotationsgeschwindigkeit. Die Dimensionen und das Gewicht der Antriebseinheit sind in folgender Tabelle 8 dargestellt:

Tabelle 8: Dimensionen und Gewicht der Antriebseinheit.

	Höhe	Breite	Tiefe	Gewicht
Gewebedissoziator	225 mm	225 mm	225 mm	6,5 kg

5.9 Integration in den diagnostischen Gesamtprozess

Der diagnostische Gesamtprozess umfasst drei Hauptschritte. Präanalytik, Analytik und Postanalytik. In der Präanalytik werde alle Prozesse erfasst, die im Zusammenhang mit der Probenvorbereitung stehen. Die Prozesse sind sehr umfangreich, komplex aber gleichzeitig wenig standardisiert, vor allem im Bereich der Gewebedissoziation. Dies wird verdeutlicht durch die hohe Fehleranfälligkeit von bis zu 60 %¹⁵⁴ in der Präanalytik im Vergleich zu der Analyse und Postanalyse. Dadurch hat die Präanalytik einen sehr großen Einfluss auf den diagnostischen Gesamtprozess und ist entscheidend für die Qualität des Analyseergebnisses. An diesem Punkt setzt der in dieser Arbeit entwickelte Lösungsansatz für die mechanische und enzymfreie Gewebedissoziation an. In Abbildung 42 ist ein Lösungsansatz für die enzymfreie und mechanische Gewebedissoziation im Kontext des diagnostischen Gesamtprozesses skizziert. Zur Vereinfachung wird der entwickelte Lösungsansatz im Folgenden als Gewebedissoziator bezeichnet. Der Gewebedissoziator ist ein Verfahren zur effizienten und enzymfreien Dissoziation von verschiedenen Gewebeproben. Der Gewebedissoziator basiert auf einem Zentrifugenröhrchen und Zellfilter, in welchen ein Mahl- und Schneidwerk zur mechanischen Dissoziation von Gewebeproben integriert wurde. Durch die Kombination von Zentrifugenröhrchen, Zellfilter und Mahl- und Schneidwerk in einem Gefäß, können verschiedene Operation (Gewebedissoziation, Waschen und Filtration durch Zentrifugation) in einem geschlossenen System ausgeführt werden. Dadurch wird der Prozess einfach integrierbar in bestehende Laborprotokolle und das Risiko von Kontamination wird durch eine Minimierung der Nutzer-Gewebeproben-Interaktion verringert. In aktuellen Laborprotokollen werden durchschnittlich 2-4 große Ausrüstungen (z. B. Schüttler, Zentrifuge, Vortex-Mixer, automatischer Zellzähler), 5-8 verschiedene Instrumente (z. B. Scheren, Klängen, Zellsiebe, Schalen, Röhrchen), sowie ~10-15 Pipettierschritte häufig für die konventionelle Verarbeitung von Gewebe zu Einzelzellen verwendet ⁷⁰ (siehe Abschnitt 3.3.3 und 3.3.5). Diese Abfolge von Prozessen mit unterschiedlichen Hilfsmitteln bietet eine Kette von Möglichkeiten für Zellverlust, Beschädigung und Exposition gegenüber externen Kontaminationen. Im Gegensatz dazu wird in dieser Arbeit eine geschlossene sterile Plattform entwickelt, die die Ausrüstung auf ein Minimum verringert und die Pipettierschritte deutlich reduziert und sich für eine Vielzahl an Gewebetypen eignet (Abbildung 42).

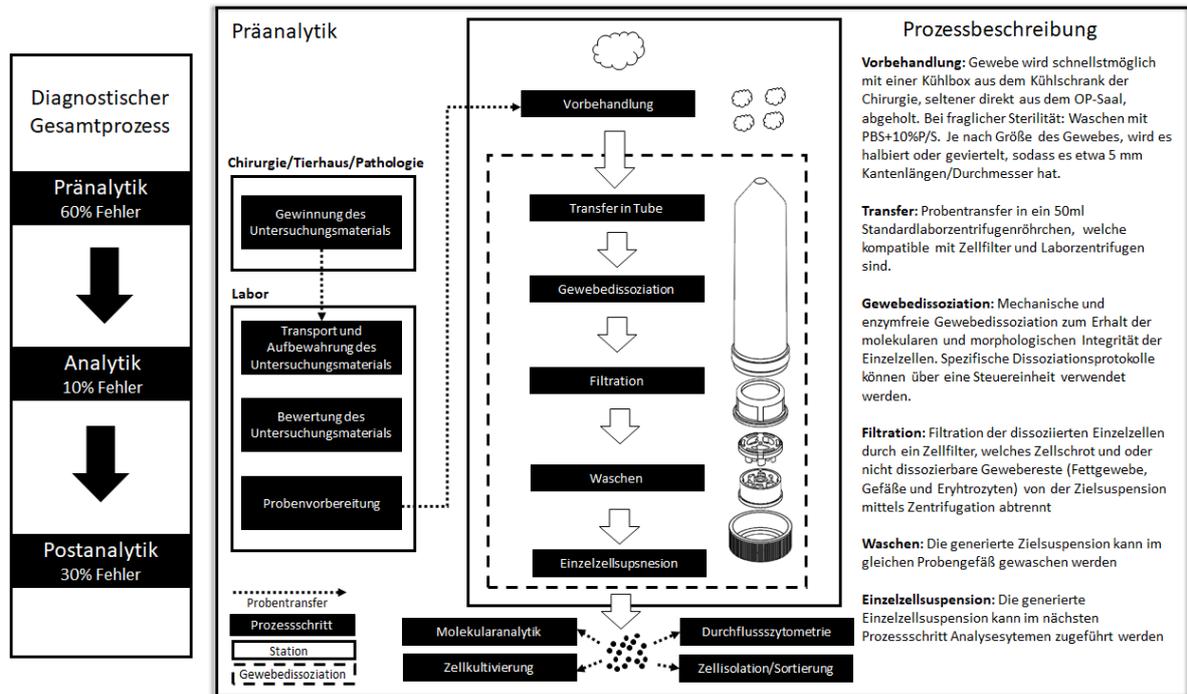


Abbildung 42: Schaubild eines idealen Workflows für ein mechanisches und enzymfreies Gewebedissoziationsverfahren mit dem Gewebedissoziator -System.

Im Folgenden wird der Aufbau und die Verwendung des Gewebedissoziators schematisch erklärt (Abbildung 43). Das zu untersuchende Gewebe wird in die Mahlkammer eingeführt. Die Beladung hängt von der Art des untersuchten Gewebes ab. Der optimale Arbeitsbereich erstreckt sich von 5 bis 400 mg. Nachdem die Gewebeprobe platziert wurde, wird eine geeignete Pufferlösung oder Zellkulturmedium von bis zu 800 µL zugegeben. Im nächsten Vorbereitungsschritt wird das Zentrifugenröhrchen auf den Deckel gesetzt und verschraubt. Das Röhrchen mit dem integrierten Mahlwerk und die Antriebseinheit sind durch eine formschlüssige Verbindung miteinander verbunden. Der Zapfen des Rotors ragt aus dem Deckel heraus und muss auf die Antriebswelle der Antriebseinheit aufgesteckt werden. Der Befestigungsstutzen für das Dissoziationsröhrchen ist so gestaltet, dass das Zentrifugenröhrchen fest positioniert und fixiert ist.

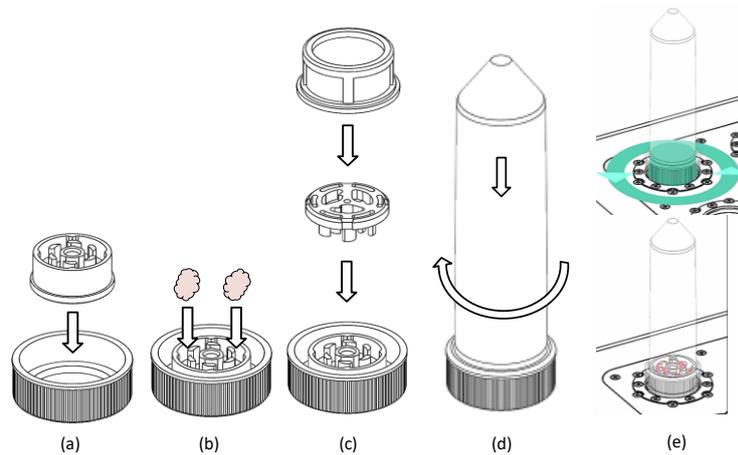
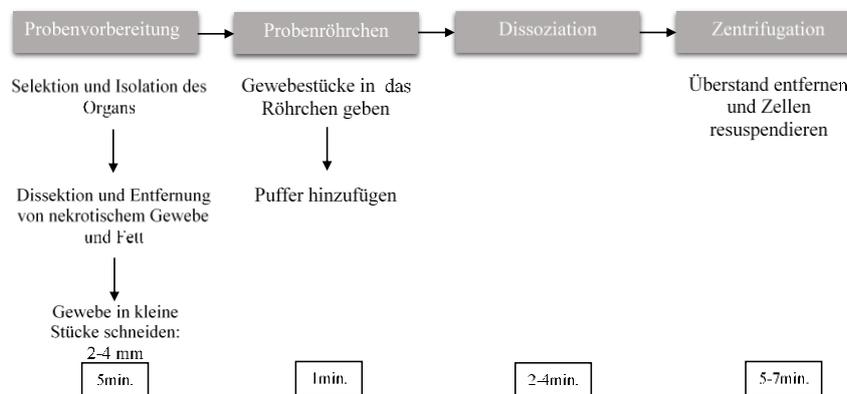


Abbildung 43: Arbeitsablauf des Gewebedissoziators.¹⁴⁵ (a) Der Rotoreinsatz wird in den Deckel des Zentrifugenröhrchens eingesetzt. (b) Die Gewebeprobe wird in den freien Raum zwischen den Rotorzähnen eingebracht und mit Zellkulturmedium versetzt. (c) Der Statoreinsatz wird in ein Standard-Nylonzellensieb eingesetzt. (d) Im nächsten Vorbereitungsschritt, wird das Zentrifugenröhrchen auf den Deckel gesetzt und mit diesem verschraubt. (e) Dissoziationsröhrchen und Tischgerät werden durch eine formschlüssige Verbindung verbunden.

In Abbildung 44 wird die Prozessübersicht mit dem Gewebedissoziator -System noch detaillierter in Bezug auf die benötigten Materialien und Pipettierschritte, beschrieben. Die Prozessschritte der Probenvorbereitung, der Transfer der Proben in das Probenröhrchen, die Dissoziation und Zentrifugation umfassen insgesamt fünf Pipettierschritte.



Prozessschritt	Beschreibung	Materialien	Pipettierschritte	Dauer
Probenvorbereitung	Auswahl + Isolierung des Organs			30sec. -1min
	Entfernung von nekrotischem Gewebe			30sec. -1min
	Gewebe in kleine Stücke schneiden			30sec. -1min
Probenröhrchen	Waschen mit DPBS	-Hinzufügen DPBS -Entfernen von DPBS	2	20sec.
	Übertragung der Gewebestücke in einen Zerkleinerer			20sec.
Dissoziation	Puffer hinzufügen		1	5sec.
				3-4min.
Zentrifugation	Remove supernatant and resuspend cells	-Entfernen des Überstands -Resuspendierung	2	5min. 20sec.
		Total	5	

Abbildung 44: Prozessanalyse des enzymfreien und mechanischen Gewebedissoziators.

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Prozessparameter und Gerätespezifikationen des Gewebedissoziators.

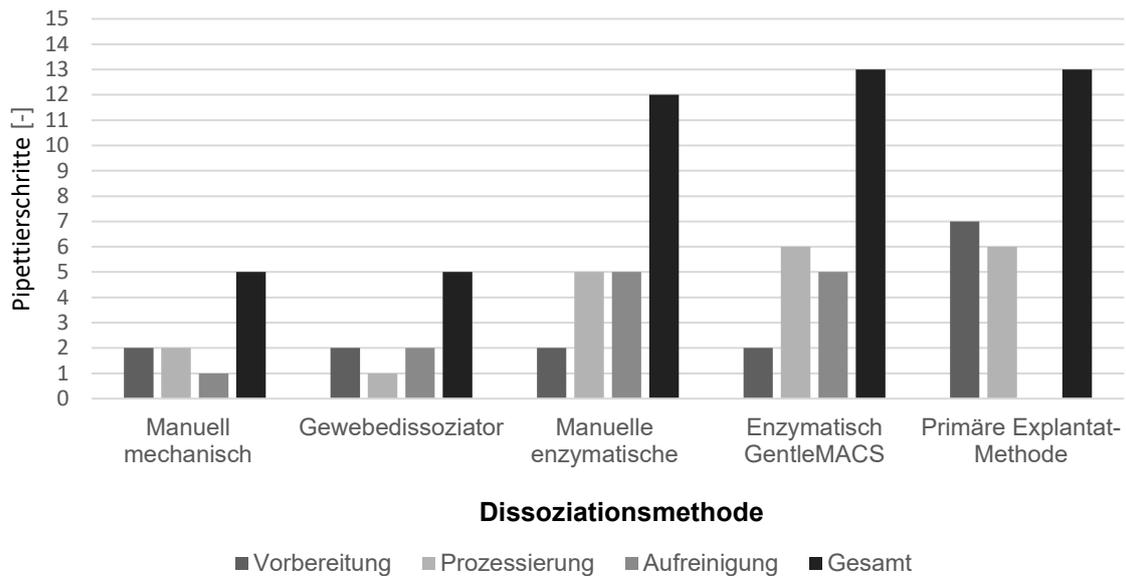
Tabelle 9: Gesamtsystem Spezifikationen des Gewebedissoziators.

Spezifikationen	
Beladung	4 Röhren parallel, individuelle und unabhängige Bearbeitung möglich
Zellsieb	40, 70, 100 µm Maschenweite
Plattform	Standard 50 ml konische Zentrifugenröhrchen
Probenvolumen	5-400 mg Gewebe plus 500-700 µl Puffer / Zellkulturmedium
Drehzahl Mahlwerk	Arbeitsbereich 1-30 U/min; max. 110 U/min
Modus der Rotation	Scheren, Mahlen und Scheren/Mahlen

Während sich das bisherige Lösungskonzept mit der Integration in ein Laborformat, der Auslegung der Mahlwerksdimensionen und des zerkleinerungsaktiven Volumens beschäftigt, ist es im nächsten Schritt essentiell das System im Kontext eines Laborprozesses zu untersuchen und zu bewerten. Die wichtigsten quantitativen Parameter, die untersucht werden, sind: Pipettierschritte pro Prozessschritt und das damit einhergehende Kontaminationsrisiko, Gesamtverarbeitungszeit aufgeschlüsselt in Zeitaufwand pro Prozessschritt und die Kosten pro Probe für eine bestimmte Dissoziationsmethode.

5.9.1 Pipettierschritte pro Prozessschritt im Kontext des Kontaminationsrisikos

Eine Kontamination liegt vor, wenn eine unerwünschte Substanz vorhanden ist. In der Biologie kann es sich dabei zum Beispiel um unerwünschte Bakterien, DNA, RNA und Proteine handeln. Eine Möglichkeit, eine Kontamination von Laborproben zu vermeiden, besteht darin, bestimmte Aspekte des Prozesses zu automatisieren. Durch erhöhte Automatisierung und Integration von Prozessschritten kann auch die Anzahl der benötigten Pipettierschritte deutlich reduziert werden. Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 gezeigt, steht die Anzahl der Pipettierschritte in direktem Verhältnis mit dem Kontaminationsrisiko. In Abbildung 45 ist eine Übersicht über die Anzahl der benötigten Pipettierschritte für verschiedene Gewebedissoziationsmethoden dargestellt. Die enzymatischen Verfahren benötigen mit der Explantmethode die höchste Anzahl an Pipettierschritten (12 bzw. 13 Pipettierschritte). Im Vergleich dazu benötigen die manuelle Methode und der Gewebedissoziator nur 5 Pipettierschritte. Als Grundlage für die Analyse der Prozesse wurden repräsentative Dissoziationsprotokolle ausgewählt.



Dissoziationsmethode	Vorbereitung	Prozessierung	Aufreinigung	Gesamt
Manuell mechanisch	2	2	1	5
Gewebedissoziator	2	1	2	5
Manuelle enzymatische	2	5	5	12
Enzymatisch GentleMACS	2	6	5	13
Primäre Explantat-Methode	7*	6**	0	13

*3x Waschschrift

**inklusive Kultivierung mit Wechsel des Mediums

"Aufreinigung mit empfohlenem Smartstrainer

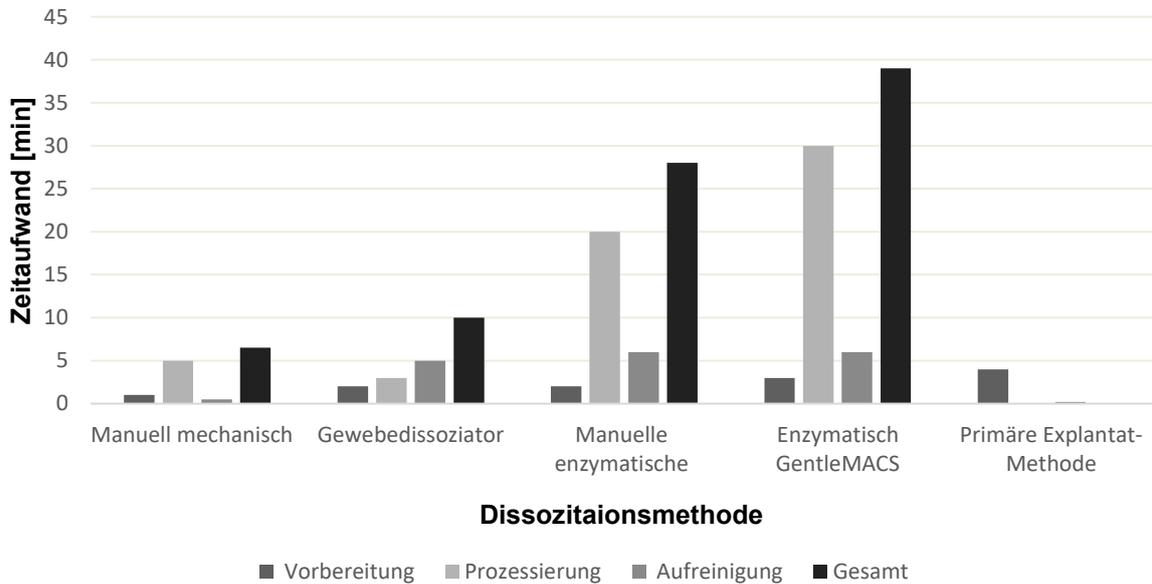
"Annahme: Verwendung von 3 Enzymen

Abbildung 45: Anzahl der Pipettierschritte pro Gewebedissoziationsmethode. Als Datengrundlage der Prozessanalyse wurden repräsentative Dissoziationsprotokolle der verschiedenen Methoden verwendet.

5.9.2 Zeit pro Prozessschritt

Neben dem Kontaminationsrisiko spielt der Zeitbedarf bei der Dissoziation von Gewebeproben eine essentielle Rolle. Ein wichtiges Ziel der Laborautomatisierung ist die Verringerung des Zeitaufwands. Wie in Abschnitt 3.2.1 bereits beschrieben, sollte die Gewebeprobe möglichst schnell nach der Entnahme verarbeitet werden. Die manuelle Verarbeitung durch einen erfahrenen Techniker dauert etwa 20-25 Minuten pro Biopsie. Eine maschinelle Verarbeitungszeit von 15 Minuten oder weniger pro Biopsie wird als akzeptabel angesehen. Eine angestrebte Verarbeitungszeit von 10-12 Minuten wird angestrebt. In Abbildung 46 ist der Zeitaufwand pro Gewebedissoziationsmethode dargestellt. Die enzymatische Methode stellen in diesem Vergleich den höchsten Zeitaufwand mit 28 und 39 Minuten. Dies entspricht einer ca. 4-fach längeren Prozesszeit im Vergleich zu den nicht-enzymatischen Methoden. Bei diesen Methoden liegt der Zeitaufwand kleiner gleich 10 Minuten. Es stellt sich heraus, dass vor allem die Prozessierung der zeitaufwändigste Schritt bei den enzymatischen Methoden ist. Diese kann bei anderen Enzymzusammensetzungen auch mehrere Stunden betragen. Durch die direkte Zentrifugation der Dissoziationsröhrchen im Gewebedissoziator wurde festgestellt,

dass die erzeugte Einzelzellsuspension weitgehend frei von Ablagerungen und Verunreinigungen ist. Dies führte zu einer erheblichen Verkürzung der Verarbeitungszeit.



Dissoziationsmethode	Vorbereitung	Prozessierung	Aufreinigung	Gesamt
<i>Manuell mechanisch</i>	1	5	0,5	6,5
<i>Gewebedissoziator</i>	2	3	5	10
<i>Manuelle enzymatische</i>	2	20	6	28
<i>Enzymatisch GentleMACS</i>	3	30	6	39
<i>Primäre Explantat-Methode</i>	4*		0,2	

*3x Waschschrift

**inklusive Kultivierung mit Wechsel des Mediums

*Aufreinigung mit empfohlenem Smartstrainer

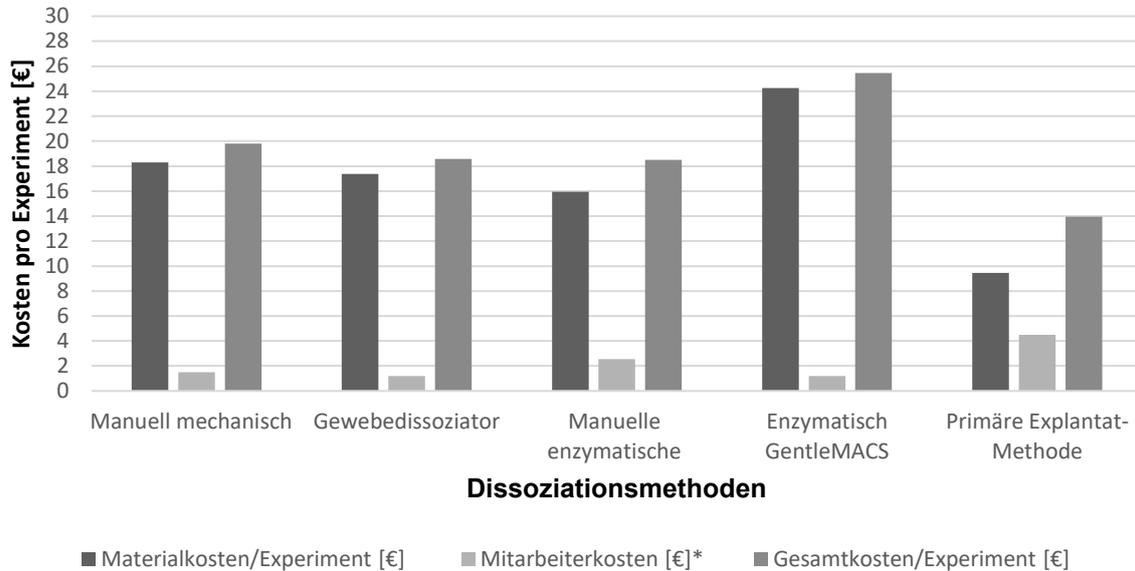
*Annahme: Verwendung von 3 Enzymen

Abbildung 46: Zeitaufwand pro Gewebeaufarbeitung. Als Datengrundlage der Prozessanalyse wurden repräsentative Dissoziationsprotokolle der verschiedenen Methoden verwendet.

5.9.3 Kosten pro Dissoziationsmethode

Die Kostenanalyse der Dissoziationsverfahren wurde durchgeführt, indem die Gesamtkosten für die Durchführung der verschiedenen Methoden summiert wurden. Diese Kosten setzen sich aus den handelsüblichen Materialkosten für sämtliche Verfahren zusammen, einschließlich Objektträgern und Pipettenspitzen. Ebenso wurden die geschätzten Personalkosten unter Berücksichtigung eines angenommenen Stundensatzes von 18 € pro Stunde (netto) sowie der Anschaffungspreis für das teilautomatisierte Gewebedissoziationssystem einbezogen. Diese Kosten wurden dann auf ein einzelnes Experiment gerechnet und in Abbildung 47 dargestellt. Bei dem Vergleich stellte sich das teilautomatisierte enzymatische Verfahren als kostenintensivste Variante pro Experiment mit 25,46 € heraus. Die manuell-mechanische und manuell-enzymatische Dissoziationsmethode liegen bei 19,80 € und bei 18,49 €. Die teilautomatisierte nicht-enzymatische Dissoziationsmethode mittels Gewebedissoziator verursacht Kosten von

18,57 € und liegt damit 27 % unter den Kosten des teilautomatisierten enzymatischen Verfahrens. Damit ist das Dissoziationsröhrchen auch bei moderatem Probendurchsatz kosteneffizient, zeichnet sich durch einfache und sichere Handhabung aus und erfordert kein geschultes Personal.



Dissoziationsmethode	Gerätekosten [€]	Materialkosten/Experiment [€]	Mitarbeiterkosten [€]*	Gesamtkosten/Experiment [€]
Manuell mechanisch	0	18,3	1,5	19,8
Gewebedissoziator	10000	17,37	1,2	18,57
Manuelle enzymatische	0	15,94	2,55	18,49
Enzymatisch GentleMACS	20944	24,26	1,2	25,46
Primäre Explantat-Methode	0	9,44	4,5	13,94

*3x Waschschrift

**inklusive Kultivierung mit Wechsel des Mediums

†Aufreinigung mit empfohlenem Smartstrainer

‡Annahme: Verwendung von 3 Enzymen

Abbildung 47: Kostenaufwand pro Dissoziationsmethode. Als Datengrundlage wurden repräsentative Protokolle verwendet.

Im nächsten Kapitel soll das prototypische System des Gewebedissoziators mit Hilfe eines zweistufigen Testplans validiert werden. Die erste Stufe besteht aus Funktionstests, die zum einen aus mechanischen Tests und zum anderen aus ersten biologischen Tests mit unterschiedlichen Gewebetypen bestehen, bevor in definierten klinisch-relevanten Einsatzfällen der entwickelte Gewebedissoziator validiert wird.

6 Validierung

Das konkrete Ziel der Validierung des Gewebedissoziators ist die Abgrenzung zum manuellen und enzymatischen Dissoziationsprozess bezogen auf Funktionalität, Effizienz und Interoperabilität zwischen bestehenden Laborprozessen. Der manuelle und enzymatische Prozess zur Gewinnung von Einzelzellen ist immer noch Stand der Technik. Teilautomatisierte und enzymatische Prozesse zur Gewebedissoziation sind zwar vorhanden, die Ergebnisse jedoch nicht zufriedenstellend. Ebenso kann der Einsatz von Enzymen zur Dissoziation die Probenqualität verringern. Erste Ergebnisse mit dem in dieser Arbeit entwickelten System haben gezeigt, dass mit dieser Methode viable Einzelzellen aus Gewebeproben gewonnen werden können.¹⁴⁵ Ziel dieses Vorhabens ist daher die Durchführung von Testreihen mit definierten Gewebetypen, die eine repräsentative Auswahl an klinischen Proben darstellen. Mit diesem Demonstrator sollen dann im Rahmen der Validierung vor allem folgende Prozessparameter bestimmt werden: Dissoziationseffizienz, Viabilität und Zellausbeute. In Abbildung 48 ist der gefertigte Prototyp des Dissoziationsröhrchen und der Antriebseinheit, die für die Validierung verwendet wurden, dargestellt.

A)



B)



Abbildung 48: Gewebedissoziator Prototyp und Dissoziationsröhrchen A) Komponenten des Dissoziationsröhrchens in folgender Anordnung. V.l.: Deckel mit Lochbohrung, Mahlwerk bestehend aus Rotor und Stator, Zellsiebe unterschiedlicher Maschenweite und Zentrifugenröhrchen B) Antriebseinheit des Gewebedissoziators mit aufgesetztem Dissoziationsröhrchen.

Die Validierung des Demonstrators mit klinischen Proben erfolgt in mehreren Stufen. So werden einerseits die jeweiligen Teilsysteme hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit (z.B. Zellviabilität und Zellausbeute) charakterisiert und getestet. Im Rahmen der Integration werden anderer-

seits Trockentests der Systemabläufe durchgeführt und schlussendlich soll das integrierte Gesamtsystem mit klinischen Proben, unter möglichst praxisnahen Bedingungen getestet und die Leistungsfähigkeit demonstriert werden.

Aufgrund der extremen Vielfalt an in der Praxis eingesetzten Probenarten und Probenmerkmalen sowie den vielfältigen analytischen Fragestellungen und ihrer Zielmoleküle werden für die Entwicklung im Rahmen dieser Arbeit folgende repräsentativen Zell- und Gewebeproben gewählt:

Tabelle 10: Übersicht verwendetes Probenmaterial für die Validierung.

Probenmaterial	Gewebe-/Zelltyp	Art	Hersteller/Herkunft
CHO-K1	Zelllinie	Hamster	Thermo Fisher Scientific (514448)
Milz	Primärmaterial	Maus	Tierhaus* UMM
Leber	Primärmaterial	Maus	Tierhaus* UMM
Sinovialhaut	Primärmaterial	Schwein	Schlachter
Tumor	Primärmaterial	Mensch	Chirurgie** UMM

* Interne Anzeige (I-17/12); **Ethikantrag (UMM 2012-293N-MA)

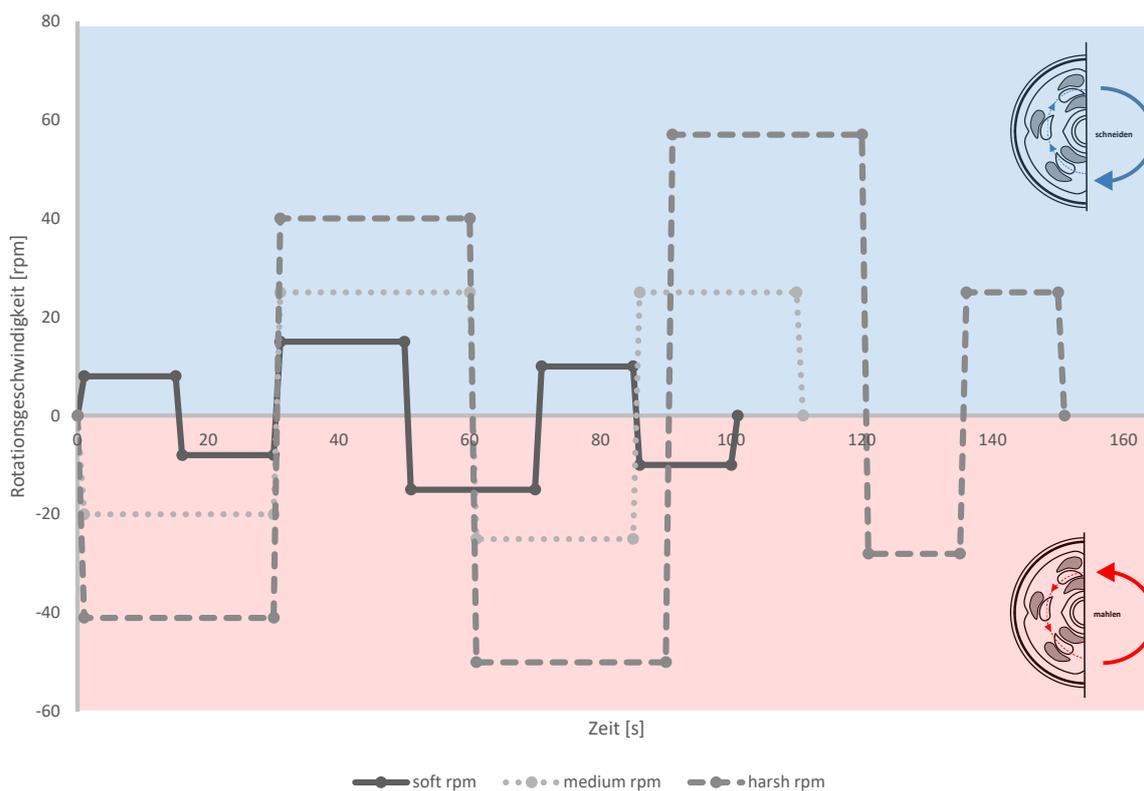
Diese Gewebearten unterscheiden sich in Struktur und mechanischen Eigenschaften und stellen somit eine repräsentative Bandbreite für den klinischen Anwendungsbereich für das zu entwickelnde mechanische Aufschlussverfahren dar. Die Ergebnisse der Untersuchung in diesem Kapitel bilden die Grundlage für die finale Konfiguration des Probenträgersystems und für die Auswahl der Aufschlussparameter in Abhängigkeit der Proben und Zielzellen der jeweiligen angestrebten Anwendung und Analyse.

6.1 Zellqualität

Der erste Schritt zur Einzelzellanalyse ist die Gewinnung von Zellen aus einer Gewebeprobe. Um anhand von Einzelzelldaten Rückschlüsse auf die Funktion eines Organs oder sogar eines ganzen Organismus ziehen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Zellen repräsentativ für dieses spezifische Organ oder diesen Organismus sind. Hierzu wurden verschiedene Gewebeproben getestet und mittels Gewebedissoziator verarbeitet. Nach der erfolgten Dissoziation wird die Zellsuspensionen resuspendiert und zur weiteren Verarbeitung aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen. Um über die Qualität der Gewebedissoziation zu entscheiden, werden an den generierten Einzelzellproben weitere Untersuchungen durchgeführt, unter anderem mikroskopische und molekularbiologische Analyseverfahren. Vor den

nachfolgenden Untersuchungen müssen die Einzelzellsuspensionen in den meisten Fällen gewaschen und verdünnt werden, um einzelne Zellen sichtbar zu machen und Zelldebris zu entfernen. Eine Auswertungsmethode ist die Viabilitäts- und die Gesamtzellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer. Zusätzlich wurde zu Beginn der Versuchsreihe noch eine Auswertung mittels Massenausbeutenbestimmung durchgeführt. Hierbei werden Gewebe und Puffer einmal vor Beginn der Dissoziation gewogen. Eine zweite Massenbestimmung erfolgt nach der Dissoziation und Entnahme der Suspension aus dem Reaktionsgefäß (siehe Abschnitt 3.1.1).

Ziel dieser Studie ist eine detaillierte Untersuchung der verschiedenen Dissoziationsmechanismen, die das entwickelte Mahlwerk und Filtrationsmodul bietet, in Abhängigkeit von verschiedenen Betriebsbedingungen, Zielzelltypen und Applikation durchzuführen. Dies ermöglicht es, eine Gesamtübersicht über die Leistungsfähigkeit, Leistungspotentiale und Limitationen des entwickelten Gesamtsystems zu erfassen. Ein entscheidendes Ziel eines jeden Gewebedissoziationsprotokolls ist es, möglichst viele lebensfähige Zellen für die nachfolgende Bearbeitung und Analyse zu gewinnen. Mehrere Protokollparameter können das Ergebnis der Gewebedissoziation beeinflussen, z. B. die Tierart, der Gewebetyp, Temperatur, usw. (siehe Abschnitt 3.2.1). Parameter, die beeinflusst werden können, werden empirisch bestimmt und optimiert, um die Ausbeute und Lebensfähigkeit der Zellen zu maximieren. Aufgrund der spezifischen Leistungseintragsberechnungen mit dem entwickelten Mahlwerk, unter zur Hilfenahme der theoretischen Betrachtung, wurden folgenden Protokolle ausgewählt, die den kompletten Leistungsbereich des Systems abdecken. Dadurch wird eine vollständige Leistungsbetrachtung des entwickelten Gewebedissoziators möglich. In Abbildung 49 werden die getesteten Protokolle dargestellt und mit soft, medium und harsh gekennzeichnet. Diese Protokolle decken den Parameterraum, des entwickelten Systems, welches für die Gewebedissoziation bereitsteht, ab.



Prozessschritt	soft			medium			harsh		
	Rotation [-]	Dauer [s]	Modus schneiden/mahlen	Rotation [rpm]	Dauer [s]	Modus schneiden/mahlen	Rotation [rpm]	Dauer [s]	Modus schneiden/mahlen
1	8	15	s	-20	30	m	-41	30	s
2	-8	15	m	25	30	s	40	30	m
3	15	20	s	-25	25	m	-50	30	s
4	-15	20	m	25	25	s	57	30	m
5	10	15	s				-28	15	s
6	-10	15	m				25	15	m

Abbildung 49: Übersicht über die verwendeten Dissoziationsprotokolle zur Demonstration der Leistungsfähigkeit des entwickelten Systems.

6.1.1 Überprüfung der Dissoziationsleistung unterschiedlicher Mahlwerksvarianten

Im ersten Schritt wird die Auswirkung von unterschiedlich hergestellten Mahlwerken (Frästeil oder Spritzgussteil) auf die Dissoziationsleistung getestet, um die Zellintegrität für die folgenden Versuche zu gewährleisten. Getestet wurden ein Mahlwerk, welches mittels Fräse hergestellt wurde und ein Mahlwerk, welches mittels Spritzgussverfahren hergestellt wurde. Das Fräsverfahren ist sehr präzise zur Herstellung von feinen Strukturen, eignet sich jedoch nicht für die Massenproduktion, daher wurden die beiden Mahlwerksvarianten getestet, um sicherzustellen, dass keine unerwarteten Effekte in Bezug auf die Zellqualität verursacht werden, wenn die Mahlwerke in größerer Stückzahl im Spritzgussverfahren gefertigt werden. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Modellsystem mit CHO-K1-Zellen etabliert, um die Bedingungen für die Viabilitäts-, Zellintegritätstest und die Auswirkung auf die Dissoziationsergebnisse zu ermitteln, bevor das Verfahren an primärem Gewebe getestet wird.

Die verwendeten Mahlwerke unterscheiden sich zunächst einmal in ihrer Fertigungsweise, wodurch zwischen Frästeilen und Spritzguss differenziert werden kann. Spritzgussmahlwerke werden hergestellt, indem Maschinen flüssigen Kunststoff in ein speziell angefertigtes Spritzgusswerkzeug, eine Negativform des Bauteils, spritzen. Der Vorteil liegt darin, dass sie kostengünstig, in großen Stückzahlen, gefertigt werden können. Frästeile dagegen werden als Präzisionsteile angesehen, deren Toleranzen sich bei der Herstellung sehr genau kontrollieren lassen. Sie werden über ein spanendes Verfahren hergestellt, wobei Vollmaterial mittels unterschiedlicher Werkzeuge abgetragen wird. In Abbildung 50 wird deutlich, dass sich Abweichungen in der Maßhaltigkeit vom Frästeil zum Spritzgussprozess ergeben.

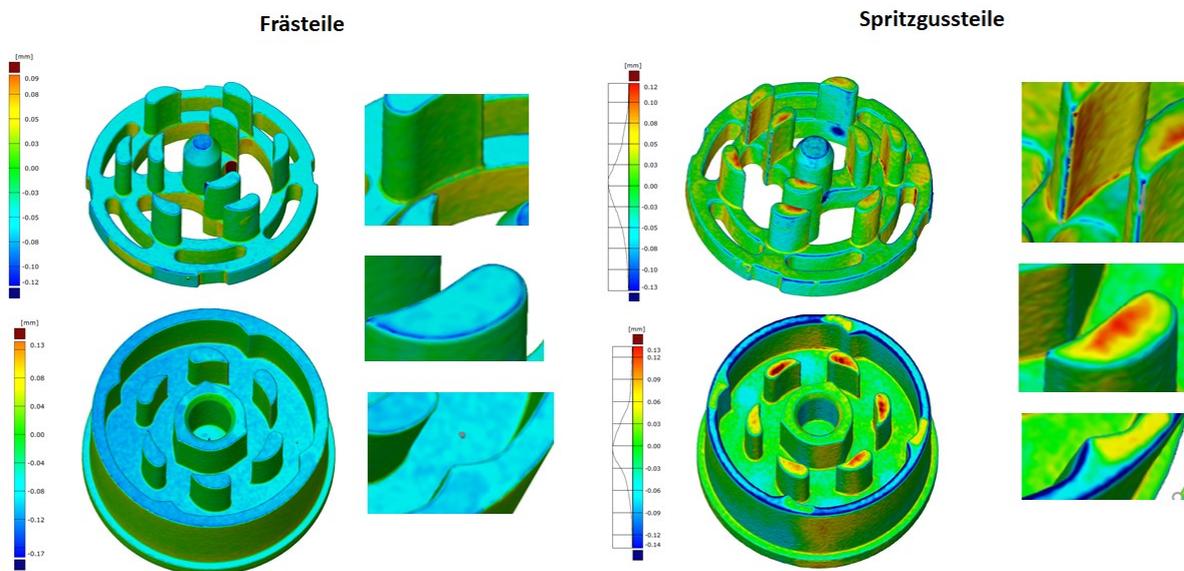


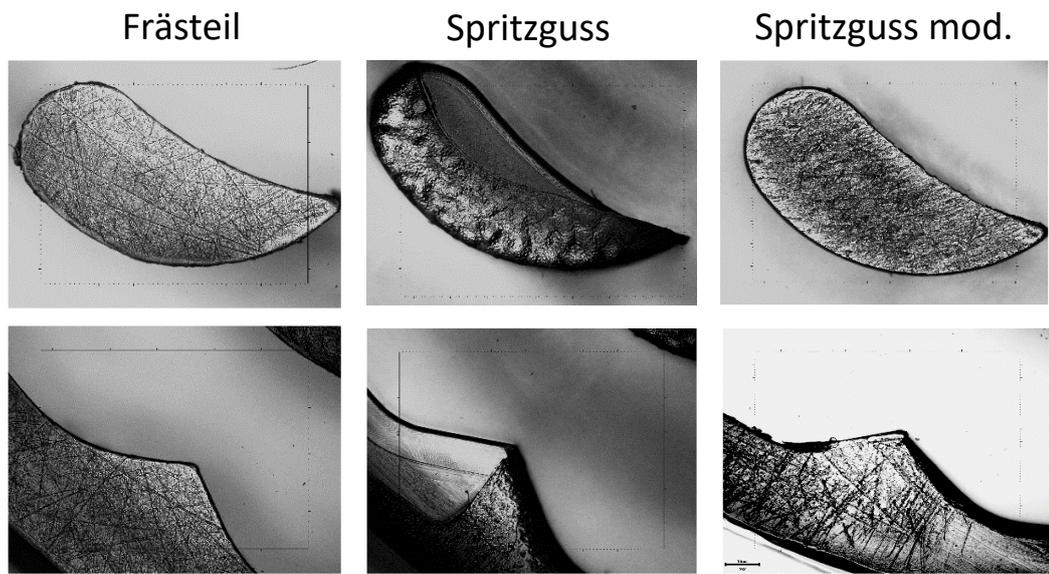
Abbildung 50: CT-Scan von Fräs- und Spritzgussmahlwerk. Eine Auflösung von 0.1 Millimeter wurde mit ein Werth TomoScope HV500 erzielt. Abweichung zum Sollmass des Frästeils sind in rot dargestellt.

Diese Abweichungen können die Leistungsfähigkeit, aber auch die Handhabung der im Spritzgussverfahren hergestellten Mahlwerke, negativ beeinflussen. Da es jedoch keine Alternative für den Spritzgussprozess in Bezug auf Herstellungskosten gibt, wurde das Spritzgussmahlwerk nachgearbeitet, um sich dem Frästeilmaßen in Bezug auf die Toleranzen wieder anzunähern. Im ersten Schritt wurde nun die Vergleichbarkeit von Fräs-, Spritzgussteil und nachgearbeitetes Spritzgussteil mit einer etablierten CHO-K1-Zelllinie getestet.

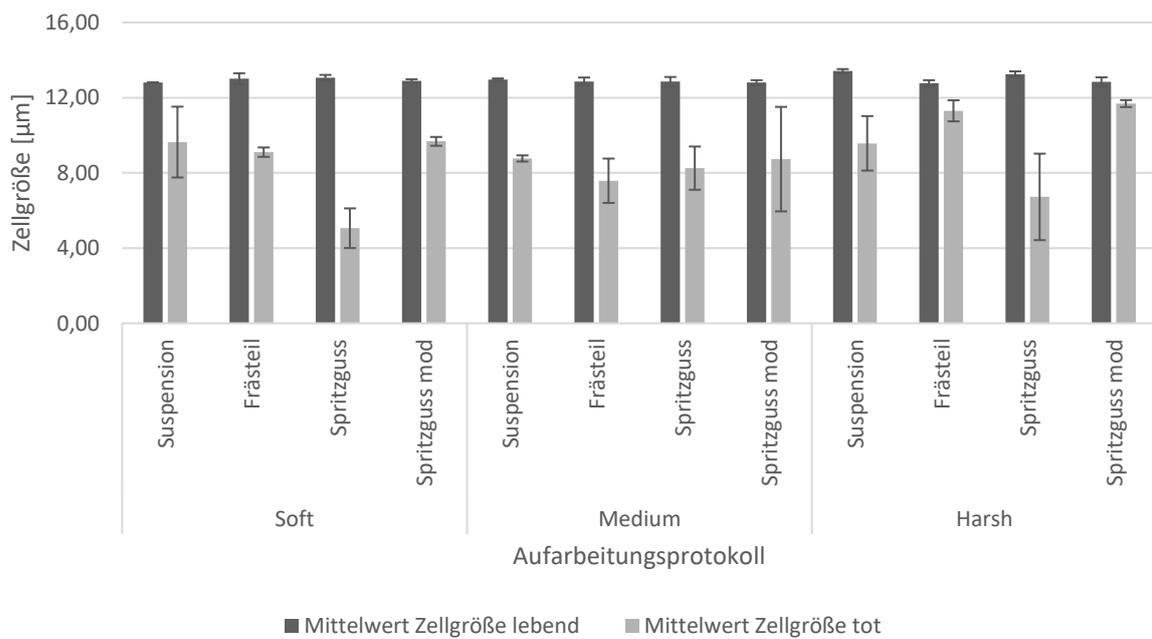
Zunächst wurde eine Gesamtbestimmung der Zellzahl durchgeführt. Für die Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität wurde das automatisierte Zellzählgerät (Countess 3 Thermo Fisher) verwendet, welches sich für etablierten Zellkulturen, wie bei einer CHO-K1 Suspensionskultur, eignet. 800 µl der CHO-K1-Suspension mit einer Zellkonzentration von $7,8E+06$ Zellen/ml wurden in ein Mahlwerk gegeben, um die Kultur im Anschluss mit verschiedenen Dissoziationsprotokollen des Gewebedissoziators zu beanspruchen. Nach dem Prozess wurde die

Probe abzentrifugiert und das Zellpellet resuspendiert. Es wurde eine Bestimmung der Zellviabilität und Zellausbeute vor und nach dem Dissoziationsprotokoll durchgeführt. Das Ziel dieses Versuches bestand darin, den Einfluss auf die Zellviabilität, Zellausbeute und Zellintegrität von Suspensionskulturen hinsichtlich unterschiedlicher Mahlwerke in Bezug auf Herstellungsverfahren und Nacharbeiten (händisches entgraten der Spritzgussmahlwerke), zu untersuchen. Hierbei kam das gefräste Mahlwerk, das unbearbeitete Spritzgussmahlwerk, das nachgearbeitete Spritzgussmahlwerke zum Einsatz, welche jeweils mit dem soft, medium und harsh Dissoziationsprotokoll (siehe Abschnitt 6.1) beansprucht wurden. Zunächst wurde die Zellkonzentration hinsichtlich der einzelnen Protokolle separat betrachtet. Hierbei ergibt sich für das Soft-Protokoll eine durchschnittliche Zellkonzentration von $7,86E+06$ Zellen/ml. Für das Medium Protokoll eine Konzentration von $7,45E+06$ Zellen/ml und für das harsh Protokoll eine Zellkonzentration von $7,21E+06$ Zellen/ml. Neben der Zellkonzentration wurde ebenfalls eine Gesamtbestimmung der Zellviabilität hinsichtlich der einzelnen Mahlwerke durchgeführt. Um einen Referenzwert für die Zellausbeute und Zellviabilität zu erhalten, wurde ebenfalls eine Gesamtzellzahlbestimmung und eine Viabilitäts-Bestimmung bei der zuvor entnommenen Zellsuspension aus der Stammlösung durchgeführt. Diese Suspensionsprobe wurde als Kontrolle nicht mit einem Dissoziationsprotokoll beansprucht. Bei dieser Versuchsreihe wurde ebenfalls überprüft, ob sich bei unterschiedlichen Mahlwerken eine unterscheidbare Zellgrößen-Verteilung bestimmen lässt. In der Abbildung 51 ist erkennbar, dass sich die Durchschnittsgröße der lebenden Zellen kaum zwischen den unterschiedlichen Protokollen unterscheidet. Die Größe der lebenden CHO-Zellen beläuft sich gemittelt auf einen Wert von $12,92 \mu\text{m}$, wohingegen die Größe der toten Zellen $9,64 \mu\text{m}$ betrifft. Wie dem Diagramm der Gesamtbestimmung der Zellviabilität zu entnehmen ist, können keine Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Mahlwerke erkannt werden. Die Zellviabilität wurde bei allen Proben mithilfe des Zellzählers bestimmt. Es wurde eine Viabilität der Zellen von ca. 98 % gemessen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich keine negativen Effekte der Spritzgusshergestellten Mahlwerke in Bezug auf Zellausbeute, Zellviabilität und Zellgrößenverteilung eingestellt haben.

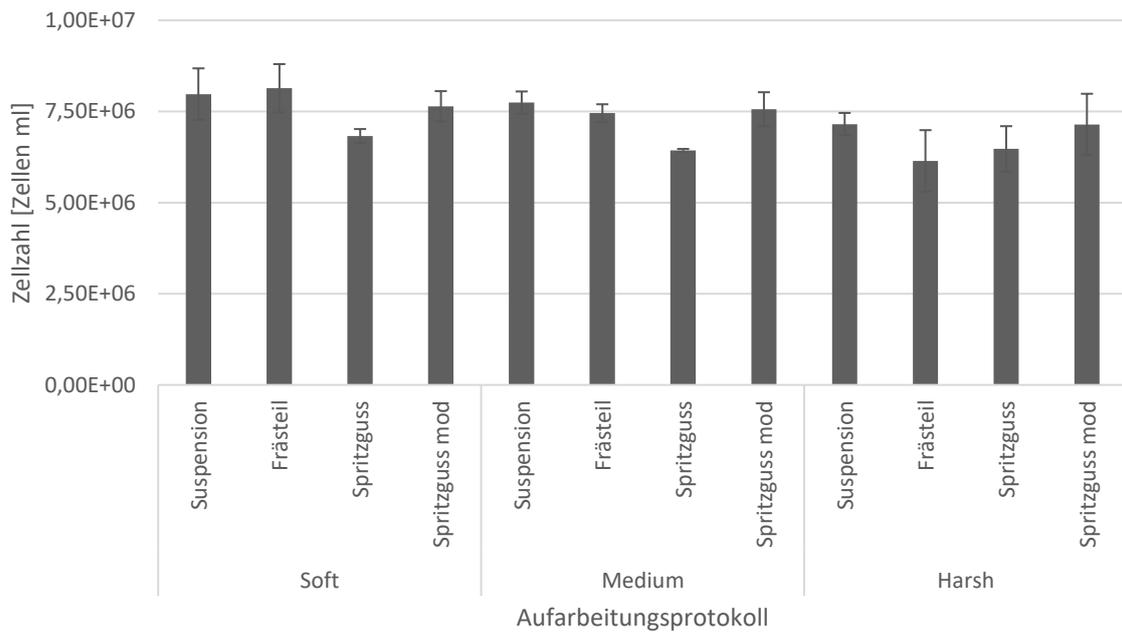
A)



B)



C)



D)

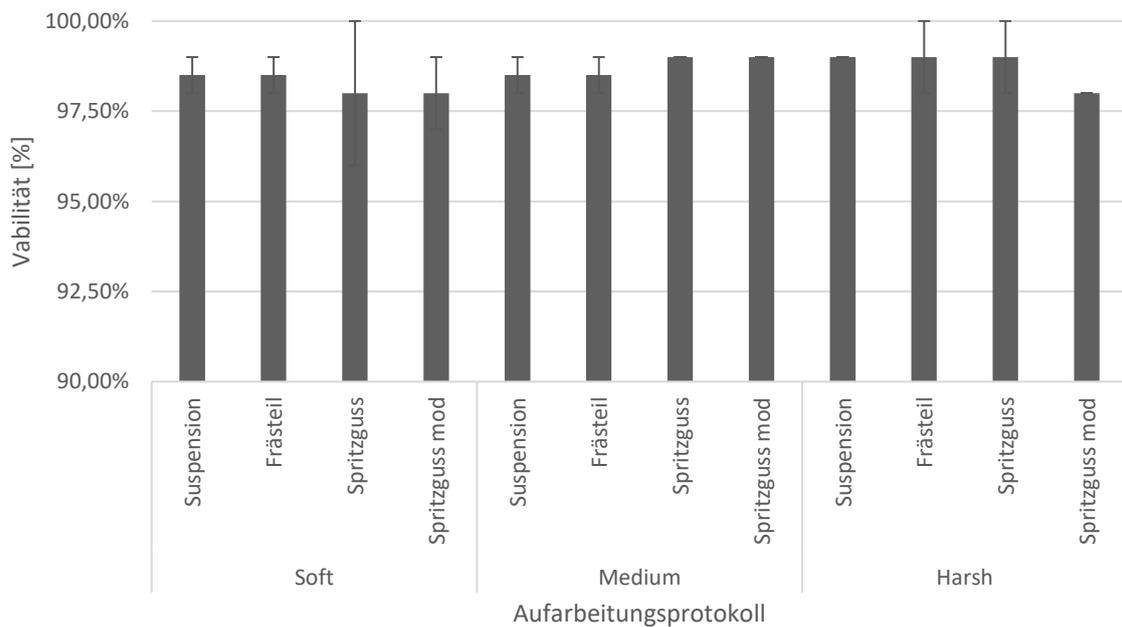


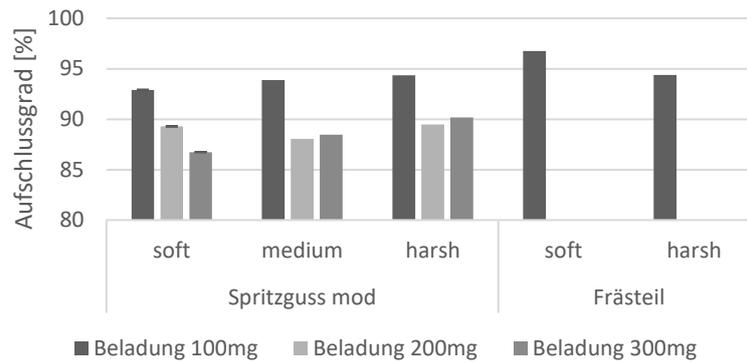
Abbildung 51: Bestimmung des Einflusses von Fräsmahlwerk, Spritzgussmahlwerk und modifiziertes Spritzgussmahlwerk auf die Dissoziation. A) Mikroskopische Aufnahmen der untersuchten Mahlwerksvarianten. Einfluss der unterschiedlichen Mahlwerke auf die B) Zellgröße, C) Zellausbeute und D) Viabilität von CHO-K1 Suspensionszellen wurde mit unterschiedlichen Dissoziationsprotokollen getestet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

Nachdem eine Schädigung der Zellen durch die nachgearbeiteten Mahlwerke ausgeschlossen worden ist, wurden diese Mahlwerke auch für die weiteren Versuche verwendet. Im nächsten Abschnitt folgen erste Versuch der Mahlwerksvarianten mit Primärmaterial, um den Aufschlussgrad von Leberproben in Abhängigkeit von unterschiedlichen Gewebemengen zu bestimmen.

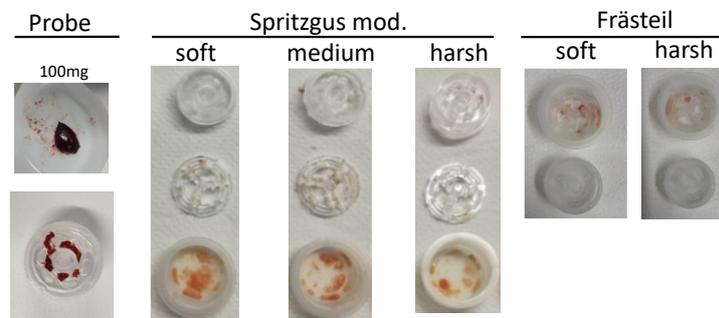
6.1.2 Bestimmung der Dissoziationseffizienz

Eine effiziente Gewebedissoziation bedeutet, dass das Gewebe zügig und vollständig getrennt werden kann, ohne dabei unerwünschte Schäden zu verursachen. Dies ermöglicht es, Gewebe schnell und genau zu analysieren oder zu isolieren. Zunächst wurde der Einfluss drei unterschiedlicher Gewebemengen von 50mg, 150mg und 300mg, verglichen. Wie in Abbildung 52 verdeutlicht wird, liegen alle drei Protokolle bei einem Aufschlussgrad von >90%. Zur Kontrolle wurden Dissoziationsversuche unter Verwendung des gefrästen Mahlwerks durchgeführt. Dabei wurde eine Gewebemenge von 100 mg verwendet und sowohl das soft als auch das harsh Protokoll angewandt. Eine Variation der Dissoziationsprotokolle führt zu keiner Veränderung des Aufschlussgrads bezogen auf die unterschiedlichen Mahlwerke und die Ausgangsprobe. Dies wird bestätigt durch die qualitative Auswertung des Restgewebes nach der Dissoziation in den beiden Mahlwerksvarianten und mittels unterschiedlicher Dissoziationsprotokolle. Hierbei konnten nur noch sehr geringe Mengen an Restgewebe festgestellt werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung der erzeugten Einzelzellsuspensionen des Fräsmahlwerks und des Spritzgussmahlwerks sind die Zellpopulationen der Hepatozyten mit einer charakteristischen Zellgröße von ca. 25-40 µm klar erkennbar.

A)



B)



C)

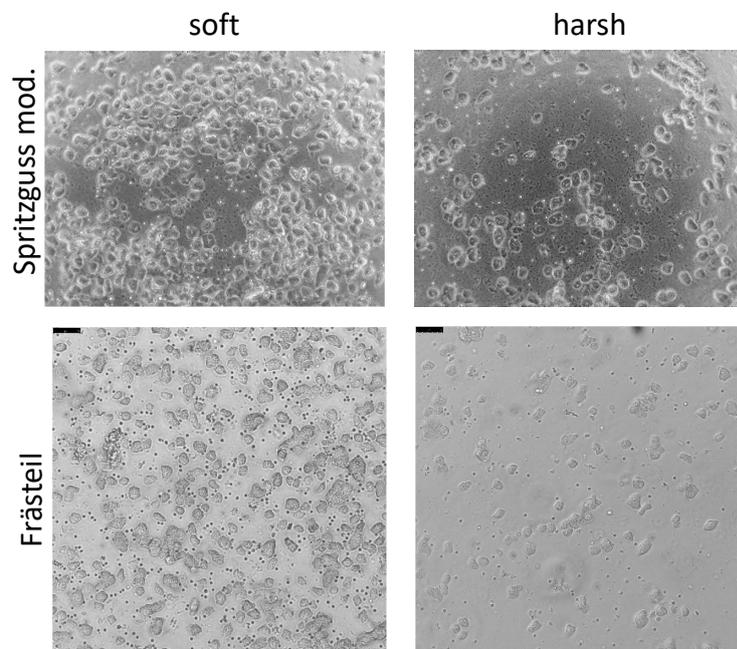


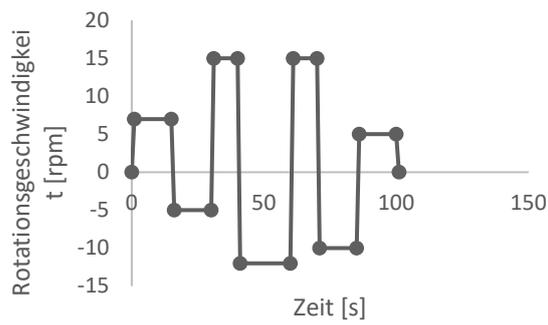
Abbildung 52: Vergleich Fräs- und modifiziertes Spritzgussmahlwerke mit Primärmaterial. A) Dissoziationseffizienz in Abhängigkeit unterschiedlicher Protokolle, Beladungsmengen und Mahlwerkstypen. B) Qualitative Auswertung des Restgewebes im Mahlwerk und Filter nach der Gewebedissoziation. C) Einzelzellsuspension nach der enzymfreien mechanischen Gewebedissoziation. Klar erkennbar ist die Population der Hepatozyten mit ihrer charakteristischen Größe von 25-40 μm in beiden Mahlwerkstypen. Schwarzer Messbalken = 100 μm.

Nach der Feststellung, dass das im Spritzgussverfahren hergestellte Mahlwerk weder die Lebensfähigkeit noch die Integrität der Zellen in Suspensionskulturen oder bei Verwendung von Primärmaterial beeinträchtigt, wurde das modifizierte Spritzgussmahlwerk für die folgenden Experimente verwendet. Des Weiteren wurde mit den Zellfiltern der Porengröße 70 µm weitergearbeitet, um eine bessere Vergleichbarkeit für weitere Versuche mit dem Benchmark-Gerät gentleMACS® zu gewährleisten, welches ebenfalls Zellfilter mit einer Porengröße von 70 µm verwendet.

6.1.3 Dissoziation von Milzgewebe

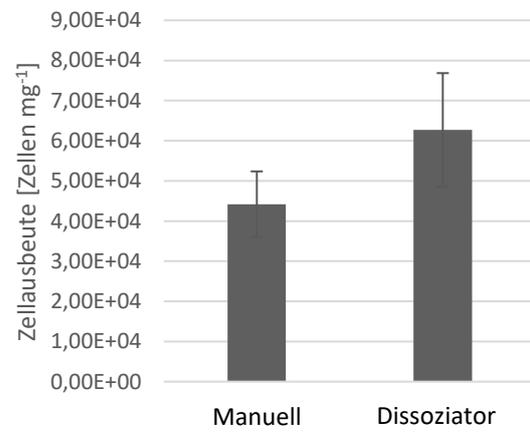
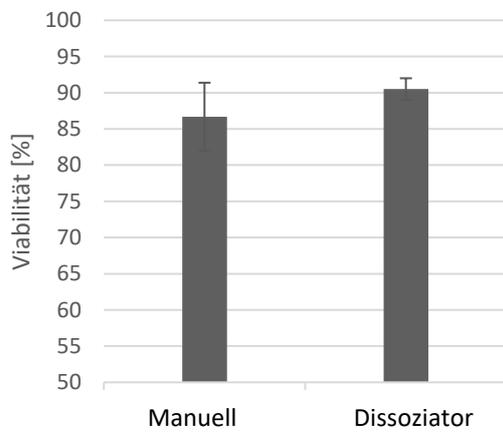
Die Milz ist ein wichtiges Organ im Immunsystem, das an der Produktion und Aufrechterhaltung von Blutzellen und der Abwehr von Infektionen beteiligt ist. Daher wird Milzgewebe in der klinischen Forschung untersucht, um besser zu verstehen, wie es bei verschiedenen Erkrankungen und Zuständen beeinflusst wird. Durch die Untersuchung von Milzgewebe können Wissenschaftler mehr über die Entstehung und den Verlauf von Erkrankungen wie Blutkrebs, Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten und anderen Erkrankungen des Immunsystems erfahren. In diesem Abschnitt wird eine angepasste Methode für die Dissoziation von Milzgewebe beschrieben. Bei diesem Ansatz wurde Milzgewebe durch ein angepasstes Protokoll dissoziiert, um eine möglichst schonende Gewebedissoziation zu erreichen. Bei diesem Protokollansatz wurde das murine Milzgewebe im Ganzen in das Mahlwerk eingebracht, um den Verlust von Probenvolumen bei der Probenvorbereitung zu vermeiden. Die Milzprobe wurde zweimal mit PBS gewaschen, um die zellulären Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend erfolgte die mechanische Dissoziation, gefolgt von der Zentrifugation. Daraufhin wurden die Zellausbeute und die Zellviabilität bestimmt sowie eine qualitative Bewertung des Grads der Einzelzellbildung durchgeführt. Die manuelle Vergleichsmethode¹⁵⁵ bestand -in einem weit verbreiteten Ansatz- darin, eine vorzerkleinerte Milz mit minimaler Kraftanwendung mittels einem weichen Gummispritzenkolben durch ein 70 µm Zellsieb zu drücken. Die Ergebnisse zeigen, dass die Dissoziation mit dem Gewebedissoziator eine höhere Viabilität und Zellausbeute als der manuelle Prozess aufweist. Nach der qualitativen Betrachtung des Vereinzelungsgrads konnte eine Vereinzelung der Gewebeproben mit einigen Zellaggregaten bei beiden Methoden festgestellt werden.

A)



Prozessschritt	Milz-Protokoll		
	Rotation	Dauer	Modus
[-]	[rpm]	[s]	schneiden/mahlen
1	7	15	s
2	-5	15	m
3	15	10	m
4	-12	20	s
5	15	10	m
6	-10	15	s
7	5	15	m

B)



C)

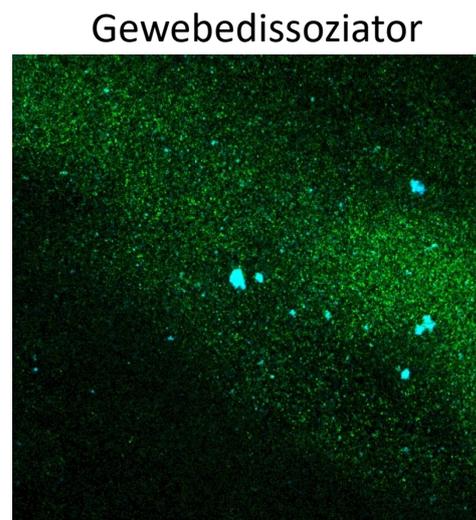
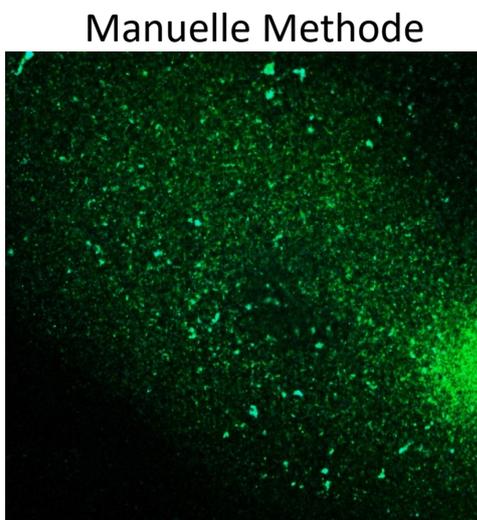
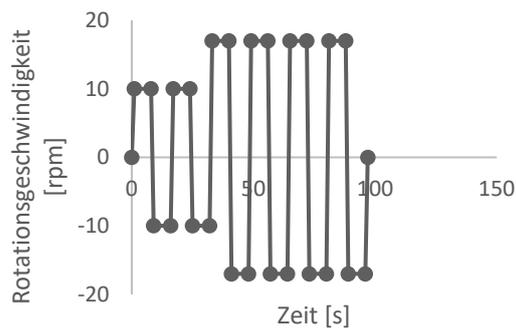


Abbildung 53: Gewebedissoziation von Milz. A) Milz-spezifisches Profil des Gewebedissoziationsprotokolls. B) Darstellung der Viabilität und Zellausbeute zwischen der manuellen Methode und dem Gewebedissoziator. C) Mikroskopische Darstellung mittels Acridine Orange-DAPI-Färbung der generierten Einzelzellsuspension mittels manueller Methode und Gewebedissoziator.

6.1.4 Dissoziation von Lebergewebe

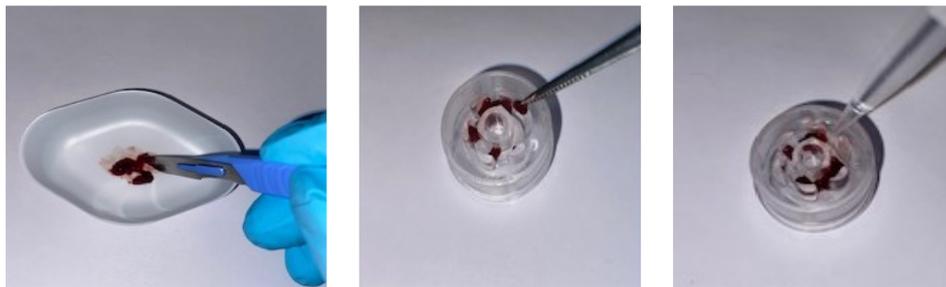
Primäre menschliche Leberzellen können die vollständige Leberfunktionalität in vivo widerspiegeln, weshalb sie für die pharmakologische und toxikologische in vitro-Forschung von großer Bedeutung und zu einem wichtigen Modellsystem für die klinische Forschung macht. Da der Zugang zu menschlichen Leberproben begrenzt ist, werden häufig Leberproben von Mäusen als Alternative verwendet, die gleichzeitig die Möglichkeit bietet, Arzneimittel in vitro zu testen. Hinzu kommt, dass die Leber ein relativ weiches Material ist, was sie zu einem geeigneten Gewebe für die Prüfung des schonenden Gewebeaufschlusses mit dem Gewebedissoziator macht. Für die Herstellung einer primären Zellkultur wurde eine teilautomatisierte mechanische Dissoziation mit dem Gewebedissoziator und eine enzymatische Dissoziation mit dem gentleMACS® durchgeführt. Daher wurden die generierten primären Zellen auf ihre Lebensfähigkeit und Zellausbeute analysiert. Für die Analyse wurden die beiden unterschiedlichen Zellzählmethoden Neubauer-Zählkammer und Nucleocounter verwendet. Da die Unterscheidung zwischen Zelltrümmern und echten Zellen in einer primären Zellkultur schwierig ist, wurde die manuelle Neubauer-Zählmethode zusätzlich mit dem automatischen Nucleocounter verglichen. Das verwendete experimentelle Dissoziationsprotokoll für den Gewebedissoziator, in Bezug auf die Gewebeinputmenge und Zentrifugationsparameter, wurde durch Vorversuche mit variierenden Prozessparametern ermittelt.¹⁵⁶ Parallel wird der enzymatische Dissoziationsverlauf mittels gentleMACS® als Benchmark mitgeführt. In Abbildung 54 ist erkennbar, dass das Gewicht von 150 mg mit einer Zellausbeute von $2,66E+08$ Zellen mg^{-1} und einer Viabilität von 96,59 % das beste Ergebnis der Zellausbeute und Zellviabilität lieferte. Ein geringeres Probengewicht von 50 mg liegt mit einer Zellausbeute von $2,48E+08$ Zellen mg^{-1} vor. Dagegen ist bei einem erhöhten Probengewicht von 300mg eine deutlich geringere Zellausbeute feststellbar. Nach der Bewertung der zellulären Lebensfähigkeit und Ausbeute wurde die Einzellsuspension auf die Dissoziationseffizienz untersucht, der durch die Differenz zwischen dem Eingangsgewicht und dem nach der Verarbeitung in den Röhrchen verbleibenden Gewebe definiert ist.

A)



Prozessschritt	Leber-Protokoll		
	Rotation	Dauer	Modus schneiden/mahlen
[-]	[rpm]	[s]	
1	10	8	s
2	-10	8	m
3	10	8	s
4	-10	8	m
5	17	8	s
6	-17	8	m
7	17	8	s
8	-17	8	m
9	17	8	s
10	-17	8	m
11	17	8	s
12	-17	8	m

B)



C)

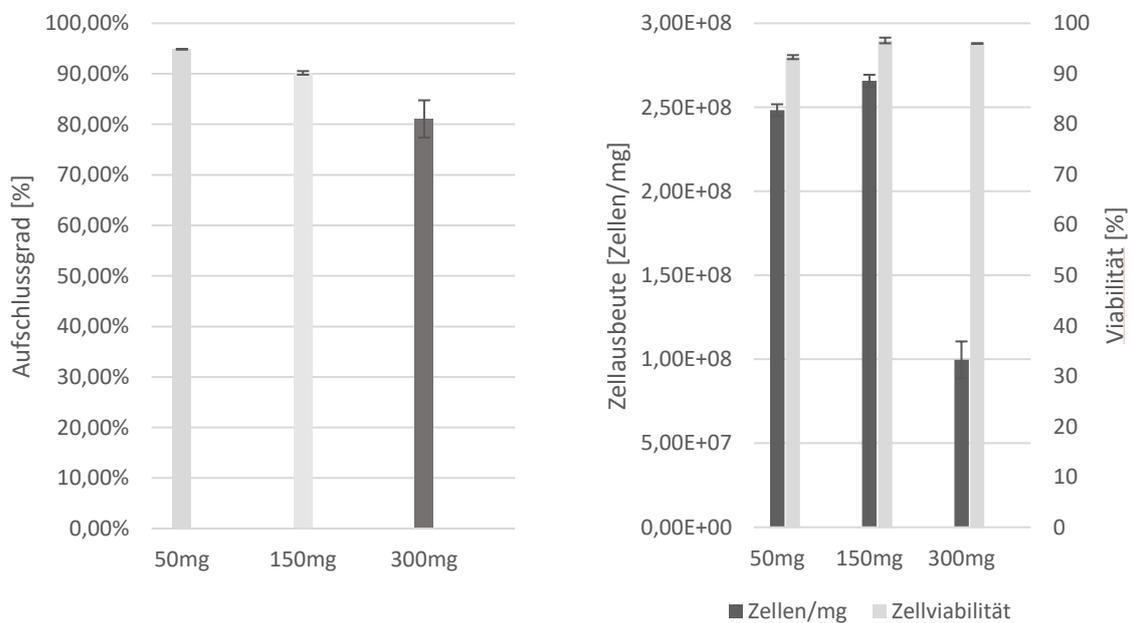


Abbildung 54: Ergebnisübersicht der Gewebedissoziation mit Lebergewebe. A) Leber-spezifisches Profil des Gewebedissoziationsprotokolls. B) Darstellung der Beladung des Mahlwerks mit Leberproben. C) Darstellung des Aufschlussgrads, Zellausbeute und Viabilität der Leberprobe nach der Dissoziation. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

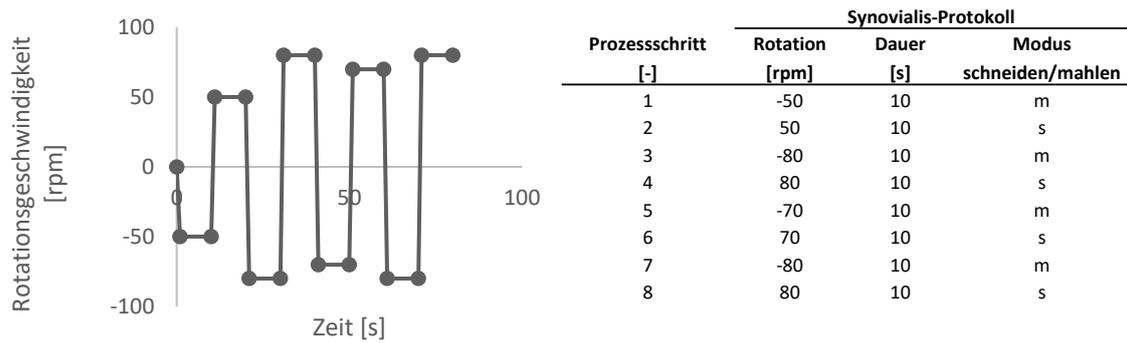
6.1.5 Dissoziation von Sinovialgewebe

In diesem Abschnitt wird, im Gegensatz zu Milzproben und Leberproben, eine Gewebeprobe verarbeitet, welche sich am oberen Ende der beschriebenen Elastizitätsskala (Absatz 2.2) befindet. Die Sinovialis ist von Gefäßen, Nerven und elastischen Fasern durchsetzt. Charakteristisch für die Morphologie der Sinoviozyten sind lange zytoplasmatische Ausläufer, mit denen sie sich untereinander verbinden. So können Zellen aus der obersten Schicht mit entfernteren Zellen in Verbindung treten.

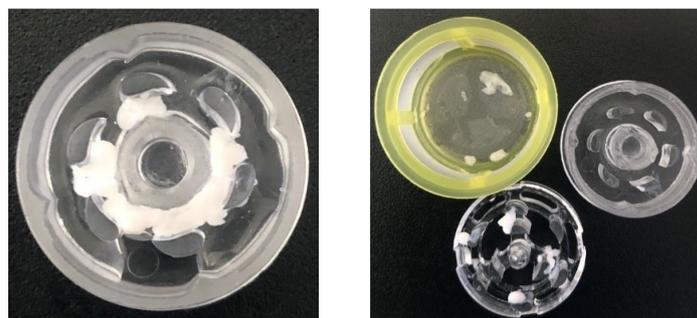
Um Sinovialiszelle aus den Gewebeproben (Schwein) zu gewinnen, wurden diese zunächst großflächig mit 70-prozentigem Isopropanol abgesprüht und unter der Sicherheitswerkbank seziiert. Dazu wurde die Sinovialis freipräpariert, indem die noch anhängenden Fett- und Fremdgewebeschichten auf der Gelenkkapsel weitestgehend entfernt wurden, ohne dabei die Sinovialis zu beschneiden. Die anschließend flächig abgetragenen Sinovialmembran wurde zweifach in PBS -/- gewaschen und für die weitere Verarbeitung in wenige Millimeter große Stücke zerteilt. Diese Stücke wurden in das Mahlwerk des Gewebedissoziators überführt und verarbeitet. Für die enzymatische Gewebedissoziation ist zunächst das Gewicht der zerkleinerte Sinovialisstücke pro Ansatz auf ein Gramm gemessen worden. Anschließend wurden diese Gewebeproben mit einer enzymatischen Mixtur bestehend aus 10ml einer 0,2%igen Kollagenase-I-Lösung (bei 200 U/mg) aus RPMI 1640 (Rosell Park Memorial Institute) + HEPES (Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäuren) + L-Glutamin mit 10%igem fetalem Bovinserum und einem Prozent Penicillin/Streptomycin versetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37° C und 60 Umdrehungen pro Minute auf einem Schüttler inkubiert. Nach 24 Stunden konnte die Suspension durch einen Zellfilter mit einer Porengröße von 70 µm abzentrifugiert werden und mit einer Zellkonzentration von $5,0E+05$ Zellen ml^{-1} in einer Gelatine-beschichteten T25-Zellkulturflasche und 5ml RPMI 1640 + HEPES + L-Glutamin mit 10% fetalem Bovinserum und einem 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät werden.

In Abbildung 55 sind unter anderem der Gewebeinput und die Gewebereste nach der Dissoziation und der Zentrifugation dargestellt. Beim Mahlwerk des Gewebedissoziators ist deutlich zu erkennen, dass noch Gewebereste im Zellsieb und am Mahlwerk anhaften. In einer quantitativen Bestimmung der Gewebereste wurde deutlich, dass im Schnitt 72,4 % der eingebrachten Gewebemenge im Mahlwerk verbleiben. Beim enzymatischen Aufschluss wird nahezu die komplette Gewebeprobe dissoziiert. Dieses Verhältnis spiegelt sich ebenfalls in der gemessenen Zellausbeute wider.

A)



B)



C)

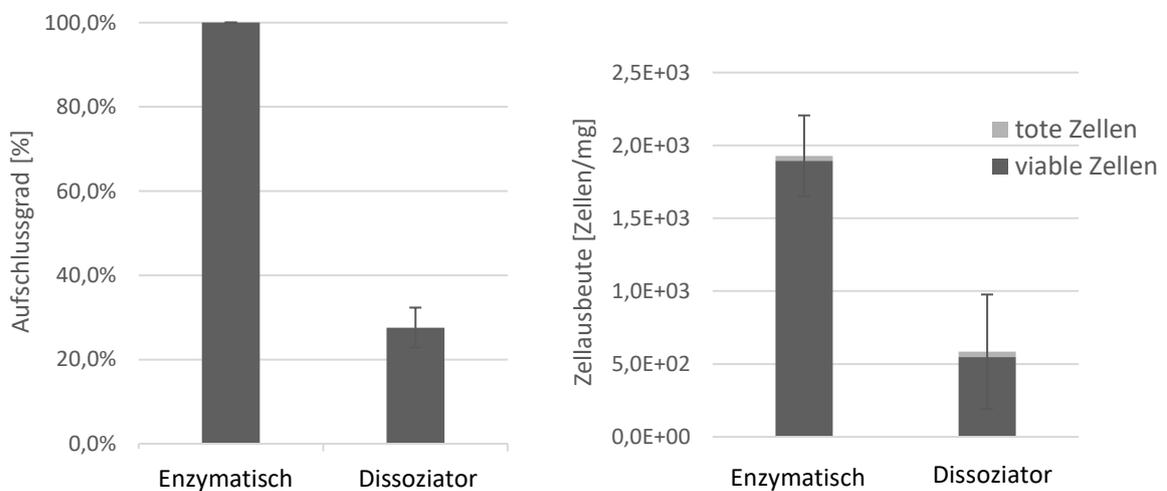


Abbildung 55: Ergebnisübersicht der Gewebedissoziation mit Sinovialgewebe. A) Sinovial-spezifisches Profil des Gewebedissoziationsprotokolls¹⁵⁷. B) Darstellung der Beladung des Mahlwerks mit Sinovialproben vor und nach der Dissoziation. C) Darstellung des Aufschlussgrads, Zellausbeute und Viabilität nach der Dissoziation.

In der Abbildung 56 sind jeweils Sofortkulturen (24 Stunden nach Dissoziation) und zweiwöchige fibroblast like synoviocytes (FLS)-Kulturen zu sehen. Die Zellen sind in beiden Kulturen sehr länglich adhäriert und gehen viele Zell-Zell-Kontakte ein. Anders als auf den Bildern der

Sofortkulturen sind nun alle Zellen entlang ihrer Längsachse ausgerichtet und bilden einen homogenen Verband mit langen zytoplasmatischen Ausläufern.

Um die Identität der Zellen nachzuweisen, wurde der spezifische Oberflächenmarker Cadherin-11 der FLS mittels AlexaFluor™ 488 konjugiertem Anti-CDH11 grün angefärbt. Zusätzlich wurde die DNS mit Hoechst® 33342 FITC blau markiert, um einen Kontrast zu bilden und Zellen von Fragmenten sowie Artefakten unterscheiden zu können.

In Abbildung 56 ist die grüne Fluoreszenzfärbung der Cadherin-11 Oberflächenmoleküle deutlich zu erkennen. Die Analyse der Zellen in allen durchgeführten Versuchen lässt darauf schließen, dass es sich um Synoviozyten handelt. Hierzu wurden Zellen aus enzymatisch und mechanisch dissoziierten Kulturansätzen angefärbt. Zweiwöchige Kulturen wurden ebenfalls angefärbt.

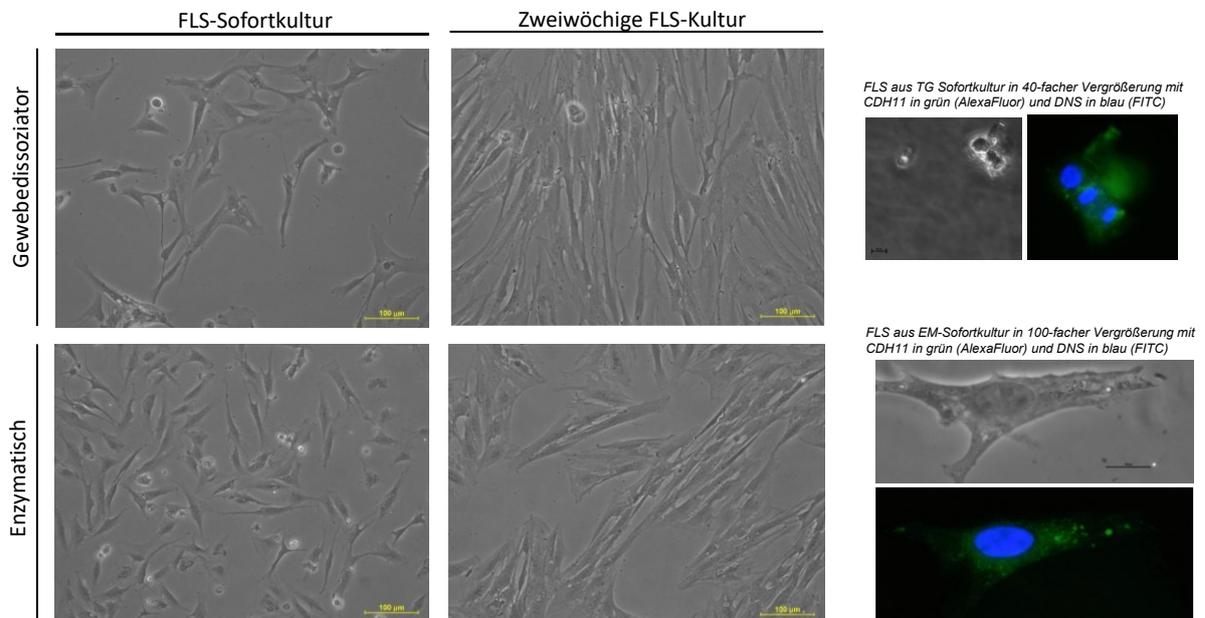


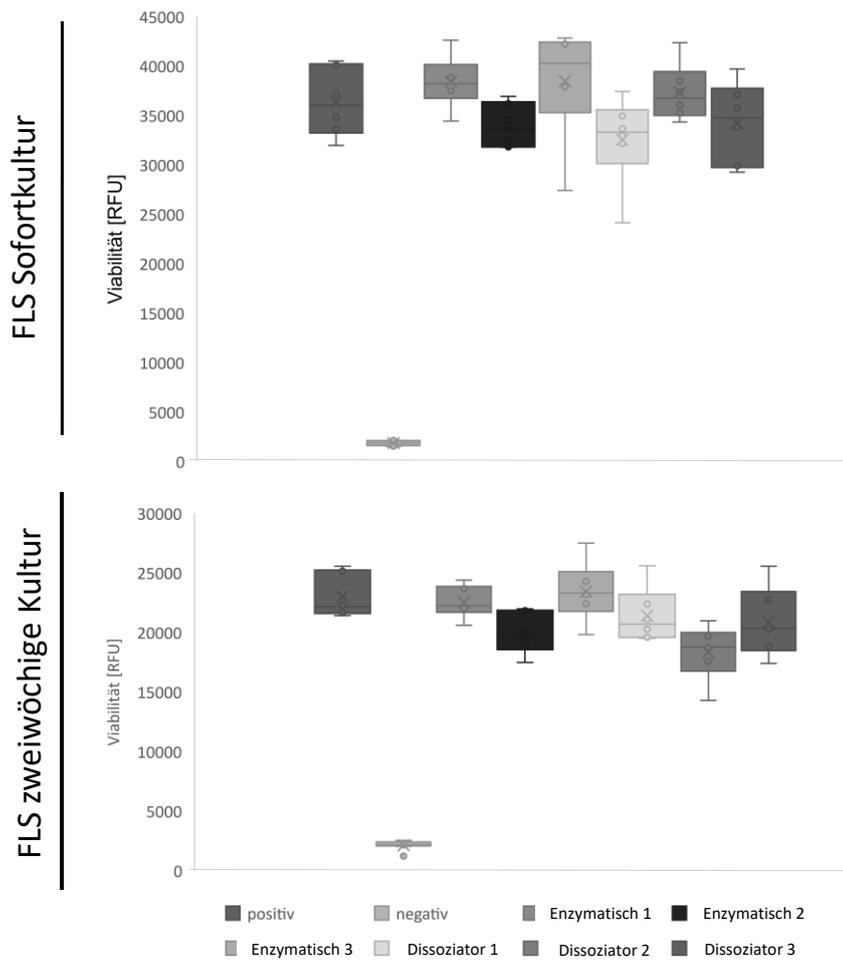
Abbildung 56: Fluoreszenzfärbung der Cadherin-11 Oberflächenmoleküle der generierten Einzelzellen.

Für die Bestimmung der Viabilität wurden jeweils enzymatisch sowie mechanisch dissoziierte Sofortkulturen, als auch solche, die sich zwei Wochen in Kultur befanden untersucht. Dazu wurden je 20.000 Zellen in eine Spalte einer 96-Well-Platte mit einer Multipipette pipettiert, das Inokulum mit Medium auf je 100 µL pro Well aufgefüllt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden in jedes Well 10 µL Resazurin zugegeben und der Startwert der Extinktion mit einem Plattenphotometer aufgenommen. Anschließend wurden die Platten nochmals für vier Stunden bei gleicher Einstellung inkubiert und der Schlusswert ermittelt. Die Differenz aus Schluss- und Startwert ergibt die Fluoreszenz des durch den Zellstoffwechsel zu Resorufin

umgesetzten Resazurins in RFU (relative fluorescence units) wieder und steht in einem direkten Verhältnis zur Stoffwechselaktivität der Zellen. Für die Positivkontrollen der Sofortkulturen wurden FLS aus einer zweiwöchigen Kultur, die enzymatisch aufgeschlossen wurden, verwendet. Für die Positivkontrollen der zweiwöchigen Kulturen wurden ebenfalls enzymatisch aufgeschlossene zweiwöchige Kulturen verwendet, welche aber in Medium mit doppeltem FBS-Anteil (20 %) kultiviert wurden. Die Negativkontrollen bestanden jeweils aus zweiwöchigen, enzymatisch aufgeschlossenen Kulturen, zu denen je fünf Mikroliter Staurosporin pro Well zugegeben wurden, um die Zelle abzutöten.

Abbildung 57 zeigt die Viabilität der Sinoviozyten nach 24 Stunden. Bei der Betrachtung der Balkendiagramme zeigten sich bei den enzymatisch dissoziierten Proben marginal größere Viabilitätswerte. In den Untersuchungen der zweiwöchigen Kulturen zeigt sich ein ähnliches Gesamtbild wie in denen der Sofortkulturen. Für die quantitative Analyse der Stressantwort der Zellen, wurde die Verteilung der MAP-Kinase p38, sowie deren phosphoryliertes Pendant mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) und Western Blot aufgenommen. In der quantitativen Auswertung zeigt sich kein Unterschied zwischen der enzymatischen und enzymfreien Dissoziation im prozentualen Anteil der phosphoryliertes Kinase p38.

A)



B)

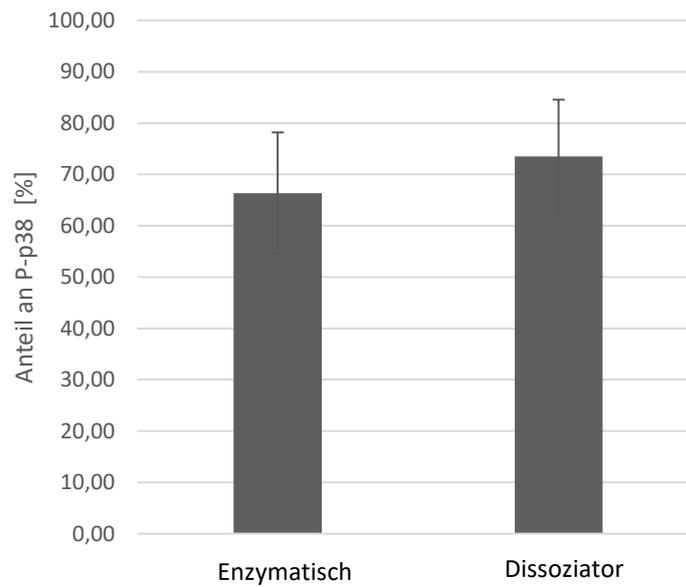
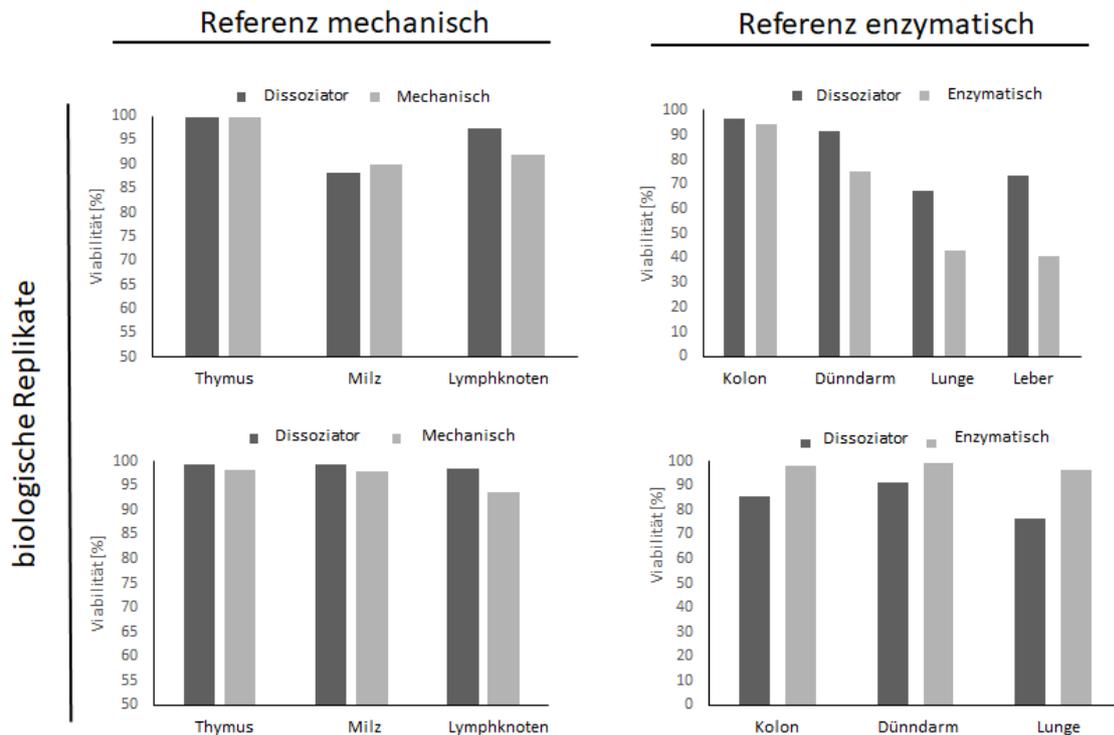


Abbildung 57: Bestimmung der Viabilität und Stressantwort mittels Resazurin Assay und Western Blot des phosphorylierten Kinase p38-Anteils. A) Resazurin Viabilitäts Assay. B) Auswertung des Western Blot zur Bestimmung der MAP-Kinase p38, sowie deren phosphoryliertes Pendant.

6.1.6 Viabilität und Zellausbeute von verschiedenen Gewebeproben von der Maus

Das nächste Ziel war es, die Leistung des Spritzgussmahlwerks mit verschiedenen Gewebeproben von Mäusen zu testen (Interne Anzeige Universitäts Medizin Mannheim, Aktenzeichen I-17/12). Zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des Systems wurden neben einem manuellen mechanischen Verfahren, auch enzymatische Verfahren als Referenzsysteme verwendet. Probematerial aus verschiedenen Gewebetypen wurden in das Spritzgussmahlwerk geladen und mit gewebespezifischen Protokollen dissoziiert, die in verschiedenen Vorarbeiten etabliert wurden.^{156,158} Für die mechanische Dissoziation mit dem Gewebedissoziator wurden die Organe gründlich mit PBS gewaschen, bevor sie in DMEM mit 2 % FBS eingelegt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelegt wurden. Die enzymatischen Protokolle wurden der Literatur entnommen und sind in Tabelle 11 im Anhang zusammengefasst. Die einzelnen Schritte für die Verwendung der spezifischen Gewebedissoziationsprotokolle sind im Anhang in Tabelle 12 zusammengefasst und basieren auf Vorversuchen. Die Dissoziation des Gewebes wurde mit dem Gewebedissoziator durchgeführt, wie in^{145,159} beschrieben. Die Gewebeprobe wurde in kleine Stücke von etwa 1-2mm geschnitten und mit 800 µl DMEM, ergänzt mit 2 % FBS, in die Rotoreinheit des Gewebedissoziators gegeben. Die Rotoreinheit wurde im Deckel eines 50-ml-Falcon-Röhrchens positioniert. Der Statoreinsatz mit einem 70-µm-Zellsieb wurde auf die Rotoreinheit gesetzt. Ein 50-ml-Falcon-Röhrchen wurde auf den Deckel gesetzt, verschraubt und auf die Gewebedissoziator-Antriebseinheit aufgesetzt (Abbildung 43). Nach dem Mahlvorgang wurde das Falcon-Röhrchen auf ein Gestell umgedreht, geöffnet und das Zellsieb mit 5 ml DMEM, 2 % FBS, gewaschen. Der Durchfluss wurde in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt und 8 Minuten lang bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 2 ml PBS, 2 % FBS gewaschen, durch ein FACS-Röhrchen mit einer Zellsiebkappe geleitet und 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugiert¹⁶⁰.

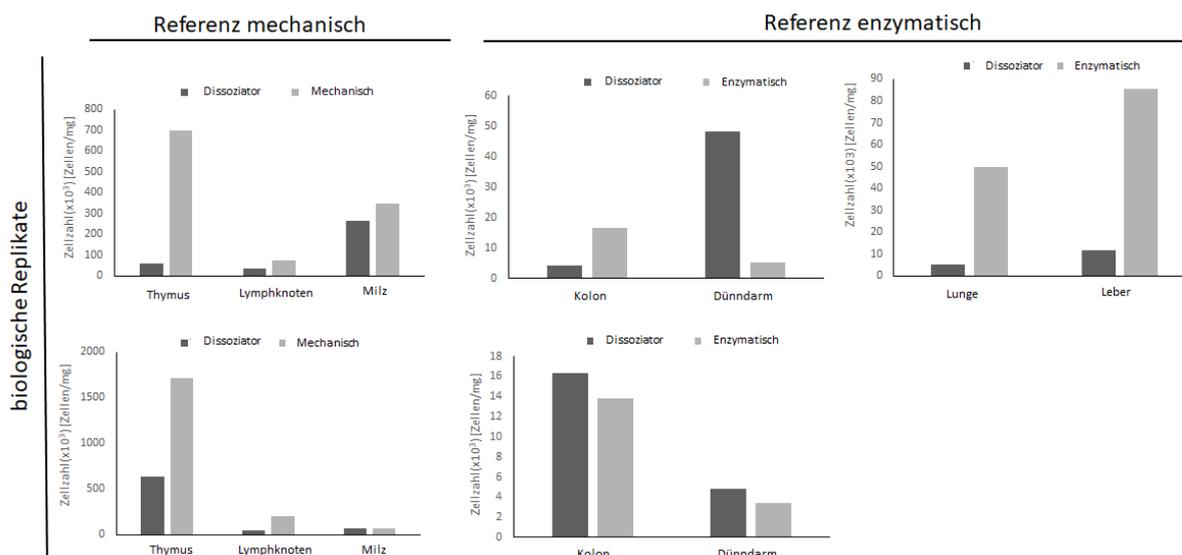


Gewebedissoziator

	Viabilität [%]		
	Biologische Replikate		
Niere	98.07	94.90	97.16
Magen	96.48	98.06	82.99
Pankreas	99.52	91.75	
Human Organoids	78.86		

Abbildung 58: Vergleich der Viabilität bei mechanischer und enzymatischer Dissoziation. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit Propidiumiodid bestimmt (für Gewebedissoziator-Daten Niere und Magen: n=3, Pankreas n=2; für enzymatische Dissoziation Niere, Pankreas und Magen: n=1; alle anderen Organe n=2).

Insgesamt wurden 10 verschiedene murine Gewebe verarbeitet. Die Lebensfähigkeit betrug in den gewonnenen Einzelzellen 70-90 % (Abbildung 58). Die Zellausbeute war vergleichbar zur enzymatischen Dissoziation und gewebeabhängig. Es wurde festgestellt dass gerade die Zellausbeute bei der enzymatischen Methode teilweise höher ausgefallen ist. Dies liegt an der Varianz in den Gewebeproben an sich, was durch die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Betrachtung der biologischen Replikate deutlich wird. Die enzymatischen Protokolle sind jedoch deutlich zeit- und materialaufwändiger. In Abbildung 59 sind die Zellausbeuten für die prozessierten Mausgewebeproben dargestellt.



Gewebedissoziator

	Zellausbeute [Zellen/mg]			
	Biologische Replikate			
Niere	9,54E+04	3,45E+04	5,09E+05	3,81E+05
Magen	3,75E+03	1,83E+03	4,88E+03	
Pankreas	2,41E+04	3,09E+04		
Herz	4,77E+04	3,79E+04		

Abbildung 59: Vergleich der Zellausbeute bei mechanischer und enzymatischer Dissoziation. Anzahl der Zellen pro mg verarbeitetes Gewebe, bestimmt durch Zellzählung mittels Neubauerzählkammer (für Gewebedissoziator -Daten Niere und Magen: n=3, Pankreas n=2; für enzymatische Dissoziation Niere, Pankreas und Magen: n=1; alle anderen Organe n=2).

Die erste Stufe des Validierungsplans bestehend aus Funktionstests, die zum einen aus mechanischen Tests und zum anderen aus ersten biologischen Tests mit unterschiedlichen Gewebetypen bestehen, wurde erfolgreich abgeschlossen. Hier wurden insbesondere die technische Integration der Komponenten, sowie die biologische Robustheit und Machbarkeit des Systems in Bezug auf unterschiedliche Gewebeproben getestet, bevor im folgenden Abschnitt der entwickelte Gewebedissoziator in klinischen Anwendungsfällen validiert wird. Unter Realbedingungen soll damit die Tauglichkeit des Systems und die Vorteile gegenüber dem Stand der Technik gezeigt werden. Durch den Test des aufgebauten Demonstrators und dessen Erprobung in klinisch relevanten Einsatzfällen mit repräsentativen Gewebeproben, wird der Nachweis der technischen Machbarkeit erbracht und eine Überprüfung und Bewertung der Forschungsarbeit ermöglicht.

6.2 Anwendungsspezifische Validierung

Die Zukunft der personalisierten Diagnostik beginnt auf der Ebene der einzelnen Zelle. Selbst High-End-Technologien wie Next Generation Sequencing können verbessert werden, wenn sie auf reine Einzelzellpopulationen (z. B. Tumorzellen ohne kontaminierende Stromazellen) oder auf Einzelzellebene (DNA/RNA-Sequenzierung) angewendet werden. Die überwiegende Mehrheit dieser Technologien benötigt einzelne und möglichst unversehrte Zellen für den Analyseprozess. Entscheidende Voraussetzung für die High-End-Analytik ist daher, die Zellen möglichst schonend aus ihrer Gewebematrix zu entfernen. Dies kann durch einen enzymfreien, schnellen und reproduzierbaren Ansatz der Gewinnung von reinen und individuellen Einzelzellen aus Gewebeproben erreicht werden. In diesem Kapitel wird die Anwendbarkeit des entwickelten Gewebedissoziators für die mechanische, nicht-enzymatische und parallele Verarbeitung von Gewebeproben an klinisch-relevanten Anwendungsbeispielen demonstriert.

6.2.1 Ein Schritt zur enzymfreien Gewebedissoziation

Nach der erfolgreichen Optimierung eines mechanischen Dissoziationsprotokolls für Lebergewebe, soll der Gewebedissoziator mit dem enzymatischen Verfahren des gentleMACS®, als Benchmark-Gerät, verglichen werden. Um die Anwendbarkeit des Demonstrators zu zeigen, wurde die Viabilität, die Zellausbeute und der Dissoziationsgrad von murinen Leberproben überwacht. Frisch isoliertes murines Lebergewebe wurde in RPMI-Medien ins Labor transportiert und für den Versuch auf Eis gelegt. Die Proben wurden innerhalb von 2 h nach der Entnahme verarbeitet, um eine maximale Zellviabilität zu gewährleisten. In Abbildung 60 ist der Versuchsverlauf dargestellt. Für diesen Versuch wurde der entwickelte Gewebedissoziator und der gentleMACS® Dissociator von Milteny Biotec eingesetzt. Für den gentleMACS® wurden C-Röhrchen verwendet. Die Probenvorbereitung und -aufbereitung mittels gentleMACS® erfolgte entsprechend dem kommerziell erhältlichen Leberenzym-Kit (Best.-Nr.:130 105 807) von Miltenyi Biotec. Gewebeproben für den Gewebedissoziator wurden ohne Enzymzusatz verarbeitet. Nach der Erzeugung der Einzelzellen und der Qualitätsbestimmung der Suspension wurden im nächsten Schritt die Zellen zu dreidimensionalen Sphäroiden kultiviert. Hierzu wurde die generierte Zellsuspension der beiden Verfahren in speziell beschichteten Biofloat-Platten, so genannten non-attachment-Platten, der Firma FaCellitate kultiviert.

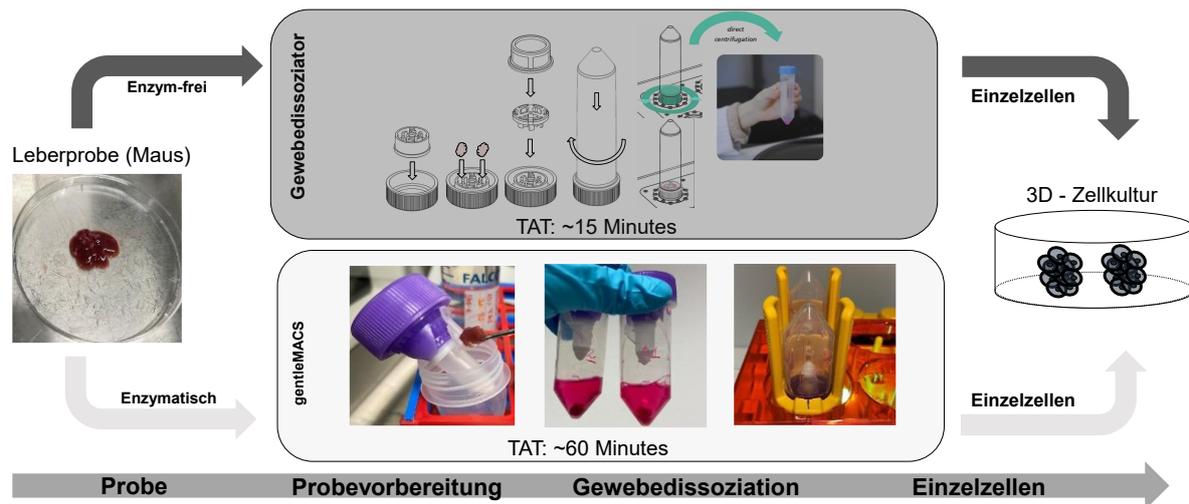
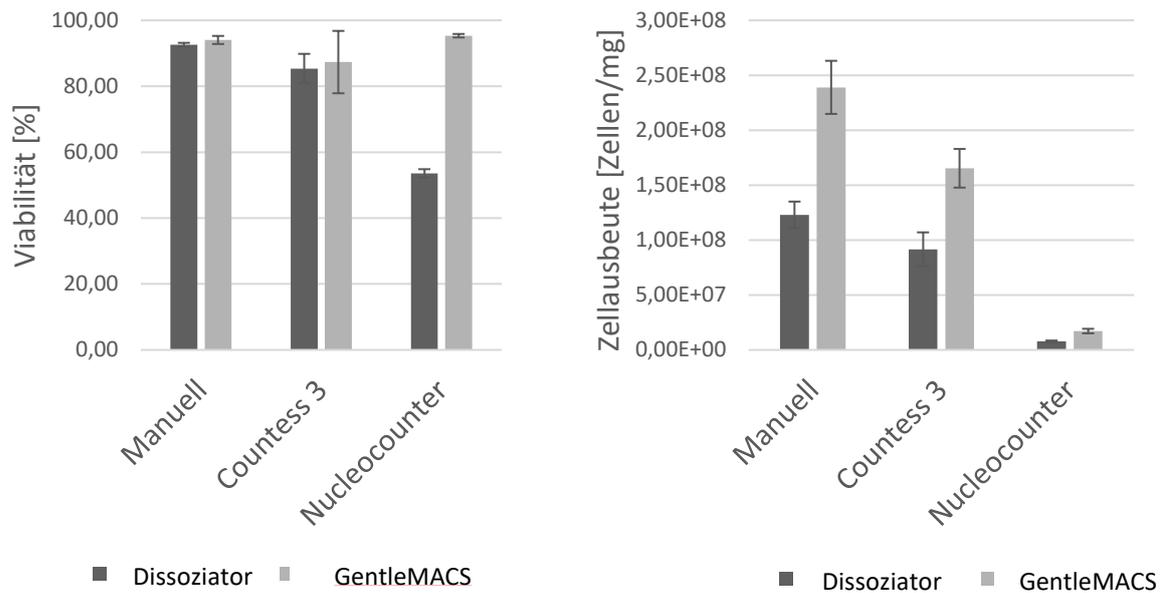


Abbildung 60: Darstellung des Arbeitsablaufs zur Dissoziation von Leberproben mittels Gewebedissoziator und gentleMACS® bis zur Kultivierung als Sphäroide.

Um eine Einzelzellsuspension aus einer Gewebeprobe mit dem enzymatischen Verfahren mittels gentleMACS® isolieren zu können, müssen zunächst die im Kit enthaltenen Enzyme vorbereitet werden. Hierfür wird den einzelnen Vials, abhängig vom Enzym, mit 1ml an DMEM und stabilem Glutamin versetzt. Die Enzyme müssen sich vollständig lösen und anschließend aliquotiert werden. Anschließend kann mit der eigentlichen enzymatischen Gewebedissoziation fortgefahren werden. Hierfür wird das steril verpackte GentleMACS C-Tube unter der Sterilwerkbank geöffnet und darin der Dissoziationsmix vorbereitet. Im nächsten Schritt wird das gewünschte Probengewicht abgewogen, üblicherweise 750-1200 mg, mit DMEM abgespült und mit Hilfe einer Pinzette in das C-Tube mit dem vorbereiteten Dissoziationsmix überführt. Das C-Tube wird fest verschlossen und umgekehrt auf die Portstelle des gentleMACS® aufgesetzt. Zusätzlich wird das Heizsystem aufgesetzt und das gewünschte, an das Gewebe und Kit angepasste, Programm durchgeführt. Nach Beendigung des Aufschlusses wird das C-Tube vom Gerät abgenommen und muss vor der Zentrifugation separat gefiltert werden. Nach der Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in der gewünschten Volumen Medium resuspendiert. Für einen ersten Test wurde das Dissoziationsröhrchen des Gewebedissoziators mit frisch resezierten murinen Leberproben getestet. Die Dissoziationsexperimente wurden wie in 6.1.3 beschrieben durchgeführt. Um Ergebnisse der nicht-enzymatischen Zelldissoziation durch des Gewebedissoziators im Vergleich zur enzymatischen Standardbehandlung durch den gentleMACS® zu ermitteln, wurde eine Zellzählung, die Bestimmung der Zellviabilität und eine qualitative mikroskopische Analyse der Zellsuspensionen durchgeführt. Die Ergebnisse der verschiedenen Zellzählmethoden, Neubauer Zählkammer, Countess3 und Nucleocounter, wurden verglichen. Abbildung 61 zeigt die Zellausbeute in Zellen pro mg nach Auszählung mit den verschiedenen Zellzählmethoden. Die Ergeb-

nisse der Neubauer-Methode und der Countess-Messung wiesen eine große Bandbreite zwischen $1,05E+08$ und $6,95E+08$ Zellen pro mg Gewebeprobe auf. Im Vergleich dazu waren die Zellzahlen des Nucleocounters niedriger, aber mit deutlich geringer Standardabweichung. Die Ergebnisse lagen zwischen $1,13E+08$ und $2,97E+08$ Zellen pro mg Gewebeprobe. In Abbildung 61 wurden die mit der Neubauer-Zählkammer und dem Nucleocounter ermittelten Viabilitätswerte verglichen. Die mit der Neubauer-Zählkammer und Countess ermittelten Viabilitäten waren bei jedem Lauf zwischen 80 % und 90 %. Mit dem Nucleocounter reichten die Viabilitäten von 53 % bis 95 %. Bei der Betrachtung der erzeugten Einzelzellsuspensionen der beiden Verfahren unter dem Mikroskop, so fallen bereits morphologische Unterschiede der Zellen in den Zellsuspensionen auf. Um Kontaminationen der Probe zu vermeiden, wurde der Aufschlussgrad nicht separat berechnet und nur rein optisch nach erfolgter Dissoziation bewertet. Im C-Tube des gentleMACS® waren keine Gewebereste mehr nachzuweisen. Im Gewebedissoziator wurde, wie bereits in der Protokolloptimierung (Abschnitt 6.1.4) erläutert, ein hoher Aufschluss von 90-95 % erzielt.

A)



B)

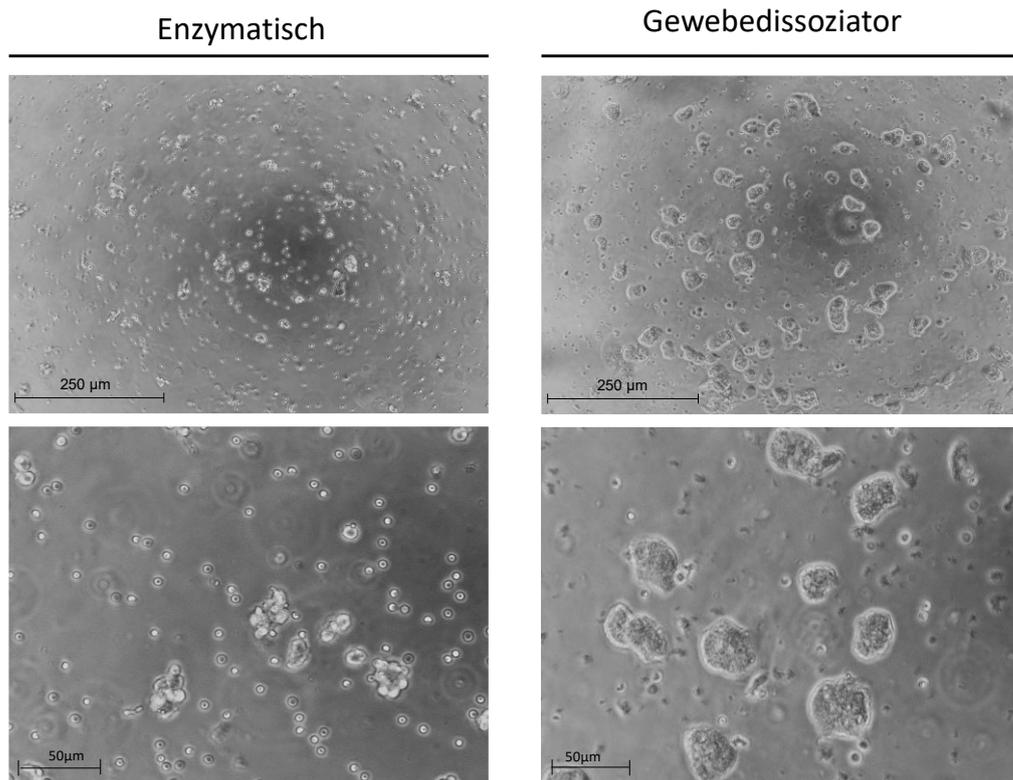


Abbildung 61: Zellausbeute und Viabilitätsbestimmung nach Dissoziation von Lebergewebe mittels Gewebedissoziator und gentleMACS®. A) Die Zellausbeute und Viabilitätsbestimmung nach der Dissoziation von Lebergewebe wurde mittels manueller Zellzählmethode, Countess und Nucleocounter bestimmt B) Mikroskopisches Bild der generierten Zellsuspensionen aus Gewebedissoziator und GentleMACS®.

In der Zellsuspension des Gewebedissoziators, Abbildung 61, ist vor allem eine Zellpopulation mit auffallender Größe von 25-40 μm erkennbar. In der Zellsuspension des gentleMACS® dagegen, finden sich keine Zellen in diesem Größenbereich. Um die Eigenschaften dieser charakteristischen Zellen genauer zu untersuchen, wurde die Echtzeit-Verformbarkeitszytometrie (RT-DC) angewendet. Die Echtzeit-Verformbarkeitszytometrie (RT-DC) ist eine Hochdurchsatzmethode zur mechanischen Charakterisierung einzelner Zellen in Suspension.¹⁶¹ Die RT-DC-Analyse ermöglichte es markierungsfrei zwischen Subpopulationen von Zellen zu unterscheiden und weitere Informationen aus Einzelzellbildern zu extrahieren, wie z. B. die Verformbarkeit. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass sie nicht zerstörerisch ist und die Zellen weiterverwendet werden können. Außerdem kann eine Zellpopulation von Interesse ohne Markierung nach bildbasierten Parametern sortiert werden. Darüber hinaus ergab die RT-DC-Untersuchung einzelner Zellsuspensionen, die durch enzymatische und mechanische Dissoziation entstanden waren, unterschiedliche Populationsverteilungen für bestimmte Gewebetypen¹⁶⁰. Die mechanische Dissoziation von Lebergewebe führte im Vergleich zu enzymatisch behandelten Proben zu einer Anreicherung von größeren Zellen. Hepatozyten wurden als Zellen in der Leber identifiziert, deren Zellquerschnittsfläche zwischen 150 μm^2 und 800 μm^2 lag.¹⁶⁰

Nach der Optimierung eines geeigneten Protokolls für den Gewebedissoziator und der Zellcharakterisierung steht eine weiterführende Kultivierung der erzeugten Einzelzellsuspension aus Lebergewebe im Vordergrund. Hierfür wurde die Kultivierung zu dreidimensionalen Zellaggregaten, den sogenannten Sphäroiden, unter Zuhilfenahme von low-attachment Platten der Firma FaCellitate, durchgeführt. Für die 3D-Kultivierung der Einzelzellsuspension aus Leberproben mittels Gewebedissoziator, wird auch die enzymatisch gewonnene Einzelzellsuspension mittels gentleMACS® als Referenz mitgeführt. Für die genauere Charakterisierung der generierten Sphäroide werden diese über das Programm Fiji ImageJ untersucht.¹⁶²

Die mit dem Gewebedissoziator und gentleMACS® erzeugten Zellsuspensionen wurden zunächst in 96-Multiwellplatten kultiviert mit einer Einsaat von ca. $2,5E04$ Zellen pro Well (Abbildung 63).

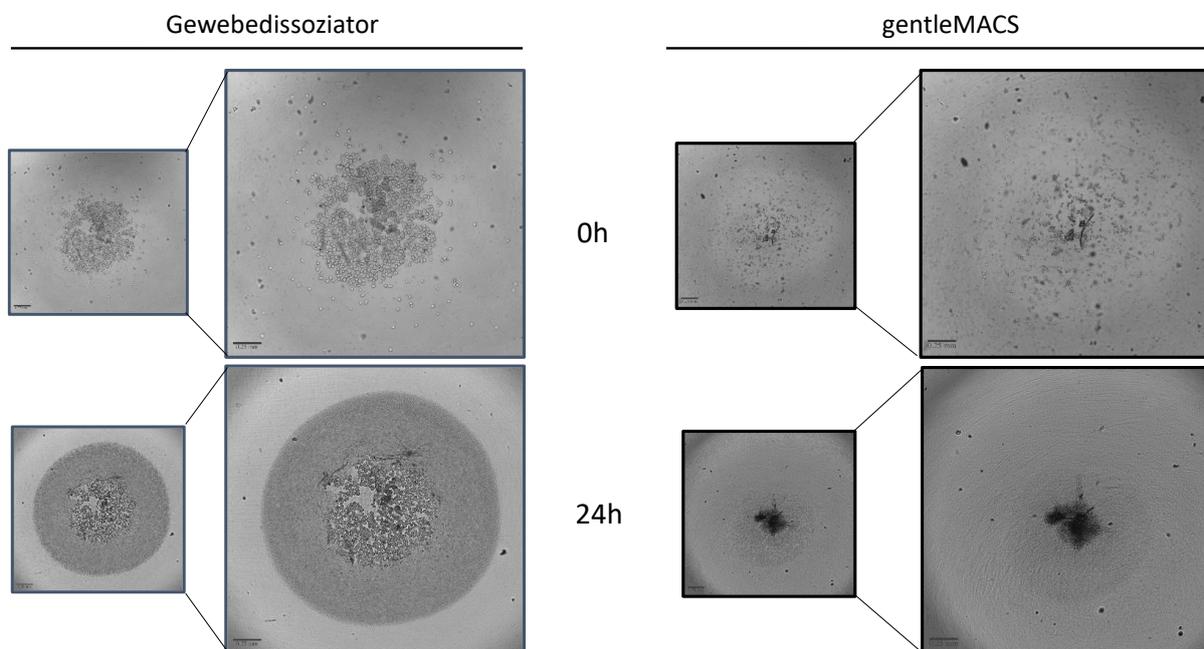


Abbildung 63: Gewebedissoziator und gentleMACS® Einzelzellsuspension nach Dissoziation

Die Kultivierung erfolgte über eine Zeitdauer von acht Tagen, mit $t=0$ bis $t=7$, wobei $t=0$ den Zeitpunkt direkt nach der Zellaussaat definiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen in umgeschichteten 96-Multiwellplatten ausgesät. In diesen Kulturschalen waren Zellen sichtbar, die von der Kunststoffoberfläche abgelöst wurden, was zu einem nicht-konfluenten Wachstum führte. Daher wurde für die weiteren Versuche lediglich mit der Biofloat 96-Wellplatte gearbeitet (Abbildung 64). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die generierten Sphäroide bezüglich ihrer Fläche, ihrer Dichte und ihrer Zirkularität mit der Software ImageJ analysiert. Die Einstellungen für die Helligkeit und Belichtungszeit wurden konstant gehalten, damit aussagekräftige und vergleichbare Daten erhoben werden konnten.

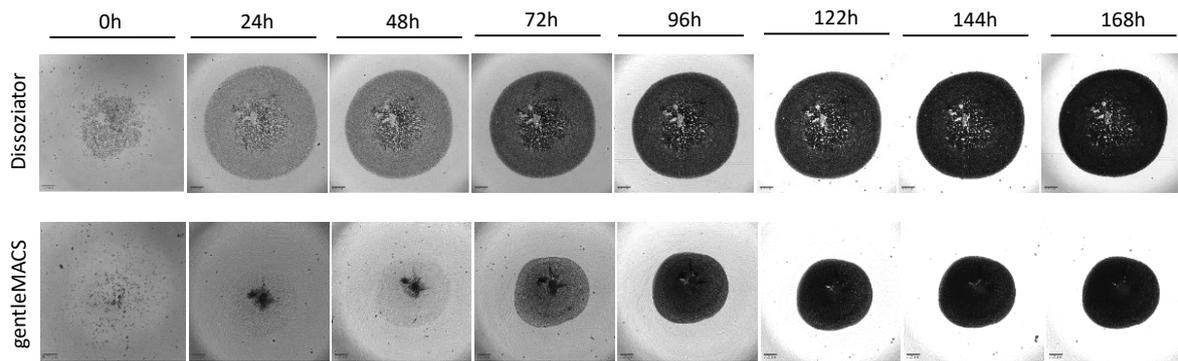


Abbildung 64: 3D-Kultivierung der enzymfreien und enzymatischen Zellsuspensionen aus Lebergewebe über einen Zeitraum von 168h (8 Tage).

Zunächst wird die Sphäroidbildung in Bezug auf ihre Fläche, Dichte und Zirkularität untersucht. Die Fläche der erzeugten Sphäroide hängt mit der nachfolgenden Formel proportional vom Radius und damit vom gemessenen Durchmesser ab.

$$\text{Fläche (A)} = \pi \times r^2$$

Formel 9: Bestimmung der Sphäroidfläche

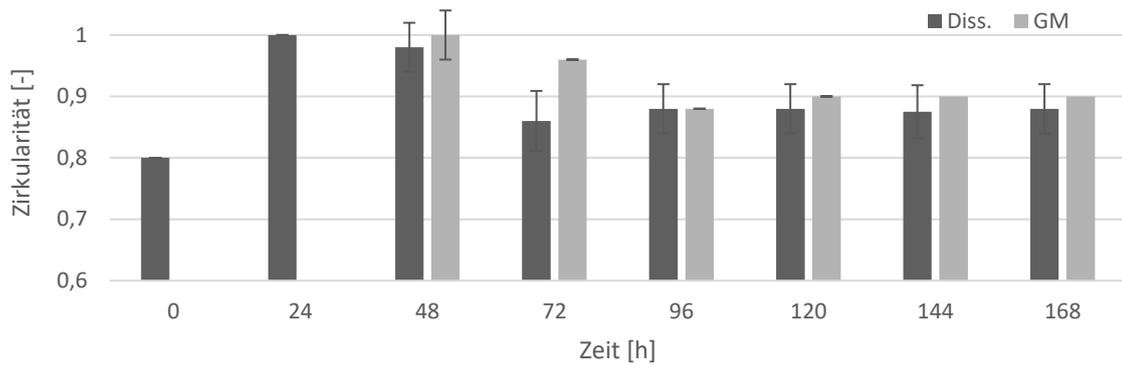
Die Dichte wird über den sogenannten „Mean grey value“ ermittelt, wobei die Summe der Grauwerte aller Pixel in der Auswahl in den Bezug zu Gesamtanzahl der Pixel gesetzt wird. Zusätzlich erfolgt die Ermittlung der Zirkularität, die auch als Kreisform bekannt ist. Sie vergleicht den Umfang einer Form mit der Fläche, die sie enthält und wird nachfolgender Formel ermittelt, wobei A die Fläche und U den Umfang angibt.

$$\text{Zirkularität (C)} = 4\pi \times AU^2$$

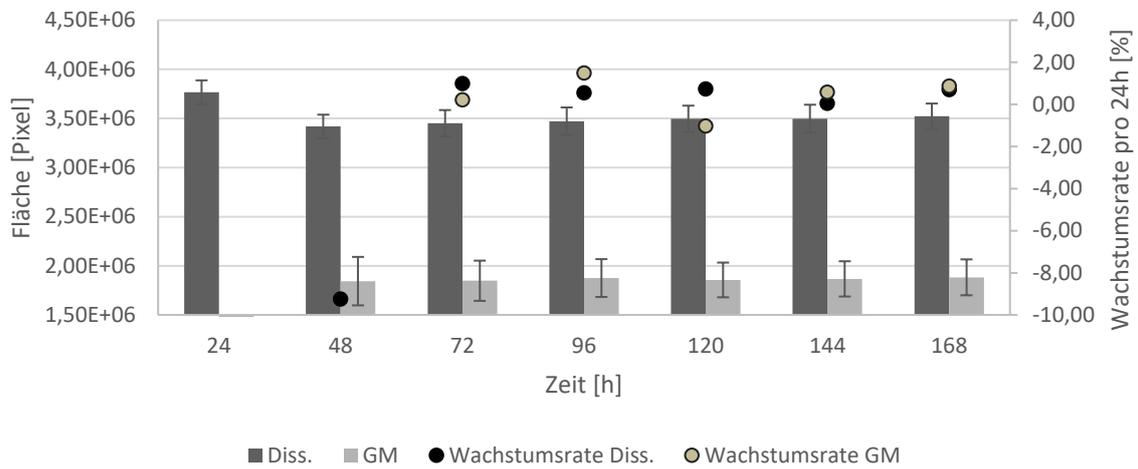
Formel 10: Bestimmung der Sphäroid Zirkularität

Bereits bei der optischen Beurteilung der Sphäroide können klare Unterschiede festgestellt werden. Die Sphäroide aus der Gewebedissoziator erzeugten Zellsuspension zeigen einen deutlich höheren Durchmesser und damit verbunden eine höhere Zunahme in ihrer Fläche, im Vergleich zur gentleMACS® erzeugten Suspension. Die generierten Sphäroide weisen nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen eine vergleichbare Dichte auf. Hierbei wurden bei den Gewebedissoziator-Sphäroiden (Abbildung 65) Daten ab Tag eins ermittelt, wohingegen das Sphäroid des gentleMACS®, erst ab Tag zwei auswertbar war. Um ein aussagekräftiges Ergebnis vorlegen zu können, wurden jeweils fünf Sphäroide vermessen, der Mittelwert gebildet und mit ihrer Standardabweichung dargestellt. Gleichzeitig ist die Hepatozytenpopulation zentriert zu finden, die, wie bereits im Vergleich in Abschnitt 6.2.1 festgestellt, nicht in der gentleMACS® erzeugten Suspension vorhanden ist.

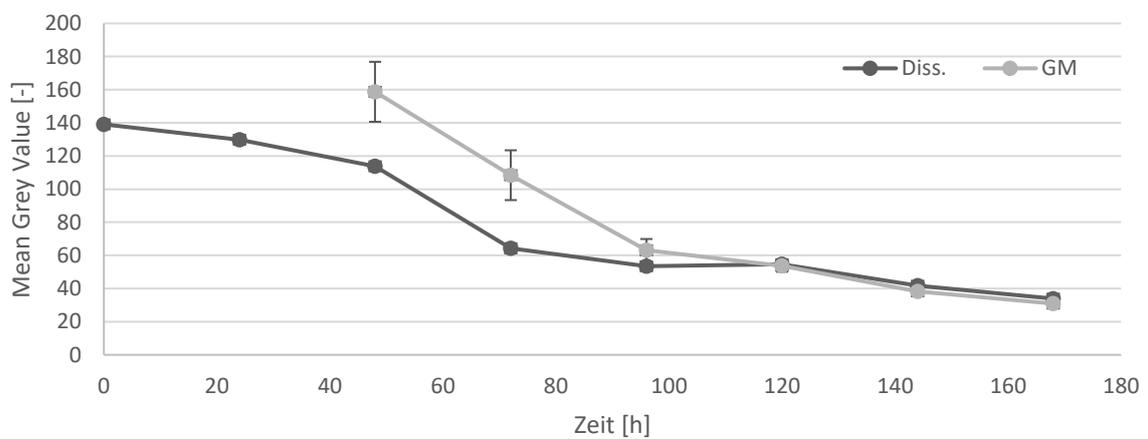
A)



B)



C)



D)

Zeit [h]	Dissoziator			GentleMACS		
	Fläche [Pixel]	Grey Mean Value [-]	Zirkularität [-]	Fläche [Pixel]	Grey Mean Value [-]	Zirkularität [-]
0	-	139,1	0,80	-	-	-
24	3766173,8	129,8	1,00	-	-	-
48	3417934,0	113,8	0,98	1843870	158,7	1,00
72	3451848,5	64,3	0,86	1847837	108,4	0,96
96	3470913,6	53,5	0,88	1875424	63,1	0,88
120	3496350,8	54,7	0,88	1855990	53,7	0,90
144	3498018,7	41,7	0,88	1866776	38,3	0,90
168	3522363,3	33,9	0,88	1882847	30,9	0,90

Abbildung 65: Sphäroid-Analyse Gewebedissoziator (Diss.) und gentleMACS® (GM) über eine Kultivierungsdauer von 8 Tagen. A) Darstellung der Zirkularitäten der einzelnen Sphäroide. B) Darstellung der Fläche und der Wachstumsrate C) Darstellung des Verlaufes des Mean grey Values. D) Tabellarische Übersicht der gemessenen Parameter.

Nachdem die Sphäroide 168 Stunden kultiviert worden waren, wurden die Lebensfähigkeitstests durchgeführt. Die Ergebnisse des CellTiterGlo® 3D Cell Viability Assay sind in Abbildung 66 dargestellt. Der Lebensfähigkeitstest zeigt bei beiden Varianten lebende Zellen, auch der charakteristische nekrotische Sphäroidkern ist zu erkennen.

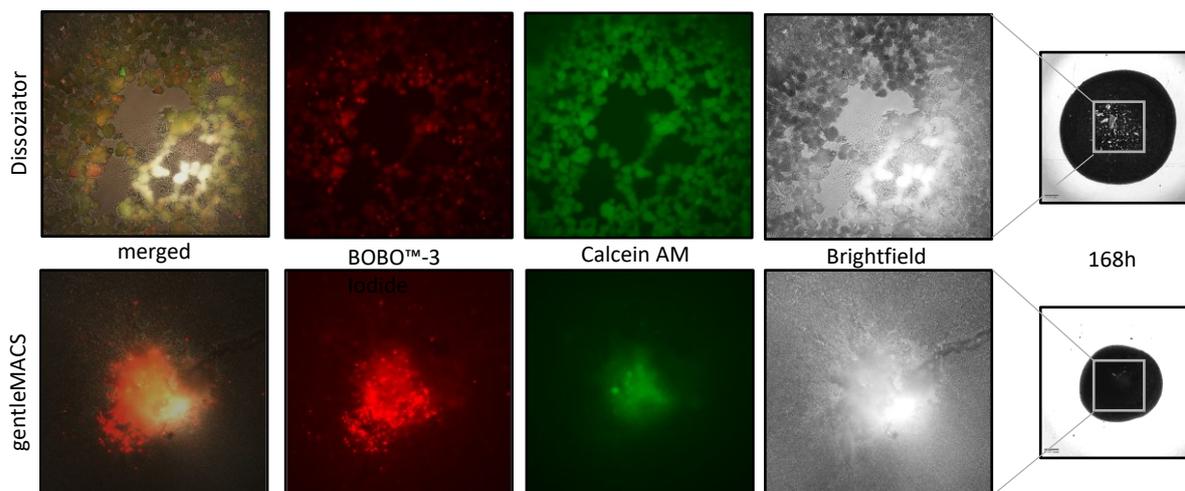


Abbildung 66: Bestimmung der Viabilität von den generierten Sphäroiden mittels CellTiterGlo® 3D Cell Viability Assay nach 168 Stunden Kultivierungsdauer. Calcein AM wurde als Lebendfarbstoff und BOBO-3 als Todfarbstoff eingesetzt.

6.2.2 Enzymfreie Gewebedissoziation von Tumorproben

In diesem Abschnitt wird ein kompletter Arbeitsablauf für die enzymfreie Prozessierung von primären humanen Krebsgewebeproben in Einzelzellen demonstriert.¹⁴² Für diesen Arbeitsablauf war es entscheidend, trotz struktureller Unterschiede in den Eigenschaften der prozessierten Gewebeproben, lebensfähige Einzelzellen für die weitere Kultivierung bereitzustellen. Zur Bewertung des Stressfaktors, der durch die mechanische Gewebedissoziation verursacht wird, wurden die erzeugten Einzelzellen zusätzlich auf Anzeichen von Apoptose untersucht.

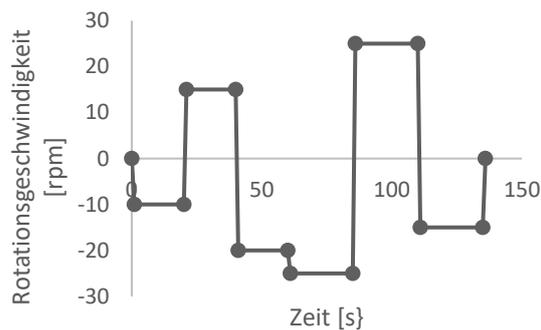
Der angewandte Ablauf wurde im Vergleich zur Standard-Explantationsmethode analysiert. Die Gewebedissoziationsmethode und die Explantationsmethode wurden anhand folgender Kriterien bewertet: Zeit für die Probenpräparation, Effizienz der Zellisolation, Zeitspanne bis zum Beginn des Zellwachstums und das Ausmaß des Stressniveaus. Diese Studie wurde von 2019 bis 2021 durchgeführt. In dieser Zeit wurden 33 chirurgisch resezierte Tumorproben mit dem Gewebedissoziator bearbeitet, um seine Fähigkeit zu bewerten, lebende Zellen aus verschiedenen Tumorgeweben zu isolieren. Diese bearbeiteten Tumorproben stammten hauptsächlich aus dem Pankreas, der Leber und dem Dickdarm-Rektal-Bereich. Einige seltene Tumorentitäten wie Gallengangkrebs, Dickdarmkrebs, Analkrebs, Gebärmutterkrebs-Metastasen, Magenkrebs und eine Metastase von Karzinom unbekannter Herkunft (CUP) wurden ebenfalls verarbeitet.

Chirurgisch resezierte Tumorgewebe wurden entnommen und innerhalb einer Stunde mit zwei verschiedenen Techniken zur Isolierung der Zellen verarbeitet - Explantatmethode und unter Verwendung des Gewebedissoziators. Diese Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Universitätsmedizin Mannheim genehmigt (2012-293N-MA), und alle Spender gaben ihre schriftliche, informierte Zustimmung.

Primäres Tumorgewebe wurde mit PBS gewaschen, das mit 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10.000 Einheiten/mL/Streptomycin (10.000 µg/mL)-Lösung, Gibco, Life Technologies Limited, USA) ergänzt wurde. Blutgetränkte Gewebeproben wurden mit Ammoniumchloridlösung (Stemcell Technologies, Kanada) gewaschen, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde das Gewebe in kleine Stücke mit einem Durchmesser bzw. einer Kantenlänge von 1-2 mm geschnitten. Anschließend wurden die Gewebestücke gewogen und eine gleiche Menge des Gewebes wurde für die Zellisolation mittels Explantatmethode und Gewebedissoziator aufbereitet. Für die Explantatkulturen wurde das gewogene, gewürfelte Tumorgewebe in Sechs-Well-Platten mit 3 ml Dresden-Medium für mindestens sechs Wochen kultiviert, um das Auswachsen der Zellen zu ermöglichen. Alle Zellen erhielten Dresden-Medium, eine Mischung aus zwei Dritteln des üblichen DMEM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), ergänzt mit 10% FBS (Gibco, Life Technologies Limited, USA) und 1 % Penicillin (10, 000 Einheiten/mL)/Streptomycin (10.000 µg/mL)-Lösung (Gibco, Life Technologies Limited, USA) und einem Drittel Wachstumsmedium für Keratinozyten (Gibco, Life Technologies Limited, USA), ergänzt mit Bovinem Hypophysenextrakt (25 mg) und EGF Human Recombinant (2. 5 µg) (Gibco, Life Technologies Limited, USA). Dieses Medium wurde bei früheren erfolgreichen Versuchen bei der Gewinnung von Zelllinien aus Primärgewebe etabliert. Das Kulturmedium wurde mindestens zweimal pro Woche gewechselt. Die Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:6 passagiert, sobald sie konfluent wurden.

Die Kultur wurde bei 37 °C mit 5 % CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre gehalten. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Wenn nach sechs Wochen Kulturzeit kein Zellwachstum beobachtet wurde, wurden die Kulturplatten verworfen.

Die sterilen Einweg-Röhrchensets für den Gewebedissoziator wurden geöffnet und durch Einrasten des Stators in das Zellsieb zusammengesetzt. Stator und Rotor mit Zellsieb wurden mit 1 ml Dresden-Medium gespült. 100-200 mg der vorbereiteten Gewebestücke wurden in den Rotor transferiert (mit einer 1 ml Pipette). In Abbildung 67 ist das verwendete Protokoll für die Versuchsreihe dargestellt, welches bereits in Vorarbeiten erarbeitet wurde.¹⁵⁸



Prozessschritt	Tumor-Protokoll		
	Rotation	Dauer	Modus
[-]	[rpm]	[s]	schneiden/mahlen
1	-10	20	m
2	15	20	s
3	-20	20	m
4	-25	25	m
5	25	25	s
6	-15	25	m

Abbildung 67: Schritte des Gewebedissoziator-Programms, die für die Verarbeitung des Gewebes verwendet werden. Es werden sechs unterschiedliche Schritte dargestellt, jeweils mit dem darin ablaufenden Prozess, der Geschwindigkeit und der Zeitspanne. Die Gesamtdauer des Programms beträgt folglich 2 Minuten und 45 Sekunden.

Nach der 2:45-minütigen Dissoziation wurde das Röhrchen in der Laminar-Flow-Arbeitsbank wieder geöffnet. Zell- und Gewebereste wurden mit 1 ml Dresden-Medium in das Zellsieb und das Röhrchen gespült, um sicherzustellen, dass alle Zellen im Röhrchen gesammelt werden. Das Zellsieb, einschließlich des Stators, wurde aus dem Röhrchen entfernt und für 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 3 ml Dresden-Medium resuspendiert und in einer separaten Vertiefung einer Sechs-Well-Platte für jeden Lauf kultiviert. Der komplette Arbeitsablauf ist in Abbildung 68 dargestellt.

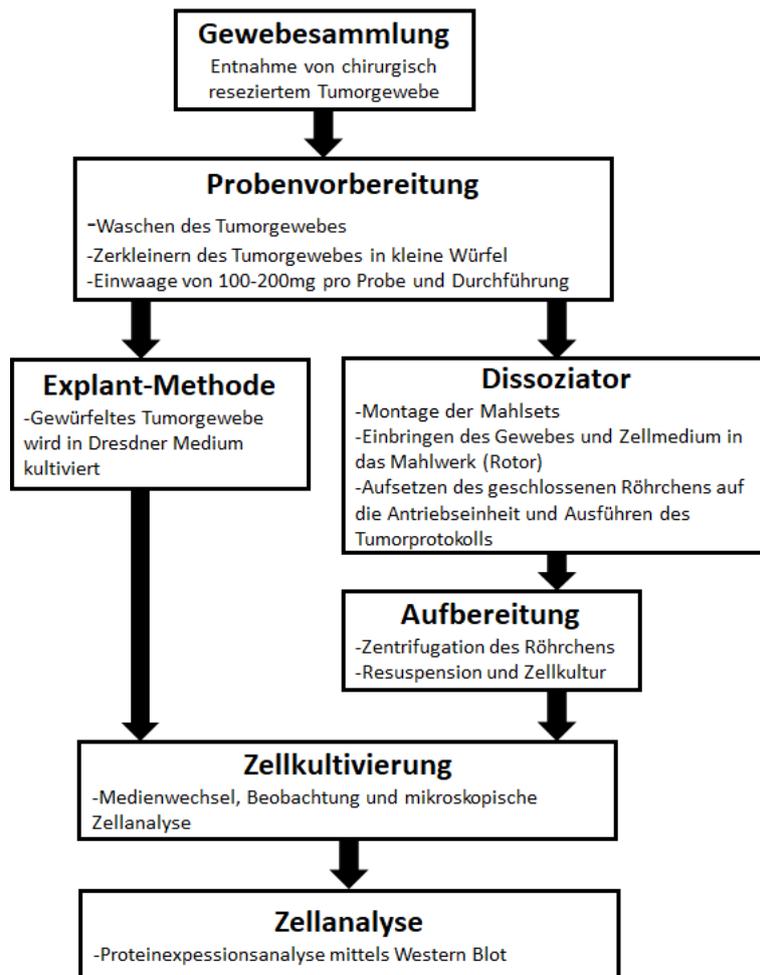


Abbildung 68: Der komplette Workflow der Tumorgewebeaufbereitung. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Tumorresektion so rasch wie möglich aus dem Operationssaal entnommen. Die Vorbereitung der Proben begann innerhalb von einer Stunde nach der Tumorresektion. Die Zeit für die Probenpräparation war sowohl für den Gewebedissoziator als auch für die als Kontrolle verwendete Explantationsmethode gleich. Dies umfasste das Waschen, Schneiden und Wiegen des Tumorgewebes. Das Dissoziationsröhrchen des Gewebedissoziators wurde mit einer Gewebemenge von 100-200 mg beladen. Nach dem Verschließen des Röhrchens wurde es am Gewebedissoziator befestigt, und das Dissoziationsprogramm wurde ausgeführt. Nachfolgend wurde das Röhrchen zentrifugiert, der Überstand abgetrennt, das Zellpellet resuspendiert und auf derselben Sechs-Well-Platte wie bei der Explantationsmethode kultiviert. Während der Zellkultivierung wurde das Kulturmedium alle drei Tage gewechselt, und das Wachstum der Zellen wurde überwacht und mikroskopisch festgehalten. Adaptiert von¹⁴².

Die gewonnenen Zellen wurden in einem 2D-Monolayer auf Sechs-Well-Platten, T25- und T75-Flaschen kultiviert. Wachstumsmuster und Zellmorphologie wurden durch Phasenkontrastbilder mit einem Zeiss Phasenkontrastmikroskop Axio, Vert.A1 inkl. AxioCam 105 Color (Zeiss, Jena, Deutschland) bestimmt. Die Zellen wurden in einem Puffer lysiert, der 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 1 µM Dithiothreitol (DTT) sowie Proteinase- und Phosphataseinhibitoren enthält. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Coomassie-Reagenzien (Thermo Scientific, Rockford, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen.

Der Western Blot wurde wie in¹⁶³ beschrieben durchgeführt. Es wurden 15 µg des Gesamtproteins pro Probe auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und eine Elektrophorese durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen (1 mA pro cm² bei Raumtemperatur per Semidry-Blot für 1 Stunde). Anschließend wurden die Blots in TBS mit 0,1 % Tween 20 und 5 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert, wobei die Verdünnung gemäß Tabelle 13 im Anhang vorgenommen wurde.

Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde durch Immobilisieren der Membran mit einem monoklonalen anti-human-β-Actin-Antikörper bestätigt. Zur Bestimmung des Ausmaßes des mechanischen Stresses auf die Zellen wurde der Apoptose-Westernblot-Cocktail (Abcam, USA) mit pro/p17-Caspase-3, gespaltenem PARP1 und Muskel-Actin entsprechend der Herstelleranleitung verwendet. Die Detektion der immunreaktiven Banden wurde mit einem ECL-System (PerkinElmer, Inc., Niederlande) durchgeführt.

Je nach Menge der erhaltenen Gewebeprobe aus dem chirurgisch resezierten Tumor wurden pro Dissoziation zwischen 100 mg und 200 mg des Gewebes verarbeitet. Die kleinste verarbeitete Gewebemenge betrug 20 mg Tumor aus der Bauchspeicheldrüse, während die größte Menge an Tumorgewebe von Leberkrebs 305 mg betrug. Der Bereich der verwendeten Probenmenge für jeden Tumortyp ist in Abbildung 69 dargestellt. Verschiedene Tumorarten besitzen unterschiedliche physikalische Probeneigenschaften. Die physischen Merkmale des in dieser Untersuchung verwendeten Gewebes werden mittels einer Skala definiert. Dabei werden zwei Eigenschaften - die Schneidbarkeit und die Konsistenz des verarbeiteten Gewebes - auf einer Skala von 0 bis 10 bewertet. Proben, die leicht zu schneiden sind, erhalten auf dieser Skala eine höhere Bewertung, wobei 10 für die leichteste Schneidbarkeit steht, während Proben, die schwer zu schneiden sind, eine niedrigere Bewertung erhalten. In diesem Fall steht 0 für das schwierigste zu schneidende Gewebe. Im Vergleich zu nicht-fibrotischem Tumorgewebe gestaltete sich das Schneiden von Gewebe mit fibrotischer Struktur beispielsweise schwieriger. Die Konsistenz der erhaltenen Probe wurde anhand der Festigkeit/Textur der Probe beschrieben, die beim Schneiden des Gewebes makroskopisch beobachtet wurde. Proben, die gelartige oder klebrige Eigenschaften aufwiesen, wurden an das höhere Ende der Skala (in Richtung 10) und feste Proben an das niedrigere Ende der Skala (in Richtung 0) eingeordnet. Einige der Tumorproben, wie die meisten Leberkarzinome waren schleimig, während die meisten Tumorproben von Pankreaskarzinomen eher fest waren. Abbildung 69 zeigt diesen Ansatz zur Kategorisierung der Vielfalt des in dieser Studie verarbeiteten Gewebes.

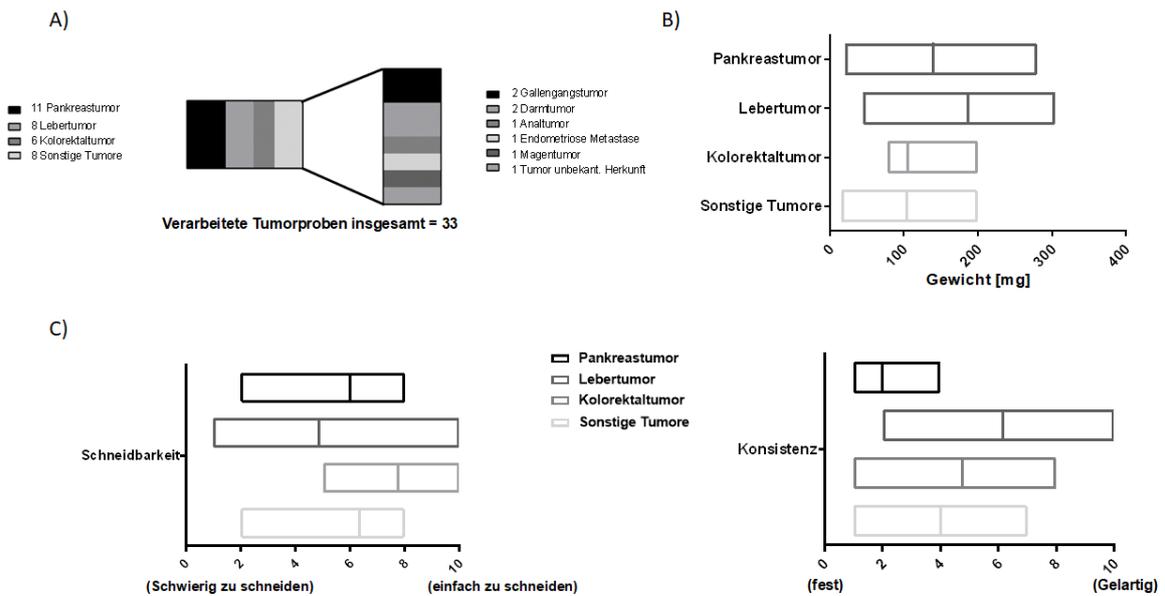


Abbildung 69: Übersicht der bearbeiteten Tumorproben mit dem Gewebedissoziator. A) 33 mit dem Gewebedissoziator verarbeitete Tumorproben und deren Kategorisierung. B) Die Gewichtsverteilung der verarbeiteten Tumorproben in jedem separaten Lauf für jede der vier Hauptkategorien von Tumorgewebe mit dem Median, der minimalen und maximalen Menge, die pro Lauf verarbeitet wurde. C) Die physikalischen/materiellen Eigenschaften der verarbeiteten Gewebe, basierend auf Schneidfestigkeit und Konsistenz. Für die Schneidfestigkeit bedeutet "0" schwer zu schneiden, während "10" für leicht zu schneidendes Gewebe steht. Die Konsistenz definierte die Textur des verarbeiteten Gewebes, wobei "10" weiches, gelartiges Gewebe bedeutet, während "0" festes Gewebe bedeutet. Adaptiert von¹⁴².

Nach einem Zeitraum von einem Monat Kultivierung konnte festgestellt werden, dass die Erfolgsrate angewachsener Zellen aus den verarbeiteten Proben bei mit dem Gewebedissoziator bearbeiteten Kulturen bei 75 % lag. Im Vergleich dazu wurde bei Kulturen, die mit der Explantationsmethode behandelt wurden, eine Erfolgsrate von 45 % erzielt. Ein konkretes Beispiel für diese Beobachtung wurde in den Fällen von viszeralem Sarkom, Pankreaskrebs und Anal-krebs nach 8, 20 bzw. 47 Tagen dargestellt (Abbildung 70).

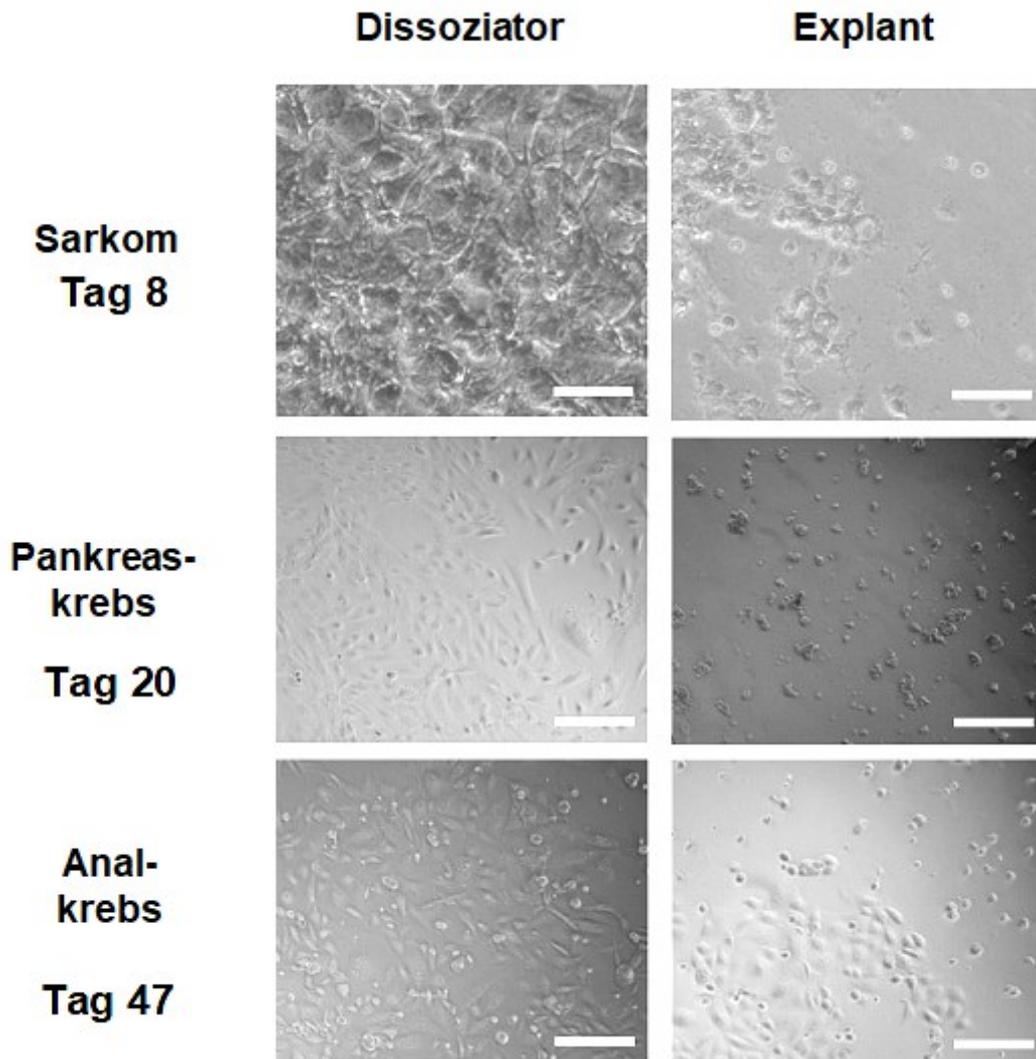
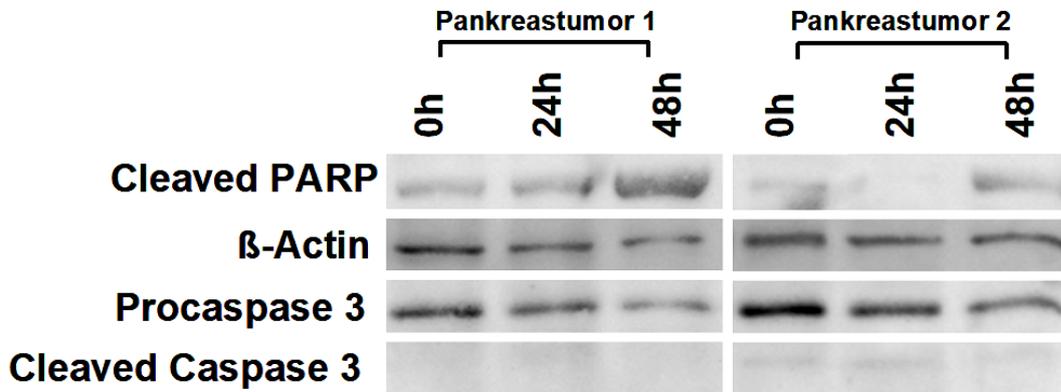


Abbildung 70: Vergleich zwischen drei verschiedenen Tumorgeweben, die sowohl mit dem Gewebedissoziator als auch mit der Explant-Methode verarbeitet wurden. Gezeigt werden Hellfeldbilder der Tumormorphen von Sarkom, Pankreaskrebs und Analkrebs, die mit dem Gewebedissoziator und der Explantationsmethode am 8., 20. und 47. Kultivierungstag. Die Bilder wurden mit einem 4x Zeiss Objektiv NA- aufgenommen. Der weiße Skalenbalken stellt 200 μm dar. Adaptiert von¹⁴².

Obwohl Zellen im Gewebe üblicherweise einer Vielzahl von mechanischen Beanspruchungen während der Entwicklung, der Gewebemöostase und bei Krankheiten ausgesetzt sind, kann übermäßige mechanische Belastung zu Zelltod führen. Daher wurde weiter untersucht, ob Zellen, die durch den Gewebedissoziator dissoziiert wurden, Anzeichen von Apoptose aufweisen. Hierfür wurde Immunoblotting verwendet. Bei den Zellen, die aus Gewebeproben von Pankreaskarzinomen (PC) mithilfe des Gewebedissoziators isoliert wurden, zeigte sich im Gesamtprotein nur eine geringfügige Spaltung von Caspase-3. Dies war sowohl direkt nach der Verarbeitung als auch 24 und 48 Stunden danach der Fall (Abbildung 71). Eine leichte Expression des Apoptose-spezifischen 89 kDa PARP-Fragments wurde jedoch in der PC-Tumor 1-Probe

zu allen Zeitpunkten beobachtet, während sie in PC-Tumor 2 nur geringfügig bei 48 Stunden beobachtet wurde.

A)



B)

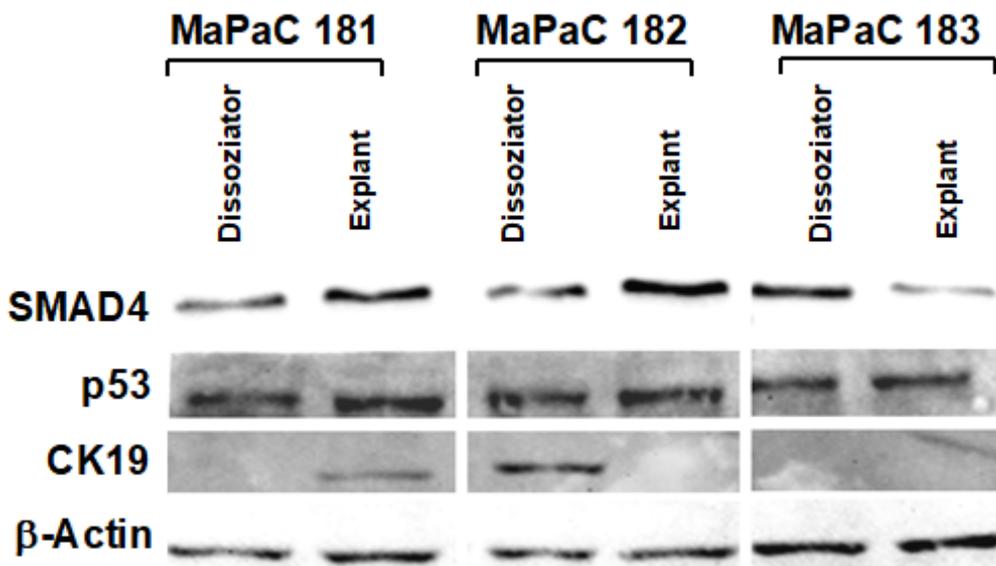


Abbildung 71: Nachweis der Wirkung von mechanischem Stress auf die Apoptose. A) Western Blots wurden mit dem Gesamtprotein durchgeführt, das aus Zellen isoliert wurde, die nach der Verarbeitung von Gewebeproben des Pankreaskarzinoms (PC) von zwei verschiedenen Spendern mit dem Gewebedissoziator gewonnen wurden. Die Zellen wurden sofort, 24 h und 48 h nach der Aufbereitung des Gewebes gesammelt. Die Expression von PARP (cleaved-PARP), Caspase3 und cleaved Caspase3 wurde untersucht. 20 μ g Gesamtprotein wurden in jede Spur geladen und die gleiche Proteinladung wurde mit β -Actin bestätigt. B) Nachweis der Expression von Pankreaskrebs-Markern in drei bearbeiteten Pankreaskrebs-Proben (MaPaC 181 - MaPaC 183). Western Blots wurden mit dem Gesamtprotein durchgeführt, das aus den Zellen isoliert wurde, die nach der Verarbeitung von drei Bauchspeicheldrüsensarkom-Proben mit dem Gewebedissoziator und der Explantationsmethode sechs Wochen nach der Verarbeitung gewonnen wurden. Die Expression der Proteine SMAD 4, p53 und CK19 wurde ausgewertet. 20 μ g des Gesamtproteins wurden in jede Lane geladen und β -Actin diente als Kontrolle. Adaptiert von¹⁴².

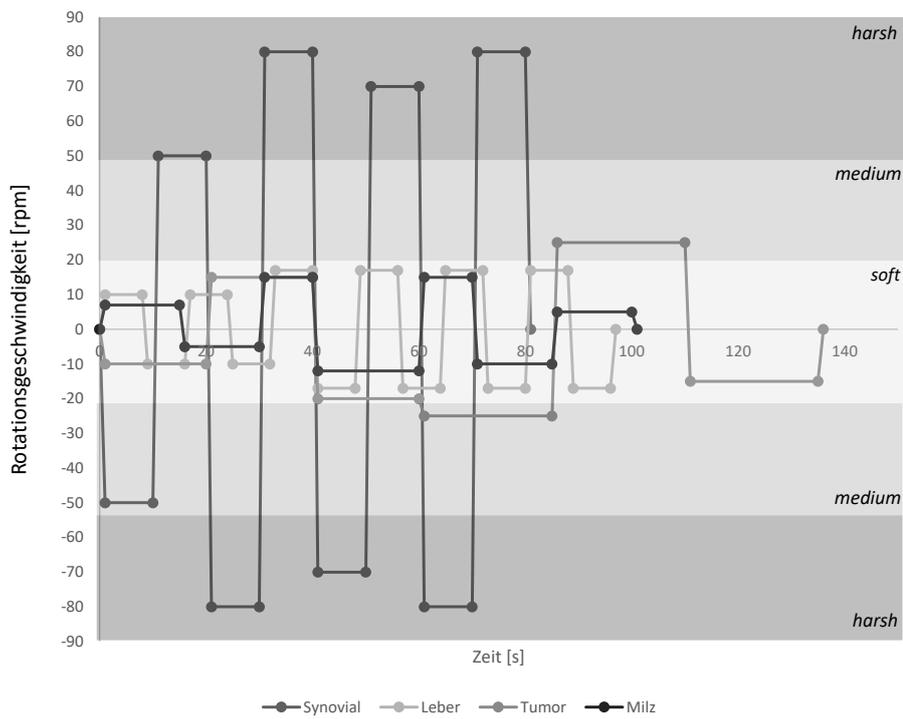
Um die Identifizierung von Krebszellen aus dem Tumorgewebe sicherzustellen, wurde das Gesamtprotein aus drei aufeinanderfolgenden Pankreaskrebs-Proben isoliert. Diese Proben wurden sowohl mit der Explantationsmethode als auch mit dem Gewebedissoziator bearbeitet und über einen Zeitraum von sechs Wochen kultiviert. Im Anschluss daran erfolgte die Untersuchung der Expression von Bauchspeicheldrüsenkrebs-Markern mittels Western Blot. Zu diesem Zweck wurde die Expression von SMAD4, p53 und CK19 ausgewertet. SMAD4 wurde in allen Zellen beobachtet, unabhängig davon, wie die Tumorprobe bearbeitet wurde. Eine stärkere Expression von SMAD4 wurde in den per Explantat isolierten Zellen von MaPaC-181 und MaPaC-182 beobachtet, während die mit dem Gewebedissoziator isolierten Zellen von MaPaC-183 einen umgekehrten Trend zeigten. Das Vorhandensein von p53 wurde in allen untersuchten Proben unabhängig von der Isolierungsmethode beobachtet. CK19 scheint nur in der Explantatprobe von MaPaC-181 und der Gewebedissoziator -Probe von MaPaC-182 exprimiert zu werden. In den Zellen von MaPaC-183 wurde keine Expression von CK19 beobachtet.

6.2.3 Zusammenfassung anwendungsspezifischer Validierung

Ziel der Arbeiten in diesem Kapitel war es, anhand praktischer Versuche mit klinisch-relevanten Gewebeproben die wesentlichen Einflussfaktoren bei der enzymfreien und mechanischen Gewebedissoziation zu beschreiben und zu quantifizieren. Es wurde ein Gewebedissoziationssystem angestrebt, das robust genug ist, um das Gewebe effektiv zu dissoziieren und gleichzeitig die Lebensfähigkeit der Zellen aufrechtzuerhalten. Des Weiteren ist das System mit handelsüblichen Zentrifugenröhrchen kompatibel, wodurch es eine geeignete Schnittstelle für Fluid-Handling-Roboter bietet und sich nahtlos in bestehende Laborabläufe integrieren lässt.

Um die Nützlichkeit und Leistungsfähigkeit des Gewebedissoziators zu demonstrieren, wurde die Lebensfähigkeit von Zellen nach der Dissoziation von Milz (Maus), Leber (Maus), Sinovialgewebe (Schwein) getestet. Das Sinovialgewebe wurde als besonders zähes Gewebe und die Milz- und Lebergewebe als Beispiel für eine extrem kleine und weiche Gewebeprobe ausgewählt. Eine genaue Analyse der enzymfrei generierten Zellsuspensionen ergab eine Anreicherung von spezifischen Zellpopulationen (Hepatozyten, die beim enzymatischen Verfahren zerstört worden sind). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die enzymfreie Dissoziation menschlicher Tumorproben eine reichhaltige Quelle für die Etablierung patientennaher Zellkulturen darstellt - ideal für eine Reihe nachgelagerter Forschungs- und Therapieanwendungen. In Abbildung 72 ist in einer Übersicht dargestellt welche gewebespezifischen Protokolle und Dissoziation mit dem entwickelten System abgedeckt wurden.

A)



B)

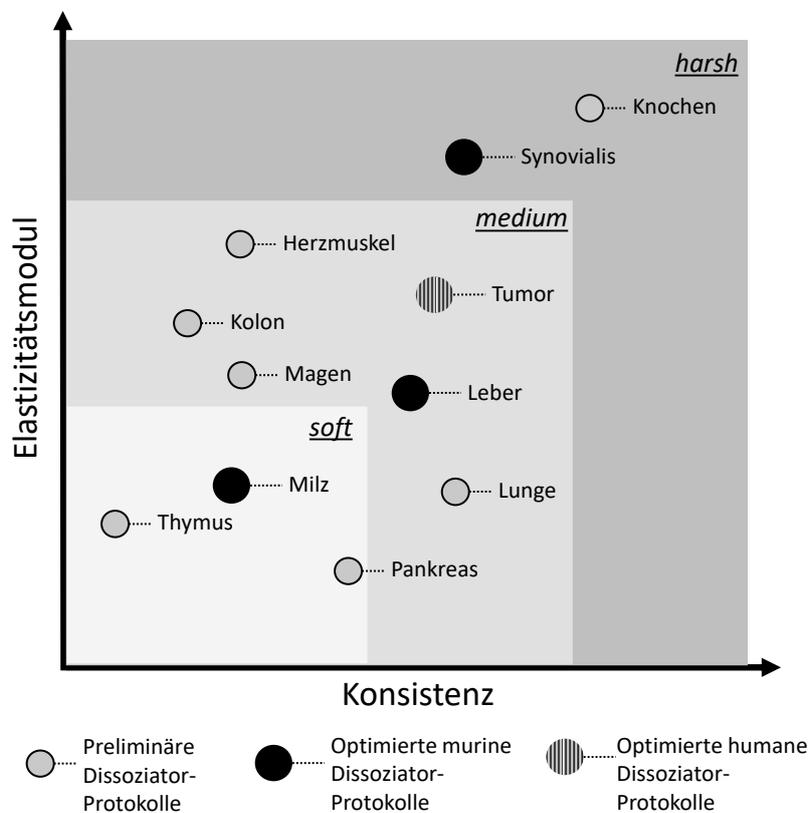


Abbildung 72: Arbeitsbereich des Gewebedissoziators in Bezug auf unterschiedliche mechanische Eigenschaften von klinisch-relevanten Gewebeproben.

Darüber hinaus wurde erfolgreich nachgewiesen, dass die entwickelten Dissoziationsprotokolle für verschiedene Gewebetypen hinsichtlich struktureller Gewebeeigenschaften wie Elastizität und Konsistenz geeignet sind. Die definierten Anforderungen an ein mechanisches und enzymfreies Verfahren zur teilautomatisierten Gewinnung von Einzelzellen aus Gewebeproben (Abschnitt 3.5) konnten im Rahmen der Validierung bestätigt und erfüllt werden.

7 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Verwendung eines neuartigen Gewebedissoziationsgeräts zur enzymfreien und teilautomatisierten Dissoziation von Primärmaterial aus einer Vielzahl von klinisch-relevanten Gewebeproben beschrieben. Der erste Schritt bei der Isolierung einzelner Zellen aus Primärproben besteht darin, eine Suspension lebensfähiger Einzelzellen herzustellen. Dies ist bei komplexen festen Geweben nicht trivial - die extrazelluläre Matrix, die die verschiedenen Zelltypen zusammenhält, variiert in ihrer Zusammensetzung drastisch von Gewebetyp zu Gewebetyp. Durch ihre stark adhäsiven Eigenschaften sorgt sie dafür, dass die Zellen zusammengehalten werden und so als geschlossenes Netzwerk funktionieren können. Darüber hinaus können erkrankte Gewebe im Vergleich zu ihren normalen Gegenstücken eine unterschiedliche Dissoziationskinetik aufweisen, ebenso wie eine unterschiedliche Dissoziation zwischen Proben derselben Krankheit. Zum Beispiel sind Fibrose und Verkalkung zwei häufige Prozesse, die in verschiedenen Arten von Tumoren zu finden sind und die mechanische Dissoziation von Gewebe, die ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Dissoziation des Gewebes und Erhaltung der Zellen erfordert, zu einer Herausforderung machen. Mit der Möglichkeit, die Zerkleinerungs- und Schneidprozesse im Gewebedissoziator zu programmieren, wurden individuelle Verarbeitungsprofile für bestimmte Gewebe erstellt und Zellen aus verschiedenen Gewebeproben gewonnen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute an lebensfähigen Einzelzellen ohne enzymatische Behandlung mit enzymatischen Referenzmethoden übereinstimmt oder diese übertrifft, während die Verarbeitungszeit um mindestens 80 % reduziert wird. Für die vorliegende Studie war die Dissoziation durch den Gewebedissoziator in weniger als zwei Minuten abgeschlossen und bot eine erhebliche Zeitersparnis gegenüber dem gentleMACS® -Verfahren (ca. 60 min), insbesondere wenn die parallele Verarbeitung mehrerer Proben berücksichtigt wird. Die enzymatische Vorbehandlung zeigte jedoch Vorteile im Aufschlussgrad, insbesondere für härtere Gewebeproben wie Sinovialgewebe. Offensichtlich bewirkte die enzymatische Behandlung eine Auflockerung der Gewebestruktur und damit eine vollständigere Verarbeitung.

Weiterhin wurde untersucht, ob die enzymfreien und enzymatisch dissoziierten Zellen kultiviert werden können. Neben der Standard-zweidimensionalen-Zellkultur wurde zusätzlich die Kultivierung als dreidimensionale Sphäroide unter Verwendung von low-attachment Platten getestet. Die 3D-Zellkulturmodelle werden zur klinischen Anwendung verwendet, um als Ersatz für fehlendes oder beschädigtes Gewebe zu fungieren. Die Primärzellkulturen wurden durch enzymfreie und mechanische Dissoziation von Leberproben von der Maus mittels Gewebedissoziator erzeugt. Nach der Dissoziation wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer und dem Nucleocounter gezählt. Die verwendeten Zellzählmethoden zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Die Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlichen Zählmethoden erklären.

Der Nucleocounter zählt ausschließlich Zellen mit Zellkernen, wodurch Erythrozyten ausgeschlossen werden. Bei der Verwendung der Neubauer-Kammer wurden alle Zelltypen erfasst, doch die Unterscheidung zwischen tatsächlichen Zellen und Zelltrümmern stellt eine beträchtliche Fehlerquelle dar. Dies wird auch durch die hohen Standardabweichungen deutlich. Der Nucleocounter ermöglicht präzisere Messungen, allerdings war es mit dieser Methode nicht möglich, Hepatozyten separat zu zählen. Zusätzlich berücksichtigt der Nucleocounter bei den Messungen nicht, dass Hepatozyten mehr als einen Zellkern enthalten können.¹⁶⁴

Die Kombination vom Gewebedissoziator mit der RT-DC-Analyse hat das Potenzial, ein schnelles diagnostisches Verfahren mit hohem Durchsatz zu sein. Es kann dazu dienen, pathologische Veränderungen in Gewebebiopsien zu erkennen und Zellpopulationen aufzudecken, die für markerbasierte Ansätze nicht sichtbar wären. Als wichtigster parenchymaler Zelltyp der Leber machen Hepatozyten 70 % der Leberzellpopulation aus und nehmen fast 80 % des Lebervolumens ein.¹⁶⁵ In der mit dem Gewebedissoziator gewonnenen Zellsuspension lag der Anteil der Hepatozyten an den Gesamtzellen zwischen 40 % und 80 %, was zeigt, dass die Ausbeute an Hepatozyten nahezu repräsentativ für ihr bekanntes Vorkommen im Gewebe war. Es liegt auf der Hand, dass eine mechanische Dissoziation für empfindliche Zellen wie Hepatozyten, die extrem anfällig für den Zelltod sind und bei Standardisolierungsverfahren häufig lysiert werden, weniger störend sein kann.¹⁷ Die Zeit, die für die Bearbeitung jeder Probe bei der mechanischen Dissoziation benötigt wurde, belief sich auf weniger als 5 Minuten. Im Vergleich dazu dauerten enzymatische Dissoziationsverfahren oft Dutzende von Minuten oder sogar viele Stunden. Darüber hinaus erfordern enzymatische Verfahren oft kostspielige chemische Substanzen, die spezifisch für die jeweilige Probe sind und besondere Lagerbedingungen erfordern. Im Gegensatz dazu kann die mechanische Dissoziation in herkömmlichen Kulturmedien durchgeführt werden. Durch eine schnelle Dissoziation können die metabolischen und biophysikalischen Eigenschaften der Zellen in einem Zustand bewahrt werden, der dem in-situ Zustand nahekommt. Im Gegensatz dazu ist es wahrscheinlich, dass diese Eigenschaften bei anderen Methoden mit längeren Verarbeitungszeiten abnehmen.

Ein Tumor ist eine komplexe Struktur, die aus vielfältigen Zellen besteht und untereinander interagiert. Zum Beispiel sind Tumorfibroblasten und Tumorzellen an der Resistenz gegenüber Medikamenten beteiligt. Daher ist es von Bedeutung, die Heterogenität der Zellen, die aus dem Tumorgewebe isoliert werden, zu bewahren, um beispielsweise die Effektivität von Chemotherapeutika zu beurteilen. Zellen, die durch die Verwendung des Gewebedissoziators isoliert wurden, zeigten häufig eine höhere Heterogenität im Vergleich zu Zellen, die durch die Explantationsmethode gewonnen wurden. Bei der Explantationsmethode wachsen die Zellen in der Regel aus dem Gewebe heraus in die Kulturschale. Trotz des Zuschneidens des Gewebes in winzige Stücke von 1 mm³ besteht ein Nährstoffgradient, bei dem nur geringe Mengen

die Zellen im Kern des geschnittenen Gewebestücks erreichen. Dies führt dazu, dass nur spezifische Zellen aus dem Gewebe herauswachsen können. Im Gegensatz zur Explantationsmethode wird das Gewebe im Gewebedissoziator nahezu vollständig in Einzelzellen dissoziiert. Daher sollten die mit dem Gewebedissoziator isolierten Zellen die Heterogenität des Tumors besser repräsentieren als das Gewebe im Explantationsverfahren. Die Lebensfähigkeit und Heterogenität der erzeugten Einzelzellen wurde indirekt durch Überwachung der Zellprofilierung in der Kultur bestimmt. Eine direkte Messung wurde nicht durchgeführt, um das Risiko einer Kreuzkontamination zu minimieren und einen einheitlichen und effizienten klinischen Prozess zu demonstrieren. Viabilitätsergebnisse mit dem Gewebedissoziator konnten bereits in den Studien^{145,160} mit Nachweisen an verschiedenen Gewebeproben (Milz, Thymus, Lymphknoten, Leber, Niere, Dünndarm, Dickdarm, Lunge, Magen und Bauchspeicheldrüse) nachgewiesen werden. Die Gewebedissoziation vor der eigentlichen Analyse sind nach wie vor zeitaufwendige Prozesse. Aufgrund der häufig manuellen Durchführung ist jedoch ihre Reproduzierbarkeit oft nicht vollständig gegeben.¹⁶⁶ Die Gewebedissoziation mittels des Gewebedissoziators erfordert im Vergleich zur herkömmlichen Explant-Methode etwa 15 bis 30 Minuten zusätzliche Zeit. Jedoch wurden in den Kulturen, die mit dem Gewebedissoziator bearbeitet wurden, Zellen bereits früher beobachtet (nach 4-7 Tagen), im Vergleich zu den Explantat-Kulturen, bei denen Zellen erst nach 10-12 Tagen sichtbar wurden.

Jede Methode der Probenvorbereitung kann einen unterschiedlichen Grad an Beeinträchtigung der Zellintegrität nach der Dissoziation verursachen. Typische Stressfaktoren sind - suboptimale Temperatur, suboptimale Pufferbedingungen, Stress durch lange enzymatische Dissoziation oder hohe mechanische Belastung beim Mahlen oder Schädigung durch Zentrifugation, Resuspension oder Vortexen der Zellen. Die Auswirkungen auf die Zellen hängen oft von der Dauer der Einwirkung dieser Faktoren ab. Beim Gewebedissoziator eröffnet die Möglichkeit, gewebespezifische Dissoziationsprotokolle zu programmieren, insbesondere den Faktor der mechanischen Belastung so weit wie möglich zu minimieren, um ein schonendes Dissoziationsverfahren zu erreichen. Dies wird offensichtlich, wenn das Gewebe, das durch den Gewebedissoziator verarbeitet wird, lediglich einem geringen mechanischen Stress ausgesetzt ist. Dieser Stress führt zwar zu einer leichten Expression von gespaltenem PARP-1, jedoch nicht zu Apoptose, da kein gespaltenes Caspase-3 vorhanden ist.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neuartige Gewebedissoziator-Plattform erfolgreich als System für die Teilautomatisierung für klinische-relevante Gewebedissoziationen demonstriert wurde und die Anforderungen für ein enzymfreies Dissoziationsverfahren erfüllt sind. Basierend auf dem geschlossenen Einwegdissoziationsröhrchen für den Betrieb in Standard-Laborzentrifugen erfordert diese neuartige Gewebedissoziationsplattform minimale Infrastrukturstandards, da Kontaminationsrisiken minimiert werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen mikrofluidischen Systemen ist der Gewebedissoziator in der Lage, Probenvolumina bis in den Milligramm- bis Grammbereich zu verarbeiten, wie sie in vielen diagnostischen und analytischen Anwendungen benötigt werden. Damit stellt der Gewebedissoziator eine kosteneffiziente Alternative für die Automatisierung in Laboren mit geringem bis mittlerem Probandendurchsatz dar, wie z.B. in Forschungs- oder kleinen Krankenhauslaboren. Diese Technologie ist auch bei geringem Probandendurchsatz kosteneffizient, zeichnet sich durch einfache und sichere Handhabung aus und erfordert kein geschultes Personal.

Die entwickelte Technologie bietet entscheidende Vorteile im Vergleich zur manuellen und enzymatischen Gewebedissoziation sowie zu bereits auf dem Markt etablierten teilautomatisierten Geräten:

- Die Gewebedissoziation wird kosteneffizienter gestaltet, da weniger Aufarbeitungsschritte erforderlich sind.
- Durch eine optimierte Geometrie der Schneid- und Mahlwerkzeuge wird eine schonendere Aufschlussmethode für das Gewebe erreicht.
- Der Verzicht auf enzymatische Verdauungslösungen trägt zur Erhaltung der molekularen Integrität bei und erweitert dadurch das Spektrum potenzieller Diagnoseverfahren.
- Der gesamte Prozess ist flexibel einsetzbar. Ein modularer Aufbau ermöglicht die Integration mit vorhandenen manuellen Schritten, wie beispielsweise Zentrifugation.

Durch den Einsatz von teilautomatisierter Verfahren für den enzymfreien und mechanischen Gewebeaufschluss eröffnen sich vielfältige Perspektiven. Besonders angesichts des zunehmenden Fokus auf personalisierte Medizin in den kommenden Jahren, ist die Entwicklung unterstützender Verfahren von großer Bedeutung. Im Hinblick darauf, Patienten eine Therapie anzubieten, die spezifisch auf die individuelle Ausprägung ihrer Krankheitsbilder zugeschnitten ist, gewinnt die optimale Untersuchung des Gewebes an Bedeutung. Ein vielversprechender Ansatz hierfür ist die Analyse von Einzelzellsuspensionen. Diese ermöglichen eine präzise Charakterisierung von Geweben, wie beispielsweise Tumorgewebe.

Um die praktische und klinische Routineanwendung zu ermöglichen, müssen die Gewebeverarbeitung und die Analyse der Einzelzellphänotypen in eine einzige automatisierte Abfolge

integriert werden. Während die mechanische und enzymfreie Dissoziation mit dem Gewebedissoziator eine effiziente Methode darstellt, um einzelne Zellen aus Gewebe für diagnostische Zwecke zu gewinnen, besteht weiterhin die Notwendigkeit, nachgelagerte manuelle Arbeitsschritte wie die Zellfiltration und -aufkonzentrierung zu minimieren. Dennoch ist der Gewebedissoziator selbst in seinem aktuellen Zustand schneller und kostengünstiger als die enzymatische Aufbereitung von Gewebeproben. Während verschiedene enzymatische Protokolle oft nur zu einer Anreicherung bestimmter Zelltypen führen, gibt es Hinweise darauf, dass die nach der mechanischen und enzymfreien Dissoziation entstandene Einzelzellsuspension repräsentativer für die tatsächlichen Zellpopulationen im Gewebe sein könnte. Daher eignet sie sich besser für eine unverzerrte Analyse der zellulären Landschaft. Außerdem könnten die Zellen aufgrund der Geschwindigkeit der mechanischen Dissoziation weniger proteomische oder transkriptionelle Veränderungen erfahren, die bekanntermaßen bei der deutlich längeren enzymatischen Verarbeitung auftreten. Umfangreiche vergleichende und molekulare Studien sind erforderlich, um diese Annahmen zu bewerten und um festzustellen, ob eine enzymfreie kurze Verarbeitungszeit die physischen Phänotypveränderungen und transkriptionelle Veränderungen verringert, die nach langer Exposition gegenüber enzymatischen Reagenzien auftreten können. Hierfür stellt das entwickelte System eine vielversprechende technologische Plattform zur Verfügung.

9 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 71(3): 209–49, 2021, doi:10.3322/caac.21660
2. Aboulkheyr Es H, Montazeri L, Aref AR, Vosough M, Baharvand H: Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends in biotechnology* 36(4): 358–71, 2018, doi:10.1016/j.tibtech.2017.12.005
3. La Thangue NB, Kerr DJ: Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nature reviews. Clinical oncology* 8(10): 587–96, 2011, doi:10.1038/nrclinonc.2011.121
4. Kamel Boulos MN, Zhang P: Digital Twins: From Personalised Medicine to Precision Public Health. *Journal of personalized medicine* 11(8), 2021, doi:10.3390/jpm11080745
5. Kinkorová J: Biobanks in the era of personalized medicine: Objectives, challenges, and innovation: Overview. *The EPMA journal* 7: 4, 2015, doi:10.1186/s13167-016-0053-7
6. Ascierio PA, Bifulco C, Palmieri G, Peters S, Sidiropoulos N: Preanalytic Variables and Tissue Stewardship for Reliable Next-Generation Sequencing (NGS) Clinical Analysis. *The Journal of molecular diagnostics JMD*, 2019, doi:10.1016/j.jmoldx.2019.05.004
7. Aberle MR, Burkhart RA, Tiriach H, Olde Damink SWM, Dejong CHC, Tuveson DA, van Dam RM: Patient-derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer. *The British journal of surgery* 105(2): e48-e60, 2018, doi:10.1002/bjs.10726
8. Regev A, Teichmann S, Lander ES, Amit I, Benoist C, Birney E, Bodenmiller B, Campbell P, Carninci P, Clatworthy M, Clevers H, Deplancke B, Dunham I, Eberwine J, Eils R, Enard W, Farmer A, Fugger L, Gottgens B, Hacohen N, Haniffa M, Hemberg M, Kim SK, Klenerman P, Kriegstein A, Lein E, Linnarsson S, Lundberg J, Majumder P, Marioni J, Merad M, Mhlanga M, Nawijn M, Netea M, Nolan G, Pe'er D, Philipakis A, Ponting CP, Quake SR, Reik W, Rozenblatt-Rosen O, Sanes JR, Satija R, Shumacher T, Shalek AK, Shapiro E, Sharma P, Shin J, Stegle O, Stratton M, Stubbington MJT, van Oudenaarden A, Wagner A, Watt FM, Weissman JS, Wold B, Xavier RJ, Yosef N: The Human Cell Atlas. *eLife*.(6): 1–30, 2017, doi:10.7554/eLife.27041
9. Turner W: The cell theory, past and present. *J. Anat.Physiol.*(24): 253–87, 1890
10. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, Perez-Amodio S, Strippoli P, Canaider S: An estimation of the

- number of cells in the human body. *Annals of human biology* 40(6): 463–71, 2013, doi:10.3109/03014460.2013.807878
11. Sender R, Milo R: The distribution of cellular turnover in the human body. *Nature medicine* 27(1): 45–8, 2021, doi:10.1038/s41591-020-01182-9
 12. Gawad C, Koh W, Quake SR: Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature reviews. Genetics* 17(3): 175–88, 2016, doi:10.1038/nrg.2015.16
 13. McBeth C, Gutermuth A, Ochs J, Sharon A, Sauer-Budge AF: Automated Tissue Dissociation for Rapid Extraction of Viable Cells. *Procedia CIRP* 65: 88–92, 2017, doi:10.1016/j.procir.2017.04.007
 14. Altschuler SJ, Wu LF: Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell* 141(4): 559–63, 2010, doi:10.1016/j.cell.2010.04.033
 15. Quy H. Nguyen, Nicholas Pervolarakis, Kerrigan Blake, Dennis Ma, Ryan Tevia Davis, Nathan James, Anh T. Phung, Elizabeth Willey, Raj Kuma, Eric Jabart, Ian Driver, Jason Rock, Andrei Goga, Seema A. Khan, Devon A. Lawson, Zena Werb Kai Kessenbrock: Profiling human breast epithelial cells using single cell RNA sequencing identifies cell diversity. *Nature communications*(9), 2018, doi:10.1038/s41467-018-04334-1
 16. Park J, Shrestha R, Qiu C, Kondo A, Huang S, Werth M, Li M, Barasch J, Suszták K: Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science (New York, N.Y.)* 360(6390): 758–63, 2018, doi:10.1126/science.aar2131
 17. MacParland SA, Liu JC, Ma X-Z, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, Manuel J, Khuu N, Echeverri J, Linares I, Gupta R, Cheng ML, Liu LY, Camat D, Chung SW, Seliga RK, Shao Z, Lee E, Ogawa S, Ogawa M, Wilson MD, Fish JE, Selzner M, Ghanekar A, Grant D, Greig P, Sapisochin G, Selzner N, Winegarden N, Adeyi O, Keller G, Bader GD, McGilvray ID: Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nature communications* 9(1): 4383, 2018, doi:10.1038/s41467-018-06318-7
 18. Reyfman PA, Walter JM, Joshi N, Anekalla KR, McQuattie-Pimentel AC, Chiu S, Fernandez R, Akbarpour M, Chen C-I, Ren Z, Verma R, Abdala-Valencia H, Nam K, Chi M, Han S, Gonzalez-Gonzalez FJ, Soberanes S, Watanabe S, Williams KJN, Flozak AS, Nicholson TT, Morgan VK, Winter DR, Hinchcliff M, Hrusch CL, Guzy RD, Bonham CA, Sperling AI, Bag R, Hamanaka RB, Mutlu GM, Yeldandi AV, Marshall SA, Shilatifard A, Amaral LAN, Perlman H, Sznajder JI, Argento AC, Gillespie CT, Dematte J, Jain M, Singer BD, Ridge KM, Lam AP, Bharat A, Bhorade SM, Gottardi CJ, Budinger GRS, Misharin AV: Single-Cell Transcriptomic Analysis of Human Lung Provides Insights into the Pathobiology of Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 199(12): 1517–36, 2019, doi:10.1164/rccm.201712-2410OC

19. Hinohara K, Polyak K: Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations. *Trends in cell biology* 29(7): 569–79, 2019, doi:10.1016/j.tcb.2019.03.003
20. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C: The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 501(7467): 338–45, 2013, doi:10.1038/nature12625
21. Bendall SC, Nolan GP: From single cells to deep phenotypes in cancer. *Nature biotechnology* 30(7): 639–47, 2012, doi:10.1038/nbt.2283
22. Wang Y, Navin NE: Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Molecular cell* 58(4): 598–609, 2015, doi:10.1016/j.molcel.2015.05.005
23. Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, Tran NM, Macosko EZ, Kowalczyk M, Adiconis X, Levin JZ, Nemesh J, Goldman M, McCarroll SA, Cepko CL, Regev A, Sanes JR: Comprehensive Classification of Retinal Bipolar Neurons by Single-Cell Transcriptomics. *Cell* 166(5): 1308–1323.e30, 2016, doi:10.1016/j.cell.2016.07.054
24. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E, Nilsson E, Grundberg I, McDonald D, Filby A, Li W, Jager PL de, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N: Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science (New York, N.Y.)* 356(6335), 2017, doi:10.1126/science.aah4573
25. Lombardo JA, Aliaghaei M, Nguyen QH, Kessenbrock K, Haun JB: Microfluidic platform accelerates tissue processing into single cells for molecular analysis and primary culture models. *Nature communications* 12(1): 2858, 2021, doi:10.1038/s41467-021-23238-1
26. Wu H, Kirita Y, Donnelly EL, Humphreys BD: Advantages of Single-Nucleus over Single-Cell RNA Sequencing of Adult Kidney: Rare Cell Types and Novel Cell States Revealed in Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 30(1): 23–32, 2019, doi:10.1681/ASN.2018090912
27. Nguyen QH, Pervolarakis N, Nee K, Kessenbrock K: Experimental Considerations for Single-Cell RNA Sequencing Approaches. *Frontiers in cell and developmental biology* 6: 108, 2018, doi:10.3389/fcell.2018.00108
28. Beckwitt CH, Clark AM, Wheeler S, Taylor DL, Stolz DB, Griffith L, Wells A: Liver 'organ on a chip'. *Experimental cell research* 363(1): 15–25, 2018, doi:10.1016/j.yexcr.2017.12.023
29. Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ: Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy* 213(1): 66–72, 2008, doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x
30. Mahla RS: Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International journal of cell biology* 2016: 6940283, 2016, doi:10.1155/2016/6940283

31. Esch EW, Bahinski A, Huh D: Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 14(4): 248–60, 2015, doi:10.1038/nrd4539
32. Aref AR, Campisi M, Ivanova E, Portell A, Larios D, Piel BP, Mathur N, Zhou C, Coakley RV, Bartels A, Bowden M, Herbert Z, Hill S, Gilhooley S, Carter J, Cañadas I, Thai TC, Kitajima S, Chiono V, Paweletz CP, Barbie DA, Kamm RD, Jenkins RW: 3D microfluidic ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade. *Lab on a chip* 18(20): 3129–43, 2018, doi:10.1039/c8lc00322j
33. Portillo-Lara R, Annabi N: Microengineered cancer-on-a-chip platforms to study the metastatic microenvironment. *Lab on a chip* 16(21): 4063–81, 2016, doi:10.1039/c6lc00718j
34. Low LA, Tagle DA: Tissue chips - innovative tools for drug development and disease modeling. *Lab on a chip* 17(18): 3026–36, 2017, doi:10.1039/c7lc00462a
35. Fong ELS, Toh TB, Yu H, Chow EK-H: 3D Culture as a Clinically Relevant Model for Personalized Medicine. *SLAS technology* 22(3): 245–53, 2017, doi:10.1177/2472630317697251
36. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC: Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology* 26(11): 1276–84, 2008, doi:10.1038/nbt.1503
37. Serra M, Brito C, Correia C, Alves PM: Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends in biotechnology* 30(6): 350–9, 2012, doi:10.1016/j.tibtech.2012.03.003
38. Kasendra M, Tovaglieri A, Sontheimer-Phelps A, Jalili-Firoozinezhad S, Bein A, Chalkiadaki A, Scholl W, Zhang C, Rickner H, Richmond CA, Li H, Breault DT, Ingber DE: Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Scientific reports* 8(1): 2871, 2018, doi:10.1038/s41598-018-21201-7
39. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR: Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 30(12): 2164–74, 2009, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.084
40. Ivascu A, Kubbies M: Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of biomolecular screening* 11(8): 922–32, 2006, doi:10.1177/1087057106292763
41. Liu Y, Gill E, Shery Huang YY: Microfluidic on-chip biomimicry for 3D cell culture: A fit-for-purpose investigation from the end user standpoint. *Future science OA* 3(2): FSO173, 2017, doi:10.4155/fsoa-2016-0084
42. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V: Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 17(1): 1–15, 2015, doi:10.1016/j.neo.2014.12.004

43. Pokrywczynska M, Balcerczyk D, Jundzill A, Gagat M, Czapiewska M, Kloskowski T, Nowacki M, Gastecka AM, Bodnar M, Grzanka A, Marszalek A, Drewa T: Isolation, expansion and characterization of porcine urinary bladder smooth muscle cells for tissue engineering. *Biological procedures online* 18: 17, 2016, doi:10.1186/s12575-016-0047-9
44. Gawad C, Koh W, Quake SR: Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature reviews. Genetics* 17(3): 175–88, 2016, doi:10.1038/nrg.2015.16
45. Ulmer A, Dietz K, Hodak I, Polzer B, Scheitler S, Yildiz M, Czyz Z, Lehnert P, Fehm T, Hafner C, Schanz S, Röcken M, Garbe C, Breuninger H, Fierlbeck G, Klein CA: Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival. *PLoS medicine* 11(2): e1001604, 2014, doi:10.1371/journal.pmed.1001604
46. Dietel M, Jöhrens K, Laffert MV, Hummel M, Bläker H, Pfitzner BM, Lehmann A, Denkert C, Darb-Esfahani S, Lenze D, Heppner FL, Koch A, Sers C, Klauschen F, Anagnostopoulos I: A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Therapy* 22(9): 417–30, 2015, doi:10.1038/cgt.2015.39
47. Irianto J, Pfeifer CR, Xia Y, Discher DE: SnapShot: Mechanosensing Matrix. *Cell* 165(7): 1820-1820.e1, 2016, doi:10.1016/j.cell.2016.06.002
48. Barnes JM, Przybyla L, Weaver VM: Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *Journal of cell science* 130(1): 71–82, 2017, doi:10.1242/jcs.191742
49. Smith AE, Zhang Z, Thomas CR: Wall material properties of yeast cells: Part 1. Cell measurements and compression experiments. *Chemical Engineering Science* 55(11): 2031–41, 2000, doi:10.1016/S0009-2509(99)00500-X
50. Kampen I: *Einfluss der Zellaufschlussmethode auf die Expanded Bed Chromatographie*. Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, 2005, doi:10.24355/dbbs.084-200611130100-50
51. C. Shiu, Z. Zhang & C.R. Thomas: A novel technique for the study of bacterial cell mechanical properties. *Biotechnology Techniques*(13): 707–13, 1999, doi:10.1023/A:1008919915047
52. Thomas CR, Zhang Z, Cowen C: Micromanipulation measurements of biological materials. *Biotechnology Letters*(22): 531–7, 2000, doi:10.1023/A:1005644412588
53. Mashmouhy H, Zhang Z and Thomas CR: Micromanipulation measurement of the mechanical properties of baker's yeast cells. *Biotechnology Techniques*(12): 925–9, 1998, doi:10.1023/A:1008825830928
54. Wang CX, Wang L, Thomas CR: Modelling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells. *Annals of botany* 93(4): 443–53, 2004, doi:10.1093/aob/mch062

55. Guimarães CF, Gasperini L, Marques AP, Reis RL: The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nat Rev Mater*, 2020, doi:10.1038/s41578-019-0169-1
56. Meacham CE, Morrison SJ: Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501(7467): 328–37, 2013, doi:10.1038/nature12624
57. Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knöspel F: Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 241(15): 1684–98, 2016, doi:10.1177/1535370216657448
58. Mendoza R, Banerjee I, Reghupaty SC, Yetirajam R, Manna D, Sarkar D: Isolation and Culture of Mouse Hepatocytes and Kupffer Cells (KCs). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2455: 73–84, 2022, doi:10.1007/978-1-0716-2128-8_7
59. Pfeiffer E, Kegel V, Zeilinger K, Hengstler JG, Nüssler AK, Seehofer D, Damm G: Featured Article: Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 240(5): 645–56, 2015, doi:10.1177/1535370214558025
60. Cabral F, Miller CM, Kudrna KM, Hass BE, Daubendiek JG, Kellar BM, Harris EN: Purification of Hepatocytes and Sinusoidal Endothelial Cells from Mouse Liver Perfusion. *Journal of visualized experiments JoVE*(132), 2018, doi:10.3791/56993
61. Mattei G, Ahluwalia A: Sample, testing and analysis variables affecting liver mechanical properties: A review. *Acta biomaterialia* 45: 60–71, 2016, doi:10.1016/j.actbio.2016.08.055
62. Clauss W, Clauss C: *Humanbiologie kompakt*, 2nd ed., Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2018, doi:10.1007/978-3-662-55850-8
63. Martini FH: *Anatomie Kompaktlehrbuch*, 6th ed., München, Pearson Higher Education, 2013
64. Marquort W: Zur Histologie der Synovialmembran. *Z.Zellforsch*(12): 34–52, 1930, doi:10.1007/BF00376553
65. Jonietz E: Mechanics: The forces of cancer. *Nature*(491): 56–7, 2012, doi:10.1038/491S56a
66. Alibert C, Goud B, Manneville J-B: Are cancer cells really softer than normal cells? *Biology of the cell* 109(5): 167–89, 2017, doi:10.1111/boc.201600078
67. Ghosh D, Dawson MR: Microenvironment Influences Cancer Cell Mechanics from Tumor Growth to Metastasis. *Advances in experimental medicine and biology* 1092: 69–90, 2018, doi:10.1007/978-3-319-95294-9_5
68. Bols NC, Lee LE: Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish. *Cytotechnology* 6(3): 163–87, 1991, doi:10.1007/BF00624756
69. Northcraft RD: A Rapid Method of Single Cell Isolation. *Science (New York, N.Y.)* 107(2787): 578, 1948, doi:10.1126/science.107.2787.578

70. Reichard A, Asosingh K: Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for Flow Cytometry. *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology* 95(2): 219–26, 2019, doi:10.1002/cyto.a.23690
71. Kasza KE, Rowat AC, Liu J, Angelini TE, Brangwynne CP, Koenderink GH, Weitz DA: The cell as a material. *Current opinion in cell biology* 19(1): 101–7, 2007, doi:10.1016/j.ceb.2006.12.002
72. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF: An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32(12): 3233–43, 2011, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
73. Mitra A, Mishra L, Li S: Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends in biotechnology* 31(6): 347–54, 2013, doi:10.1016/j.tibtech.2013.03.006
74. Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J: Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of tissue engineering*(4): 1-14, 2013, doi:10.1177/2041731412472690
75. Lim CT, Zhou EH, Quek ST: Mechanical models for living cells--a review. *Journal of biomechanics* 39(2): 195–216, 2006, doi:10.1016/j.jbiomech.2004.12.008
76. Surachai U: Basic Techniques in Animal Cell Culture. *Drug Delivery System Workshop*: 1–30, 1999, doi:10.1093/wentk/9780199733057.003.0002
77. Mótyán JA, Tóth F, Tózsér J: Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules* 3(4): 923–42, 2013, doi:10.3390/biom3040923
78. Mark Peakman, Gillian L. McNab, Nigel D. HEaton, Kai C. Tan, Diego Vergani: Development of techniques for obtaining monodispersed human islet cells. *Transplantation*(57): 384–93, 1994
79. Welch EC, Yu H, Tripathi A: Optimization of a Clinically Relevant Chemical-Mechanical Tissue Dissociation Workflow for Single-Cell Analysis. *Cellular and molecular bioengineering* 14(3): 241–58, 2021, doi:10.1007/s12195-021-00667-y
80. Qiu X, Lombardo JA, Westerhof TM, Pennell M, Ng A, Alshetaiwi H, Luna BM, Nelson EL, Kessenbrock K, Hui EE, Haun JB: Microfluidic filter device with nylon mesh membranes efficiently dissociates cell aggregates and digested tissue into single cells. *Lab on a chip* 18(18): 2776–86, 2018, doi:10.1039/c8lc00507a
81. Failli A, Consolini R, Legitimo A, Spisni R, Castagna M, Romanini A, Gaetano Crimaldi, Miccoli P: The challenge of culturing human colorectal tumor cells: establishment of a cell culture model by the comparison of different methodological approaches. *Tumori*(95): 343–7, 2009, doi:10.1177/030089160909500312

82. Triantafillu UL, Nix JN, Kim Y: Novel fluid shear-based dissociation device for improved single cell dissociation of spheroids and cell aggregates. *Biotechnology progress* 34(1): 293–8, 2018, doi:10.1002/btpr.2528
83. Toullec JV: Crustacean primary cell culture: A technical approach. *Methods in Cell Science*(21): 193–8, 1999, doi:10.1023/a:1009833924792
84. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS: Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus* 4: 713, 2015, doi:10.1186/s40064-015-1509-2
85. Fischer A: *Tissue culture studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro*, London, Heinemann, 1925, doi:10.5962/bhl.title.6566
86. Parker, R. C., J.F. Morgan: *Methods of tissue culture*. New York: Hoeber Medical Division-Harper & Row., 1950
87. Ribeiro L and Ahne W.: Fish Cell Culture. *In Vitro*(5): 419–20, 1982, doi:10.1007/BF02796467
88. Miserocchi G, Mercatali L, Liverani C, Vita A de, Spadazzi C, Pieri F, Bongiovanni A, Recine F, Amadori D, Ibrahim T: Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *Journal of translational medicine* 15(1): 229, 2017, doi:10.1186/s12967-017-1328-z
89. Wensink GE, Elias SG, Mullenders J, Koopman M, Boj SF, Kranenburg OW, Roodhart JML: Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *NPJ precision oncology* 5(1): 30, 2021, doi:10.1038/s41698-021-00168-1
90. Markin RD and Whalen SA: Laboratory Automation: Trajectory, Technology, and Tactics. *Clinical chemistry*(46:5): 764–71, 2000
91. Santangelo C: *Worthington Biochemical Online Tissue Dissociation Guide*, 2011
92. Tennant JR: Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation*(2): 685–94, 1964, doi:10.1002/0471142735.ima03bs111
93. Strober W: Monitoring cell growth. *Current protocols in immunology*: Appendix 3A, 2001, doi:10.1002/0471142735.ima03as21
94. Hosic S, Murthy SK, Koppes AN: Microfluidic Sample Preparation for Single Cell Analysis. *Analytical chemistry* 88(1): 354–80, 2016, doi:10.1021/acs.analchem.5b04077
95. Hughes NC, Wong EYK, Fan J, Bajaj N: Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays. *The AAPS journal* 9(3): E353-60, 2007, doi:10.1208/aapsj0903042
96. Leelatian N, Doxie DB, Greenplate AR, Sinnaeve J, Ihrle RA, Irish JM: Preparing Viable Single Cells from Human Tissue and Tumors for Cytomic Analysis. *Current protocols in molecular biology* 118: 25C.1.1-25C.1.23, 2017, doi:10.1002/cpmb.37

97. Riba J, Zimmermann S, Koltay P: Technologies for Automated Single Cell Isolation. In: *Handbook of Single Cell Technologies*, edited by Santra TS, Tseng F-G, Singapore, Springer Singapore, 2018, pp 1–28
98. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S: Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *The American Journal of Pathology* 161(6): 1961–71, 2002, doi:10.1016/S0002-9440(10)64472-0
99. Apple S, Pucci R, Lowe AC, Shintaku I, Shapourifar-Tehrani S, Moatamed N: The effect of delay in fixation, different fixatives, and duration of fixation in estrogen and progesterone receptor results in breast carcinoma. *American journal of clinical pathology* 135(4): 592–8, 2011, doi:10.1309/AJCPB1RIT5YXMRIS
100. Bell WC, Young ES, Billings PE, Grizzle WE: The efficient operation of the surgical pathology gross room. *Biotechnic & histochemistry official publication of the Biological Stain Commission* 83(2): 71–82, 2008, doi:10.1080/10520290802127610
101. Bykov Y, Kim SH, Zamarin D: Preparation of single cells from tumors for single-cell RNA sequencing. *Methods in enzymology* 632: 295–308, 2020, doi:10.1016/bs.mie.2019.05.057
102. Grizzle WE, Bell WC, Sexton KC: Issues in collecting, processing and storing human tissues and associated information to support biomedical research. *Cancer biomarkers section A of Disease markers* 9(1-6): 531–49, 2010, doi:10.3233/CBM-2011-0183
103. Dressler LG, Visscher D: Handling, storage, and preparation of human tissues. *Current protocols in cytometry* Chapter 5: Unit 5.2, 2001, doi:10.1002/0471142956.cy0502s01
104. Hanamsagar R, Reizis T, Chamberlain M, Marcus R, Nestle FO, Rinaldis E de, Savova V: An optimized workflow for single-cell transcriptomics and repertoire profiling of purified lymphocytes from clinical samples. *Scientific reports* 10(1): 2219, 2020, doi:10.1038/s41598-020-58939-y
105. Zilionis R, Nainys J, Veres A, Savova V, Zemmour D, Klein AM, Mazutis L: Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics. *Nat Protoc* 12(1): 44–73, 2017, doi:10.1038/nprot.2016.154
106. Kassem S, van der Pan K, Jager AL de, Naber BAE, Laat IF de, Louis A, van Dongen JJM, Teodosio C, Díez P: Proteomics for Low Cell Numbers: How to Optimize the Sample Preparation Workflow for Mass Spectrometry Analysis. *Journal of proteome research* 20(9): 4217–30, 2021, doi:10.1021/acs.jproteome.1c00321
107. Hwang B, Lee JH, Bang D: Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Experimental & molecular medicine* 50(8): 1–14, 2018, doi:10.1038/s12276-018-0071-8

108. Shema E, Bernstein BE, Buenrostro JD: Single-cell and single-molecule epigenomics to uncover genome regulation at unprecedented resolution. *Nature genetics* 51(1): 19–25, 2019, doi:10.1038/s41588-018-0290-x
109. Stuart T, Satija R: Integrative single-cell analysis. *Nature reviews. Genetics* 20(5): 257–72, 2019, doi:10.1038/s41576-019-0093-7
110. Ståhlberg A, Kubista M: Technical aspects and recommendations for single-cell qPCR. *Molecular aspects of medicine* 59: 28–35, 2018, doi:10.1016/j.mam.2017.07.004
111. Machado L, Geara P, Camps J, Dos Santos M, Teixeira-Clerc F, van Herck J, Varet H, Legendre R, Pawlotsky J-M, Sampaolesi M, Voet T, Maire P, Relaix F, Mourikis P: Tissue damage induces a conserved stress response that initiates quiescent muscle stem cell activation. *Cell stem cell*, 2021, doi:10.1016/j.stem.2021.01.017
112. Litchfield K, Stanislaw S, Spain L, Gallegos LL, Rowan A, Schnidrig D, Rosenbaum H, Harle A, Au L, Hill SM, Tippu Z, Thomas J, Thompson L, Xu H, Horswell S, Barhoumi A, Jones C, Leith KF, Burgess DL, Watkins TBK, Lim E, Birkbak NJ, Lamy P, Nordentoft I, Dyrskjøt L, Pickering L, Hazell S, Jamal-Hanjani M, Larkin J, Swanton C, Alexander NR, Turajlic S: Representative Sequencing: Unbiased Sampling of Solid Tumor Tissue. *Cell reports* 31(5): 107550, 2020, doi:10.1016/j.celrep.2020.107550
113. Tung P-Y, Blischak JD, Hsiao CJ, Knowles DA, Burnett JE, Pritchard JK, Gilad Y: Batch effects and the effective design of single-cell gene expression studies. *Scientific reports* 7: 39921, 2017, doi:10.1038/srep39921
114. Z. Zhang, M. A. Ferenczi A. C. Lush and C. R. Thomas: A novel micromanipulation technique for measuring the bursting strength of single mammalian cells. *Appl Microbiol Biotechnol*(36): 208–10, 1991
115. Rumpf H: Die Einzelkornzerkleinerung als Grundlage einer technischen Zerkleinerungswissenschaft. *Chemie Ing. Techn.* 37(3): 187–202, 1965, doi:10.1002/cite.330370303
116. Heinrich Schubert: *Handbuch der Mechanischen Verfahrenstechnik*, Wiley-VCH, 2002
117. Ali R, Samman N, Al Zahrani H, Nehdi A, Rahman S, Khan AL, Al Balwi M, Alriyees LA, Alzaid M, Al Askar A, Boudjelal M: Isolation and characterization of a new naturally immortalized human breast carcinoma cell line, KAIMRC1. *BMC cancer* 17(1): 803, 2017, doi:10.1186/s12885-017-3812-5
118. Faridi N, Bathaie SZ, Abroun S, Farzaneh P, Karbasian H, Tamanoi F, Mohagheghi M-A: Isolation and characterization of the primary epithelial breast cancer cells and the adjacent normal epithelial cells from Iranian women's breast cancer tumors. *Cytotechnology* 70(2): 625–39, 2018, doi:10.1007/s10616-017-0159-3

119. Ghaderi F, Mehdipour F, Hosseini A, Talei A, Ghaderi A: Establishment and Characterization of a New Triple Negative Breast Cancer Cell Line from an Iranian Breast Cancer Tissue. *Asian Pacific journal of cancer prevention APJCP* 20(6): 1683–9, 2019, doi:10.31557/APJCP.2019.20.6.1683
120. Roider T, Brinkmann BJ, Dietrich S: Processing human lymph node samples for single-cell assays. *STAR protocols* 2(4): 100914, 2021, doi:10.1016/j.xpro.2021.100914
121. Nushtaeva AA, Karpushina AA, Ermakov MS, Gulyaeva LF, Gerasimov AV, Sidorov SV, Gayner TA, Yunusova AY, Tkachenko AV, Richter VA, Koval OA: Establishment of primary human breast cancer cell lines using "pulsed hypoxia" method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice. *Cancer cell international* 19: 46, 2019, doi:10.1186/s12935-019-0766-5
122. Richter M, Piwocka O, Musielak M, Piotrowski I, Suchorska WM, Trzeciak T: From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Frontiers in cell and developmental biology* 9: 711381, 2021, doi:10.3389/fcell.2021.711381
123. Hendijani F: Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell proliferation* 50(2), 2017, doi:10.1111/cpr.12334
124. Hamburger AW, White CP, and Tencer K: Effect of Enzymatic Disaggregation on Proliferation of Human Tumor Cells in Soft Agar. *Journal of the National Cancer Institute*(68): 945–9, 1982
125. Autengruber A, Gereke M, Hansen G, Hennig C, Bruder D: Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. *European journal of microbiology & immunology* 2(2): 112–20, 2012, doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.3
126. O'Flanagan CH, Campbell KR, Zhang AW, Kabeer F, Lim JLP, Biele J, Eirew P, Lai D, McPherson A, Kong E, Bates C, Borkowski K, Wiens M, Hopkins J, Hewitson B, Ceglia N, Moore R, Mungall AJ, McAlpine JN, Shah SP, Aparicio S: *Dissociation of solid tumour tissues with cold active protease for single-cell RNA-seq minimizes conserved collagenase-associated stress responses*, 2019, doi:10.1101/683227
127. Volovitz I, Shapira N, Ezer H, Gafni A, Lustgarten M, Alter T, Ben-Horin I, Barzilai O, Shahar T, Kanner A, Fried I, Veshchev I, Grossman R, Ram Z: A non-aggressive, highly efficient, enzymatic method for dissociation of human brain-tumors and brain-tissues to viable single-cells. *BMC neuroscience* 17(1): 30, 2016, doi:10.1186/s12868-016-0262-y
128. Brink SC, Sage F, Vértesy A, Spanjaard B, Peterson-Maduro J, Baron CS, Robin C and Oudenaarden A: Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nature methods*(14): 935–6, 2017, doi:10.1038/nmeth.4437

129. Mattei D, Ivanov A, van Oostrum M, Pantelyushin S, Richetto J, Mueller F, Beffinger M, Schellhammer L, vom Berg J, Wollscheid B, Beule D, Paolicelli RC, Meyer U: Enzymatic Dissociation Induces Transcriptional and Proteotype Bias in Brain Cell Populations. *International journal of molecular sciences* 21(21), 2020, doi:10.3390/ijms21217944
130. Machado L, Relaix F, Mourikis P: Stress relief: emerging methods to mitigate dissociation-induced artefacts. *Trends in cell biology* 31(11): 888–97, 2021, doi:10.1016/j.tcb.2021.05.004
131. Grange C, Létourneau J, Forget M-A, Godin-Ethier J, Martin J, Liberman M, Latour M, Widmer H, Lattouf J-B, Piccirillo CA, Cailhier J-F, Lapointe R: Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. *Journal of immunological methods* 372(1-2): 119–26, 2011, doi:10.1016/j.jim.2011.07.002
132. Quatromoni JG, Singhal S, Bhojnagarwala P, Hancock WW, Albelda SM, Eruslanov E: An optimized disaggregation method for human lung tumors that preserves the phenotype and function of the immune cells. *Journal of leukocyte biology* 97(1): 201–9, 2015, doi:10.1189/jlb.5TA0814-373
133. Gray D, Chidgey A, Boyd R: Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *Journal of immunological methods* 260(1-2): 15–28, 2002, doi:10.1016/S0022-1759(01)00493-8
134. Waise S, Parker R, Rose-Zerilli MJJ, Layfield DM, Wood O, West J, Ottensmeier CH, Thomas GJ, Hanley CJ: An optimised tissue disaggregation and data processing pipeline for characterising fibroblast phenotypes using single-cell RNA sequencing. *Scientific reports* 9(1): 9580, 2019, doi:10.1038/s41598-019-45842-4
135. Lafferty RM: *Enzyme Technology*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 1983, doi:10.1007/978-3-642-69148-5
136. Kleinig AR, Middelberg AP: On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science* 53(5): 891–8, 1998, doi:10.1016/S0009-2509(97)00414-4
137. Burden D: Guide to the Homogenization of Biological Samples. *Random Primers*(7): 1–14, 2008
138. Qiu X, Westerhof TM, Karunaratne AA, Werner EM, Pourfard PP, Nelson EL, Hui EE, Haun JB: Microfluidic device for rapid digestion of tissues into cellular suspensions. *Lab on a chip* 17(19): 3300–9, 2017, doi:10.1039/c7lc00575j
139. Qiu X, Jesus J de, Pennell M, Troiani M, Haun JB: Microfluidic device for mechanical dissociation of cancer cell aggregates into single cells. *Lab on a chip* 15(1): 339–50, 2015, doi:10.1039/c4lc01126k

140. Lin C-H, Lee D-C, Chang H-C, Chiu I-M, Hsu C-H: Single-cell enzyme-free dissociation of neurospheres using a microfluidic chip. *Analytical chemistry* 85(24): 11920–8, 2013, doi:10.1021/ac402724b
141. Dobler H: *Automatisierung des Gewebeaufschlusses für die Analyse von Zellinhaltsstoffen*. Dissertation, Universität Stuttgart, Jost-Jetter Verlag, 2004
142. Scheuermann S, Lehmann JM, Ramani Mohan R, Reißfelder C, Rückert F, Langejürgen J, Pallavi P: TissueGrinder, a novel technology for rapid generation of patient-derived single cell suspensions from solid tumors by mechanical tissue dissociation. *Frontiers in medicine* 9: 721639, 2022, doi:10.3389/fmed.2022.721639
143. Kloke A, Fiebach AR, Zhang S, Drechsel L, Niekrawietz S, Hoehl MM, Kneusel R, Panthel K, Steigert J, Stetten F von, Zengerle R, Paust N: The LabTube - a novel microfluidic platform for assay automation in laboratory centrifuges. *Lab on a chip* 14(9): 1527–37, 2014, doi:10.1039/c3lc51261d
144. McClymont DW, Freemont PS: With all due respect to Maholo, lab automation isn't anthropomorphic. *Nature biotechnology* 35(4): 312–4, 2017, doi:10.1038/nbt.3795
145. Scheuermann S, Schäfer A, Langejürgen J, Reis C: A step towards enzyme-free tissue dissociation. *Current Directions in Biomedical Engineering* 5(1): 545–8, 2019, doi:10.1515/cdbme-2019-0137
146. Blecher L: *Strömungsvorgänge in Rührwerksmühlen*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 1993
147. Englert M: *Einfluss mechanischer Dispergierverfahren auf Struktur und Eigenschaften duroplastischer Nanoverbundwerkstoffe*. Dissertation, Technischen Universität Kaiserslautern, 2009
148. Mende S: *Mechanische Erzeugung von Nanopartikeln in Rührwerkskugelmühlen*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2003
149. Mende G: *Das Einfangen von Mahlgutpartikeln durch Mahlkugeln*. Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Cuvillier, 2005
150. Milo R, and Philipps R.: *Cell Biology by the Numbers*, New York, Garland Science, 2015, doi:10.1201/9780429258770
151. Wilson ZE, Rostami-Hodjegan A, Burn JL, Tooley A, Boyle J, Ellis SW and Tucker GT: Inter-individual variability in levels of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. *Br J Clin Pharmacol*(56): 433–40, 2003, doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01881.x.
152. Bialleck S: *Herstellung von Polysaccharidpellets mittels Schmelzextrusion*. Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011

153. Kampen I: *Einfluss der Zellaufschlussmethode auf die Expanded Bed Chromatographie*. Dissertation, Universität Braunschweig, 2005, doi:10.24355/dbbs.084-200611130100-50
154. Mäder-Porombka C, Homberg A, Hörster F, Brune M, Kilian S, Buckel B, Goldwasser R: Einfluss einer maßgeschneiderten Präanalytik-Fortbildung auf die Qualität der Laboruntersuchungen. *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen* 150-152: 38–44, 2020, doi:10.1016/j.zefq.2019.12.004
155. Schulze TT, Neville AJ, Chapman RC, Davis PH: Mouse splenocyte enrichment strategies via negative selection for broadened single-cell transcriptomics. *STAR protocols* 3(2): 101402, 2022, doi:10.1016/j.xpro.2022.101402
156. Priebe E: *Optimierung eines Protokolls zur Dissoziation von Mausleber mittels TissueGrinder und der anschließenden Kultivierung der Einzelzellen zu Sphäroiden*. Bachelorarbeit, Hochschule Mannheim, 2021
157. Daniel Wiencek: *Etablierung und Analyse des mechanischen Gewebeaufschlusses von Synovialmembran und Chondrozyten mittels TissueGrinder*. Bachelorarbeit, Hochschule Frankfurt, 2022
158. Lehmann, Jonas M: *Entwicklung und Evaluierung eines Protokolls zur Isolierung und Kultivierung von Zellen aus Primärgewebe mittels TissueGrinder*. Bachelorarbeit, Hochschule Mannheim, 2020
159. Scheuermann S, Lehmann JM, Mohan RR, Reißfelder C, Rückert F, Langejürgen J, Pallavi P: TissueGrinder, a novel technology for rapid generation of patient-derived single cell suspensions from solid tumors by mechanical tissue dissociation. *bioRxiv preprint*, 2021, doi:10.1101/2021.06.08.447529
160. Soteriou D, Kubánková M, Schweitzer C, López-Posadas R, Pradhan R, Thoma O-M, Györfi A-H, Matei A-E, Waldner M, Distler JHW, Scheuermann S, Langejürgen J, Schneider-Stock R, Atreya R, Neurath MF, Hartmann A, Guck J: Single-cell physical phenotyping of mechanically dissociated tissue biopsies for fast diagnostic assessment. *bioRxiv preprint*, 2021, doi:10.1101/2021.11.30.21267075
161. Otto O, Rosendahl P, Mietke A, Golfier S, Herold C, Klaue D, Girardo S, Pagliara S, Ekpenyong A, Jacobi A, Wobus M, Töpfner N, Keyser UF, Mansfeld J, Fischer-Friedrich E, Guck J: Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping. *Nature methods* 12(3): 199-202, 2015, doi:10.1038/nmeth.3281
162. Ivanov DP, Parker TL, Walker DA, Alexander C, Ashford MB, Gellert PR, Garnett MC: Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. *PloS one* 9(8): e103817, 2014, doi:10.1371/journal.pone.0103817

163. Pallavi P, Pretze M, Caballero J, Li Y, Hofmann BB, Stamellou E, Klotz S, Wängler C, Wängler B, Loesel R, Roth S, Theisinger B, Moerz H, Binzen U, Greffrath W, Treede R-D, Harmsen MC, Krämer BK, Hafner M, Yard BA, Kälsch A-I: Analyses of Synthetic N-Acyl Dopamine Derivatives Revealing Different Structural Requirements for Their Anti-inflammatory and Transient-Receptor-Potential-Channel-of-the-Vanilloid-Receptor-Subfamily-Subtype-1 (TRPV1)-Activating Properties. *Journal of medicinal chemistry* 61(7): 3126–37, 2018, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00156
164. Kachi K FSW: The connection between the nuclei of binucleated hepatocytes an ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol.*(26(2)): 163–72, 1994
165. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA: Organogenesis and development of the liver. *Developmental cell* 18(2): 175–89, 2010, doi:10.1016/j.devcel.2010.01.011
166. Ascierio PA, Bifulco C, Palmieri G, Peters S, Sidiropoulos N: Preanalytic Variables and Tissue Stewardship for Reliable Next-Generation Sequencing (NGS) Clinical Analysis. *The Journal of molecular diagnostics JMD* 21(5): 756–67, 2019, doi:10.1016/j.jmoldx.2019.05.004
167. Roelofsen DP: Entwicklungen auf dem Gebiet des Pigmentdispergierens mit Rührwerkskugelmöhlen. *Farbe + Lack*(97): 235–42, 1991
168. Ruiz VE, Sachdev M, Zhang S, Wen S, Moss SF: Isolating, immunophenotyping and ex vivo stimulation of CD4+ and CD8+ gastric lymphocytes during murine *Helicobacter pylori* infection. *Journal of immunological methods* 384(1-2): 157–63, 2012, doi:10.1016/j.jim.2012.07.002
169. Valente MJ, Henrique R, Costa VL, Jerónimo C, Carvalho F, Bastos ML, Pinho PG de, Carvalho M: A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PloS one* 6(5): e19337, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0019337
170. Epshtein A, Sakhneny L, Landsman L: Isolating and Analyzing Cells of the Pancreas Mesenchyme by Flow Cytometry. *Journal of visualized experiments JoVE*(119), 2017, doi:10.3791/55344

10 Anhang

Für das zerkleinerungsaktive Volumen zwischen zwei Mahlkörpern kann folgender Zusammenhang hergeleitet werden ¹⁶⁷:

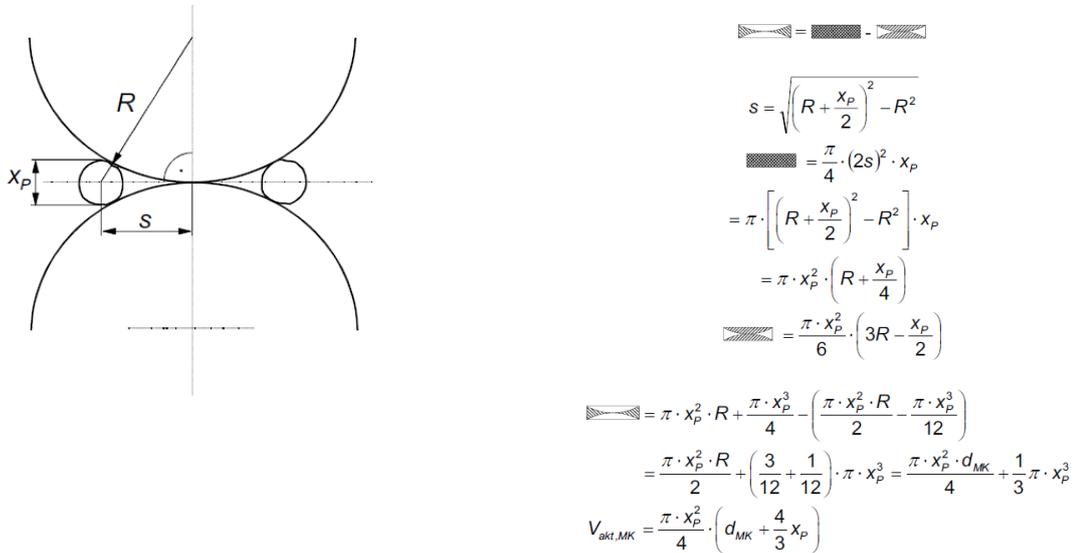
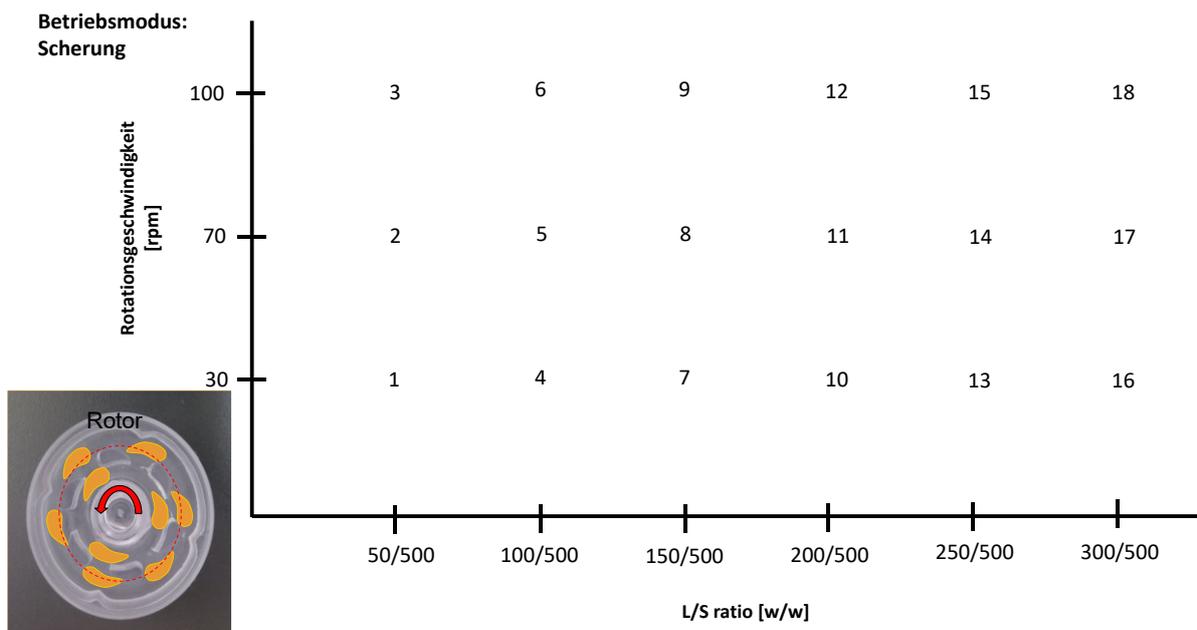


Abbildung 73: Herleitung zerkleinerungsaktives Volumen zwischen zwei Mahlkörpern.

Arbeitsmatrix zur Bestimmung des Drehmoments und Berechnung des spezifischen mechanischen Energieeintrags.

A)



B)

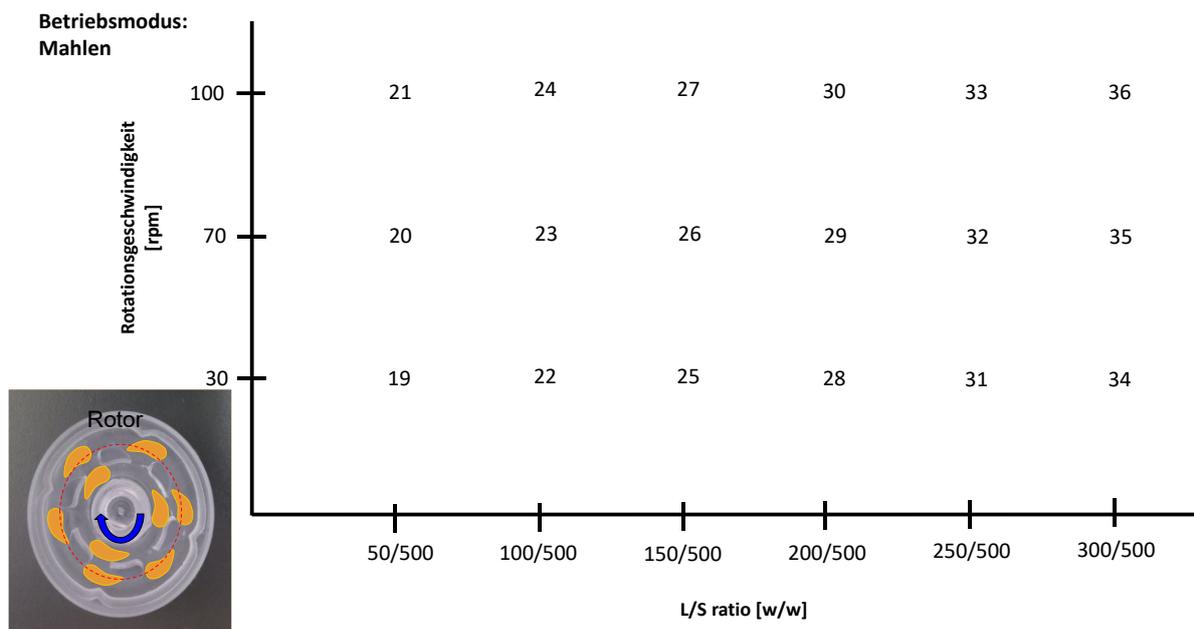


Abbildung 74: Arbeitsmatrix der Versuchsanordnung für die Drehmomentmessung. A) Betriebsmodus: Scheren, B) Betriebsmodus: Mahlen. L/S ration stellt das Verhältnis von Flüssigkeit (PBS in mg) zur festen Probe (ballistische Gelatine in mg) dar.

Übersicht über die verwendeten enzymatischen und mechanischen Dissoziationsprotokolle.

Tabelle 11: Für jedes Organ verwendete enzymatische oder mechanische Dissoziationsprotokolle ¹⁶⁰.

Gewebe	Dissoziationsprotokoll
Dickdarm	Miltenyi Biotec Lamina Propria Dissoziations-Kit
Klein	Miltenyi Biotec Lamina-Propria-Dissoziations-Kit
Lunge	Miltenyi Biotec Lungen-Dissoziations-Kit
Leber	Miltenyi Biotec Leber-Dissoziations-Kit oder Kollagenase/Dispase
Magen	Ruiz et al 2012 ¹⁶⁸
Niere	Valente et al 2011 ¹⁶⁹
Bauchspeicheldrüse	Epshtein et al. 2017 ¹⁷⁰
Thymus	Gewebe zwischen den gefrosteten Enden von zwei Objektträgern zerdrücken
Mesenterialer Lymphknoten	Gewebe zwischen den gefrosteten Enden von zwei Objektträgern zerdrücken
Milz	Gewebe zwischen den gefrosteten Enden von zwei Objektträgern zerdrücken

Übersicht über die mechanische und enzymfreien Gewebedissoziator-Protokolle.

Tabelle 12: Gewebedissoziator-Protokolle mit dessen Hilfe die Mausorgane für die mechanische Dissoziation aufbereitet wurden ¹⁶⁰.

Gewebe	Gewebedissoziator-Protokoll
Dickdarm	Colon
Dünndarm	Intestine
Lunge	Lung standard
Leber	Liver standard
Niere	Medium
Bauchspeicheldrüse	Soft
Thymus	Spleen
Mesenterialer Lymphknoten	Lymph nodes standard
Milz	Spleen
Menschlicher Tumor	Tumor

Western Blot Antikörper Verdünnungen.

Tabelle 13: Tabelle mit der Beschreibung der in der Studie verwendeten Antikörper zur Durchführung des Western Blots

Antikörper	Verdünnung	Produktnr.	Unternehmen
Beta-Actin	1:1000	4970S	Cell Signaling Technology
Keratin 19	1:1000	4558S	Cell Signaling Technology
P53	1:1000	48818S	Cell Signaling Technology
SMAD4	1:1000	38454S	Cell Signaling Technology
Anti-Rabbit – HRP Konjugat	1:1000	7074S	Cell Signaling Technology
Anti-Maus – HRP Konjugat	1:1000	58802S	Cell Signaling Technology

11 Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

Auszüge dieser Arbeit wurden an folgender Stelle vorab veröffentlicht:

Peer-Reviewed-Artikel:

- Despina Soteriou, Markéta Kubánková, Christine Schweitzer, Rashmita Pradhan, Rocío López- Posadas, Oana-Maria Thoma, Andrea-Hermína Györfi, Alexandru-Emil Matei, Maximilian Waldner, Jörg H. W. Distler, **Stefan Scheuermann**, Jens Langejürgen, Regine Schneider-Stock, Raja Atreya, Arndt Hartmann, and Jochen Guck. **2023**, Rapid single-cell physical phenotyping of mechanically dissociated tissue biopsies. Nat. Biomed. Eng (2023). <https://doi.org/10.1038/s41551-023-01015-3>
- **Stefan Scheuermann***, Jonas M. Lehmann*, Ramkumar Ramani Mohan*, Christoph Reißfelder, Felix Rückert, Jens Langejürgen, Prama Pallavi. **2022**. TissueGrinder, a novel technology for rapid generation of patient-derived single cell suspensions from solid tumors by mechanical tissue dissociation, Front. Med. 9:721639, doi: 10.3389/fmed.2022.721639
- **Scheuermann, Stefan**; Schäfer, Armin; Langejürgen, Jens; Reis, Christian. **2019**. A step towards enzyme-free tissue dissociation, *accepted*, Current Directions in Biomedical Engineering, S. 545-548, DOI: <https://doi.org/10.1515/cdbme-2019-0137>

** die Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen*

Vorträge:

- **Scheuermann, Stefan**, 2022. Capacity Building Workshop EU Projekt Brain Twin, TissueGrinder + RT-DC, online 11.05.2022
- **Scheuermann, Stefan**, 2021. Tissue Dissociation and Single Cell Isolation, Nanions Ephys Seminar Series, online 21.05.2021
- **Scheuermann, Stefan**; Schöning, Sebastian. 2019. High-throughput diagnostic system for tissue-based personalized cancer therapy using lymph nodes. In: Forschungscampus M2OLIE: 4. Image-Guided Interventions Conference: Digitalisierung in der Medizin. 4. und 5. November 2019, Mannheim.
- **Scheuermann, Stefan**; Heidelberger Science Day 2018, Enabling automated, enzyme-free tissue dissociation for personalized medicine; 11.09.2018 BioRN Network e.V., Heidelberg.

Poster:

- Kubánková, M.* Soteriou, D.*, Thoma, O. M., Györfi, A. H., Matei, A. E., **Scheuermann, S.**, Dirla, F., Waldner, M., Distler, J., Langejürgen, J. and Guck, J. 2020. Mechanical dissociation of tissue for real-time deformability cytometry. DPG-Frühjahrstagung, 15-20. März 2020, Dresden (Konferenz wurde wegen Corona-Pandemie abgesagt).
- **Scheuermann, Stefan**; Schäfer, Armin; Langejürgen, Jens; Reis, Christian. 2019. Towards Enzyme-free Tissue Dissociation by Predictive Modelling. In: Deutsche Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE: 53rd Conference of the German Society for Biomedical Engineering. Frankfurt am Main.
- Werner-Klein, Melanie; Scheitler, Sebastian; Polzer, Bernhard; **Scheuermann, Stefan**; Bruns, Volker; Klein, Christoph. 2019. A novel approach for the detection, staging, typing, and treatment of minimal residual cancer. In: ASCENION GmbH: BioVaria 2019: 08. und 09. Mai 2019, München.
- **Scheuermann, Stefan**; Edinger, Daniel; Schäfer, Armin; Reis, Christian. 2018. TissueGrinder : Enabling Automated, Enzyme-free Tissue Dissociation for the Provision of Building Blocks for 3D Cell Cultures and High-throughput Screens In: Society for Laboratory Automation and Screening: 2018 SLAS Advanced 3D

Human Models and High-Content Analysis Conference: 17-19 Oktober 2018, Leiden, The Netherlands.
Oral Poster Presentation

Buchkapitel

Pallavi Prama; **Scheuermann Stefan**. 2023. Single cell isolation from surgically resected tissue via mechanical dissociation using TissueGrinder. In: Gužvić, Miodrag (Ed.): Single Cell Analysis: Methods and Protocols. Springer Science+Business Media LLC, 2024, S. 1-9 http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-3621-3_1

Patent:

- **Scheuermann, Stefan**; Edinger, Daniel; Schäfer, Armin; Reis, Christian; WO2019145029A1; Vorrichtung und Verfahren zur Dissoziation von Gewebe; Fraunhofer Gesellschaft e.V.

12 Lebenslauf

Stefan Scheuermann

Geburtsdatum und -ort: 28. März 1989 in Hardheim
Nationalität: Deutsch

Schulischer Werdegang

09/2005 – 07/2008 **Abitur, Frankenlandschule Walldürn**
Wirtschaftsgymnasium
Note: 2,2 (gut)

09/1999 – 07/2005 **Burghardt-Gymnasium Buchen**

Universitärer Werdegang

seit 11/2017 **Promotion (Dr. sc. hum.)**
Universität Heidelberg

03/2013 – 12/2014 **Master of Science (M.Sc.)**, Bioprocess Development
Hochschule Mannheim
Note: 1,4 (sehr gut)
Thesis: Fluorescence Detection of Cardiac Troponin T by Magnetic Manipulation of Magnetic Particles

10/2009 – 02/2013 **Bachelor of Science (B.Sc.)**, Biotechnology
Hochschule Mannheim
Note: 1,9 (gut)
Thesis: In-Situ mikroskopische Analyse von CHO Zellen

Beruflicher Werdegang

seit 01/2020 **Dozent, DHBW Mannheim**
Fach: Diagnostik, Studiengang: Chemische Technik

seit 05/2020 **Co-Founder, Fast Forward Discoveries GmbH**

seit 01/2015 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Fraunhofer IPA**
Abteilung für Automatisierung in der Medizin und Biotechnologie (PAMB) / ab 2021 Klinische Gesundheitstechnologien, Mannheim
Arbeitsbereich: Biomedizinische Sensoren und Mikrosystem

13 Danksagung

Mit großer Freude und Dankbarkeit möchte ich anlässlich meiner abgeschlossenen Dissertation die Gelegenheit nutzen, meinen tief empfundenen Dank auszusprechen.

Zunächst gilt mein aufrichtiger Dank meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr.-Ing. Jan Stallkamp, der mich während meiner gesamten Promotionszeit mit seinem Fachwissen, seiner Erfahrung und vor allem seiner unermüdlichen Unterstützung betreut hat. Seine wertvollen Ratschläge und kritischen Anmerkungen haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön gebührt Frau Volz, die mich geduldig und kompetent bei allen Fragen zum organisatorischen Promotionsprozess unterstützt hat. Ihre Hinweise und ihre stets offenen Ohren haben mir in manchen Situationen den Weg geebnet.

Ich möchte auch die Gruppe für Biomedizinische Sensoren und Mikrosysteme nicht vergessen, insbesondere Jens, Philipp L, Philipp R, Sabrina, Florian und Jan, die für eine großartige Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und mit denen ich einige schöne Stunden am Kickerisch verbracht habe. Nicht zu vergessen sind auch die vielen talentierten Studierenden, die mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet haben.

Ein weiterer Dank gilt meinen geschätzten Kollegen der Abteilung Klinische Gesundheitstechnologien des Fraunhofer IPA. Ihre Kooperation und Unterstützung haben die Forschungsumgebung unglaublich bereichert und zu einem fruchtbaren Austausch beigetragen.

Ich möchte mich herzlich bei der ehemaligen Gruppe Bioprozesstechnik des Fraunhofer IPA bedanken, bei der ich meine ersten Schritte als wissenschaftlicher Mitarbeiter machen durfte. Ein besonderer Dank geht an Caro, Sabrina, Thien, Marius, Armin und Christian. Ich hätte mir keine besseren Kollegen für den Start in mein Berufsleben wünschen können.

Ein herzlicher Dank geht an Jannick und Laura für ihre Unterstützung beim Korrekturlesen und die wertvollen Anmerkungen zur Arbeit. Ihre Hilfe hat maßgeblich dazu beigetragen, die Qualität meiner Arbeit zu verbessern. Vielen Dank!

Ich möchte mich von Herzen bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während der Erstellung dieser Arbeit stets unterstützt haben und mich auf meinem Lebensweg gefördert haben.

Ein besonderer Dank gebührt meiner wundervollen Frau Juliane, die großes Verständnis für die Herausforderungen aufgebracht hat und mir mit bedingungsloser Unterstützung und Liebe die nötige Stärke auf dieser Reise geschenkt hat. Abschließend möchte ich meinem Sohn Henry herzlich dafür danken, dass er mich entscheidend motiviert hat, die Arbeit erfolgreich abzuschließen.