

***In vitro* Rekonstruktion der äußeren Blut-Retina-Schranke in *Organ-on-chip*
Systemen mit Hilfe neuer Stammzell-Technologien**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Tamara Molitor

aus

Mannheim, Deutschland

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referent: Prof. Dr. Frank Breitling

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2022

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers von Juni 2019 bis Juli 2022 am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG), Karlsruher Institut für Technologie (KIT) angefertigt.

Diese Arbeit wurde durch die Carl-Zeiss-Stiftung gefördert.

Herrn Prof. Dr. Frank Breitling danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche und inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung wurde beachtet.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 <i>Tissue Engineering</i>	3
2.1.1 Von der 2D zur 3D Zellkultur	4
2.1.2 Hydrogele als EZM Analogon.....	5
2.1.3 3D <i>Bioprinting</i>	7
2.1.4 Organ-on-chip Systeme	8
2.2 Die Retina	10
2.2.1 Das Choroid	12
2.2.1.1 Vaskulogenese und Angiogenese	13
2.2.2 Retinales Pigmentepithel (RPE)	14
2.2.2.1 Funktionen des RPEs.....	14
2.2.2.2 Barrierefunktion des RPEs als äußere Blut-Retina-Schranke.....	16
2.3 Retinale Erkrankungen	18
2.3.1 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD).....	18
3. Zielsetzung.....	20
4. Ergebnisse und Diskussion	21
4.1 Kultivierung und Charakterisierung muriner embryonaler Stammzellen (mESC).....	21
4.1.1 Bestimmung der Pluripotenz bei mESC-Rx-GFP	21
4.1.1.1 Pluripotenzanalyse durch Immunfluoreszenznachweis	22
4.1.1.2 Pluripotenzanalyse mittels Durchflusszytometrie	23
4.2 Differenzierung von RPE aus mESC-Rx-GFP	25
4.2.1 Einfluss des Kultivierungsmaterials auf die RPE-Differenzierung.....	28
4.2.1.1 Einfluss von Serum auf die mESC-Rx-GFP Kultivierung.....	28
4.2.1.2 Einfluss von Zellkulturplatten auf die Differenzierung	30
4.2.2 Charakterisierung retinaler Vorläuferzellen während der RPE Differenzierung	33
4.2.2.1 <i>Live-cell Imaging</i> der GFP-Expression in DD7 Organoiden	34
4.2.2.2 Vermessung des Neuroektoderms bei DD7 Organoiden.....	35
4.2.2.3 Analyse retinaler Vorläuferzellen in DD7 Organoiden mit Hilfe der Durchflusszytometrie	36
4.2.2.4 Viabilitätsanalyse von DD7 Organoiden durch eine Lebend-/Tot-Färbung.....	38
4.2.2.5 Analyse der Anzahl an RPE-Vorläuferzellen an DD11	41
4.2.3 Charakterisierung des aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPEs.....	42
4.2.3.1 Viabilitätsanalyse des differenzierten RPEs mittels Lebend-/Tot-Färbung	42
4.2.3.2 Charakterisierung des differenzierten RPEs mittels Immunfluoreszenz	44
4.2.3.3 Genexpressionsanalyse des differenzierten RPEs.....	46
4.3 Etablierung des retinalen Endothels	50
4.3.1 Einfluss der Beschichtung auf das Wachstum und die Adhäsion bei REC.....	51

4.3.2	Einfluss der Beschichtung auf die Genexpression spezifischer Marker bei REC	54
4.4	Etablierung der oBRB im Transwell	56
4.4.1	Bestimmung eines geeigneten Kultivierungsmediums	57
4.4.2	Ko-Kultivierung von REC und RPE im Transwell.....	59
4.4.3	Funktionalitätstest der oBRB	62
4.4.3.1	Dextranassay zur Untersuchung der Barriereintegrität der oBRB im Transwell	62
4.4.3.2	TEER-Messung zur Untersuchung der Barriereintegrität der oBRB im Transwell ..	65
4.5	Etablierung der oBRB im vasQchip	68
4.5.1	Bestimmung der Zellzahl zur Kultivierung von REC im vasQchip	69
4.5.2	Bestimmung der Porengröße zur Kultivierung von REC im vasQchip	72
4.5.3	Kultivierung von REC im vasQchip	74
4.5.3.1	Einfluss der Beschichtung auf die Kultivierung von REC im vasQchip	74
4.5.3.2	Einfluss von Mikrofluidik auf die Kultivierung von REC im vasQchip.....	79
4.5.4	Einbringen des RPEs in <i>Organ-on-chip</i> Systeme	83
4.5.4.1	Einfluss der Porengröße auf die RPE Differenzierung.....	84
4.5.4.2	Kultivierung des RPEs im vasQchip	85
4.6	Etablierung der oBRB in einem Hydrogel basierten <i>Organ-on-chip</i> System	86
4.6.1	Herstellung der Gerüststruktur	87
4.6.2	Hydrogele zur Kultivierung von REC und RPE.....	88
4.6.2.1	PEGDA Hydrogele.....	89
4.6.2.2	Fibrinhydrogel	91
4.6.2.3	Kollagen I Hydrogele	94
4.6.2.4	GelMA Hydrogele.....	99
4.6.2.5	GelN/S Hydrogele.....	102
4.6.3	Toxizität von Bestrahlung und Photoinitiator gegenüber den Zellen	106
4.6.4	Etablierung des retinalen Endothels im Mikrokanal des <i>HB-flow</i> Systems.....	111
4.6.4.1	Charakterisierung des retinalen Endothels im Mikrokanal des <i>HB-flow</i> Systems	112
4.6.5	Einfluss der Mikrofluidik bei der Kultivierung von REC im <i>HB-flow</i> System	116
4.6.6	Pluronic F-127 für den 3D Biodruck des Mikrokanals im <i>HB-flow</i> System	118
4.6.7	Kultivierung von RPE auf dem Hydrogel im <i>HB-flow</i> System	121
4.6.8	Ko-Kultivierung von REC und RPE im <i>HB-flow</i> System.....	123
4.7	AMD als Krankheitsmodell	125
4.7.1	Untersuchung der Viabilität der oBRB unter hypoxischen Bedingungen im Transwell durch einen MTT-Nachweis.....	126
4.7.1.1	Wasserstoffperoxid.....	126
4.7.1.2	Cobaltchlorid.....	128
4.7.2	Analyse der Barriereintegrität unter hypoxischen Bedingungen	129
4.7.2.1	TEER-Messung zur Bestimmung der Barriereintegrität unter hypoxischen Bedingungen.....	129

4.7.2.2	Permeabilitätsassays mit Dextran zur Bestimmung der Barriereintegrität unter hypoxischen Bedingungen.....	131
5.	Fazit	133
6.	Material und Methoden	135
6.1	Material	135
6.1.1	Zellen	135
6.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	135
6.1.3	Medien und Puffer.....	140
6.1.4	Verbrauchsmaterialien	141
6.1.5	Verwendete Geräte	143
6.1.6	Primer	145
6.1.7	Antikörper.....	145
6.1.8	Mikroskopieeinstellungen	148
6.1.9	Software.....	148
6.2	Methoden.....	149
6.2.1	Allgemeine Zellkultur.....	149
6.2.1.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	149
6.2.1.2	Kultivierung von adhärennten Zellen.....	149
6.2.1.3	Beschichtung von Kultivierungsmaterialien zur REC Kultivierung	151
6.2.1.4	Wachstumskurven von REC und HUVEC.....	151
6.2.2	RPE-Differenzierung aus mESC-Rx-GFP	151
6.2.2.1	Beschichtungen für die Organoidbildung von mESC-Rx-GFP.....	153
6.2.2.2	Vermessung des Neuroektoderms	153
6.2.2.3	Lebend-/Tot-Nachweis.....	153
6.2.3	Ko-Kultivierung von REC und RPE im Transwell.....	154
6.2.3.1	Bestimmung der Barriereintegrität mit Hilfe von TEER-Messungen	154
6.2.3.2	Bestimmung der Permeabilität mit Hilfe von Dextran-FITC	155
6.2.4	Isolierung des RPEs aus dem Mausauge für die RNA Extraktion.....	155
6.2.5	Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der Genexpression.....	156
6.2.6	Durchflusszytometrie	158
6.2.7	Hydrogele.....	158
6.2.8	vasQchip	161
6.2.8.1	Produktion und Ätzen des Mikrokanals.....	161
6.2.8.2	Assemblierung des vasQchips.....	162
6.2.8.3	Beschichten des vasQchips	163
6.2.8.4	Besiedeln des Mikrokanals	163
6.2.8.5	Mikrofluidische Kultivierung des vasQchips mit Hilfe der Peristaltikpumpe.....	164
6.2.8.6	Reinigung	164
6.2.9	HB-flow System.....	165

6.2.9.1	Drucken der Gerüststruktur	165
6.2.9.2	Erstellen des Mikrokanals mit Hilfe der Nadeltechnik.....	165
6.2.9.3	Erstellen des Mikrokanals durch das 3D Drucken von Pluronic F-127	165
6.2.9.4	Besiedelung des Mikrokanals.....	165
6.2.9.5	Kultivierung des RPEs.....	166
6.2.9.6	Ko-Kultivierung von RPE und REC	166
6.2.9.7	Mikrofluidik mit Hilfe einer Peristaltikpumpe	166
6.2.9.8	Reinigung des <i>HB-flow</i> Systems.....	167
6.2.10	Hypoxische Umgebung.....	167
6.2.10.1	H ₂ O ₂ und CoCl ₂	167
6.2.10.2	MTT-Toxizitätstest	167
6.2.11	Immunfluoreszenz.....	168
6.2.12	Statistische Auswertung.....	169
7.	Abkürzungsverzeichnis	171
8.	Literaturverzeichnis.....	175
9.	Anhang.....	212

1. Zusammenfassung

Das Auge ist ein hochkomplexes Organ, das als sensorisches System die Fähigkeit hat, Lichtreize aus der Umwelt wahrzunehmen. Die Aufrechterhaltung der Sehfunktion durch eine geeignete Mikroumgebung im Auge wird durch Barrieren sichergestellt. Eine dieser Barrieren ist die äußere Blut-Retina-Schranke (oBRB). Diese wird durch das Retinale Pigmentepithel (RPE), einem polarisierten Epithel aus hexagonalen Zellen, gebildet. *Tight Junctions* verbinden die RPE-Zellen und separieren dadurch die neuronale Retina vom darunterliegenden fenestrierten Choroid, das als endotheliale Gefäßstruktur die äußere Retina über das Blut versorgt. Veränderungen der Barriereintegrität des RPEs führen zu dessen Funktionsbeeinträchtigung und der Pathogenese degenerativer retinaler Erkrankungen. Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist dabei als komplexe Augenerkrankung weltweit die Hauptursache für den Sehverlust älterer Menschen, weshalb der Bedarf an der Entwicklung von Therapien zur Behandlung hoch ist. Da die direkte Untersuchung am Patienten nur begrenzt möglich ist, stellt sich die Evaluation der Wirksamkeit neuer Medikamente bei der Arzneimittelentwicklung als problematisch dar. Da die Zellen im menschlichen Körper in einer dreidimensionalen (3D) Umgebung angeordnet sind und mit der umgebenden extrazellulären Matrix sowie mit anderen Zellen interagieren, rekapituliert die zweidimensionale Zellkultur die *in vivo* Situation nicht vollständig. Das *Tissue Engineering* hat sich durch die Etablierung dreidimensionaler Zellkulturmodelle die *in vivo* ähnliche Rekonstruktion von Geweben zum Ziel gesetzt. Organ-on-chip Systeme dienen der Nachbildung funktioneller Gewebeeinheiten auf Trägermaterialien und bieten großes Potenzial zur Untersuchung neuer Wirkstoffe. Dabei stellt vor allem die Differenzierung von Stammzellen eine vielversprechende Möglichkeit zur Erforschung biologischer Zusammenhänge und der Untersuchung retinaler Erkrankungen dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines *in vitro* Modells der äußeren Blut-Retina-Schranke durch die Kombination neuer Stammzelltechnologien und Hydrogele. Embryonale Stammzellen gelten heutzutage als wichtiges Forschungswerkzeug, da sie die Fähigkeit besitzen sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, aber in einem undifferenzierten, pluripotenten Zustand in Kultur gehalten werden können. Murine embryonale Stammzellen (mESC) wurden zur Differenzierung des RPEs eingesetzt, wobei zunächst deren Pluripotenz validiert wurde. Es ist bekannt, dass äußere Faktoren die Differenzierung beeinflussen, weshalb für die mESC geeignete Kultivierungs- und Differenzierungsbedingungen identifiziert wurden. Entgegen herkömmlicher Methoden wurde bei der Differenzierung von funktionellem RPE die *serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation* (SFEBq) Methode nach Iwasaki et al. zur Generierung retinaler Organoide eingesetzt. Nach 18 Differenzierungstagen konnte die erfolgreiche Differenzierung der mESC zu funktionellem RPE durch Analyse der Viabilität und der Genexpression bestätigt werden.

Neben der erfolgreichen Differenzierung von murinem RPE konnte für die anschließende Rekonstruktion der oBRB retinales Endothel etabliert werden. Da bekannt ist, dass die Oberfläche Einfluss auf die Zelladhäsion hat, wurden die Zellkulturmaterialien mit unterschiedlichen Proteinen der Extrazellulären Matrix (EZM) beschichtet, wodurch die Adhäsion der Endothelzellen verstärkt wurde. Die oBRB konnte anschließend nach der Identifikation eines geeigneten Mediums zur Ko-Kultivierung von RPE und Endothelzellen in einem Transwell System etabliert werden. Eine funktionale oBRB zeichnet sich vor allem durch den vom RPE kontrollierten Transport an Ionen, Wasser und metabolischen Produkten zwischen dem subretinalen Raum und dem Blut aus. Die Barriereintegrität der etablierten Ko-Kultur aus differenziertem RPE und retinalen Endothelzellen konnte anhand eines Permeabilitätsassays und dem Messen des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) validiert werden. Zusätzlich wurde der Einfluss hypoxischer Bedingungen auf die Barriereintegrität des RPEs in der etablierten Ko-Kultur untersucht, da oxidativer Stress bei der Pathogenese von AMD eine Rolle spielt. Um die wichtigen strukturellen, funktionellen, biochemischen und mechanischen Merkmale der oBRB vollständig rekapitulieren zu können, wurden *Organ-on-chip* Systeme als vaskularisierte *in vitro* Modellsysteme eingesetzt. Mit Hilfe des *Organ-on-chip* Systems können dynamische Prozesse wie der Blutfluss realisiert werden. Der in der Arbeitsgruppe Schepers (IFG, KIT) entwickelte vasQchip ist solch ein *Organ-on-chip* System, in dem das retinale Endothel erfolgreich im Mikrokanal etabliert werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass sich Oberflächenbeschichtungen im Vergleich zur statischen 2D Kultivierung unterschiedlich gut eignen und die Mikrofluidik die Genexpression der Zell-Zell-Verbindungen positiv beeinflusst. Für eine 3D Kultivierung des RPEs wurden natürliche Hydrogele als geeignetes EZM-Analog identifiziert. Das in der Arbeitsgruppe Huang entwickelte, Hydrogel-basierte *HB-flow* System besteht im Gegensatz zum vasQchip nur aus Hydrogel als Grundgerüst. Dabei konnte das semi-synthetische Hydrogel GelMA als geeignetes Stützmaterial für das Erstellen des Mikrokanals definiert werden. Durch extrusionsbasierte 3D Drucktechniken konnte zudem ein Mikrokanal im *HB-flow* System generiert werden, in dem die Kultivierung eines vaskularisierten retinalen Endothels möglich war. Die Kombination von GelMA und natürlichen Hydrogelen hat erste vielversprechende Ergebnisse bei der Ko-Kultivierung von retinalem Endothel im Mikrokanal und RPE auf der Hydrogeloberfläche erzielt, wobei die Möglichkeit einer mikrofluidischen Kultivierung besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination verschiedener Methoden aus dem *Tissue Engineering* großes Potential für die Entwicklung retinaler, vaskularisierter Gewebe bietet. Durch die erfolgreiche Ko-Kultivierung von differenziertem RPE und retinalen Endothelzellen konnte ein funktionales Modell der oBRB etabliert werden. Der Einsatz von Hydrogelen zur Nachahmung der EZM erlaubte die Nachbildung des Choroids in einem dreidimensionalen, vaskularisierten Mikrokanal eines *Organ-on-chip* Systems. Der Einsatz dieser *Organ-on-chip*-Systeme kann zukünftig der Identifikation von Arzneimitteln und der Behandlung von schweren retinalen Erkrankungen dienen.

2. Einleitung

2.1 Tissue Engineering

Das Versagen oder der Verlust von Organen oder Geweben ist ein häufig auftretendes, gravierendes und gleichzeitig kostspieliges Problem im Gesundheitswesen^[1]. Gerade auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin fehlt es seit Jahren an Spenderorganen und Ersatzgeweben. Neue Ansätze, diese Missstände zu beheben, bietet seit einigen Jahren das *Tissue Engineering*. Das *Tissue Engineering* stellt ein interdisziplinäres Feld der Ingenieurs- und Biowissenschaften dar und hat zum Ziel Technologien zu schaffen, die es erlauben Gewebe und Organe sowie biologische Ersatzteile zu generieren, die keiner Limitierung mehr unterliegen. Dabei können Probleme bei Transplantationen, wie z.B. eine lebenslange Immunsuppression zur Verhinderung der Abstoßung fremder Gewebe durch die Verwendung körpereigener Zellen umgangen werden^{[2]; [3]}. Das *Tissue Engineering* macht sich die Entwicklung biologischer Ersatzstoffe zu Nutze,^{[4]; [5]} manipuliert gezielt Zellen für eventuelle Ersatztherapien, setzt natürliche oder synthetische Gerüstmaterialien ein und verwendet bioaktive Moleküle, um Gewebe außerhalb des Körpers zu rekonstruieren. Die Nachahmung der natürlichen biologischen Umgebung steht bei der Herstellung intakter Gewebe- und Organ-Konstrukte im Vordergrund^[2], weshalb die Zellen typischerweise in einer Matrix eingebettet werden^{[4] [2] [6]}. Die Matrix dient den Zellen als strukturelle Unterstützung für die Zellanhaftung und anschließende Gewebeentwicklung und besteht typischerweise aus gentechnisch hergestellten biokompatiblen Polymeren oder natürlich vorkommenden EZM Proteinen^[7]. Das allumfassende Ziel des *Tissue Engineerings* ist die Verwendung patienteneigener Zellen zur Rekonstruktion komplexer Organe mit biotechnologisch erzeugtem transplantierbarem Material^[2]. Dazu steht insbesondere die Verwendung von patienteneigenem Material wie beispielsweise entnommene somatische Primärzellen im Vordergrund, aber auch differenzierte adulte Zellen oder undifferenzierte Vorläuferzellen sowie Stammzellen werden verwendet^{[8]; [2]}. Obwohl adulte Primärzellen aus Biopsien leicht zu isolieren sind und den Vorteil haben sich in einem ausdifferenzierten, funktionsfähigen Stadium zu befinden, weisen sie nur eine begrenzte Lebensdauer auf sobald sie aus ihrer nativen Umgebung entfernt wurden^{[9] [2]}. Auch die Proliferation der Zellen wird in der Regel eingestellt, wodurch die isolierte Menge an Zellen nach der Explantation für eine Organrekonstruktion oftmals nicht ausreicht. Aufgrund dessen richtet sich die Aufmerksamkeit verstärkt auf die Verwendung von Stammzellen^[4], da diese in der Lage sind sich selbst zu erneuern^{[9] [2]}. Embryonale Stammzellen beispielsweise werden während des Blastozystenstadiums aus der inneren Zellmasse des Embryos isoliert^[10] und können auch *in vitro* in Zelltypen aller 3 Keimblätter differenziert werden. In der Zellkultur können die embryonalen Stammzellen über lange Kulturperioden aufrechterhalten werden^[4]. Vor allem in der Regenerativen Medizin werden Kombinationen aus embryonalen Stammzellen, Gerüstmaterialien und

Wachstumsfaktoren für den Regenerationsprozess verwendet ^{[11][12]}. Der Stammzellpool mit unbeschränkter Pluripotenz beschränkt sich jedoch auf embryonale Stammzellen. Heute ist die Gewinnung embryonaler Stammzellen umstritten, weshalb der Fokus auf dem Generieren neuartiger adulter pluripotenter Stammzellen durch die Reprogrammierung adulter somatischer Zellen liegt ^{[13][2]}. Außerdem kann das *Tissue Engineering* durch den Einsatz menschlicher Zellen die Lücke zwischen Tierversuchen und klinischen Studien in der Arzneimittelforschung schließen, indem neue Wirkstoffe identifiziert und vorklinische Screenings durchgeführt werden können ^{[14][15]}. Auch wenn Tiermodelle in der Erforschung menschlicher Krankheiten als wichtige Forschungsmethode angesehen werden, bringen diese insbesondere auf ethischer Ebene viele Fragen mit sich. Das 3R-Prinzip (*replace, reduce, refine*) der Vermeidung, Reduktion und Verbesserung von Tierversuchen wird deshalb durch das *Tissue Engineering* gestärkt ^[16].

2.1.1 Von der 2D zur 3D Zellkultur

Vor fast einem Jahrhundert wurden die ersten zweidimensionalen (2D) *in vitro* Modelle zur Kultivierung von Zellen entwickelt ^{[17]; [18]}. Eine 2D-Zellkultur definiert sich durch das Wachstum von Zellen auf einer ebenen Fläche, wodurch die Möglichkeit zur Untersuchung der physiologischen und pathologischen Zellaktivitäten außerhalb des Organismus besteht ^{[18]; [19]}. Dabei stellt die 2D Zellkultivierung eine sehr einfache, kostengünstige und reproduzierbare Methode dar. Mit zunehmendem Verständnis der Zellmikroumgebung ^{[20]; [19]} hat sich jedoch gezeigt, dass eine 2D Zellkultur die gewebespezifischen Eigenschaften und Funktionen vieler Zelltypen nicht vollständig rekapitulieren kann, da die natürliche Mikroumgebung nicht vollumfänglich widergespiegelt wird ^{[21]; [19]; [18][22]; [19]}. Im Organismus selbst bestehen Gewebe aus einer Vielzahl verschiedener Zellen, die durch zahlreiche Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte in einer 3D Umgebung miteinander in Verbindung stehen ^{[23]; [18][24]; [25]}. Die für die Gewebe charakteristischen und morphologischen ^[26] Eigenschaften können während einer 2D Zellkultivierung aufgrund von Zelldifferenzierungen oftmals verloren gehen ^{[27] [21] [28][29][30] [25]}. Auch die Polarität ^[31], der Stoffwechsel ^[27] sowie die Proliferation der Zellen ^{[23]; [32]} werden durch das Einbringen in eine neue Mikroumgebung beeinflusst. ^{[33][34][35]} Die Zellviabilität^[19] sowie die Funktionalität und das Expressionsmuster der Zellen ^[36] können sich durch die fehlende Interaktion mit anderen Zellen und der extrazellulären Matrix ^{[37]; [38]} ebenfalls ändern. ^[39] Die Bereitstellung einer gewebetypischen Mikroumgebung ist somit für den Erhalt der Zellfunktionalität von großer Bedeutung.^[40] Wissenschaftler haben während der letzten Jahrzehnte verschiedene 3D-Kulturtechniken entwickelt, um die räumliche und chemische Komplexität lebender Gewebe besser widerzuspiegeln (**Abbildung 1**).^{[19][41][42]} Eine Möglichkeit zur Darstellung einer 3D Mikroumgebung besteht in dem Einbringen von Zellen in Gerüststrukturen, die der EZM *in vivo* ähneln. ^{[43]; [44]} Diese basieren meist auf Hydrogelen, die entweder aus natürlichen extrazellulären Matrixmolekülen oder

synthetischen Polymeren bestehen (Abbildung B). Eine weitere Form der 3D Zellkultivierung stellen Sphäroide dar, die durch Selbst-Assemblierung kugelförmige Zellaggregate bilden (Abbildung C).^{[45]; [46]} Die multizellulären Sphäroide können für die Vorhersage der Wirksamkeit und Toxizität von Arzneimitteln *in vivo* verwendet und auf unterschiedliche Weise generiert werden^[47]. Dabei bilden die Zellen aufgrund der fehlenden adhäsiven Wachstumsoberfläche vermehrt interzelluläre Kontakte aus.^[23] Für Hochdurchsatzscreenings^{[48]; [49]} wird oftmals die *Floating culture* Methode eingesetzt, wobei sich Sphäroide durch die schwimmende Kultivierung von Zellen in einer *low-attachment* Kultivierungsplatte bilden^{[50][51]; [52]}. In der Krebsforschung werden vorzugsweise mit der Hanging Drop^[53] Methode gleichmäßige Sphäroide in einem kleinen Volumen generiert^{[49]; [54]}. Auf die korrekte Ausbildung und Aufrechterhaltung der Gewebefunktionen haben auch noch Faktoren wie räumlich und zeitlich variierende Gradienten^[55] sowie Grenzflächen^[56] zwischen verschiedenen Strukturen einen wichtigen Einfluss. Der Austausch von Signalen und Interaktionen verschiedener Zellen wird in Ko-Kulturen^[57] durch den Einsatz von porösen Membranen zur Kompartimentierung wie in Transwell-Systemen ermöglicht (Abbildung D)^[58]. Die mechanischen Stimuli, wie die durch den Blutfluss erzeugten Scherkräfte^{[59]; [60]}, können durch den Einsatz von *Organ-on-chip* Systemen in Kombination mit Pumpen simuliert werden (Abbildung E)^{[31]; [61]}. Diese erlauben eine dynamische, mikrofluidische Kultivierung und Vaskularisierung der Zellen und sind in der Lage, Gewebe und Organe sowie deren Krankheitsbilder realitätsnah abzubilden^{[18]; [62]}.

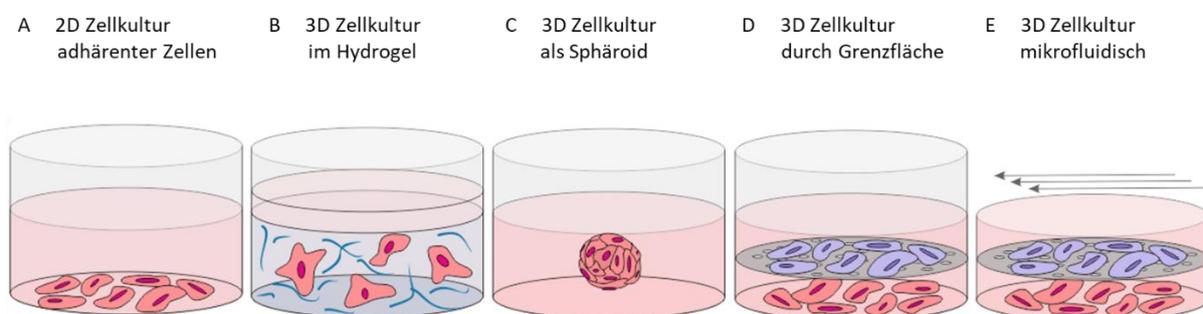


Abbildung 1: Darstellung möglicher Kultivierungsmethoden von Zellen *in vitro* mit unterschiedlicher Komplexität. A) Die 2D Kultivierung von Zellen findet auf einer planaren Oberfläche statt. B) Hydrogele als dreidimensionale Matrix bieten den Zellen ein EZM-Analog. C) Sphäroide stellen eine weitere Form der 3D Zellkultivierung dar. D) Poröse Membranen als Grenzfläche wie in Transwell-Systemen erlauben eine Ko-Kultivierung von Zellen. E) Die Mikrofluidische Kultivierung wie in *Organ-on-chip* Systemen spiegelt zusätzlich mechanische Stimuli wieder. Modifiziert nach Pfister^[63]

2.1.2 Hydrogele als EZM Analogon

Für die 3D Zellkultur ist die richtige 3D Matrix ein sehr wichtiger Faktor, der zum Überleben und zur korrekten Ausbildung der Zellkontakte notwendig ist. In der natürlichen Umgebung wird diese Funktion von der heterogenen und gewebespezifischen Extrazellulären Matrix (EZM) übernommen. Die EZM ist eine in allen Geweben vorhandene azelluläre Komponente, die nicht nur als physikalisches

Gerüst eine entscheidende Rolle spielt, sondern auch die für die Gewebemorphogenese^[64], Adhäsion^[65], Migration^[66], Proliferation^[67], Differenzierung^[37] und Homöostase^[68] des Gewebes erforderlichen biochemischen und biomechanischen Signalwege moduliert^[43]. Die extrazelluläre Matrix ist aus einer komplexen Mischung an Kollagenen, Elastin, Proteoglykanen und nicht-kollagenen Glykoproteinen zusammengesetzt und bildet organspezifisch ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk zwischen den Zellen verschiedener Gewebe^[69]. Die EZM wird aufgrund ihrer Zellinteraktion und Signalerzeugung als dynamische Struktur verstanden, der es möglich ist, das Zellverhalten zu steuern^[70]. Hydrogele sind, aufgrund ihrer Ähnlichkeiten mit der natürlichen extrazellulären Matrix sowie der Möglichkeit ihre physikalischen und biochemischen Parameter zu kontrollieren, ideal für die Einbettung von Zellen^[71]. Als Hydrogele werden vernetzte hydrophile Polymere bezeichnet, die eine wichtige Klasse an Biomaterialien in der Biotechnologie und Medizin darstellen^[72]. Neben den natürlichen EZM Bestandteilen gibt es eine große Anzahl an biobasierten Hydrogelen. Diese können aufgrund ihrer Ähnlichkeiten mit der natürlichen EZM sowie der Kontrolle physikalischer und biochemischer Parameter bei der Einbettung von Zellen als Gerüststruktur oder zur Rekonstruktion perfundierbarer vaskulärer Netzwerke dienen^[73]. Sie zeichnen sich vor allem durch die Fähigkeit aus, große Mengen an Wasser (bis zu 99 % ihrer Masse) aufzunehmen, ohne sich aufzulösen und ähneln damit natürlichen Gerüststrukturen^[74]. Verantwortlich für die Aufnahme des Wassers sind im Hydrogel vorhandene hydrophile Gruppen^[75]. Durch ihre hohe Biokompatibilität verursachen Hydrogele^[76] zudem nur minimale Entzündungsreaktionen im Organismus^{[77][78][79][72]}. Um eine ausreichende Versorgung der Zellen im Hydrogel mit Sauerstoff, Nährstoffen und anderen wasserlöslichen Metaboliten zu gewährleisten, müssen die Porengröße, Porenverteilung und Porenverbindungen berücksichtigt werden^{[72]; [80]}. Der regulierbare Porositätsgrad nimmt einen erheblichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels, welches mit zunehmender Porosität weicher wird^[81]. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich photopolymerisierte Hydrogele für den Einsatz einer Vielzahl an biomedizinischen Anwendungen^{[82]; [83]; [23]; [84]; [40]; [49]; [85]; [86]; [72]} Hydrogele können basierend auf dem Polymerursprung in natürliche^[87], synthetische^[75] und semisynthetische^[88] Hydrogele unterteilt werden^[89]. Zu den aus lebenden Organismen gewonnenen natürlichen Polymeren oder Makromolekülen zählen unter anderem Kollagen, Gelatine, Fibrin, Elastin, Chitosan, Alginat, Hyaluronsäure und dezellularisierte EZM^[87]. Die enthaltenen RGD-Sequenzen (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) spielen dabei eine große Rolle bei der Zelladhäsion^{[90][74]}. Trotz ihrer hohen Biokompatibilität aufgrund der vorhandenen bioaktiven Motive für Zell-Matrix-Wechselwirkungen weisen natürliche Hydrogele eine geringe mechanische Stabilität auf. Zudem ist die Kontrolle der Materialeigenschaften aufgrund von Chargen-Variationen schwierig^{[74]; [91]; [92]}. Synthetische Polymere wie Polyethylenglykol (PEG)^[93] weisen vergleichsweise eine geringere Biokompatibilität auf^[88], sind aufgrund ihrer einstellbaren mechanischen Eigenschaften aber besser reproduzierbar und können

leicht in großem Maßstab synthetisiert werden ^{[75]; [72]}. Semi-synthetische Hydrogele, wie das photovernetzbare Gelatinderivat Gelatine-Methacrylat (GelMA) ^[94], stellen eine Kombination aus natürlichen und synthetischen Komponenten dar. Dabei werden natürliche Polymere chemisch modifiziert und vereinen somit die bioaktiven Eigenschaften natürlicher Materialien und die variablen mechanischen Eigenschaften synthetischer Materialien ^{[95][96]; [90]}. Durch den Einsatz von Photoinitiatoren und unter Verwendung von Licht einer spezifischen Wellenlänge können diese Monomere durch radikalische Polymerisation schnell und kontrolliert in eine vernetzte Hydrogelstruktur umgewandelt werden ^{[72]; [97]}. Photoinitiatoren sind chemische Verbindungen, die in einer Photolysereaktion zerfallen, wobei reaktive Spezies gebildet werden, die die Polymerisation der Hydrogele initiieren ^[98]. Vor Anwendung sollte daher die Biokompatibilität, Wasserlöslichkeit, Stabilität und Zytotoxizität des Photoinitators berücksichtigt werden ^{[99]; [72]}. Neben den klassischen Methacrylaten und den Acrylaten gibt es eine Plethora an verschiedenen Modifikationen, die eine Polymerisation von solchen semisynthetischen Hydrogelen erlauben. Hierbei sind die ultraschnell aushärtenden Gele auf der Basis der Thiol-En-Chemie hier hervorzuheben. Die Thiol-En-Photopolymerisation bietet, wie bei der Vernetzung von Gelatine mit Norbonengruppen und thiolierter Gelatine (GelN/S), ein einfaches Mittel zur Abstimmung biochemischer und mechanischer Eigenschaften ^{[100]; [101]}. Aufgrund der schnellen und orthogonalen Reaktion zwischen den Alken- und Thiol-Funktionalitäten wird diese als Klick-Reaktion angesehen, ^[74] da die Reaktion räumlich und zeitlich steuerbar und ohne schädliche Nebenprodukte abläuft ^[102]. Die durch schrittweises Kettenwachstum entstehenden Thiol-En-Netzwerke sind homogener und haben eine höhere Umwandlung funktioneller Gruppen im Vergleich zu Hydrogelen auf Basis einer Kettenwachstumspolymerisation ^{[74][103]}.

2.1.3 3D Bioprinting

Die zuvor beschriebenen Hydrogele bilden das Grundgerüst für viele additive Verfahren im *Tissue Engineering*. Ein Verfahren, das dabei besonders hervorsticht ist das 3D-Bioprinting. Es stellt eine Unterkategorie der additiven Fertigung dar und wird definiert als das Drucken von spezifischen Geometrien auf ein Substrat unter Verwendung lebensfähiger Zellen, Biomaterialien und biologischer Moleküle als Tinte ^{[104] [105]; [106]}. Bei dem computergesteuerten Prozess werden durch das Drucken von aufeinanderfolgenden Materialschichten anatomisch genaue 3D-Objekte generiert ^{[107] [108]}. Vor allem die Integration des 3D-Drucks im Bereich des *Tissue Engineerings* ebnet den Weg für viele innovative Lösungen aktueller biomedizinischer Herausforderungen ^[109]. Im Gegensatz zu herkömmlichen Fertigungsmethoden setzt der 3D-Druck der Geometriekomplexität eines Objekts praktisch keine Grenzen ^[110] und gewährleistet eine hohe Reproduzierbarkeit sowie präzise Kontrolle über die hergestellten Konstrukte ^[111]. Hydrogele sind eine Schlüsselkomponente des Erfolgs für das sich

heutzutage rasant entwickelnde 3D *Bioprinting*.^[112] Hydrogele dienen hier als Biotinte zur Erstellung der Gewebekonstrukte und können mit oder ohne lebende Zellen verdruckt werden^[109]. Die Biotinte kann dabei während oder unmittelbar nach dem Druckprozess vernetzt werden^{[113]; [111]}. Eine geeignete Biotinte sollte die entsprechenden mechanischen, rheologischen und biologischen Eigenschaften des Zielgewebes besitzen, um die Funktionalität der biogedruckten Gewebe und Organe zu gewährleisten. Die Auswahl der Biotinte hängt neben der Art der Anwendung auch von den verwendeten Zellen sowie dem Bioprinter ab^{[111]; [114]}. Das *Bioprinting* lässt sich technisch gesehen in Inkjet *Bioprinting*, extrusionsbasiertes *Bioprinting* und Lasergestütztes *Bioprinting* unterteilen^[115]. Der Extrusionsdruck ist die am weitesten verbreitete 3D-*Bioprinting* Methode, bei der mittels pneumatischer oder mechanischer Kräfte ein gewisses Volumen an Biotinte durch eine Nadel kontinuierlich extrudiert wird^{[104]; [115]; [105]}. Der wesentliche Vorteil des extrusionsbasierten 3D-*Bioprinting* besteht darin, dass hohe Zelldichten in viskosen Lösungen verdruckt werden können^{[106]; [113]}. Die Auflösung ist mit einer minimalen Strukturgröße von etwa 100 µm zwar im Vergleich zu anderen Drucktechniken geringer^[116], die hohe Strukturintegrität der Filamente erlaubt jedoch ein einfaches Herstellen stabiler Gewebestrukturen^[117]. *Bioprinting*-Techniken wurden schon, neben dem eigentlichen Ziel der Herstellung ganzer Ersatzorgane auch zur Erzeugung mikrovaskulärer Strukturen und mikrofluidischer *Organ-on-chip* Systemen eingesetzt. Sie haben das Potenzial, als Prävaskularisierungsschritt vor der Implantation Endothelzellen innerhalb von 3D-Strukturen präzise zu positionieren^{[113]; [118][115]}.

2.1.4 Organ-on-chip Systeme

Organ-on-chip Systeme sind mikrofluidische Zellkultursysteme welche die physikalisch-chemische Mikroumgebung von Geweben im menschlichen Körper unter kontrollierbaren Bedingungen widerspiegeln^{[61][119]}. Sie rekapitulieren eine multizelluläre Gewebearchitektur durch den Einsatz lebender Zellen. Dabei können wichtige strukturelle, funktionelle, biochemische und mechanische Merkmale lebender Gewebe und Organe in einem einzigen System simuliert werden.^[31] Je nach Fragestellung kann die Komplexität dieser Systeme angepasst werden, indem systematisch Zelltypen und physikalisch-chemische Parameter der Gewebemikroumgebung kontrolliert verändert werden^[61]. Die einfachsten Systeme bestehen aus einem perfundierbaren Mikrokanal der mit Endothelzellen ausgekleidet ist^{[120]–[123][124]}. Dabei ist Polydimethylsiloxan (PDMS) als polymeres, synthetisches Elastomer, das am häufigsten verwendete Trägermaterial bei der Herstellung von Organchips^[61]. Der am Karlsruher Institut für Technologie entwickelte vasQchip ist ein *Organ-on-chip* System mit halbrundem Mikrokanal als zentralem Element zur Nachbildung eines artifiziiellen Blutgefäßes^[125]. Das umgebende Kompartiment dient zur Kultivierung von organotypischen 3D Geweben, wobei eine poröse Polycarbonat (PC)-Membran als Basalmembran des Blutgefäßkanals fungiert. Diese poröse

Grenzfläche erlaubt einen Austausch zwischen den Zellen der unterschiedlichen Kompartimente. ^[125] Die PC-Membran wird mit dem *Track-Etch* Verfahren behandelt, wobei durch Schwerionenbeschuss eine latente Ionenspur erzeugt wird, die anschließend durch Ätzen freigestellt wird. Der Porendurchmesser ist variabel und kann durch die Ätzdauer und -temperatur sowie durch die Konzentration der Ätzlösung kontrolliert beeinflusst werden ^[126]. Die typische Blutkanalstruktur erhält die Membran durch ein sogenanntes Mikrothermoformverfahren, in dem die Mikrokanäle durch Druck und Hitze geformt werden ^[127]. Das Verbinden des Mikrokanals mit Pumpensystemen ermöglicht eine mikrofluidische Kultivierung der Zellen. Dabei führen die entstehenden Scherkräfte des artifiziellen Blutstroms eine charakteristische Ausrichtung der Zellen, ähnlich wie im lebenden Organismus, herbei (**Abbildung 2**) ^{[128]; [129]}. Durch die Mikrofluidik können chemische Gradienten erzeugt werden, oder Zellen unter kontinuierlicher Perfusion kultiviert werden. Dabei beeinflusst die mikrofluidische Kultivierung unter anderem das Zellverhalten und deren Entwicklung, deren Metabolismus sowie die zelluläre Mikroumgebung ^[130].

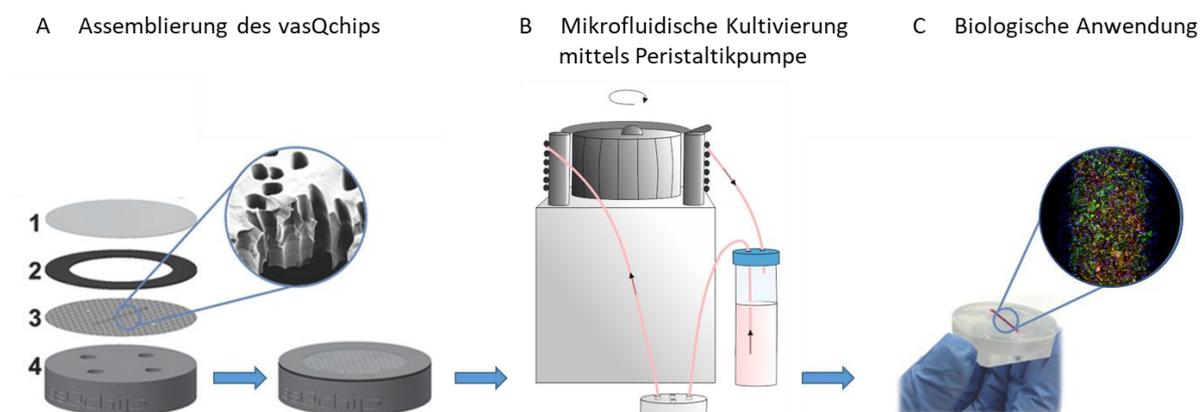


Abbildung 2: Der vasQchips als Beispiel für ein *Organ-on-chip* System mit einem Trägermaterial aus Polymethylmethacrylat (PMMA). A) Die PC-Membran wurde mit Schwerionen beschossen, um eine latente Ionenspur zu erzeugen. Durch Druck und Temperatur wurde die PC-Membran in die gewünschte Form gebracht. Durch nasschemisches Ätzen mit NaOH wurde die latente Ionenspur auf der PC-Membran zu Poren geöffnet. Die Mikrokanäle wurden auf einen PDMS Block aufgebracht und mit einem Deckglas verschlossen. B) Durch das Verbinden des vasQchips mit einem Pumpensystem war eine mikrofluidische Kultivierung der Zellen möglich. C) Das rekonstruierte Gewebe konnte für biologische Anwendungen verwendet werden. Modifiziert nach Kappings ^[125]

Um auf die Gegebenheiten der Mikroumgebungen verschiedener Gewebe eingehen zu können, ist eine schnelle und einfache Anpassung der *Organ-on-chip* Gerüststruktur von Vorteil ^{[131]; [132]; [73]}. Hydrogel-basierte *Organ-on-chip* Systeme wie das in der Arbeitsgruppe Huang (University of Cambridge, UK) entwickelte *Hydrogel-basierte (HB)-flow* System haben den Vorteil, dass sie ohne Trägermaterial hergestellt werden können. Die Fertigung des Mikrokanals kann durch einfache mechanische Methoden oder durch 3D Drucken eines Opfermaterials erfolgen. Aufgrund der Hydrogelstützstruktur ist die Erzeugung komplexerer Geometrien im *Organ-on-chip* System schnell

und unkompliziert, wobei der im Hydrogel befindliche Mikrokanal perfundierbar ist ^[133]. Zudem eröffnet das Hydrogel-basierte Gewebe aufgrund seiner Biokompatibilität die Möglichkeit einer direkten Transplantation in den lebenden Organismus ^{[134]; [87]; [135]}. Das Vorhandensein mehrerer Mikrokanäle in Organ-on-chip Systemen simuliert eine Schnittstelle zwischen verschiedenen Zellen gleicher oder unterschiedlicher Gewebe ^[124]. Insgesamt wird durch *Organ-on-chip* Systeme eine *in vivo* ähnliche physiologische Umgebung bereitgestellt. Dabei können durch eine hochauflösende Echtzeit-Bildgebung und *in vitro* Analyse biochemische, genetische und metabolische Aktivitäten lebender Zellen in einem funktionellen Gewebe- und Organkontext untersucht werden ^{[31]; [125]}. Die *Organ-on-chip* Systeme weisen damit großes Potential bei der Entwicklung menschlicher Gewebemodelle für Krankheitsmodellierungen und Arzneimitteltests auf ^[136]. Heutzutage sind Organmodelle der Lunge ^[137], der Leber ^[138], der Haut ^[139], der Niere ^[140], des Darms ^[141], des Herzens ^[142] und der Blut-Hirn-Schranke ^[143] auf mikrofluidischen *Organ-on-chip* Systemen verfügbar ^{[144]; [61]; [125]}. Auch bei der Nachbildung der Blut-Retina-Schranke wurden Fortschritte, hin zu einer nahezu vollständigen Rekonstruktion, erzielt ^{[124]; [145]; [146]}.

2.2 Die Retina

Gerade die Retina rückt heutzutage auch in den Fokus für *Organ-on-chip* Systeme, da einige Krankheitsbilder zur Degenerierung der Retina führen und damit die Verschlechterung des Sehvermögens einhergeht. Das Auge dient als sensorisches System der Fähigkeit Informationen aus der Umwelt wahrzunehmen ^[147]. Dabei teilen alle Wirbeltiere einen grundlegenden Aufbau der Retina (**Abbildung 3**) ^[148].

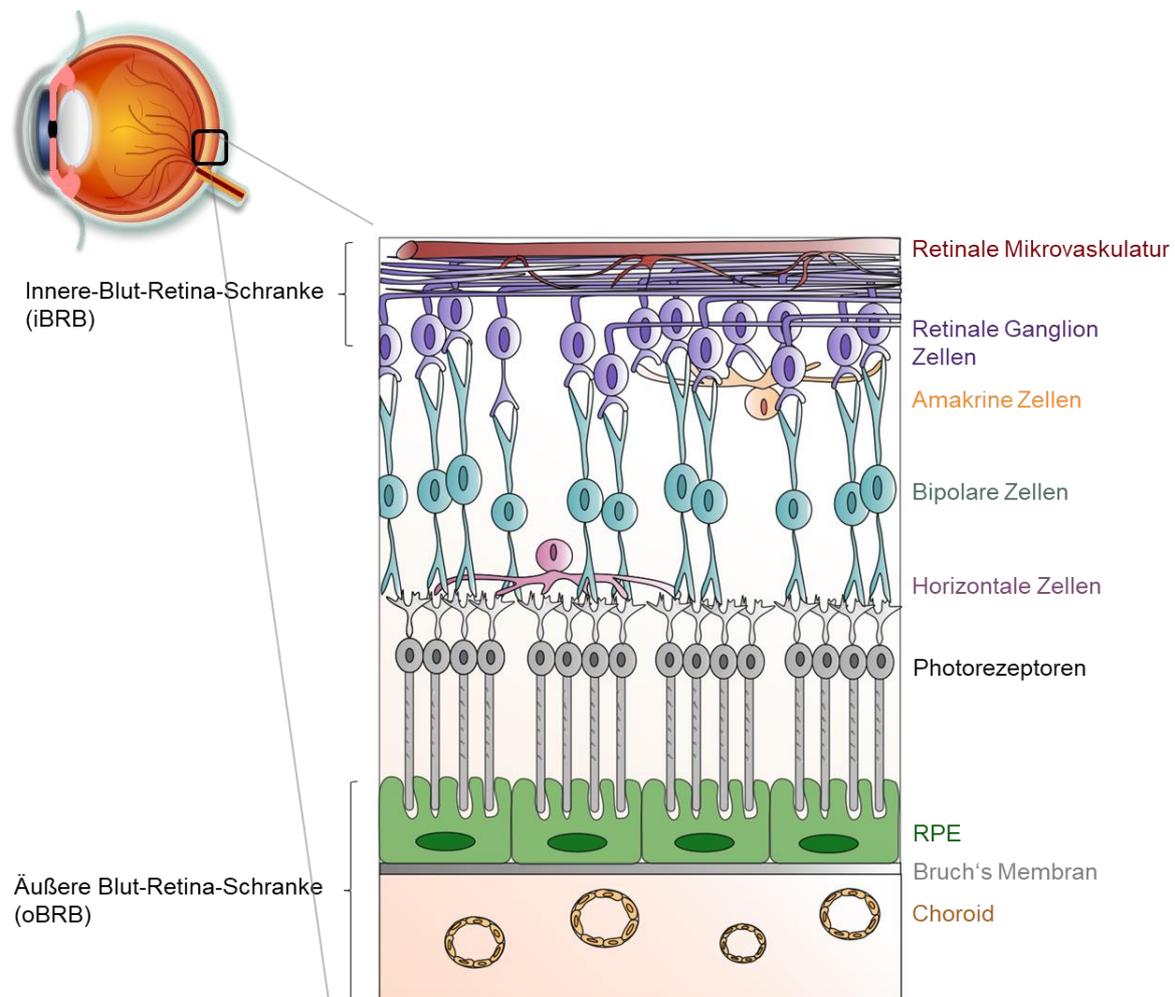


Abbildung 3: Rekapitulation der retinalen Zellschichten. Vom inneren Teil der Retina (unten) zum äußeren Teil (oben): das Choroid, die Bruch's Membran, das retinale Pigment Epithel, die Photorezeptoren, die horizontalen Zellen, die Bipolaren Zellen, die Amakrine Zellen, die retinale Ganglienzellschicht, sowie die retinalen Endothelzellen der Mikrovaskulatur. Die iBRB wird durch die retinale Mikrovaskulatur erzeugt, die oBRB durch das RPE. Modifiziert nach Ragelle und Yeste ^{[146]; [56]}

Dabei sind die empfindlichen retinalen neuronalen Zellen durch die innere Blut-Retina-Schranke (iBRB) vom zirkulierenden Blut getrennt ^[149]. Die iBRB wird durch komplexe *Tight Junctions* ^[150] zwischen den retinalen kapillaren Endothelzellen erzeugt und hält eine stabile ionische Umgebung aufrecht, indem sie den unspezifischen Transport zwischen der neuralen Retina und dem zirkulierenden Blut einschränkt ^[149]. Die humane Retina besteht aus fünf Klassen von Neuronen, die vertikal und horizontal in Verbindung stehen ^{[151]; [147]}. Im horizontalen Weg stehen, zur Bereitstellung von *Feedback*- und *Feed forward*-Signalen, Horizontale Zellen mit den Photorezeptoren in Verbindung, während die Amakrine Zellen eine Verbindung zu Bipolaren- und Ganglion Zellen schaffen. ^[147] Für das Codieren visueller Informationen sind Photorezeptoren verantwortlich, indem sie Lichtenergie in Membranpotentialänderungen umwandeln ^{[152]; [148]} und die Signale über Axone der retinalen Ganglienzellen an das Gehirn weiterleiten ^{[153]; [147]; [63]}. Die Photorezeptoren stehen zudem in direktem Kontakt mit dem retinalen Pigmentepithel (RPE) ^[154]. Das RPE ist eine Schicht aus postmitotischen

Zellen und fungiert als vegetativer Regulator der Photorezeptorschicht sowie als selektive Barriere zwischen der neuronalen Retina und dem Choroid. ^[155] Zwischen dem RPE und dem fenestrierten Choroid befindet sich die Bruch-Membran, ^{[156]; [157]} die als elastin- und kollagenreiche extrazelluläre Matrix den wechselseitigen Austausch von Biomolekülen, Nährstoffen, Sauerstoff, Flüssigkeiten und Stoffwechselabfallprodukten reguliert ^{[158]; [159]}. Das RPE stellt zusammen mit dem Choroid und der Bruch-Membran die äußere Blut-Retina-Schranke dar ^[160]. Insgesamt ist die Retina ein hoch metabolisch anspruchsvolles System mit dem höchsten Sauerstoffverbrauch pro Gewichtseinheit unter den Geweben ^{[161]; [146]}. Während der Bereich der inneren Retina eine niedrige Stoffwechselrate aufweist und durch die Zirkulation der retinalen Mikrovaskulatur versorgt wird, zeichnet sich die äußere Retina durch einen hohen Sauerstoffverbrauch der Photorezeptoren aus. Dabei wird deren Versorgung durch das Choroid gewährleistet ^{[146] [157]; [156]}.

2.2.1 Das Choroid

Bei der Geburt des Menschen beträgt die Dicke des Choroids etwa 200 µm und nimmt während des Lebens auf etwa 80 µm ab, ^{[162]; [124]} womit es in etwa der Choroiddicke von nichtmenschlichen Primaten entspricht ^[157]. Definiert wird das Choroid als endotheliale Gefäßstruktur, welche die äußere Retina über das Blut versorgt ^[157]. Dabei kleidet ein Endothel die Innenseite der Blutgefäßwände aus und reguliert hauptsächlich den Transport gelöster Stoffe und Makromoleküle über die Blutgefäßwand in und aus dem Blut ^{[163]; [164]}. Zell-Zell-Verbindungen des Endothels, wie die *Tight-* ^[165] oder *Adherens Junctions* ^[166] spielen eine Schlüsselrolle bei der Gewebeintegrität, der Barrierefunktion und der Zell-Zell-Kommunikation ^{[167][163]}. Die Choriokapillaris stellt ein stark verzweigtes Netzwerk aus Kapillaren dar, das an der Bruch-Membran anliegt ^[162]. Die Choriokapillaren weisen beim Menschen mit 20-40 µm einen relativ großen Durchmesser auf und besitzen aufgrund des hohen trans-endothelialen Transports ein fenestriertes Endothel ^[157]. Im fenestrierten Endothel ist eine kontinuierliche Basalmembran vorhanden, sowie 50-60 nm große transzelluläre Poren welche von der Glykokalyx, die membrangebundene negativ geladene Proteoglykane, Glykoproteine, Glykolipide und Glykosaminoglykane umfasst, überzogen sind (**Abbildung 4**) ^{[168]–[170]}. Für ein starkes und funktionelles Gefäßendothel ist die luminale Oberfläche aller vaskulären Endothelzellen von der endothelialen Glykokalyx bedeckt ^[171]. Aufgrund der negativ geladenen Zuckermoleküle der Glykokalyx werden Plasmaproteine des Blutes mit ebenfalls negativer Ladung am Durchdringen der Poren gehindert, während Wasser, Peptide, organische Verbindungen und Ionen passieren können ^[170].

A Kontinuierliches Endothel

B Fenestriertes Endothel

C Diskontinuierliches Endothel

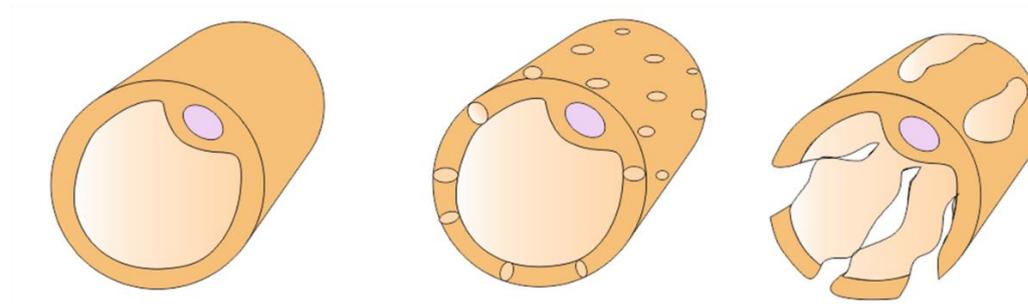


Abbildung 4: Endothelarten. Kapillare in verschiedenen Geweben unterscheiden sich in ihrer Permeabilität. A) Kontinuierliches Endothel ist in den meisten Arterien, Venen und Kapillaren zu finden, wobei die Endothelzellen durch *Tight Junctions* verbunden und an einer kontinuierlichen Basalmembran verankert werden. B) Das fenestrierte Endothel ist mit einer kontinuierlichen Basalmembran assoziiert und zeichnet sich durch das Vorhandensein von transzellulären 50-60 nm breiten Poren aus, die lediglich von der Glykokalyx überzogen sind. C) Ein diskontinuierliches Endothel ist aufgrund des hohen parazellulären Transports mit einer weniger strukturierten Basalmembran und mit Poren bis zu 200 μm assoziiert ^{[170]; [169]}. Modifiziert nach Hoffman ^[80]

Eine Beeinträchtigung des Sauerstoffflusses vom Choroid zur Retina kann degenerative Veränderungen des RPEs und eine Neovaskularisierung des Choroids verursachen ^[157].

2.2.1.1 Vaskulogenese und Angiogenese

Als grundlegender Prozess wird die Bildung der Blutgefäße im Organismus über die Vaskulogenese und Angiogenese reguliert ^{[172]–[174]}. Die Vaskulogenese beginnt mit der Differenzierung mesodermaler Angioblasten zu Endothelzellen und der damit einhergehenden Ausbildung eines primitiven Gefäßnetzwerks ^[175]. Unter der Angiogenese wird eine Remodellierung des existierenden Gefäßnetzwerks verstanden, bei der neue Kapillaren aus den bereits bestehenden Blutgefäßen gebildet werden ^{[172]; [174]}. Während bei der Embryogenese Blutgefäße sowohl durch Vaskulogenese als auch durch Angiogenese gebildet werden, erfolgt im erwachsenen Organismus die Bildung neuer Blutgefäße hauptsächlich durch Angiogenese und nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen, wie der Reproduktion oder Wundheilung ^[174]. Einer der spezifischsten Regulatoren der Angiogenese stellt der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) dar ^[176], welcher die Proliferation und Permeabilität der Endothelzellen reguliert. ^[177] Als Reaktion auf solche proangiogenen Stimuli aus der Matrix werden die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Endothelzellen durch Proteasen abgebaut und die Basalmembran degradiert ^[175]. Durch Proliferation und Sprossung bilden die Endothelzellen tubuläre Strukturen in Richtung des angiogenen Signals aus, wobei die neuen Blutgefäße nach der Vaskularisierung wieder stabilisiert werden. Eine Dysregulation der Angiogenese wird auch mit der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, vor allem in der Retina in Verbindung gebracht ^{[174]; [178]; [179]}.

2.2.2 Retinales Pigmentepithel (RPE)

In Anbetracht der durch Angiogenese hervorgerufenen retinalen Erkrankungen, ist die Bedeutung der regulierten Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren und angiogenen Reaktionen der Choriokapillaris durch die Integrität des retinalen Pigmentepithels (RPE) groß ^[180]. Das RPE reguliert die Umgebung der äußeren Retina, indem es eine dichte Barriere zwischen dem Blut und der neuronalen Retina bildet ^{[181]; [182]}. Dabei sind die hexagonalen Zellen der polarisierten RPE- Zellschicht durch *Tight Junctions* verbunden ^[183]. Wie die neuronale Retina, ist das RPE ein Derivat des optischen Neuroepithels, das im vorderen Neuroektoderm spezifiziert wird ^{[184]; [185]}. Während der embryonalen Augenentwicklung invaginiert das Augenfeld und komplexe Gewebewechselwirkungen leiten unter Regulation des Rx Transkriptionsfaktors ^[186] die Spezifikation und Differenzierung von Retina, RPE, Sehnerv und der Linse ein ^[187]. Dabei ist die basolaterale Membran des RPEs durch die Bruch-Membran von dem fenestrierten Choroid getrennt ^[188]. Die apikale Seite der RPE-Zellen weist lange Mikrovilli auf, in deren Zwischenräumen sich die äußeren Segmente der Photorezeptoren befinden ^[189].

2.2.2.1 Funktionen des RPEs

Das RPE ist mit einer Vielzahl an Funktionen verbunden, um die Sehfunktion aufrechtzuerhalten ^[190] ^[188] (**Abbildung 5**). Die Lichtenergie wird von der Linse auf der Retina gebündelt und von der pigmentierten Zellschicht des RPEs absorbiert ^[188]. Das RPE enthält eine komplexe Zusammensetzung verschiedener Pigmente für unterschiedliche Wellenlängen. Melanosome sind zytoplasmatische Granula, die sich auf der apikalen Seite des RPEs konzentrieren und das namensgebende Pigment Melanin beinhalten ^{[191]; [188]}. Besonders Licht mit einer Wellenlänge im blauen Bereich kann zu Schäden in den RPE-Zellen führen, da es die Photooxidation von Lipofuszin-Bestandteilen zu zelltoxischen Substanzen ermöglicht. Vor allem im höheren Alter erreicht das Pigment Lipofuszin aufgrund seiner lebenslangen Akkumulation eine toxische Konzentration ^{[192]; [188]}.

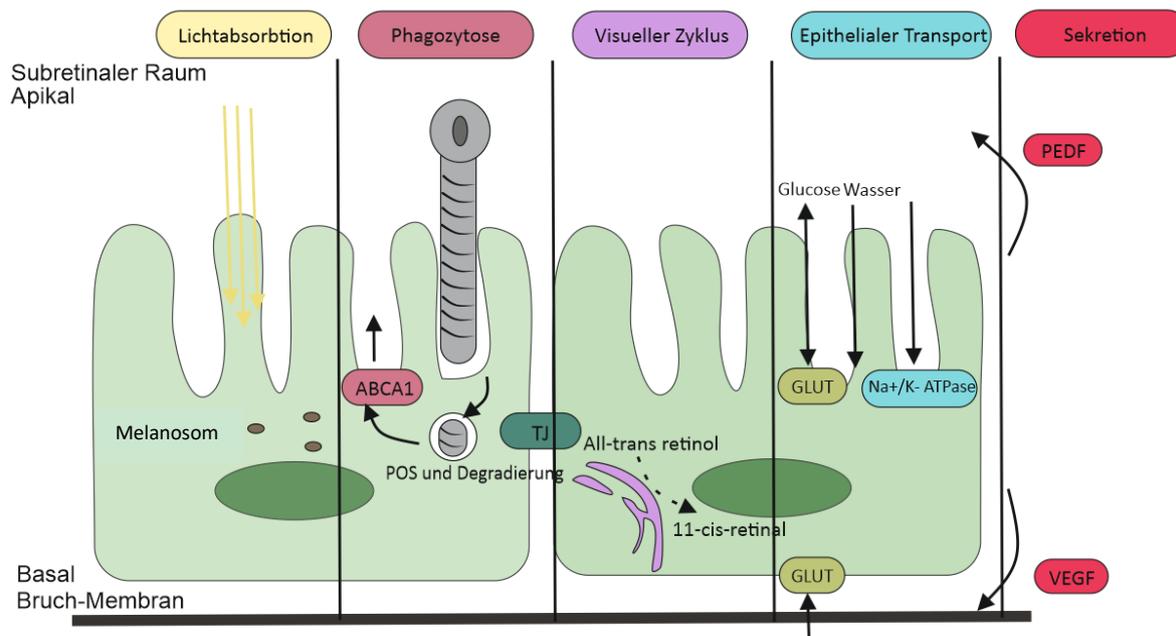


Abbildung 5: Funktionen des retinalen Pigmentepithels. Das RPE ist für die Sehfunktion unerlässlich, da es verantwortlich ist für die Lichtabsorption, die Phagozytose äußerer Photorezeptorsegmente, die Aufrechterhaltung des visuellen Zyklus, die Regulation des epithelialen Transports zwischen Choroid und Retina sowie der Sekretion wichtiger Faktoren zur Aufrechterhaltung der umgebenden Zellschichten. Die *Tight Junctions* verbinden die RPE-Zellen und generieren damit eine selektive Barriere (oBRB). Modifiziert nach Strauß. ^[188].

Eine Akkumulation lichtgeschädigter Proteine und Lipide ist aufgrund deren Aussetzung intensiven Lichts in den Photorezeptoren zu finden. Im Laufe eines Tages nimmt die Konzentration der vom Licht induzierten toxischen Substanzen zu, da Retinal, der lichtempfindliche Teil des Rhodopsin Moleküls, selbst photooxidative Radikale erzeugt ^{[188]; [193]}. Aufgrund ihrer hohen Konzentration an Radikalen, lichtgeschädigten Proteinen und Lipiden, unterliegen die äußeren Segmente der Photorezeptoren (*photoreceptor outer segments*; POS) einem ständigen Erneuerungsprozess. Um die Funktionsfähigkeit der Photorezeptor-vermittelten Lichttransduktion zu gewährleisten werden POS abgegeben und durch die Vermittlung der Merck- und V5-Integrin-Rezeptoren vom RPE internalisiert ^{[188]; [190]; [182]; [194]}. Die phagozytierten POS werden vom RPE verdaut und wichtige Moleküle wie Retinal oder Docosahexaensäure an die Photorezeptoren zurückgeliefert ^{[190]; [188]; [195]}. Um eine konstante Länge des Photorezeptoren beizubehalten, werden die POS anschließend nachgebildet ^[188]. Auch während des visuellen Zyklus wird Retinal von den Photorezeptoren zum RPE transportiert, wo eine Re-Isomerisierung zu 11-cis-Retinal stattfindet und ein anschließender Rücktransport zu den Photorezeptoren folgt. Nach Umwandlung von Lichtenergie in elektrische Impulse ist es den Photorezeptoren aufgrund der fehlenden cis-trans-Isomerase-Funktion nicht möglich selbst all-trans-Retinal in 11-cis-Retinal zu regenerieren ^{[196]; [188]; [190]}. Ionen und Wasser werden ebenfalls vom RPE aus dem subretinalen Raum oder der apikalen Seite zur Blut- oder basolateralen Seite transportiert ^[182]. Die RPE-Zellen bilden dabei eine dichte, selektive Barriere zwischen dem subretinalen Raum und der

Choriokapillaris ^{[197]; [198]; [188]; [199]}, weshalb der parazelluläre Widerstand deutlich höher als der transzelluläre Widerstand ist. Während der Transport von Wasser hauptsächlich durch Cl^- und K^+ Ionen angetrieben wird, liefert die apikal lokalisierte Na-K-ATPase die Energie für den transepithelialen Transport ^{[188]; [200]}. Zudem enthält das RPE sowohl apikal als auch basolateral große Mengen an Glukose Transportern (GLUT), um die Photorezeptoren mit Glucose zu versorgen ^{[188]; [201]}. Um die Aufrechterhaltung der Retina auch über längere Distanzen hinweg zu gewährleisten, sekretiert das RPE eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren. Auf der apikalen Seite des RPEs wird vor allem der *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF) sekretiert, das als neuroprotektiver Faktor die Neuronen vor Glutamat- oder Hypoxie-induzierter Apoptose schützt ^{[188]; [190]; [202]}. Als antiangiogenetischer Faktor hemmt PEDF zudem die Endothelzellproliferation und stabilisiert damit das Endothel der Choriokapillaris ^[203]. Die Sekretion von VEGF auf der basolateralen Seite des RPEs wirkt als Permeabilitätsfaktor ebenfalls stabilisierend auf das fenestrierte Endothel des Choroids ^{[204]; [176]; [188]; [190]}.

2.2.2.2 Barrierefunktion des RPEs als äußere Blut-Retina-Schranke

Das RPE stellt zudem als äußere Blut-Retina-Schranke eine geeignete retinale Mikroumgebung zur Aufrechterhaltung der Sehfunktion bereit ^[146]. Das RPE kontrolliert dabei den Transport von Ionen, Wasser und metabolischen Endprodukten aus dem subretinalen Raum ins Blut und versorgt umgekehrt die Photorezeptoren mit Nährstoffen aus dem Blut ^{[205][188]; [200]}. Die Barriere wird durch die *Tight Junctions* des RPEs gebildet, welche benachbarte Zellen miteinander verbinden und so die Zellpolarität durch die Trennung des apikalen und basolateralen Bereichs aufrechterhalten ^{[165]; [206]; [198]; [183]}. In der oBRB sind die *Tight Junctions* an der apikalen Oberfläche der RPE-Zellen konzentriert ^{[198]; [207]} und bestehen überwiegend aus Proteinen der Claudin-Familie, Transmembranproteinen der MARVEL-Familie und *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) ^[197]. Die Transmembranproteine werden von dem zytoplasmatischen Gerüstprotein *Zonula Occludens* gebunden und am Zytoskelett verankert (**Abbildung 6**) ^{[207]; [208]}.

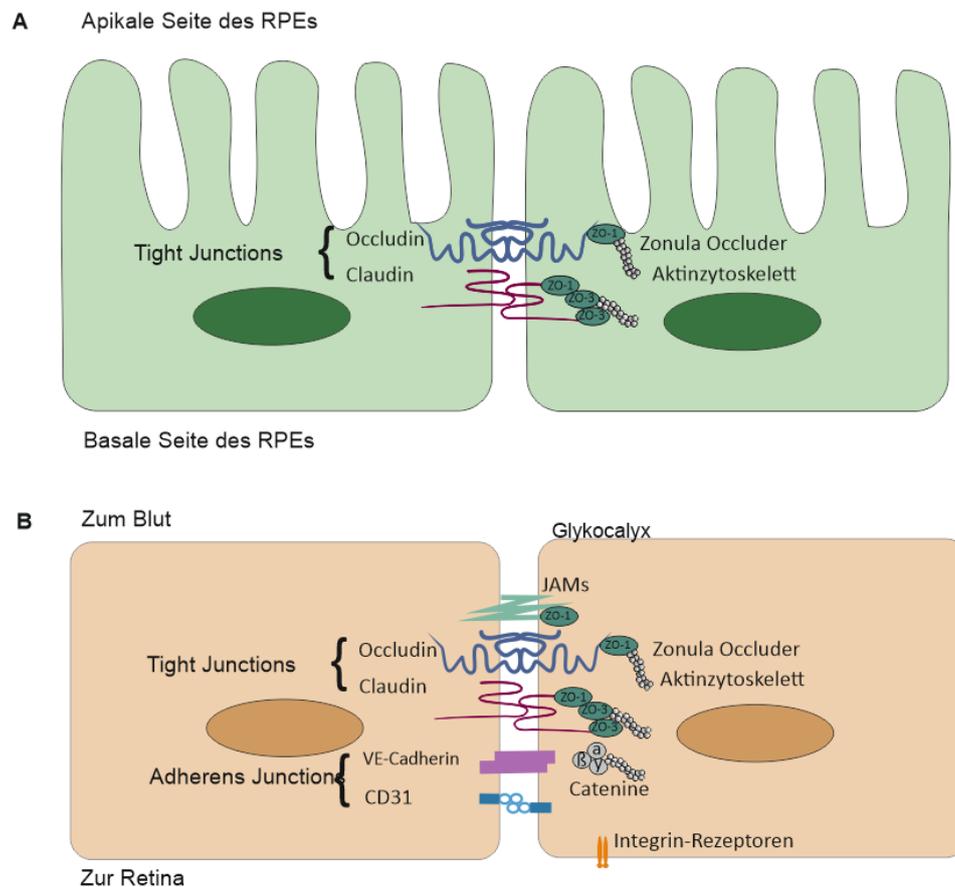


Abbildung 6 Zell-Zellverbindungen des RPEs und der retinalen Endothelzellen. A) In der oBRB sind die *Tight Junctions* an der apikalen Oberfläche der RPE-Zellen konzentriert und bestehen überwiegend aus Proteinen der Claudin-Familie, Transmembranproteinen der MARVEL-Familie und *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs). Die Transmembranproteine werden von dem zytosomatischen Gerüstprotein Zonula Occludens gebunden und am Zytoskelett verankert. B) Während im RPE die *Tight Junctions* an der apikalen Seite konzentriert sind, sind sie bei den Endothelzellen zwischen dem apikalen (zum Blut) und basolateralen Bereich verteilt angeordnet. Endothelzellen exprimieren sowohl *Adhärenz-* als auch *Tight Junctions*, die von verschiedenen Komponenten gebildet werden. Modifiziert nach O’Leary und Campbell [207].

Während sich die *Tight Junctions* im RPE an der apikalen Seite konzentrieren, sind sie bei den Endothelzellen zwischen dem apikalen (zum Blut) und basolateralen (zur Retina) Bereich verteilt angeordnet [209]. Endothelzellen exprimieren sowohl *Adhärenz-* als auch *Tight Junctions*, die von verschiedenen Komponenten gebildet werden. Bei *Adhärenzverbindungen* wird die Endothelzelladhäsion durch vaskuläres Endothel-Cadherin (VE-Cadherin) vermittelt, das mit intrazellulären Proteinen wie β -Catenin verbunden ist [167]; [210]–[212]; [209]. Bei den *Tight Junctions* ist die Adhäsion auf Mitglieder der Claudin-Familie zurückzuführen, die mit verschiedenen intrazellulären Proteinen wie Zona occludens-1 (ZO-1) assoziiert sind [213]; [166]; [209]. Andere an der Bildung von *Tight Junctions* beteiligte Adhäsionsproteine sind das integrale Membranprotein Occludin und die Mitglieder des *Junctional Adhesion Molekül* der JAM Familie [214]; [209]. Das *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule* (PECAM oder CD31) ist ein *Tight Junction* assoziiertes Transmembran-Glykoprotein und stellt eine endotheliale Verbindungskomponente dar [209]; [215]. Veränderungen des *Tight Junction-Komplexes* der oBRB

resultiert in einer Dysfunktion und führt zu mit Sehverlust einhergehenden retinalen Erkrankungen [146].

2.3 Retinale Erkrankungen

Diese Veränderungen der Barriereintegrität führen zu Funktionsbeeinträchtigungen des RPEs und sind mit der Pathogenese von degenerativen retinalen Erkrankungen wie Retinitis pigmentosa [216], der Stargardt-Krankheit [217] und der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) [218] assoziiert [146]. Eine ideale Möglichkeit zur Erforschung retinaler Krankheitsbilder stellen deshalb isolierte und differenzierte RPE-Zellen dar [219]. Forschern ist es bereits gelungen humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) und embryonale Stammzellen (ESC) außerhalb des Körpers in RPE zu differenzieren [220]–[222]. Auch RPE aus iPSC und ESC der Maus konnte bereits erfolgreich differenziert werden [42]. Zudem ermöglicht die Rekonstruktion der mit dem RPE assoziierten AMD Pathogenese auf *Organ-on-chip* Systemen die Validierung entsprechender Wirkstoffe zur Behandlung [145]; [223].

2.3.1 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist als komplexe Augenerkrankung weltweit die Hauptursache für den Sehverlust älterer Menschen [224]. Klinisch gesehen kann die AMD in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden und betrifft zunächst den als Makula bekannten zentralen Bereich der Retina [225]. Das späte Stadium der AMD wird dann nochmals in die atrophische Form (trockene AMD) und die neovaskuläre Form (feuchte AMD) unterteilt [226]; [218]; [227]. Die trockene AMD ist eine chronische Erkrankung, die zu Sehbehinderungen führt und manchmal zu einer schweren Erblindung fortschreitet. Im Gegensatz dazu betrifft die feuchte AMD nur 10–15 % der AMD-Patienten, ist aber mit einem schweren Sehverlust verbunden [228] [218]; [226]. AMD-Patienten entwickeln typischerweise zunächst die trockene Form bevor die feuchte AMD auftritt, da sich in den frühen Stadien der asymptomatischen AMD unlösliche extrazelluläre Aggregate, die sogenannten Drusen, in der Retina ansammeln [227]; [229]; [230]. Das späte Stadium der trockenen AMD ist gekennzeichnet durch die Degenerationsbereiche des RPEs und den darüberliegenden lichtempfindlichen retinalen Photorezeptoren. Die feuchte Form der AMD ist im Spätstadium durch choroidale Neovaskularisierung (CNV) gekennzeichnet, bei der durch Angiogenese neue Blutgefäße vom Choroid Richtung äußerer Retina wachsen (**Abbildung 7**). [218]; [231].

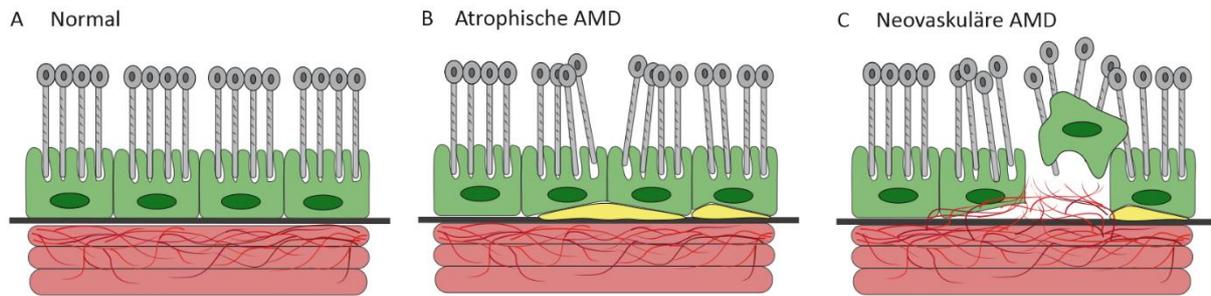


Abbildung 7: Formen der altersbedingten Makuladegeneration. A) Die oBRB besteht aus dem RPE, das in direktem Kontakt zu den Photorezeptoren steht, der darunterliegenden Bruch-Membran und dem fenestrierten Choroid. B) Die trockene AMD (atrophisch), ist gekennzeichnet durch Degenerationsbereiche des RPEs und den darüber liegenden lichtempfindlichen retinalen Photorezeptoren aufgrund der Drusenbildung und Anlagerung toxischer Substanzen. C) Die feuchte Form der AMD (vaskulär) ist im Spätstadium durch choroidale Neovaskularisierung gekennzeichnet, bei der durch Angiogenese neue Blutgefäße vom Choroid Richtung äußerer Retina wachsen. Modifiziert nach Fleckenstein ^[232].

Mehrere genetische Faktoren, Fettstoffwechsel, oxidativer Stress und Alterung liegen der AMD Erkrankung als Ursache zugrunde ^{[226]; [233]}. Vor allem die Seneszenz von RPE-Zellen führt dazu, dass die antioxidative Kapazität des RPEs abnimmt. Die oxidative Schädigung des RPEs wird hauptsächlich durch das Ungleichgewicht zwischen der Produktion und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verursacht ^{[193]; [234]; [235]}. Die Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies stellt Lipofuszin dar, wobei sich der oxidative Stress in der Retina mit zunehmendem Alter durch deren Ansammlung im RPE erhöht ^[192]. Die damit einhergehende Verdickung der Bruch-Membran reduziert die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen vom Choroid über das RPE zu den Photorezeptoren und löst einen Zustand relativer Hypoxie innerhalb der subretinalen Kompartimente aus ^[236]. Als Hypoxie wird der Abfall der Sauerstoffkonzentration unter die in den meisten Geweben herrschenden 3 bis 5 % bezeichnet ^[236]. Um die Hypoxie-induzierten Ereignisse zu minimieren, reagiert das RPE mit der übermäßigen Sezernierung pro-angiogener Faktoren wie VEGF ^[237]. VEGF ist eines der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der feuchten AMD, da es die Neovaskularisierung initiiert ^[238]. Bei der feuchten AMD dient das Blockieren von VEGF-A Rezeptoren deshalb als wirksames Mittel zur Stabilisierung des Sehvermögens ^[224]. Im Gegensatz zur feuchten AMD bleibt der klinische Erfolg bei der Behandlung der trockenen AMD jedoch schwer fassbar, weshalb der Bedarf an der Entwicklung von Therapien zur Behandlung der AMD hoch ist ^{[226]; [224]; [239]}. Solche Erkrankungen bedingen eine möglichst genaue Rekonstruktion der retinalen Barrieren und der gesamten Retina, um die entsprechenden Krankheitsmodelle zur Untersuchung neuer Therapiemöglichkeiten zu generieren.

3. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *in vitro* Modells der äußeren Blut-Retina-Schranke (oBRB) durch die Kombination neuer Stammzelltechnologien und Hydrogele. Eine schematische Darstellung der oBRB ist in **Abbildung 8** zu sehen. Durch den Einsatz von *Organ-on-chip* Systemen sowie verschiedenen Methoden aus dem *Tissue Engineering* sollte ein, auf retinaspezifischen Zellen basierendes, vaskularisiertes *in vitro* Modellsystem entwickelt werden. Die mikrofluidische Kultivierung dieses Systems sollte eine Möglichkeit bieten, die *in vivo* Situation der äußeren Blut-Retina-Schranke möglichst präzise widerzuspiegeln. Neben der Etablierung des Endothels aus retinalen Endothelzellen sollten murine embryonale Stammzellen für die Differenzierung von funktionellem Retinalem Pigmentepithel (RPE) eingesetzt werden. Zudem sollte eine geeignete Extrazelluläre Matrix (EZM) in Form von Hydrogelen zur Erzeugung dreidimensionaler retinaler Gewebe etabliert und analysiert werden. Zukünftig soll das etablierte oBRB Modellsystem nicht nur in der personalisierten Medizin Anwendung finden, sondern auch der Rekapitulation von retinalen Krankheitsbildern wie der altersbedingten Makuladegeneration dienen. Dabei hat das oBRB Modellsystem mit seinen Krankheitsbildern das Potential, Wirkstoffe zu validieren und deren Anwendung als Pharmazeutika zu testen.

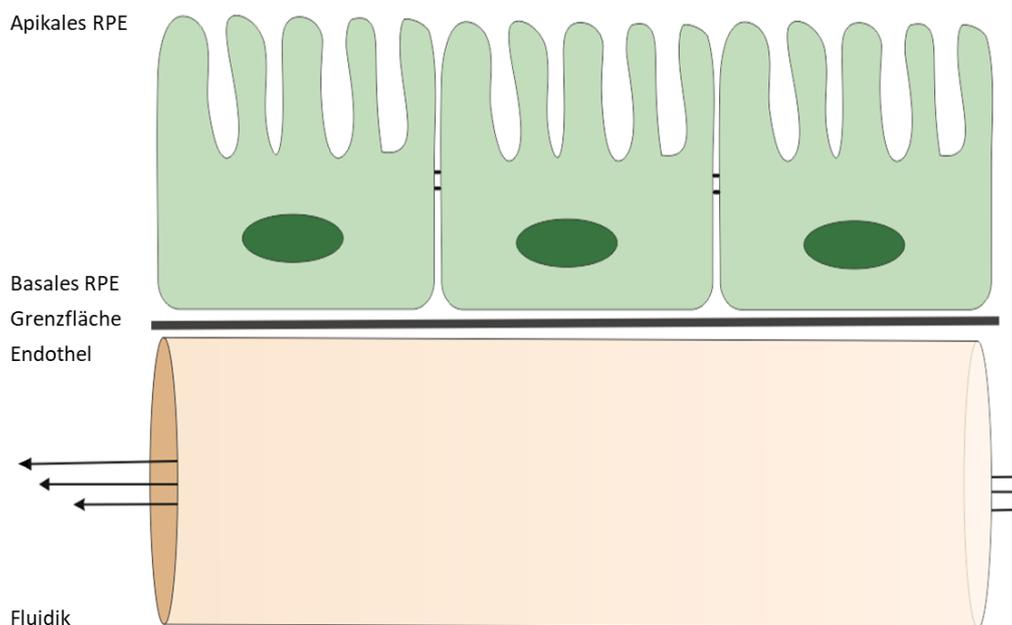


Abbildung 8: Schematische Darstellung der oBRB in einem Organ-on-chip Modellsystem. Im Mikrokanal befinden sich retinale Endothelzellen und im umgebenden Kompartiment retinales Pigmentepithel, welches durch Differenzierung von embryonalen Stammzellen gewonnen wird. Zudem besteht die Möglichkeit, Hydrogele als Extrazelluläresmatrix-Analog im umgebenden Kompartiment einzufügen und das Modellsystem fluidisch zu kultivieren.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kultivierung und Charakterisierung muriner embryonaler Stammzellen (mESC)

Um das beschriebene Ziel der Entwicklung eines *in vitro* Modells der äußeren Blut-Retina-Schranke (oBRB) zu erreichen, spielt insbesondere die Gewinnung der einzelnen somatischen Zelltypen mit Hilfe neuartiger Stammzelltechnologien eine Rolle. Dabei sollten embryonale Stammzellen zur Rekonstruktion des RPEs in der oBRB eingesetzt und differenziert werden. Da die Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen ethisch bedenklich ist wurden hierfür embryonale Stammzellen aus der Maus verwendet. Embryonale Stammzellen (ESC) sind pluripotente Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste stammen und somit Zellen des frühen Embryos sind ^[240]. Im Jahr 1981 konnten erstmals ESC aus einer Maus-Blastozyste gewonnen und erfolgreich *in vitro* kultiviert werden ^[241]. Charakteristisch für ESC ist vor allem ihre Pluripotenz und die Fähigkeit, sich unbegrenzt selbst zu erneuern ^[242].

4.1.1 Bestimmung der Pluripotenz bei mESC-Rx-GFP

Unter Pluripotenz wird die Fähigkeit von Zellen verstanden, sich als Reaktion auf Signale aus dem Embryo oder der Zellkulturumgebung in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) zu differenzieren ^{[240]; [243]}. Neben dieser Fähigkeit können Stammzellen *in vitro* in einem undifferenzierten Zustand kultiviert werden. Dies macht die embryonalen Stammzellen (ESC) heutzutage als Forschungswerkzeug für den Einsatz in der regenerativen und personalisierten Medizin interessant ^{[244] [240]}. Zur Identifikation der Stammzellen *in vitro* dienen Molekülmarker, die aus einzigartigen Genexpressionsmustern bestehen ^{[240]; [245]}. Das Homöoboxprotein Nanog ist ein Transkriptionsfaktor, der erstmals in murinen ESC entdeckt wurde. Nanog ist ausschließlich in pluripotenten Zellen zu finden und steuert dabei die Selbsterneuerung dieser undifferenzierten Zellen ^{[246] [247]}. Auch das Homöodomänenprotein *Octamer binding transcription factor* Oct4 (auch Oct3/4 genannt) wurde als essentieller Bestandteil für den Erhalt der Stammzell-Eigenschaften muriner embryonaler Stammzellen identifiziert ^[248] und wird während der Differenzierung herunterreguliert ^[249]. Somit sind unter anderem Nanog und Oct4 gemeinsam dafür verantwortlich, den undifferenzierten Zustand der ESC aufrecht zu erhalten ^[250]. In dieser Arbeit wurden, wie bereits erwähnt murine embryonale Stammzellen (mESC-Rx-GFP) verwendet und charakterisiert. Die mESC-Rx-GFP stellen eine Unterlinie der embryonalen Stammzelllinie EB5 (129/Ola) aus der Maus dar und beinhalten ein GFP Knock-In unter dem Rx-Promotor sowie eine Resistenzkassette unter der Kontrolle des Oct4-Promotors. Dabei sind die mESC, sofern sie sich in einem pluripotenten Zustand befinden und Oct4 exprimieren, gegen die Selektion mit Blasticidin S ^[251] als Proteinsyntheseinhibitor resistent.

4.1.1.1 Pluripotenzanalyse durch Immunfluoreszenznachweis

Um die Pluripotenz der mESC-Rx-GFP zu überprüfen, wurde eine 24-Well Kultivierungsplatte für 30 min unter Standardbedingungen mit 0,1 % Gelatine beschichtet. Als Standardbedingungen werden in der gesamten Arbeit, sofern nicht anders beschrieben, die Kultivierung adhärenter Zellen in zellspezifischem Kultivierungsmedium im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C, einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit definiert. $3 \cdot 10^4$ mESC-Rx-GFP wurden in Maintenance Medium (MM) auf der beschichteten Oberfläche ausgebracht und für 2 Tage kultiviert. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA; 4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert, unspezifische Bindungsstellen blockiert und mittels Immunfluoreszenz analysiert (**Abbildung 9**). Die Immunfluoreszenz ist eine wichtige immunochemische Technik, die den Nachweis und die Lokalisierung von Antigenen in verschiedenen Zellpräparaten durch den Einsatz mono- und polyklonaler Antikörper ermöglicht ^[252]. Die beiden Pluripotenzfaktoren Nanog (Abbildung A1; B1) und Oct4 (Abbildung A2; B2) wurden durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe der Konfokalmikroskopie nachgewiesen. Die Zellkerne der mESC-Rx-GFP wurden zusätzlich mit Hoechst33342 visualisiert (Abbildung A3; B3) und die Aufnahmen überlagert (Abbildung A4; B4).

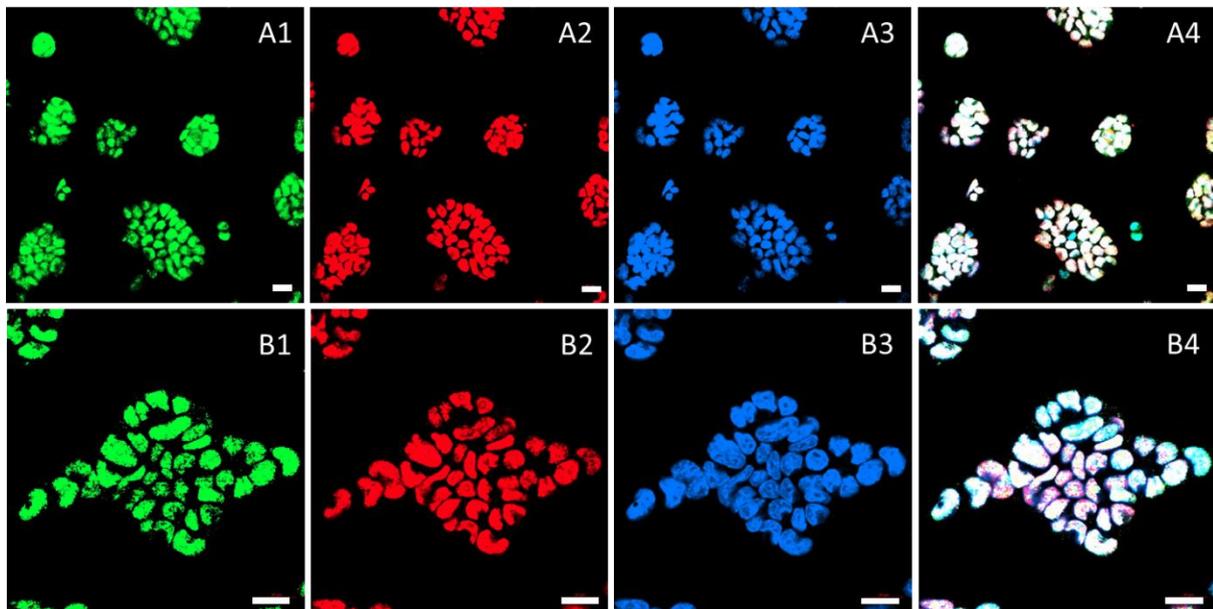


Abbildung 9: Nachweis der Pluripotenz von mESC-Rx-GFP mittels Immunfluoreszenzfärbung. $3 \cdot 10^4$ mESC-Rx-GFP wurden auf einer mit Gelatine-beschichteten (0,1 %, 30 min) 24-Well Kultivierungsoberfläche ausgebracht und für 2 Tage kultiviert. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurden die mESC mit PFA (4 %; 10 min, RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min, RT) permeabilisiert und unspezifische Bindestellen blockiert. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Transkriptionsfaktoren Nanog (A1; B1) und Oct4 (A2; B2). Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml) visualisiert (A3; B3). Maßstab 20 µm. Carl Zeiss LSM8000

Anhand der Immunfluoreszenzfärbung konnten beide Transkriptionsfaktoren, Nanog und Oct4, wie erwartet im Zellkern der mESC-Rx-GFP nachgewiesen werden. Zwar findet die Synthese von Oct4 im Zytoplasma statt, dieses wird aber aufgrund seines Kernlokalisierungssignals (NLS) von Importin- α gebunden und in den Zellkern importiert ^[253] ^[254]. Studien zeigten auch, dass Oct4 für die Nanog-induzierte Selbsterneuerung in humanen Embryonen erforderlich ist ^[255]. Erst wenn der Spiegel der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog sinkt, kann die Pluripotenz der Zellen nicht länger aufrechterhalten werden ^[256]. Aufgrund des Immunfluoreszenznachweises von Oct4 und Nanog in den mESC-Rx-GFP konnte deren pluripotenter Zustand validiert werden.

4.1.1.2 Pluripotenzenanalyse mittels Durchflusszytometrie

Neben der Immunfluoreszenzanalyse wurde die Pluripotenz der mESC-Rx-GFP zusätzlich quantitativ mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Durchflusszytometrie ist eine leistungsfähige Methode, um eine schnelle, multiparametrische Aussage über die Heterogenität einer Zellpopulation in Suspension zu treffen. Die Zellpopulationen werden dabei anhand ihrer fluoreszierenden oder lichtstreuenden Eigenschaften analysiert und/oder sortiert ^[257]. Während der Analyse passieren die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung nacheinander einen Laserstrahl im Durchflusszytometer. Dabei streuen die Zellen abhängig von ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) das Laserlicht in verschiedene Richtungen ^[258]; ^[259] ^[260]. Um den Anteil der pluripotenten mESC-Rx-GFP zu ermitteln, wurden diese aufgeteilt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dies wurde in Kollaboration mit Dr. Yvonne Heneka und M. Sc. Steffen Sonntag aus der Gruppe Orian-Rousseau (KIT) durchgeführt. Zunächst wurden die mESC-Rx-GFP von einer mit Gelatine-beschichteten Kultivierungsfläche (T25 Kultivierungsflasche) mit Hilfe von Trypsin-EDTA (0,25 %) abgelöst und insgesamt $3 \cdot 10^6$ mESC-Rx-GFP mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert und in FACS Puffer resuspendiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Fc-Block (2 μ l/ 10^6 Zellen) auf Eis blockiert (30 min). Anschließend wurden drei verschiedene Zellpopulationen präpariert, die in **Abbildung 10** dargestellt sind. Es wurden $1 \cdot 10^6$ mESC-Rx-GFP mit dem Antikörper anti-Oct3/4 PE *mouse* monoclonal IgG1 (Abbildung B; orange) behandelt. Weitere $1 \cdot 10^6$ mESC-Rx-GFP wurden mit der Isotypkontrolle PE *mouse* IgG1 (Abbildung B; blau) markiert. R-Phycoerythrin (PE) zählt zu den Phycobiliprotein-Farbstoffen, dessen Anregungsmaximum bei 496 nm/566 nm und Emissionsmaximum bei 576 nm liegt ^[261]. Mit Hilfe der Isotypkontrolle kann die Spezifität eines Primärantikörpers besser beurteilt werden. Die Isotypkontrolle ist dabei gegen ein Antigen, das nicht in den Zellen vorhanden ist gerichtet und bildet einen möglichen unspezifischen Hintergrund ab ^[262]. Als Negativkontrolle dienten $1 \cdot 10^6$ unbehandelte mESC-Rx-GFP (Abbildung B; rot). Das Ergebnis der Analyse wurde in Form eines Histogramms dargestellt, wobei die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten anhand einer relativen Skala abgebildet

wurde. Der *Sideward Scatter* (SSC), ist ein Maß für das sogenannte Seitenstreulicht, wodurch die Granularität der Zelle, die Größe und Struktur des Zellkerns und die Menge der zellulären Vesikel in einer Zelle bestimmt werden können. Je höher die Granularität ist, desto mehr seitlich gestreutes Licht wird erzeugt ^[260]. Die Zellen mit ähnlicher Fluoreszenzintensität und Granularität können bei der Auswertung in einem ähnlichen Bereich lokalisiert und quantifiziert werden (Abbildung A). Die detektierten Zellen der unterschiedlich behandelten Zellen weisen verschiedene Fluoreszenzintensitäten auf und können dadurch unterschieden werden (Abbildung B).

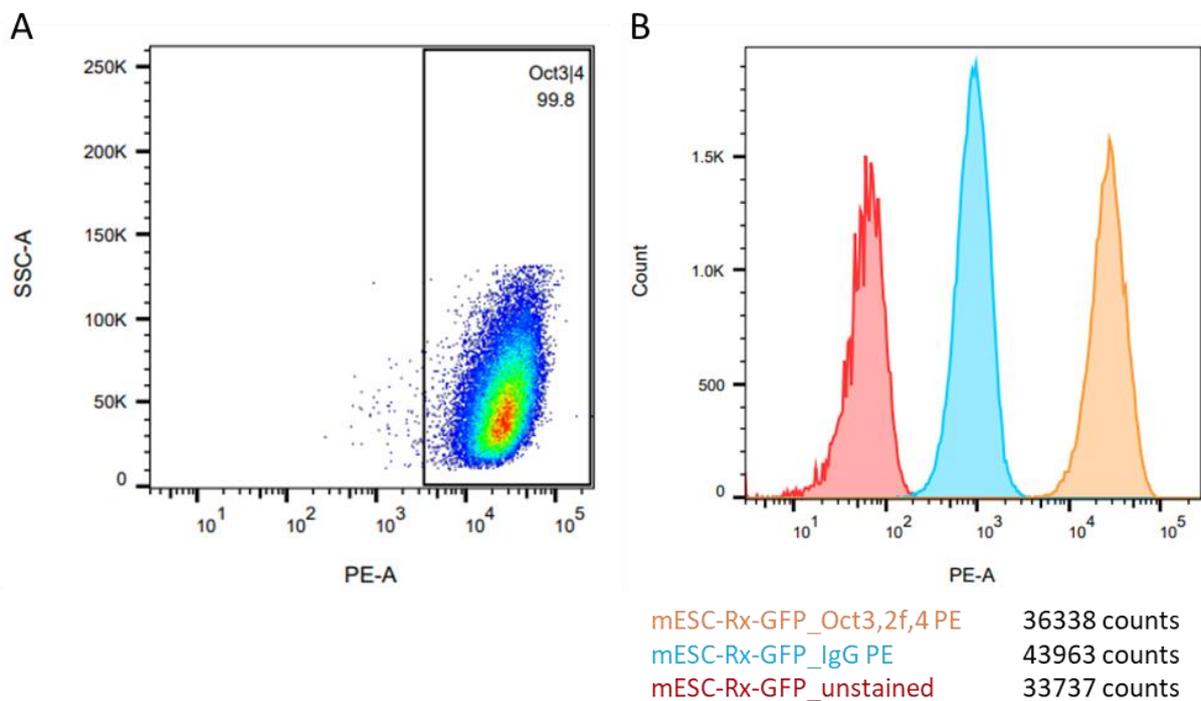


Abbildung 10: Nachweis der Pluripotenz bei mESC-Rx-GFP anhand der Durchflusszytometrie durch den fluoreszenzbasierten Nachweis des Transkriptionsfaktors Oct3/4. Eingesetzt wurden insgesamt $3 \cdot 10^6$ mESC-Rx-GFP, die zunächst mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit 0,1 %igem Triton-X permeabilisiert und bei denen unerwünschte Bindungsstellen blockiert wurden. $1 \cdot 10^6$ der pluripotenten Zellen erfolgte durch den anti-Oct3/4 PE mouse monoclonal IgG1 Antikörper. Als Kontrolle wurden unbehandelte mESC-Rx-GFP eingesetzt sowie mit der Isotypkontrolle PE mouse IgG1 behandelte mESC-Rx-GFP. BD FACSaria Fusion Flow Cytometer. Wellenlänge: 561 nm.

Die Analyse der Pluripotenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie ergab, wie auch schon die Immunfluoreszenzfärbung, dass die kultivierten mESC-Rx-GFP den Transkriptionsfaktor Oct4 exprimieren. Dabei waren 99,8 % der mESC-Rx-GFP Oct3/4 positiv, wobei dieser Prozentsatz verglichen mit der Literatur in einem optimalen Bereich liegt ^{[263]; [264]}. Daher kann von einer homogenen, pluripotenten mESC-Rx-GFP Zellkultur als Ausgangsmaterial ausgegangen werden. Nachdem der Status der Pluripotenz validiert werden konnte, konnten die mESC-Rx-GFP im Rahmen dieser Arbeit für die Differenzierung von retinalem Pigmentepithel (RPE) eingesetzt werden.

4.2 Differenzierung von RPE aus mESC-Rx-GFP

Das RPE ist ein hochpolarisiertes, multifunktionales Epithel, das sich im Auge zwischen der neuronalen Retina und dem Choroid befindet. Das RPE wird aus hexagonal angeordneten pigmentierten Zellen gebildet, welche, für Barrieren charakteristisch, durch *Tight Junctions* verbunden sind ^[265]. Heutzutage wird in der Forschung oftmals primäres RPE eingesetzt, um grundlegende Eigenschaften des RPEs zu analysieren und zu verstehen ^[266]. Auch wenn einige RPE-Zelllinien etabliert werden konnten ^{[267]; [268]} verlieren immortalisierte und passagierte Zellen oftmals innerhalb eines kurzen Zeitraums morphologisch und physiologisch charakteristische Eigenschaften der natürlichen RPE-Zellen ^[265]. Aus Stammzellen gewonnene differenzierte Zellen ziehen daher besonders in der regenerativen Medizin die Aufmerksamkeit auf sich ^[42]. Embryonale Stammzellen beispielsweise können als unbegrenzte Spenderquelle für die Differenzierung von Zellen wie dem RPE dienen ^[269]. Eine reproduzierbare Differenzierung von mESC zu funktionalem RPE aus mESC trägt zum Verständnis von *in vivo* Prozessen in der Retina bei. Wie die Literatur belegt, haben die Stammzellen unterschiedlicher Spezies das Potenzial sich in RPE-ähnliche Zellen differenzieren zu lassen ^{[220]; [270]–[272]}. Kawasaki et al. ^[273] berichten als eine der Ersten über die *in vitro* Differenzierung von RPE-ähnlichen Zellen aus embryonalen Stammzelllinien des Affen. Andere Studien konnten zeigen, dass auch die differenzierten Zellen charakteristische Marker des RPEs sowie die Fähigkeit zur Phagozytose aufweisen ^[270]. Ein wichtiger Fortschritt stellte die spontane Differenzierung von humanen ESC zu RPE Zellen ohne zusätzliche *Feederzellen* dar ^{[274][184]}. Als *Feederzellen* werden normalerweise adhärente, im Wachstum gehemmte, aber lebensfähige Zellen bezeichnet. Diese werden aufgrund ihrer Bioaktivität oftmals als Substrat verwendet, um das Kultivierungsmedium für andere Zellen zu konditionieren ^[275]. Eiraku und Sasai 2011 haben in vorherigen Studien gezeigt, dass sich ESCs durch eine SFEBq-Kultivierung in neuroepitheliales Gewebe differenzieren lassen ^[52]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mESC-Rx-GFP auf Grundlage des modifizierten Differenzierungsprotokolls von Iwasaki et al 2016 ^[42] zum RPE differenziert. Der Ablauf der Differenzierung ist in **Abbildung 11** dargestellt.

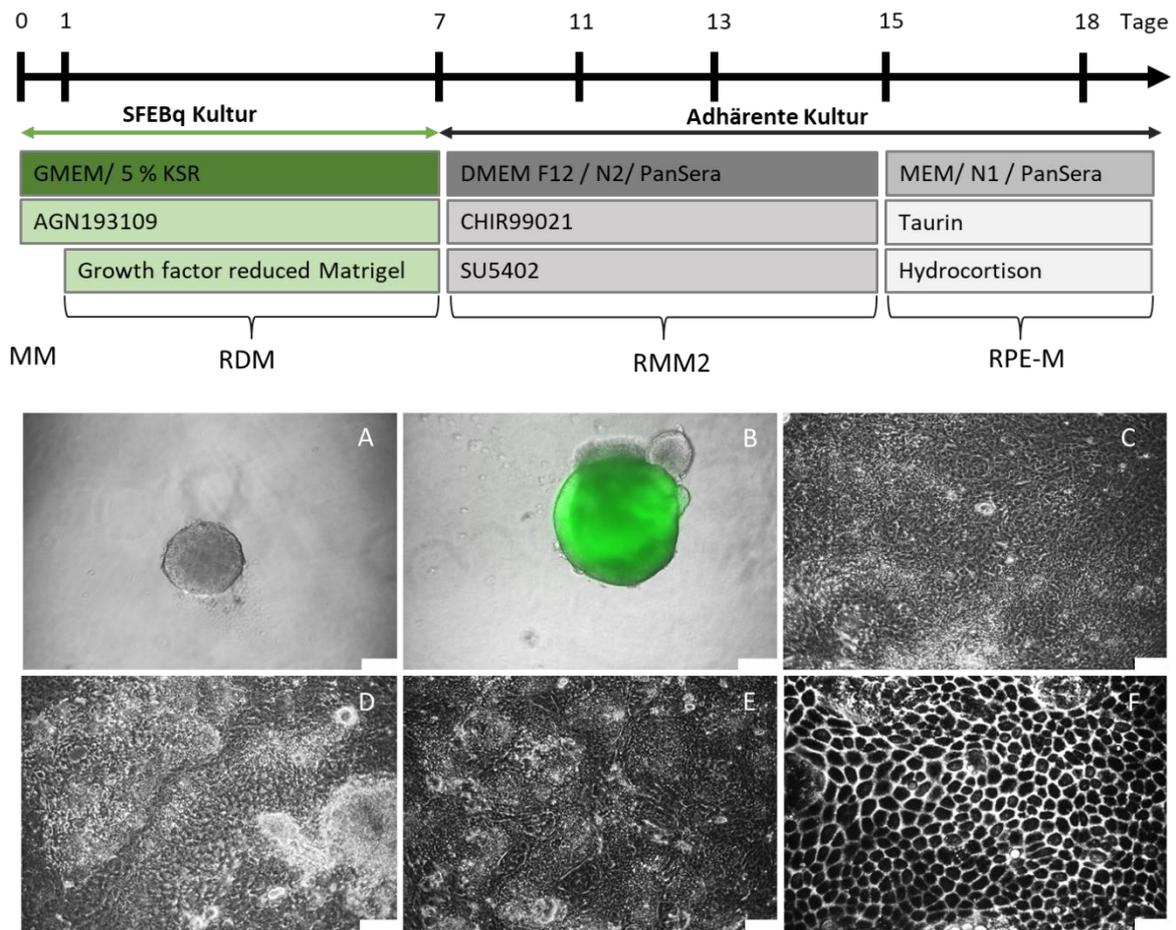


Abbildung 11: Differenzierungsprotokoll von mESC-Rx-GFP zu RPE innerhalb von 18 Tagen modifiziert nach Iwasaki et al. 2016 (Iwasaki et al. 2016). Dazu wurden die in Maintenance Medium (MM) kultivierten mESC-Rx-GFP abgelöst und in einer 96-ULW Kultivierungsplatte je $3 \cdot 10^3$ Zellen pro Well in 100 μ l Retinales Differenzierungsmedium (RDM: GMEM mit Knock-out Serum und AGN192109 als Zusatz) als SFEBq Kultur gehalten (A). An Differenzierungstag 1 (DD1) wurden 20 μ l Matrigel in einer Endkonzentration von 2 % pro Well hinzugegeben. Innerhalb von 7 Tagen entwickelten sich retinale, GFP-positive Organoide (B). Die Organoide wurden aufgebrochen und in Retinalem Maturierungsmedium (RMM2: DMEM/F12, versetzt mit N2 Supplements, PanSera sowie ChHIR99021, SU5402 und Y-27632) als adhärenz Kultur inkubiert (C). An DD11 wurden die Kolonien mit Accutase selektiert und die weniger adhärenz Zellen entfernt. Die weitere Kultivierung erfolgte in RMM2 (D). An DD13 fand ein Medienwechsel mit RMM2 statt (RMM2: DMEM/F12, versetzt mit N2 Supplements, PanSera sowie ChHIR99021, SU5402) (E). Nach dem Ersetzen des Medium an DD15 zu Retinalem Pigmentepithel-Medium (RPE-M: MEM- α versetzt mit N1 Supplements, PanSera, sowie den Faktoren Taurin, Hydrocortison und Triiodothyronin), wiesen die Zellen an DD18 eine RPE charakteristische Morphologie auf (F). Maßstab 100 μ m und 20 μ m (F). Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED.

Den Start der Differenzierung stellt das Ablösen der mESC-Rx-GFP von der Zellkulturflasche dar. Anschließend werden mit Hilfe der *serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation* (SFEBq) Kultivierung retinale Organoide erzeugt ^[276]. Dabei wurden zur Aggregation der Zellen je $3 \cdot 10^4$ mESC-Rx-GFP in einer 96-Well ultra low attachment (ULW) Kultivierungsplatte ausgebracht. Das verwendete retinale Differenzierungsmedium (RDM) war mit dem Retinsäurerezeptor-Antagonist AGN193109 als wichtiger physiologischer Zusatz für die Regulation der epithelialen Proliferation und Differenzierung versetzt ^[277]. An Differenzierungstag 1

(DD1) wurde zu den aggregierten Zellen Matrigel (2 % Endkonzentration) als EZM Komponente hinzugegeben. Matrigel besteht aus einer Mischung an extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin und Wachstumsfaktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Üblicherweise wird Matrigel in der Stammzellkultivierung als Beschichtungsmaterial eingesetzt, da es das Zellwachstum und deren strukturelle Organisation *in vitro* fördert ^[278] ^[279]. Ob die Organoide in retinales Gewebe differenzieren, konnte anhand einer Expression von GFP durch den retinalen Rx-Promotor an DD7 überprüft werden. Das retinale Homöoboxprotein ist ein Transkriptionsfaktor, der in der retinalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt ^[261]. Die GFP-positiven Organoide wurden mechanisch mit Hilfe von Kanülen aufgebrochen, damit sie adhärent auf einer Laminin beschichteten 12-Well Kultivierungsplatte weiter kultiviert werden konnten. Das verwendete retinale Maturierungsmedium wurde dabei mit den Faktoren CHIR99021, SU5402 und Y-27632 versetzt. CHIR99021 fördert als Aktivator des Wnt-Signalweges ^[280] die Differenzierung von retinalen Vorläuferzellen zum RPE ^[281]. Auch SU5402 als selektiver Inhibitor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (VEGFR-2) ^[282] sowie des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 1 (FGFR-1) induzieren die retinale Differenzierung, gleichsam wie der Rho-assoziierte Kinase-Inhibitor Y-27632 ^[283]. Insbesondere bei der Differenzierung von RPE-ähnlichen Zellen spielen, wie Studien demonstrieren, diese Faktoren eine wichtige Rolle ^[284] ^[285]; ^[286]. Um die RPE-Vorläuferzellen aus den adhären Kolonien zu selektionieren, wurden diese an DD11 mit Accutase™ ^[287], einer aus proteolytischen Enzymen bestehenden Lösung, behandelt, um schlechter adhärierende Zellen zu entfernen. Die RPE-Vorläuferzellen konnten anschließend abgelöst und auf eine mit Laminin-beschichtete Kultivierungsplatte mit RMM2 Medium überführt werden. An DD13 wurde schließlich das Medium durch RMM2 mit weniger zugesetzten Faktoren (CHIR99021 und SU5402) ersetzt. Für den finalen Differenzierungsschritt der RPE-Vorläuferzellen zu RPE wurde an DD15 das Medium gegen Retinales Pigmentepithel-Medium (RPE-M) ausgetauscht. Das RPE-M war mit Taurin, Hydrocortison sowie Triiodothyronin versetzt. Taurin ist eine β -Aminosulfonsäure, ^[288] die für die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität der Photorezeptoren und RPE-Zellen unerlässlich ist ^[289]. Auch Triiodothyronin spielt für die Photorezeptoren und RPE-Zellen eine essentielle Rolle, wie Studien an Ratten demonstrieren ^[290]; ^[291]. Ab DD18 konnte bei den differenzierten mESC-Rx-GFP eine charakteristische hexagonale Zellmorphologie der RPE Zellen nachgewiesen werden. Wie das Differenzierungsergebnis verdeutlicht hat, konnte das ursprünglich auf murine iPSC ausgelegte Differenzierungsprotokoll von Iwasaki et al 2016 ^[42] auch auf die Differenzierung von mESC übertragen werden. Um die ausschlaggebenden Faktoren für diesen Erfolg zu identifizieren wurde die Differenzierung in den nachfolgenden Kapiteln näher betrachtet.

4.2.1 Einfluss des Kultivierungsmaterials auf die RPE-Differenzierung

Die Wahl geeigneter Wachstumsbedingungen ist eine grundlegende Anforderung in der Zellkultur. Neben einer geeigneten Mikroumgebung spielen eine kontrollierte Temperatur ^{[292]; [293]}, ein geeignetes Kultivierungssubstrat und Wachstumsmedium sowie der pH-Wert eine wichtige Rolle für ein optimales Zellwachstum ^{[294] [295] [296]; [297]}.

4.2.1.1 Einfluss von Serum auf die mESC-Rx-GFP Kultivierung

Fast alle eukaryotischen Kultivierungsmedien beinhalten für die *in vitro* Aufrechterhaltung und Vermehrung von Zellen und Gewebe fötales Kälberserum (FCS) ^[298]. Dieses stellt für die Zellen, aufgrund seiner biologischen Herkunft, eine optimale Mikroumgebung mit Grundnährstoffen, Wachstumsfaktoren und Hormonen bereit ^[297]. Aber auch gerade aufgrund des biologischen Ursprungs können das mögliche Vorhandensein Wachstums-inhibierender Faktoren sowie Chargendifferenzen Einfluss auf die Qualität der Experimente nehmen ^{[299]; [300]}. Besonders Stammzellen reagieren empfindlich gegenüber Schwankungen in ihrer Kultivierungsumgebung, was sogar mit dem Verlust ihrer Pluripotenz einhergehen kann ^[301]. Ein speziell aufgereinigtes Serum wurde daher für die Kultivierung der mESC-Rx-GFP eingesetzt und mit dem FCS-versetzten Kultivierungsmedium verglichen (**Abbildung 12**). Dazu wurden mESC-Rx-GFP ($4,2 \cdot 10^5$ Zellen) in einer mit Gelatine-beschichteten (0,1 %) T25 Kultivierungsflasche ausgebracht und kultiviert. Jeden zweiten bzw. dritten Tag wurden die Zellen standardgemäß passagiert und in eine neue beschichtete Zellkulturflasche überführt. Als Kultivierungsmedium wurde Maintenance Medium (MM) verwendet, das entweder mit 10 % FCS oder mit 15 % PanSera versetzt war. Mit jeder neuen Passage wurde die Zellzahl bestimmt, um das Zellwachstum in den Kultivierungsmedien mit unterschiedlichen Seren analysieren zu können. Das Ergebnis der Analyse ist anhand eines Boxplots graphisch dargestellt. Um auszuschließen, dass PanSera neben dem Einfluss auf die Proliferation und die Adhäsion auch die Zellmorphologie beeinflusst, wurde nach einer vierwöchigen Kultivierung der mESC-Rx-GFP zudem eine mikroskopische Analyse durchgeführt.

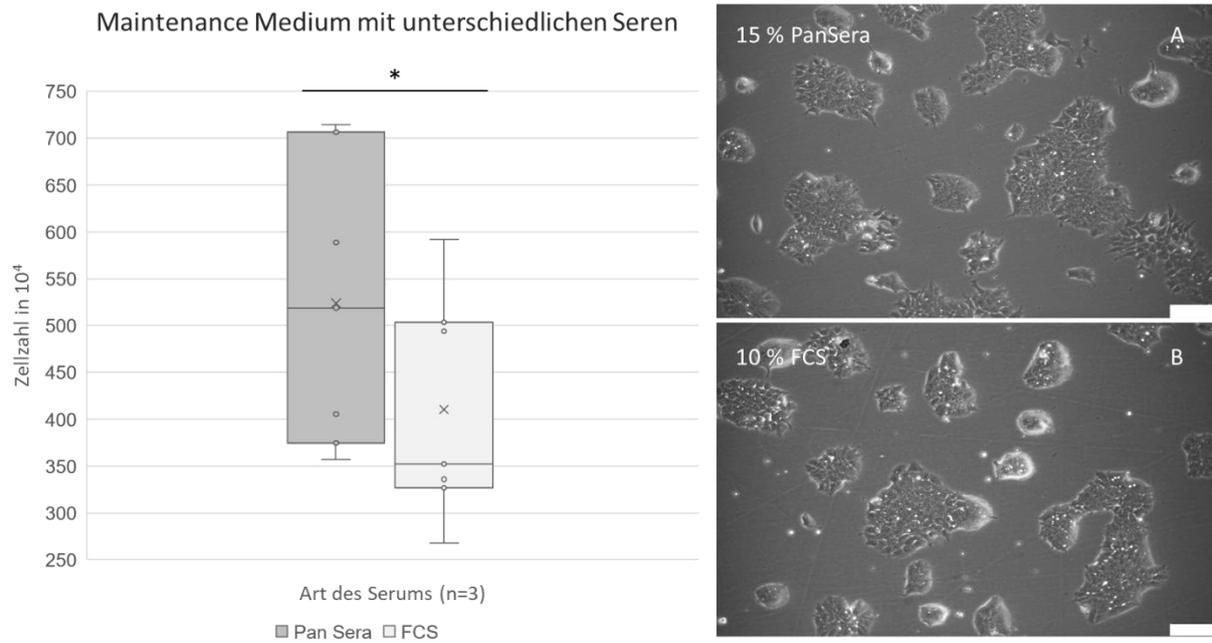


Abbildung 12: Vergleich der Kultivierung von mESC-Rx-GFP in Maintenance Medium (MM) mit unterschiedlichen Seren. Verglichen wurde das Zellwachstum in MM mit 15 % PanSera (A) oder mit 10 % FCS (B) über einen Zeitraum von 4 Wochen. $4,2 \cdot 10^5$ mESC-Rx-GFP wurden in eine mit Speed Coating beschichtete T25 Kultivierungsflasche ausgebracht und kultiviert. Jeden 2. bzw. 3. Tag wurden die Zellen passagiert und dabei die Zellzahl bestimmt. Das Ergebnis der Auszählung wurde in einem Boxplot graphisch aufgetragen. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurden die Zellen in den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zudem mit einem Lichtmikroskop visualisiert. Maßstab 100 μm . Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED

Auch nach einem Kultivierungszeitraum von 4 Wochen konnte bei der Kultivierung der mESC-Rx-GFP mit PanSera keine maßgeblichen morphologischen Änderungen im Vergleich zu der Kultivierung mit FCS verzeichnet werden. Unter beiden Kultivierungsbedingungen waren die Zellen wie zu erwarten, in kleinen Kolonien adhärirt, deren Größe sich jedoch signifikant unterschied (P -Wert=0,177). Die statistische Auswertung erfolgte in der gesamten Arbeit, sofern nicht anders beschrieben mit Hilfe des zweiseitigen Student-t-Test mit $\alpha = 0,05$. Nach einer Kultivierungsdauer von 4 Wochen zeigte sich eine verbesserte Proliferation der mESC-Rx-GFP bei der Kultivierung mit PanSera (Median $5,18 \cdot 10^6$ Zellen) verglichen mit FCS (Median $3,52 \cdot 10^6$ Zellen), da beim Zählen die durchschnittliche Zellzahl größer war. Bei beiden Kultivierungsbedingungen lagen die minimale (PanSera $7,14 \cdot 10^6$ Zellen; FCS $2,67 \cdot 10^6$ Zellen) und maximale Zellzahl ähnlich weit auseinander. Ob sich das Serum signifikant auf die Proliferation der mESC-Rx-GFP auswirkt wurde statistisch bestimmt und ergab mit einem P -Wert von 0,147 keinen signifikanten Unterschied. Da die Verwendung von PanSera keine Morphologieänderung der mESC-Rx-GFP bewirkte und deren Wachstum positiv beeinflusste, wurde für die weitere Kultivierung der mESC das MM mit PanSera versetzt. Auch die Medien für die Differenzierung der mESC zu RPE wurden mit PanSera angesetzt. Dass die Art des Serums einen Einfluss auf die Kultivierung der Stammzellen hat zeigt die Notwendigkeit von stabilen Kultivierungsbedingungen. Da die

Zusammensetzung von FCS variiert bemühen sich Forscher bereits weltweit, einen adäquaten Ersatz für FCS zu finden, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten^[302].

4.2.1.2 Einfluss von Zellkulturplatten auf die Differenzierung

Auch die Kultivierungsoberfläche beeinflusst den Erfolg der RPE-Differenzierung. Um eine gezielte und reproduzierbare Differenzierung des RPEs aus mESC-Rx-GFP zu gewährleisten, wurden unterschiedliche 96-Well Kultivierungsplatten eingesetzt und die Bildung von Organoiden untersucht. Als Organoiden werden vielzellige Strukturen bezeichnet, die sich von Stamm- und Vorläuferzellen ableiten. Dabei werden *in vitro* wichtige räumliche Organisationen und Gewebefunktionen rekapituliert^[303]^[304]. Organoiden sind insofern einzigartig, als dass sie selbstorganisierende 3D-Kultursysteme sind^[305]^[306]. Es stehen verschiedene Techniken zur Verfügung, um in der Zellkultur die Zellaggregation zu Organoiden gezielt zu veranlassen. Gängige Methoden stellen die Kultivierung der Zellen in Hanging-Drop Platten^[307], *ultra low attachment* (ULW) Platten^[308] oder in mikrofluidischen Systemen^[309] dar.

Für die RPE-Differenzierung wird von Iwasaki et al. der Einsatz von *Nunclon Sphera-Treated, U-Shaped-Bottom* Kultivierungsplatten empfohlen. Aufgrund von Beschaffungsengpässen sowie des hohen Kostenfaktors wurde die Bildung von mESC-Rx-GFP Organoiden (je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP pro Well) und deren Differenzierung zu RPE in 96-Well Kultivierungsplatten mit unterschiedlichen Beschichtungen vergleichend betrachtet. Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (Poly-Hema) ist dafür bekannt, die Zelladhäsion und -ausbreitung zu verhindern^[310] und verursacht zudem als Biomaterial mit ausgezeichneter Bio- und Zytokompatibilität nur eine minimale immunologische Reaktion^[311]. Deshalb wurden Suspensionsplatten mit U-Boden (Abbildung 13 B) und F-Boden (Abbildung 13 F) durch die Zugabe einer 1,2 %igen Poly-Hema Lösung beschichtet (**Abbildung 13**). Die Poly-Hema Lösung wurde für 24 h unter sterilen Bedingungen getrocknet, das Vorgehen wiederholt und nochmal bis zur vollständigen Verdampfung des Ethanol getrocknet^[312]. Agarose stellt ein weiteres biomaterialbasiertes Substrat zur Erzeugung von zellulären Sphäroiden dar^[313]. Deshalb wurden gleichermaßen Suspensionsplatten mit U-Boden (Abbildung D) und F-Boden (Abbildung C) mit einem 1,5 %igen Agarosegel versehen. Um die Organoidbildung der mESC-Rx-GFP vergleichen zu können, wurden zudem eine *Nunclon ULW* Kultivierungsplatte als Positiv-Kontrolle (Abbildung A) und eine Suspensionsplatte mit U-Boden (Abbildung E) als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Nur die Suspensionsplatte mit U-Boden und 1,2 %iger Poly-Hema Beschichtung (B) stellte eine mögliche Alternative zur Kontrollplatte dar. Die 1,2 %ige Poly-Hema Beschichtung erlaubte nicht nur die Aggregation der mESC-RX-GFP zu Organoiden, sondern auch eine vollständige Differenzierung von RPE. Dabei konnten an DD18, wie in der Kontrolle, Zellen mit den charakteristischen morphologischen Eigenschaften von RPE identifiziert werden. Mit der Agarosebeschichtung konnten zwar Organoiden aus

den mESC-Rx-GFP gebildet werden, die jedoch nicht weiter in RPE differenziert werden konnten. Zurückzuführen ist dies auf die verringerte retinale Induktion der Zellen, welche anhand der GFP-Expression an DD7 ermittelt werden kann. Ein zu geringer Prozentsatz an retinalen Vorläuferzellen verhindert die weitere Differenzierung der Zellen zu RPE ^{[186]; [314]; [315]}. Dass auch die Form des Wellbodens einen Einfluss auf die Aggregation und Differenzierung der mESC-Rx-GFP hat mit Agarose-beschichtete Suspensionsplatte mit F-Boden verdeutlicht. Trotz gleicher Beschichtung wie in der Suspensionsplatte mit F-Boden ist es den Zellen nur schwer möglich sich in Organoiden zu formieren. Die entstandenen Aggregate wiesen an DD7 zudem kein GFP-Signal auf und konnten deshalb nicht weiter differenziert werden. Bei einer mit Poly-Hema beschichteten Suspensionsplatte mit F-Boden bildeten sich sogar überhaupt keine Aggregate. Die Form des Wells alleine ist jedoch nicht ausschlaggebend für die erfolgreiche Bildung von Organoiden aus mESC-Rx-GFP. Die Kultivierung der mESC-Rx-GFP in einer Suspensionsplatte mit U-Boden führte lediglich zu vielen inhomogenen Organoiden, die keine retinale Differenzierung zeigen konnten. Für eine erfolgreiche Differenzierung von mESC-Rx-GFP zu RPE kommt als Alternative nur die Kultivierung der mESC-Rx-GFP in einer Suspensionsplatte mit U-Boden und 1,2 % Poly-Hema Beschichtung in Frage (**Abbildung 14**).

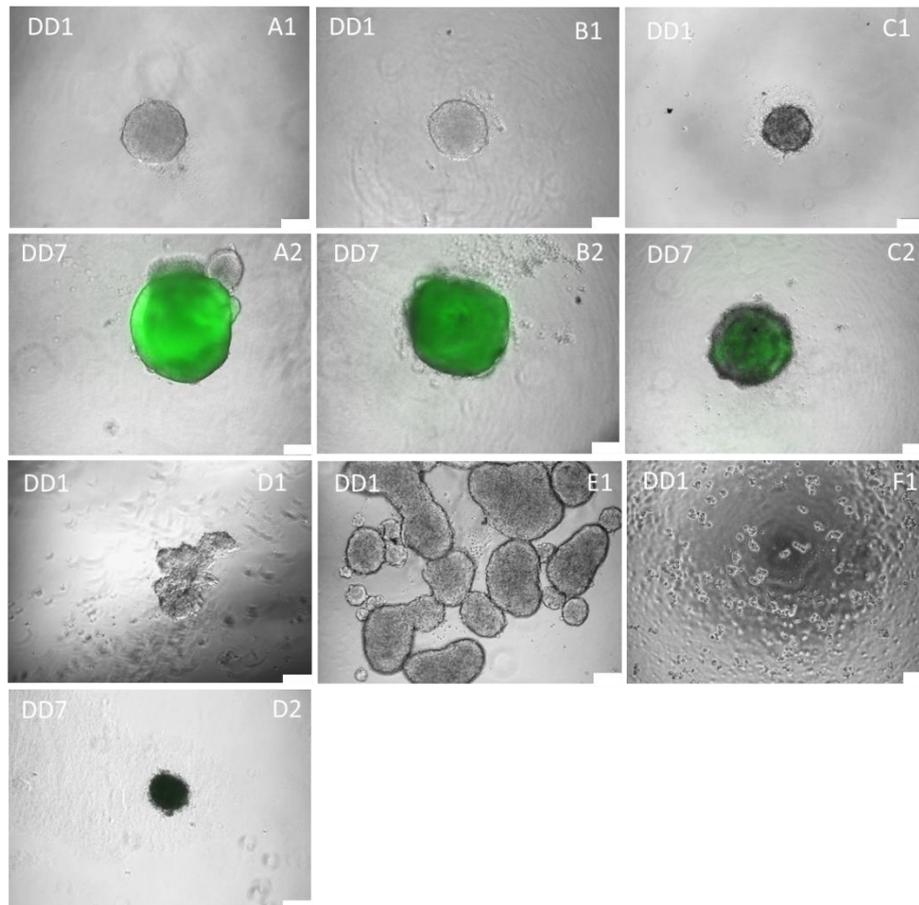


Abbildung 13: Differenzierung von mESC-Rx-GFP in unterschiedlichen 96-Well Kultivierungsplatten. Je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP wurden in (A) eine *Nunclon Sphera-Treated, U-Shaped-Bottom* Microplate Kultivierungsplatte, (B) eine Suspensionsplatte mit U-Boden und 1,2 %iger Poly-Hema Beschichtung, (C) eine Suspensionsplatte mit F-Boden und 1,5 %iger Agarosebeschichtung, (D) eine Suspensionsplatte mit U-Boden und 1,5 %iger Agarosebeschichtung, (E) eine Suspensionsplatte mit U-Boden sowie (F) eine Suspensionsplatte mit F-Boden und 1,2 %iger Poly-Hema Beschichtung in je 100 μ l RDM ausgesät. Anschließend wurde der Erfolg der Differenzierung zu RPE an DD1 und DD7 mikroskopisch verfolgt. Maßstab 100 μ m und 200 μ m (A6; B6). Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED

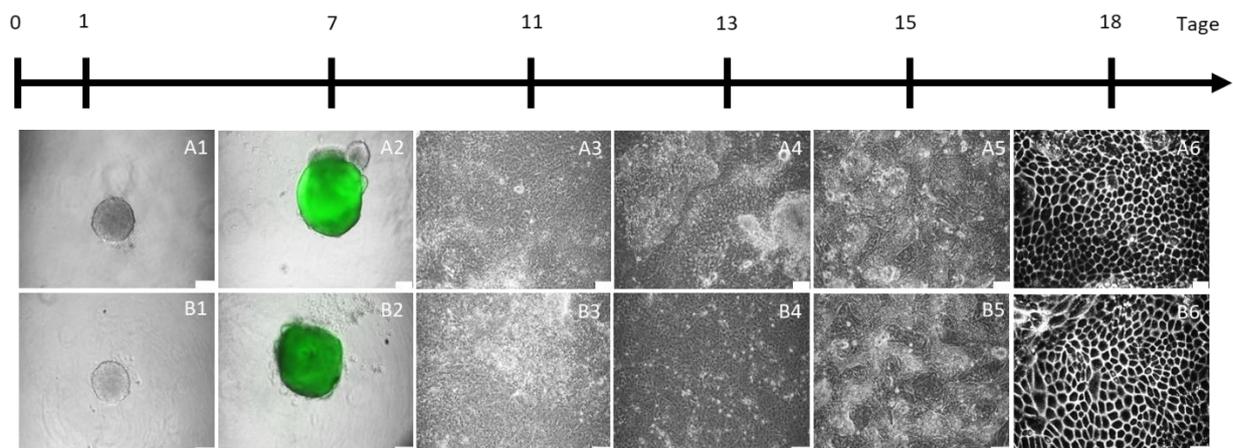


Abbildung 14: Differenzierung von mESC-Rx-GFP in unterschiedlichen 96-Well Kultivierungsplatten. Je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP wurden in (A) eine *Nunclon Sphera-Treated, U-Shaped-Bottom* Microplate Kultivierungsplatte und (B) eine Suspensionsplatte mit U-Boden und 1,2 %iger Poly-Hema Beschichtung ausgebracht und bis DD18 zu RPE differenziert. Maßstab 100 μ m bzw 200 μ m (A6; B6). Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED

Um den Differenzierungserfolg in retinale Vorläuferzellen quantitativ bestimmen zu können wurde der Prozentsatz der GFP-positiven Organoide an DD7 in einer Kultivierungsplatte mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt (**Abbildung 15**). Bei der mit Poly-Hema beschichteten Suspensionsplatte (52,75 % \pm 15,4) war die durchschnittliche Anzahl an GFP-positiven Organoiden pro Platte um 27 % geringer als bei der Differenzierung in einer *ULW*-Kultivierungsplatte (72,25 % \pm 12,4).

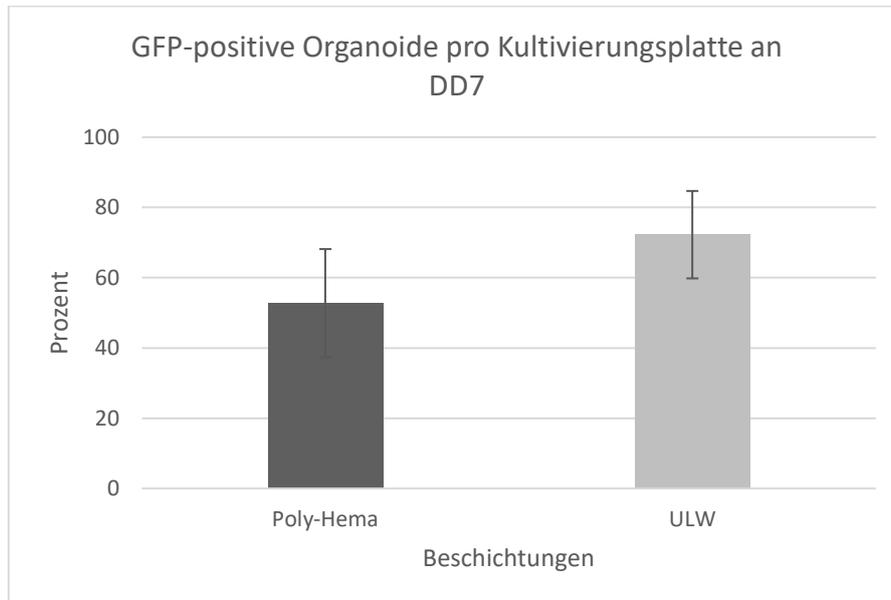


Abbildung 15: GFP-positive mESC-Rx-GFP Organoide bei der RPE Differenzierung an DD7. Dazu wurden je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in einer 96-Well Kultivierungsplatte ausgebracht (*ULW* oder Suspensionsplatte mit U-Boden und 1,2 % Poly-Hema Beschichtung) und bis DD7 kultiviert. Die GFP-positiven Organoide wurden anhand des inversen Lichtmikroskop Leica DMIL LED bestimmt. n=8.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass eine Differenzierung von mESC-Rx-GFP zu RPE in Nunclon *ULW* Kultivierungsplatten am effektivsten ist. Auch unter Beachtung des Kostenfaktors für diese Kultivierungsplatten zieht die Beschichtung von Suspensionsplatten mit Poly-Hema einen größeren Zeitaufwand, der mit einer geringeren Effizienz verbunden ist nach sich. Nach Abwägung des Kosten-Nutzen-Faktors wurde die weitere Differenzierung der mESC-Rx-GFP zu RPE in *ULW* Kultivierungsplatten durchgeführt. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Durchführung von Iwasaki et al, die in *ULW* Kultivierungsplatten iPSC zu RPE differenzieren ^[42] und Eiraku et al, die *ULW* Kultivierungsplatten zur Differenzierung von ESC zu kortikalen Neuronen verwenden ^[51].

4.2.2 Charakterisierung retinaler Vorläuferzellen während der RPE Differenzierung

Das RPE differenziert sich während der Embryogenese gemeinsam mit der neuronalen Retina aus neuroektodermalen Vorläuferzellen ^[316]. Die *in vitro*, während der RPE-Differenzierung entstandenen retinalen Zellen sollten bezüglich ihrer neuroektodermalen Herkunft näher charakterisiert werden. Dazu wurden in einer 96 *ULW* Kultivierungsplatte Organoide aus mESC-Rx-GFP erstellt. An DD7 wurden

die retinalen Organoiden durch verschiedene quantitative Methoden analysiert. In den mESC-Rx-GFP Organoiden ermöglichte der Knock-In von GFP unter der Kontrolle des retinalen Rx-Promotors die Identifikation retinaler Zellen. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* wird häufig als Reportergen in Zellen eingesetzt ^[317]. Da Rx bei Wirbeltieren essentiell für die retinale Entwicklung und deshalb hoch konserviert ist, stellt die Verbindung des Rx-Promotors mit einem Fluorophor eine gute Möglichkeit zur Identifikation retinaler Vorläuferzellen dar ^{[186] [315] [318]}.

4.2.2.1 *Live-cell Imaging der GFP-Expression in DD7 Organoiden*

Die Fluoreszenzbildgebung und Reportergentechnologie ermöglichen als nicht-invasive Methoden die Verfolgung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen. In Verbindung mit Zeitrafferaufnahmen können Prozesse sowohl räumlich als auch zeitlich analysiert und als mehrdimensionale quantitative Informationen präsentiert werden ^[319]. Das nicht-invasive *Live-Cell* Analysesystem Incucyte® wurde eingesetzt, um den Zeitpunkt zu identifizieren, an dem die mESC-Rx-GFP während der RPE Differenzierung positiv für GFP werden. Dazu wurden aus $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP pro Well einer 96-ULW Kultivierungsplatte Organoiden generiert und an DD1 Matrigel in einer Endkonzentration von 2 % ins Differenzierungsmedium gegeben. Matrigel ist eine aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkomen extrahierte Basalmembranmatrix, die seit mehr als vier Jahrzehnten für eine Vielzahl von Zellkulturanwendungen verwendet wird ^[320]. Die retinale Induktion wurde von DD0 bis DD7 unter Echtzeit verfolgt. Dabei wurde alle 3 h automatisch die Fluoreszenzintensität von GFP in den Organoiden bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Organoiden, die ausschließlich in RDM, ohne die Zugabe von Matrigel bis DD7 kultiviert wurden. Das Ergebnis der Quantifizierung ist in **Abbildung 16** aufgeführt. Nur bei Zugabe von Matrigel an DD1 waren die Zellen der retinalen Organoiden GFP-positiv. Dabei nahm die GFP-Fluoreszenzintensität ab DD4 über die Zeit exponentiell zu, wobei sie an DD4,5 bei $1 \cdot 10^6$ GCU* μm^2 lag und bis DD6 auf $8,5 \cdot 10^6$ GCU* μm^2 anstieg. Damit entspricht dieses Ergebnis den Angaben in der Literatur. Bei der Differenzierung von iPSC zu RPE demonstrierten Iwasaki et al. eine Zunahme der Rx-Expression zwischen DD0 und DD7 ^[42]. Da das RPE und die neurale Retina den gleichen entwicklungsbiologischen Ursprung aufweisen, haben Ikeda et al. und Osakada et al. ^{[314]; [321]} bei der neuronalen Differenzierung anhand der erhöhten Expression des retinalen Rx-Markers retinale Vorläuferzellen bestätigt ^[52]. Ohne Zugabe von Matrigel nahm die Fluoreszenzintensität in den Organoiden nur minimal zu, wobei sich das Maximum $0,3 \cdot 10^6$ GCU* μm^2 an DD5 und DD6 nachweisen ließ. Anhand der *Live-cell Analyse* konnte demonstriert werden, dass die Zugabe von Matrigel einen maßgeblichen Einfluss auf die Bildung GFP-positiver Organoiden hat. Für die erfolgreiche Differenzierung von mESC-Rx-GFP zu RPE ist Matrigel damit ein essentieller Bestandteil.

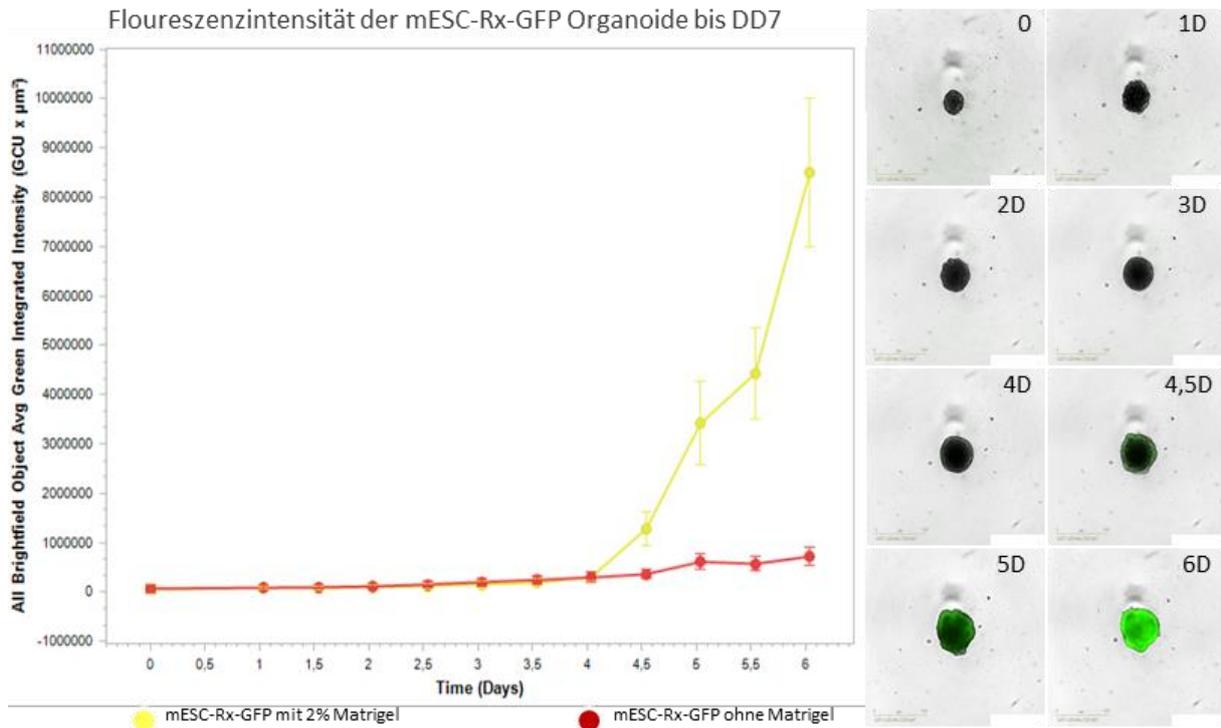


Abbildung 16: *Live Cell Analyse* der Differenzierung von mESC-Rx-GFP zu RPE bis DD7 mit Hilfe des nicht-invasiven Incucyte® Systems. Dabei wurde die Bildung der Organoide aus je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in einer Nunclon 96-ULW Kultivierungsplatte von DD0 bis DD7 unter Echtzeit verfolgt und alle 3 h deren GFP-Floureszenzintensität gemessen. Organoide, zu welchen an DD1 2 % Matrigel in einem finalen Volumen von 120 μl zugegeben wurde (gelb), wurden mit Organoiden verglichen, zu welchen kein Matrigel an DD1 zugegeben wurde (rot). Die weitere Differenzierung wurde bis DD7 in Echtzeit verfolgt. Maßstab 800 μm .

Matrigel ist jedoch aufgrund seiner komplexen, schlecht definierten und variablen Zusammensetzung in seiner Anwendbarkeit in der Zellbiologie beschränkt^{[322]; [320]; [303]}. Variationen der mechanischen und biochemischen Eigenschaften innerhalb einer einzelnen Matrigel-Charge sowie zwischen den verschiedenen Chargen können die Zellkulturexperimente beeinflussen und die Reproduzierbarkeit vermindern. Darüber hinaus kann Matrigel keiner physikalischen oder biochemischen Manipulation unterzogen werden, was die Förderung eines beabsichtigten Zellverhaltens durch den Einsatz einer spezifisch abgestimmten Matrix erschwert. Jüngste Fortschritte in der Entwicklung xenogenfreier, chemisch definierter, hochgradig abstimmbarer und reproduzierbarer Alternativen zeigen das Potential auf, Matrigel in Zukunft ersetzen zu können^{[320]; [303]}.

4.2.2.2 Vermessung des Neuroektoderms bei DD7 Organoiden

Das RPE ist ein Derivat der anterioren Neuralplatte^{[185]; [323]; [324]}, wobei die neuroektodermalen Zellen dem ektodermalen Keimblatt entstammen^[184]. Daher wurde das Neuroektoderm der mESC-Rx-GFP Organoide bei der RPE-Differenzierung näher charakterisiert, indem bei GFP-positiven Organoiden an DD7 das Neuroektoderm vermessen wurde. Es wurden 80 Messungen an insgesamt 16 Organoiden mit Hilfe der FIJI Software durchgeführt und das Ergebnis graphisch in Form eines Boxplots dargestellt

(Abbildung 17). Der Median der Neuroektoderm-Schicht in DD7 Organoiden belief sich auf 58 μm . Dabei betrug das Minimum 50,7 μm und das Maximum 68,69 μm . Das untere Quartil lag bei 54,59 μm und das obere Quartil bei 66,94 μm .

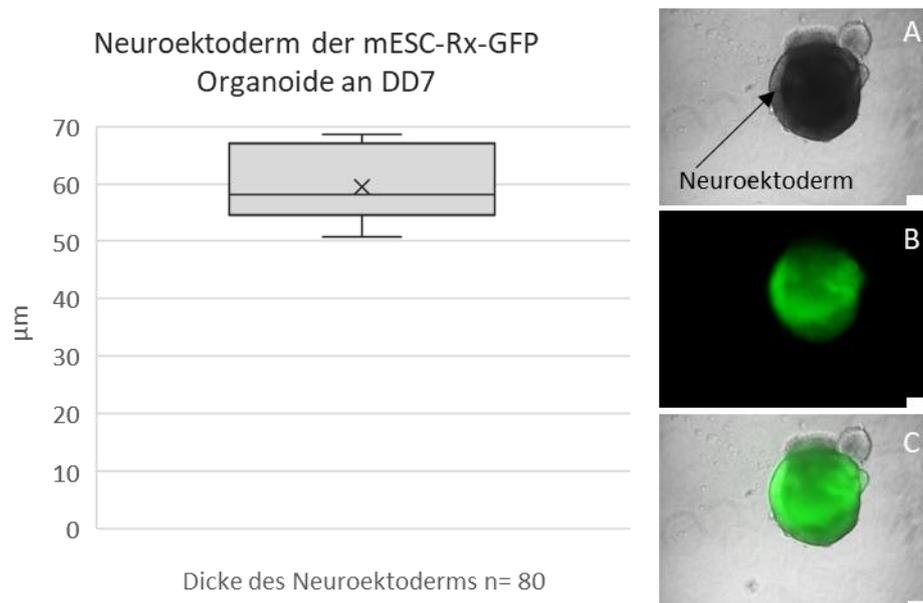


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Vermessung des Neuroektoderms bei GFP-positiven Organoiden aus der Differenzierung von mESC-Rx-GFP zu RPE an DD7. Es wurden je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in einer ULW Kultivierungsplatte differenziert und an DD7 analysiert. A) stellt die Hellfeldaufnahme, B) die Anregung bei 488 nm und C) die Überlagerung dar. Vermessen wurde das Neuroektoderm mit Hilfe der FIJI Software an 80 Stellen von insgesamt 16 Organoiden und in einem Boxplot graphisch dargestellt. Maßstab 100 μm . Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED

Sobald die mESC-Rx-GFP Organoide an DD7 ein GFP-positives Signal aufwiesen, konnte auch ein neuroektodermaler Bereich identifiziert werden. GFP-negative Organoide dagegen wiesen kein Neuroektoderm auf. Damit rekapituliert die Differenzierung der mESC-Rx-GFP die Entwicklung des RPEs ähnlich zu der *in vivo* Situation. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien. In einer geeigneten biophysikalischen und biochemischen Umgebung differenzieren sich Organoide spontan in neuroektodermale Zellen ^[325]. Dabei konnten die aus hESC- und hiPSC-abgeleiteten okulären Organoide ebenfalls die Architektur, zelluläre Organisation sowie die Funktion nativer retinaler embryonaler Gewebe endogen rekapitulieren ^{[187]; [324]; [184]; [323]}.

4.2.2.3 Analyse retinaler Vorläuferzellen in DD7 Organoiden mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln gezeigt, stellt die Durchflusszytometrie eine einfache Möglichkeit dar, um an DD7 den Anteil der GFP-positiven Zellen zu bestimmen, welche die Differenzierung der mESC-Rx-GFP zu RPE hervorbringt. Dazu wurden in einer 96-ULW

Kultivierungsplatte mit je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP pro Well Organoide generiert und bis DD7 differenziert. Die GFP-positiven Organoide wurden dann mit Trypsin-EDTA (0,25 %, 10 min) vereinzelt und anschließend mit PFA (4 %, 10 min) bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Als Negativkontrolle wurden DD2 Organoide im gleichen Verfahren wie zuvor beschrieben behandelt. Für die durchflusszytometrische Analyse (**Abbildung 18**) wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen von DD7 und DD2 eingesetzt und diese anhand ihrer GFP-Expression analysiert.

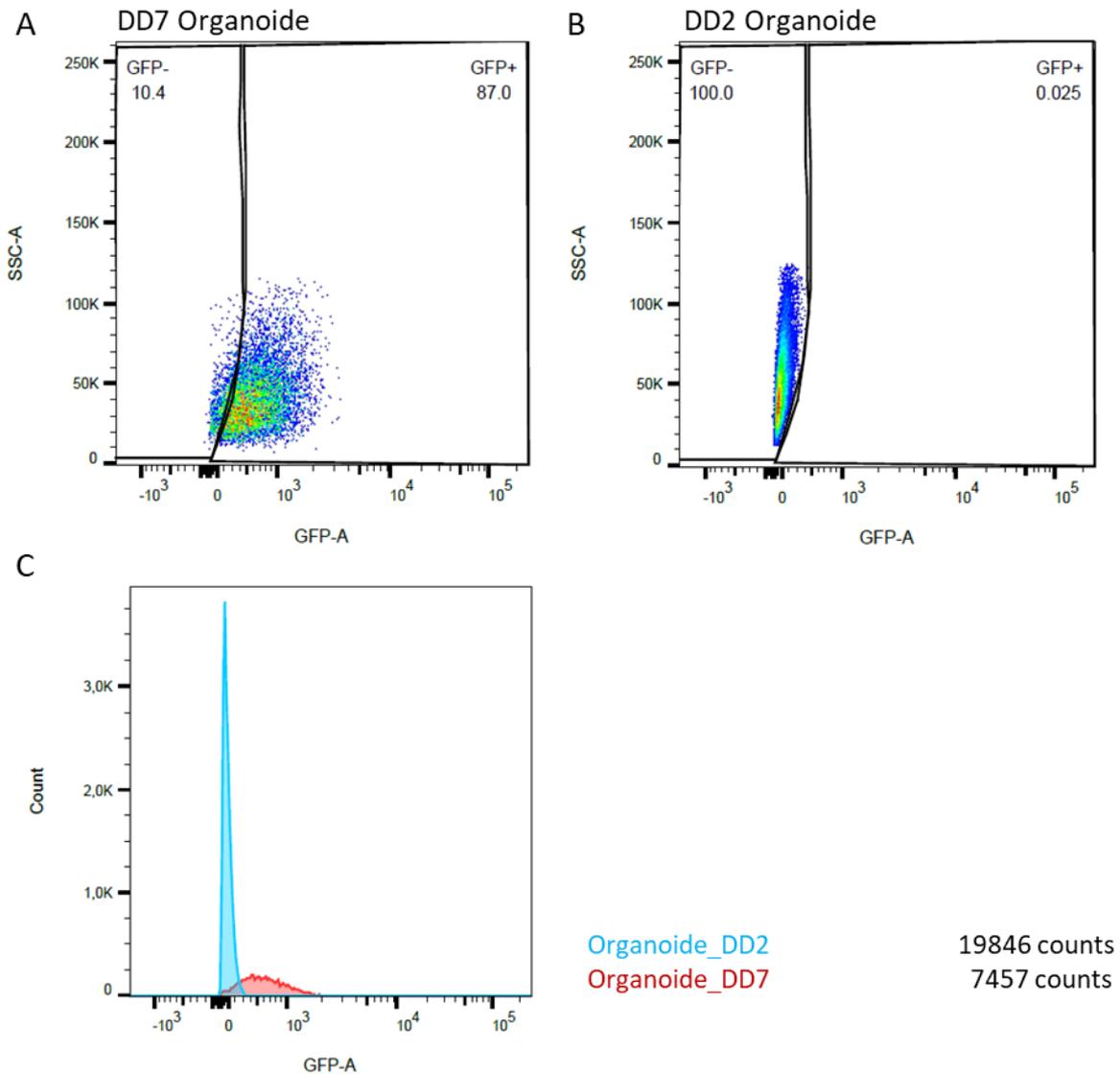


Abbildung 18: Analyse von GFP-positiven Organoiden an DD7 mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Organoide wurden in einer 96-ULW Kultivierungsplatte aus je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in RDM generiert. An DD7 wurden die GFP-positiven Organoide mit Trypsin-EDTA (0,25 %; 10 min) vereinzelt und anschließend mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert. In der Durchflusszytometrie wurden die GFP-positiven Zellen sortiert. Das Ergebnis der analysierten retinalen Zellen aus den DD7 Organoiden ist in Prozent angegeben (A). Als Negativkontrolle dienten DD2 Organoide (B). Die x-Achsen der Diagramme spiegeln die Intensität der GFP-Fluoreszenz wider. Die Intensität des SSCs dient der Granularitätsbestimmung der Zellen (A; B). Zudem ist die Anzahl der Zellen in Relation zur Fluoreszenzintensität von Zellen der DD2 und DD7 Organoide aufgetragen (C). BD FACSAria Fusion Flow Cytometer. Wellenlänge: 488 nm.

Die Zellen mit ähnlicher Fluoreszenzintensität und Granularität können bei der Auswertung in einem ähnlichen Bereich lokalisiert und quantifiziert werden (Abbildung A; B). Die detektierten Zellen der unterschiedlich behandelten Zellen weisen verschiedene Fluoreszenzintensitäten auf und können dadurch unterschieden werden. Als Kontrolle wurden 19846 Zellen der DD2 Organoide sortiert und 7357 Zellen der DD7 Organoide (Abbildung C). Das Ergebnis der Analyse wurde in Form eines Histogramms dargestellt, wobei die Häufigkeitsverteilung der Messsignale jeden Parameters entnommen werden kann ^[260]. Die Verteilung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten wurde anhand einer relativen Skala dargestellt. Je mehr Zellen mit der gleichen Fluoreszenzintensität detektiert werden, desto schmaler ist die entstehende Kurve der Parabel. Die Durchflusszytometrie ergab bei der Negativkontrolle einen Prozentsatz von 100 % an GFP-negativen Zellen. Dass die Zellen der Organoide an DD2 noch keine Fluoreszenz aufweisen korreliert mit den Ergebnissen der *Live Cell* Analyse aus 4.2.2.1. 87 % der Zellen von DD7 Organoiden waren anhand der Durchflusszytometrie GFP-positiv und damit retinal induziert. Bei weiteren Messungen (n=3) der differenzierten Zellen von DD7 Organoiden ergab sich pro 96-*ULW* Kultivierungsplatte ein durchschnittlicher Prozentsatz an GFP-positiven Zellen von 71,87 %. Die Effizienz der retinalen Induktion von ESC lag bei Eiraku und Sasai 2011 zwischen 30–70 % der Gesamtzellzahl an Rx-GFP positiven-Zellen ^[52]. Diese Ergebnisse können anhand der Literatur eingeordnet werden, die besagt, dass sich ES- oder iPS aufgrund ihrer Heterogenität nie vollständig in RPE-ähnliche Zellen differenzieren lassen ^[184].

4.2.2.4 Viabilitätsanalyse von DD7 Organoiden durch eine Lebend-/Tot-Färbung

Die erfolgreiche Differenzierung der Organoide von mESC-Rx-GFP zu RPE an DD7 hängt ebenfalls von der Viabilität der Zellen ab. Zur Bestimmung der Zellviabilität und somit indirekt der Zytotoxizität wurden, wegbereitend durch die Arbeiten von Bruning et al. ^[326], zahlreiche auf Fluoreszenzfarbstoffen-basierende Verfahren beschrieben ^[327]. Ein Lebend-/Tot-Nachweis mit Calcein-AM und Propidiumiodid (PI) wurde durchgeführt, um die Zellviabilität der aus mESC-Rx-GFP generierten Organoiden an DD7 zu untersuchen. Calcein-AM ist ein nicht-fluoreszierender lipophiler Ester, der zur Visualisierung lebender Zellen eingesetzt wird. Intrazelluläre Esterasen spalten an der Zellmembran die Acetoxymethylester-Gruppe (AM), sodass sich die membrandurchlässige, hydrophile Ringstruktur öffnet und sich ein fluoreszierendes chromophores System bildet, das in der Zelle verbleibt. Calcein weist dabei ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 515 nm visualisiert werden ^{[328]; [327]; [329]; [330]}. Um nekrotische Zellen zu visualisieren wird PI eingesetzt, das im Gegensatz zu Calcein nicht durch die intakte Zellmembran gelangt. Lediglich nekrotische, poröse Zellmembranen können von PI passiert werden, was eine anschließende Interkalierung in die DNA nekrotischer Zellen ermöglicht. Nach dem Binden der DNA weist der Fluoreszenzfarbstoff PI ein Absorptionsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm auf ^{[331]; [332]}. An DD7

wurden die mESC-Rx-GFP Organoide in ein μ -Slides 8-Well überführt und für 30 min mit Calcein-AM (4 μ g/ml) und PI (20 μ g/ml) inkubiert.

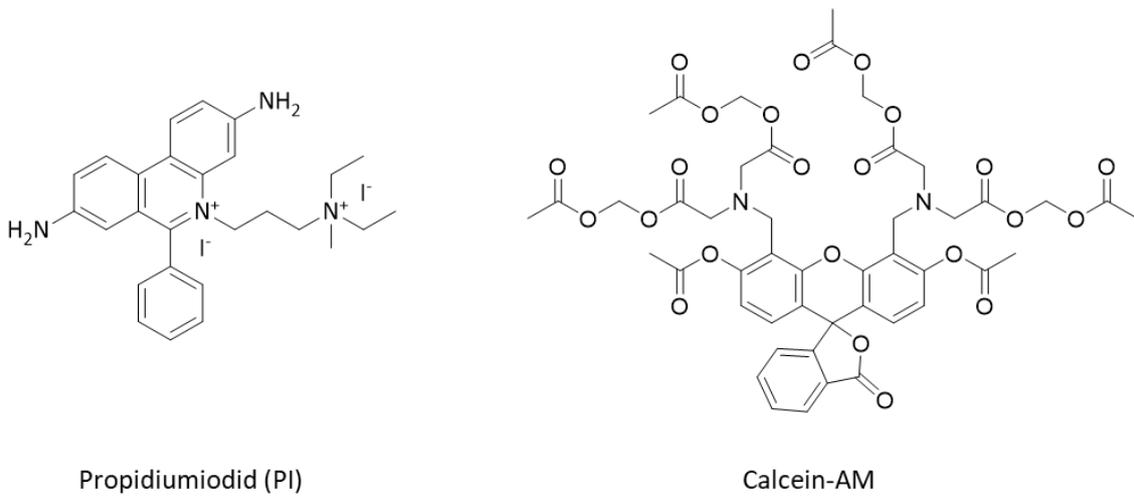


Abbildung 19: Strukturformel von Propidiumiodid (PI) und Calcein-AM. Die Kombination beider wird in der Zellbiologie als Lebend-/Tot-Nachweis verwendet. Dabei können durch Calcein lebende Zellen und durch PI tote Zellen visualisiert werden.

Nach Beenden der Inkubationszeit wurde die Färbelösung abgenommen und durch Retinales Differenzierungsmedium (RDM) ersetzt, um die Vitalität der Zellen nicht negativ zu beeinflussen. Anschließend folgte eine konfokalmikroskopische Analyse (**Abbildung 19**), bei der die detektierten Signale von Calcein (Abbildung A) und PI (Abbildung B) anschließend überlagert (Abbildung C) wurden. Anhand von *Z-Stack*-Projektion wurden die Zellstrukturen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (Abbildung D). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (Abbildung E).

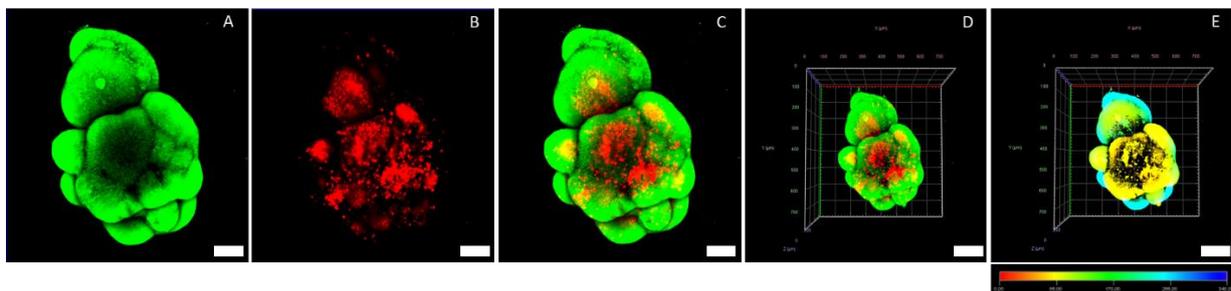


Abbildung 20: Konfokalmikroskopische Analyse der Zellviabilität von DD7 Organoiden anhand einer Lebend-/Tot-Färbung. Analysiert wurden aus mESC-Rx-GFP generierte retinale Organoide an DD7. Tote Zellen wurden mit Hilfe von PI visualisiert (B), lebende Zellen mit Hilfe von Calcein (A) und beide Signale anschließend überlagert (C). Anhand von *Z-Stack*-Projektion wurden die Zellstrukturen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (D). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (E). Maßstab 100 μ m. Carl Zeiss LSM8000 Konfokalmikroskop. Skalierung der Tiefenfärbung in 85 μ m; rot=0 μ m; blau=340 μ m

Anhand der Lebend-/tot-Färbung konnte gezeigt werden, dass Calcein in einem Großteil der DD7 Organoide nachgewiesen werden konnte, was gleichzusetzen ist mit einer hohen Vitalität. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine Kultivierung von mESC-Rx-GFP während der RPE-Differenzierung in einer 96-ULW Kultivierungsplatte ohne Medienwechsel über einen Zeitraum von 7 Tagen bedenkenlos möglich ist. Der Nachweis von toten Zellen durch PI zeigte sich vor allem in zentraleren Bereichen der Organoide. Ein definierter nekrotischer Kern, der bei der Überschreitung einer bestimmten Organoidgröße gebildet wird, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Vor allem in tiefer liegenden Zellschichten des Organoids ist die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr eingeschränkt, was vor allem im Zentrum des Organoides hypoxische Bedingungen hervorrufen kann ^{[333]; [334]}. Um zu definieren, ob sich Zelltrümmer oder tote Zellen im zentralen Bereich des mESC-Rx-GFP Organoids an DD7 befinden wurde ein Querschnitt von der Arbeitsgruppe Schröder (Universität Heidelberg) angefertigt und mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie analysiert (**Abbildung 21**).

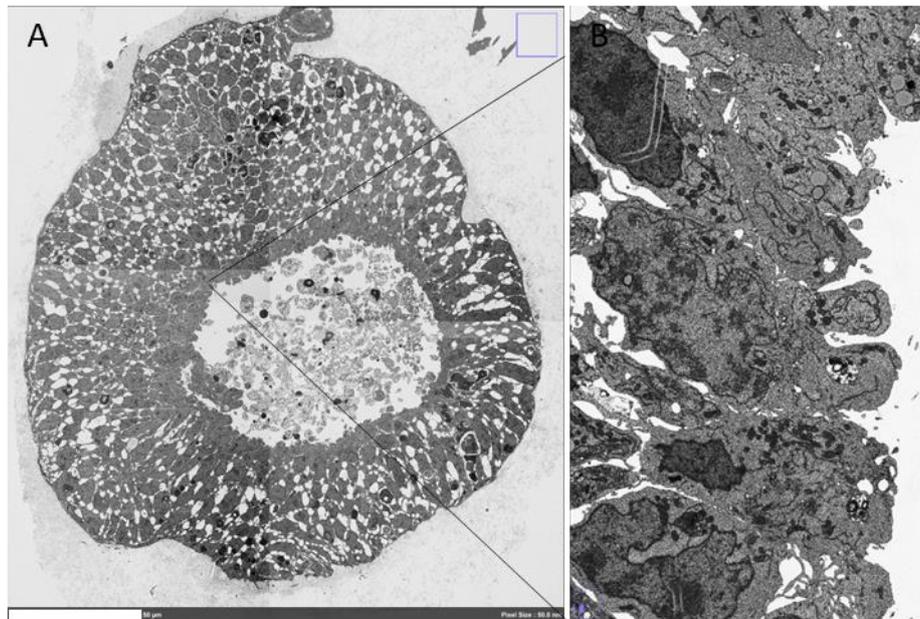


Abbildung 21 Querschnitt von mESC-Rx-GFP Organoiden an DD7 und Visualisierung der zellulären Strukturen mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops. Maßstab 50 μm ; Pixelgröße 50 nm.

Anhand des Querschnitts war deutlich zu erkennen, dass sich im zentralen Bereich der Organoide an DD7 ein Hohlraum gebildet hatte, in dem sich Zelltrümmer befinden. Die innere Zellschicht des Organoides wies zudem eine polarisierte Zellschicht, wie es für epitheliale Strukturen üblich ist, auf. Diese Ergebnisse können anhand der Literatur bestätigt werden. Zunächst homogene ESC-Aggregate weisen nach Beschreibungen von Eiraku und Sasai ab DD6 einen Hohlraum auf, der durch eine nach innen gerichtete apikale Oberfläche aus polarisierten N-Cadherin⁺-Neuroepithelien abgegrenzt wird ^{[52]; [276]}.

4.2.2.5 Analyse der Anzahl an RPE-Vorläuferzellen an DD11

Da aufgrund der heterogenen mESC- Kultur keine ganzheitliche Differenzierung der Zellen in RPE stattfinden kann ^[184], sollte die Reinheit und Effizienz der Differenzierung näher betrachtet werden. Die retinale Differenzierung der aus mESC-Rx-GFP generierten Organoide wurden zunächst an DD7 anhand des Rx-induzierten GFP Signals selektiert. An DD11 fand eine weitere Selektion der adhären kultivierten RPE-Vorläuferzellen statt. Bei der Selektion wurden weniger adhären Zellen mit Accutase™ entfernt. Accutase™ ist eine natürliche Enzymmischung mit proteolytischer Enzymaktivität, die verglichen mit Trypsin sanfter und weniger toxisch gegenüber den Zellen ist ^[287]. Die verbliebenen adhären Zellen der DD11 Kolonien konnten mit Trypsin-EDTA (0,25 %) abgelöst und die Zellzahl bestimmt werden. Für eine Fläche von 3,5 cm² wird eine Zellzahl von 1*10⁶ RPE-Vorläuferzellen benötigt. Da für die RPE-Differenzierung eine so hohe Dichte an Zellen eingesetzt werden muss, ist die Zellzahl der DD11 Selektion von großer Bedeutung für den Erfolg der Differenzierung. Die ermittelten Zellzahlen der RPE-Vorläuferzellen (n=15) wurden graphisch anhand eines Boxplots dargestellt (**Abbildung 22**). Der Median der an DD11 erhaltenen RPE-Vorläuferzellen belief sich auf 11,6*10⁵ Zellen. Allerdings zeigte sich eine große Diskrepanz zwischen den einzelnen Differenzierungen in der erhaltenen Zellzahl an RPE-Vorläuferzellen (Maximum: 16,6*10⁵ Zellen; Minimum: 1,9*10⁵ Zellen), was die Planung von Experimenten erschwerte.

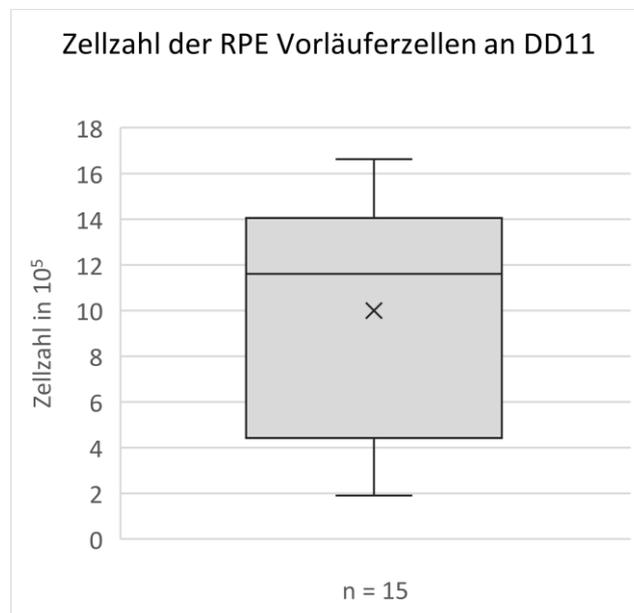


Abbildung 22: Bestimmung der Zellzahl von aus mESC-Rx-GFP gewonnenen RPE-Vorläuferzellen an DD11 der RPE-Differenzierung. In einer 96-ULW Kultivierungsplatte wurden aus je 3*10³ mESC-Rx-GFP Organoide generiert, die bis DD7 in einer SFEBq Kultur differenziert wurden. Die Organoide wurden an DD7 anhand ihres GFP-Signals selektiert und in einer 12-Well Kultivierungsplatte adhären bis DD11 differenziert. AN DD1 fand eine Selektion der RPE-Vorläuferzellen statt, indem weniger adhären Zellen mit Accutase™ entfernt wurden. Anschließend konnten die verbliebenen adhären RPE-Vorläuferzellen mit Trypsin-EDTA (0,25 %) abgelöst und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Die Zellzahl der abgelösten Zellen eines Stichprobenumfangs von 15 wurde graphisch in einem Boxplot dargestellt.

Andere Studien bestätigen, dass die geringe Effizienz der RPE-Differenzierung eine große Herausforderung darstellt ^[335], da das RPE aufgrund seiner frühen Entwicklung während des Lebens nur eine minimale Proliferation aufweist und anschließend im Ruhezustand verbleibt ^[336]. Laut Literatur beläuft sich die erforderliche Mindestzahl an Zellen, um *in vitro* einen konfluenten *Monolayer* an RPE mit epitheloider Morphologie zu bilden, auf 0,03 bis 3112 lebensfähige passagierte Zellen/mm² ^[337]. Zudem zeigte sich bei der Differenzierung von RPE aus mESC-Rx-GFP, dass das Passagieren von RPE ab DD18 ohne den Verlust der Zellidentität nicht mehr möglich war. Die Literatur bestätigt dieses Ergebnis, da auch das Passagieren von primär isolierten RPE-Zellen zum Verlust ihrer hexagonalen Morphologie führt ^[265]. Insbesondere das empfindliche RPE neigt dazu, seine epitheliale Morphologie in eine Fibroblasten-ähnliche zu wechseln. Dieser natürliche Prozess tritt in der Retina bei Beschädigung des RPEs auf, um vermehrungsfähige Zellen zu produzieren ^{[338]; [339]}. Neben der veränderten Zellmorphologie treten durch das Passagieren zudem Probleme wie der Verlust der Pigmentierung oder eine niedrige Zell-Substrat-Adhäsionsrate auf. Der finale Kultivierungsort des aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPEs musste deshalb bereits an DD11 determiniert werden. Um dieses Problem zu lösen gibt es bereits Ansätze, in denen Protokolle für die Differenzierung von RPE aus hiPSC entwickelt wurden, mit denen das differenzierte RPE unter Aufrechterhaltung seiner Charakteristika bis zu 13 Passagen kultiviert werden kann ^{[221][340]; [339]}. Das Aufrechterhalten der RPE Charakteristika ist essentiell, um die Funktionalität des RPEs auch *in vitro* gewährleisten zu können.

4.2.3 Charakterisierung des aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPEs

Das RPE hat verschiedene Funktionen in der Retina ^[148] und dem Choroid ^[157]. Dabei bildet das RPE eine dichte Barriere, um die Homöostase des okularen Systems aufrecht zu erhalten ^[188]. Die zwischen den RPE-Zellen befindlichen *Tight Junctions* kontrollieren den molekularen parazellulären Transport und gewährleisten die Barriereintegrität des RPEs ^[235]. Ein Verlust der Barriereintegrität ist der Ausgang für retinale Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration ^{[148]; [341]; [232]}. Wie im lebenden Organismus liegt das aus mESC-Rx-GFP differenzierte RPE nach Abschluss der Differenzierung an DD18 als Monolayer vor ^{[342] [42]}. Die Funktionalität des differenzierten RPEs und somit der Erfolg der mESC-Rx-GFP Differenzierung werden im Folgenden näher charakterisiert.

4.2.3.1 Viabilitätsanalyse des differenzierten RPEs mittels Lebend-/Tot-Färbung

Um die Zellviabilität des differenzierten RPEs zu untersuchen, wurden je $3 \cdot 10^3$ mESC-RxGFP in einer 96-ULW Kultivierungsplatte bis DD7 differenziert. Nach DD7 wurden die GFP-positiven Organoide aufgebrochen und als adhärenzte Kultur weiter differenziert. An DD11 fand eine Selektion der RPE-Vorläuferzellen statt, die anschließend bis DD18 in einer mit Laminin-beschichteten 96-Well

Kultivierungsplatte zu RPE differenziert wurden. An DD21 wurde bei dem differenzierten RPE ein Lebend-/Tot-Nachweis mit Calcein-AM (4 µg/ml (A3)) und PI (20 µg/ml (A2)) durchgeführt (**Abbildung 23**) und die Viabilität des RPEs bestimmt. Dazu wurde das RPE-M von den Zellen abgenommen und diese mit Calcein-AM und PI für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung wieder durch RPE-M ersetzt, um die Zellviabilität nicht negativ zu beeinflussen und das RPE konfokalmikroskopisch analysiert. Zusätzlich wurde der Prozentsatz an lebenden und toten Zellen quantitativ mit Hilfe der FIJI Software bestimmt (n=4).

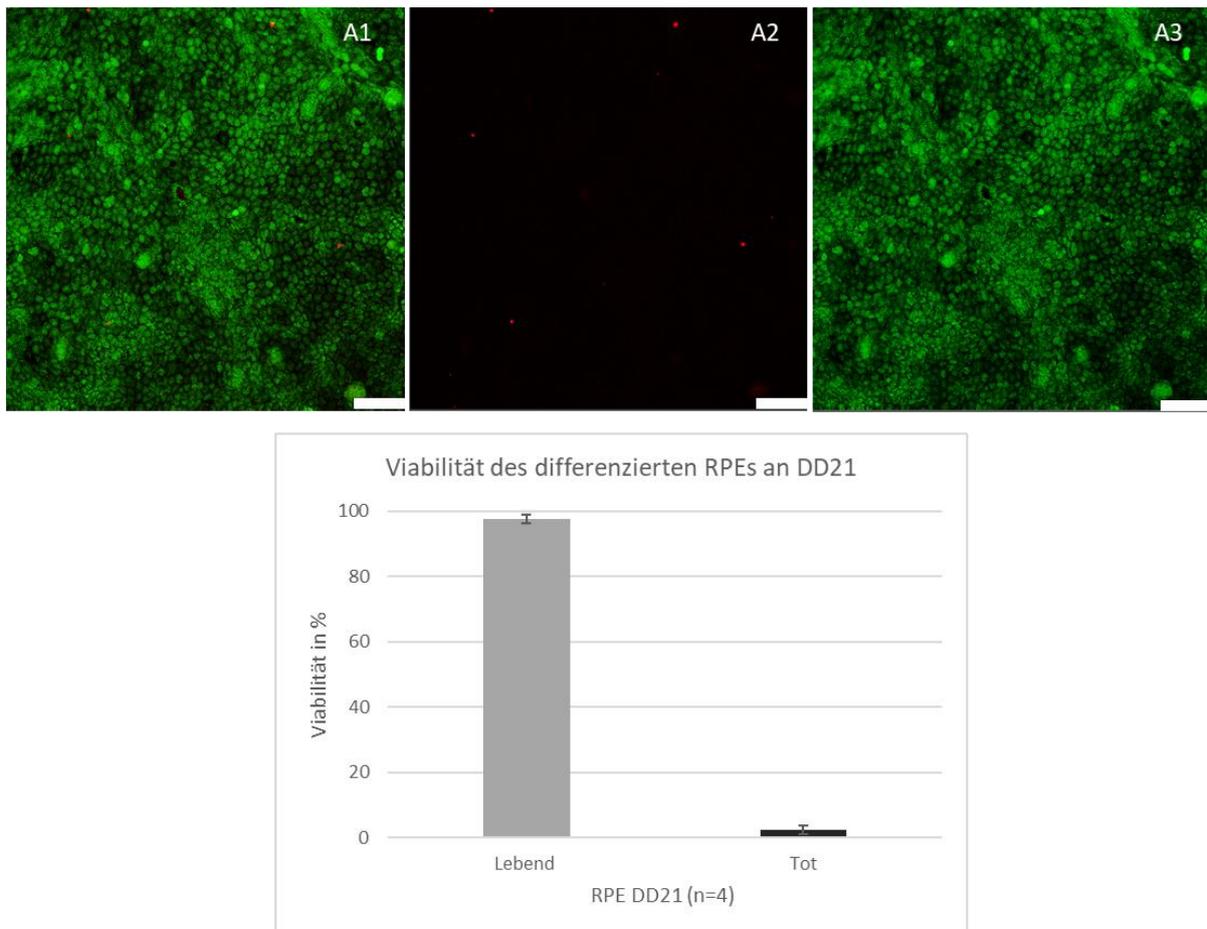


Abbildung 23: Analyse der Zellviabilität von differenziertem RPE an DD21 anhand einer Lebend-/Tot-Färbung. Dazu wurden je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in einer 96-ULW Kultivierungsplatte zum Generieren von Organoiden ausgebracht und bis DD7 differenziert. Die GFP-positiven Organoide wurden an DD7 aufgebrochen und auf eine mit Laminin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtete 12-Well Kultivierungsplatte überführt. An DD11 fand eine Selektion der RPE-Vorläuferzellen statt, indem weniger adhärenente Zellen enzymatisch entfernt wurden. Die $1 \cdot 10^6$ RPE-Vorläuferzellen wurden dann auf eine mit Laminin-beschichtete Kultivierungsoberfläche von $3,5 \text{ cm}^2$ überführt und bis DD18 durch Zugabe spezifischer Differenzierungsmedien zu RPE ausdifferenziert. An DD21 wurde die Viabilität der differenzierten RPE-Zellen analysiert, indem tote Zellen mit Hilfe von PI (20 µg/ml) visualisiert wurden (A2) und lebende Zellen durch Calcein (A3). Dazu wurden die Zellen für 30 min mit der Färbelösung inkubiert und diese anschließend durch RPE-M ersetzt. Es folgte eine konfokalmikroskopische Analyse des RPEs, wobei die Überlagerung der beiden Färbungen aus A2 und A3 in A1 dargestellt sind. Maßstab 100 µm. Carl Zeiss LSM8000 Konfokalmikroskop. Eine anschließende quantitative Auswertung mit einem Stichprobenumfang von n=4 folgte mit Hilfe der FIJI Software.

Nahezu alle differenzierten RPE-Zellen zeigten eine Umsetzung von Calcein-AM zu Calcein und damit eine quantitative Viabilität. Dabei konnten $97,67\% \pm 1,4$ der RPE-Zellen als lebend identifiziert werden. Nur vereinzelte Zellen ($2,33\% \pm 1,4$), die nicht in der RPE-Zellschicht integriert sind, waren nekrotisch. Dieses Ergebnis spricht für eine viable Zellschicht und damit für den Erfolg der Differenzierung von mESC-Rx-GFP zu RPE. Eine ähnlich hohe Viabilität des RPEs kann bei der Kultivierung der humanen RPE-Zelllinie ARPE19 durch die Literatur belegt werden ^[343].

4.2.3.2 Charakterisierung des differenzierten RPEs mittels Immunfluoreszenz

Im nächsten Schritt sollte das viable RPE auf seine Funktionalität untersucht werden. Das in der frühen Embryogenese entstandene RPE teilt seinen Ursprung mit weiteren Zelltypen und hat verschiedene Funktionen in der Retina. Um eine eindeutige Aussage über die Funktionalität des differenzierten RPEs treffen zu können, wurden RPE-Markerproteine untersucht. Die beste Möglichkeit zur Validierung funktionsfähiger RPE-Zellen stellt die Färbung von Proteinen dar, die einen integralen Bestandteil der entsprechenden RPE-Funktion aufweisen ^[219]. Daher wurde das aus mESC-Rx-GFP differenzierte RPE auf das Vorhandensein von Mitf, Otx2, RPE65, Pax6 sowie ZO-1 mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse überprüft. Mitf ist hoch konserviert und kodiert für einen Transkriptionsfaktor der Basic-Helix-Loop-Helix- und Leucin-Zipper-Familie (bHLH-LZ) ^[344]. Wie Studien belegen steuert Mitf maßgeblich die Entwicklung des RPEs und der Melanin produzierende Zellen (Melanozyten) ^{[345]; [346]}, weshalb die Abwesenheit von Mitf während der RPE-Entwicklung zu einer Vielzahl an Störungen führt. Keimbahnmutationen von Mitf sind unter anderem mit Albinismus, Mikrophthalmie, retinaler Degeneration und einem erhöhten Risiko für Melanome verbunden ^{[277]; [232] [346]; [14]}. Das Homöoboxprotein Otx2 ist ein weiteres wichtiges regulatorisches Gen, das sowohl im RPE als auch in den Photorezeptoren eine wichtige Rolle spielt. Dieser wichtige Transkriptionsfaktor wird im RPE lebenslang exprimiert ^{[347]; [348]}. Mutationen des Otx2-Gens führen zu Erkrankungen wie der retinalen Dystrophie und die Abwesenheit von Otx2 induziert in Mäusen die Entstehung retinaler Degenerationen ^{[348]; [349]; [323]; [14]; [346] [350][351]; [323]}. Zudem spielt neben Mitf und Otx2 auch das *Paired-box transcription factor 6*, Pax 6, eine wichtige Rolle in der RPE-Spezifikation zugeschrieben werden, da homozygote Mutationen des Pax6-Gens in Mäuse ein Fehlen der Augenanlagen nach sich zog ^{[352]; [14]; [346] [353] [354]; [323]}. Vor allem bei der Regeneration des Sehpigments im RPE spielt die Isomerhydrolase RPE65 eine entscheidende Rolle. Somit sind Mutationen des humanen RPE65 mit Erkrankungen wie der autosomal-rezessiven *Retinitis pigmentosa* assoziiert und gehen mit einer schnell einsetzenden Erblindung einher ^{[355] [356] [357]; [358] [356]}. Eine der wichtigsten Aufgaben des RPEs ist als oBRB das Aufrechterhalten der Barriereintegrität. Um die Barrierefunktion aufrechterhalten zu können sind die RPE-Zellen durch *Tight Junctions* verbunden, die den parazellulären Transport zwischen Blut und Retina regulieren. EZM-Proteine wie das *Zonula occludens-1* (ZO-1) sind sowohl im Epithel als auch im

Endothel aufzufinden und verankern den makromolekularen Junctinkomplex am zytoplasmatischen Aktin ^[198]. Eine Störung von ZO-1 im Epithel geht mit dem Verlust der Barrierefunktion einher, welche wiederum mit der Entstehung von schwerwiegenden retinalen Erkrankungen wie der AMD assoziiert ist ^{[198][359]; [198]; [360]}.

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in einer 96-ULW Kultivierungsplatte zu Organoiden differenziert. An DD7 wurden die Organoide anhand ihrer GFP-Expression selektiert und als adhärenzte Kultur auf mit Laminin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 12-Well Kultivierungsplatten bis DD11 differenziert. An DD11 wurden die RPE-Vorläuferzellen selektioniert und $1 \cdot 10^6$ dieser Zellen auf einer mit Laminin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Kultivierungsoberfläche von $3,5 \text{ cm}^2$ ausgebracht. Die RPE-Vorläuferzellen wurden anschließend bis DD18 zu RPE differenziert. An DD21 wurde das differenzierte RPE mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert (30 min; RT). Der Nachweis und die Lokalisierung spezifischer Antigene im RPE wurden durch den Einsatz von monoklonalen sowie polyklonalen Antikörpern ermöglicht, die mit Hilfe eines Konfokalmikroskops analysiert wurden (**Abbildung 24**). Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) sowie das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC ($0,1 \mu\text{M}$) visualisiert. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse konnten im differenzierten RPE die zentralen Regulatoren der *in vivo* RPE-Entwicklung, Mitf und Otx2, einschließlich des frühen Augenfeldentwicklungsmarkers Pax6, erfolgreich nachgewiesen werden. Obwohl für die Augenentwicklung Aktivitäten einer relativ großen Anzahl von Transkriptionsregulatoren erforderlich sind, werden laut Literatur Mitf, Otx2 und Pax6 als wesentlich für die RPE Differenzierung und Homöostase angesehen ^{[323]; [324]}. Anhand der Immunfluoreszenz wird ersichtlich, dass Otx2 und Mitf im Zellkern ko-lokalisiert sind, was durch die Literatur belegt werden kann. Pax6 ist ebenfalls im Nukleus der RPE-Zellen zu finden und kann laut Literatur mit dem Transkriptionsfaktor Mitf ko-lokalisiert werden ^{[361][323]}. Auch RPE65 konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz in den differenzierten RPE Zellen nachgewiesen werden. Die zytoplasmatische Lokalisation in RPE-Zellen der Maus konnte durch Studien gestützt werden. ^{[362]; [363]}. Auch das für die Barrierefunktion essentielle *Tight Junctions* Protein ZO-1 konnte durch Immunfluoreszenz im mESC-Rx-GFP differenzierten RPE nachgewiesen werden. Dabei war ZO-1 aufgrund der parazellulären Verbindung der RPE-Zellen am äußeren Bereich der Zellen zu finden. ^{[213]; [183]; [208]}

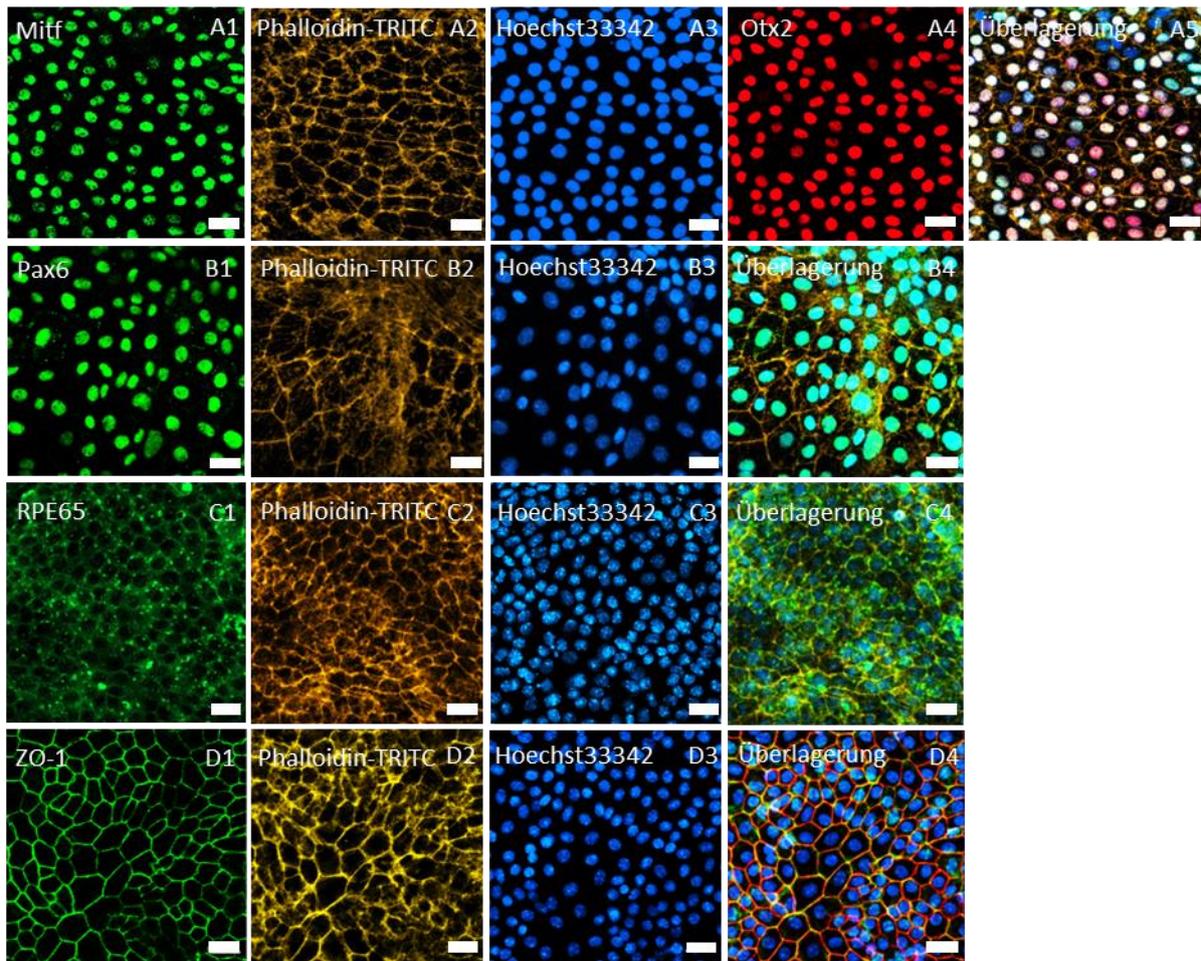


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung des differenzierten RPEs aus mESC-Rx-GFP. Dazu wurden je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in einer 96-ULW Kultivierungsplatte für das Generieren von Organoiden ausgebracht. Diese wurden an DD7 anhand ihres GFP-Signals selektiert, aufgebrochen und auf einer mit Laminin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 96-ULW Kultivierungsplatte differenziert. An DD11 wurden die adhärenen Kolonien auf die RPE Vorläuferzellen selektioniert und diese in einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen auf einer mit Laminin-beschichteten Kultivierungsfläche mit $3,5 \text{ cm}^2$ ausgebracht. Das ausdifferenzierte RPE wurde an DD21 mit Hilfe der Konfokalmikroskopie untersucht. Dazu wurde das differenzierte RPE mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert (30 min; RT). Zur Visualisierung der RPE spezifischen Marker Mitf (A1), Otx2 (A4), Pax6 (B1), RPE56 (C1) sowie ZO-1 (D1) wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zudem wurde das Aktinzytoskelett (A2; B2; C2; D2) durch Phalloidin-TRITC ($0,1 \mu\text{M}$) und die Zellkerne (A3; B3; C3; D3) mit Hilfe von Hoechst33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) visualisiert. Alle Signale wurden außerdem als Überlagerung (A5; B4; C4; D4) dargestellt. Maßstab $20 \mu\text{m}$ (B); $50 \mu\text{m}$. Carl Zeiss LSM8000 Konfokalmikroskop

4.2.3.3 Genexpressionsanalyse des differenzierten RPEs

Um die Funktionalität des differenzierten RPEs auf molekularbiologischer Ebene zu validieren, wurde die Genexpression charakteristischer RPE-Marker mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (quantitative Echtzeit (engl. *Real Time*)-Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*)) analysiert. Für die Genexpressionsanalyse wurden je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in einer 96-ULW Kultivierungsplatte ausgebracht, um innerhalb von 7 Tagen GFP-positive Organoide zu generieren. Diese Organoide wurden an DD7 aufgebrochen und auf einer mit Laminin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 12-Well

Kultivierungsplatte ausgebracht. An DD11 wurden die RPE-Vorläuferzellen durch eine Selektion aus den adhären Kolonien gewonnen und auf einer mit Laminin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 96-Well Kultivierungsplatte ausgebracht. Es wurden jeweils Triplikate erstellt, von welchen an DD18 und DD31 RNA (Ribonukleinsäure, engl. *ribonucleic acid*) mit Hilfe von TRIzol isoliert und anschließend in cDNA transkribiert wurde. Die gewonnene cDNA (komplementäre DNA, engl. *complementary desoxyribonucleic acid*) wurde für die relative Quantifizierung der Expression verschiedener Markergene in der RT-qPCR Analyse eingesetzt. Untersucht wurde die Genexpression von den in der Immunfluoreszenz nachgewiesenen (4.3.2.3) Transkriptionsfaktoren Otx2, Mitf, Pax6 sowie ZO-1. Zusätzlich dazu wurde die Genexpression von Mertk und PEDF bestimmt. Die Rezeptortyrosinkinase Mertk spielt im RPE eine wichtige Rolle bei der Phagozytose der äußeren Photorezeptorsegmente sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ^[364]. Eine unzureichende oder ineffiziente Phagozytose äußerer Photorezeptorsegmente verursachte bei Versuchstieren eine schnelle und vollständige Degeneration der Retina, was letztlich Erkrankungen wie die *Retinitis pigmentosa* und die AMD fördert, die mit einer Erblindung der Betroffenen einhergehen ^{[365]; [366]}. Auch verringerte Konzentrationen von *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF) in der Retina wurden mit mehreren retinalen Erkrankungen wie der AMD, diabetischer Retinopathie und neuroretinaler Dystrophie in Verbindung gebracht ^[367]. Dabei wird das Glycoprotein PEDF als Schutz vor oxidativem Stress vom RPE sekretiert ^[368] und verhindert die pathologische Invasion von Neogefäßen ^[203]. Die Genexpression des differenzierten RPEs aus mESC-Rx-GFP wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz eingesetzt und die Quantifizierung erfolgte zu den undifferenzierten mESC-Rx-GFP (=1). Als Positivkontrolle diente isoliertes RPE aus den Augen von C57BL/6 Mäusen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode ausgewertet und sind in **Abbildung 25** graphisch dargestellt.

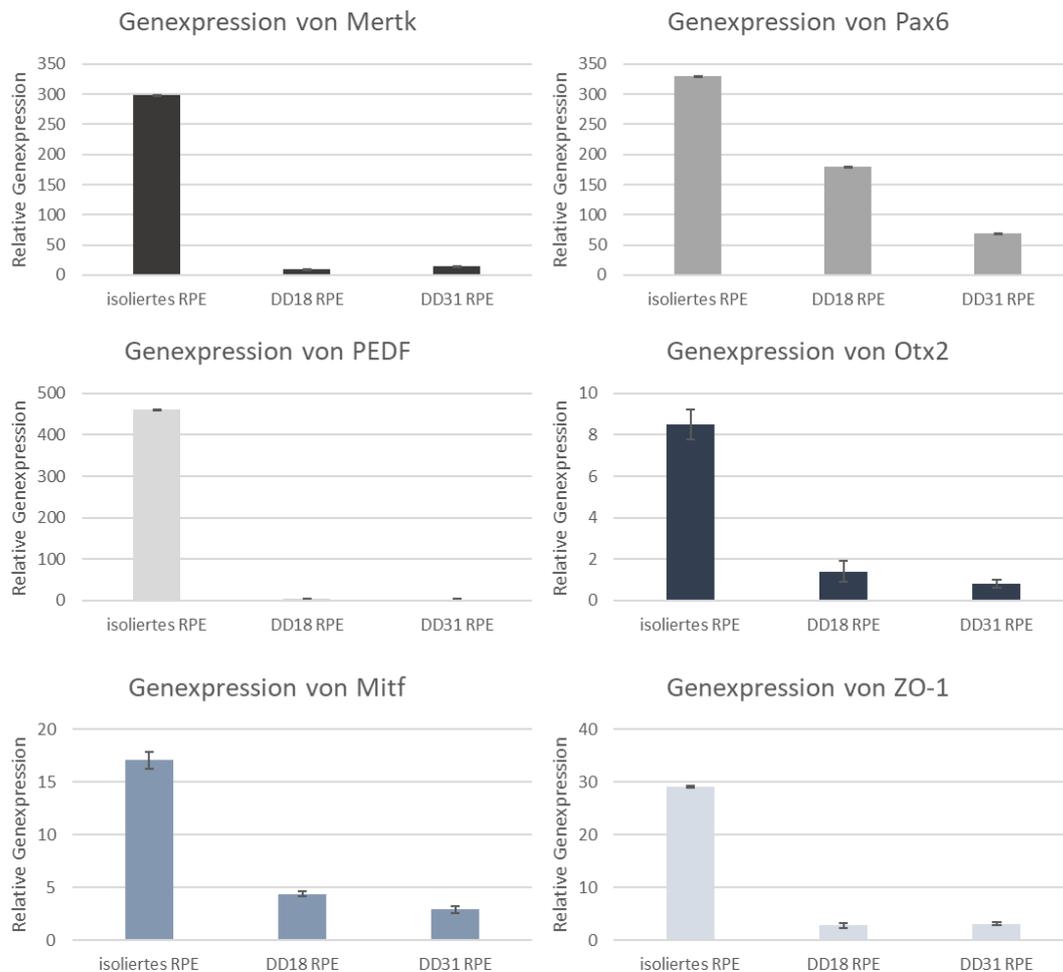


Abbildung 25: Analyse der relativen Genexpression charakteristischer RPE Marker mittels qPCR. Aus mESC-Rx-GFP wurde RPE differenziert, wobei die Zellen an DD11 auf einer Laminin-beschichteten 96-ULW Kultivierungsplatte ausgebracht wurden. An DD18 und DD31 wurde jeweils RNA von RPE-Triplikaten mittels TRIZOL isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte für die relative Quantifizierung mittels SYBRGreen in der qPCR Analyse eingesetzt werden. Untersucht wurde die Genexpression von den Transkriptionsfaktoren Otx2, Mitf, Pax6 sowie ZO-1. Zudem wurde die Genexpression von Mertk und PEDF bestimmt. Bei der Genexpressionsanalyse des differenzierten RPEs diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Haushaltsgen. Die Ergebnisse wurden in Relation zu den mESC-Rx-GFP betrachtet (=1). Als Positivkontrolle diente isoliertes RPE aus den Augen von C57BL/6 Mäusen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta Ct$ -Methode aus n=3 ausgewertet.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigten, dass alle untersuchten RPE-spezifischen Markerproteine durch die RT-qPCR nachgewiesen werden konnten. Zudem waren alle Proteine im Vergleich zu den undifferenzierten mESC-Rx-GFP hochreguliert, außer Otx2, welches an DD31 des differenzierten RPEs (DD31: $0,8 \pm 0,2$) herunterreguliert war. Im Vergleich zu dem isolierten RPE waren die Genexpressionswerte des differenzierten RPEs an DD18 und DD31 insgesamt deutlich herunterreguliert. Insbesondere bei Mertk und PEDF war die Genexpression im isolierten RPE (Mertk: $298,86 \pm 0,3$; PEDF: $461,4 \pm 0,3$) gegenüber der Genexpression im differenzierten RPE an DD18 (Mertk: $8,9 \pm 0,6$; PEDF: $3,7 \pm 0,2$) deutlich hochreguliert. Die Ergebnisse der Genexpression von RPE-charakteristischen Markern im aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPE konnten durch die Literatur

belegt werden, in der die Genexpression von murinen iPSC (DD0) mit iPS differenziertem RPE (iPS-RPE; DD29) und Kontroll-RPE aus 10 Tage alten Mäusen untersucht wurde. Auch hier wurde eine weniger starke Genexpression in dem differenzierten iPS-RPE verzeichnet als in dem isolierten RPE. ^{[369]; [370]; [353]} Besonders Mertk und PEDF wurden in dem differenzierten iPS-RPE geringer exprimiert als im isolierten RPE ^[42]. Verglichen mit der Genexpression des differenzierten RPEs aus mESC-Rx-GFP an DD18 konnte diese Beobachtung nicht belegt werden. Zwar war die Genexpression von Mertk im isolierten RPE höher als im differenzierten, allerdings nahm die Genexpression von DD18 zu DD31 zu. Der Unterschied der Genexpression von Mertk im isolierten RPE war sowohl zum differenzierten RPE an DD18 ($p=0,02$) als auch an DD31 ($p=0,018$) signifikant. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen Student-t Test mit $\alpha=0,05$. Auch bei ZO-1 war die Genexpression verglichen mit DD18 an DD31 hochreguliert. Bei allen anderen RPE-spezifischen Proteinen nahm die Genexpression von DD18 bis DD31 ab. Vor allem für Mitf und Pax6 wird durch die Literatur beschrieben, dass deren Genexpression *in vivo* während der RPE-Entwicklung hoch ist und mit zunehmender Maturierung abnimmt ^{[369]; [370]; [353]}. Insgesamt wurde die niedrigste Genexpression im isolierten RPE bei Otx2 identifiziert. Otx2 war im Vergleich zu den undifferenzierten mESC-Rx-GFP als einziges auch im differenzierten RPE an DD31 (relative Genexpression DD31: $0,8 \pm 0,2$) herunter reguliert. Im Vergleich zu der Literatur wird Otx2 in differenziertem iPS-RPE stark exprimiert, wenn auch geringer als im isolierten RPE. Sofern im mESC-Rx-GFP differenzierten RPE eine Genexpression auch über die Zeit nachweisen lässt, steht die gegenüber den mESC-Rx-GFP herunterregulierte Genexpression nicht in Zusammenhang mit Krankheitsbildern ^[347]. *In vivo* wird Otx2 ab der mittleren RPE-Entwicklung über die gesamte Lebensdauer exprimiert ^[371]. Neben dem RPE spielt Otx2 eine wichtige Rolle in den Photorezeptoren. ^[371] Das differenzierte RPE steht nicht, wie *in vivo*, mit den Photorezeptoren in Kontakt, was die geringere Genexpression hervorrufen könnte. Die höchste Genexpression konnte bei PEDF im isolierten RPE verzeichnet werden (isoliertes RPE: $461,4 \pm 0,3$). Dafür war der Unterschied zur Genexpression von PEDF im differenzierten RPE am größten (DD18: $3,7 \pm 0,2$; DD31: $2,6 \pm 0,4$). Eine insgesamt wurde im Vergleich zu den anderen untersuchten RPE-Markern eine hohe Genexpression bei Pax6 identifiziert. Die Genexpressionswerte von ZO-1 waren vergleichsweise gering gegenüber den anderen untersuchten Markern. Dennoch war bei ZO-1 im differenzierten RPE eine Hochregulierung der Genexpression an DD31 gegenüber DD18 nachzuweisen, (DD18: $2,8 \pm 0,4$; DD31: $3,1 \pm 0,3$) was für eine zunehmende Barriereintegrität des RPEs über die Zeit spricht ^[197]. Da mit Hilfe der Genexpressionsanalyse alle RPE-charakteristischen Marker in den aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPE-Zellen nachgewiesen werden konnten, konnte die erfolgreiche RPE Differenzierung validiert werde. Damit ist das differenzierte RPE auch *in vitro* in der Lage, alle Funktionen des murinen RPEs *in vivo* auszuführen.

4.3 Etablierung des retinalen Endothels

Unterhalb des RPEs befindet sich, getrennt durch die Bruch's Membran ^[158], das Choroid ^[160]. Das Choroid ist das gefäßreichste Gewebe im Auge, welches für die Versorgung der äußeren Retina verantwortlich ist ^[372]. In der oBRB ist das Choroid, anders als bei anderen Barrieren im Körper, aufgrund seines fenestrierten Endothels nicht für die selektive Permeabilität der Barriere verantwortlich. Auch im Gehirn ist eine ähnliche choroidale Struktur, die als *Plexus choroideus* bezeichnet wird, zu finden, die aus stark vaskularisierten Epithelgewebemassen mit fenestrierten Blutgefäßen besteht und als physische Barriere dient, um den Eintritt toxischer Metaboliten in das Gehirn zu verhindern ^[373]. Das Choroid dient als Abgrenzung des Blutstroms zum retinalen Gewebe, dessen Innenwände von vaskulärem Endothel ausgekleidet werden ^{[165]; [374] [156]}. Dabei sind die polaren Endothelzellen an einer 80 nm dicken Basallamina verankert ^[375]. Vor allem in der Pathophysiologie degenerativer retinaler Erkrankungen wie der AMD spielt das Choroid eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisierung ^[157]. Wichtige grundlegende Informationen ^[157] über die Funktion des Choroids und dessen assoziierte Krankheitsbilder werden durch *in vitro* Studien bereitgestellt ^[376]. Für die *in vitro* Rekonstruktion des murinen Endothels wurden in dieser Arbeit primäre retinale mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem B129S2/SvPasCrl Mausstamm verwendet. Die Morphologie der retinalen Endothelzellen (REC) ist in **Abbildung 26** zu erkennen.

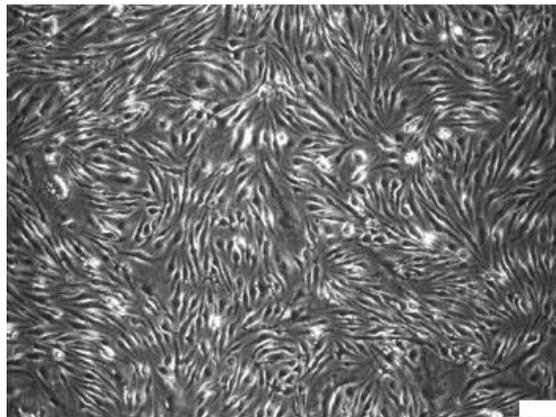


Abbildung 26: Morphologie der primären retinalen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem B129S2/SvPasCrl Mausstamm (REC) in einer mit 0,1 % Gelatine beschichteten T25 Kultivierungsflasche nach 7 Tagen. Maßstab 200 µm. Phasenkontrastaufnahme: Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED

Per Definition sind primäre Zellen direkt aus einem Gewebe isolierte, terminal differenzierte Zellen, welche anschließend *in vitro* weiter kultiviert wurden ^[296]. Primäre Zellen bieten den Vorteil eines physiologischen Zellverhaltens, während sie unter kontrollierbaren Konditionen kultiviert werden können ^{[377] [378]}. Da die Lebensdauer der Zellen aufgrund der Telomerverkürzung pro Zellteilung begrenzt ist, ^[379] wurden die REC in dieser Arbeit ausschließlich bis Passage 7 verwendet.

4.3.1 Einfluss der Beschichtung auf das Wachstum und die Adhäsion bei REC

Für die Etablierung des retinalen Endothels spielt vor allem die Adhäsion der Endothelzellen auf der Kultivierungsoberfläche eine wichtige Rolle ^[38]. Die meisten Zellen müssen an die EZM binden, um zu überleben und zu proliferieren, weshalb EZM-Proteine eine wichtige Rolle bei der Adhäsion spielen ^[380]. Die EZM besteht aus Polysacchariden und Proteinen wie Laminin ^[381], Fibronectin ^[382], Elastin ^[43] oder Kollagen ^[383] ^[38]; ^[37]; ^[384]. Einzelne Matrixkomponenten (z. B. Kollagene, Fibronektine, Laminine) werden seit vielen Jahren in der Zellkultur verwendet und haben nachweislich tiefgreifende Auswirkungen auf Zellen, sowohl in Bezug auf die Adhäsion als auch auf das Überleben und die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen ^[385]. Deshalb wurde zunächst die Zelladhäsion der REC auf unterschiedlichen Kultivierungsoberflächen in einer 2D Zellkultur analysiert. Da eine 2D Zellkultur die gewebespezifischen Eigenschaften und Funktionen vieler Zelltypen nicht vollständig rekapitulieren kann, sollen die Zellen anschließend in einem Organ-on-chip System in einer 3D Mikroumgebung kultiviert werden ^[18]. Der vasQchip ist ein Organ-on-chip System der durch die Geometrie des halbrunden Mikrokanals ein artifizielles Blutgefäß nachbildet. Das umgebende Kompartiment dient zur Kultivierung von organotypischen 3D Geweben, wobei eine poröse Polycarbonat (PC)-Membran als Basalmembran des Blutgefäßkanals fungiert. Diese poröse Grenzfläche erlaubt einen Austausch zwischen den Zellen der unterschiedlichen Kompartimente ^[386]. Um die Ergebnisse der Beschichtung später auf den Mikrokanal des vasQchips übertragen zu können, wurde in die Zellkulturwells die unporöse PC-Membran mit biokompatiblen Klebeband flächendeckend eingebracht. Polycarbonat findet aufgrund seiner Biokompatibilität in vielen kommerziell erhältlichen Kultivierungssystemen in Form einer Grenzfläche Anwendung ^[387]; ^[125]. Die mit PC-Membran ausgekleideten Wellböden einer 24-Wellkultivierungsplatte wurden mit unterschiedlichen EZM-Proteinen über einen Zeitraum von 1 h inkubiert. Dabei wurde die Adhäsion der REC auf der vom Hersteller empfohlenen *Speed Coating* Lösung mit Gelatine (2 mg/cm²), Laminin (2 µg/cm²), Kollagen I (20 µg/cm²), Fibronectin (5 µg/cm²) und Vitronectin (1 µg/cm²) verglichen (**Abbildung 27**). Je 3*10⁴ REC wurden pro Well für 72 h inkubiert, um den Zellen Zeit für die Adhäsion und Proliferation zu geben. Anschließend wurden die REC mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min, RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden das *Tight Junction* Protein ZO-1 in den REC mit Hilfe der Immunfluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen. Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 µM) visualisiert. Eine unbeschichtete PC-Membran sowie Wellböden ohne PC-Membran dienten als Kontrolle bei dem Vergleich der Adhäsion von REC auf unterschiedlichen Oberflächen (**Abbildung 28** **Abbildung 27**).

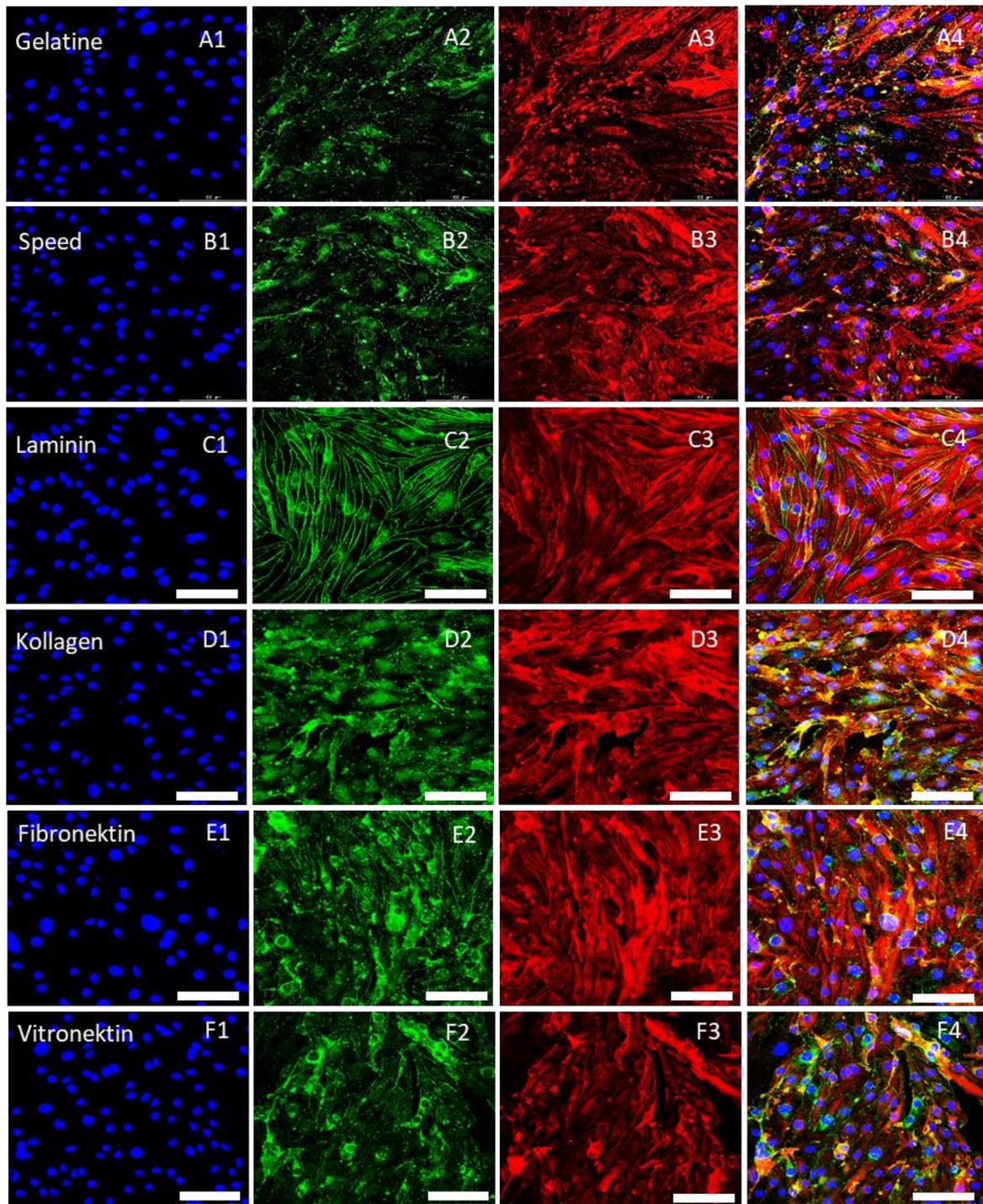


Abbildung 27: Immunfluoreszenzanalyse der Adhäsion von REC auf unterschiedlichen ECM-Proteinen als Matrix. Die Wellböden einer 24-Wellkultivierungsplatte wurden mit einer PC-Membran ausgekleidet und mit unterschiedlichen ECM-Proteinen über einen Zeitraum von 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die eingesetzten Beschichtungsproteine waren Speed Coating Solution (0,2 % Gelatine; A), Gelatine (2 mg/cm²; B), Laminin bei (2 µg/cm²; C), Kollagen I (20 µg/cm²; D), Fibronektin (5 µg/cm²; E) und Vitronektin (1 µg/cm²; F). Nachdem je 3*10⁴ Zellen pro Well in RECM eingebracht wurden, konnten diese nach einer Kultivierungsdauer von 72 h mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert und mit 0,1 % Triton-X für 4 min bei RT permeabilisiert werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen mit CasBlock für 30 min bei RT behandelt. ZO-1 wurde in den REC mit Hilfe der Immunfluoreszenz visualisiert (A2-F2). Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml; A1-F1) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 µM; A3-F3) visualisiert. Anschließend wurde die Adhäsion der REC auf der PC-Membran konfokalmikroskopisch untersucht. Maßstab 100 µm. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5

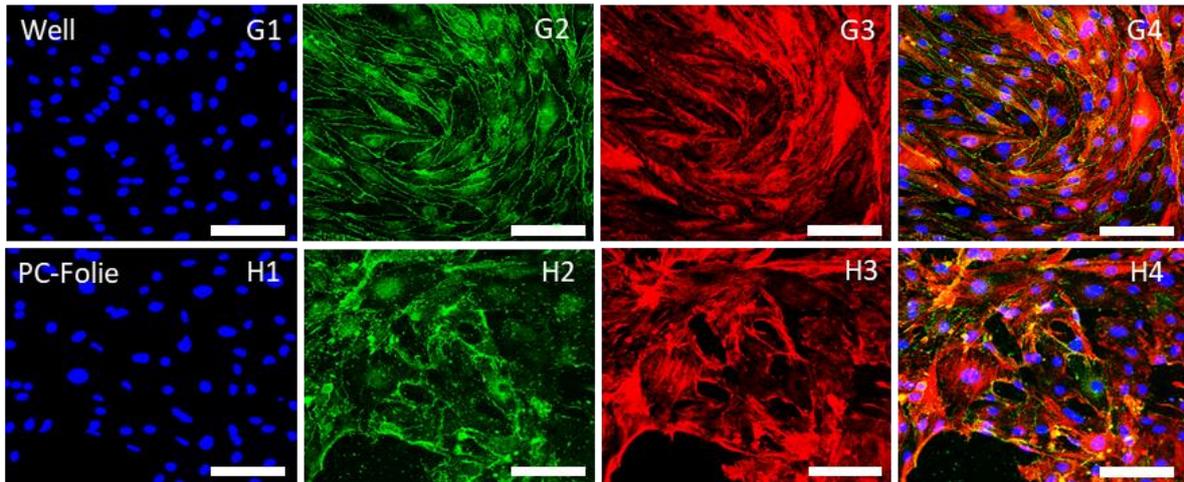


Abbildung 28: Immunfluoreszenzanalyse der Adhäsion von REC auf unbeschichteter Matrix. Nachdem je $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in RECM eingebracht wurden, konnten diese nach einer Kultivierungsdauer von 72 h mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert und mit 0,1 % Triton-X für 4 min bei RT permeabilisiert werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen mit CasBlock für 30 min bei RT behandelt. ZO-1 wurde in den REC mit Hilfe der Immunfluoreszenz visualisiert (G2-H2). Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; G1-H1) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 μM ; G3-H3) visualisiert. Anschließend wurde die Adhäsion der REC auf der PC-Membran konfokalmikroskopisch untersucht. Der unbeschichtete Wellboden (G) diente als Positivkontrolle und die unbeschichtete PC-Membran (H) als Negativkontrolle. Maßstab 100 μm . Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5

Die Adhäsion der REC konnte auf allen EZM-beschichteten Oberflächen beobachtet werden. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Konfluenz des Zelllayers. Der Zelllayer auf der unbeschichteten PC-Membran als Negativkontrolle (Abbildung H1 - H4) erschien wie zu erwarten inkonsistent. Bei einer Oberflächenbeschichtung mit Laminin (Abbildung C1 - C4) konnten die Zellen ähnlich dicht wachsen wie bei der Positivkontrolle im Well (Abbildung G1 - G4). Laminine sind Glykoproteine mit trimerer Struktur, die aus drei verschiedenen Ketten bestehen und *in vivo* an der Zelladhäsion verschiedener Zelltypen, einschließlich Epithelzellen, beteiligt sind ^[388]. Dieses Ergebnis wird durch die Literatur bestätigt, indem verfügbare Studien die Bedeutung von Lamininen bei der retinalen Gefäßentwicklung der Maus zeigen ^[389]. Auch die Oberflächenbeschichtung mit Fibronectin (Abbildung E1 - E4) gewährleistete eine homogene Adhäsion und Proliferation der REC. Fibronectin ist ähnlich wie Kollagen in einem fibrillären Netz angeordnet und mit Zelloberflächenrezeptoren (Integrinen) verbunden und spielt eine Schlüsselrolle bei der Zelladhäsion und bei Wundheilungsreaktionen. ^[388]. Dieses Ergebnis wird durch die Literatur bestätigt, indem demonstriert wurde, dass Fibronectin eine fördernde Wirkung auf die Adhäsion und Proliferation humaner retinaler Endothelzellen hat ^[67] und für die Migration von kapillären Endothelzellen der Rinderretina erforderlich ist ^[390]. Zudem konnte in Studien beobachtet werden, dass die Proliferations- und Migrationsrate von HUVEC auf einer mit Kollagen- oder Fibronectin beschichteten Oberfläche signifikant erhöht werden konnte ^[391]. Bei der Adhäsion von murinen REC erwies sich Kollagen I zwar als gute Beschichtung, wies aber in einer 2D Kultur vergleichsweise einen weniger homogenen Zelllayer auf, obwohl das Kollagen durch die

fibrilläre Anordnung den Zellen strukturelle Integrität bietet ^[392] Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein im Körper mit über 30 verschiedenen Kollagentypen und die vorherrschende Form von Strukturproteinen in der EZM ^[388]. Die auf Vitronektin (Abbildung F1 – F4) kultivierten REC wiesen den am wenigsten homogenen Zellschicht auf. Vitronektin ist ein Glycoprotein der EZM und fördert *in vivo* die Zelladhäsion und -proliferation durch das Binden von Integrinen ^[393]. Insgesamt war anhand der Immunfluoreszenzfärbung festzustellen, dass murine REC unterschiedlich gut auf EZM beschichteten Oberflächen adhären und dabei der *Tight Junction* Marker ZO-1 unterschiedlich stark in den Zellen nachweisbar ist. Diese Feststellung korreliert mit anderen Studien die beschreiben, dass schon geringe Unterschiede in der EZM-Zusammensetzung verschiedener Gewebe die zellulären Interaktionen beeinflussen können ^{[385][207]; [209]}. Die REC der Kontrolle (Abbildung G1 – G4) und die der Lamininbeschichtung (Abbildung C1 – C4) wiesen die am definiertesten *Tight Junction* Strukturen auf. Obwohl die Adhäsion der REC auf der Speed Coating Lösung (Abbildung B1 – B4) oder Gelatinebeschichtung (Abbildung A1 – A4) vergleichsweise gut war, war die Intensität der *Tight Junction* Proteine vergleichsweise schwach ausgeprägt. Dieses Ergebnis korreliert mit anderen Studien über die Adhäsion von Endothelzellen. Wie die Literatur belegt, wiesen Endothelzellen wie HUVEC neben Fibronektin und Kollagen auch eine gute Adhäsion und Proliferation auf Gelatine im Vergleich zu unbeschichtetem Kunststoff auf ^[394]. Gelatine ist ein molekulares Kollagenderivat, das aus irreversibler Denaturierung von Kollagenproteinen gewonnen wird und Zelladhäsionsstellen wie RGD-Peptidsequenzen liefert ^{[395][396]}. Aufgrund der Immunfluoreszenzergebnisse wurde für die Standardkultivierung der REC weiterhin die vom Hersteller empfohlene Speed Coating Lösung zum Beschichten der Kultivierungsflaschen verwendet. Für die Beschichtung der PC-Membran wurde anhand der Zelladhäsion und -proliferation von REC in 2D sowie der mit der Kontrolle vergleichbar stark ausgeprägten *Tight Junctions* Laminin gewählt.

4.3.2 Einfluss der Beschichtung auf die Genexpression spezifischer Marker bei REC

Um die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzanalyse bezüglich der endothelialen Adhäsionsfähigkeit auf unterschiedlichen EZM-Beschichtungen zu stützen, wurde die Genexpression einzelner Junction Proteine mit Hilfe der quantitativen RT-PCR bestimmt. Mehrere *Tight Junctions*-assoziierte Proteine werden mit verschiedenen Signal- und Transkriptionswegen in Verbindung gebracht, welche die Zellproliferation, Differenzierung und Genexpression modulieren ^[150]. In der Genexpressionsanalyse der REC wurden ZO-1, CD31 (PECAM) und VE-Cadherin untersucht. Das *Tight Junction* assoziierte Protein ZO-1 ist ein Transmembranprotein, das mit dem Aktinzytoskelett verknüpft ist und eine wichtige Rolle in der Barriereintegrität und -selektivität des Endothels spielt ^{[397][198]}. Das *Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM), auch bekannt als CD31, ist ein Glykoprotein, das zu den *Tight Junction* assoziierten Proteinen zählt und stark an Endothelzell-Zell-Verbindungen

exprimiert wird ^[398]. Das *Adherens Junction* Protein VE-Cadherin ist ein spezifisches Adhäsionsmolekül der Endothelzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in vaskulären Blutgefäßen ^{[210]; [212]}. Für die Genexpressionsanalyse wurde eine 24-Well Kultivierungsplatte mit einer unporösen PC-Membran ausgekleidet, um die Ergebnisse von der 2D Zellkultur auf den vasQchip übertragen zu können. Die Wellböden wurden mit unterschiedlichen EZM-Proteinen über einen Zeitraum von 1 h inkubiert. Verglichen wurde die Genexpression der *Tight Junctions* von REC auf der vom Hersteller empfohlenen *Speed Coating* Lösung mit Gelatine (2 mg/cm²), Laminin (2 µg/cm²), Kollagen I (20 µg/cm²), Fibronectin (5 µg/cm²) und Vitronectin (1 µg/cm²). Je 3*10⁴ Zellen wurden in RECM pro 24-Well in Triplikaten ausgebracht. Nach einer Kultivierungsdauer von 72 h wurde die RNA der REC mittels TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Die cDNA konnte dann für die relative Quantifizierung in der fluoreszenzbasierten RT-qPCR eingesetzt werden. Als Haushaltsgen diente GAPDH, wobei die Quantifizierung in Relation zu dem Wachstum der REC auf der vom Hersteller empfohlenen *Speed Coating* Lösung erfolgte (=1). Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet und sind in **Abbildung 29** graphisch dargestellt.

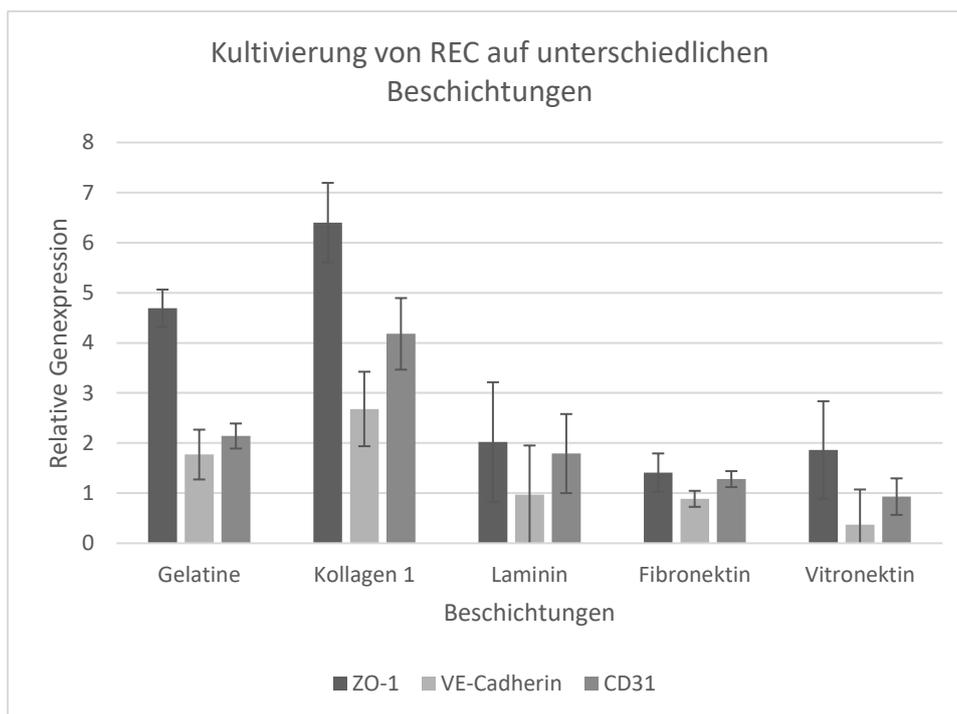


Abbildung 29: Relative Genexpression von REC auf unterschiedlichen EZM beschichteten PC-Membranen. Für die Genexpressionsanalyse wurde eine 24-Wellkultivierungsplatte mit PC-Membran ausgekleidet und die Wellböden mit unterschiedlichen EZM-Proteinen über einen Zeitraum von 1 h inkubiert. Die eingesetzte Konzentration von Gelatine lag bei 2 mg/cm², die für Laminin bei 2 µg/cm², die für Kollagen I bei 20 µg/cm², die für Fibronectin bei 5 µg/cm² und die von Vitronectin bei 1 µg/cm². 3*10⁴ Zellen in RECM wurden pro 24-Well auf den unterschiedlichen Beschichtungen in Triplikaten ausgebracht. Nach einer Kultivierungsdauer von 72 h wurde die RNA der REC mittels TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte dann für die relative Quantifizierung in der RT-qPCR mittels SYBRGreen eingesetzt werden. Näher betrachtet wurde die Genexpression von ZO-1, CD31 (PECAM) und VE-Cadherin. Als Haushaltsgen diente dabei GAPDH. Die Quantifizierung erfolgte in Relation auf das Wachstum der REC auf der vom Hersteller empfohlenen *Speed Coating* Lösung (=1). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode aus n=3 ausgewertet

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass eine Beschichtung der PC-Membran die Genexpression einzelner *Junction* Proteine der REC beeinflusst. Im Vergleich zu der vom Hersteller empfohlenen *Speed Coating* Lösung (=1) war die Genexpression von ZO-1 bei allen Beschichtungen erhöht und insbesondere bei Kollagen I hochreguliert (Kollagen I: $6,4 \pm 0,79$). Auch im Vergleich zu den anderen *Tight Junction* Proteinen VE-Cadherin und CD31 war ZO-1 am stärksten exprimiert. Bei einer Beschichtung mit Laminin ($0,97 \pm 0,98$), Fibronektin ($0,88 \pm 0,15$) oder Vitronektin ($0,37 \pm 0,7$) war VE-Cadherin gegenüber der *Speed Coating* Lösung herunterreguliert. Bei einer Beschichtung mit Gelatine ($1,77 \pm 0,49$) oder Kollagen I ($2,68 \pm 0,74$) war die Genexpression von VE-Cadherin erhöht. Die Genexpression von CD31 war auf einer mit Gelatine- ($2,14 \pm 0,24$), Kollagen I- ($4,18 \pm 0,71$), Laminin- ($1,79 \pm 0,78$) und Fibronektin- ($1,28 \pm 0,15$) beschichteten Oberfläche hochreguliert. Nur bei einer Beschichtung mit Vitronektin ($0,93 \pm 0,36$) wurde die Genexpression von CD31 im Vergleich zur *Speed Coating* Lösung runterreguliert. Insgesamt wies die Kollagen I- Beschichtung die höchste Genexpression aller *Junction* Proteine auf und somit die am stärksten ausgeprägten die Zell-Zell Verbindungen. Allerdings gibt die Genexpressionsanalyse der *Junction* Markerproteine keinen direkten Aufschluss über die Qualität der Zelladhäsion ^[399]. Da eine hohe Zelladhäsion relevant für die Ausbildung vaskulärer Blutgefäße ist ^[375], wurde diese anhand einer Immunfluoreszenzfärbung in Kapitel 4.3.1 untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Laminin die am stärksten ausgeprägten Zell-Zell-Verbindungen aufweist, was durch die Genexpressionsanalyse aber nicht belegt werden konnte. Allerdings verankern *Tight Junctions in vivo* das Endothel an der Basalmembran, um der Mechanotransduktion und den Scherstress im Blutgefäß standzuhalten, wobei die integrale endotheliale Basalmembran-Komponente, Laminin 511 (Laminin $\alpha 5$), für die Scherererkennung von zentraler Bedeutung ist ^[400]. In Bezug auf die Barrierefunktion des Endothels eignet sich eine Beschichtung mit Kollagen I für die Kultivierung von Endothelzellen, wie die Literatur belegt ^{[391]; [210]; [398]} In der oBRB ist ein funktionsfähiges Endothel mit *Tight Junctions* essentiell. Eine hohe Expression der *Tight Junction* Proteine ist jedoch nicht zu erwarten, da eine Barrierefunktion des Choroids nicht wünschenswert ist ^[198]. Insgesamt stellten sich anhand der gemessenen Genexpression Kollagen I und Gelatine als geeignete Kandidaten für eine Beschichtung der PC-Membran dar. Da sich in der Immunfluoreszenzanalyse Laminin als geeignete Beschichtung für REC identifizieren ließ, sollte eine Entscheidung bezüglich der Beschichtung anwendungsspezifisch getroffen werden. Für die Standardkultivierung der REC wurde weiterhin die vom Hersteller empfohlene *Speed Coating* Lösung zum Beschichten der Kultivierungsflaschen verwendet.

4.4 Etablierung der oBRB im Transwell

Im Auge formt das RPE zusammen mit dem Choroid und der dazwischen befindlichen Bruch-Membran die äußere Blut-Retina-Schranke (oBRB). Diese selektive Barriere reguliert den Transport von

Nährstoffen und gelösten Stoffen zwischen der Retina und dem sub-retinalen Raum und hält damit die Homöostase des Auges aufrecht ^{[145]; [374]; [165][401]}. Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurden das RPE nach der erfolgreichen Differenzierung von mESC-Rx-GFP sowie das etablierte retinale Endothel ko-kultiviert. Als Vorstufe zum vaskularisierten Modell wurde die oBRB im Transwell etabliert.

4.4.1 Bestimmung eines geeigneten Kultivierungsmediums

Für die Differenzierung des RPEs wurden verschiedene Differenzierungsmedien benötigt, die sich aber vom Kultivierungsmedium der REC unterschieden. Für die Ko-Kultivierung von RPE und REC musste daher ein geeignetes Kultivierungsmedium identifiziert werden, das die Funktionen und Charakteristika der jeweiligen Zellen nicht beeinträchtigt ^{[402]; [297]}. Da primäre Zellen einfacher zu kultivieren sind als differenzierte Stammzellen, wurde das Wachstum von REC in unterschiedlichen Kultivierungsmedien untersucht. Dazu wurden in einer mit *Speed Coating* beschichteten 24-Well Kultivierungsplatte je $7 \cdot 10^4$ REC als Triplikate ausgebracht und in RECM, in den RPE-Differenzierungsmedien RMM2 und RPE-M sowie in DMEM über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. Das für die Standardkultivierung der REC eingesetzte RECM diente als Positivkontrolle und DMEM aufgrund seiner Zell-unspezifischen Zusammensetzung als Negativkontrolle. Die REC wurden jeweils an den Tagen 1, 3 und 7 mit Trypsin-EDTA (0,25 %) abgelöst und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Ob das entsprechende Medium neben der Adhäsion und dem Wachstum auch die Morphologie der REC beeinflusst wurde mikroskopisch bestimmt (**Abbildung 30**). Zudem wurden, im Hinblick auf eine spätere Übertragbarkeit des murinen oBRB Modells auf ein humanes Modellsystem, das Verhalten von HUVEC in unterschiedlichen Kultivierungsmedien analysiert. In dem humanen oBRB Modell sollen HUVEC mit ARPE19 Zellen ko-kultiviert werden. Deshalb wurden humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC), im gleichen Vorgehen wie die REC in einer 24-Well Kultivierungsplatte ohne Beschichtung ausgebracht und die Zellzahl jeweils an den Tagen 1, 3 und 7 bestimmt. Im Gegensatz zu den choroidalen Endothelzellen die ein fenestriertes Endothel besitzen, weisen HUVEC ein kontinuierliches Endothel auf ^{[396]; [163]; [403]}. Neben den murinen RPE-Differenzierungsmedien RMM2 und RPE-M wurden HUVEC in ARPE-M untersucht, da dies für die Kultivierung der humanen RPE-Zelllinie ARPE19 eingesetzt wird. Das standardmäßig bei der Kultivierung von HUVEC eingesetzte EGM2 diente als Positivkontrolle, während die Kultivierung in DMEM als Negativkontrolle angesehen wurde.

Die REC konnten über einen Zeitraum von 7 Tagen in allen Medien kultiviert werden. In RECM verdoppelte sich die Zellzahl der REC nach einer leichten Abnahme an Tag 1 innerhalb von 7 Tagen (Tag 7: 190 % \pm 1,37). In der Negativkontrolle DMEM zeigte sich zwar das geringste Proliferationsverhalten (Tag 7: 159,4 % \pm 1,77) der REC über die Zeit, trotzdem war ein Anstieg zu verzeichnen. In dem RPE-Differenzierungsmedium RMM2 von DD13 (Tag 7: 175 % \pm 0,9) konnten die REC adhären und

prolifrieren, allerdings nur minimal besser als in der Negativkontrolle. Eine Proliferation der Endothelzellen ist in soweit konstruktiv, bis sich ein konfluentes Endothel ausgebildet hat ^[385]. Das Kultivierungsmedium das sich zur Ko-Kultivierung der REC nach dem RECM am besten eignete war RPE-M (Tag 7: 186,8 % ± 0,38), in dem sich die REC fast identisch wie im RECM verhielten. Im Vergleich zu den REC reagierten die HUVEC sensibler auf die neuen Kultivierungsumgebungen.

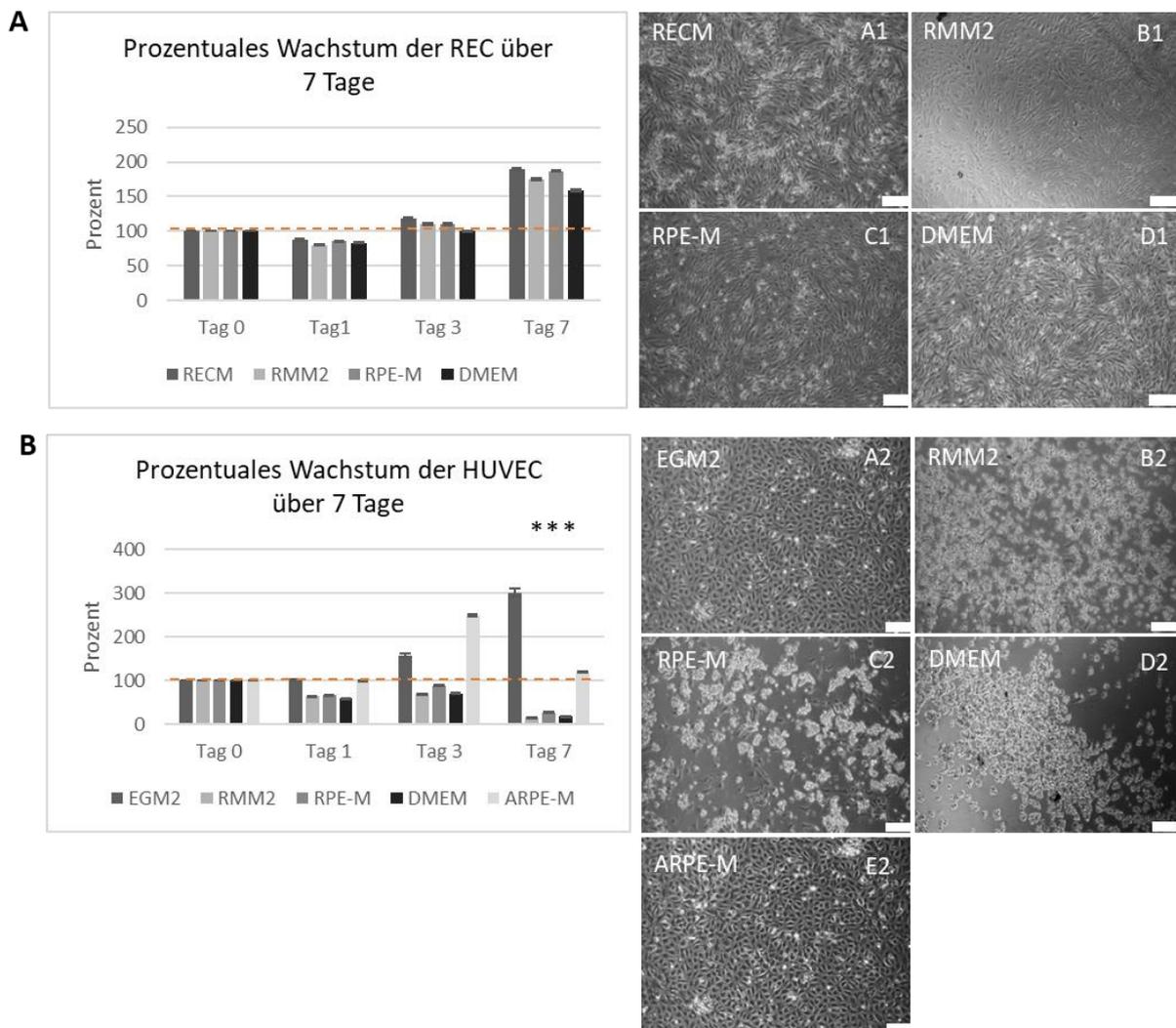


Abbildung 30: Graphische Darstellung des prozentualen Wachstums von REC und HUVEC in unterschiedlichen Medien sowie deren Morphologie an Tag 7. A) $7 \cdot 10^4$ REC wurden in einer mit *Speed Coating* beschichteten 24-Well Kultivierungsplatte ausgebracht und jeweils als Triplikate in unterschiedlichen Medien kultiviert. Als Positivkontrolle wurde das herkömmliche Medium RECM für die REC Kultivierung verwendet. Als Negativkontrolle wurde DMEM verwendet, da es keine Zell-spezifische Zusammensetzung aufweist. Analysiert wurde das Wachstum der REC in RMM2, welches von DD11 bis DD15 in der RPE Differenzierung eingesetzt wird sowie in RPE-M, welches ab DD15 Verwendung findet. B) $7 \cdot 10^4$ HUVEC wurden ebenfalls in einer 24-Well Kultivierungsplatte ausgebracht und jeweils als Triplikate in unterschiedlichen Medien kultiviert. Als Positivkontrolle wurde das herkömmliche Medium EGM2 für die HUVEC Kultivierung verwendet und als Negativkontrolle wurde DMEM eingesetzt. Analysiert wurde das Wachstum der HUVEC in RMM2, in RPE-M sowie in ARPE-M. Beide Endothelzellen wurden jeweils an Tag 1, Tag 3 sowie an Tag 7 mit 0,25 % Trypsin-EDTA abgelöst und die Zellzahl jeweils mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Zudem wurden die Morphologie und Adhäsion der Endothelzellen an Tag 7 mikroskopisch festgehalten. Maßstab 270 μm. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED

Ähnlich wie bei der Kultivierung von REC verdoppelte sich die Zellzahl der HUVEC im empfohlenen Kultivierungsmedium EGM2 über einen Zeitraum von 7 Tagen (Tag 7: 302 % \pm 8,3). In der Negativkontrolle mit DMEM konnten die HUVECs über einen Zeitraum von 7 Tagen am schlechtesten kultiviert werden, da im Vergleich zu Tag 0 eine signifikante (P-Wert=0,02) Abnahme an Tag 7 festgestellt wurde (Tag 7: 17,8 % \pm 0,75). Eine ebenfalls signifikant (P-Wert=0,021 für RMM2; P-Wert=0,027 für RPE-M) schlechtere Kultivierung von HUVEC stellte sich in den murinen Differenzierungsmedien RMM2 (Tag 7: 15,4 % \pm 0,38) und RPE-M (Tag 7: 27,3 % \pm 0,76) dar. Auch hier stand die Kultivierung der Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen mit einem hohen Verlust an adhärenen Zellen in Verbindung. Ausschließlich die Kultivierung von HUVEC in dem für humane Zellen geeignete ARPE-M war erfolgreich, da die Zellzahl der zu Beginn ausgebrachten HUVEC über die Zeit aufrecht erhalten werden konnte (Tag 7: 119 % \pm 1,1).

Die Ergebnisse der Wachstumskurven zeigten, dass für die Ko-Kultivierung von murinen REC mit differenziertem RPE aus mESC-Rx-GFP das RPE-M Kultivierungsmedium am besten geeignet ist. Für die Ko-Kultivierung von HUVEC mit ARPE-19 ist das ARPE-M Kultivierungsmedium dagegen am besten geeignet ist. Für eine Ko-Kultivierung der HUVEC mit RPE eignen sich am besten humane ARPE-19 Zellen. Viele Studien verwenden bei der Ko-Kultivierung von Zellen in unterschiedlichen Kompartimenten das zellspezifische Kultivierungsmedium ^{[404]; [223]; [405]; [406]}. Dass das Kultivierungsmedium einen starken Einfluss auf die Adhäsion und Proliferation der Zellen sowie deren Viabilität nimmt konnte auch anhand der Literatur belegt werden. Dabei haben sich Endothelzellen als wertvolle *in vitro* Modelle erwiesen, um wichtige physiologische und pathologische Prozesse zu untersuchen ^{[164]; [375]}. Bei der Interpretation experimenteller Daten allerdings ist besonders relevant, dass sich Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft oftmals ähnlich, aber in vielerlei Hinsicht sehr unterschiedlich vor allem in Bezug auf die Genexpressionsmuster verhalten. Widersprüchliche Ergebnisse in Studien der letzten Jahre waren dabei auf die Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien zurückzuführen ^{[407]; [402]}.

4.4.2 Ko-Kultivierung von REC und RPE im Transwell

Im nächsten Schritt konnte eine Ko-Kultivierung aus REC und dem differenzierten RPE im Transwell als oBRB Modell etabliert werden. Dazu wurde ein Transwell (0,4 μ m Porengröße) auf der Innenseite mit Laminin (1 μ g/cm²; 1 h) beschichtet und die Unterseite anschließend mit *Speed Coating* Lösung (0,2 % Gelatine; 2 min) bei Raumtemperatur. $9,4 \cdot 10^4$ RPE-Vorläuferzellen aus der Differenzierung von mESC-Rx-GFP wurden an DD11 auf der Innenseite des Transwells ausgebracht und bis DD18 zu RPE differenziert. Anschließend wurde das Transwell luftblasenfrei um 180 ° gedreht und in ein RPE-M befülltes 12-Well eingebracht. $3 \cdot 10^4$ REC wurden auf der Unterseite des Transwells in RECM ausgebracht und den Zellen die Möglichkeit gegeben über Nacht zu adhären. Anschließend wurde

das Transwell wieder in seine Ausgangsposition gebracht und in eine 24-Well Kultivierungsplatte mit RPE-M überführt. Die Ko-Kultivierung des differenzierten RPEs und der REC fand über einen Zeitraum von 5 Tagen statt. Anschließend wurde die Ko-Kultur mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden das *Tight Junction* Protein ZO-1 sowohl im differenzierten RPE, als auch in den REC nachgewiesen. Dazu wurden Antikörper, die in verschiedenen Wirten produziert wurden verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (2 µg/ml) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 µM) visualisiert. Anschließend wurde die oBRB Ko-Kultur konfokalmikroskopisch untersucht und die Zellstrukturen anhand von *Z-Stack*-Projektion in 3D dargestellt. Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 31** dargestellt. Anhand der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die Ko-Kultivierung von REC und dem differenzierten RPE über einen Zeitraum von 5 Tagen in einem Transwell mit 0,4 µm Poren erfolgreich war. Die REC bilden einen homogenen Zelllayer über die gesamte Membran. Die Zellen sind jedoch wie zu erwarten weniger dicht angeordnet als die RPE Zellen. Die Differenzierung des RPEs aus mESC-Rx-GFP war erfolgreich, da durch die *Tight Junctions* eine hexagonale Zellmorphologie nachgewiesen werden konnte. Auch der RPE Zelllayer war über die gesamte Membran des Transwells homogen. Der deutliche Nachweis der *Tight Junctions* zwischen den Zellen stellt ein Indiz für die Barrierefunktion der oBRB dar. ^{[165]; [198]}

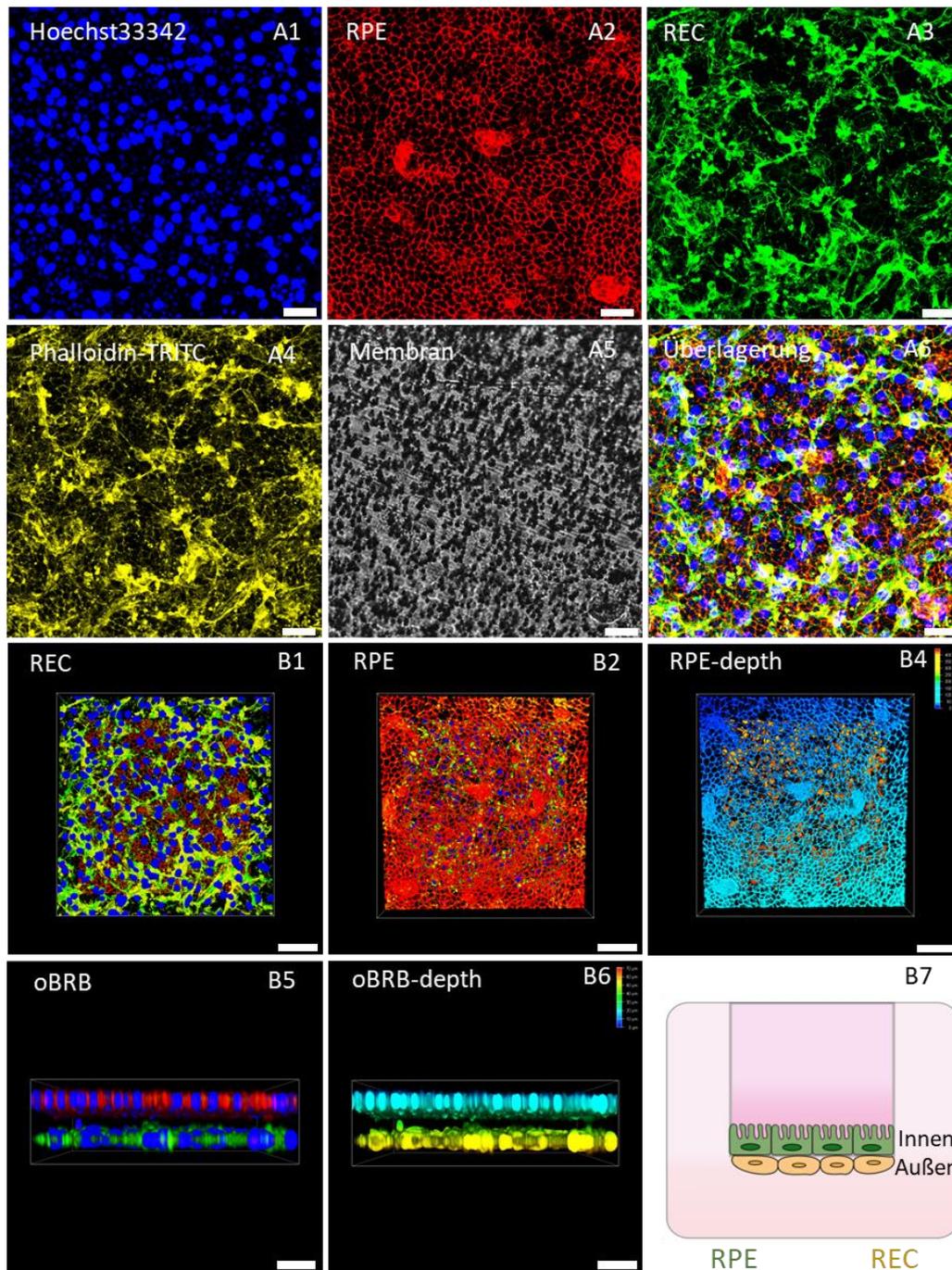


Abbildung 31: Immunfluoreszenz der etablierten oBRB im Transwell. Dazu wurde ein Transwell mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße auf der Oberseite mit Laminin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 h) beschichtet und die Unterseite für mit *Speed Coating* Lösung (2 min). Anschließend wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE Vorläuferzellen von DD11 auf der Innenseite des Transwells ausgebracht und bis DD18 differenziert. Danach wurde das Transwell luftblasenfrei um 180° gedreht und $3 \cdot 10^4$ REC auf der Unterseite des Transwells in $200 \mu\text{l}$ RECM ausgebracht. Anschließend fand eine Ko-Kultivierung des RPEs und der REC in korrekter Orientierung über 5 Tage statt. Eine schematische Darstellung der oBRB im Transwell ist in B7 zu sehen. Anschließend wurde die Ko-Kultur mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1%; 4 min; RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden das *Tight Junction* Protein ZO-1 im RPE (A2) und in den REC (A3) visualisiert. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit Hoechst33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC ($0,1 \mu\text{M}$; A4) visualisiert. Zudem wurde eine Hellfeldaufnahme der PC-Membran gemacht (A5). Die Überlagerung aller Aufnahmen ist in A6 dargestellt. Z-Stack-Projektionen (B1-B6) im Umfang von $200 \mu\text{m}$ wurden aufgenommen, um die räumliche Aufteilung der oBRB zu visualisieren. Maßstab $100 \mu\text{m}$. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skalierung der Tiefenfärbung in 10er Schritten: 0=blau; rot=70.

Das in der Immunfluoreszenz erzielte Ergebnis kann anhand der Literatur bestätigt werden. Dabei konnte demonstriert werden, dass in einer im Kontakt stehenden Ko-Kultur aus humanen REC und hESC-RPE ein homogener Endothelzelllayer zu finden ist. In Anwesenheit der REC änderte sich weder die allgemeine Morphologie noch die Feinstruktur des hESC-RPE, wie anhand der *Tight Junction* verdeutlicht werden konnte ^[406]. Der Austausch von REC und RPE durch die poröse Grenzfläche ermöglicht eine Kommunikation zwischen den Zellen ähnlich wie im Organismus ^[408]. Die modellhafte Rekonstruktion der oBRB im Transwell oder in *Organ-on-chip* Systemen kann für Arzneimittelpermeabilitätstests eingesetzt werden ^{[124]; [146]}.

4.4.3 Funktionalitätstest der oBRB

Nach erfolgreicher Etablierung der oBRB im Transwell wurde deren Barriereintegrität anhand eines Permeabilitätstests sowie der Messung des elektrischen Widerstands analysiert und validiert. Die Bildung von Diffusionsbarrieren, die Kompartimente unterschiedlicher Struktur trennen und aufrechterhalten, ist nämlich eine grundlegende Voraussetzung für die physiologische Leistungsfähigkeit von Organen ^[409].

4.4.3.1 Dextranassay zur Untersuchung der Barriereintegrität der oBRB im Transwell

Um die Dichtigkeit der oBRB zu untersuchen wurde ein Permeabilitätstest durchgeführt. Der Permeabilitätsassay beruht auf der Fluoreszenzintensitätsmessung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem Dextran, welches parazellulär durch die kultivierten Zelllayer passieren kann ^[410]. Dextran ist ein Glucosepolymer, das häufig als Tracermolekül Einsatz findet ^[411]. Aufgrund seiner leicht zugänglichen Hydroxyl- und Carbonylgruppen stellt es ein geeignetes Molekül für die Fluoreszenzmarkierung dar. Da es nicht aktiv von Zellen transportiert wird, aber leicht in Wasser gelöst werden kann, wird Dextran häufig in Permeabilitätsstudien eingesetzt ^[412]. Die Strukturformel von Dextran ist in **Abbildung 32** dargestellt.

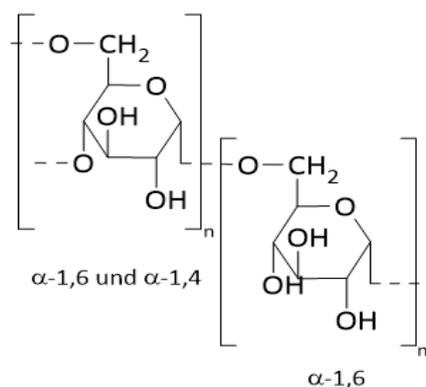


Abbildung 32: Strukturformel von Dextran. Dextrane sind D-Glucose Polysaccharide, die durch Hefen und Bakterien produziert werden und Molekülmassen zwischen 10 und 50 kDa besitzen. ^[411]

RPE und Choroid sind *in vivo* durch die dünne Bruch-Membran ($\approx 4 \mu\text{m}$) getrennt^[145], welche durch die poröse, mit EZM-Proteinen beschichtete Membran des Transwells ersetzt wird. Ein intakter und konfluenter Zelllayer ist ein wesentlicher Bestandteil jeder *in vitro* Permeabilitätsstudie. Für die Rekonstruktion der oBRB im Transwell wurden Transwelleinsätze mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ in eine 24-Well Kultivierungsplatte eingebracht. Die Innenseite des Transwells wurde für 1 h mit Laminin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet und mit DD11 RPE besiedelt, wobei das RPE aus mESC-Rx-GFP differenziert wurde. Die mESC-Rx-GFP wurden in einer 96-ULW Kultivierungsplatte ausgebracht, um Organoide zu generieren. Die GFP-positiven Organoide wurden mechanisch mit Hilfe von Kanülen aufgebrochen und auf einer Laminin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 12-Well Kultivierungsplatte bis DD11 differenziert. Die RPE-Vorläuferzellen wurden an DD11 selektiert und $9,4 \cdot 10^4$ Zellen auf der Innenseite des Transwells ausgebracht. Anschließend wurden die RPE-Vorläuferzellen bis DD18 zu RPE differenziert. Die Unterseite des Transwells wurde für 2 Minuten mit *Speed Coating* Lösung beschichtet und anschließend mit $3 \cdot 10^4$ REC in RECM besiedelt (**Abbildung 33**). Als Kontrolle wurden beschichtete Transwells ohne Zellen verwendet. Die parazelluläre Permeabilität in den statischen Kulturen der oBRB konnte anhand des, die Barriere passierten, Dextrans auf den REC am Wellboden ermittelt werden. Diese REC wurden in einer Zellzahl von $3 \cdot 10^4$ auf dem Wellboden einer 24-Well Kultivierungsplatte ausgebracht und über einen Zeitraum von 3 Tagen bis zur Konfluenz kultiviert. Für den Permeabilitätstest wurde das Kultivierungsmedium mit gelöstem 10 kDa Dextran-FITC in einer Konzentration von 20 mg/ml versetzt und in die Innenseite des Transwells gegeben. Nach einer Inkubation von 24 h wurde das Dextran-haltige Kultivierungsmedium ersetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu mindern. Anschließend wurde das passierte Dextran auf den am Wellboden befindlichen Endothelzellen durch die Konfokalmikroskopie visualisiert. Die Mikroskopieaufnahmen wurden mit Hilfe der FIJI Software analysiert und so die korrigierte totale Zellfluoreszenz (CTCF) ermittelt. Dazu wurde das Produkt aus mittlerer Hintergrundfluoreszenz und ausgewählter Fläche von der integrierten Dichte subtrahiert. Zur Kontrolle wurden zudem REC ohne Dextran-Zugabe sowie das Kultivierungsmedium untersucht, um Hintergrundfluoreszenzen auszuschließen. Beides konnte als Quelle für Hintergrundsignale ausgeschlossen werden.

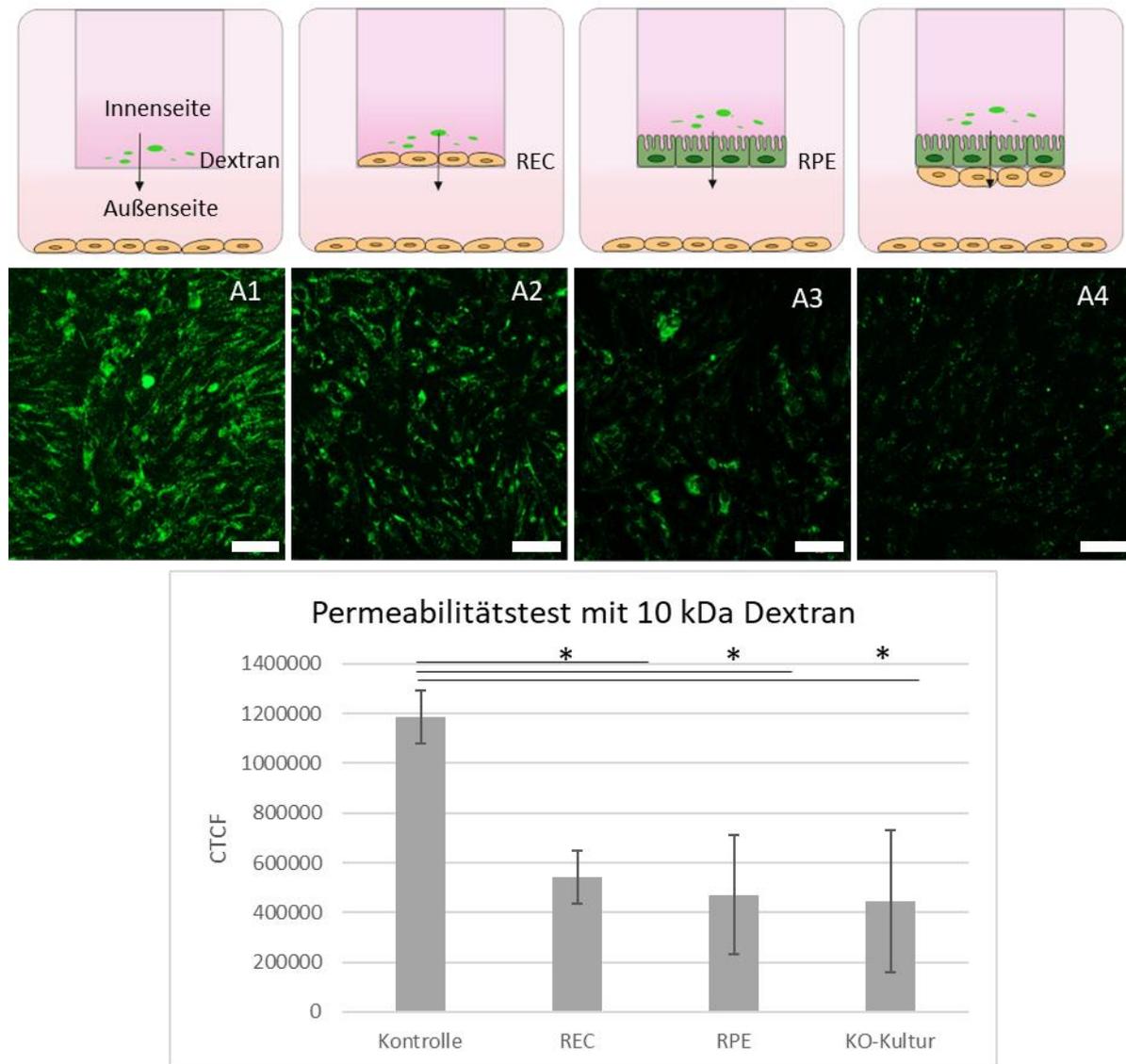


Abbildung 33: Verwendung von FITC-konjugiertem Dextran zum Nachweis der Barriereintegrität von oBRB Zelltypen in Transwells. In eine 24-Well Kultivierungsplatte wurden Transwelleinsätze mit einer Porengröße von 0,4 μm eingebracht. Diese wurden auf der Innenseite für 1 h mit Laminin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet. Die Unterseite wurde für 2 Minuten mit *Speed Coating* Lösung beschichtet. Auf die Innenseite des Transwells wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE Vorläuferzellen von DD11 ausgebracht und bis DD18 differenziert. Dann wurden auf die Unterseite des Transwells jeweils $3 \cdot 10^4$ REC in 200 μl RECM ausgebracht (A4). Für die Kontrolle wurden beschichtete Transwells ohne Zellen verwendet (A1). Zudem wurden die Barriere aus REC (A2) oder RPE (A3) zum Vergleich verwendet. Zur vergleichenden Betrachtung der parazellulären Permeabilität in statischen Kulturen der oBRB wurden auf den Wellboden der 24 Well Kultivierungsplatte je $3 \cdot 10^4$ REC ausgebracht und über einen Zeitraum von 3 Tagen bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Kultivierungsmedium mit gelöstem 10 kDa Dextran-FITC in einer Konzentration von 20 mg/ml versetzt und in die Innenseite des Transwells gegeben. Nach einer Inkubation für 24 h wurde das Kultivierungsmedium ersetzt. Die Endothelzellen auf den Wellböden wurden mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Die korrigierte totale Zellfluoreszenz (CTCF) wurde anschließend mit Hilfe der FIJI Software ermittelt und auf das Transwell ohne Zellen normiert. Maßstab 50 μm . Carl Zeiss LSM8000 Konfokalmikroskop.

Anhand der Immunfluoreszenz wurde ersichtlich, dass in der Transwellkontrolle ohne Zellen viel Dextran durch die Poren gelangt (CTCF= 1187048 ± 105474). Im Vergleich zur Kontrolle konnte eine Zellschicht aus REC (CTCF= 443912 ± 106155) das Passieren des Dextrans durch die poröse Membran

des Transwells signifikant (P-Wert=0,023) vermindern, einer Senkung um 54,21 % entspricht. Auch das differenzierte RPE (CTCF= 543627 ± 239759) konnte im Vergleich zur Kontrolle einen signifikanten (P-Wert=0,038) Unterschied bei der Messung der Fluoreszenzintensität des passierten Dextrans erzielen. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität um 60,38 % gesenkt. Auch die Ko-Kultur aus differenziertem RPE und REC (CTCF= 470367 ± 286881) konnte das Passieren von Dextran durch die poröse Membran des Transwells im Vergleich zur Kontrolle signifikant (P-Wert=0,001) um 62,61 % reduzieren. Zwischen der Kontrolle und den REC nahm die Fluoreszenzintensität deutlich ab. Verglichen mit dem differenzierten RPE reduzierte sich die Fluoreszenzintensität gegenüber der REC nochmals. Insgesamt die geringste Fluoreszenzintensität wies die Ko-Kultur aus differenziertem RPE und REC auf. Ob dieses Ergebnis auf den doppelten Zelloyer aus RPE und REC zurückzuführen ist kann in einem weiteren Versuch gezeigt werden. Dabei werden die REC durch andere Endothelzellen wie beispielsweise hCMEC aus dem Hirn ersetzt, die eine dichte Barriere aufgrund des kontinuierlichen Endothels aufweisen oder LSEC aus der Leber, die aufgrund des sinusoidalen diskontinuierlichen Endothels eine weniger dichte Barriere ausbilden ^{[163]; [171]; [413]; [63]; [414]}. Anhand dieser Werte konnte gezeigt werden, dass die rekonstruierte oBRB aus differenziertem RPE und REC die höchste Barriereintegrität aufwies. Dieses Ergebnis kann durch die Literatur gestützt werden, da auch bei der Ko-kultivierung von humanen REC und humanen ESC-RPE-Zellen die Barrierefunktion erhöht wurde ^[406]. Dass die Größe des Dextrans mit 10 kDa für die oBRB angemessen ist zeigten oBRB Modellsysteme anderer Studien, in welchen 10 kDa FITC-Dextran zum Nachweis der Barriereintegrität von ARPE19 Zellen und HUVEC im Transwell gewählt wurde ^[145]. Dass das eingesetzte Dextran neben dem parazellulären Weg auch transzellulär passieren kann wird durch die Literatur ausgeschlossen. Bisher konnten keine Nachweise über die Expression von Membranrezeptoren, welche die Transzytose von Dextran durch Epithel oder Endothel vermitteln erbracht werden ^[415]. Die beobachtete Pinozytose von Dextran stellt einen sehr langsamen Prozess dar und ist im Vergleich zum parazellulären Transport vernachlässigbar ^[409]. Die Ergebnisse der Permeabilitätsstudie der im Transwell etablierten murinen oBRB belegen die Barriereintegrität des aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPEs.

4.4.3.2 TEER-Messung zur Untersuchung der Barriereintegrität der oBRB im Transwell

Um die Barriereintegrität der im Transwell etablierten oBRB zu validieren, wurde zusätzlich zum Dextran-basierten Permeabilitätsassay der transepitheliale/transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) der Zellen bestimmt. Der TEER stellt eine quantitative Methode zur Messung der Integrität und Permeabilität von Endothel und Epithel dar, wobei die nicht-invasive Messung in Echtzeit durchgeführt wird ^{[416]; [417]}. Basis der Messung ist der elektrische Widerstand in Ohm, welcher mit handelsüblichen Messsystemen wie dem Epithelial Voltometer (EVOM3) analysiert werden kann ^{[418]; [417]}. Zur

Bestimmung des TEER wurden Transwells mit 0,4 μm Poren wie in Kapitel 4.4.3.1 präpariert. Anschließend fand eine Ko-Kultivierung des differenzierten RPEs und der REC über 15 Tage im Transwell in RPE-M statt. Jeden zweiten bzw. dritten Tag wurde eine TEER-Messung durchgeführt, mit DD21 der RPE Differenzierung als Startpunkt (**Abbildung 34**). Für die TEER-Messung wurde eine Elektrode des Volttohmmeters in das obere Kompartiment und die andere in das untere Kompartiment eingebracht, wobei eine Wechselstrom-Rechteckwelle mit einer Frequenz von 12,5 Hz angelegt wurde^[417]. Jedes Elektrodenpaar enthält ein Silber/Silberchlorid-Pellet zum Messen der Spannung und eine Silberelektrode zum Leiten des Stroms. Das Messverfahren umfasst die Messung des Leerwiderstands (R_{BLANK}) der semipermeablen Membran ohne Zellen und die Messung des Widerstands über die Zellschicht auf der semipermeablen Membran (R_{TOTAL}). Als Leerwiderstand diente ein 0,4 μm poröses, beschichtetes Transwell mit RPE-M (Abbildung A1). Als Kontrolle dafür, dass der Einfluss einer zusätzlichen Zellschicht den TEER-Wert nicht beeinflusst, wurden die Zellen der Transwellunterseite ebenfalls auf den Wellboden ausgebracht (Abbildung C1-C3). Der zellspezifische Widerstand (R_{TISSUE}) in Ω wird durch die Differenz von R_{TOTAL} und R_{BLANK} errechnet. Dabei ist der Widerstand umgekehrt proportional zur effektiven Fläche der semipermeablen Membran (M_{AREA}). TEER-Werte entstehen typischerweise aus dem Produkt von $R_{\text{TISSUE}}(\Omega)$ und $M_{\text{AREA}}(\text{cm}^2)$ und werden in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben^[419];
^[417].

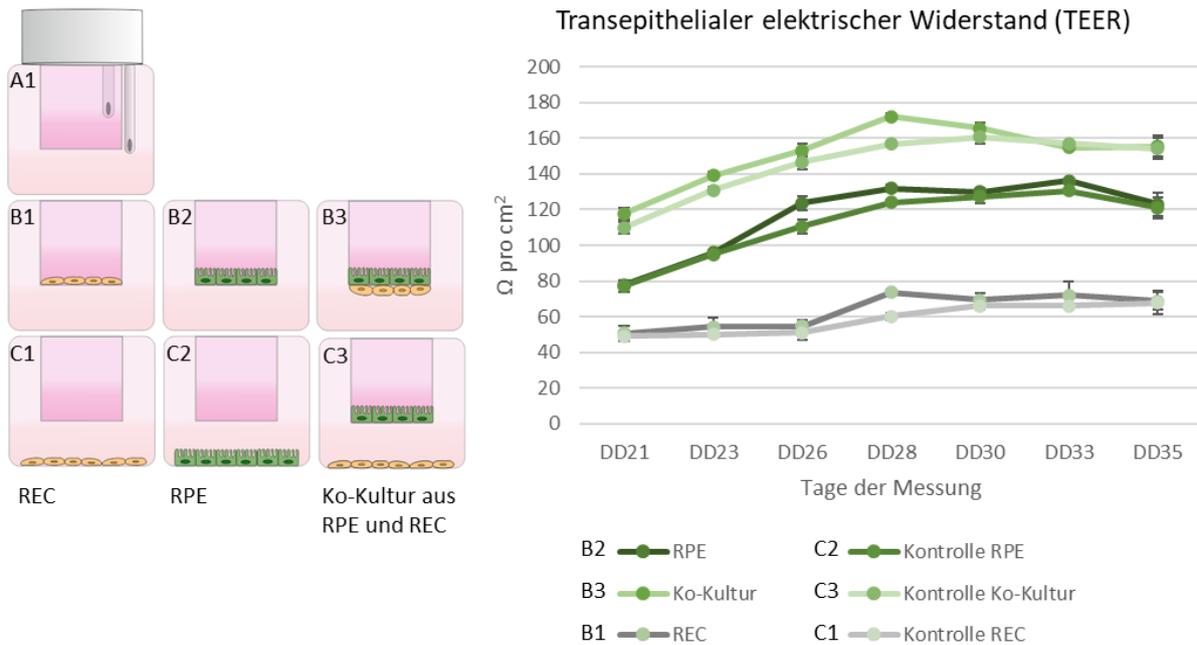


Abbildung 34: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) von Zelltypen der oBRB. Zur Bestimmung des TEER wurden Transwells mit $0,4 \mu\text{m}$ Poren auf der Innenseite für 1 h mit $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin beschichtet. Auf die Innenseite des Transwells wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE Vorläuferzellen von DD11 ausgebracht und bis DD18 differenziert. Die Unterseite des Transwells wurde für 2 Minuten mit *Speed Coating* Lösung beschichtet und jeweils $3 \cdot 10^4$ REC in $200 \mu\text{l}$ RECM ausgebracht. Nachdem diese über Nacht adhären konnten, wurde das Transwell in korrekter Orientierung in eine 24-Well Kultivierungsplatte mit RPE-M überführt. Anschließend fand eine Ko-Kultivierung des RPEs und der REC über 15 Tage im Transwell statt. Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel mit RPE-M sowie eine TEER-Messung durchgeführt. Start der TEER-Messung war DD21 des RPEs und wurde ausgehend davon an DD23, DD26, DD28, DD30, DD33 sowie DD35 durchgeführt. Bei den Messungen diente ein beschichtetes Transwell ohne Zellen als Leerwiderstand (A1). Referenziert auf den Leerwiderstand wurde der TEER in den Transwells mit REC (B1), differenziertem RPE (B2) und der Ko-Kultur (B3) bestimmt. Bei den Kontrollen befanden sich die Zellen auf dem Wellboden (C1-C3).

Dass sich der TEER-Wert bei der Ko-Kultivierung der zwei *Monolayer* an unterschiedlichen Orten nur unwesentlich unterscheidet konnte anhand der Kontrolle nachgewiesen werden. Generell zeigte sich eine steigende Tendenz der TEER-Werte über den Messzeitraum von 14 Tagen, wobei der größte elektrische Widerstand an DD28 mit (REC= $73,5 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 1,78$; RPE= $132,07 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 1,78$; Ko-Kultur= $172,07 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 1,84$) festzustellen war. Der TEER-Wert der REC ($50,67 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 1,85$) an DD21 vergleichsweise am geringsten ist, während die Werte des RPEs ($78,03 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 3,25$) zwischen dem TEER-Wert der Ko-Kultur ($117,8 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 4,16$) und dem der REC lag. Die Literatur beschreibt, dass die TEER Messwerte des RPE-Retinagewebes bei $133 \pm 7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=32$) einzuordnen sind ^[420]. Die ermittelten Messwerte der Ko-Kultur aus differenziertem RPE und REC liegen höher als in der Literatur angegeben, entsprechen aber der Messung des differenzierten RPEs an DD28. TEER-Messungen von primärem Maus-RPE haben in anderen Studien nur einen Wert von $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ergeben ^[204], während bei der TEER-Messung von murinem iPS-RPE ungefähr $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ermittelt wurden ^[42]. Zudem wird in der Literatur beschrieben, dass die TEER-Werte von murinem iPS-RPE oder murinem primären RPE niedrigere Messergebnisse hervorrufen als bei humanem iPS-RPE. Dabei lagen die TEER-Messungen

von humanen iPS-RPE-Linien im Bereich von 150 bis 350 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ^[421]. Schwankungen des TEER-Werts können aufgrund von Faktoren wie Temperatur ^[150], Medienzusammensetzung und Zellpassage auftreten ^{[418]; [417]}. Idealerweise sollten TEER-Messungen in einem Inkubator bei 37 °C durchgeführt werden oder bei Raumtemperatur durchgeführten TEER-Messungen das Medium für 20 min bei 37° C äquilibriert worden sein ^[417]. Zudem sind für stabile Messwerte die Elektrodenpositionen zu beachten ^{[417] [422]; [423]}. Abgeleitet von dem elektrischen Widerstand veranschaulicht der erhöhte TEER das Vorhandensein von *Tight Junctions* und gibt damit Aufschluss über die Barriereintegrität^[421]. Durch die TEER-Messungen kann die Integrität der Barriere in einer Ko-Kultur mit differenzierten RPE aus mESC-Rx-GFP und REC validiert werden. Zudem wurde bestätigt, dass die Barriereintegrität der Ko-Kultur wie in der *in vivo* oBRB am größten ist und das differenzierte RPE in Kultur eine höhere Barrierefunktion als die REC aufweist.

4.5 Etablierung der oBRB im vasQchip

Die *Organ-on-chip*-Technologie bietet die Möglichkeit, durch *in vitro* Studien wichtige grundlegende Informationen zu erhalten, indem physiologische Funktionen von *in vivo* Geweben besser reproduziert werden können ^[377]. *Organ-on-chip* Systeme integrieren nicht nur Zellen in einer 3D-Organisation, sondern bieten auch die Möglichkeit einer Ko-Kultivierung von Zellen unter mikrofluidischen Bedingungen ^{[424]; [425]}. Poröse Membranen ermöglichen die Aufteilung zellulärer Mikroumgebungen *in vitro*, während sie gleichzeitig ein physikalisches und biochemisches Kommunizieren zwischen den Zellen erlauben ^[386]. Für die Etablierung der oBRB in einem *Organ-on-chip* System wurde in dieser Arbeit der am KIT entwickelte vasQchip ^[125] verwendet (**Abbildung 35**).

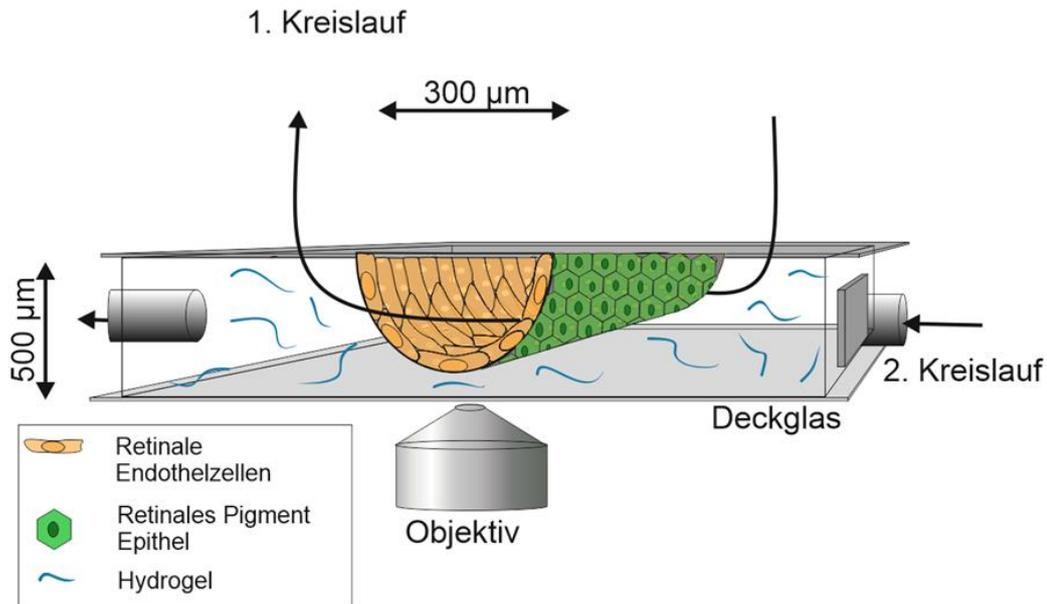


Abbildung 35 Abbildung 31: Schematische Darstellung des vasQchips als *Organ-on-chip* Modellsystem. Im semizirkulären porösen Mikrokanal befinden sich retinale Endothelzellen der Maus und im umgebenden Kompartiment retinales Pigmentepithel, welches aus der Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen stammt. Zudem besteht die Möglichkeit, Hydrogele als Extrazellulärematrix-Analog im umgebenden Kompartiment einzufügen und das Modellsystem mit der Mikrofluidik zu verbinden. Die Zellen der rekonstruierten oBRB können aufgrund des Aufbaus des vasQchips durch das Deckglas mikroskopisch analysiert werden.

4.5.1 Bestimmung der Zellzahl zur Kultivierung von REC im vasQchip

Für eine dem Organismus ähnliche Darstellung der oBRB *in vitro* wurde zunächst das Choroid im *Organ-on-chip* System etabliert. Dafür wurden zunächst REC in den Mikrokanal des vasQchips ^[125] wie in **Abbildung 36** eingebracht. Das Endothel wurde anschließend charakterisiert, da ein konfluentes retinales Endothel im Mikrokanal unerlässlich für die Rekonstruktion eines funktionsfähigen, vaskularisierten *in vitro* Modells ist ^[426]. Aufgrund der halbrunden Geometrie des Mikrokanals konnte die Zellzahl einer konfluenten 2D Kultur nicht exakt auf den Mikrokanal übertragen werden. Die näherungsweise Ermittlung einer geeigneten Zellzahl für die Besiedelung des Mikrokanals fand anhand der Mikrokanalfläche von etwa 0,326 cm² statt. Um eine geeignete Zellzahl zur konfluenten Besiedelung des Mikrokanals zu identifizieren wurden unterschiedliche Zellzahlen getestet. Vor dem Einbringen der REC in den Mikrokanal wurde dieser für 2 min mit *Speed Coating* Lösung inkubiert und anschließend 20 µl der jeweiligen Zellsuspension eingebracht (5*10⁴, 10*10⁴, 20*10⁴ Zellen). Da eine geeignete Porengröße der PC-Membran für die Kultivierung der REC noch nicht ermittelt wurde, fanden zunächst Mikrokanäle mit dem kleinsten Porendurchmesser von 1 µm Einsatz. Der vasQchip wurde nach dem Einbringen der REC in den Mikrokanal im vasQturn (1 h) inkubiert, um eine homogene Adhäsion der Zellen zu gewährleisten.

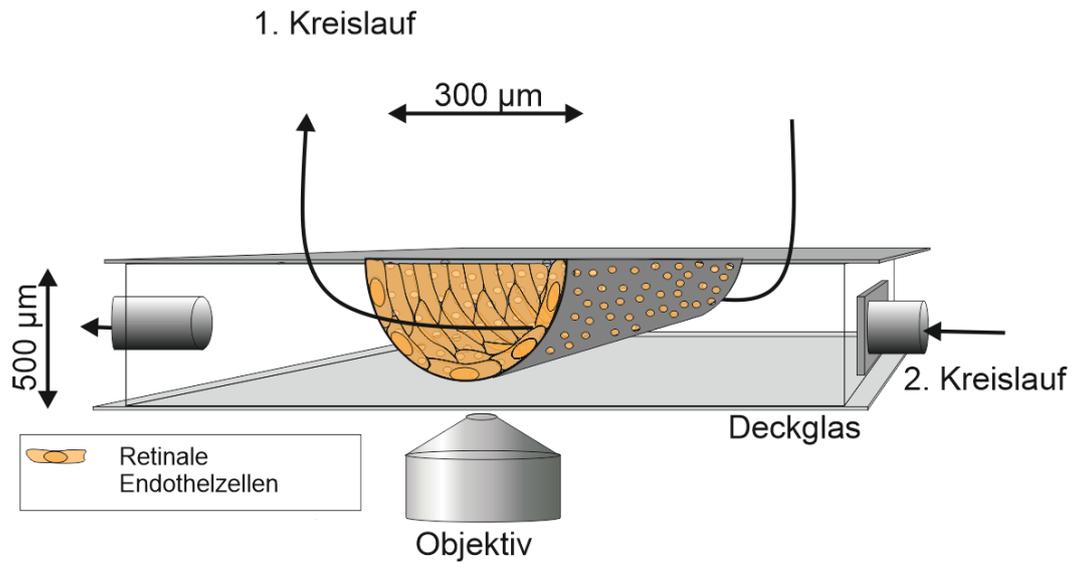


Abbildung 36: Schematische Darstellung des vasQchips als *Organ-on-chip* Modellsystem ^[125]. Besiedelt ist der Mikrokanal mit primären retinalen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem B129S2/SvPasCrl Mausstamm (REC).

Nach einer anschließenden statischen Inkubation von 3 h wurde das Kultivierungsmedium (RECM) abgenommen und die Zellen mit 5-Chlormethylfluoresceindiacetat CellTracker Green (CMFDA; 20 µM; 30 min) inkubiert. Anhand der Fluoreszenzfärbung kann die Lokalisation, Verteilung und die Zelldichte der ausgebrachten REC im Mikrokanal des vasQchips überprüft werden. CellTracker Green CMFDA ist ein fluoreszierendes Molekül, das die Zellmembran ungehindert passieren kann und im Zellinneren zu einem nicht-membrangängigen Produkt umgewandelt wird ^{[427]; [428]}. Dieses ist laut Herstellerangaben für mindestens 72 h stabil, nicht toxisch und wird darüber hinaus nicht an benachbarte Zellen übertragen. Das Extinktionsmaximum von CellTracker Green CMFDA liegt bei 492 nm und das Emissionsmaximum bei 517 nm. Die Strukturformel von CellTracker Green CMFDA ist in **Abbildung 37** dargestellt.

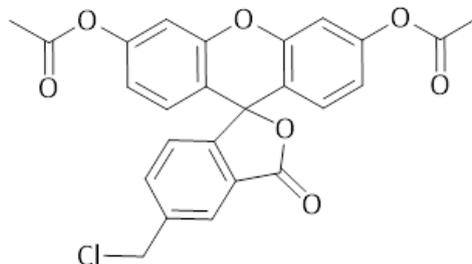


Abbildung 37: Strukturformel des fluoreszierenden Farbstoffs 5-Chlormethylfluoresceindiacetat CellTracker Green (CMFDA) zur Markierung von Zellbewegung oder -lokalisierung.

Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie wurden die Adhäsion und die Verteilung der REC nach 3 h im Mikrokanal untersucht (**Abbildung 38**). Insgesamt war festzustellen, dass der Mikrokanal mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ (A1-A3) REC nur unvollständig besiedelt war, während das Einbringen von $10 \cdot 10^4$ (B1-B3) und $20 \cdot 10^4$ (C1-C3) REC zu einer homogenen Verteilung führte. Beeinflusst werden kann die Verteilung der Zellen laut Literatur durch die Methode des Aussäens. Dabei können sich um lebensfähige Kulturen in mikrofluidischen Systemen zu erhalten, die Verfahren je nach Mikrokanaldesign und -geometrie von einem Experiment zum anderen erheblich unterscheiden ^[429]. Das Einbringen von 20 μ l Zellsuspension in den Mikrokanal des vasQchips mit anschließender rotierender Inkubation stellt eine gute Möglichkeit zur Besiedelung dar wie anhand der Verteilung der REC erkennbar ist. Eine zu hohe Zelldichte wie beim vasQchip mit $20 \cdot 10^4$ REC führt zu einer schnelleren Nährstoffverarmung und Abfallansammlung, was zu einer Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften einschließlich pH-Wert und Gaskonzentrationen führt. Diese Faktoren wirken sich langfristig gesehen nachteilig, vor allem in Bezug auf die Vitalität der Zellkultur aus ^{[128][430]}. Der interzelluläre Zellkontakt und -abstand wird jedoch von der Aussaatdichte der Zellen beeinflusst, weshalb eine zu geringe Zellzahl für die Ausbildung eines konfluenten Endothels aufgrund der niedrigen Proliferationsrate der Zellen hinderlich ist. Die Literatur beschreibt, dass zudem die EZM-Produktion, die Genexpression, die Zytokinproduktion und die Chemotaxis von mesenchymalen Stammzellen durch die Aussaatdichte beeinflusst wurde ^[431]. Andere Studien zeigten zudem, dass die Zellaussaatdichte auch eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung spielt ^[432]–^{[434][435][436]}. Einfluss auf die Zelladhäsion hat auch die Zahl der Passage der Zellen, da diese mit einem Alterungsprozess gleichgesetzt werden kann ^[437]. Aufgrund dessen wurde für die Besiedelung des Mikrokanals des vasQchips eine Zellzahl von $10 \cdot 10^4$ REC in der Passage 5 gewählt.

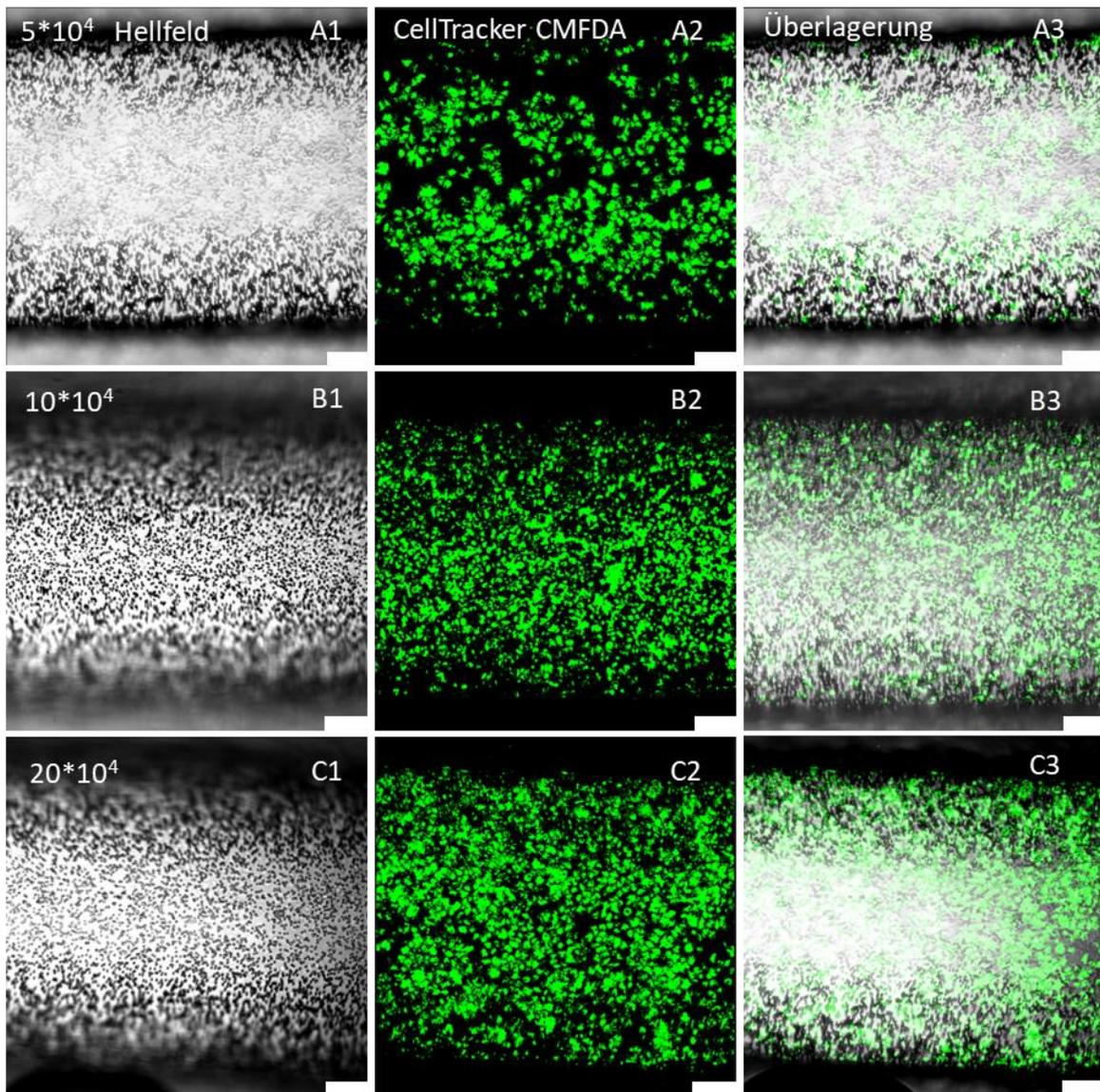


Abbildung 38: Bestimmung der Zellzahl für eine Besiedelung des Mikrokanals im vasQchip mit REC. Der Mikrokanal wurde für 2 min mit *Speed Coating* Lösung bei RT inkubiert und anschließend 20 μ l verschiedener Zellzahlen in den Mikrokanal des vasQchips mit 1 μ m Poren eingebracht ($5 \cdot 10^4$, $10 \cdot 10^4$, $20 \cdot 10^4$). Die REC wurden nach dem Einbringen in den Mikrokanal für 1 h im vasQturn inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit einer homogenen Adhäsion zu geben. Nach einer anschließenden statischen Inkubation von 3 h wurde das RECM abgenommen und die Zellen für weitere 30 min mit 20 μ M 5-Chlormethylfluoresceindiacetat CellTracker Green (CMFDA) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch das Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED bei einer Anregung von 488 nm (A2; B2; C2) und Hellfeldaufnahmen (A1; B1; C1) visualisiert. Die Aufnahmen A3; B3, C3 zeigen deren Überlagerung. Maßstab 100 μ m.

4.5.2 Bestimmung der Porengröße zur Kultivierung von REC im vasQchip

Die poröse PC-Membran erlaubt als Grenzfläche einen Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten zwischen verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Kompartimenten ^[386]. Zudem können die Endothelzellen im Mikrokanal mit dem umliegenden Epithel im umgebenden Kompartiment kommunizieren. Da der Kultivierungsuntergrund Einfluss auf die Adhäsion, Proliferation

und Genexpression der Zellen nimmt ^[438], wurden PC-Membranen mit unterschiedlicher Porosität für die Kultivierung der REC im Mikrokanal untersucht (**Abbildung 39**).

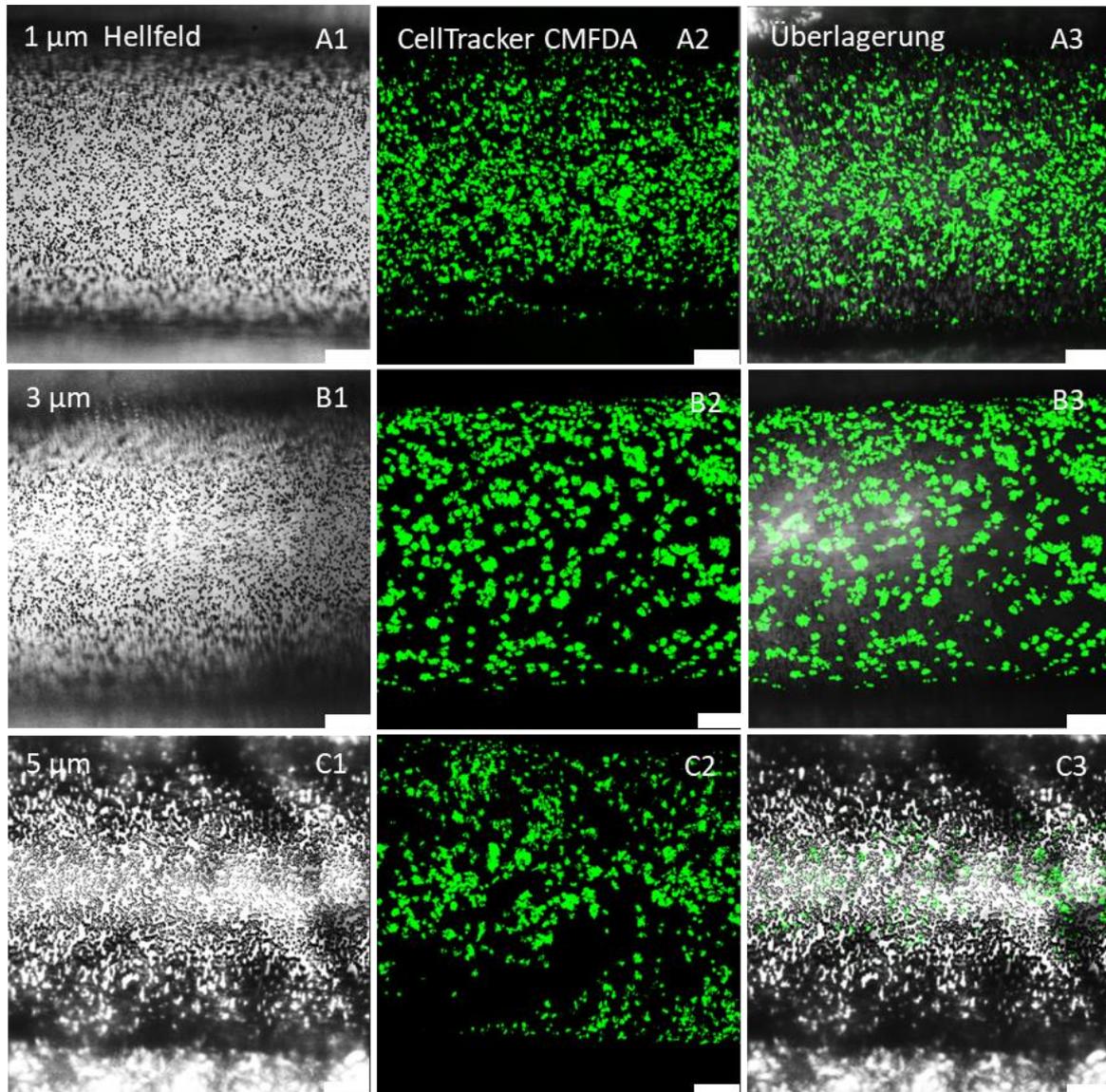


Abbildung 39: Retinale Endothelzellen im Mikrokanal des vasQchips mit unterschiedlichen Porengrößen. Es wurden drei verschiedene Porengrößen von 1 µm, 3 µm und 5 µm verwendet. Der Mikrokanal wurde für 2 min mit *Speed Coating* Lösung bei RT inkubiert. Je 20 µl mit $5 \cdot 10^4$ REC wurden in den Mikrokanal eingebracht, um die Adhäsion dieser anschließend vergleichend zu betrachten. Um eine homogene Adhäsion im Mikrokanal zu gewährleisten, wurden die REC nach dem Einbringen für 1 h im vasQturn inkubiert. Nach einer anschließenden statischen Inkubation von 3 h wurde das RECM abgenommen, die Zellen für weitere 30 min mit 20 µM CellTracker Green CMFDA inkubiert und abschließend mittels Konfokalmikroskopie vergleichend betrachtet. Anschließend wurden die Proben durch das Inverse Lichtmikroskop Leica DMIL LED bei einer Anregung von 488 nm (A2; B2; C2) und Hellfeldaufnahmen (A1; B1; C1) visualisiert. Die Aufnahmen A3; B3, C3 zeigen deren Überlagerung. Maßstab 100 µm.

In handelsüblichen Zellkultureinsätzen liegt die Porengröße im Bereich von 400 nm bis 8 µm^[386]. Für die Kultivierung der REC wurden PC-Membranen mit drei verschiedene Porengrößen (1 µm, 3 µm, 5 µm) verwendet. Je $5 \cdot 10^4$ REC wurden in den Mikrokanal eingebracht, um die Adhäsion der Zellen auf dem porösen Untergrund vergleichend zu betrachten. Nachdem eine homogene Adhäsion der Zellen an der Mikrokanalwand durch den Einsatz des vasQturns gewährleistet wurde, konnten die REC nach 3 h Inkubation mit CellTracker Green CMFDA (20 µM; 30 min) visualisiert werden. Bei vergleichender Betrachtung konnte mit Hilfe der Konfokalmikroskopie festgestellt werden, dass eine Oberfläche mit großen Poren die Adhäsion der REC erschwerte. Die Verteilung der REC auf 5 µm Poren war inhomogen und auch bei 3 µm Poren war die Verteilung der Zellen suboptimal. Hierbei wurde die Oberfläche des Mikrokanals aufgrund der Zellaggregation zu kleinen Clustern nur unvollständig bedeckt. Ausschließlich bei 1 µm Poren konnte eine homogene Verteilung sowie eine gute Zelladhäsion der REC über den gesamten Mikrokanal identifiziert werden. Ein Abgleich mit der Literatur zeigt, dass bei der Besiedelung von porösen Membranen die Auswirkungen von Porengrößen und Porenabstand auf das Wachstum von Endothelzellen noch wenig untersucht sind. Poröse 3D-Gerüste werden häufig in Gewebekonstruktionen verwendet^[122] und stellen eine geeignete Mikroumgebungen zur Unterstützung des Zellwachstums und der Zellfunktionen bereit. Die strukturellen Eigenschaften, wie beispielsweise Porosität und Porengröße der Gerüste haben direkte Auswirkungen auf ihre Funktionalität sowohl *in vitro* als auch *in vivo*^[439]. Studien haben gezeigt, dass Faktoren wie die Art der Poren, die Porengröße und der Abstand zwischen den Poren das Wachstum von Endothelzellen beeinflusst^[440]. Für die Kultivierung von Endothelzellen wurden in der Literatur Poren im Durchmesser von 0.5 µm bis 3.0 µm eingesetzt^[441]. Aufgrund der Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzanalyse und dem Vergleich mit der Literatur wurde für die Kultivierung von REC im Mikrokanal des vasQchips eine Porengröße von 1 µm gewählt.

4.5.3 Kultivierung von REC im vasQchip

Die Kultivierung von Zellen unter Verwendung mikrofluidischer Systeme findet in der experimentellen Zellbiologie immer häufiger Einsatz^[130]. Nachdem eine geeignete Porengröße und Zellzahl für die Kultivierung der REC im Mikrokanal des vasQchips identifiziert wurde, sollte im nächsten Schritt festgestellt werden, ob die REC über einen längeren Zeitraum im Mikrokanal kultiviert werden können. Zudem sollte analysiert werden, ob der vasQchip eine geeignete Mikroumgebung für die Differenzierung von RPE aus mESC-Rx-GFP bereitstellt.

4.5.3.1 Einfluss der Beschichtung auf die Kultivierung von REC im vasQchip

Bei der Etablierung des Endothels in einer 2D Zellkultur wurde bereits der Einfluss der Beschichtung auf die Adhäsion der REC untersucht. Ob diese Beschichtung auch für die 3D Kultivierung der REC im

1 µm porösen Mikrokanal des vasQchips eingesetzt werden kann, wurde in Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit analysiert. Der poröse Mikrokanal wurde mit den am besten geeigneten Beschichtungen aus der 2D Kultivierung - Gelatine (2 mg/cm²) (**Abbildung 40**), Kollagen I (20 µg/cm²) (**Abbildung 41**) oder Laminin (2 µg/cm²) (**Abbildung 42**) für 1 h inkubiert. Der beschichtete Mikrokanal wurde jeweils mit 1·10⁵ REC besiedelt, wobei eine homogene Verteilung der Zellen durch den vasQturn gewährleistet wurde. Anschließend folgte eine Kultivierung über den Zeitraum von einem Tag (T1), 3 Tagen (T3) und 7 Tagen (T7). Nach dem Beenden der Kultivierung wurden die REC im Mikrokanal mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml) visualisiert. Anhand der mikroskopischen Analyse konnte gezeigt werden, dass die REC auf allen gewählten Beschichtungen im porösen Mikrokanal des vasQchips adhären konnten und eine statische Kultivierung über 7 Tage möglich war. Es zeigten sich jedoch Unterschiede in der Anzahl an adhärenierten REC und deren Verteilung über den Mikrokanal. Kollagen I (**Abbildung 40**) erwies sich als geeignete Beschichtung zur Besiedelung des porösen Mikrokanals mit REC. Auch in der 2D Kultivierung (4.3.1) zeigte sich Kollagen I mit einer vergleichsweise erhöhten Genexpression der *Junction* Proteine gegenüber anderen Beschichtungen. Die REC bildeten auf der Kollagen I Beschichtung an Tag 1 einen homogenen Zellschicht über den gesamten Mikrokanal des vasQchips aus. Zudem konnten die REC über den gesamten Zeitraum von 7 Tagen im Mikrokanal des vasQchips auf einer Kollagen I Beschichtung kultiviert werden. Der Zellschicht der REC war allerdings am Ende des Kultivierungszeitraums an Tag 7 nicht mehr so dicht wie zu Beginn, da sich die Zellen teilweise von der Mikrokanalwand abgelöst hatten. Laminin stellte nicht nur in der 2D-Kultivierung von REC eine geeignete Beschichtung dar, sondern erwies sich auch bei der statischen Kultivierung von REC im Mikrokanal des vasQchips als geeignet (**Abbildung 41**). Die REC bildeten auf der Laminin Beschichtung an Tag 1 einen homogenen Zellschicht über den gesamten Mikrokanal des vasQchips aus. An Tag 3 verdichtete sich der Zellschicht durch die Proliferation der Zellen zunehmend. Eine Kultivierung der REC im porösen Mikrokanal des vasQchips war mit einer Laminin-Beschichtung über den gesamten Zeitraum von 7 Tagen möglich. Die vom Hersteller empfohlene *Speed Coating* Lösung ist eine Gelatine-basierte Beschichtung, weshalb als kostengünstige Alternative Gelatine zur Beschichtung eingesetzt wurde (**Abbildung 42**), welche in der 2D Kultivierung von REC ein besseres Ergebnis erzielt hatte. Bei der statischen Kultivierung der REC im Mikrokanal des vasQchips konnte ein homogener Zellschicht an den Tagen 1 und 3 auf der Gelatine-Beschichtung nachgewiesen werden. Die Gelatine Beschichtung erlaubte zudem eine Kultivierung der REC im Mikrokanal über einen Zeitraum von 7 Tagen, wobei der Zellschicht am Ende nicht mehr so homogen wie zu Beginn des Kultivierungszeitraums war.

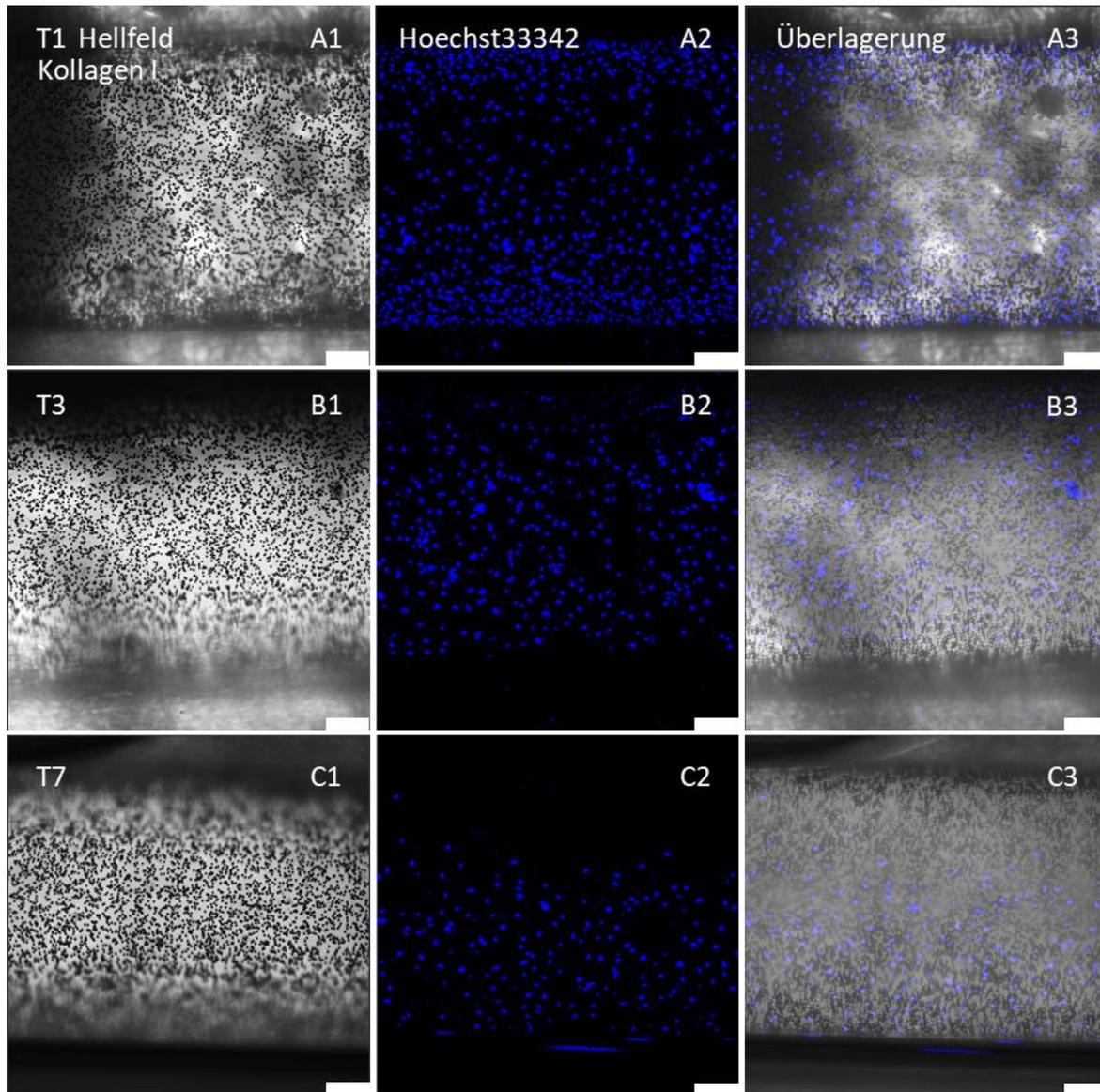


Abbildung 40: Statische Kultivierung von REC über 7 Tage im 1 µm porösen Mikrokanal mit Kollagen I Beschichtung. Ein 1 µm poröser Mikrokanal wurde mit Kollagen I ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 1 h inkubiert und anschließend jeweils mit $1 \cdot 10^5$ REC besiedelt. Nachdem die Zellen mit Hilfe des vasQturns gleichmäßig über die Mikrokanalfläche verteilt wurden, fand an den Tagen 1 (T1), 3 (T3) und 7 (T7) jeweils die Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) statt (A2; B2; C2). Zudem wurde eine Hellfeldaufnahme (A1; B2; C2) generiert und beide Aufnahmen überlagert (A3; B3; C3). Maßstab 100 µm. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5

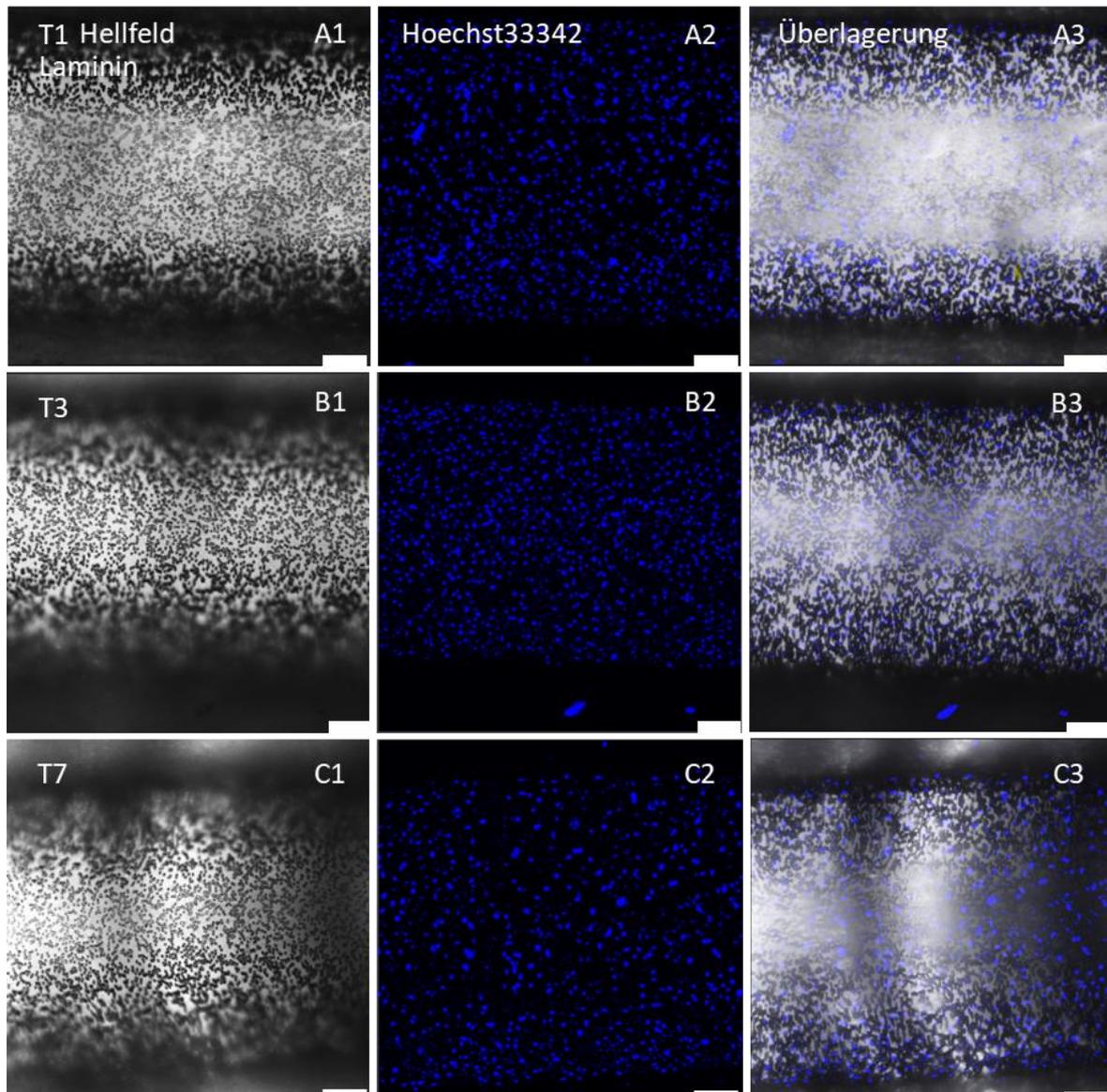


Abbildung 41: Statische Langzeitkultivierung von REC über 7 Tage im 1 µm porösen Mikrokanal mit Laminin Beschichtung. Ein 1 µm poröser Mikrokanal wurde mit Laminin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 1 h inkubiert und anschließend jeweils mit $1 \cdot 10^5$ REC besiedelt. Nachdem die Zellen mit Hilfe des vasQturns gleichmäßig über die Mikrokanalfläche verteilt wurden, fand an den Tagen 1 (T1), 3 (T3) und 7 (T7) jeweils die Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) statt (A2; B2; C2). Zudem wurde eine Hellfeldaufnahme (A1; B1; C1) generiert und beide Aufnahmen überlagert (A3; B3; C3). Maßstab 100 µm. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5

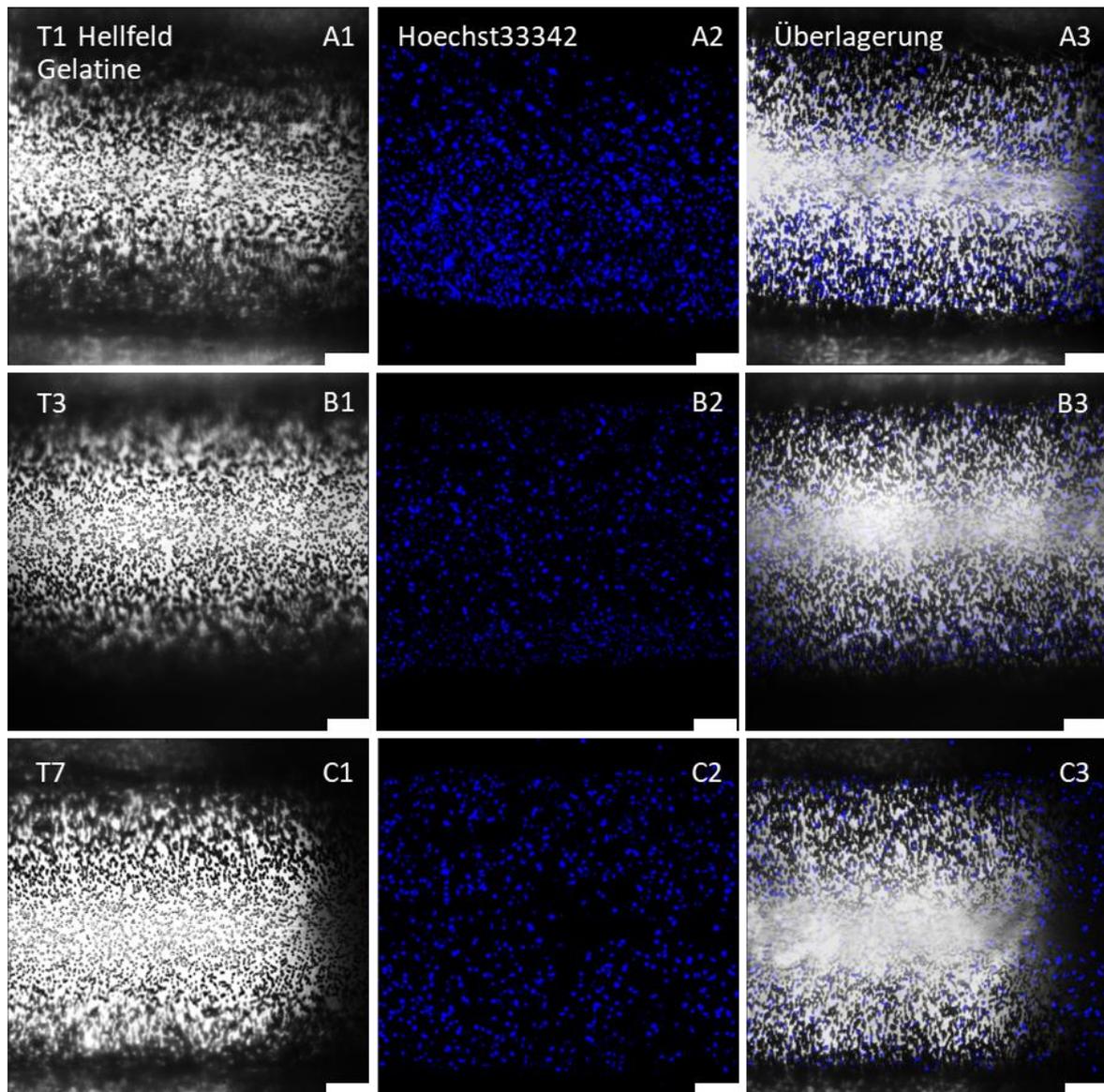


Abbildung 42: Statische Langzeitkultivierung von REC über 7 Tage im 1 µm porösen Mikrokanal mit Gelatine Beschichtung. Ein 1 µm poröser Mikrokanal wurde mit Gelatine (2 mg/cm²) für 1 h inkubiert und anschließend jeweils mit 1·10⁵ REC besiedelt. Nachdem die Zellen mit Hilfe des vasQturns gleichmäßig über die Mikrokanalfläche verteilt wurden, fand an den Tagen 1 (T1), 3 (T3) und 7 (T7) jeweils die Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml) statt (A2; B2; C2). Zudem wurde eine Hellfeldaufnahme (A1; B2; C2) generiert und beide Aufnahmen überlagert (A3; B3; C3). Maßstab 100 µm. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sich für die statische Kultivierung von REC im porösen Mikrokanal des vasQchips sowohl Gelatine als auch Laminin als Beschichtung eignen. Lediglich Kollagen I wies an Tag 7 einen inhomogenen Zelllayer auf ^[311], obwohl die Literatur belegt, dass Endothelzellen bei der Kultivierung auf Kollagen- und Gelatine Beschichtungen ein konfluenteres Endothel gegenüber anderen Beschichtungen aufweisen. Begründet werden kann dies durch die wichtige Rolle von Kollagen unter physiologischen Bedingungen wie der Wundheilung, bei der eine schnelle Proliferation der Endothelzellen erforderlich ist ^[390]. Zukünftig wurde, aufgrund der mikroskopischen Analyse und unter Einbeziehung des Kostenfaktors, für die statische Kultivierung der REC im porösen Mikrokanal des vasQchips eine Beschichtung mit Gelatine (0,1 %) gewählt.

4.5.3.2 Einfluss von Mikrofluidik auf die Kultivierung von REC im vasQchip

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Mikrofluidik auf die Adhäsion der REC im beschichteten Mikrokanal des vasQchips analysiert. Die Literatur zeigt, dass Beschichtungen über die Zeit instabil werden und daher langfristige Zellstudien in PDMS-Mikrokanälen unter physiologischen Scherstressbedingungen begrenzt sind ^[442]. Für eine mikrofluidische Kultivierung der REC wurde der Mikrokanal (1 μm Poren) des vasQchips mit Gelatine (2 mg/cm^2), Laminin (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder Kollagen I (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet. $1 \cdot 10^5$ REC wurden anschließend in den beschichteten Mikrokanal eingebracht und mit Hilfe des vasQturn homogen über die gesamte Fläche des Mikrokanals verteilt. Anschließend wurde der Mikrokanal mit einer Peristaltikpumpe verbunden und mit 0,05 ml/min für einen Zeitraum von 1 Tag, 3 Tagen oder 7 Tagen durchströmt. Nach Beenden der Kultivierungszeit wurden die Zellen an Tag 7 im Mikrokanal mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden die *Tight Junction* Proteine der REC mit Hilfe der Immunfluoreszenz durch einen monoklonalen Antikörper gegen ZO-1 nachgewiesen. Die Zellkerne wurden zudem mit Hoechst33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 μM) visualisiert. Dadurch konnte die Adhäsion der im porösen Mikrokanal befindlichen REC über die Zeit verfolgt und Aussagen über die Bildung eines konfluenten Endothels getroffen werden (**Abbildung 43**). Anhand der Immunfluoreszenzanalyse war erkennbar, dass mikrofluidische Kultivierung der REC im porösen Mikrokanal des vasQchips über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen möglich war. Dabei konnte die Ausbildung eines dichten Endothels auf allen eingesetzten Beschichtungen nachgewiesen werden. Bei einer Beschichtung mit Kollagen I (Abbildung A1-A8) konnte ein verbessertes Ergebnis gegenüber der statischen Kultivierung erzielt werden. Anhand der Färbung des Aktinzytoskeletts (Abbildung A2) wurde deutlich, dass sich über den Kultivierungszeitraum von 7 Tagen auch unter mikrofluidischen Einflüssen ein homogenes und dichtes Endothel über die Mikrokanaloberfläche ausbildete. Die *Tight Junctions* konnten deutlich durch den Antikörper gegen ZO-1 nachgewiesen werden (Abbildung A1). Kollagen stellte sich damit als geeignete Beschichtung für eine mikrofluidische Kultivierung der REC im Mikrokanal über 7 Tage heraus. Bei einer Beschichtung des porösen Mikrokanals mit Laminin (Abbildung B1-B8) konnten die Ergebnisse aus der statischen Kultivierung in der mikrofluidischen Kultivierung reproduziert werden. Anhand der Anfärbung des Aktinzytoskeletts (Abbildung B2) wurde deutlich, dass sich über den Kultivierungszeitraum von 7 Tagen unter mikrofluidischen Einflüssen ein weniger homogenes und dichtes Endothel über die Mikrokanaloberfläche ausbildete als bei Kollagen I. Laut Literatur ist ein kritischer Punkt der mikrofluidischen Perfusionskultivierung eine gute Zelladhäsion, um die Zellen durch die Medienperfusion nicht aus dem Mikrokanal zu spülen ^[120]. Die Wahl des Zellsubstratmaterials ist deshalb entscheidend für die Zelladhäsion in mikrofluidischen Systemen,

insbesondere für anspruchsvolle Zelltypen wie Primärzellen^[443]. Adhäsionsproteine verbessern die Adhäsion der Zellen im Mikrokanal^[444]. Nachdem die Zellen in den Mikrokanal eingebracht wurden, wird ihnen eine Adhäsion an das Zellsubstrat unter statischen Bedingungen erlaubt. Dabei sollte ein Nährstoff- und Sauerstoffmangel vermieden werden^[445]. Die Dauer dieser statischen Adhäsionszeit kann je nach Zelltyp, Zelldichte, Zellsubstrateigenschaften und Kulturmedium zwischen 2 Stunden^[120]^[446] und einer nächtlichen Inkubation^[447] variieren. Zudem wird Scherspannung in hohen Konzentrationen als limitierender Faktor in mikrofluidischen Systemen wahrgenommen. Ebenso ist das Vorhandensein von Luftblasen^{[448]; [449]} ein kritischer Punkt in mikrofluidischen Systemen, da diese den Medienfluss behindern und damit auch die Zellvitalität beeinträchtigen^[450]. Bei einer Beschichtung des porösen Mikrokanals mit Gelatine (Abbildung C1-C8) konnten die vielversprechenden Ergebnisse aus der statischen Kultivierung der REC reproduziert werden. Anhand der Visualisierung des Aktinzytoskeletts (A2) wurde deutlich, dass sich über den Kultivierungszeitraum von 7 Tagen unter mikrofluidischen Einflüssen ein homogenes und dichtes Endothel über die Mikrokanaloberfläche ausbildete. Die *Tight Junctions* konnten durch den immunhistochemischen Nachweis von ZO-1 visualisiert werden und waren ähnlich stark wie bei der Beschichtung mit Kollagen I ausgebildet (Abbildung A1). Obwohl eine Beschichtung des Mikrokanals mit Kollagen I unter fluidischen Bedingungen ein gutes Ergebnis erzielte, bildeten die REC auf einer Gelatine Beschichtung ein konfluenteres Endothel über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen. Neben dem geringeren Kostenfaktor gegenüber anderen Beschichtungen erwies sich Gelatine schon in der statischen Kultivierung von REC im Mikrokanal des vasQchips als gute Beschichtung.

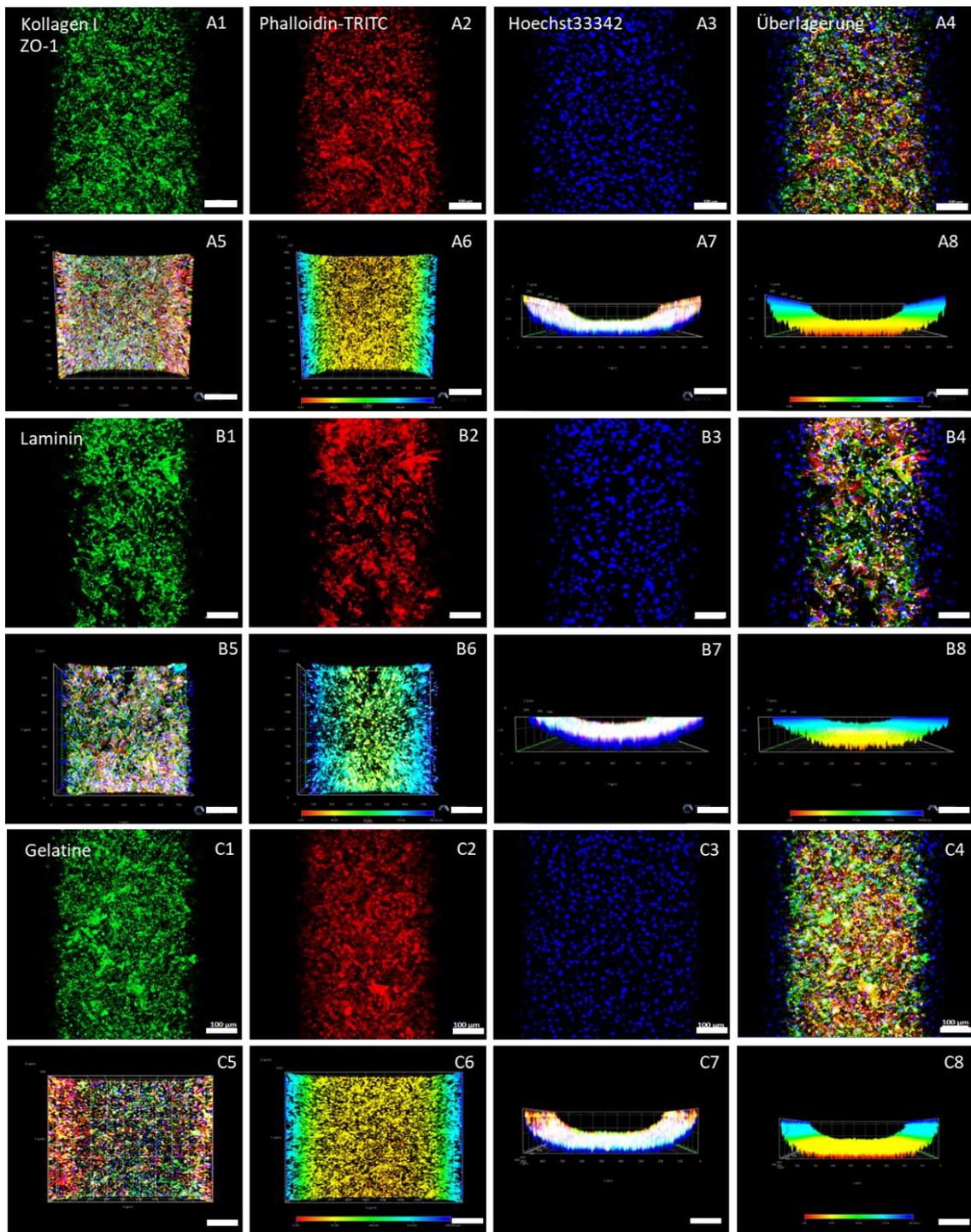


Abbildung 43: Mikrofuidische Kultivierung von REC im Mikrokanal des vasQchips über einen Zeitraum von 7 Tagen mit unterschiedlichen Beschichtungen. Der Mikrokanal ($1\ \mu\text{m}$ Poren) des vasQchips wurde mit Gelatine ($2\ \text{mg}/\text{cm}^2$), Laminin ($2\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder Kollagen I ($20\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet und für 1 h inkubiert. $1 \cdot 10^5$ REC wurden durch den Einsatz des vasQturns im Mikrokanal homogen verteilt und über einen Zeitraum von 1, 3 oder 7 Tagen im Mikrokanal mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mikrofuidisch bei einer Fließgeschwindigkeit von $0,05\ \text{ml}/\text{min}$ kultiviert. An Tag 7 wurden die REC im Mikrokanal mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. ZO-1 (A1; B1; C1) wurde durch eine Immunfluoreszenzanalyse der im Mikrokanal befindlichen REC visualisiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 ($2\ \mu\text{g}/\text{ml}$; A3; B3; C3) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC ($0,1\ \mu\text{M}$; A2; B2; C2) visualisiert. Die Adhäsion der REC im Mikrokanal unter fluidischen Bedingungen wurde konfokalmikroskopisch untersucht und die Zellstrukturen anhand von Z-Stack-Projektionen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt. Anhand der Tiefenfarbung fand eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Maßstab $100\ \mu\text{m}$. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5

Zusätzlich zu der Immunfluoreszenzanalyse wurde die Genexpression der Zell-Zellverbindungen untersucht. Dazu wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR die Genexpression ZO-1, CD31 und VE-Cadherin näher betrachtet, die eine wichtige Rolle bei der Gewebeintegrität und vaskulären Permeabilität spielen [165]; [124]; [451]. Für die Genexpressionsanalyse wurde der poröse Mikrokanal als Triplikat jeweils mit Gelatine (2 mg/cm²), Kollagen I (20 µg/cm²) oder Laminin (2 µg/cm²) beschichtet. Je 1*10⁵ Zellen in RECM wurden in den Mikrokanal eingebracht und mit Hilfe des vasQturns homogen über die poröse Mikrokanaloberfläche verteilt. Durch das anschließende Verbinden des Mikrokanals mit einer Peristaltikpumpe konnten die im Mikrokanal befindlichen REC bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,05 ml/h über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert werden. Anschließend wurde die RNA der Zellen durch TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde für die relative Quantifizierung der Genexpression eingesetzt, die mit Hilfe der RT-qPCR ermittelt wurde. Als Haushaltsgen diente dabei GAPDH, wobei die Quantifizierung der Ergebnisse in Relation zu dem Wachstum der REC auf einem mit Gelatine-beschichteten (2 mg/cm²) 24-Well betrachtet wurde (=1). Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet und sind in **Abbildung 44 A** graphisch dargestellt.

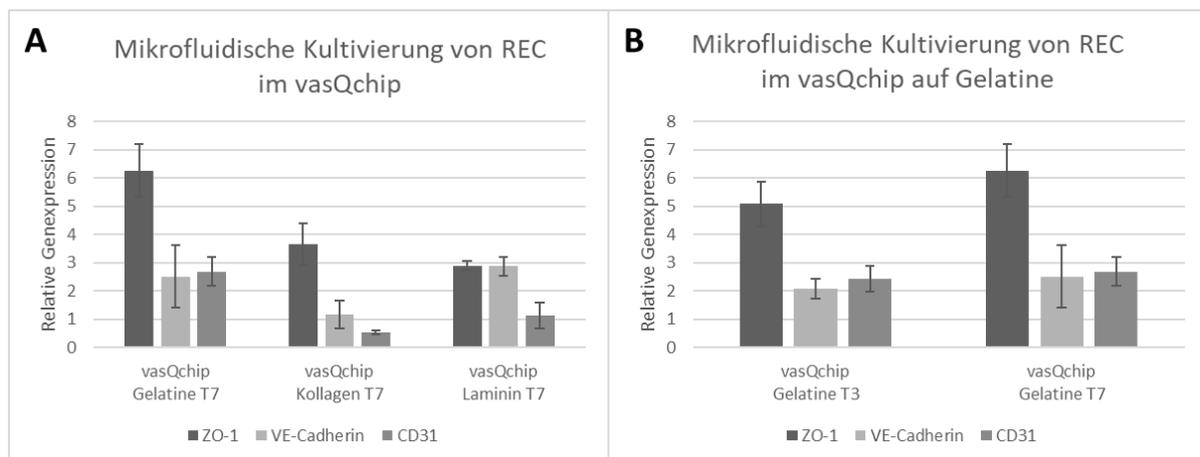


Abbildung 44: Genexpressionsanalyse der REC bei mikrofluidischer Langzeitkultivierung im Mikrokanal des vasQchips auf unterschiedlichen Beschichtungen über einen Zeitraum von 7 Tagen. A) Analysiert wurde die Genexpression von ZO-1, VE-Cadherin und CD31. Für die Genexpressionsanalyse wurden wie zuvor 1 µm poröse Mikrokanäle mit Gelatine (2 mg/cm²), Kollagen I (20 µg/cm²) sowie Laminin (2 µg/cm²) beschichtet. Je 1*10⁵ Zellen wurden in 20 µl RECM in den Kanal ausgebracht und nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen wurde die RNA der REC mit Hilfe von TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte für die relative Quantifizierung in der qPCR mittels SYBRGreen eingesetzt werden. Als Haushaltsgen diente GAPDH und die Ergebnisse wurde in Relation zu dem Wachstum der REC auf einem Gelatine (2 µg/cm²) beschichtetem 24-Well betrachtet. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. B) Zudem wurde die Genexpression der REC im mikrofluidischen Mikrokanal mit einer Gelatine Beschichtung nach 3 und nach 7 Tagen verglichen. n=3

An Tag 7 war bei allen Beschichtungen die Genexpression von ZO-1 und VE-Cadherin hochreguliert. Die Genexpression von CD31 war in REC auf einer Kollagen I Beschichtung runterreguliert (0,54 ± 0,16), wohingegen CD31 bei REC auf einer Gelatine- (2,68 ± 0,51) und Laminin-Beschichtung hochreguliert war. Dabei war CD31 in den REC auf einer Laminin-Beschichtung signifikant hochreguliert (P-

Wert=0,007). Insgesamt wurden die *Tight Junction* Proteine in den auf Gelatine kultivierten REC am stärksten exprimiert. Für die mikrofluidische Kultivierung von REC im Mikrokanal des vasQchips wurde daher Gelatine, vor Laminin und Kollagen I als Beschichtung eingesetzt.

Zusätzlich wurde die zeitliche Änderung des Genexpressionsprofils am Beispiel des mit Gelatine-beschichteten vasQchips analysiert. Dazu wurde die Genexpression von ZO-1, VE-Cadherin und CD31 nach einem Kultivierungszeitraum von 3 Tagen mit der Genexpression nach einem Kultivierungszeitraum von 7 Tagen verglichen (**Abbildung 44 B**). Anhand der quantitativen Analyse konnte gezeigt werden, dass sich die Genexpression der *Junction* Proteine unter mikrofluidischen Kultivierungsbedingungen zwischen Tag 3 und Tag 7 verändert. Im Vergleich zu Tag 3 waren alle *Tight Junction* Proteine an Tag 7 hochreguliert. Mit 18,82 % war der quantitative Unterschied der Genexpression von ZO-1 an Tag 7 im Vergleich zu Tag 3 am größten. Die Literatur belegt, dass Gelatine gegenüber anderen Beschichtungen die Zellaktivität unter mikrofluidischen Kultivierungsbedingungen am besten aufrechterhalten kann, wobei Studien mit HUVEC zeigten, dass die Zellen auf einer Gelatinebeschichtung eine starke Adhäsion zum Zellkultursubstrat aufwiesen und einen stabilen Zelllayer unter Scherstress beibehielten ^{[452]; [453]}. Zudem waren auf Gelatine kultivierte Zellen über einen langen Kultivierungszeitraum viabel und wiesen bereits nach 2 Kultivierungstagen ein konfluentes Endothel auf ^{[454] [453]}. Gelatine ist zudem geeignet die hydrophilen Eigenschaften von PDMS zu verbessern ^[453]. Auch wenn einige Studien Gelatine in Bezug auf die Adhäsion von Endothelzellen als weniger geeignet beschreiben, hängt dies vorrangig mit dem Ursprung der Endothelzellen zusammen ^{[374]; [164]; [429]}. Da Gelatine eine kostengünstige, biokompatible und stabile Alternative zu herkömmlichen EZM Materialien darstellt ^[455], wurde diese für die mikrofluidische Kultivierung der murinen REC im Mikrokanal des vasQchips gewählt.

4.5.4 Einbringen des RPEs in *Organ-on-chip* Systeme

Im nächsten Schritt für die Darstellung einer *in vivo* ähnlichen oBRB *im vasQchip* wurde das RPE im umgebenden Kompartiment etabliert. Dafür wurden im vasQchip RPE-Vorläuferzellen von DD11 aus der Differenzierung von mESC-Rx-GFP eingebracht und in funktionales RPE differenziert (**Abbildung 45**).

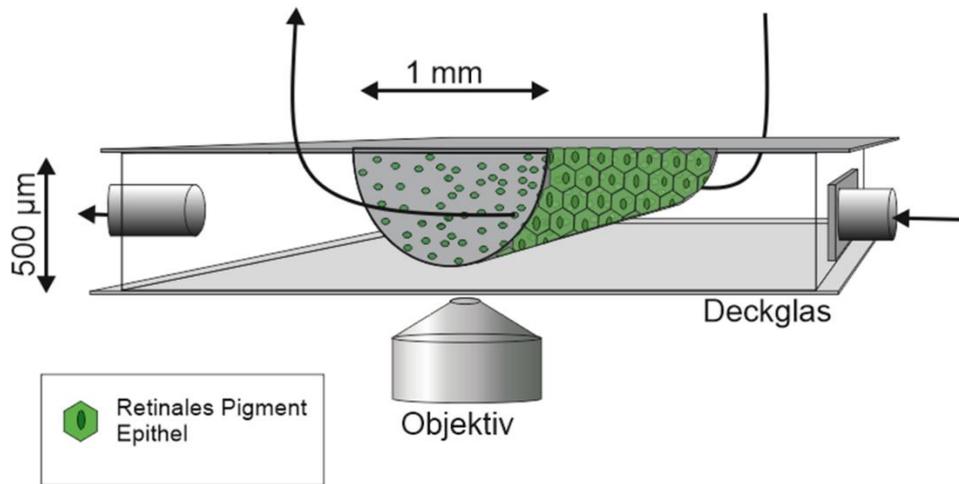


Abbildung 45: Schematische Darstellung des differenzierten RPEs aus mESC-Rx-GFP im umgebenden Kompartiment des vasQchips.

4.5.4.1 Einfluss der Porengröße auf die RPE Differenzierung

Da die poröse PC-Membran als Grenzfläche zwischen dem Endothel und dem RPE dient, musste eine für beide Zellarten passende Porengröße identifiziert werden. Da die REC auf einer Porengröße von $1\ \mu\text{m}$ kultiviert wurden, sollte analysiert werden, ob dies auch eine geeignete Porengröße für die Kultivierung des RPEs darstellt. Um herauszufinden, auch welcher Porengröße das RPE am besten differenziert werden konnte, wurde die Differenzierung der mESC-Rx-GFP auf PC-Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen verglichen. Dazu wurde die entsprechende poröse PC-Membran ($1\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m}$) in eine 48 Well-Kultivierungsplatte eingebracht und mit Laminin ($1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 1 h inkubiert. Auf die beschichtete PC-Membran wurden anschließend RPE-Vorläuferzellen von DD11 ($1 \cdot 10^6$ Zellen pro $3,5\ \text{cm}^2$) ausgebracht und bis DD18 zu RPE differenziert. Anschließend wurde das differenzierte RPE mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz (**Abbildung 46**) wurde das *Tight Junction* Protein ZO-1 im differenzierten RPE visualisiert. Die Visualisierung der Zellkerne wurden mit einer Hoechst33342 Färbung ($2\ \mu\text{g}/\text{ml}$) erreicht und die des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-TRITC ($0,1\ \mu\text{M}$). Bei einer konfokalmikroskopische Analyse wurden anhand von *Z-Stack*-Projektion die Zellstrukturen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt. Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Durch die Immunfluoreszenzanalyse wurde deutlich, dass die RPE-Vorläuferzellen von DD1 auf einer Porengröße von $1\ \mu\text{m}$ am besten adhären und zu RPE differenzieren konnten. Insgesamt konnte RPE auf der mit Laminin-beschichteten PC-Membran mit einer Porengröße $1\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$ oder $5\ \mu\text{m}$ bis DD18 differenziert werden. Anhand der Literatur kann belegt werden, dass RPE auf mit Laminin- oder Fibronectin-beschichteten Filtermembranen eine schnellere Konfluenz aufwiesen als auf unbeschichteten Filtermembranen ^[456]. Grund für die Wahl der Beschichtung stellt die Expression von Laminin auf der basalen Seite des RPEs

an DD9 der RPE-Differenzierung dar ^[276] sowie die Synthese von Laminin111 im frühen Entwicklungsstadium des RPEs *in vivo* ^[457] ^[42]. In anderen Studien werden Transwells mit einer Porengröße von 0,4 μm und einer Dicke von 10 μm für die Kultivierung von primärem RPE aus dem Schwein eingesetzt ^[458]. Die stark ausgeprägten *Tight Junctions* weisen auf eine hohe Barriereintegrität hin, welche verantwortlich für den selektiven Transport zwischen Endothel und Retina ist ^[165]. Da die Differenzierung des RPEs auf einer PC-Membran mit 1 μm Poren morphologisch charakteristische Zellen hervorbrachte und zudem die *Tight Junctions* gut ausgebildet waren, wurde diese Porengröße für die Etablierung des RPEs im vasQchip gewählt.

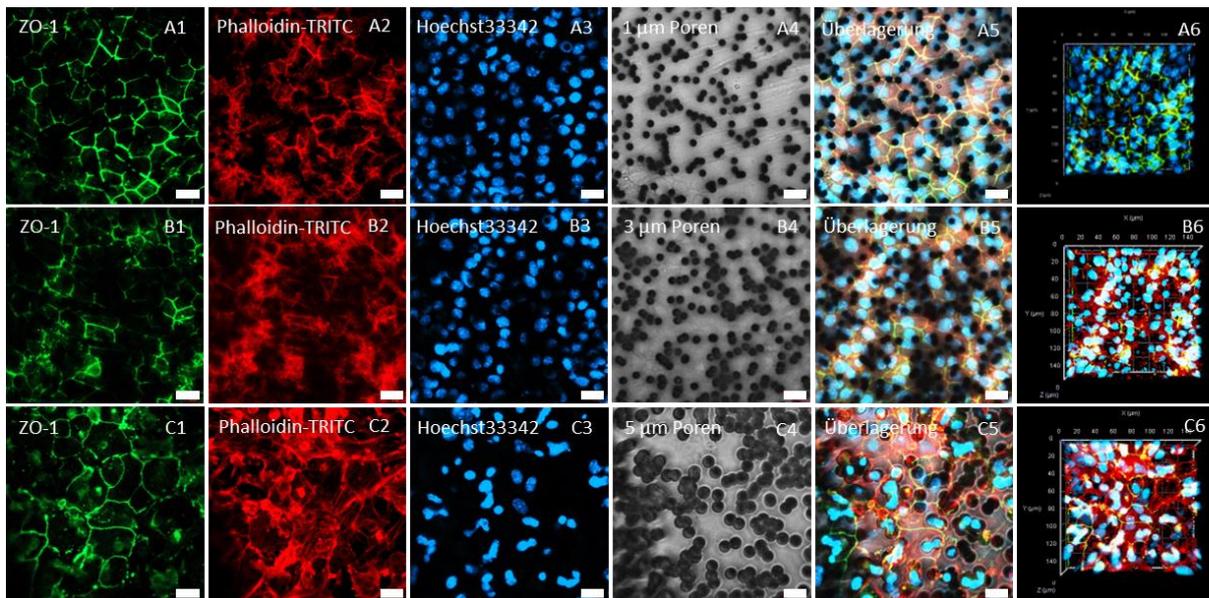


Abbildung 46: Differenzierung von RPE aus mESC-Rx-GFP auf PC-Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen. 1 μm , 3 μm und 5 μm poröse PC-Membranen wurden in eine 48 Well-Kultivierungsplatte eingebracht und mit $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin für 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden RPE Vorläuferzellen an DD11 darauf ausgesät und bis DD18 zu RPE differenziert. Anschließend wurde das RPE mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton (0,1%; 4 min; RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Es folgte die Visualisierung von ZO-1 mit Hilfe der Immunfluoreszenz (A1; B1; C1). Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (A3; B3; C3)) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 μM (A2; B2; C3)) visualisiert und konfokalmikroskopisch untersucht. Anhand von *Z-Stack*-Projektion wurden die Zellstrukturen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt. Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (A6; B6, C6). Zudem wurde die poröse PC-Membran mit Hilfe der Hellfeldaufnahme veranschaulicht (A4; B4; C4) und alle 2D Aufnahmen in einer Überlagerung zusammengeführt (A5; B5; C5). Maßstab 20 μm . Carl Zeiss LSM8000

4.5.4.2 Kultivierung des RPEs im vasQchip

Nachdem eine geeignete Porengröße für die Differenzierung des RPEs aus mESC-Rx-GFP auf der PC-Membran des vasQchips identifiziert wurde, folgte im nächsten Schritt das Einbringen des RPEs in das umgebende Kompartiment des vasQchips. Dazu wurden aus je $3 \cdot 10^3$ mESC-Rx-GFP in 96-ULW Kultivierungsplatten Organoide in RDM generiert. Die GFP-positiven Organoide wurden an DD7 aufgebrochen und auf eine mit Laminin-beschichtete 12-Well Kultivierungsplatte mit RMM2 überführt.

An DD11 wurden die RPE-Vorläuferzellen selektiert und im umgebenden Kompartiment des vasQchips auf die poröse PC-Membran über dem Laminin-beschichteten Mikrokanal ausgebracht (200 μl ; $1 \cdot 10^6$ Zellen pro $3,5 \text{ cm}^2$). Nachdem die Zellen nach 6 h adhärirt waren konnte der vasQchip mit einem Deckglas verschlossen werden. Die Differenzierung des RPEs im umgebenden Kompartiment war nicht erfolgreich, da die RPE-Vorläuferzellen aufgrund der Mikrokanalgeometrie nur schwer adhärirten konnten. Für die Differenzierung der Zellen zu RPE ist eine sehr hohe Zelldichte an DD11 nötig, die für die Fläche des umgebenden Kompartiments nur schwer aufzubringen war. Das geringe Volumen in dem die RPE-Vorläuferzellen ausgebracht wurden stellte einen zusätzlichen Stressfaktor dar, der die Differenzierung beeinflusste [339]; [459]. Dass die RPE-Differenzierung nicht aufgrund des Oberflächenmaterials verhindert wurde zeigt die erfolgreiche Differenzierung des RPEs im Laminin-beschichteten Mikrokanal mit $1 \mu\text{m}$ Poren (Anhang: **Abbildung 86**). Dass die Kultivierung von RPE in *Organ-on-chip* Systemen prinzipiell möglich ist zeigen auch andere Studien, in denen ein mikrofluidisches *Organ-on-chip* Modell der oBRB generiert wurde. Dieses beinhaltete einen Zelllayer aus humanem immortalisiertem RPE, das durch eine semipermeable Membran von den im Mikrogefäß befindlichen Endothelzellen getrennt war [124]. Im Organismus liegt das RPE nicht direkt auf der Außenseite des Choroids an, sondern bildet als dichter Zelllayer eine Barriere oberhalb [341]. Um erfolgreich RPE im umgebenden Kompartiment des vasQchips zu differenzieren, muss die Geometrie an die Anforderungen der Zellen angepasst werden. Das Einbringen eines Hydrogels über dem Mikrokanal kann die Zelladhäsion vereinfachen [460]. Dazu ist es notwendig, den Abstand vom Deckglas zum Mikrokanal zu vergrößern, um ein ausreichend großes Volumen für die Differenzierung des RPEs im umgebenden Kompartiment bereitzustellen. Der vasQchip ist jedoch aufgrund seines Materials aus Polymethylmethacrylat (PMMA) und der Produktionsart schwierig innerhalb kurzer Zeit anzupassen [461]. Bei der Konstruktion von *Organ-on-chip* Systemen ist daher darauf zu achten, dass die Gerüste schnell und flexibel modelliert und verändert werden können [61]. Auch wenn der vasQchip nicht für die Etablierung der oBRB weiterverwendet werden konnte, weisen entsprechende Optimierungen in der Zukunft jedoch das Potenzial für eine erfolgreiche RPE-Differenzierung und Kultivierung im umgebenden Kompartiment auf.

4.6 Etablierung der oBRB in einem Hydrogel basierten *Organ-on-chip* System

Es gibt zahlreiche Übersichten zu mikrofluidischen Zellkulturplattformen [450]; [128]; [462] [463]; [464] für den Einsatz in der biologischen Forschung [465]; [445]; [466] mit unterschiedlichem Design der mikrofluidischen Systeme, die das Potenzial zur Untersuchung von Erkrankungen aufweisen [145] [467] [309]. Kürzlich wurden Hydrogelsubstrate mit Mikrokanälen entwickelt, die eine 3D-Zellkulturumgebungen bereitstellen und mikrofluidisch kultiviert werden können [468]; [124]; [444]; [469].

Für die Rekonstruktion der oBRB in einem *Organ-on-chip* System wurde während eines kollaborativen Auslandsaufenthaltes in der AG Huang (University of Cambridge, UK) ein auf die Bedürfnisse der retinalen Zellen angepasstes Hydrogel-basierte (*HB-flow*) System entwickelt. Eine schematische Darstellung des Hydrogel basierten *Organ-on-chip* Systems ist in **Abbildung 47** zu sehen. Der im Hydrogel befindliche zirkuläre Mikrokanal kann mit Endothel ausgekleidet werden und mikrofluidisch in einer 3D Mikroumgebung kultiviert werden. Zudem besteht die Möglichkeit das RPE auf der Hydrogeloberfläche über dem Mikrokanal zu differenzieren und zu kultivieren. Hydrogele können je nach Ursprung in natürliche, semi-synthetische und Synthetische Hydrogele unterteilt werden. Sie sind biokompatible, biofunktionale Biomaterialien, die kontrollierbare Eigenschaften aufweisen^{[91]; [470]; [471]}. Hydrogele bestehen aus einem hydrophilen Polymernetzwerk, das die Fähigkeit besitzt eine große Menge Wasser aufzunehmen. Da sich Hydrogele auch für den Einsatz bei Transplantationen eignen, hat das *HB-flow* System zukünftig das Potential Einsatz in der therapeutischen Medizin zu finden^[135].

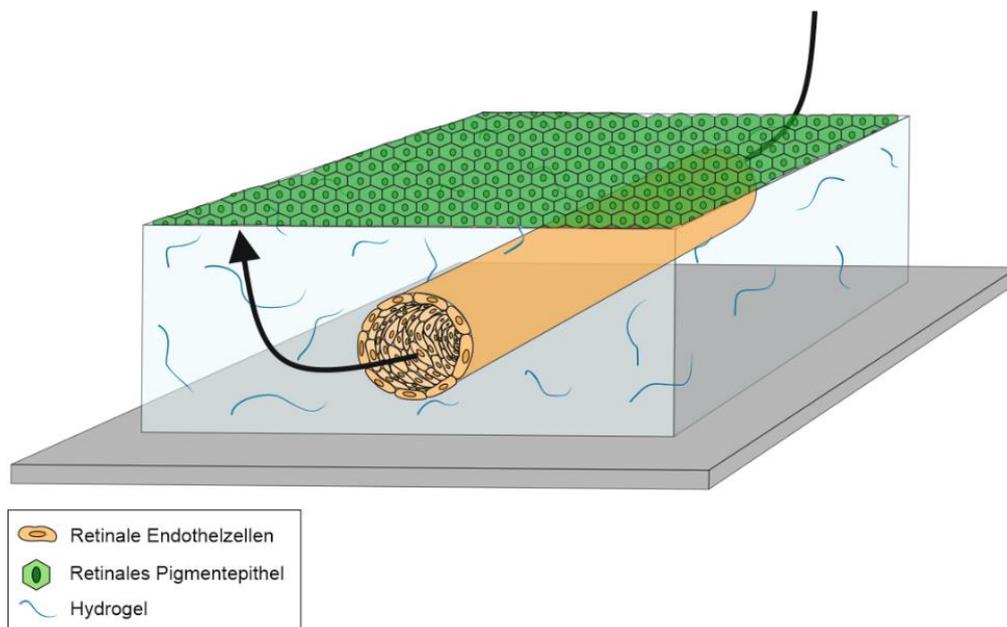


Abbildung 47: Schematische Darstellung des *HB-flow* Systems mit rekonstruierter oBRB. Dabei dient als EZM Matrix ein Hydrogel. Im Mikrokanal des Hydrogels befinden sich retinale Endothelzellen und auf dem Hydrogel RPE. Durch Verbindung des Mikrokanals mit einem Pumpensystem ist eine mikrofluidische Kultivierung möglich.

4.6.1 Herstellung der Gerüststruktur

Zum Erstellen des *HB-flow* Systems wurde im ersten Schritt mit Hilfe eines extrusionsbasierten 3D-Druckers eine Gerüststruktur aus Polydimethylsiloxan (SE1700) auf einem Deckglas generiert. Der zum Druck der Struktur verwendete extrusionsbasierte 3D-Drucker wurde im Zuge des Promotionsprojektes von Dr. Iek Man Lei in der AG Huang an der University of Cambridge entworfen und gebaut. Extrusionsbasiertes *Bioprinting* ist derzeit das am weitesten verbreitete *Bioprinting*-

Verfahren, bei dem kontinuierlich Material aus der Drucknadel extrudiert wird. Dazu werden 3D-Modelle über Computergrafiksoftware wie CAD/CAM entworfen und dienen dem *Bioprinter* als Druckanleitung. Auch wenn im Vergleich zu anderen Druckverfahren die Auflösung auf etwa 100 μm begrenzt ist ^[116], stehen für dieses druckbasierte Verfahren ein breites Spektrum an biokompatiblen Materialien zur Verfügung ^{[104] [472]; [473]}. Üblicherweise werden thermisch vernetzbare Materialien oder Materialien mit strukturviskosen Eigenschaften für Mikroextrusionsanwendungen verwendet ^[105]. Das Grundgerüst des *HB-flow* Systems wurde mit einer konischen 25 G Nadel auf einem, mit Ethanol befestigten Deckglas gedruckt (**Abbildung 48**). Als Biotinte wurde SE1700, ein beständiges transluzentes Silikon eingesetzt und durch die Inkubation bei 60 °C über 24 h ausgehärtet. Dabei wurde das zweiteilige Silikonelastomer (SE1700; Dow Chemical) mit dem Katalysator in einem Verhältnis von 10:1 (w/w) gemischt ^[474]. Zwei gegenüberliegende Aussparungen (rote Pfeile) in der Gerüststruktur dienen einem späteren Zugang zur Mikrofluidik.

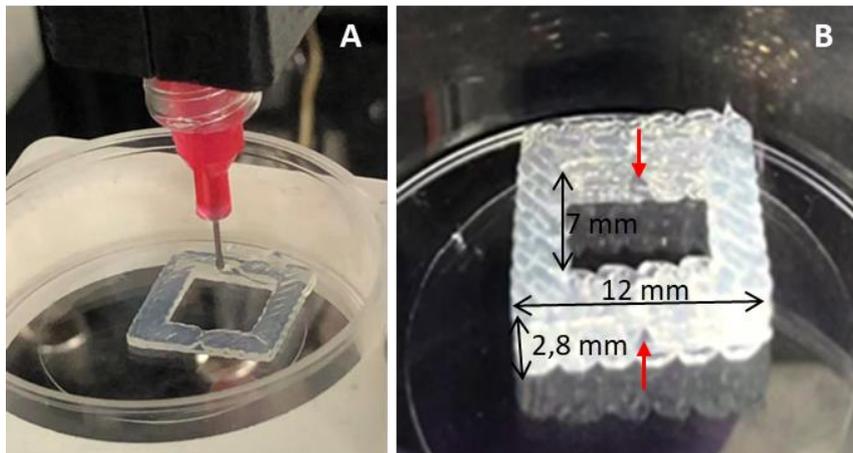


Abbildung 48: 3D gedruckte Gerüststruktur des *HB-flow* Systems aus SE1700. Das Grundgerüst des *HB-flow* Systems besteht aus SE1700, einem beständigen transluzenten Silikon, welches im 3D Biodruck eingesetzt und durch die Inkubation bei 60 °C über 24 h ausgehärtet werden kann. SE 1700 ist eine Silikontinte, die aus einem zweiteiligen Silikonelastomer (SE 1700; Dow Chemical) aus Basis und Katalysator in einem Verhältnis von 10:1 (w/w) eingesetzt wird. A) Für den Druck der Struktur wurde ein extrusionsbasierter 3D-Drucker verwendet, der im Zuge des Promotionsprojektes von Dr. Iek Man Lei in der AG Huang an der University of Cambridge (UK) gebaut wurde. B) Die Maße der Gerüststruktur betragen 12 mm an der Außenkante, 7 mm an der Innenkante und 2,8 mm in der Höhe. Die Durchmesser der Aussparungen betragen etw 0,51 mm, sodass eine 26 G Nadel durchgeführt werden kann.

Nach dem Aushärten des Grundgerüsts konnte dieses unter UV-Licht sterilisiert werden und so Einsatz in der Zellkultur finden ^[475].

4.6.2 Hydrogele zur Kultivierung von REC und RPE

Die zelluläre Mikroumgebung spielt eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Zellverhaltens und der Zellfunktion ^[452]. Da die Grundlage des *HB-flow* Systems ein Hydrogel darstellt, sollte im nächsten Schritt ein geeignetes EZM- Analogon identifiziert werden. Dafür wurde das Zellwachstum in und auf

unterschiedlichen Hydrogelen charakterisiert. Diese Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt. In einer 96-Well Kultivierungsplatte (*U-shaped*) wurden B129 REC, differenziertes mESC-Rx-GFP RPE sowie ARPE19 Zellen auf unterschiedlichen Hydrogelen ausgebracht. Die ARPE-19 Zellen sind eine spontan entstandene humane RPE-Zelllinie mit normaler Karyologie mit der Fähigkeit ein polarisiertes Epithel mit RPE-charakteristischen Markern auszubilden ^[268]. Um die Adhäsion und Viabilität der Zellen vergleichen zu können, wurden Hydrogele mit unterschiedlichen Eigenschaften eingesetzt. Unterteilt nach ihrem Ursprung wurden synthetische Hydrogele wie PEGDA, semi-synthetische Hydrogele wie GelMA und GelN/S, sowie natürliche Hydrogele wie Kollagen und Fibrin verwendet. Die Hydrogele wurden entsprechend vernetzt und für die Kultivierung von $9,4 \cdot 10^4$ RPE-Vorläuferzellen von DD11 mit Laminin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 h) beschichtet. Anschließend wurden die RPE-Vorläuferzellen bis DD18 zu RPE differenziert. Die Endothelzellen wurden in einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ je 96-Well Kultivierungsplatte in zellspezifischem Medium auf einer mit *Speed Coating* beschichteten Hydrogeloberfläche ausgebracht. $5 \cdot 10^4$ ARPE19 Zellen hingegen wurden in einer 96-Well Kultivierungsplatte ohne zusätzliche Beschichtung auf der Hydrogeloberfläche ausgebracht. Als jeweilige Kontrolle diente die Kultivierung der Zellen in entsprechend beschichteten Kultivierungsplatten ohne Hydrogel für einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen.

Zusätzlich wurden die Endothelzellen in den Hydrogelen integriert. Dazu wurden $1 \cdot 10^5$ REC in einem Hydrogel integriert und dieses in einem μ -Slide 8-Well in einem Volumen von 200 μl vernetzt. Die Hydrogele wurden anschließend mit zellspezifischem Kultivierungsmedium über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. An Tag 1, 3 und 7 wurde jeweils ein Lebend-/Tot-Nachweis mit Calcein-AM und PI durchgeführt, um die Viabilität der in den Hydrogelen befindlichen Endothelzellen zu analysieren.

4.6.2.1 PEGDA Hydrogele

Synthetische Hydrogele auf Basis von Poly(ethylenglycol) (PEG) wurden in den letzten zwei Jahrzehnten aufgrund ihrer kontrollierbaren Vernetzungsdichte zunehmend im *Tissue Engineering* eingesetzt ^[476]. Insbesondere acrylierte oder methacrylierte PEG-Derivate sind einfach in der Handhabung, da sie durch Licht einer spezifischen Wellenlänge zu Hydrogelen polymerisiert werden können ^[477]. Die Substitution von endständigen Hydroxylgruppen durch Acrylate unter Bildung von Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA) ermöglicht die anschließende Vernetzung des Polymers zu einem dreidimensionalen Polymernetzwerk ^[476]. PEGDA ist ein hydrophiles Polymer, das in vernetztem Zustand eine große Menge Wasser aufnehmen kann ^{[477]; [97]}. Die Strukturformel ist in **Abbildung 49** dargestellt.

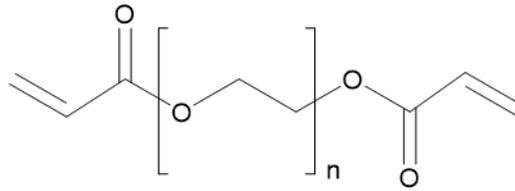


Abbildung 49: Strukturformel von Poly(Ethylenglycol)diacrylat (PEGDA), einem hydrophilen Polymer.

Das PEGDA Hydrogel wurde aus 0,1 g/ml PEGDA erstellt und durch Zugabe von LAP (1 %) in einem Volumen von 100 μ l durch ein Licht spezifischer Wellenlänge (500 mW/cm²; 60 s) zu einem Hydrogel vernetzt (**Abbildung 50**). PEG-Peptid-Hydrogele basieren auf der Thiol-En-Photopolymerisation mit schrittweisem Wachstum ^[478], weshalb die resultierenden Netzwerke homogener sind und eine höhere Umwandlung an funktionellen Gruppen im Vergleich zu kettenwachstumspolymerisierten Hydrogelen mit ähnlicher Vernetzungsdichte aufweisen. Die Thiol-En-Photopolymerisation wird aufgrund der schnellen und orthogonalen Reaktion zwischen den Alken- und Thiol-Funktionalitäten als „Klick“-Reaktion angesehen. ^[74] Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle konnten keine der verwendeten Zellarten auf der Oberfläche des PEGDA-Hydrogels adhären. Vergleiche mit der Literatur zeigen, dass RPE-Zellen unterschiedliche Adhäsionsmuster auf verschiedenen Substraten aufweisen. Dabei konnte ein positiver Einfluss der Funktionalisierung von PEGDA mit der Zelladhäsionsproteinsequenz zugesprochen werden ^[479]. Da weder RPE noch Endothelzellen auf dem PEGDA Hydrogel kultiviert werden konnten, das Hydrogel jedoch Hauptbestandteil des *HB-flow* Systems ist, wurde keine Lebend-/Tot-Färbung von Endothelzellen im PEGDA-Hydrogel durchgeführt.

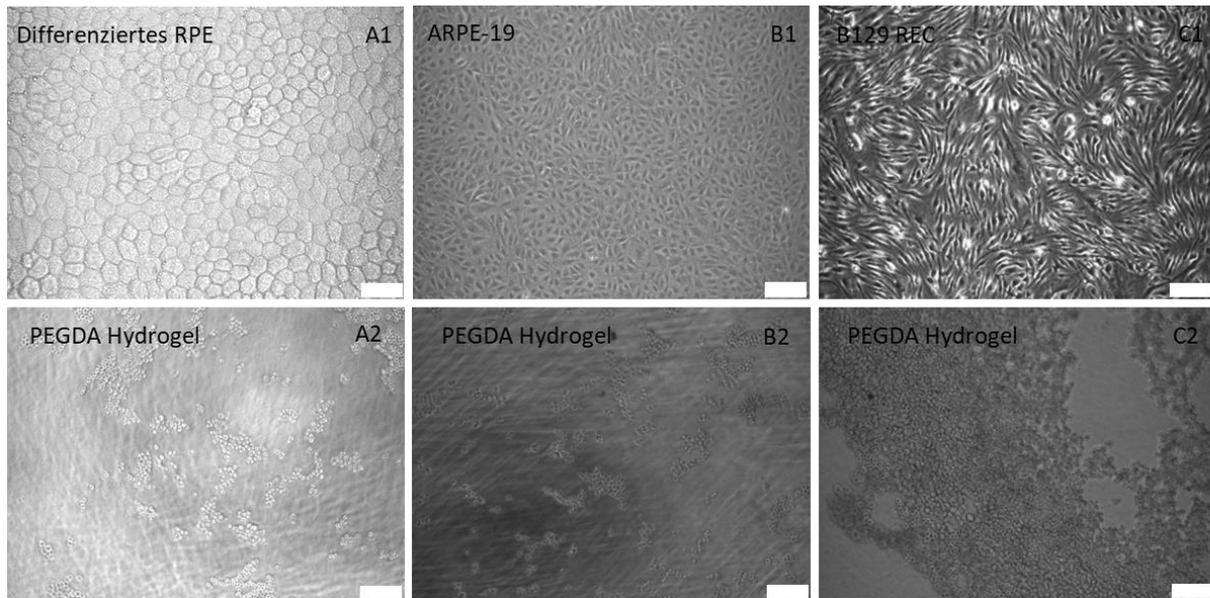


Abbildung 50: Kultivierung von Zellen der oBRB auf PEGDA Hydrogelen. Ein Hydrogel aus 0,1 g/ml PEGDA mit 1 % LAP in einem Volumen von 100 μ l erstellt und mit einer Strahlungsintensität von 500 mW/cm² für 60 Sekunden vernetzt. $5 \cdot 10^4$ REC wurden in RECM pro 96-Well auf das mit *Speed Coating* beschichtete PEGDA-Hydrogel ausgebracht (C2). Als Kontrolle diente ein mit *Speed Coating* beschichtetes Well (C1). Nach der Beschichtung des PEGDA Hydrogels mit Laminin (1 μ g/cm²; 1 h) wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE- Vorläuferzellen von DD11 in RMM2 auf der beschichteten Hydrogeloberfläche ausgebracht und bis DD18 differenziert (A2). Als Kontrolle diente ein Lamininbeschichtetes Well zur Kultivierung der RPE-Vorläuferzellen (A1). $5 \cdot 10^4$ ARPE-19 Zellen wurden ohne weitere Beschichtung auf der PEGDA-Hydrogeloberfläche in ARPE-M ausgebracht (B2). Für die Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an ARPE19 Zellen in ein unbeschichtetes Well ausgesät. Der Kultivierungszeitraum betrug 7 Tage. Maßstab 50 μ m. Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop

4.6.2.2 Fibrinhydrogel

Das natürlich vorkommende Fibrin wird in der Regel aus humanem oder tierischem Plasma gewonnen und besitzt deshalb eine hohe Biokompatibilität. Die Bildung eines Fibrinhydrogels basiert auf seinem natürlichen Polymerisationsprozess mit Thrombin nach einer Gefäßverletzung^{[480]; [481]}. Thrombin spaltet zwei kleine Aminosäuresequenzen in den Aminotermini der α - und β -Kette des Fibrinvorläufers Fibrinogen. In Folge dessen werden Strukturen innerhalb des Moleküls freigelegt, die zu einem 3D-Fibrinnetzwerk durch Polymerisation einzelner Fibrinogen-Moleküle führen. Eine weitere Stabilisierung dieses Netzwerks kann durch kovalente Vernetzung, katalysiert durch den Faktor XIIIa, erreicht werden^[480]. Ein Fibrinhydrogel aus 5 mg/ml Fibrinogen und Thrombin (2 U/ml) wurde in einem Volumen von 100 μ l durch Inkubation (10 min) bei RT polymerisiert. Nachdem die Hydrogeloberfläche entsprechend beschichtet wurde konnten die Zellen darauf ausgebracht werden (**Abbildung 51**).

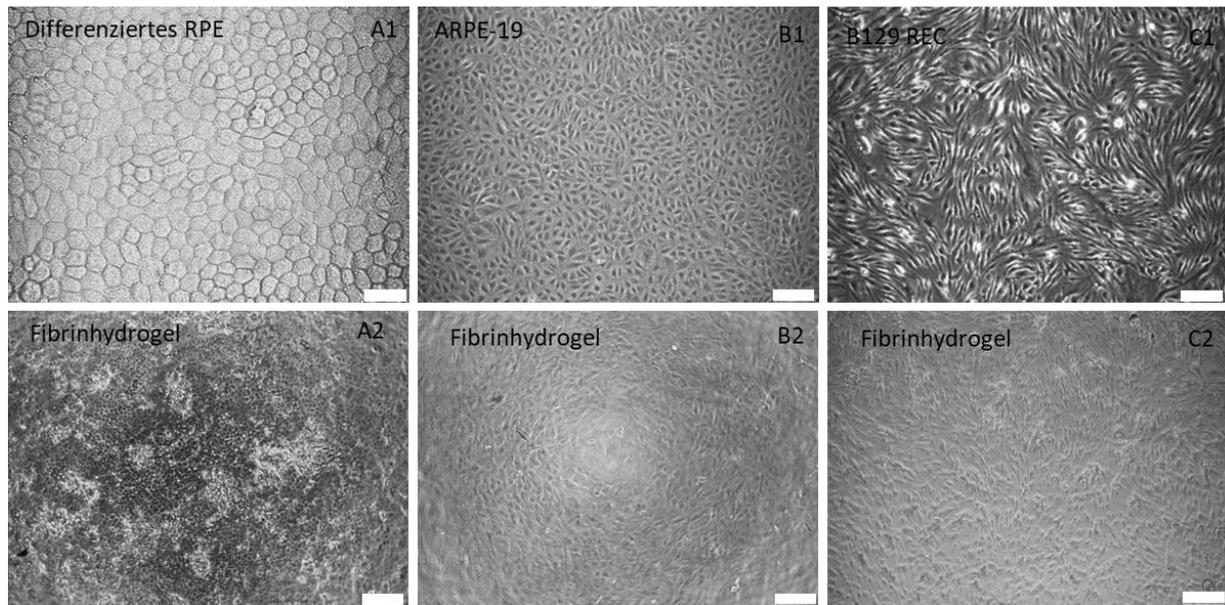


Abbildung 51: Kultivierung von Zellen der oBRB auf Fibrinhydrogelen. Ein Hydrogel aus 5 mg/ml Fibrinogen und 2 U/ml Thrombin wurde in einem Volumen von 100 μ l erstellt und zur Polymerisation für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. REC wurden in RECM in einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ pro 96-Well auf das mit *Speed Coating* beschichtete Fibrinhydrogel ausgebracht (C2). Als Kontrolle diente eine mit *Speed Coating* beschichtete Well (C1). Nach der Beschichtung des Fibrinhydrogels mit Laminin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 h) wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE-Vorläuferzellen von DD11 in RMM2 auf der beschichteten Hydrogeloberfläche ausgebracht und bis DD18 differenziert (A2). Als Kontrolle diente ein Laminin-beschichtetes Well zur Kultivierung der RPE-Vorläuferzellen (A1). $5 \cdot 10^4$ ARPE-19 Zellen wurden ohne weitere Beschichtung auf der Fibrin-Hydrogeloberfläche in ARPE-M ausgebracht (B2). Für die Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an ARPE19 Zellen in ein unbeschichtetes Well ausgesät. Der Kultivierungszeitraum betrug 7 Tage. Maßstab 50 μ m (A1) / 200 μ m. Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop.

Verglichen mit der jeweiligen Kontrolle konnten alle Zelltypen auf dem Fibrinhydrogel wachsen. Zudem war es möglich, die RPE-Vorläuferzellen von DD11 bis DD18 zu RPE zu differenzieren. An DD18 war die charakteristische Morphologie der RPE-Zellen erkennbar. Die Literatur beschreibt ebenfalls den Einsatz dünner Fibrinhydrogele als Trägermaterial für die Transplantation von RPE als geeignet ^[482]. Auch die REC konnten auf der Oberfläche des Fibrinhydrogels adhären und über den Kultivierungszeitraum einen dichten Endothelzelllayer bilden. Daher wurden REC in das Fibrinhydrogel integriert und deren Viabilität durch einen Lebend-/Tot-Nachweis charakterisiert. Dazu wurden Fibrinhydrogele aus 5 mg/ml Fibrinogen mit Thrombin (2 U/ml) sowie $1 \cdot 10^5$ REC in einem μ -Slide 8-Well (200 μ l) erstellt und über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit Calcein-AM (4 μ M) und PI (20 μ g/ml) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Signale für lebende Zellen von Calcein (grün) und die für tote Zellen von PI (rot) anhand von *Z-Stack*-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (**Abbildung 52**). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Für eine quantitative Bestimmung der Viabilität wurden mit der Software FIJI die Anzahl der fluoreszierenden Zellen gezählt und die mittlere Fluoreszenz von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt.

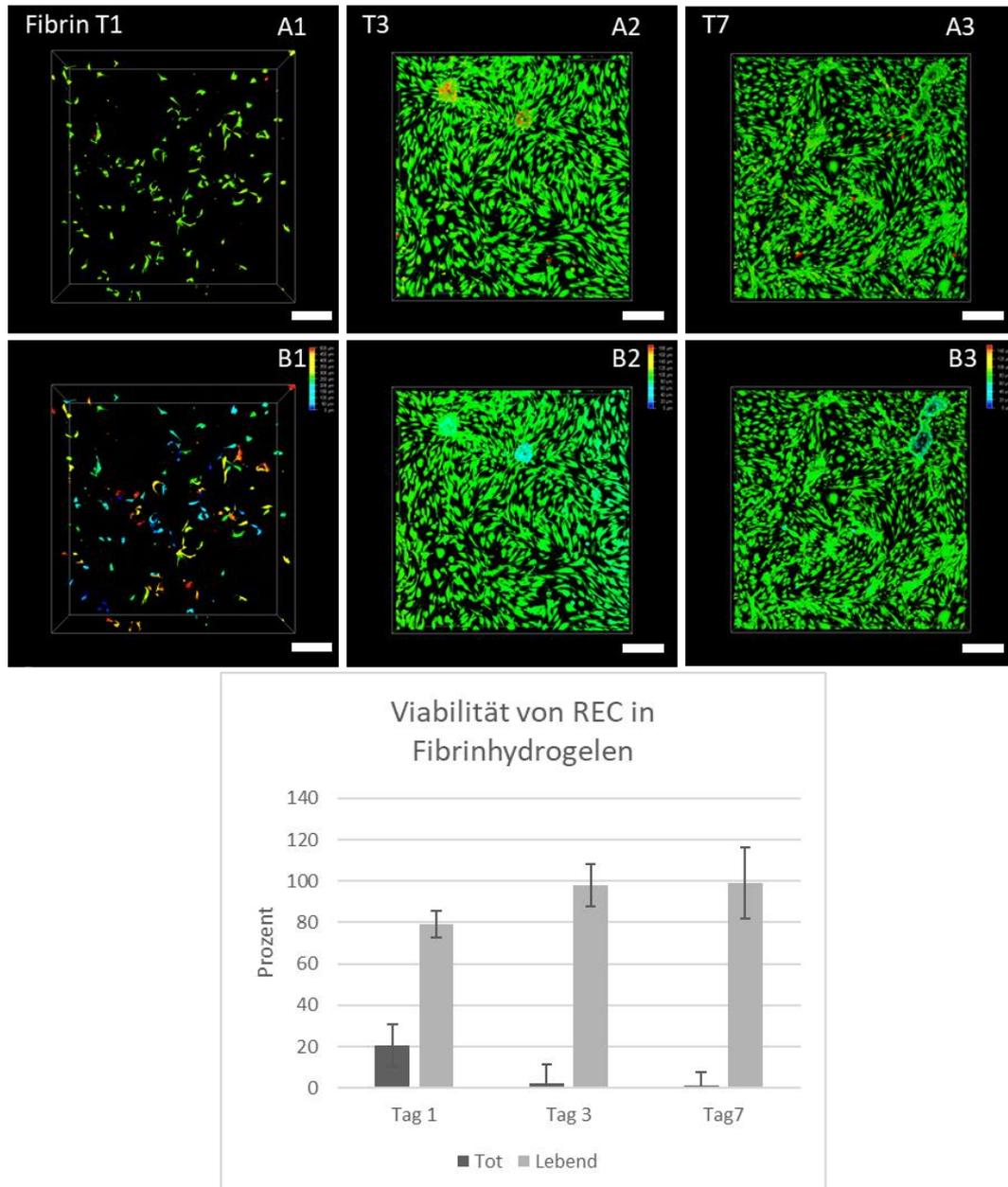


Abbildung 52: Viabilitätsnachweis der REC im Fibrinhydrogel über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen durch eine Lebend-/Tot-Färbung. Dazu wurden Fibrinhydrogele aus 5 mg/ml Fibrinogen und 2 U/ml Thrombin sowie $1 \cdot 10^5$ REC in einem μ -Slide 8-Well in einem Volumen von 200 μ l erstellt. Die Kultivierung der Hydrogele fand über einen Zeitraum von 7 Tagen statt, wobei eine Lebend-/Tot-Charakterisierung jeweils an den Tagen 1, 3 und 7 vorgenommen wurde. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit 4 μ M Calcein und 20 μ g/ml PI in 250 μ l RECM für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Signale von Calcein (grün) für lebende Zellen und die von PI (rot) für tote Zellen anhand von Z-Stack-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (A1; A2; A3). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (B1; B2; B3). Mit der Software FIJI wurden zudem die jeweiligen Signale gezählt und die mittlere Anzahl gezählter Signale von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt. Maßstab 100 μ m. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala: 0 μ m = blau; 500 μ m = rot. 50 μ m Schritte.

Anhand des Lebend-/Tot-Nachweises konnte gezeigt werden, dass die REC an Tag 1 im Fibrinhydrogel homogen über das ganze Hydrogel verteilt waren und sich bereits in Teilen ausgebreitet haben. Dabei war der Anteil an toten Zellen gegenüber den lebenden (68,1 %) deutlich geringer. An Tag 3 konnte

kein Fibrinhydrogel mehr nachgewiesen werden, was anhand der Tiefenfärbung erkennbar war. Die verbliebenen Zellen waren am Boden adhärirt, wobei auch hier der Anteil an lebenden Zellen (81,6 %) im Vergleich zu den Toten überwog. An Tag 7 war der Anteil der am Wellboden adhärirten toten REC zwar gestiegen, aber deutlich geringer als der Anteil der lebenden Zellen (71 %). Eine Kultivierung von REC in einem Hydrogel aus 5 mg/ml Fibrinogen war über den Kultivierungszeitraum von 7 Tagen nicht möglich. Fibrin ist der wichtigste extrazelluläre Bestandteil und ^[118] fördert die Proliferation der Endothelzellen ^{[483]; [118]}. In der Literatur wird ebenfalls von dem Problem des schnellen Abbaus von Fibrinhydrogelen durch dessen fehlende mechanische Eigenschaften berichtet ^[118]. Ursache dafür ist der proteolytische Abbau von Fibrin durch Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen und Plasmin ^[484]. Plasminogen, der Vorläufer von Plasmin, ist in den meisten Fibrinpräparaten vorhanden und wird durch Plasminogenaktivatoren gespalten. Diese wiederum werden von Zellen *in vitro* und *in vivo* produziert, um das aktive Fibrin-abbauende Enzym Plasmin zu hemmen ^[292]. Matrix-Metalloproteinasen werden zudem von fast allen Zelltypen produziert oder aktiviert ^{[485]; [484]}. Im *Tissue Engineering* wird die Fibrinolyse häufig durch die Blockierung der Plasminbildung bei der Vaskularisierung eingesetzt, um die Abbaurrate *in vivo* und *in vitro* zu kontrollieren ^{[486]; [485]; [487]}. Zu diesem Zweck wird üblicherweise der Serinprotease-Inhibitor Aprotinin verwendet, um der Plasminogenaktivierung entgegenzuwirken ^{[485]; [484]; [487]}. Die Anwesenheit von Aprotinin kann jedoch auch zur Reduktion von kapillarähnlichen Endothelzellstrukturen im Fibrinhydrogel führen ^{[487]; [484]}. Andere Mittel zur Kontrolle der Stabilität des Fibrinhydrogels umfassen das Mischen von Fibrin mit einem anderen stabileren Material ^{[488]–[490]; [487]}. Die chemische Konjugation von Aprotinin an Fibrinogen kann dessen Diffusion verhindern und stabilisiert das Fibrinhydrogel bis zu 4 Tage ^{[491] [485]}.

4.6.2.3 Kollagen I Hydrogele

Ein weiteres natürliches Hydrogel ist das Kollagen I Hydrogel. Kollagen I wird typischerweise aus der Sehne des Rattenschwanzes gewonnen das unter niedrigem pH-Wert in Pepsin gelöst und bei niedriger Temperatur gelagert wird. Es weist aufgrund seiner Zelladhäsionsliganden strukturelle und mechanische Eigenschaften von nativem Gewebe auf und ist enzymatisch abbaubar. Durch Änderung des pH-Wertes und der Temperatur bildet Kollagen I ein fibrilläres Gerüst ähnlich dem der EZM ^[71]. Für das Kollagenhydrogel wurde 1 mg/ml Kollagen I durch die Zugabe von NaOH für 30 min polymerisiert. Nachdem die Hydrogeloberfläche entsprechend beschichtet wurde konnten die Zellen ausgebracht werden. Alle Zelltypen konnten im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle auf dem Kollagenhydrogel adhäririeren (**Abbildung 53**). Zudem war es möglich, die RPE-Vorläuferzellen von DD11 bis DD18 zu RPE mit charakteristischer Zellmorphologie zu differenzieren. Auch REC konnten auf dem Kollagen I Hydrogel adhäririeren und als konfluentes Endothel kultiviert werden. Daher wurden REC in das Kollagen I Hydrogel integriert und deren Viabilität durch einen Lebend-/Tot-Nachweis charakterisiert.

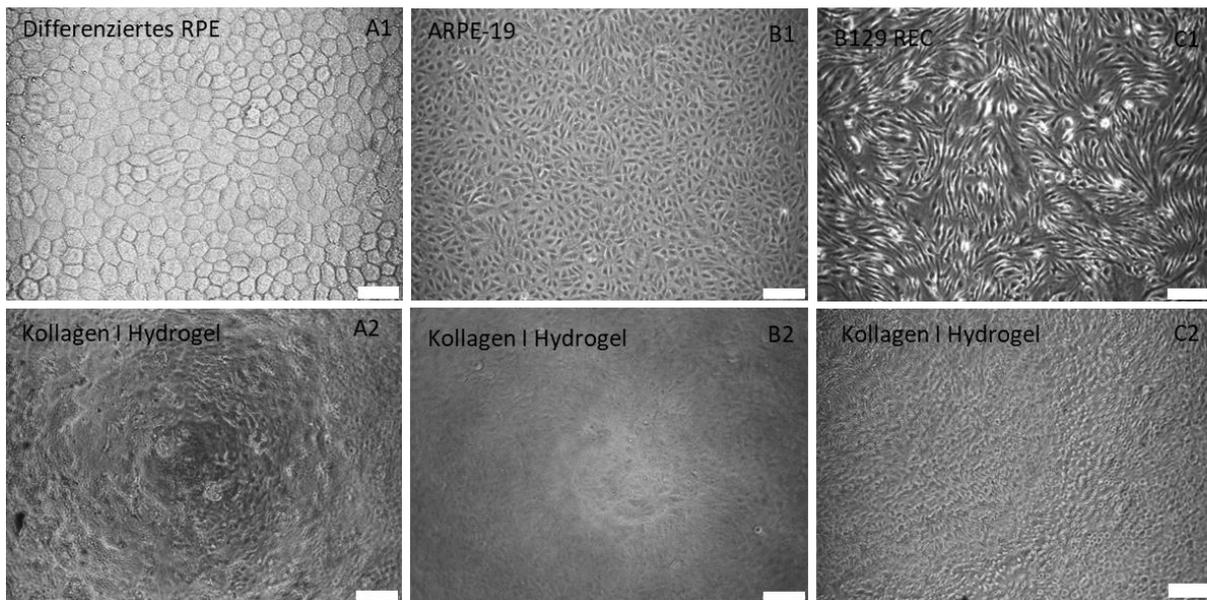


Abbildung 53: Kultivierung von Zellen der oBRB auf Kollagen I Hydrogelen. Ein Hydrogel aus 1 mg/ml Kollagen I in einem Volumen von 100 μ l wurde erstellt und mit NaOH für 30 min inkubiert. $5 \cdot 10^4$ REC wurden in RECM auf das mit *Speed Coating* beschichtete PEGDA-Hydrogel im 96-Well ausgebracht (C2). Als Kontrolle diente ein mit *Speed Coating* beschichtetes Well (C1). Nach der Beschichtung des PEGDA Hydrogels mit Laminin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 h) wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE-Vorläuferzellen von DD11 in RMM2 auf der beschichteten Hydrogeloberfläche ausgebracht und bis DD18 differenziert (A2). Als Kontrolle diente ein Laminin-beschichtetes Well zur Kultivierung der RPE-Vorläuferzellen (A1). $5 \cdot 10^4$ ARPE-19 Zellen wurden ohne weitere Beschichtung auf der Kollagen I Hydrogeloberfläche in ARPE-M ausgebracht (B2). Für die Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an ARPE19 Zellen in ein unbeschichtetes Well ausgesät. Der Kultivierungszeitraum betrug 7 Tage. Maßstab 50 μ m (A1) / 100 μ m. Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop

Daher wurden Kollagen I Hydrogele mit unterschiedlichen Kollagen I Konzentrationen (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml) und jeweils $1 \cdot 10^5$ REC in einem μ -Slide 8-Well (200 μ l) erstellt. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit Calcein-AM (4 μ M) und PI (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Fluoreszenz für lebende Zellen von Calcein (grün) und die für tote Zellen von PI (rot) anhand von *Z-Stack*-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt. Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Für eine quantitative Bestimmung der Viabilität wurden mit der Software FIJI die Anzahl der fluoreszierenden Zellen gezählt und die mittlere Fluoreszenz von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt (**Abbildung 54**).

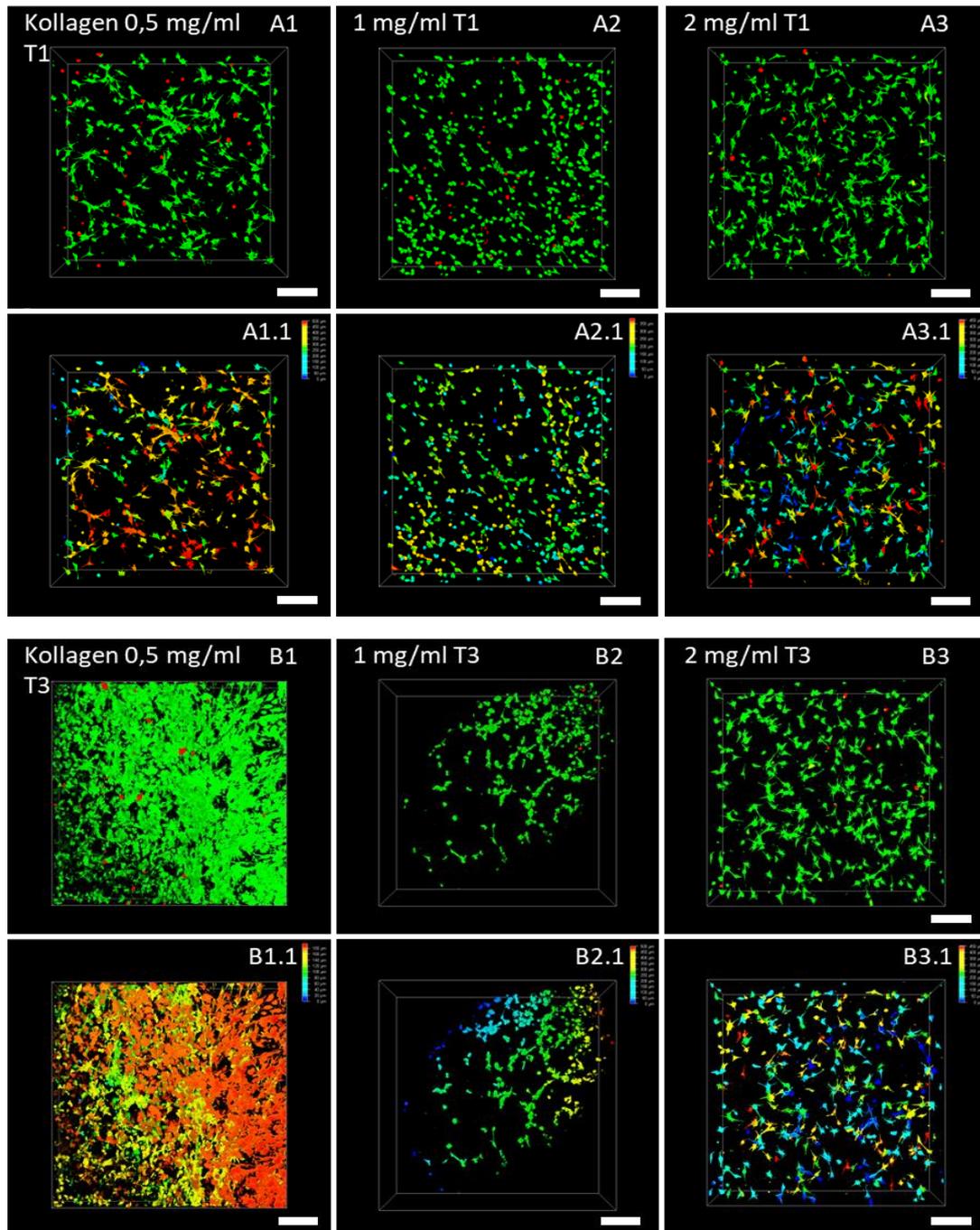


Abbildung 54: Viabilitätsnachweis der REC im Kollagen I Hydrogel durch eine Lebend-/Tot-Färbung an Tag 1 und 3. Dazu wurden Kollagenhydrogele aus unterschiedlichen Kollagen I Konzentrationen (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml) mit jeweils $1 \cdot 10^5$ REC in einem μ -Slide 8-Well in einem Volumen von 200 μ l erstellt. Für die Polymerisation wurde das Hydrogel mit NaOH versehen und für 30 min inkubiert. Eine Lebend-/Tot-Charakterisierung wurde jeweils an den Tagen 1 (A1; B1) und 3 (A2; B2) vorgenommen. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit 4 μ M Calcein-AM und 20 μ g/ml PI in 250 μ l RECM für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Signale von Calcein (grün) für lebende Zellen und die von PI (rot) für tote Zellen anhand von Z-Stack-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (A1; A2; A3.1; B1; B2; B3). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (A1.1; A2.1; A3.1; B1.1; B2.1; B3.1). Mit der Software FIJI wurden außerdem die jeweiligen Signale gezählt und die mittlere Anzahl gezählter Signale von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt. Maßstab 100 μ m. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala: 0 μ m= blau; 500 μ m =rot.

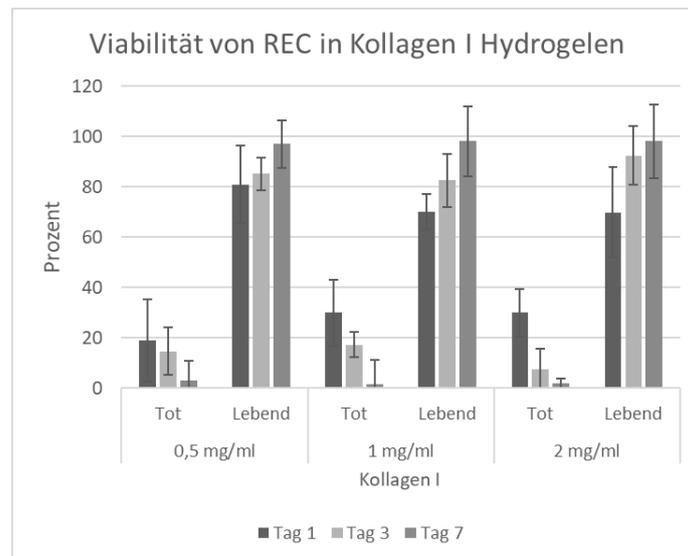
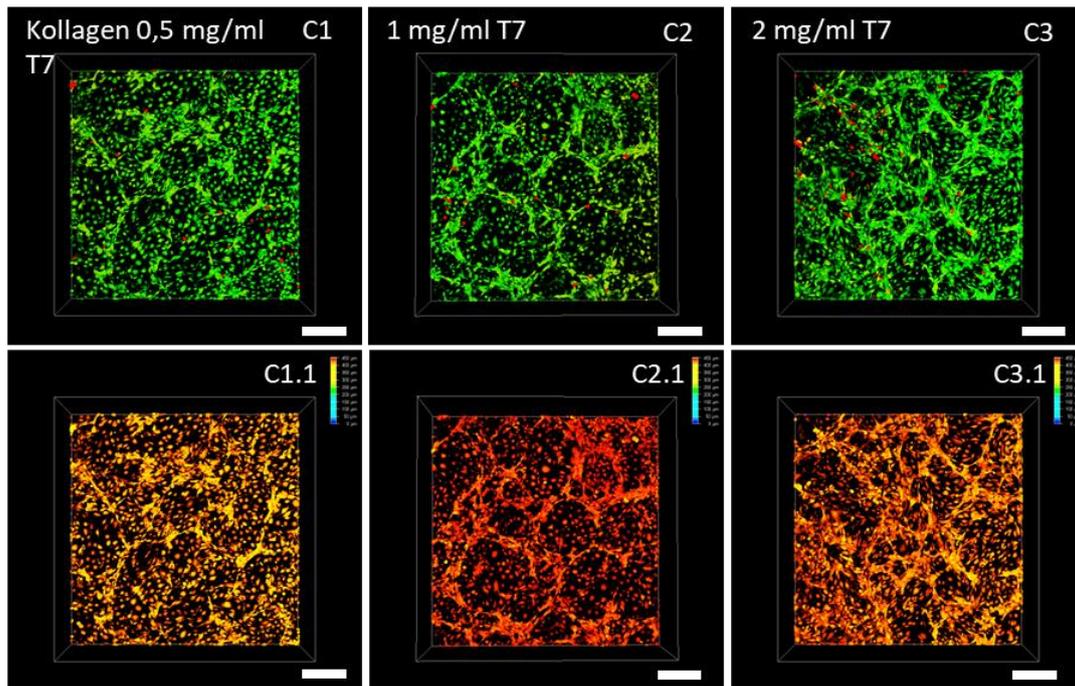


Abbildung 55: Viabilitätsnachweis der REC im Kollagen I Hydrogel durch eine Lebend-/Tot-Färbung an Tag 7. Dazu wurden Kollagenhydrogele aus unterschiedlichen Kollagen I Konzentrationen (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml) mit jeweils $1 \cdot 10^5$ REC in einem μ -Slide 8-Well in einem Volumen von 200 μ l erstellt. Für die Polymerisation wurde das Hydrogel mit NaOH versehen und für 30 min inkubiert. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit 4 μ M Calcein-AM und 20 μ g/ml PI in 250 μ l RECM für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Signale von Calcein (grün) für lebende Zellen und die von PI (rot) für tote Zellen anhand von Z-Stack-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (C1-C3). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (C1.1-C3.1). Mit der Software FIJI wurden zudem die jeweiligen Signale gezählt und die mittlere Anzahl gezählter Signale von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt. Maßstab 100 μ m. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala: 0 μ m = blau; 500 μ m = rot.

Anhand des Lebend-/Tot-Nachweises konnte gezeigt werden, dass die REC an Tag 1 im Kollagenhydrogel mit 0,5 mg/ml Kollagen I homogen über das ganze Hydrogel verteilt waren und begannen sich auszubreiten. Dabei lag der Anteil an toten Zellen (19 %) deutlich unter dem der lebenden Zellen (81 %). An Tag 3 war anhand der Tiefenfärbung erkennbar, dass kein Kollagenhydrogel

(0,5 mg/ml) mehr vorhanden war, weshalb die Zellen am Wellboden adhärten. Dabei war der prozentuale Anteil an toten Zellen (14,8 %) gegenüber dem 1. Kultivierungstag gesunken und betrug etwa 1/5 der lebenden Zellen (85,2 %). An Tag 7 war der Anteil der am Wellboden adhärten lebenden Zellen (97 %) im Vergleich zum 3. Kultivierungstag nochmals angestiegen und der Anteil der toten REC auf ein Minimum gesunken (3 %). Im Kollagenhydrogel mit 1 mg/ml Kollagen I waren die Zellen an Tag 1 ebenfalls homogen über das gesamte Hydrogel verteilt und fingen an, sich in Teilen auszubreiten. Der Anteil an toten Zellen (30 %) war im Vergleich zum 0,5 mg/ml Kollagen I Hydrogel deutlich höher und der Prozentsatz an lebenden Zellen (70 %) geringer. Anhand der Tiefenfärbung war erkennbar, dass das Kollagen I Hydrogel an Tag 3 nur noch teilweise vorhanden war. Die darin befindlichen Zellen wiesen gegenüber Kultivierungstag 1 einen deutlich geringeren Anteil an Zellen (17,3 %) auf. Der Anstieg an lebenden Zellen (82,6 %) spricht für eine gute Proliferation. An Tag 7 waren die Zellen am Wellboden adhärnt, da sich das Hydrogel vollständig aufgelöst hatte. Daher sank der Prozentsatz an toten REC deutlich (1,8 %), während der Anteil an lebenden Zellen bis fast aufs Maximum anstieg. Im Kollagenhydrogel mit 2 mg/ml Kollagen I waren die Zellen homogen über das ganze Hydrogel verteilt und begannen sich bereits an Tag 1, im Vergleich zu den anderen Kollagen I Konzentrationen am stärksten auszubreiten. Dennoch war der Anteil an toten Zellen ähnlich wie bei der Kollagen I Konzentration von 1 mg/ml, genauso wie der Anteil an lebenden Zellen (69,9 %). Anhand der Tiefenfärbung war erkennbar, dass an Tag 3 das Kollagenhydrogel mit 2 mg/ml Kollagen I noch vollständig erhalten war. Dabei war der Anteil an lebenden Zellen im Hydrogel stark angestiegen (92,5 %). Wie bei den anderen Kollagen I Konzentrationen war auch bei dem 2 mg/ml Kollagen I Hydrogel nach 7 Kultivierungstagen kein Hydrogel mehr vorhanden. Der Anteil der am Wellboden adhärten lebenden REC war daher wie zu erwarten nochmals angestiegen (98,1 %). Die längste Kultivierung von REC konnte in einem Hydrogel mit 2 mg/ml Kollagen I über 3 Tage vorgenommen werden. Kollagen ist der Hauptbestandteil der EZM, wobei Kollagen I am häufigsten Einsatz als Hydrogel findet. Laut Literatur erlauben Kollagen-Konzentrationen zwischen 1,2 bis 1,9 mg/ml eine gute Zellproliferation und -migration ^{[492]; [118] [493]; [414]}, weshalb die gewählte Konzentration von 0,5 mg/ml Kollagen I zu gering war. Die Gelierungskinetik von Kollagenhydrogelen ist abhängig vom pH-Wert und der Temperatur, mit einem Optimum bei pH 8 und 37 °C, wobei diese Konditionen den Stress gegenüber den Zellen minimiert ^{[118]; [494]}. Die limitierenden mechanischen Eigenschaften von Kollagen I für einen längeren Kultivierungszeitraum, können durch Kombination von Kollagen I mit synthetischen Polymeren oder Nanopartikeln verringert werden ^{[495] [118]; [71] [496]}. Der durch Metalloproteinasen, einschließlich Kollagenasen, verursachte Abbau des Kollagen I Hydrogels beeinflusst die mechanische Steifheit der Gerüststruktur und kann durch den Einsatz von Kollagenase in einer Konzentration zwischen 0,1 und 5 U/ml verlangsamt werden ^[414].

4.6.2.4 GelMA Hydrogele

Semi-synthetische Hydrogele vereinen die Vorteile von synthetischen und biologischen Hydrogelen, indem sie die Möglichkeit bieten, deren mechanische und biochemische Eigenschaften zu steuern und damit reproduzierbare Ergebnisse generiert werden können ^[133]. Gelatinemethacrylat (GelMA) zählt zu den semi-synthetischen Hydrogelen und wurde erstmals als Derivat von Gelatine durch Van Den Bulcke et al. beschrieben und synthetisiert ^{[94]; [497] [497]}. GelMA ist ein photopolymerisierbares Hydrogel aus der modifizierten natürlichen EZM-Komponente Gelatine. Die zugegebenen Methacrylatgruppen werden an die Amine der Gelatine substituiert und verbinden sich dann durch eine lichtbasierte Polymerisation zu einem Hydrogel ^[452]. Durch die Zugabe unterschiedlicher Äquivalentmengen an Methacrylsäure (MAA) konnten verschiedene Funktionalisierungsgrade von GelMA erstellt werden. Synthetisiert wurden die Hydrogele von M. Sc. Alisa Grimm und M. Sc. Sonja Leopold. Die Vernetzungsreaktion von GelMA ist in **Abbildung 56** dargestellt.

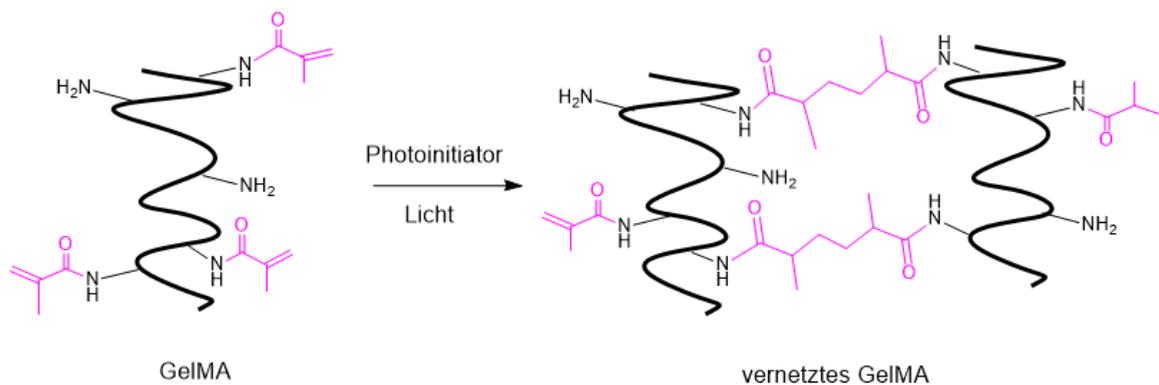


Abbildung 56: Vernetzungsreaktion von Gelatinemethacrylat. GelMA wurde durch Einbau von Methacrylatgruppen an die aminhaltigen Seitengruppen von Gelatine synthetisiert. Der Methacrylierungsgrad kann durch den Prozentsatz der Lysingruppen, die durch die Methacrylatgruppen substituiert sind, kontrolliert werden. Die Vernetzung des GelMAs durch Initiierung einer radikalischen Polymerisation findet durch Zugabe eines Photoinitiators und mit Hilfe einer Lichtquelle mit spezifischer Wellenlänge statt.

Ein 4 %iges GelMA Hydrogel (8 Äq) wurde in einem Volumen von 100 µl erstellt und durch Zugabe von 0,3 % LAP vernetzt (30 s; RT; 500 mW/cm²). Die Äquivalente (Äq) beziehen sich dabei auf die Menge an zugegebenem Methacrylanhydrid während der Synthese ^[498]. Die vernetzten Hydrogele wurden entsprechend beschichtet und die Zellen anschließend auf der Hydrogeloberfläche ausgebracht (**Abbildung 57**). Verglichen mit der jeweiligen Kontrolle konnten weder die ARPE-19 Zellen noch die RPE-Vorläuferzellen aus der Differenzierung von mESC-Rx-GFP auf dem GelMA Hydrogel adhären. Die RPE-Vorläuferzellen von DD11 bildeten kleine Aggregate statt eines flächigen Zelllayers und die ARPE19 Zellen formatierten sich in einer netzwerkartigen Struktur. Daher war es nicht möglich, die DD11 RPE Vorläuferzellen bis DD18 zu RPE zu differenzieren. Die REC konnten dagegen gut auf der Hydrogeloberfläche adhären. Auch die Literatur beschreibt die Adhäsion von humanen

Endothelzellen der Nabelschnur auf GelMA Hydrogelen, nicht jedoch auf PEG ^{[452]; [73]}, wie auch die Ergebnisse dieses Experiments bestätigen. Zudem demonstrieren Studien, dass höhere Konzentrationen an Gelatine zu einer besseren Zelladhäsion führen ^{[499]; [73]} und die Viabilität von in GelMA Hydrogelen integrierten Zellen langfristig aufrechterhalten werden kann ^{[452]; [500]; [501]}.

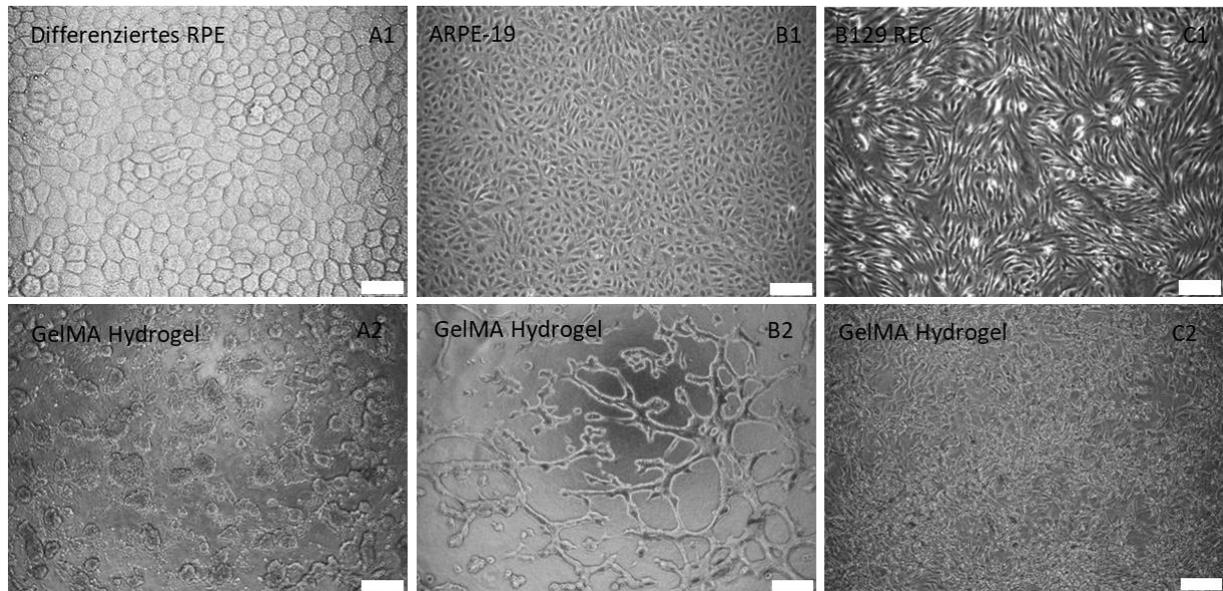


Abbildung 57: Kultivierung von Zellen der oBRB auf GelMA Hydrogelen. Ein Hydrogel aus 4 %igem GelMA 8 Äq wurde in einem Volumen von 100 µl erstellt und mit einer Strahlungsintensität von 500 mW/cm² für 60 Sekunden vernetzt. 5*10⁴ REC wurden in RECM pro 96-Well auf das mit *Speed Coating* beschichtete GelMA-Hydrogel ausgebracht (C2). Als Kontrolle diente ein mit *Speed Coating* beschichtetes Well (C1). Nach der Beschichtung des GelMA Hydrogels mit Laminin (1 µg/cm²; 1 h) wurden 9,4*10⁴ RPE- Vorläuferzellen von DD11 in RMM2 auf der beschichteten Hydrogeloberfläche ausgebracht und bis DD18 differenziert (A2). Als Kontrolle diente ein Lamininbeschichtetes Well zur Kultivierung der RPE-Vorläuferzellen (A1). 5*10⁴ ARPE-19 Zellen wurden ohne weitere Beschichtung auf der GelMA Hydrogeloberfläche in ARPE-M ausgebracht (B2). Für die Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an ARPE19 Zellen in ein unbeschichtetes Well ausgesät. Der Kultivierungszeitraum betrug 7 Tage. Maßstab 50 µm (A1) / 100 µm. Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop

Um die Viabilität der REC im GelMA Hydrogel mit der Literatur zu vergleichen, wurde ein Lebend-/Tot-Nachweis durchgeführt. Dazu wurde ein 4 %iges GelMA Hydrogel (8 Äq) mit 1*10⁵ REC µ-Slide 8-Well (200 µl) erstellt. Das GelMA wurde hierzu mit LAP (0,3 %) als Photoinitiator versetzt und durch Licht einer spezifischen Wellenlänge (30 s; 500 mW/cm²) vernetzt. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit Calcein-AM (4 µM) und PI (20 µg/ml) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Fluoreszenz für lebende Zellen von Calcein (grün) und die für tote Zellen von PI (rot) anhand von *Z-Stack*-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt. Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Für eine quantitative Bestimmung des Viabilitäts-Prozentsatzes wurden mit der Software FIJI die fluoreszierenden Zellen gezählt und die mittlere Fluoreszenz von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt (**Abbildung 58**).

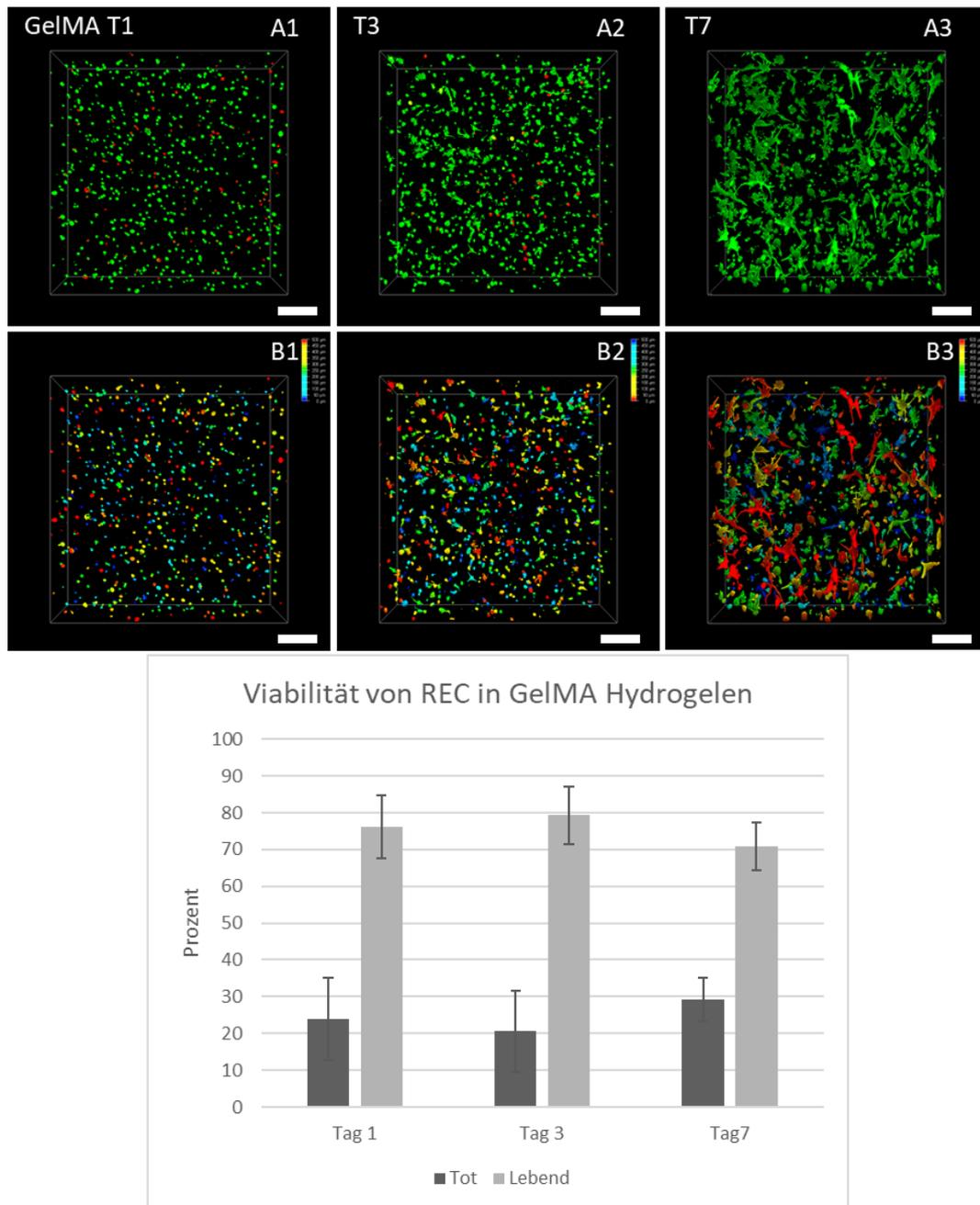


Abbildung 58: Viabilitätsnachweis der REC im GelMA Hydrogel über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen durch eine Lebend-/Tot-Färbung. Dazu wurden 4 %ige GelMA Hydrogele (8 Äq) mit $1 \cdot 10^5$ REC in einem Volumen von 200 μ l in einem μ -Slide 8-Well erstellt. Durch Zugabe von LAP (0,3 %) als Photoinitiator wurde GelMA unter Einsatz einer Lichtquelle mit spezifischer Wellenlänge (30 s; 500 mW/cm²) vernetzt. Die Kultivierung der Hydrogele fand über einen Zeitraum von 7 Tagen statt, wobei eine Lebend-/Tot-Charakterisierung jeweils an den Tagen 1, 3 und 7 vorgenommen wurde. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit 4 μ M Calcein-AM und 20 μ g/ml PI in 250 μ l RECM für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Signale von Calcein (grün) für lebende Zellen und die von PI (rot) für tote Zellen anhand von Z-Stack-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (A1; A2; A3). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (B1; B2; B3). Mit der Software FIJI wurden zudem die jeweiligen Signale gezählt und die mittlere Anzahl gezählter Signale von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt. Maßstab 100 μ m. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala: 0 μ m= blau; 500 μ m =rot.

Anhand der Leben-Tot-Färbung konnte gezeigt werden, dass die REC an Tag 1 im GelMA Hydrogel homogen über das ganze Hydrogel verteilt waren. Dabei war der prozentuale Anteil an lebenden Zellen (67,1 %) ähnlich dem in natürlichen Hydrogelen. An Tag 3 begannen sich die Zellen auszubreiten, wobei der prozentuale Anteil an lebenden Zellen (79,3 %) aufgrund der Proliferation anstieg. An Tag 7 hatten sich die REC stark im Hydrogel ausgebreitet und teilweise verbunden. Der Anteil an lebenden Zellen (70,8 %) war minimal geringer als an Tag 3. Das GelMA Hydrogel blieb bis Kultivierungstag 7 stabil und die Kultivierung von RECM im GelMA Hydrogel war erfolgreich. Auch in der Literatur wurde eine hohe Zellviabilität von anderen Zellarten, wie humanen embryonalen Nierenzellen in Gelatinehydrogelen beschrieben^{[502]; [73]}. Studien zeigten auch, dass die Viabilität der im GelMA befindlichen humanen Endothelzellen mit steigender GelMA Konzentration sank. In einem 5 %igen GelMA Hydrogel lag die Viabilitätsrate der Endothelzellen bei 92 %^{[452]; [497]}, was mit den Ergebnissen dieses Experimentes korreliert. Der Methacrylierungsgrad nimmt Einfluss auf die Methylierung indem mit zunehmendem Methacrylierungsgrad die Abbaugeschwindigkeit und durchschnittliche Porengröße abnimmt^{[503]; [497]}. Im Gegensatz dazu nahm mit zunehmender Zellkonzentration die Stabilität des Hydrogels ab, während die Porengröße zunahm^{[504] [497]}. Vor allem für die Kapillarbildung humaner Endothelzellen eignen sich weichere GelMA Hydrogele^{[503]; [118]}, während steifere GelMA Hydrogele die Osteogenese und Knochenbildung^{[505]; [118]} fördern^[118].

4.6.2.5 GelN/S Hydrogele

Die Literatur zeigt Nachteile der Photovernetzung durch die herkömmliche Kettenwachstumspolymerisation, wie die Nebenreaktionen von Methacrylatgruppen mit Komponenten der Zelloberfläche, der Einsatz großer Radikalmengen zur Initiierung, lange Bestrahlungszeiten und die Bildung einer heterogenen Netzwerkstruktur auf^{[506]; [507]; [100]}. Daher stellt GelN/S ein weiteres semi-synthetisches Hydrogel dar, das auf der Thiol-En-Chemie basiert. Diese erlaubt auf Grundlage von Thiolen und Alkenen die Entstehung von schnell zu vernetzenden Hydrogelen^{[508]; [100]}. GelN wird durch die Reaktion zwischen Gelatine und Norbornen-(5)-carbonsäure-(2) unter pH-Kontrolle hergestellt^[506]. Im Gegensatz zu Methacrylaten weist die Norbornen-Gruppe eine geringere Toxizität für Zellen auf. Thiolierte Gelatine (GelS) wird durch kovalente Modifikation der primären Aminogruppen der Gelatine durch Addition von Sulfhydrylresten hergestellt. Die anschließende orthogonale Vernetzung von GelN und GelS zum Hydrogel findet über eine Thiol-En-Photoklick-Reaktion statt.^{[506] [100]} Dabei reagieren die Norbonengruppen selektiv mit Thiolen und führen eine Polymerisation mit schrittweisem Wachstum zur Bildung eines homogenen Netzwerks herbei^{[509]; [100]; [74]}. Thiol-En-Reaktionen erfordern insgesamt niedrigere Radikalkonzentrationen für die photochemische Initiierung^{[510]; [100]}, wobei die Vernetzungsreaktion von GelN und GelS zu GelN/S in **Abbildung 59** dargestellt ist.

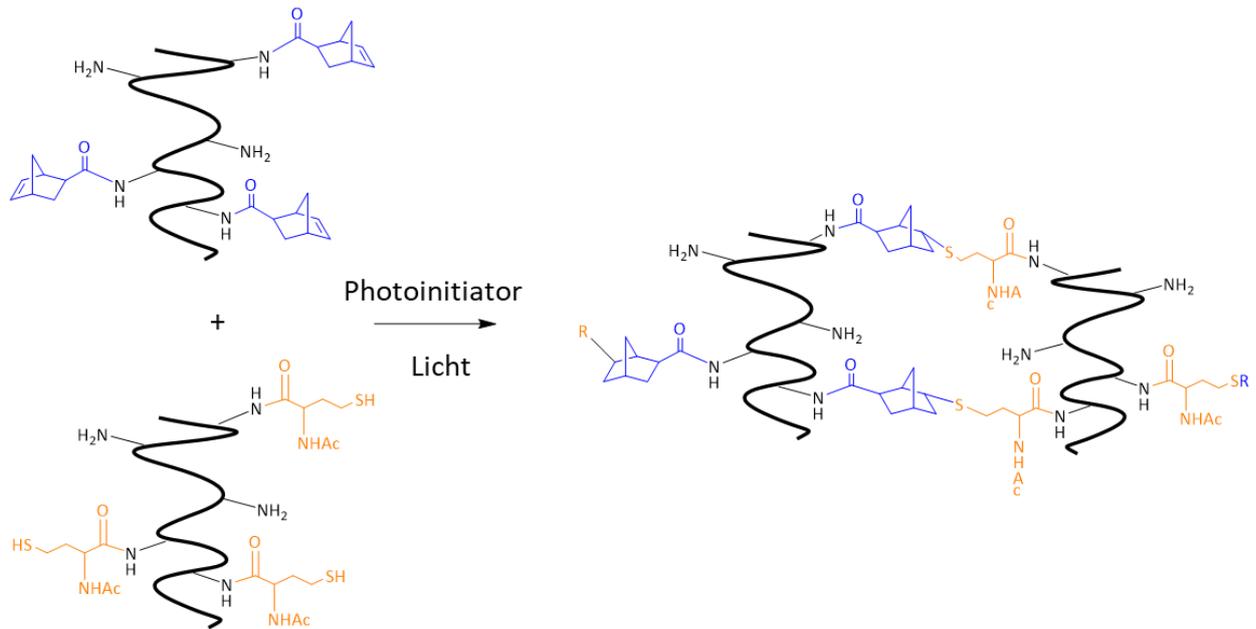


Abbildung 59: Erstellung eines GelN/S Hydrogels. Ein 5 %iges GelN/S Hydrogel wurde aus GelN (2Äq) sowie GelS (5 Äq) zusammen mit LAP (0,03 %) als Photoinitiator erstellt. Für die Polymerisation wurde GelN/S für 30 s einer Lichtintensität von 500 mW/cm² ausgesetzt.

Ein 5 %iges GelN/S Hydrogel bestehend aus GelN (2 Äq) sowie GelS (5 Äq) wurde in einer 96-Well Kultivierungsplatte (100 µl) erstellt. Nach Zugabe von LAP (0,03 %) erfolgte die Polymerisation zu GelN/S durch Photocuring mit Licht bei 500 mW/cm² (30 s) (**Abbildung 60**). Anhand der Mikroskopieaufnahmen war zu erkennen, dass keine der RPE-Zellarten auf dem GelN/S Hydrogel adhären konnte. Sowohl ARPE19 als auch die aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPE-Vorläuferzellen bildeten Aggregate auf der Hydrogeloberfläche statt eines konfluenten Zelllayers. Es war zudem nicht möglich, die DD11 RPE-Vorläuferzellen bis DD18 zu differenzieren. Im Gegensatz zu den RPE-Zellen war es den REC möglich, auf der Hydrogeloberfläche zu adhären. Im Vergleich mit der Adhäsion auf GelMA war der Zelllayer weniger konfluent gewachsen innerhalb des Kultivierungszeitraums.

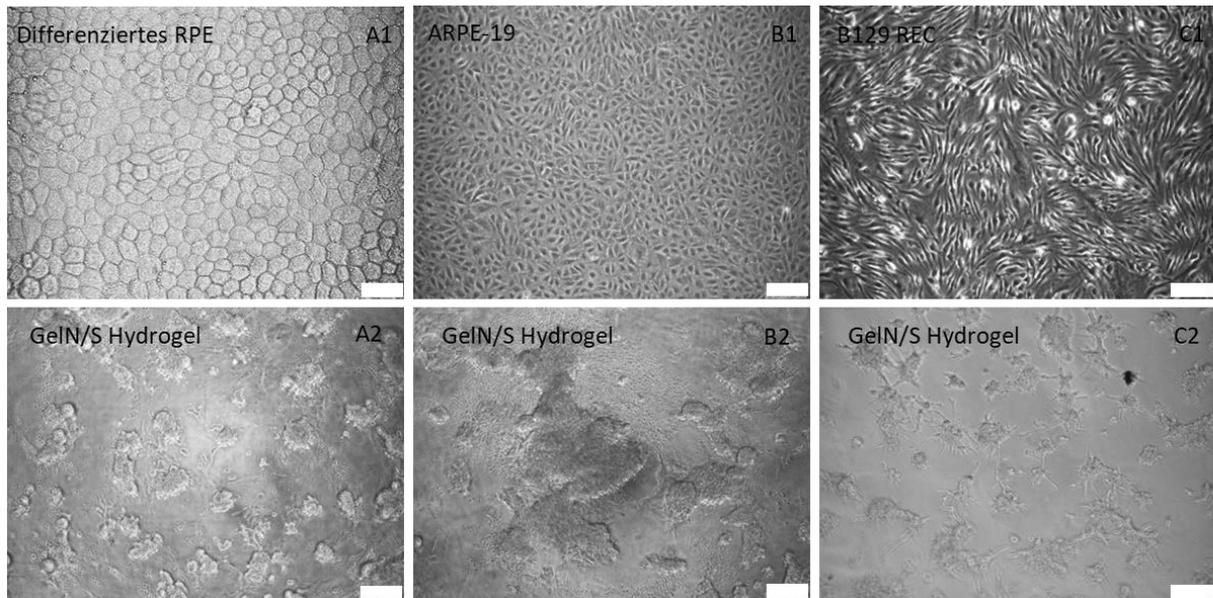


Abbildung 60: Kultivierung von Zellen der oBRB auf GelN/S Hydrogelen. Ein 5 %iges GelN/S Hydrogel aus 2 Äq GelN sowie 5 Äq GelS wurde zusammen mit 0,03 % LAP in einem Volumen von 100 µl erstellt und mit einer Strahlungsintensität von 500 mW/cm² für 30 Sekunden vernetzt. $5 \cdot 10^4$ REC wurden in RECM auf das mit *Speed Coating* beschichtete GelN/S Hydrogel in einem 96-Well ausgebracht (C2). Als Kontrolle diente ein mit *Speed Coating* beschichtetes Well (C1). Nach der Beschichtung des GelN/S Hydrogels mit Laminin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 h) wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE- Vorläuferzellen von DD11 in RMM2 auf der beschichteten Hydrogeloberfläche ausgebracht und bis DD18 differenziert (A2). Als Kontrolle diente ein Laminin-beschichtetes Well zur Kultivierung der RPE-Vorläuferzellen (A1). $5 \cdot 10^4$ ARPE-19 Zellen wurden ohne weitere Beschichtung auf der GelN/S Hydrogeloberfläche in ARPE-M ausgebracht (B2). Für die Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an ARPE19 Zellen in ein unbeschichtetes Well ausgesät. Der Kultivierungszeitraum betrug 7 Tage. Maßstab 50 µm (A1) / 100 µm. Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop

Um die Viabilität der REC im GelMA Hydrogel mit der Literatur zu vergleichen, wurde ein Lebend-/Tot-Nachweis durchgeführt. Dazu wurde ein 5 %iges GelN/S Hydrogel aus GelN (2 Äq) sowie GelS (5 Äq) mit $1 \cdot 10^5$ REC μ -Slide 8-Well (200 µl) erstellt. Das GelMA wurde hierzu mit LAP (0,03 %) als Photoinitiator versetzt und durch Licht bei 500 mW/cm² (30 s) vernetzt. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit Calcein-AM (4 µM) und PI (20 µg/ml) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Fluoreszenz für lebende Zellen von Calcein (grün) und die für tote Zellen von PI (rot) anhand von *Z-Stack*-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt. Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Für eine quantitative Bestimmung der Viabilität wurden mit der Software FIJI die fluoreszierenden Zellen gezählt und die mittlere Fluoreszenz von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt (**Abbildung 61**).

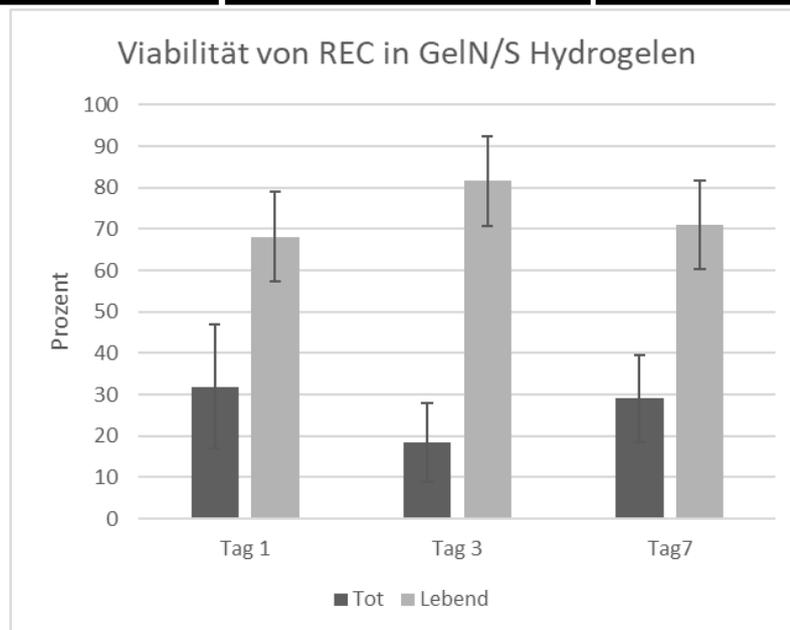
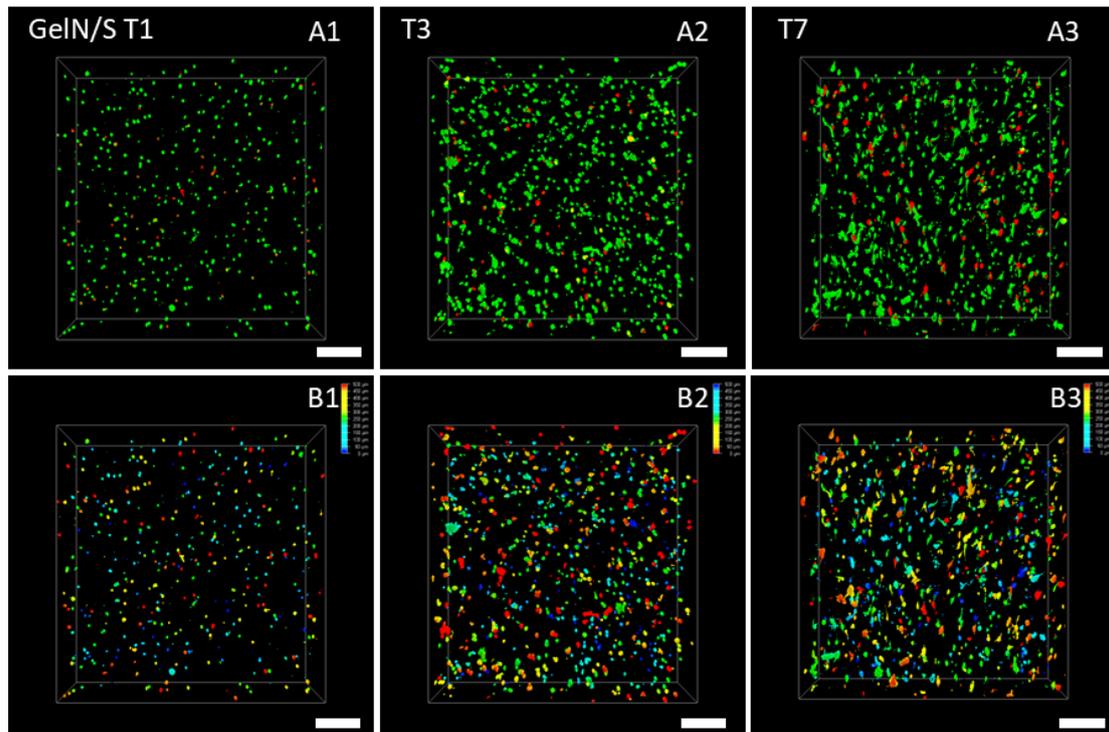


Abbildung 61: Viabilitätsnachweis der REC im GelN/S Hydrogel über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen durch eine Lebend-/Tot-Färbung. Ein 5 %iges GelN/S Hydrogel aus GelN (2Äq) sowie GeIS (5 Äq) in einem Volumen von 200 μl mit $1 \cdot 10^5$ wurde erstellt. Für die Polymerisation wurde das Hydrogel mit LAP (0,03 %) versehen und für 30 s bei 500 mW/cm^2 in einem $\mu\text{-Slide}$ 8-Well vernetzt. Die Kultivierung der Hydrogele fand über einen Zeitraum von 7 Tagen statt, wobei eine Lebend-/Tot-Charakterisierung jeweils an den Tagen 1, 3 und 7 vorgenommen wurde. Für die Lebend-/Tot-Charakterisierung wurden die Hydrogele mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM und $20 \mu\text{g/ml}$ PI in 250 μl RECM für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und für die konfokalmikroskopische Analyse durch RECM ersetzt. Dabei wurde die Überlagerung der Signale von Calcein (grün) für lebende Zellen und die von PI (rot) für tote Zellen anhand von *Z-Stack*-Projektion visualisiert und als 3D Projektion dargestellt (A1; A2; A3). Zudem fand anhand der Tiefenfärbung eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt (B1; B2; B3). Mit der Software FIJI wurden zudem die jeweiligen Signale gezählt und die mittlere Anzahl gezählter Signale von lebenden und toten Zellen graphisch dargestellt. Maßstab 100 μm . Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala: 0 μm = blau; 500 μm =rot.

Anhand der Mikroskopieaufnahmen war zu erkennen, dass die REC im GelN/S Hydrogel homogen verteilt waren und der prozentuale Anteil an lebenden Zellen (68,1 %) an Tag 1 deutlich höher war gegenüber den toten Zellen. An Tag 3 begannen sich die Zellen teilweise im Hydrogel auszubreiten, wobei der prozentuale Anteil an lebenden Zellen (81,6 %) anstieg. An Tag 7 hatten sich die REC im Vergleich zum GelMA Hydrogel weniger stark ausgebreitet. Auch der prozentuale Anteil an lebenden Zellen (71 %) sank leicht gegenüber dem Kultivierungstag 3. Insgesamt war eine Kultivierung der REC über 7 Tage in einem 5 %igen GelN/S Hydrogel erfolgreich. Die Literatur beschreibt eine erhöhte Zellviabilität und Ausbreitung von humanen mesenchymalen Stammzellen in GelNB/DTT-Hydrogelen im Vergleich zu GelMA^[506] ^[100]; ^[511]. Die REC allerdings wiesen ein verbessertes Wachstum in GelMA Hydrogelen auf. Laut Studien zeigten Zellen generell im Vergleich zu weicheren Substraten, auf steifen Hydrogelen eine verringerte Zellausbreitung, aber eine dynamischere Zelladhäsionen^[479].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl ARPE19 Zellen als auch die differenzierten RPE-Vorläuferzellen aus mESC-Rx-GFP am besten auf Fibrinhydrogelen zu kultivieren waren. Auf Fibrinhydrogelen konnten zudem mESC-Rx-GFP problemlos adhären und bis DD18 zu RPE differenziert werden. Da das Fibrinhydrogel allerdings aufgrund seiner mechanischen Instabilität nicht für eine langfristige Kultivierung von Zellen über mehrere Tage geeignet war, schied es als Grundmatrix für das *HB-flow* System aus. Als Grundgerüst wurde dagegen ein GelMA Hydrogel aufgrund seiner mechanischen Stabilität über den kompletten Kultivierungszeitraum von 7 Tagen eingesetzt. Die REC konnten zudem erfolgreich auf der GelMA Hydrogeloberfläche adhären und wiesen bei der Kultivierung im Hydrogel eine hohe Viabilität auf. Für die Rekonstruktion der oBRB im *HB-flow* System wurde GelMA als Grundmatrix für die Kultivierung von Endothelzellen im Mikrokanal verwendet sowie ein oberhalb des GelMA Hydrogels befindliches Fibrinhydrogel für die Kultivierung von RPE.

4.6.3 Toxizität von Bestrahlung und Photoinitiator gegenüber den Zellen

Für die Vernetzung von synthetischen und semi-synthetischen Hydrogelen ist ein Photoinitiator sowie Licht einer spezifischen Wellenlänge notwendig. In der Literatur aber wird berichtet, dass eine UV-Exposition und die Toxizität von Photoinitiatoren die Lebensfähigkeit der Zellen negativ beeinflussen^[118]. Der für die Vernetzung von GelMA und GelN/S eingesetzte Photoinitiator ist Lithiumphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinat (LAP). LAP ist ein radikalischer Photoinitiator, der eine Radikalkettenpolymerisation bei Lichteinwirkung initiiert^[512]. Zwar wird LAP als zytokompatibel beschrieben^[497], kann jedoch das Wachstum der Zellen beeinflussen. Die Strukturformel ist in **Abbildung 62** dargestellt.

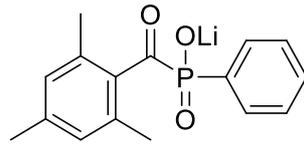


Abbildung 62: Strukturformel des Photoinitiators Lithiumphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinat (LAP).

Um den Einfluss von LAP gegenüber den Zellen zu bestimmen, wurde ein MTT-Toxizitätstest auf Grundlage von Mosmann et al. 1983^[513] ^[514] durchgeführt. Der MTT-Toxizitätstest stellt eine kolorimetrische Messung der intrazellulären Formazanproduktion dar. Durch die Bestimmung der metabolischen Zellaktivität kann Rückschluss auf die Zellviabilität gezogen werden^{[515]; [514]}. Das MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) ist ein Monotetrazoliumsalz, das aus einem positiv geladenen quaternären Tetrazolringkern besteht, der vier umgebende Stickstoffatome enthält. Diese sind mit drei aromatischen Ringen, einschließlich zwei Phenyleinheiten und einem Thiazolyrning verbunden^{[515]; [514]}. Aufgrund seiner positiven Ladung sowie der lipophilen Struktur^[516] kann MTT die Zellmembran lebender Zellen passieren und wird in den Mitochondrien mit Hilfe der Succinat-Dehydrogenase verstoffwechselt^{[515]; [514]}. Dabei wird bei der Reduktion von MTT der Tetrazol-Kernring geöffnet und das violette wasserunlösliche Formazan entsteht (**Abbildung 63**). Nach der Solubilisierung des wasserunlöslichen Formazans durch Dimethylsulfoxid (DMSO) wird die homogenisierte MTT-Formazan-Lösung mit Hilfe eines Spektrophotometers in Bezug auf ihre optische Dichte (OD; 595 nm) analysiert. Die gemessenen OD-Werte spiegeln die Formazan-Konzentration und folglich die intrazelluläre Reduktion von MTT wider^[514]. Der LD₅₀-Wert gibt dabei die Konzentration eines Stoffes, an die für die Zellen letal ist.

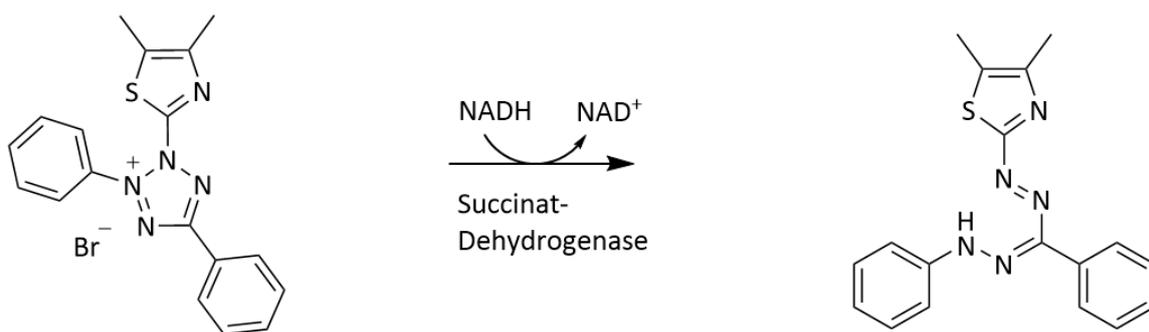


Abbildung 63: Das MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) ist ein Monotetrazoliumsalz, das aus einem positiv geladenen quaternären Tetrazolringkern besteht, der vier umgebende Stickstoffatome enthält. Diese sind mit zwei Phenyleinheiten und einem Thiazolyrning verbunden. MTT kann aufgrund seiner positiven Ladung sowie der lipophilen Struktur^[516] die Zellmembran lebender Zellen passieren und wird in den Mitochondrien mit Hilfe der Succinat-Dehydrogenase verstoffwechselt. Die Reduktion von MTT öffnet den Tetrazol-Kernring, wodurch das violette wasserunlösliche Formazan entsteht.

Mit Hilfe des MTT-Toxizitätstests wurde der Einfluss von LAP und UV-Licht auf REC, HUVEC sowie NHDF untersucht. Diese Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner

Masterarbeit erzielt. REC dienen als Endothel in der oBRB gemeinsam mit dem murinen differenzierten RPE. HUVEC werden als humanes Endothelzellanalog eingesetzt in Kombination mit ARPE19 Zellen zur Rekonstruktion der oBRB. Die Fibroblasten NHDF dienen als Vergleich zu dem Verhalten der beiden Endothelzellen. Dazu wurden die Zellen jeweils in einer 96-Well Kultivierungsplatte (je $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml) ausgebracht und mit LAP oder UV-Licht behandelt. LAP wurde in 6 unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 %, 0,5 %) zu den Zellen gegeben, woraufhin eine Inkubation von 72 h folgte. Bei der Behandlung mit UV-Licht wurden die Zellen 3 unterschiedlichen Strahlungsintensitäten (5000 mW/cm^2 , 1000 mW/cm^2 , 500 mW/cm^2) und -zeiträumen (60 s, 30 s, 10 s) ausgesetzt und ebenfalls für 72 h inkubiert. Die Entfernung zur Strahlungsquelle betrug 5 cm. Die Totkontrolle wurde durch Zugabe von Triton X (1 %; 5 μl) und MTT (15 μl) pro Well erzeugt. Nach einer Inkubation von 3 h wurde die Reaktion mit einer Stop Lösung (100 μl) unterbunden und gleichzeitig der Farbstoff solubilisiert. Am Folgetag erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm mit Hilfe des Spektrophotometers. Um die Messergebnisse anschließend auszuwerten dienten die unbehandelten Lebend- und Totkontrollen als Referenz. Durch die Absorptionsmessung und den anschließenden Vergleich mit den Kontrollen, konnte ein relativer Unterschied zwischen den Proben in der Absorption und damit ein relativer Unterschied in der Viabilität bestimmt werden (**Abbildung 64**).

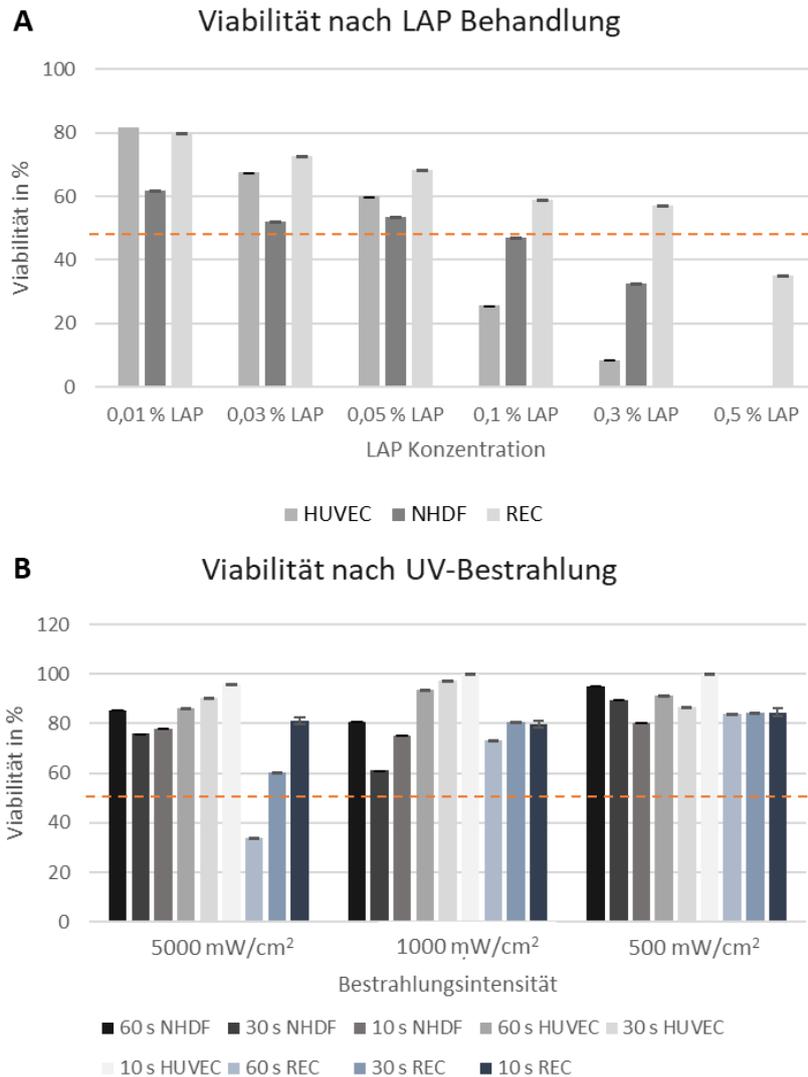


Abbildung 64: Bestimmung der Viabilität durch einen MTT Toxizitätsnachweis. Dazu wurden die Zellen jeweils in einer 96-Well Kultivierungsplatte in einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml kultiviert und mit LAP oder UV-Licht behandelt. LAP wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 %, 0,5 %) eingesetzt und die Zellen für 72 h inkubiert. Für die Behandlung mit UV-Licht wurden die Zellen unterschiedlichen Strahlungsintensitäten (5000 mW/cm², 1000 mW/cm², 500 mW/cm²) und -zeitspannen (60 s, 30 s, 10 s) ausgesetzt und ebenfalls für 72 h inkubiert. Zu der Totkontrolle wurden erst je 5 µl Triton-X (1 %) zugegeben und anschließend 15 µl MTT pro Well hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 3 h wurden 100 µl Stop Lösung in jedes Well zur Solubilisierung gegeben. Am Folgetag erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm mit Hilfe eines Photospektrometers. Für die Auswertung wurde auf die Lebend- und Totkontrollen ohne Behandlung normiert.

Die Messergebnisse wiesen mit steigender LAP Konzentration eine sinkende Zellviabilität auf. Unter Berücksichtigung des LD₅₀- Wertes konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der REC Zellen bis zu einer Konzentration von 0,5 % LAP (34,9 % ± 0,14) über dem kritischen Wert lag. Die maximale Zellviabilität der REC war bei einer LAP Konzentration von 0,01 % (79,86 % ± 0,009) zu finden, wobei der LD₅₀- Wert bei >0,3 % LAP liegt. Auch die HUVEC wiesen eine sinkende Tendenz der Zellviabilität gegenüber einer erhöhten LAP Konzentration auf. Im Vergleich zu den REC liegen sind die Viabilitätswerte der HUVEC insgesamt geringer. Bei den HUVEC liegt unter Beachtung des LD₅₀- Wertes die kritische LAP

Konzentration bereits bei $>0,05$ %. Das Maximum der Viabilität liegt bei den HUVEC ebenfalls bei einer LAP Konzentration von $0,01$ % ($81,64 \pm 0,019$). Die NHDF zeigen gegenüber LAP die geringste Viabilität auf, wobei der LD_{50} -Wert $>0,05$ % ist. Zur Vernetzung der GelMA-Hydrogele wurde $0,3$ % LAP eingesetzt. Bei $0,3$ % LAP befinden sich, unter Beachtung des LD_{50} -Wertes nur die REC ($57 \pm 0,005$) über dem kritischen Wert, nicht aber die HUVEC ($8,37 \pm 0,03$) und NHDF ($32,53 \pm 0,01$). Für die Vernetzung von GelN/ und GelS wurde dagegen $0,03$ % LAP eingesetzt. Bei einer LAP Konzentration von $0,03$ % befinden sich, unter Beachtung des LD_{50} -Wertes sowohl die REC ($72,75 \pm 0,017$), als auch die HUVEC ($67,54 \pm 0,009$) und NHDF ($52,17 \pm 0,014$) über dem kritischen Wert. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass REC sowohl in den GelN/S Hydrogelen als auch in GelMA-Hydrogelen kultiviert werden können, ohne dass die Menge an LAP eine schädigende Wirkung auf die Zellen ausübt. Die HUVECs sollten aufgrund der geringeren Menge an LAP in GelN/S Gelen kultiviert werden, um die Unterschreitung des kritischen Toxizität-Wertes zu vermeiden. Die Literatur bestätigt diese Ergebnisse. Dabei wurde bei LAP-Konzentrationen von $0,3$ % und $0,5$ % (w/v) eine hohe Zellviabilität nachgewiesen, während diese bei Konzentrationen von $0,7$ % und $0,9$ % (w/v) abnahm. Insgesamt zeigen die Zellen mit LAP aber eine vergleichsweise höhere Viabilität als mit dem Photoinitiator Irgacure2959 ^{[497]; [512]}. Anhand der Literatur konnte belegt werden, dass LAP ein bevorzugt einzusetzender Photoinitiator ist, da dieser eine Polymerisation bei sichtbarem Licht initiieren kann, was nachweislich die Toxizität des Photoinitiators verringert und die Viabilität der Zellen steigert ^[118] ^{[497] [517]}.

Zudem wurde der Einfluss der Bestrahlung bei der Vernetzung der Hydrogele auf die Zellviabilität untersucht. Bei dem Erstellen von GelMA oder GelN/S Hydrogelen wird eine Bestrahlungsintensität von 500 mW/cm^2 und eine Bestrahlungsdauer von 30 s zur Vernetzung eingesetzt. Bei den REC erwies sich eine Strahlungsdauer von 10 - 60 s ($10 \text{ s} = 83,91 \pm 0,05$; $30 \text{ s} = 84,54 \pm 0,01$; $60 \text{ s} = 84,58 \pm 0,006$) bei einer Intensität von 500 mW/cm^2 unter Beachtung des kritischen LD_{50} -Wertes als unbedenklich. Insgesamt nahm mit zunehmender Bestrahlungsdauer und steigender Strahlungsintensität die Zellviabilität stark ab. Bei einer Intensität von 5000 mW/cm^2 und einer Strahlungsdauer von 60 s ($34 \pm 0,12$) wurde der kritische LD_{50} -Wert unterschritten. Bei den HUVEC hatte die Bestrahlungsdauer und Strahlungsintensität weniger Einfluss auf die Zellviabilität als die LAP Konzentration. Im Vergleich zu den REC waren die HUVEC deutlich unempfindlicher gegenüber der Bestrahlung. Es erwies sich bei einer Intensität von 500 mW/cm^2 eine Strahlungsdauer von 10 s ($100 \pm 0,01$) unter Beachtung des kritischen LD_{50} -Wertes als beste Option. Insgesamt unterschritt keiner der Messwerte den kritischen LD_{50} -Wert bei einer getesteten Bestrahlungsintensität oder Bestrahlungsdauer. Bei den NHDF hatte die Strahlungsintensität und -dauer einen größeren Einfluss auf die Zellviabilität als bei den HUVEC. Allerdings fiel der Messwert bei keiner Bestrahlungsintensität oder Bestrahlungsdauer unter den kritischen LD_{50} -Wert. Bei einer Intensität von 500 mW/cm^2 erwies sich eine Strahlungsdauer von 60 s

(95,11 ± 0,01) unter Beachtung des kritischen LD₅₀- Wertes beste Option. Studien haben bereits demonstriert, dass Ultraviolettes (UV)-Licht ein potenzieller Verursacher zellulärer DNA- und Gewebeschäden ist, da eine chromosomale und genetische Instabilität in Säugetierzellen durch Exposition gegenüber UV-Licht hervorgerufen wurde [518]; [519][520][521]; [520]. Vor allem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Reaktion von UV-Licht mit Sauerstoff der Umgebung verursacht oxidative Schäden an der DNA [521]; [522]; [520].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass REC sowohl in den GelN/S Hydrogelen als auch in GelMA-Hydrogelen problemlos kultiviert werden können, ohne dass die Menge an LAP eine schädigende Wirkung auf die Zellen ausübt. Eine Bestrahlungsdauer von 30 s bei einer Bestrahlungsintensität von 500 mW/cm² beeinflusst die Zellviabilität außerdem nur geringfügig. HUVECs sind empfindlich gegenüber der LAP Konzentration, weshalb diese bevorzugt mit GelN/S-Hydrogelen aufgrund der geringeren eingesetzten LAP-Konzentration kultiviert werden sollten. Eine Bestrahlungsdauer von 30 s bei einer Bestrahlungsintensität von 500 mW/cm² ist bezüglich der Zellviabilität unbedenklich. Die Kultivierung der NHDF ist sowohl in GelMA-Hydrogelen als auch in GelN/S -Hydrogelen möglich, da bei keiner Bestrahlungsdauer und keiner Bestrahlungsintensität der kritische LD₅₀- Wert unterschritten wurde. Allerdings handelt es sich bei dem MTT assay um einen Viabilitätstest, weshalb keine Aussagen über mögliche Mutationen oder nicht-letale DNA-Schäden getroffen werden können [521].

4.6.4 Etablierung des retinalen Endothels im Mikrokanal des *HB-flow* Systems

In der Literatur sind mikrofluidische Kanäle in vielen verschiedenen Hydrogelsubstraten zu finden, die den Zellen eine dreidimensionale Zellkulturumgebung bereitstellen [444]; [523]; [468] [524]; [468] [132]; [468] [525]; [468] und als Materialien für den Aufbau von Hydrogel-basierten Mikrokanalnetzwerken verwendet werden [468][526] [527]. Für das *HB-flow* System wurden GelMA sowie GelN/S aufgrund ihrer mechanischen und zytokompatiblen Eigenschaften gegenüber den REC als eine geeignete Hydrogelstützstruktur identifiziert. REC wurden, wie in **Abbildung 65** dargestellt, in den Mikrokanal des *HB-flow* Systems eingebracht. Die einfachste Form zur Erzeugung von Mikrokanälen in Hydrogelkonstrukten ist die Verwendung von Nadeln oder Fasern, die durch Entnahme eine perfundierbare Gefäßstruktur im Hydrogel bilden [528]. In der Literatur wird die Erzeugung eines perfundierbaren Mikrokanals mit einem Durchmesser von 550 µm durch die Verwendung eines Röhrchens in einem Typ-I-Kollagenhydrogel beschrieben, der anschließend mit Endothelzellen besiedelt wurde [73] [529]. Zudem konnte ein Mikrokanalsystem auf Basis des semi-synthetischen GelMA Hydrogels entwickelt werden, das die Endothelbarrierefunktion förderte. [529] [530]. Die mikrofluidische Kultivierung von humanen retinalen Zellen in einem vaskularisierten Modell ohne exogene Materialien, treibt zudem die Entwicklung neuer Therapeutika für Erkrankungen wie AMD voran [531]. Für die Erstellung des Mikrokanals im *HB-flow*

System wurde eine 25 G Kanüle durch die Aussparungen im Grundgerüst geführt. Anschließend wurde ein 4 %iges GelMA (8 Äq) Hydrogel mit einem Anteil von 40 % Kollagen I in die Vertiefung des *HB-flow*-Systems gegeben und vernetzt. Anschließend konnte die Kanüle entfernt werden, was zu einem Kanaldurchmesser von etwa 520 μm führte.

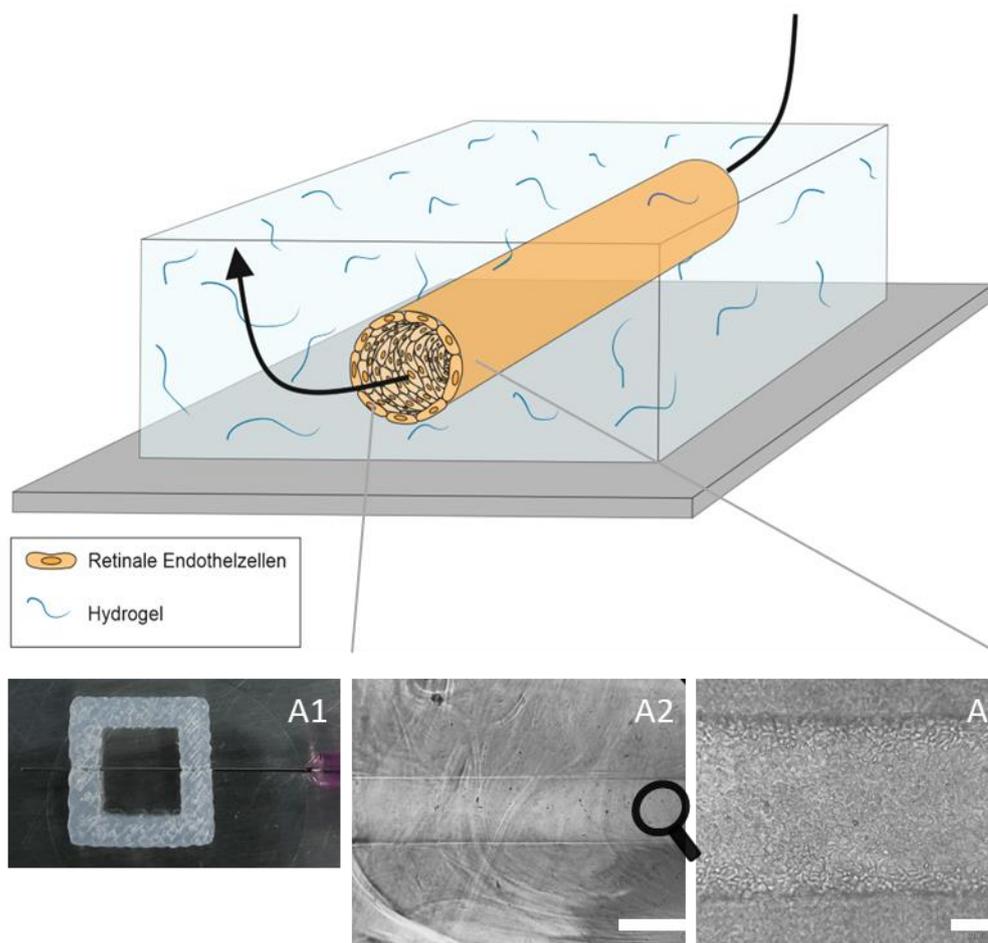


Abbildung 65: Schematische Darstellung des *HB-flow* Systems und dessen Präparation. Anschließend konnten REC in den Mikrokanal des *HB-flow* Systems eingebracht werden und diese durch die Verbindung mit einer Peristaltikpumpe mikrofluidisch kultiviert werden. Für die Erstellung des Mikrokanals musste zunächst eine 25 G Kanüle durch die Aussparungen im Grundgerüst geführt werden (A1). Anschließend wurden 150 μl eines 4 %igen GelMA (8 Äq) Hydrogels mit einem Anteil von 40 % Kollagen I in die Vertiefung gegeben und durch die Bestrahlung für 30 s bei 500 mW/cm^2 vernetzt. Anschließend konnte die Kanüle entfernt werden, was zu einem Kanaldurchmesser von etwa 520 μm führte (A2). Der entstandene Mikrokanal konnte anschließend mit insgesamt $2 \cdot 10^5$ REC besiedelt werden (A3). Maßstab A2 und A4 1000 μm ; Maßstab A3 200 μm . Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop

4.6.4.1 Charakterisierung des retinalen Endothels im Mikrokanal des *HB-flow* Systems

Um die Konfluenz des retinalen Endothels im Mikrokanal des *HB-flow* Systems zu validieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt. Dabei wurde ein 4 %iges GelMA (8 Äq) Hydrogel

mit einem Anteil an 40 % Kollagen I oder ein 5 %iges GelN/S Hydrogel aus GelN (2 Äq) und GelS (5 Äq) mit einem Anteil an 25 % Kollagen I in die Vertiefung des *HB-flow* Systems gegeben und vernetzt. Die Zugabe von Kollagen erhöht den Anteil an Zelladhäsionspunkten auf der Hydrogeloberfläche und fördert daher die Zelladhäsion. Nach dem Entfernen der Kanüle wurde das *HB-flow* System über Nacht in RECM inkubiert, um den Zellen später die Adhäsion im Mikrokanal zu erleichtern. Nachdem $1 \cdot 10^5$ REC im Mikrokanal (10 μ l) adhärirt waren, konnte das *Organ-on-chip* System am darauffolgenden Tag an der Horizontalen um 180 ° gewendet werden, um die andere Seite des Mikrokanals ebenfalls mit $1 \cdot 10^5$ REC zu besiedeln. Nach einer Inkubation über Nacht waren die Zellen im Mikrokanal adhärirt und das *HB-flow* System konnte wieder in seine Ausgangsposition gebracht werden. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums von 5 Tagen wurden die Zellen im Mikrokanal mit PFA (4 %; 10 min, RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %, 4 min, RT) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnten die Zellen im Mikrokanal immunhistochemisch analysiert werden (**Abbildung 66**). Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 μ g/ml) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 μ M) visualisiert. Anhand von *Z-Stack*-Projektion wurden die Zellstrukturen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt, wobei anhand der Tiefenfärbung das 3D-Volumen visualisiert wurde. Anhand der Immunfluoreszenzfärbung wurde deutlich, dass die REC sowohl im Mikrokanal des GelMA Hydrogels als auch im Mikrokanal des GelN/S Hydrogels ein konfluentes Endothel über die gesamte Kanalfäche bilden konnten. Die REC waren gleichmäßig an der oberen und unteren Seite der Mikrokanalwand verteilt, was für die Besiedelungstechnik spricht. Insgesamt war die Verwendung von einem mit Kollagen I versetzten Gelatine-basierten Hydrogel (GelMA oder GelN/S) als Gerüststruktur im *HB-flow* System erfolgreich. In Bezug auf die Adhäsion und Langzeitkultivierung von REC im Mikrokanal konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hydrogelen festgestellt werden. Die Hydrogele konnten über den gesamten Kultivierungszeitraum aufrechterhalten werden und sind somit für eine Langzeitkultivierung geeignet. In weiteren Experimenten konnte auch gezeigt werden, dass die Langzeitkultivierung von HUVEC im Mikrokanal des *HB-flow* Systems möglich ist (Daten im Anhang). Auch andere Studien zeigten, dass ein auf GelMA basierendes *Organ-on-chip* System für die Kultivierung von Endothelzellen über einen längeren Zeitraum geeignete Voraussetzungen bietet ^[532].

befindlichen REC analysiert (**Abbildung 67**). Dafür wurde ein 4 %iges GelMA (8 Äq) Hydrogel bzw. ein 5 %iges GelN/S Hydrogel (2 Äq/ 5 Äq) in die Gerüststruktur des *HB-flow* Systems eingebracht, mit 500 mW/cm² vernetzt und wie zuvor beschrieben mit REC besiedelt. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums von 5 Tagen wurde die RNA aus den REC mit Hilfe von TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte dann für die relative Quantifizierung in der RT-qPCR eingesetzt werden. Als Haushaltsgen diente GAPDH, wobei die Quantifizierung in Relation zu dem Wachstum der REC auf einem mit 0,1 % Gelatine beschichteten 24-Well erfolgte (=1). Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet und graphisch dargestellt.

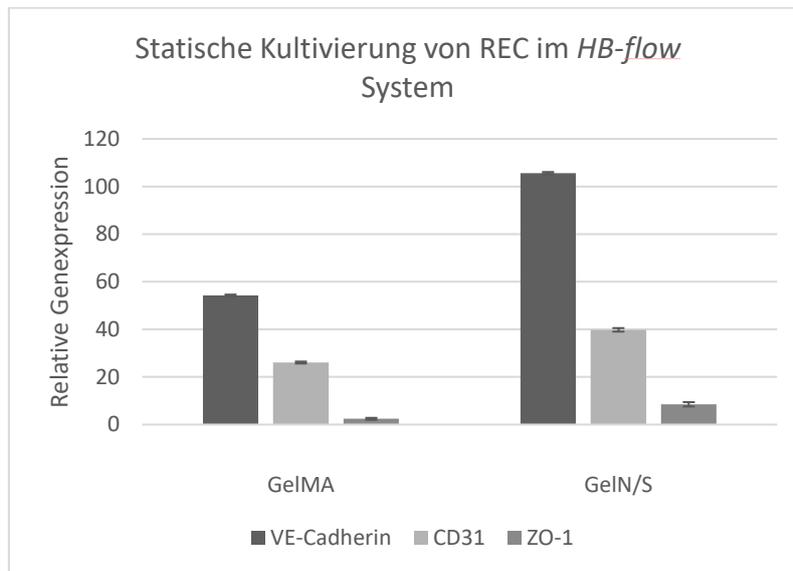


Abbildung 67: Genexpressionsanalyse von ZO-1, VE-Cadherin sowie CD31 in statisch kultivierten REC im Mikrokanal des *HB-flow* Systems. Dafür wurde ein 4 %iges GelMA (8 Äq) Hydrogel bzw. ein 5 %iges GelN/S Hydrogel (2 Äq/ 5 Äq) in die Gerüststruktur des *HB-flow* Systems eingebracht, mit 500 mW/cm² vernetzt und wie zuvor mit REC besiedelt. Eine Kultivierung erfolgte über 5 Tage, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurde die RNA der REC mittels TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte dann für die relative Quantifizierung in der RT-qPCR mit Hilfe von SYBRGreen eingesetzt werden. Als Haushaltsgen diente dabei GAPDH. Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte in Relation zu dem Wachstum der REC auf einem mit Gelatine (0,1 %) beschichteten 24-Well. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (n=3) ausgewertet.

Die Genexpression der REC im Mikrokanal des *HB-flow* Systems lag verglichen mit der Kontrolle in einer 2D-Kultur deutlich höher. Die Genexpression von VE-Cadherin war bei den in GelMA Hydrogelen (54,19 ± 0,44) kultivierten REC geringer als bei einer Kultivierung im GelN/S Gerüst (105,66 ± 0,7) und insgesamt am stärksten exprimiert. Auch die Genexpression von CD31 war bei den REC in GelN/S (39,8 ± 1,4) gegenüber GelMA erhöht (26,05 ± 0,9). Die Genexpression von ZO-1 war insgesamt am geringsten, wobei die REC in GelMA (2,4 ± 1,1) eine weniger starke Expression als in GelN/S (8,5 ± 1,4) aufwiesen. Schon kleine Änderungen in der Polymerkonzentration und Materialsteifigkeit haben einen signifikanten Einfluss auf die Qualität des Endothels ^[533]. Das langfristige Überleben der Zellen hängt von der passiven Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen oder von der Neovaskularisierung ab, da

die passive Diffusion auf etwa 200 μm begrenzt ist. Dadurch ist die Sauerstoff- und Nährstoffdiffusion in tiefere Bereiche von technischen Konstrukten begrenzt ^{[534]; [533]}. Die Vielseitigkeit der Vernetzungschemie ermöglicht die Feinabstimmung der physikalisch-chemischen und mechanischen Eigenschaften hergestellter Hydrogele. Gelatine-basierte Hydrogele erlauben sowohl die Bildung von Mikrokapillaren als auch die erfolgreiche Biofabrikation von Konstrukten mit komplexen 3D-Verbindungsarchitekturen unter Verwendung einer einzigen Materialplattform ^{[535]; [533]}. Wie Studien zeigten förderte GelN das Wachstum und die Selbstorganisation von Endothelzellen zu Mikrokapillaren und ist zudem mit dem Extrusionsdruck kompatibel ^{[533]; [100]}. Zukünftig besteht daher die Möglichkeit das *HB-flow* System vollständig zu drucken.

4.6.5 Einfluss der Mikrofluidik bei der Kultivierung von REC im *HB-flow* System

Um den Einfluss der Mikrofluidik auf die Kultivierung der im Mikrokanal befindlichen REC zu untersuchen, wurde der besiedelte Mikrokanal des *HB-flow* Systems mit einer Peristaltikpumpe verbunden (**Abbildung 68**). Diese Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt. Dazu wurde ein 4%iges GelMA (8 Äq) Hydrogel in die Gerüststruktur des *HB-flow* Systems eingebracht und pro Mikrokanalhälfte je $1 \cdot 10^5$ REC eingebracht. Nachdem die REC an der Mikrokanalwand adhärirt waren fand eine mikrofluidische Kultivierung bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,05 ml/min über 5 Tage statt. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurde eine Genexpressionsanalyse des im Mikrokanal befindlichen Endothels durchgeführt und die Genexpression von ZO-1, VE-Cadherin sowie CD31 untersucht. Dazu wurde die RNA der REC mit Hilfe von TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte dann für die relative Quantifizierung in der qPCR eingesetzt und quantifiziert werden. Als Haushaltsgen wurde GAPDH eingesetzt, wobei die Quantifizierung in Relation zu dem Wachstum der REC im statisch kultivierten *HB-flow* System mit einem GelMA-Hydrogel als Stützstruktur erfolgte (=1). Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet und graphisch dargestellt. Anhand der Genexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass ZO-1 in verglichen mit der statischen Kultivierung der REC im mikrofluidischen *HB-flow* System um das 1,34-fache \pm 0,11 hochreguliert war. VE-Cadherin wies eine relative Genexpression von $0,715 \pm 0,12$ auf und CD31 von $0,42 \pm 0,23$ auf, welche im Vergleich zur statischen 2D Kultivierung von REC geringer ausfiel. Anhand der Literatur wird deutlich, dass die Implementierung eines physiologischen Flusses entscheidend ist für die Barriereigenschaften, die durch die Scherspannung reguliert werden und Veränderungen in der Genexpression sowie der Glykokalyx induzieren ^{[170]; [150]}.

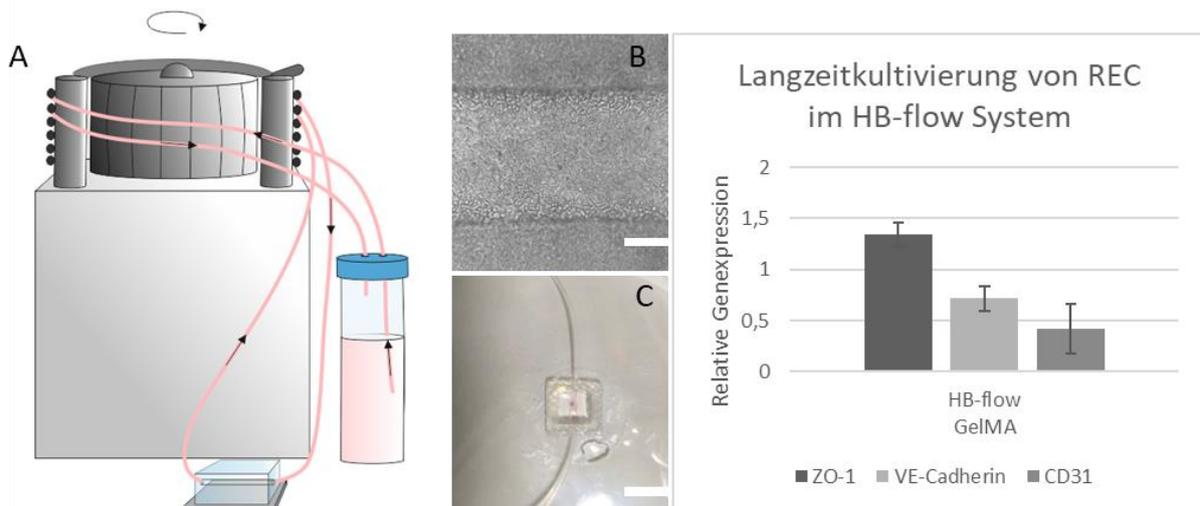


Abbildung 68: Mikrofluidische Kultivierung der REC im Mikrokanal des *HB-flow* Systems und Genexpressionsanalyse des Endothels. Ein 4 %iges GelMA (8 Åq) Hydrogel wurde in die Gerüststruktur des *HB-flow* Systems eingebracht und der Mikrokanal mit REC besiedelt (B). Anschließend wurde der besiedelte Mikrokanal des *HB-flow* Systems mit einer Peristaltikpumpe verbunden (C). Die mikrofluidische Kultivierung fand bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,05 ml/min über 5 Tage statt, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Eine schematische Darstellung des Systemaufbaus ist in A dargestellt. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurde eine Genexpressionsanalyse des im Mikrokanal befindlichen Endothels durchgeführt und die Genexpression von ZO-1, VE-Cadherin sowie CD31 untersucht. Dazu wurde die RNA der REC mittels TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte dann für die relative Quantifizierung in der RT-qPCR mittels SYBRGreen eingesetzt werden. Als Haushaltsgen diente dabei GAPDH und wurde in Relation zu dem Wachstum auf das statisch kultivierte *HB-flow* System mit GelMA-Hydrogel betrachtet (=1). Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet aus $n=3$. Maßstab 200 μm bzw. 1000 μm .

Die Literatur beschreibt Ansätze mit unidirektionaler Perfusion über Pumpen und Ventile, die eine Steuerung der Flussrate ermöglichen, da der Blutfluss im Gefäßsystem extrem heterogen ist ^[146]. Ein Problem bei der mikrofluidischen Kultivierung des *HB-flow* Systems bestand in der Eigenschaft der Hydrogele, eine große Menge an Wasser aufzunehmen. Bei einem unidirektionalen Fluss sammelte sich das Medium im Hydrogel, statt durch den Mikrokanal zu fließen. Daher wurde ein System entwickelt, indem ein simultanes Pumpen und Ziehen der Flüssigkeit stattfand. In der Literatur wird beschrieben, dass die physiologische Scherbelastung in der Retina, verglichen mit anderen Organen, höher ist ^[536], weshalb die Scherspannung in mikrofluidischen Systemen 0,1 bis 10 Pa umfassen kann ^{[146] [124]; [537]}. Die Erhöhung der noch geringen Fließgeschwindigkeit von 0,005 ml/min im *HB-flow* System kann zu einer verstärkten Expression der *Junction* Proteine führen ^[146]. Andere Studien setzten zur mikrofluidischen Kultivierung eines oBRB Modells aus ARPE19 und HUVEC mit 50 $\mu\text{l/h}$ eine noch geringere Fließgeschwindigkeit ein ^[223]. Die Durchblutung der Choriokapillaris jedoch beträgt 1.400 ml/min*100 g Gewebe im Organismus ^[188].

4.6.6 Pluronic F-127 für den 3D Biodruck des Mikrokanals im *HB-flow* System

Auch im *HB-flow* System konnte der 3D Druck Anwendung finden, um einen Hydrokanal zu generieren. Dazu wurde eine Opferstruktur gedruckt, die anschließend die Funktion eines Mikrokanals aufwies. Diese Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt. Pluronic[®] oder Poloxamere sind Triblock-Co-Polymere aus Poly(ethylenoxid)-Poly(propylenoxid)-Poly(ethylenoxid) (PEO-PPO-PEO), die sich aufgrund ihrer Eigenschaften besonders gut dazu eignen^[538]. Diese Gruppe synthetischer Polymere ist in wässriger Lösung thermoreversibel. Das hydrophile Ethylenoxid und das hydrophobe Propylenoxid geben Pluronic eine amphiphile Struktur, weshalb sich in wässriger Lösung selbstständig Mizellen bilden. Dabei ist eine polare, wasserlösliche Gruppe an eine unpolare, wasserunlösliche Kohlenwasserstoffkette gebunden. Die Mizellenbildung ist temperaturabhängig und beeinflusst die Abbaueigenschaften des Biomaterials. Bei einer bestimmten charakteristischen Temperatur, die als kritische Mizellentemperatur bekannt ist, werden sowohl die Ethylen- als auch die Propylenoxidblöcke hydratisiert und der PPO-Block wird löslich^[539]. Im Fall des Pluronic F127 ist diese kritische Temperatur bei 4°C gegeben. Die Strukturformel von Pluronic F-127 ist in **Abbildung 69** dargestellt.

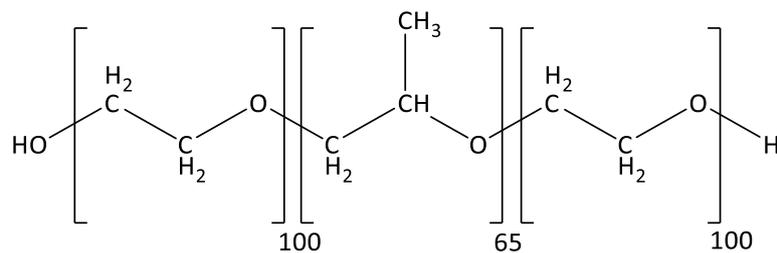


Abbildung 69: Strukturformel von Pluronic F-127.

Um den Mikrokanal im *HB-flow* System mit Hilfe des 3D Biodruck zu generieren wurde eine 40 %ige Pluronic F-127 Stock-Lösung in Wasser angesetzt und bei 4° C über mehrere Tage gelöst. Das gelöste Pluronic F-127 konnte dann in eine 10 ml Spritze mit abgestumpfter, konischer 27 G Kanüle gefüllt werden. Bei Raumtemperatur weist das Pluronic F-127 eine viskose, gelartige Konsistenz auf, die sich gut zum Verdrucken eignet^[540]. Daraufhin konnte die Gerüststruktur mit 50 µl 4 %igem GelMA (8 Äq) Hydrogel befüllt werden, was etwa der Höhe des Ein- bzw. Ausgangs der Gerüststruktur entsprach. Die Vernetzung des Hydrogels fand bei 500 mW/cm² für 30 s statt. Anschließend wurde mit dem Biospot BP Biofluidix 3D-Drucker Pluronic F-127 vom Eingang bis zum Ausgang der Gerüststruktur auf das vernetzte GelMA Hydrogel extrudiert (**Abbildung 70**). Die Opferstruktur aus Pluronic F-127 wurde daraufhin mit 100 µl 4 %igem GelMA (8 Äq) Hydrogel überschichtet und vernetzt. Eine Inkubation des *HB-flow* Systems bei 4° C für 10 min führte aufgrund der Temperatur zu einer Verflüssigung des Pluronic F-127. Dieses konnte aus dem Hydrogel und dem darin entstandenen Mikrokanal mit Hilfe

von Filterpapier entfernt werden. Nachdem der Mikrokanal mit DPBS^{-/-} gewaschen wurde, wurde das *HB-flow* System über Nacht in RECM inkubiert, um das Adhärenzverhalten der Endothelzellen im Mikrokanal später zu erleichtern. Im nächsten Schritt wurden $1 \cdot 10^5$ REC in den Mikrokanal eingebracht. Nachdem die Zellen über Nacht an der Mikrokanalwand adhären waren, wurde die andere Seite des Mikrokanals durch Wenden des *HB-flow* Systems an seiner Horizontalen um 180° mit $1 \cdot 10^5$ REC besiedelt. Nachdem die Zellen bis zur Adhäsion an der Mikrokanalwand inkubiert worden waren, wurde das *HB-flow* System in seine Ausgangsposition gebracht und über einen Zeitraum von 5 Tagen kultiviert. Nach Beenden der Kultivierungszeit wurde die Genexpression der im Mikrokanal befindlichen REC analysiert. Dazu wurde die RNA der Zellen mit Hilfe von TRIzol isoliert und in cDNA transkribiert. Diese konnte dann für die relative Quantifizierung in der RT-qPCR eingesetzt werden. Als Haushaltsgen wurde GAPDH eingesetzt und die Quantifizierung der Messwerte erfolgte in Relation zu dem Wachstum von $7 \cdot 10^4$ REC auf einem mit Gelatine (0,1 %) beschichteten 24-Wellboden (=1). Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode herangezogen und diese anschließend graphisch dargestellt.

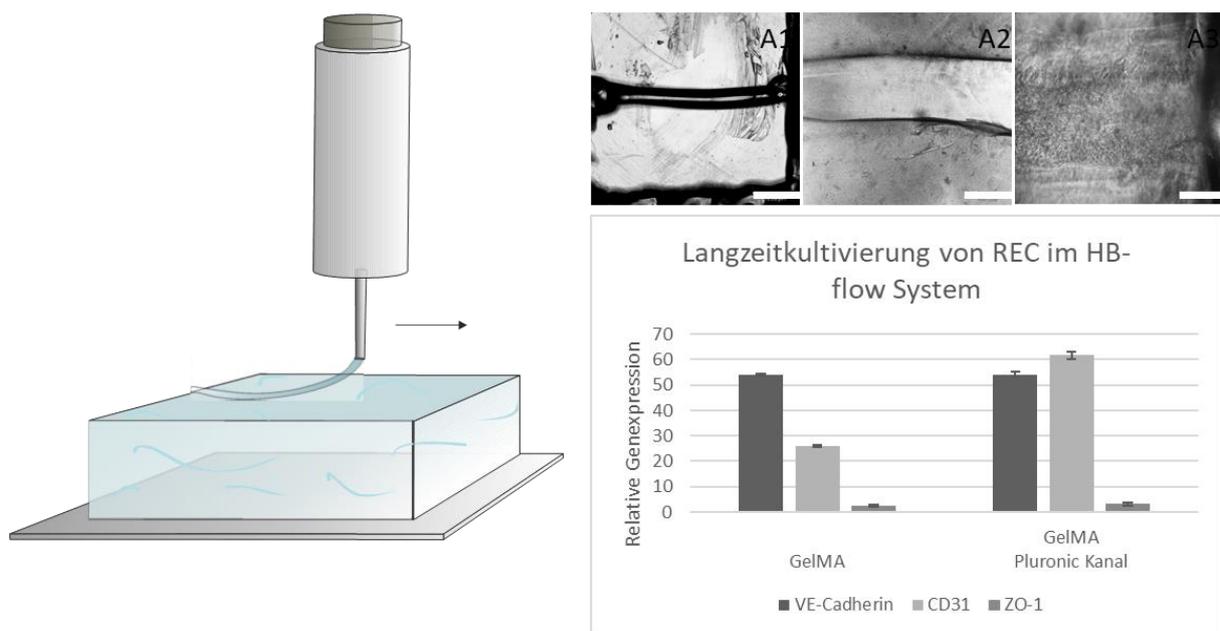


Abbildung 70: Pluronic F-127 als Opferstruktur für die Erstellung eines Mikrokanals im *HB-flow* System mit Hilfe des 3D Extrusionsdrucks. Es wurde eine 40 %ige Pluronic F-127 Lösung in Wasser angesetzt und bei 4°C über mehrere Tage gelöst. Das gelöste Pluronic F-127 konnte dann in eine 10 ml Spritze mit abgestumpfter, konischer 27 G Kanüle gefüllt und bei RT auf ein vernetztes 4 %igem GelMA (8 Äq) Hydrogel in der Gerüststruktur des *HB-flow* Systems gedruckt. Anschließend wurde die Opferstruktur mit 4 %igem GelMA (8 Äq) Hydrogel überschichtet. Nach 10 min Inkubation bei 4°C konnte das Pluronic F-127 entfernt werden. Der entstandene Mikrokanal wurde dann mit insgesamt $2 \cdot 10^5$ REC besiedelt. Eine Kultivierung erfolgte über 5 Tage, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Nach Kultivierungsende wurde die Genexpression von ZO-1, VE-Cadherin sowie CD31 im retinalen Endothel durch eine farbstoffbasierte RT-qPCR Analyse untersucht. GAPDH diente als Referenz und es wurde auf die Kontrolle der 2D kultivierten REC normiert (=1). Die Genexpression wurde durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt mit $n=3$. Maßstab $1250\ \mu\text{m}$ (A1) bzw. $520\ \mu\text{m}$ (A2) bzw. $259\ \mu\text{m}$ (A3). Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop

Anhand der Genexpressionsanalyse wurde deutlich, dass REC im Pluronic F-127 gedruckten Mikrokanal ähnlich gut adhären und *Tight Junction* Proteine exprimieren konnten wie im Mikrokanal des *HB-flow* Systems mit der Nadelmethode. Im Vergleich zu der 2D Kultivierung von REC in einer Zellkulturplatte waren die Expressionen aller *Junction* Proteine in beiden *HB-flow* Systemen erhöht. Die im herkömmlichen *HB-flow* System kultivierten REC sowie die im Pluronic-Kanal kultivierten REC wiesen beide die gleiche Genexpression von VE-Cadherin auf ($54,19 \pm 1,7$ bzw. $2,32$). Die Genexpression von CD31 war im Vergleich zum herkömmlich erstellten Mikrokanal ($26,05 \pm 0,4$) bei den REC im Pluronic-Kanal ($61,8 \pm 3,4$) erhöht. Auch bei der Genexpression von ZO-1 wurde eine Hochregulierung im Pluronic-Kanal ($3,2 \pm 0,58$) gegenüber der Kultivierung im herkömmlichen Mikrokanal ($2,4 \pm 0,41$) verzeichnet. Diese Ergebnisse zeigen, dass Pluronic F-127 als Opferstruktur keine negativen Auswirkungen auf die Zellviabilität und -adhäsion der anschließend in den Mikrokanal des *HB-flow* Systems eingebrachten REC aufweist. Dies belegt auch die Zulassung durch die *Food and Drug Administration*, die Pluronic als biokompatibles, injizierbares und thermoresponsives Polymer mit vielversprechenden biomedizinischen Anwendungen einordnet ^{[538][106]}. Pluronic F-127, auch als Poloxamer 407 bekannt, wird häufig in der *Tissue Engineering* eingesetzt, da es als konsistentes Produkt im Handel erhältlich ist, einen Sol-Gel-Übergang nahe der physiologischen Temperatur und dem pH-Wert hat ^[539]. Neben seiner Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit eignet sich Pluronic F-127 für den 3D Biodruck ab einem Verhältnis von 20 % v/v in Wasser ^[527]. Andere Studien haben bereits Pluronic F-127 als Opfermaterial zur Erzeugung von vaskularisierten Mikrokanälen in GelMA Hydrogelen eingesetzt ^[527]. Die Verwendung von einem Opfermaterial wie Pluronic F-127 oder aber eines Stützmaterials wie PMMA ist bei der Erzeugung komplexer 3D-Hydrogelstrukturen unvermeidlich ^[541].

Zudem war es möglich den aus Pluronic F-127 erstellten Mikrokanal mit der Mikrofluidik durch den Anschluss einer Peristaltikpumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,05 ml/min zu verbinden (**Abbildung 71**). Auch hier war es essentiell das *HB-flow* System durch simultanes Drücken und Ziehen des Mediums mikrofluidisch zu kultivieren, um einen Überdruck im Hydrogel zu vermeiden. Um dies zu gewährleisten wurde der aus dem Medienreservoir führende Schlauch in Pumprichtung um die Peristaltikpumpe gelegt und dann mit dem Eingang des Mikrokanals im *HB-flow* System verbunden. Das mit dem Ausgang des Mikrokanals verbundene Schlauchende wurde dann entgegen der Pumprichtung um die Peristaltikpumpe gelegt und in das Medienreservoir zurückgeführt. Damit konnte ein Überdruck im Hydrogel verhindert und ein zielgerichteter Fluss gewährleistet werden, wie der ausschließlich im Mikrokanal befindliche blaue Farbstoff demonstriert.

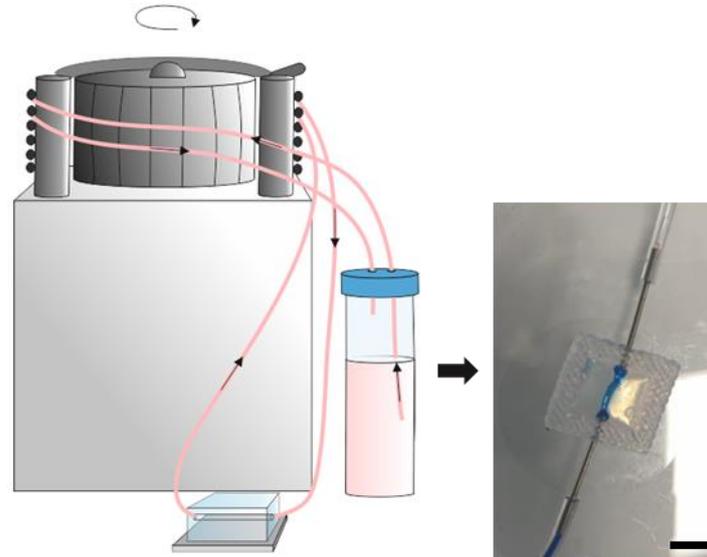


Abbildung 71: Perfusion des 3D gedruckten Mikrokanals im *HB-flow* System mittels Peristaltikpumpe. Eine 40 %ige Pluronic F-127 Lösung wurde als Opfermaterial im 3D Biodruck eingesetzt. Durch das Verbinden des Mikrokanals im *HB-flow* System mit einer Peristaltikpumpe konnte eine mikrofluidische Durchströmung mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,05 ml/min realisiert werden. Maßstab 1000 µm.

Auch in der Literatur sind einige Hydrogel-basierte *Organ-on-chip* Systeme zu finden, die zur Erzeugung mikrofluidischer Kanäle andere Opferstrukturen als Pluronic F-127 verwenden. Studien zeigten, dass Gelatine als Opferstruktur in Fibrin- oder Kollagenhydrogelen eingesetzt werden kann und Mikrokanäle in einem Durchmesser von 6 µm erstellt werden können und diese mikrofluidischen Hydrogele als Gerüststruktur für humane mikrovaskuläre Endothelzellen dienen ^[131]. In anderen Studien wiederum wurden 3D-Filamente aus Kohlenhydratglas für die Erzeugung von Mikrokanälen verwendet. Die mit Endothelzellen ausgekleideten Mikrokanäle konnten unter pulsierendem Hochdruckfluss durchströmt werden. Dabei konnte die metabolische Funktion von primären Hepatozyten der Ratte in den perfundierten Gefäßkanäle aufrechterhalten werden ^[542].

4.6.7 Kultivierung von RPE auf dem Hydrogel im *HB-flow* System

Nachdem ein geeignetes Hydrogel zum Erstellen des Mikrokanals des *HB-flow* Systems und zur erfolgreichen Kultivierung der REC im Mikrokanal identifiziert wurde, konnte im nächsten Schritt RPE auf die Hydrogeloberfläche ausgebracht werden. Die humane immortalisierte RPE-Zelllinie ARPE-19, wurden entwickelt, um die Robustheit und Verfügbarkeit von RPE-Zellen zu verbessern. Aufgrund des schnellen Wachstums ohne zusätzliche Differenzierung und der guten Adhäsion auf der Oberfläche von Substraten wurden für diesen Versuch ARPE-19 Zellen gewählt ^[268]. Die Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt.

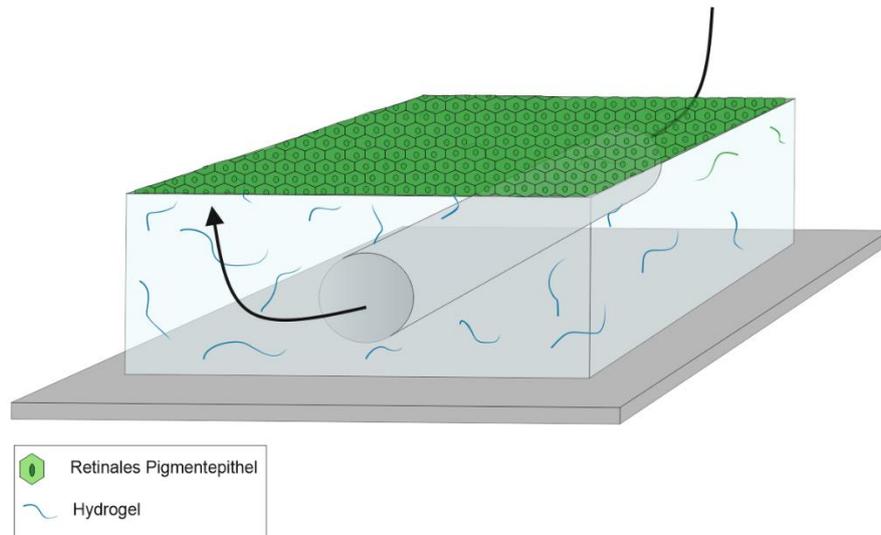


Abbildung 72: Schematische Darstellung der Etablierung des RPEs im *HB-flow* System. In die Gerüststruktur des *HB-flow* System kann ein GelMA/ Kollagen I Hydrogel in einem Volumen von 150 μl eingebracht und anschließend ein Fibrinhydrogel darüber positioniert werden. Der Mikrokanal wurde durch eine Kanüle erstellt. Auf die Oberfläche des Fibrinhydrogels können RPE Zellen ausgebracht werden.

In die Gerüststruktur des *HB-flow* System wurde ein 4 %iges GelMA (8 Äq) Hydrogel in einem Volumen von 100 μl eingebracht und mit 500 mW/cm^2 für 30 s vernetzt. Anschließend wurde ein Fibrinhydrogel aus 5 mg/ml Fibrinogen in einem Volumen von 50 μl auf das vernetzte GelMA Hydrogel gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Vernetzung und Aushärtung der Hydrogele wurde die Kanüle aus der Gerüststruktur entfernt, um den Mikrokanal zu generieren. Auf die Oberfläche des Fibrinhydrogels wurde in einem Volumen von 200 μl eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ ARPE19 Zellen ausgebracht die während einer Inkubation von 6 h auf der Oberfläche des Fibrinhydrogels adhärten. Anschließend wurde das *HB-flow* System in ARPE-M überführt und für 3 Tage kultiviert. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurde das Hydrogel fixiert und mit Hilfe von Immunfluoreszenz analysiert (**Abbildung 73**). Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 μM) visualisiert. Anschließend wurde die Adhäsion der ARPE19 Zellen konfokalmikroskopisch untersucht. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass die ARPE19 Zellen problemlos auf der Fibrinhydrogeloberfläche adhärten und proliferieren konnten. Dabei bildete sich eine homogene ARPE19 Zellschicht über die gesamte Oberfläche des *HB-flow* Systems, inklusive des Mikrokanals. Vielversprechend für die anschließende Rekonstruktion der oBRB war auch die Tatsache, dass die Gerüststruktur aus GelMA wie zu erwarten noch vorhanden und intakt war.

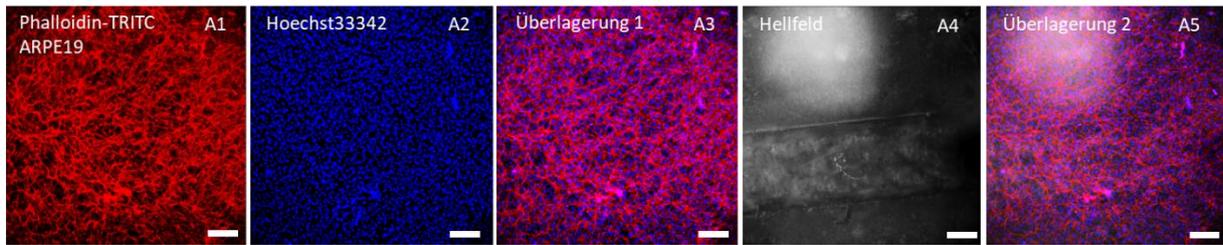


Abbildung 73: ARPE19 Zellen im *HB-flow* System auf einer Hydrogeoberfläche. In die Gerüststruktur des *HB-flow* Systems wurde ein 4 %iges GelMA (8 Åq) Hydrogel in einem Volumen von 100 µl eingebracht und mit 500 mW/cm² für 30 s vernetzt. Anschließend wurde ein Fibrinhydrogel aus 5 mg/ml Fibrinogen in einem Volumen von 50 µl auf das vernetzte GelMA Hydrogel gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Vernetzung und Aushärtung der Hydrogele wurde die Kanüle aus der Gerüststruktur entfernt, um den Mikrokanal zu generieren. Auf die Oberfläche des Fibrinhydrogels wurde in einem Volumen von 200 µl eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ ARPE19 Zellen ausgebracht, die während einer Inkubation von 6 h auf der Oberfläche des Fibrinhydrogels adhärten. Anschließend wurde das *HB-flow* System in ARPE-M überführt und für 3 Tage kultiviert. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurde das Hydrogel mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert und mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (2 µg/ml; A2) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 µM; A1) visualisiert. Zudem wurde eine Hellfeldaufnahme erstellt (A4). Anschließend wurden die Signale überlagert (A3; A5) und die Adhäsion der ARPE19 Zellen konfokalmikroskopisch untersucht. Maßstab 100 µm. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich für die Kultivierung von RPE-Zellen mehrere Materialien als Gerüststruktur eignen, wozu unter anderem natürliche ^[543] und synthetische Polymere ^[544] zählen. *In vitro* kultivierte RPE Zellen zeigten positive Ergebnisse bezüglich ihrer Viabilität ^[545], Ausbildung von *Tight Junctions* ^[546] sowie der Fähigkeit zur Phagozytose ^[547] auf natürlichen Polymeren. Studien haben bereits die erfolgreiche Kultivierung von ARPE19 Zellen auf einer Fibrinmatrix demonstriert. Dabei wurde ein biomimetisches mikrofluidisches Modell der oBRB erstellt, das als wichtiges physiologisches Merkmal eine intakte Barrierefunktion aufwies. ^[145] Diese Angaben korrelieren mit den Ergebnissen aus der Kultivierung der ARPE-Zellen im *HB-flow* System. Fibrinhydrogele eignen sich auch für die Kultivierung von ARPE19 Zellen und können bei der Rekonstruktion der oBRB im *HB-flow* System eingesetzt werden.

4.6.8 Ko-Kultivierung von REC und RPE im *HB-flow* System

Nach der erfolgreichen Etablierung des retinalen Endothels im Mikrokanal des *HB-flow* Systems sowie des RPEs auf der Hydrogelfläche wurde zur Nachstellung der oBRB eine Ko-Kultur beider Zelltypen im *HB-Flow* System zusammen mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit etabliert. Dazu wurde in das *HB-flow* System 100 µl eines 4 %igen GelMA (8 Åq) Hydrogels mit einem Anteil von 40 % Kollagen I als Gerüststruktur eingebracht und durch Licht einer spezifischen Wellenlänge vernetzt. Anschließend wurden 60 µl eines Fibrinhydrogels (5 mg/ml) auf das bereits vernetzte Gelatine basierte Hydrogel ausgebracht und für 10 min bei RT inkubiert, um eine Polymerisation zu initiieren. Anschließend wurde die Fibrinhydrogeloberfläche mit Laminin (1 µg/cm²) beschichtet. Der Mikrokanal des *HB-flow* Systems wurde mit Hilfe einer zuvor eingebrachten 26 G Kanüle generiert. Bevor $1 \cdot 10^5$ REC in den Mikrokanal

eingbracht wurden, erleichterte eine vorangegangene Inkubation des *HB-flow* Systems über Nacht in ARPE-M die Adhäsion der Endothelzellen. Am darauffolgenden Tag wurde das *HB-flow* System durch eine 180 ° Drehung an der Horizontalen gewendet und die obere Seite des Mikrokanals ebenfalls mit $1 \cdot 10^5$ REC besiedelt. Nachdem die Zellen im Mikrokanal vollständig adhärirt waren, wurde das *HB-flow* System wieder seine Ausgangsposition gebracht. Auf die Oberfläche des Fibrinhydrogels wurden $1 \cdot 10^5$ ARPE19 Zellen ausgebracht und durften für einen Zeitraum von 6 h adhäreren. Anschließend wurde das *HB-flow* System unter statischen Bedingungen über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurde das *HB-flow* System mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert und mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert. Anschließend folgte eine Visualisierung der Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml) und die des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-TRITC (0,1 µM). Anschließend wurde das retinale Endothel konfokalmikroskopisch untersucht. Anhand von *Z-Stack*-Projektion wurden die Zellstrukturen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt, wobei eine Tiefenfärbung 3D-Volumen visualisierte.

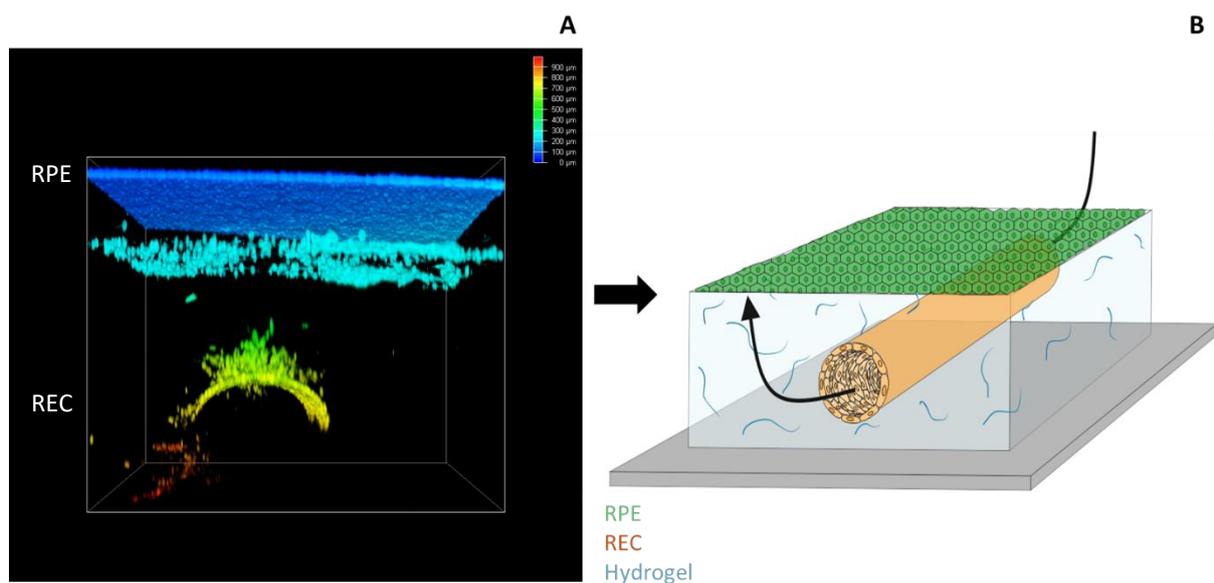


Abbildung 74: oBRB Modell im *HB-flow* System aus ARPE19 Zellen und REC im Mikrokanal. In das *HB-flow* System wurden 100 µl eines 4 %igen GelMA (8 Åq) Hydrogels mit einem Anteil von 40 % Kollagen I als Gerüststruktur eingebracht und mit 500 mW/cm² für 30 s vernetzt. Anschließend wurden 60 µl eines Fibrinhydrogels (5 mg/ml) auf das bereits vernetzte Gelatine basierte Hydrogel ausgebracht, vernetzt (10 min; RT) und mit Laminin (1 µg/cm²) beschichtet. Der Mikrokanal des *HB-flow* Systems wurde mit Hilfe einer zuvor eingebrachten 26 G Kanüle generiert. Das *HB-flow* System wurde in einem 6 Well mit 5 ml ARPE-M über Nacht inkubiert und anschließend wurden insgesamt $2 \cdot 10^5$ REC in den Mikrokanal eingebracht. Die Oberfläche des Fibrinhydrogels wurde mit $1 \cdot 10^5$ ARPE19 Zellen (200 µl; ARPE-M) besiedelt. Anschließend wurde das *HB-flow* System unter statischen Bedingungen über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert. Nach Beenden des Kultivierungszeitraums wurde das *HB-flow* System mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert und mit Triton-X (0,1 %; 4 min; RT) permeabilisiert. Anschließend folgte eine Visualisierung der Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml) und die des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-TRITC (0,1 µM). Anschließend wurde das retinale Endothel konfokalmikroskopisch untersucht. Anhand der Tiefenfärbung fand eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Maßstab 200 µm. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala der Tiefenfärbung in 100 µm: blau= 0 µm; rot= 900 µm

Anhand der Fluoreszenzfärbung wurde deutlich, dass die ARPE19 Zellen einen konfluenten RPE-Zelllayer auf der Oberfläche des Fibrinhydrogels ausbilden konnten. Zudem bildeten die im Mikrokanal befindlichen REC ein konfluentes Endothel über die gesamte Fläche des Mikrokanals aus. Allerdings wurde der Mikrokanal beim Herauslösen der Kanüle an der Oberseite leicht beschädigt, weshalb die Zellen nach der Besiedelung aus dem Mikrokanal auswachsen konnten. Eine unerwünschte Zellschicht zwischen den beiden Hydrogelen wurde durch die Besiedelungstechnik des *HB-flow* Systems hervorgerufen. Um dies zukünftig zu verhindern besteht eine Möglichkeit darin, das Fibrinhydrogel als dünne Beschichtung des GelMA Hydrogels zu verwenden, das sich während der Bildung eines konfluenten RPE-Zelllayers abbaut und dieser anschließend auf dem GelMA Hydrogel aufliegt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, das besiedelte *HB-flow* System nach der Mikrokanalbesiedelung mit Endothelzellen nicht direkt in Medium zu kultivieren, sondern bis zu deren Adhäsion an der Mikrokanalwand eine Inkubation ohne Medium vorzuziehen. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Zellen ausreichend mit Nährstoffen versorgt bleiben. Andere Studien zeigten bereits, dass mikrofluidische Kanäle für verschiedene Matrixzusammensetzungen zugänglich sind, und Matrizen auf Kollagen-I-, Fibrin- und Matrigelbasis zusammen mit abstimmbaren, synthetischen Hydrogelen erstellt werden können ^{[548]; [146]}. Diese vielversprechenden Ergebnisse aus diesem Experiment erlauben zukünftig einen Einsatz des *HB-flow* Systems für die Rekonstruktion der oBRB und deren Krankheitsbildern ^[124].

4.7 AMD als Krankheitsmodell

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine neurodegenerative Erkrankung der alternden Retina, die schätzungsweise weltweit etwa 314 Millionen Menschen betrifft. Die AMD ist in den Industrieländern eine der Hauptursachen für Sehverlust und Erblindung bei Menschen über 60 Jahren ^{[549][124]}. Pathologische Veränderungen des RPEs und der damit verbundene Verlust von Photorezeptoren sind Ursache der Erblindung. Obwohl von den beiden existierenden Formen, die trockene AMD am häufigsten vorkommt, ist die vaskuläre AMD für den größten Anteil an Sehverlusten bei Patient*innen verantwortlich. Es stehen jedoch nur begrenzt Therapiemöglichkeiten zur Verfügung, die nur bei einer geringen Anzahl an Betroffenen Wirkung zeigen. Die zukünftige umfassende klinische Versorgung hängt von der Identifizierung neuer therapeutischer Ziele und der Annahme eines multitherapeutischen Ansatzes ab. Derzeit beruht die einzige Behandlungsmöglichkeit auf intravitrealen Injektionen von Anti-VEGF, um die Angiogenese zu hemmen und den Sehverlust zu minimieren ^[550]. In Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl fand die modellhafte Nachbildung einer AMD Mikroumgebung in der rekonstruierten oBRB statt.

4.7.1 Untersuchung der Viabilität der oBRB unter hypoxischen Bedingungen im Transwell durch einen MTT-Nachweis

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass oxidativer Stress bei der Pathogenese von AMD eine Rolle spielt [551]; [234]. Die Retina benötigt zur Aufrechterhaltung der hohen Stoffwechselrate vergleichsweise höhere Sauerstoffkonzentrationen, wobei mit steigendem Sauerstoffverbrauch bei Entzündungsreaktionen eine größere Anzahl an reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid [234] produziert wird [239]. Entzündung und lokale Hypoxie treten bei der Alterung von Choriokapillaris, RPE-Zellen und neuraler Netzhaut auf [236]. Darüber hinaus führt die tägliche Phagozytose der äußeren Photorezeptorsegmente zur Erzeugung freier Radikale in den RPE Zellen. Daher sind RPE-Zellen langfristig anfällig für oxidativen Stress und die damit einhergehende Dysfunktion der RPE-Zellen trägt zur Entwicklung von AMD bei [239]; [552]. Dies führt zu einer Verdickung der Bruch-Membran, wodurch die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen vom Choroid zum RPE eingeschränkt wird und ein Zustand der relativen Hypoxie innerhalb der subretinalen Kompartimente entsteht, der zur AMD Pathogenese beiträgt [237]. Die Behandlungen von AMD sind im Allgemeinen präventiv [553].

Für die Erzeugung oxidativen Stresses wurden in dieser Arbeit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Cobaltchlorid ($CoCl_2$) eingesetzt. Für die Behandlung der Zellen mit den Chemikalien musste zunächst eine geeignete, nicht-letale Konzentration mit Hilfe eines MTT-Toxizitätstest identifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt. Um die Toxizität von H_2O_2 und $CoCl_2$ auf ARPE19, REC sowie HUVECs zu untersuchen, wurden diese jeweils in 96-Well-Kultivierungsplatten ($3 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) kultiviert, entsprechend behandelt und 72 h inkubiert. Als Referenzwerte dienten Lebend- und Totkontrollen, bei denen keine Zugabe des zu untersuchenden Stoffes erfolgte. Zur Totkontrolle wurden zunächst Triton-X (1 %) zugegeben, bevor die Zugabe von MTT in allen Wells folgte. Nach einer Inkubation von 3 h wurde ein Lysispuffer als Stop Lösung zur Homogenisierung des Farbstoffes zu den Probenwells gegeben. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm, wodurch Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen gezogen werden konnte [513].

4.7.1.1 Wasserstoffperoxid

Die Strukturformel des zur Erzeugung von oxidativem Stress eingesetzte H_2O_2 ist in **Abbildung 75** dargestellt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an H_2O_2 (0,25 mM, 0,125 mM, 0,05 mM) behandelt, wobei die Zellviabilität nach der Behandlung in einem Diagramm dargestellt wurde. Anhand des MTT-Toxizitätstests wurde ersichtlich, dass die ARPE19 Zellen bei einer H_2O_2 Behandlung einen LD_{50} -Wert von $>0,125$ mM ($87,3 \% \pm 0,09$) aufweisen. Für die HUVEC und REC konnte kein LD_{50} -Wert bestimmt werden, da diese bei allen eingesetzten Konzentrationen eine Viabilität über dem kritischen LD_{50} -Wert aufwiesen. Dies zeigt, dass die RPE Zellen besonders sensitiv gegenüber

oxidativem Stress reagierten. Verglichen mit der Literatur wurden ähnliche Konzentrationen an H_2O_2 eingesetzt. iPSC-RPE von AMD Patienten sowie RPE von gesunden Spendern wurde mit verschiedenen H_2O_2 Konzentrationen im Bereich von 0 bis 10 mM für 24 oder 48 h behandelt, um die Einwirkung von oxidativem Stress zu untersuchen. ^[554]

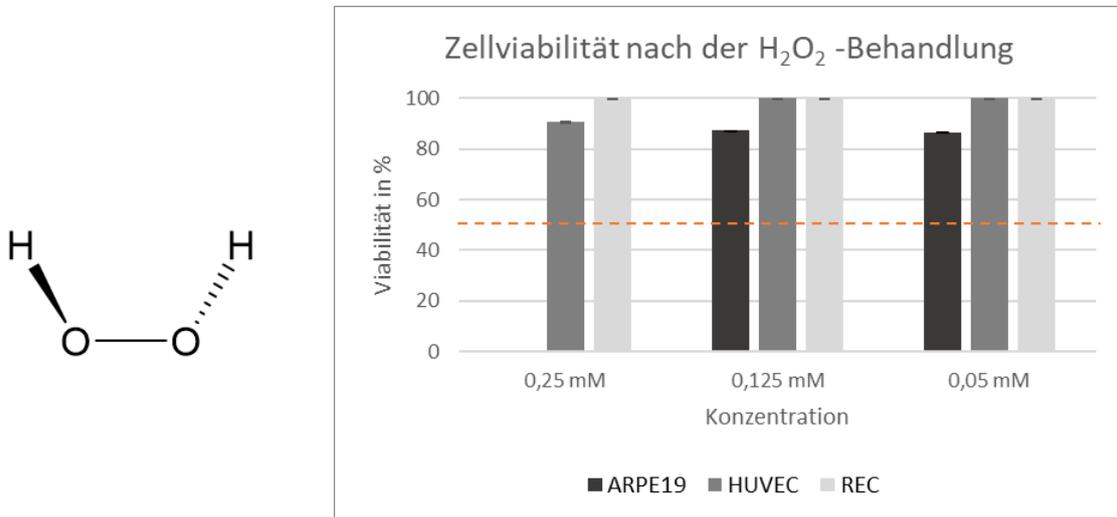


Abbildung 75: Strukturformel von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und die Bestimmung der Toxizität von H_2O_2 gegenüber Zellen der oBRB durch einen MTT-Nachweis. Um die Toxizität von H_2O_2 auf ARPE19, REC sowie HUVEC zu untersuchen, wurden diese jeweils in 96-Well-Platten in einer Zellzahl von $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Well kultiviert. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an H_2O_2 (0,25 mM, 0,125 mM, 0,05 mM) eingesetzt und 72 h inkubiert. Als Referenzwerte dienen Lebend- und Totkontrollen, bei denen keine Zugabe von H_2O_2 erfolgte. Zur Totkontrolle wurden zunächst 1 % Triton-X zugegeben, anschließend folgte die Zugabe von MTT in allen Wells. Nach einer Inkubation von 3 h wurde ein Lysispuffer als Stop Lösung zur homogenen Lösung des Farbstoffes zu jedem Probenwell gegeben. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm, wodurch die Viabilität der Zellen vergleichend betrachtet werden konnte.

Der MTT-Toxizitätstest zeigt gegenüber der Behandlung von Zellen mit H_2O_2 ähnliche Ergebnisse wie in der Literatur beschrieben. Dabei wurde anhand von TEER-Messungen deutlich, dass die parazelluläre Permeabilität in differenzierten Caco-2-Zellen durch H_2O_2 erhöht wurde, ohne den transzellulären und aktiven Transport zu beeinträchtigen. ^[555] *In vitro* AMD-Modelle aus ARPE19 Zellen wurden in anderen Studien oxidativem Stress in Form von 200 μM H_2O_2 ausgesetzt. ^[233] ^[556] Diese angegebene Konzentration liegt in einem ähnlichen Bereich wie die eingesetzte in diesem Experiment. Die Anhand der Literatur wurde deutlich, dass sich H_2O_2 auf Epithelzellen unterschiedlichen Ursprungs verschieden auf die epitheliale Barrierefunktion und die Verteilung von *Tight Junction* Proteinen auswirkt. ^[557] Für die Erstellung einer AMD-nachempfundenen Mikroumgebung eignet sich für die oBRB aus ARPE19 und REC Zellen eine H_2O_2 Konzentration von 0,125 mM.

4.7.1.2 Cobaltchlorid

Eine der am häufigsten verwendeten Chemikalien zur Imitation von hypoxischen Bedingungen ist Cobaltchlorid (CoCl_2). Hierbei besteht die Möglichkeit Proben über einen großen Zeitraum unter normoxischen Bedingungen zu manipulieren und zu analysieren. ^[558] Die Strukturformel von CoCl_2 , das zur Erzeugung oxidativen Stresses eingesetzt wurde ist in **Abbildung 76** dargestellt. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an CoCl_2 (1,5 mM, 150 nM, 50 nM) untersucht, wobei die Zellviabilität graphisch dargestellt wurde.

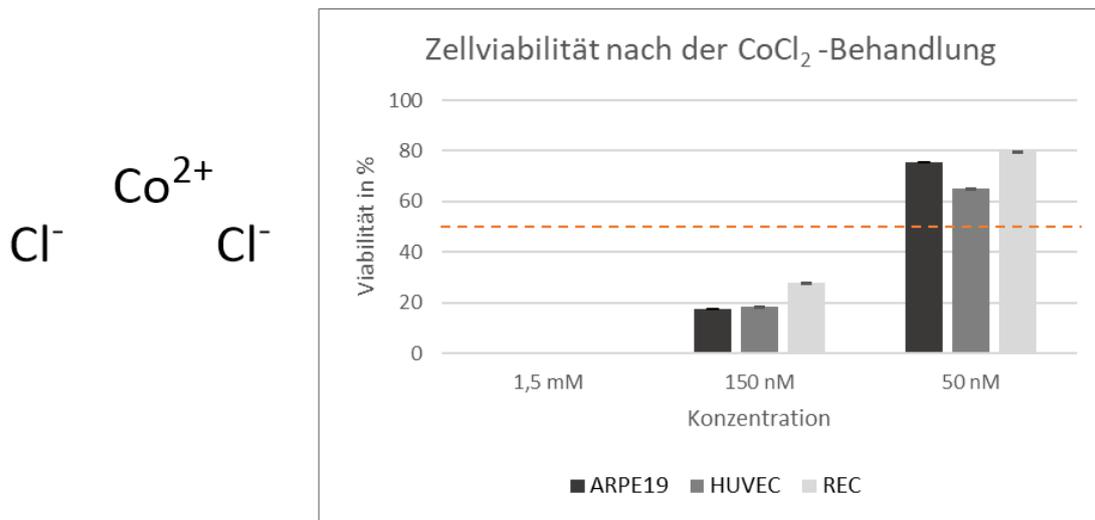


Abbildung 76: Strukturformel von Cobaltchlorid (CoCl_2) und die Bestimmung der Toxizität von CoCl_2 gegenüber Zellen der oBRB durch einen MTT-Nachweis. Um die Toxizität von CoCl_2 auf ARPE19, REC sowie HUVEC zu untersuchen, wurden diese jeweils in 96-Well-Platten in einer Zellzahl von $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Well kultiviert. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an CoCl_2 (1,5 mM, 150 nM, 50 nM) eingesetzt und 72 h inkubiert. Als Referenzwerte dienten Lebend- und Totkontrollen, bei denen keine Zugabe von CoCl_2 erfolgte. Zur Totkontrolle wurden zunächst 1 % Triton-X zugegeben, anschließend folgte die Zugabe von MTT in allen Wells. Nach einer Inkubation von 3 h wurde ein Lysispuffer als Stop Lösung zur homogenen Lösung des Farbstoffes zu jedem Probenwell gegeben. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm, wodurch die Viabilität der Zellen vergleichend betrachtet werden konnte.

Anhand des MTT-Toxizitätstests wurde ersichtlich, dass der LD_{50} -Wert für CoCl_2 bei den ARPE19 Zellen >50 nM war. Ausschließlich bei einer Konzentration von 50 nM CoCl_2 ($75,5\% \pm 0,03$) wurde der kritische LD_{50} -Wert überschritten. Auch die HUVEC der LD_{50} -Wert bei einer CoCl_2 Konzentration von >50 nM eine vollständige Letalität auf. Ausschließlich bei einer Konzentration von 50 nM CoCl_2 ($65,2\% \pm 0,09$) wurde der kritische LD_{50} -Wert überschritten. Identisch zu den beiden anderen Zelltypen lag der LD_{50} -Wert bei REC ebenfalls bei einer CoCl_2 Konzentration >50 nM. Ausschließlich bei einer Konzentration von 50 nM CoCl_2 ($79,7\% \pm 0,03$) wurde der kritische LD_{50} -Wert überschritten. Der MTT-Toxizitätstest zeigt gegenüber der Behandlung von Zellen mit CoCl_2 ähnliche Ergebnisse wie in der Literatur beschrieben. In anderen Studien wurden 100 μM CoCl_2 zur Simulation hypoxischer Bedingungen eingesetzt, um den Einfluss auf die Barrierefunktion von humanen mikrovaskulären Endothelzelllinien des Gehirns zu untersuchen. Dabei nahm, übereinstimmend mit früheren Studien,

die Barrierefunktion und -integrität signifikant ab ^[559]. CoCl_2 verringert nach Angaben der Literatur bereits nach 24 h die Barrierefunktion von Endothelzellen des Rattenhirns signifikant ^[560]. Für die Erstellung einer AMD-nachempfundenen Mikroumgebung eignet sich für die oBRB aus ARPE19 und REC Zellen eine CoCl_2 Konzentration von 50 nM.

4.7.2 Analyse der Barriereintegrität unter hypoxischen Bedingungen

Hauptursache der AMD stellt die Degeneration des RPEs dar und verursacht somit den Verlust der Barriereintegrität ^[561].

4.7.2.1 TEER-Messung zur Bestimmung der Barriereintegrität unter hypoxischen Bedingungen

Da die Barriere Integrität für die physiologischen Aktivitäten der oBRB von entscheidender Bedeutung ist wurde eine TEER-Messung unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit B. Sc. Eric Pohl im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt. Dazu wurde eine Ko-Kultur aus mESC-Rx-GFP differenziertem RPE und REC in einem Transwelleinsatz einer 24-Well Kultivierungsplatte erstellt. Es wurde ein Transwell (0,4 μm Porengröße) auf der Innenseite mit Laminin (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 h) beschichtet und die Unterseite anschließend mit *Speed Coating* Lösung (0,2 % Gelatine; 2 min) bei Raumtemperatur. $9,4 \cdot 10^4$ RPE-Vorläuferzellen aus der Differenzierung von mESC-Rx-GFP wurden an DD11 auf der Innenseite des Transwells ausgebracht und bis DD18 zu RPE differenziert. Anschließend wurde das Transwell luftblasenfrei um 180 ° gedreht und in ein RPE-M befülltes 12-Well eingebracht. $3 \cdot 10^4$ REC wurden auf der Unterseite des Transwells in RECM ausgebracht und den Zellen die Möglichkeit gegeben über Nacht zu adhären. Anschließend wurde das Transwell wieder in seine Ausgangsposition gebracht und in eine 24-Well Kultivierungsplatte mit RPE-M überführt. Der elektrische Widerstand wurde mit einem EVOM3-Messgerät an DD21 bestimmt. Als Leerwiderstand der TEER-Messung diente ein mit Laminin beschichtetes 0,4 μm poröses Transwell gefüllt mit RPE-M (**Abbildung 77**). Es wurden zunächst Messungen im Transwell vor der Behandlung mit H_2O_2 durchgeführt und anschließend nach der Behandlung mit 0,125 mM H_2O_2 (30 min), um die Unterschiede in der Barriereintegrität analysieren zu können. Zum Vergleich wurde eine Ko-Kultur ebenfalls mit 50 nM CoCl_2 (30 min) behandelt. Dazu wurde eine Elektrode in das obere Kompartiment und die andere in das Untere eingebracht. Das Messverfahren umfasste die Messung des Leerwiderstands (R_{BLANK}) der semipermeablen Membran ohne Zellen und die Messung des Widerstands über die Zellschicht auf der semipermeablen Membran (R_{TOTAL}). Der zellspezifische Widerstand (R_{TISSUE}) in Ω wurde durch die Differenz von R_{TOTAL} und R_{BLANK} errechnet. Dabei war der Widerstand umgekehrt proportional zur effektiven Fläche in cm^2 der semipermeablen Membran (M_{AREA}). Die TEER-Werte aus dem Produkt von $R_{\text{TISSUE}}(\Omega)$ und $M_{\text{AREA}}(\text{cm}^2)$ wurden in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben

und graphisch dargestellt ^[417]. Anhand der TEER-Messung der Ko-Kultur aus mESC-Rx-GFP differenziertem RPE und REC vor der Behandlung konnte gezeigt werden, dass der TEER-Wert bei $99,2 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 11,4$ an DD21 lag. Nach der Behandlung mit H_2O_2 war der TEER Messwert auf $86,7 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 8,5$ gesunken. Abgeleitet von dem elektrischen Widerstand veranschaulichte dies, dass die Integrität der Barriere bei einer Ko-Kultur von differenzierten RPE und REC, wie in der *in vivo* oBRB, am größten ist und unter hypoxischen Bedingungen sinkt. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Behandlung mit CoCl_2 . Vor Behandlung konnte bei der Ko-Kultur an DD21 ein TEER-Wert von $81,9 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 8,1$ ermittelt werden. Nach der Behandlung lag der Wert nur noch bei $70,8 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 5,01$. Sowohl H_2O_2 als auch CoCl_2 haben einen negativen, aber nicht statistische signifikanten Effekt auf die Barriereintegrität der im Transwell etablierten oBRB. Zudem änderte sich die Morphologie der mit H_2O_2 behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, indem die hexagonalen Zellen nicht mehr deutlich voneinander abgegrenzt waren (Abbildung B). CoCl_2 hingegen beeinflusste die Morphologie nicht (Abbildung C).

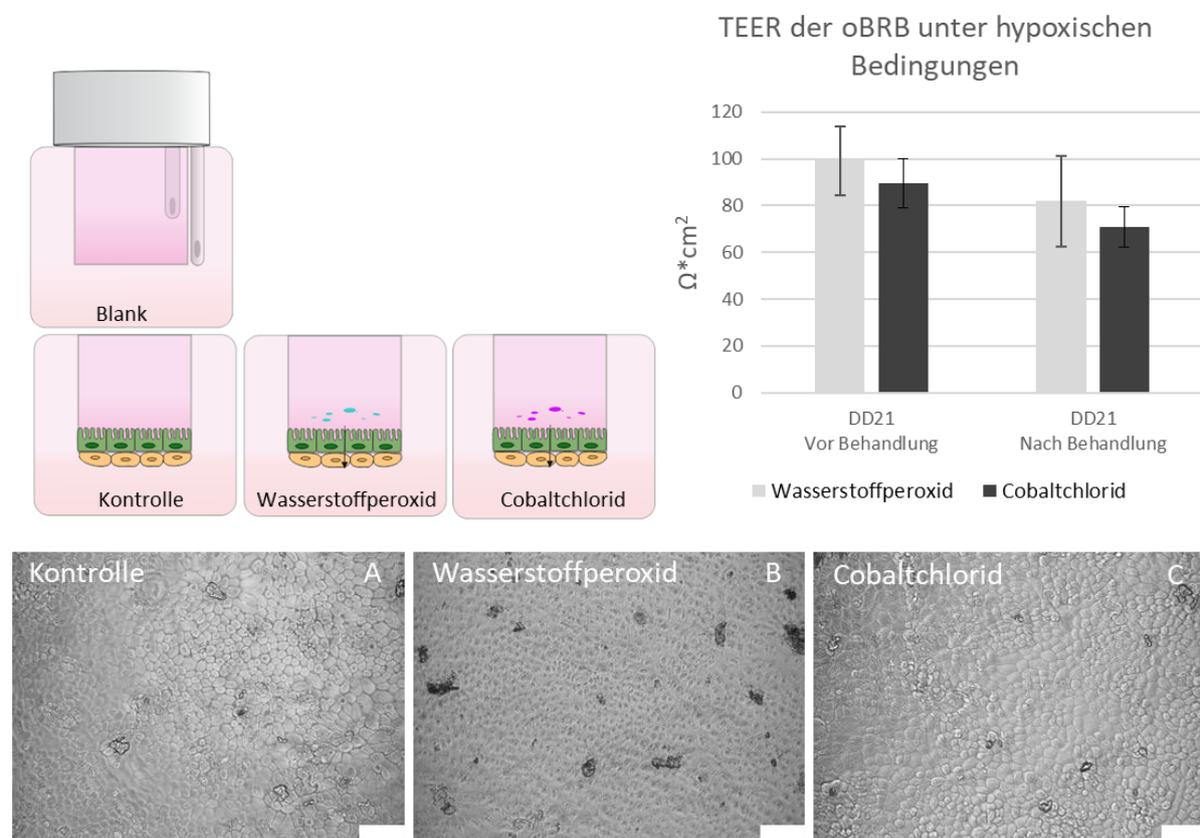


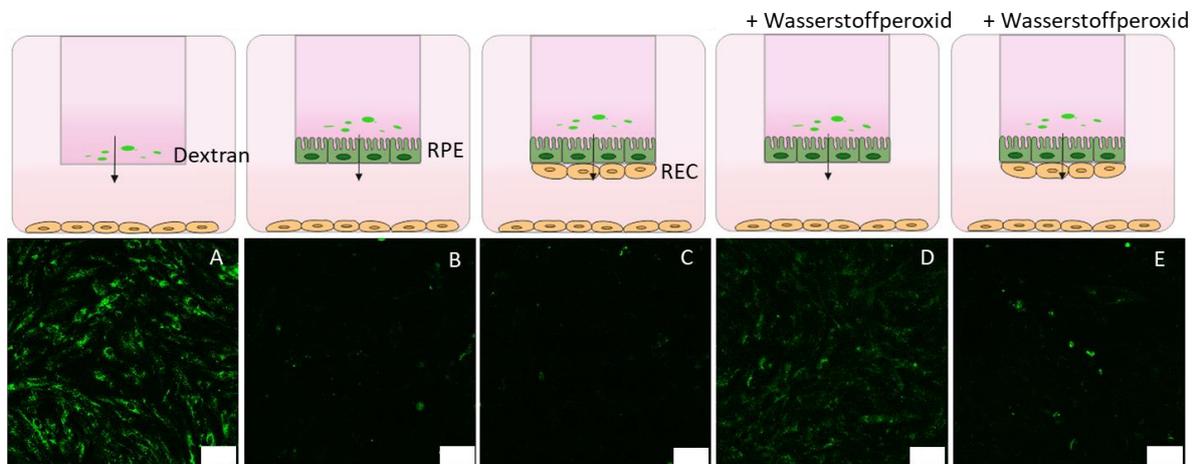
Abbildung 77: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) von Zelltypen der oBRB. Zur Bestimmung des TEER wurden Transwells mit $0,4 \mu\text{m}$ Poren auf der Innenseite für 1 h mit Laminin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet. Die Unterseite wurde für 2 Minuten mit *Speed Coating* Lösung beschichtet. Auf die Innenseite des Transwells wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE Vorläuferzellen von DD11 ausgebracht und bis DD18 differenziert. Dann wurden auf die Unterseite des Transwells jeweils $3 \cdot 10^4$ REC in $200 \mu\text{l}$ REC ausgebracht. Nachdem diese über Nacht adhären konnten wurde das Transwell wieder in seine Ausgangsposition in eine 24-Well Kultivierungsplatte mit RPE-M überführt. Anschließend fand eine Ko-Kultivierung des RPEs und der REC statt, wobei an DD21 der TEER bestimmt wurde. Dazu wurde zunächst eine Messung in RPE-M ohne Zellen als Blank vorgenommen. Die Kontrolle bestand aus einer Ko-Kultur aus differenziertem RPE und REC (A). Nachdem der TEER der Ko-Kultur an DD21 bestimmt wurde, folgte eine Behandlung mit $125 \text{ mM } \text{H}_2\text{O}_2$ für 30 min. Anschließend wurde der TEER erneut gemessen. Maßstab $25 \mu\text{m}$. Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop

Verglichen mit der Literatur stimmen die erzielten Ergebnisse der TEER-Messung mit anderen Studien überein. Auch andere Studien untersuchten den Einfluss oxidativen Stresses. Dabei konnte anhand eines mikrofluidischen oBRB Modells aus ARPE19 Zellen und HUVECs nachgewiesen werden, dass die Proliferation der HUVEC behindert wurde, sobald der ARP19 Zelllayer aufgrund der durch CoCl_2 ausgelösten hypoxischen Bedingungen zu brechen begann ^[223]. Zudem demonstrierten Studien, dass die Behandlung mit Wasserstoffperoxid zu einer verringerten Expression der RPE-Marker RPE-65 und CRALBP führt. ^[562] Eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur Induktion oxidativen Stresses verursachte bei Endothelzellen der Rinderlunge Lücken im Endothel durch die Internalisierung von Cadherinen ^[563]. In ähnlicher Weise wurde die Umlagerung von Occludin und ZO-1 bei HUVEC nachgewiesen ^{[564][565]}. Die Literatur bestätigt damit, dass oxidativer Stress die RPE-Zellverbindung stört und dadurch die Barriereintegrität verringert wird ^{[565]; [560]}.

4.7.2.2 Permeabilitätsassays mit Dextran zur Bestimmung der Barriereintegrität unter hypoxischen Bedingungen

Zusätzlich zu der TEER-Messung wurde die Barriereintegrität der oBRB im Transwell anhand eines Permeabilitätsassays mit Hilfe von Dextran-FITC analysiert. In eine 24-Well Kultivierungsplatte wurden Transwelleinsätze mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ eingebracht. Diese wurden auf der Innenseite mit Laminin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 h) und auf der Unterseite für 2 Minuten mit Speed Coating Lösung beschichtet. Als Kontrolle wurden beschichtete Transwells ohne Zellen verwendet. Auf die Innenseite des Transwells wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE-Vorläuferzellen von DD11 ausgebracht und bis DD18 zu RPE differenziert. Anschließend wurden auf die Unterseite des Transwells $3 \cdot 10^4$ REC ausgebracht, wie in der schematischen Darstellung in **Abbildung 78** gezeigt ist. Die parazelluläre Permeabilität in den statischen Kulturen der oBRB konnte anhand des, die Barriere passierten, Dextrans auf den REC am Wellboden ermittelt werden. Diese REC wurden in einer Zellzahl von $3 \cdot 10^4$ auf dem Wellboden einer 24-Well Kultivierungsplatte ausgebracht und über einen Zeitraum von 3 Tagen bis zur Konfluenz kultiviert. Eine Ko-Kultur wurde für 30 min mit $0,125 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ im Medium inkubiert, wobei das Medium anschließend ersetzt wurde. Für den Permeabilitätstest wurde das Kultivierungsmedium mit gelöstem $10 \text{ kDa Dextran-FITC}$ in einer Konzentration von 20 mg/ml versetzt und in die Innenseite des Transwells gegeben. Nach einer Inkubation von 24 h wurde das Dextran-haltige Kultivierungsmedium ersetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu mindern. Anschließend wurden das passierte Dextran auf den am Wellboden befindlichen Endothelzellen durch die Konfokalmikroskopie visualisiert. Die Mikroskopieaufnahmen wurden mit Hilfe der FIJI Software analysiert und so die korrigierte totale Zellfluoreszenz (CTCF) ermittelt. Dazu wurde das Produkt aus mittlerer Hintergrundfluoreszenz und ausgewählter Fläche, von der integrierten Dichte subtrahiert. Zur Kontrolle wurden zudem REC ohne

Dextran-Zugabe sowie Kultivierungsmedium untersucht, um Hintergrundfluoreszenzen auszuschließen. Beides konnte als Quelle für Hintergrundsignale ausgeschlossen werden.



Permeabilitätsassay der oBRB unter hypoxischen Bedingungen

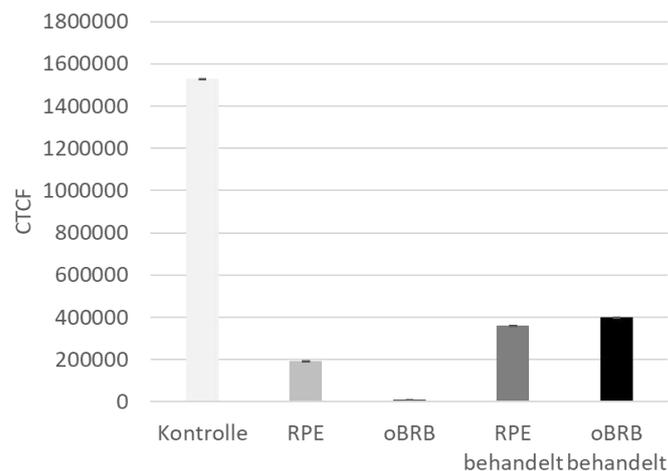


Abbildung 78: Permeabilitätsanalyse von Zellen der oBRB unter hypoxischen Bedingungen mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Dextran. In eine 24-Well Kultivierungsplatte wurden Transwell-Einsätze mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ eingebracht. Diese wurden auf der Innenseite für 1 h mit $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin beschichtet. Die Unterseite wurde für 2 Minuten mit *Speed Coating* Lösung beschichtet. Für die Kontrolle wurden beschichtete Transwells ohne Zellen verwendet. Auf die Innenseite des Transwells wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE Vorläuferzellen von DD11 ausgebracht und bis DD18 differenziert. Dann wurden auf die Unterseite des Transwells jeweils $3 \cdot 10^4$ REC in $200 \mu\text{l}$ REC ausgebracht. Zur vergleichenden Betrachtung der parazellulären Permeabilität in statischen Kulturen der oBRB wurden auf den Wellböden der 24 Well Kultivierungsplatte je $3 \cdot 10^4$ REC ausgebracht und über einen Zeitraum von 3 Tagen bis zur Konfluenz kultiviert. Eine Ko-Kultur wurde für 30 min mit $0,125 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ im Medium inkubiert, wobei das Medium anschließend ersetzt wurde. Anschließend wurde das Kultivierungsmedium mit gelöstem 10 kDa Dextran-FITC in einer Konzentration von $20 \text{ mg}/\text{ml}$ versetzt und in die Innenseite des Transwells gegeben. Nach einer Inkubation für 24 h wurde das Kultivierungsmedium ersetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu mindern und die Endothelzellen auf den Wellböden mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Die korrigierte totale Zellfluoreszenz (CTCF) wurde anschließend mit Hilfe der FIJI Software ermittelt und graphisch dargestellt. Maßstab= $50 \mu\text{m}$. Carl Zeiss LSM8000

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass bei der Kontrolle eine hoher CTCF Wert von 1529803 ± 359 vorlag während bei dem aus mESC-Rx-GFP differenzierten RPE ein CTCF Wert von 194819 ± 138

berechnet wurde. Verglichen mit der Kontrolle entsprach dies einer Senkung um 87,27 %. Bei der Ko-Kultur aus REC und differenziertem RPE ergab sich ein CTCF Wert von 11108 ± 267 , was verglichen mit der Kontrolle 0,72 % entspricht. Bei dem mit H_2O_2 behandelten differenzierten RPE wurde ein CTCF Wert von 362796 ± 420 ermittelt, was in vergleichender Betrachtung zum unbehandelten RPE einer Erhöhung von 86,2 % entspricht und gegenüber der Kontrolle einer Senkung von 76,3 %. Bei der mit H_2O_2 behandelten Ko-Kultur aus REC und differenziertem RPE wurde ein CTCF Wert von 399658 ± 31 ermittelt, was in vergleichender Betrachtung zur unbehandelten oBRB Ko-Kultur einer 35,9-fachen Steigerung und gegenüber der Kontrolle 23,1 % entspricht. Anhand dieser Werte konnte gezeigt werden, dass die Barriereintegrität des RPEs als auch die der Ko-Kultur aus REC und RPE unter hypoxischen Bedingungen geringer ist. Diese Ergebnisse können anhand der Literatur belegt werden. Andere Studien zeigen, dass H_2O_2 die Barrierefunktion eines intakten ARPE19-Monolayers zerstört. ^{[560]; [566]} Die Zugabe von PEDF verhinderte eine erhöhte Permeabilität des RPE-Zelllayers ^[567].

5. Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination verschiedener Methoden aus dem *Tissue Engineering* großes Potential für die Entwicklung retinaler, vaskularisierter Gewebe bietet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines *in vitro* Modells der äußeren Blut-Retina-Schranke durch die Kombination neuer Stammzelltechnologien und Hydrogelen. Dafür wurden erfolgreich murine embryonale Stammzellen (mESC) zur Differenzierung des RPEs eingesetzt, wobei zunächst deren Pluripotenz validiert wurde. Entgegen herkömmlicher Methoden wurde bei der Differenzierung von funktionellem RPE die *serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation* (SFEBq) Methode nach Iwasaki et al. zur Generierung retinaler Organoiden verwendet. Nach 18 Differenzierungstagen konnte die erfolgreiche Differenzierung der mESC zu funktionellem RPE durch Analyse der Viabilität und der Genexpression bestätigt werden. Zudem wurde das retinale Endothel durch die verbesserte Adhäsion aufgrund der Identifikation geeigneter Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM) als Beschichtung etabliert. Durch die erfolgreiche Ko-Kultivierung von differenziertem RPE und retinalen Endothelzellen konnte erfolgreich ein funktionales Modell der oBRB im Transwell etabliert werden. Die Barriereintegrität der etablierten oBRB wurde anhand eines Permeabilitätsassays und dem transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) validiert. Um die wichtigen strukturellen, funktionellen, biochemischen und mechanischen Merkmale der oBRB vollständig rekonstruieren zu können, wurden *Organ-on-chip* Systeme für die Rekapitulation vaskularisierter *in vitro* Modelle der oBRB eingesetzt. Mit Hilfe des vasQchips wurde ein retinales Endothel erfolgreich im Mikrokanal etabliert und mikrofluidisch kultiviert. Der Einsatz von Hydrogelen zur Nachahmung der EZM erlaubte die Nachbildung des Choroids in einem

dreidimensionalen, vaskularisierten Mikrokanal im *HB-flow* System als *Organ-on-chip* Modell. Die Kombination von GelMA als Grundgerüst und einem natürlichen Hydrogel hat erste vielversprechende Ergebnisse bei der Ko-Kultivierung von retinalem Endothel im Mikrokanal und RPE auf der Hydrogeloberfläche erzielt. Durch oxidativen Stress wurde die Barriereintegrität der oBRB vermindert und damit erfolgreich eine AMD-ähnliche Mikroumgebung nachgestellt. Der Einsatz dieser Organ-Systeme kann zukünftig der Identifikation von Arzneimitteln und der Behandlung von schweren retinalen Erkrankungen dienen.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Zellen

- mESC-Rx-GFP (Sublinie muriner embryonaler Stammzellen, EB5 (129/Ola), in welchen ein GFP Knock-in unter dem Rx Promotor stattfand, AES0145 : Rx-GFP K/I EB5, RIKEN)
Maintenance Medium, Gelatine Beschichtung
- ARPE-19 (humane Zelllinie des retinalen Pigment Epithels aus den Augen eines 19-jährigen Mannes, CRL-2302, ATCC), ab Passage 21
ARPE-M
- B129 REC (B129 murine primäre retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, B129-7065, PELObiotech GmbH, Martinsried, Deutschland)), Passagen 3 bis 8
RECM, Speed Coating Lösung
- HUVEC (humane Endothelzellen der Nabelschnur, C-12980, PromoCell GmbH), Passagen 3 bis 8
EGM2

6.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

	Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturzusätze	Collagen Type I Rat Tail (Nr. ALX-522-435-0100)	Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, Germany)
	Complete endothelial cell Medium/w Kit mit VEGF (PB-M1168)	PELObiotech GmbH (Martinsried, Deutschland)
	DMEM F-12 (ATCC-30-2006)	LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland)
	DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nr.41966-029)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	DMEM/F12 Glutamax (3133102)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	DPBS ^{-/-} , Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (^{-/-}) (Nr.14190-094)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	DPBS ^{+/+} , Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (^{+/+}) (Nr. 14140-091)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	EGM-2 Endothelial Growth SingleQuot Kit Supplement & Growth Factors (Nr.CC-4176)	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)

	EGM-2, Endothelial Cell Growth Medium 2 (Nr. 22011)	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	FBS, Fetal Bovine Serum (Nr. 10500064)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	Glasgow's MEM (21710025)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	HBSS ^{+/+} (24020091)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	Knockout Serum Replacement (10828028)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	MEM-alpha (M4526)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	PanSera (P30-2602)	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
	Pen/Strep, Penicillin/Streptomycin (Nr. 15140122)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (A1110501)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	Trypsin-EDTA, 0,25 % (Nr. 25200056)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
Chemikalien	0,2 % Gelatine basierte Speed Coating Solution	PELObiotech GmbH (Martinsried, Deutschland)
	10x DPBS (Nr. 14200075)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	2-Mercaptoethanol (Nr. 21985023)	Thermo Fischer Scientific (Carlsbad, USA)
	5x GoTaq Puffer grün (Nr. M7911)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	6x Loading Dye (Nr. B7021S)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
	Agarose (Nr. 32-2789P)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	AGN193109 (Nr. SML2034)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	AGN193109 (Nr. SML2034)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Blasticidin S (Nr. 15205)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Calcein-AM (Nr. C3099)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
	CHIR99021 (Nr. SML1046)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Chloroform (Nr. 288306)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Cobalt(II)-chlorid (Nr. 232696-5G)	Merck (Steinheim, Deutschland)

	DMSO, Dimethylsulfoxid (Nr. A994.2)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	dNTPs (10 mM) (N0447S)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
	Dowfax™ 2A1 (Nr. 119019641107)	The Dow Chemical Company A000080 (Midland, USA)
	Dowsil SE1700 (Nr. 2924404)	Biesterfeld AG (Hamburg, Deutschland)
	EDTA (Nr. 8043.1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Ethanol (Nr. 20821.330P)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Ethidiumbromid (Nr. 2218.1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Fibrinogen (Nr. F3879-250MG)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Fibronektin (Nr. C-4305)	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	Gelatine Typ A (Nr. G1890)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	GelMA	Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG-CB, KIT Karlsruhe)
	GelNB	Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG-CB, KIT Karlsruhe)
	GelS	Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG-CB, KIT Karlsruhe)
	GoTaq Master Mix (Nr. A6001)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	GoTaq Polymerase (Nr. M7845)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	Growth factor reduced Matrigel (Nr. 354230)	Corning Incorporated (New York, USA)
	Isopropanol (Nr. 6752.1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Ladder 100 bp (Nr. N3231S)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
	Laminin (Nr. L2020)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	LAP, Lithium phenyl-2,4,6- trimethylbenzoylphosphinate (Nr. 85073-19-4)	Merck (Steinheim, Deutschland)

	Leukemia inhibitory factor (LIF) (Nr. ESG1107)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	L-Glutamin (Nr. G7513)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	L-Hydrocortison (Nr. H0396)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	L-Taurin (Nr. T8691)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	L-Triiodo-Thyronin (Nr. T5516)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	MES (Nr. 4256.3)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Methacrylsäure (Nr. 276685-500ML)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	M-MLV Reverse Transkriptase (Nr. M3683)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	MTT Assay (Nr. G4100)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	N1 Supplements (Nr. N6530)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	N2 Supplements (Nr. 17502001)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	Natriumhydroxid Plättchen, NaOH (Nr. 6771.1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Nonessential amino acids (Nr. BE13114E)	Lonza (Basel, Schweiz)
	Nucleasefreies Wasser (Nr. P119E)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	Paraformaldehyd (PFA) (Nr. 818715)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Pattex Extreme Repair (Nr. 813557-62)	Conrad Electronics SE (Hirschau, Deutschland)
	PCR Tubes (Nr. TCS1201)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
	PD0325901 (Nr. PZ0126)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Pluronic F-127 (Nr. P2443)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Poly-Hema (Nr. P3932)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Propidiumiodid (Nr. 40016)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	qPCR Platten (Nr. HSP9601)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)

	Random Primer (Nr. C1181)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	RNase away (Nr. 732-2271)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	RQ1 RNase free DNase (Nr. M6101)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	Sodium Pyruvat (Nr. P2256)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	SU5402 (Nr. 2159233)	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)
	Thrombin (Nr. 10602400001)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Triton™ X-100 (Nr. T9284-100ML)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Triton™ X-100 (Nr. T9284-100ML)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	TriZOL (Nr. 15596018)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
	Versiegelungsfolie (Nr. MSB1001)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
	Vitronektin (Nr. 14009)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Wasserstoffperoxid (Nr. H/1800/15)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
	Y27632 (Nr. 1293823)	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)
Färbereagenzien	CasBlock™ (Nr. 008120)	Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific (Carlsbad, USA)
	CellTracker Green™ (Nr. C7025)	Molecular Probes®, life technologies (Carlsbad, USA)
	FcR-Block (Nr.130-092-575)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
	Hoechst 33342, bisBenzimide H33342 Trihydrochloride (Nr. B2261)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Phalloidin-TRITC (Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate) (Nr. P1951)	Merck (Steinheim, Deutschland)

6.1.3 Medien und Puffer

Tabelle 2: Medien und Puffer

Medium	Zusammensetzung
DMEM	DMEM 10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin
Einfrriermedium	50 % Zellspezifisches Medium 40 % FBS 10 % DMSO
Einfrriermedium Stammzellen	90 % Zellspezifisches Medium 10 % DMSO
Trypsininhibitor	10 % FBS 90 % DPBS ^{-/-}
Maintance Medium <i>Frisch dazu geben</i> <i>Beschichtung</i>	DMEM 15 % PanSera 1 % Penicillin/Streptomycin 0,1 mM Nonessential amino acids 0,1 mM 2 Mercaptoethanol 2000 U/ μ l LIF 1 μ M PD0325901 2 mg/ μ l Blastidin 0,1 % Gelatine Typ A
RDM <i>Frisch dazu geben</i>	GMEM 0,1 mM Nonessential amino acids 1 mM Natrium Pyruvat 5 % Knockout Serum 0,1 mM 2 Mercaptoethanol 0,1 μ M AGN193109 Final 2 % Matrigel
RMM2 <i>Frisch dazu geben</i> <i>Beschichtung</i>	DMEM/F12 Glutamaxx 1 % N2 Supplements 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % PanSera 10 μ M Y27632 3 μ M CHIR99021 5 μ M SU5402 1 μ g/cm ² Laminin

RPE-M	MEM-alpha 1 % N1 Supplements 1 % PanSera 0,1 mM Nonessential amino acids 2 mM L-Glutamin
<i>Frisch dazu geben</i>	250 mg/l Taurin 25 µg/l Hydrocortison 0,013 µg/l Triiodothyronin
ARPE-M	DMEM/F12 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % FCS
RECM	Complete mouse endothelial cell medium kit (PB-M1168) PELObiotech GmbH (Martinsried, Deutschland)
EGM2	Endothelial Cell Growth Medium 2 (C-22011) PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
FACs Puffer	194 ml DPBS 2 ml P/S (1 %) 0,149 g EDTA (2 mM) 4 ml FCS (2 %)
10x TAE Puffer (pH 8,5)	48,4 g Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan 37,2 g Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 11,4 ml Essigsäure konz. Auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen

6.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
3M Transferklebeband Typ 9460PC	AF Adhäsive Formteile GmbH (Pfinztal, Deutschland)
Cryovial 2 ml (Nr. 430525)	Corning®Life Science (NY, USA)
Deckgläser #1,5, 32 mm (Nr. CB00320RAC20MNT0)	Thermo Fischer Scientific (Carlsbad, USA)
Dialyseschläuche 14 kDa (Nr. D92527-100FT)	Merck (Steinheim, Deutschland)
Dosiernadel konisch rot (Nr. 501610)	VIEWEG GmbH (Kranzberg, Deutschland)
Dosiernadel konisch weiß (Nr. 501611)	VIEWEG GmbH (Kranzberg, Deutschland)
Erlenmeyerkolben 250 ml (Nr. 214-1132)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Falcon-Röhrchen, 15/ 50 ml (Nr. 188271/ 227261)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

iPore Track-etched membrane, 10 ⁶ Ionen/cm ² (1000M50/610N000/R/3)	it4ip (Louvain-la-Neuve, Belgien)
Kanülen Sterican hellblau 23 G (Nr. 4657640) braun 26 G (Nr. 4657683)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Luer Connector Female (Nr. 10825)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
Luer Connector Male (Nr. 10824)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
Luer Plug Male (Nr. 10822)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
Luer Plugs (Nr. 10826)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
male mini Luer Fluid connector (Nr. 10000116)	microfluidic chip shop GmbH (Jena, Deutschland)
Messpipetten, AR-Glas, 5/ 10 /20 ml (Nr. 27076/ 27077/ 27078)	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Nunclon Sphera <i>ULW</i> Mikrotiterplatten (Nr. 15227905)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Parafilm M, 4 in.*125 ft. Roll (Nr. P7793)	Merck (Steinheim, Deutschland)
Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas (Nr. 747720)	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Pipettenspitzen 0,1-10 µl (Nr.4125)	Corning® Life Science (NY, USA)
Pipettenspitzen 100-1000 µl (Nr.4867)	Corning® Life Science (NY, USA)
Pipettenspitzen 1-200µl (Nr. 613-0732)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
PTFE tube (Nr. 10000032)	microfluidic chip shop GmbH (Jena, Deutschland)
Reaktionsgefäße, farblos 1,5/ 2,0 ml (Nr. 0030120086/ 0030120094)	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
Silicon tube (Nr. 10000031)	microfluidic chip shop GmbH (Jena, Deutschland)
Spritzen Inkjet 5/10 ml (Nr. 4606108V)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzen Omnifix 1 ml (Nr. 1617100V)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterilfilter, 0,2 µm (FP 30/0,2)	Whatman®Schleicher&Schuell (Dassel, Deutschland)
Transwells 0,4 µm PC (Nr. 734-1568)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tygon® Sanitary Silicone Tubing (Nr. 3350)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
vasQchip PC Spritzgussblock	Hoffner GmbH (Waghäusel, Deutschland)
Zellkultur Multiwellplatte 12 Well, PS, F-Boden, Transparent CellstarR (Nr. 392-0049)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Zellkultur Multiwellplatte 24 Well, PS, F-Boden, Transparent CellstarR (Nr. 391-3370)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Zellkultur Multiwellplatte 48 Well, PS, F-Boden, Transparent CellstarR (Nr. 392-0062)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Zellkultur Multiwellplatte 6 Well, PS, F-Boden, Transparent CellstarR (Nr. 700-1425)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Zellkultur Multiwellplatte 96 Well, PS, F-Boden, Transparent CellstarR (Nr. 391-3325)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturflasche 75 cm ² (Nr. 658170)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturschalen, PS; 10 cm (Nr.664160)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
μ-Slide 8 Well, ibiTreat (Nr. 80826)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)

6.1.5 Verwendete Geräte

Tabelle 4: Geräte

	Bezeichnung	Hersteller
Zellkultur	Absaugpumpe Integra Vacusafe	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
	CO ₂ -Inkubator, C170	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
	Mehrkanalpipetten 1-10μL/20-200μL	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Pipetten Eppendorf Research Plus 1-10μl/ 10-100 μl/ 100-1000 μl	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
	Wärmeschrank UN55	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
	Pipettierhilfe accuJet pro (Nr. BR26343)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifugen	Heraeus Laborfuge 400R (Nr. 10638422)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
	Megafuge2.0R Sepatech	Heraeus (Hanau, Deutschland)
	Microzentrifuge Micro Star 17R (Nr. 521-1647P)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Analysewaage LAG214i (Nr. 611-2269)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Weitere Geräte	Ätzzvorrichtung	Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG-CB, KIT Karlsruhe)
	BD FACSAria Fusion Flow Cytometer	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
	Biospot BP Biofluidix	BioFluidix GmbH (Freiburg, Deutschland)
	CFX Connect Real-time PCR System (Nr. 1855201)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)

	Chemidoc (Nr. 12003154)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
	Gelelektrophorese (Nr. 730-0220)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	LabDancer (Nr. 444-0020)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Magnetrührer VMS-C7 (Nr. 442-0664)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Magnetrührer VMS-C7 mit Temperaturfühler PT1000	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Messzylinder 100 ml (Nr. 612-4403) 250 ml (Nr. 612-4404)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Model 200/2.0 Power supply (Nr. M1654761)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
	Mr. Frosty™ Freezing Container, (Nr. 5100-0001)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
	Nanodrop Lite, Mikrovolumen, Spektralphotometer (Nr. ND-LITE-PR)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
	OmniCure S2000-UV- Punkthärtungssystem	Excelitas Technologies Corp. (Waltham, USA)
	Peristaltik Pumpensystem, Perisys S (Nr. A2049000008)	Cetoni GmbH (Korbussen, Deutschland)
	pH-Meter (Nr. 662-2283P)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	SpectraMax iD3 Reader (Nr. 735-0391)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Thermocycler peqSTAR (Nr.732-2888)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Thermocycler peqSTAR (Nr. 732-2888)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Thermoformanlage	Institut für biologische Grenzflächen (IBG), (KIT Karlsruhe)
	vasQturn	Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG-CB, KIT Karlsruhe)
	Waage (Nr. LPG-2102i)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Wasserbad (Nr. 462-0494)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Mikroskop	Konfokalmikroskop (Leica DMI4000B, ECA TCS SPE)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Konfokalmikroskop Carl Zeiss (LSM8000)	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
	Konfokalmikroskop Stellaris 5 (8119637)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Lichtmikroskop (Leica DM IL)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)

6.1.6 Primer

Die Primer wurden in 5'-3' Orientierung angegeben.

Tabelle 5: Primer

Name	Sequenz
CD31_MM_for	GCTACGTCATTCCCTCAGGCTC
CD31_MM_rev	TCACCTTGGGCTTGGATACG
GAPDH_MM_for	AACTCCCACTCTCCACCTTCGA
GAPDH_MM_rev	CTCTTGCTCAGTGTCTTGCTG
Mertk_MM_for	ATCAAAGTAATCCCCTCCCCGCC
Mertk_MM_rev	TGCAGACCAGCCAATCTCATTCC
Mitf_MM_for	GATGGACGATGCCCTCTCAC
Mitf_MM_rev	GAAGAAGAGAGGGAGCGGTC
Nanog_MM_for	AGGATGAAGTGCAAGCGGTG
Nanog_MM_rev	AAGTTGGGTTGGTCCAGGTC
Oct4_MM_for	TGGCTTCAGACTTCGCCTTC
Oct4_MM_rev	TGAGGTCCACAGTATGCCATC
Otx2_MM_for	AGCAGCAGAATGGAGGTCAG
Otx2_MM_rev	ATAGACACTGGAGCACTGCTG
Pax6_for_MM	AATCGGAGGGAGTAAGCCAAG
Pax6_MM_for	GGAGGGGGAGAGAACACCAACTCC
Pax6_MM_rev	CTTCTCCATTTGGCCCTTCGATTAG
Pax6_rev_MM	TAGCCAGGTTGCGAAGAACTC
PECAM_MM_for	ATCCAGGTGTGCGAAATGCTC
PECAM_MM_rev	TTGCTGGGTCATTGGAGGTC
PEDF_MM_for	AGAAAGACGACCCTCCAGGATTTTC
PEDF_MM_rev	AGGGGCAGGAAGAAGATGATGC
RPE56_MM_for	ACCCAGTGGGAGAAGATTACTATGC
RPE65_MM_rev	TCCTCTTCTCAGTCATTGCTCGAAC
VE-Cad2_MM_for	TCCATCCGCAAGACCAGTGAC
VE-Cad2_MM_rev	ATCCAGTTCGTTGGCCTCCAC
ZO-1_MM_for	ATCATTCCACGCAGTCTCCAC
ZO-1_MM_rev	GTTCTGGAAGAGTGGGCGTC

6.1.7 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Konzentration	Anregung	Emission
Primärantikörper			
anti-CRALBP mouse monoclonal IgG1	1:100	-	-

Abcam ab15051			
anti-Mitf mouse monoclonal IgG1 Abcam ab12039	1:200	-	-
anti-Nanog mouse monoclonal IgG1 [NNG-811] Abcam ab62734	1:100	-	-
anti-Oct3/4 PE mouse monoclonal IgG1 Chip-grade BD Bioscience 560186	20 μ l/10 ⁶ Zellen (Durchflusszytometrie)	496 nm/566 nm	576 nm
anti-Oct4 rabbit monoclonal IgG Abcam ab181557	1:200	-	-
anti-Otx2 + Otx1 rabbit polyclonal IgG Abcam ab21990	1:200	-	-
anti-Pax6 mouse monoclonal IgG1 Abcam ab78545	1:50	-	-
anti-PECAM-FITC mouse monoclonal IgG (WM-59 clone) Merck F8402-50TST	1:100	491 nm	516 nm
anti-RPE65 mouse monoclonal IgG Abcam ab13826	1:100	-	-
anti-VE-Cadherin rabbit polyclonal IgG	1:200	-	-

Abcam ab33168			
anti-ZO-1 mouse monoclonal IgG2a Santa Cruz sc-33725	1:100	-	-
Isotype Control PE mouse IgG1 556650 BD Bioscience	1 µg/10 ⁶ Zellen (Durchflusszytometrie)	566 nm	576 nm
Sekundärantikörper			
Alexa Fluor488 goat anti-rat IgG Invitrogen A11006	1:500	495 nm	519 nm
Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG Invitrogen A11001	1:1000	495 nm	519 nm
Alexa Fluor488 donkey anti-rabbit IgG Invitrogen A21206	1:500	495 nm	519 nm
Alexa Fluor568 goat anti-mouse IgG Invitrogen A11031	1:500	597 nm	603 nm
Alexa Fluor647 chicken anti-goat IgG Invitrogen A21469	1:500	594 nm	633 nm
Alexa Fluor647 chicken anti-rabbit IgG Life Technologies A21443	1:500	594 nm	633 nm
Alexa Fluor647 goat anti-rat IgG Invitrogen A21247	1:500	594 nm	633 nm

6.1.8 Mikroskopieeinstellungen

Tabelle 7: Mikroskopieeinstellungen

Mikroskopieeinstellungen	Einstellungen und Objektive
Carl Zeiss LSM8000	HC PL FLUOTAR 10.0×0.30 DRY HC PL FLUOTAR 20.0×0.70 DRY Resolution: 8 bit Format: 1024 × 1024 pixels Speed: 400 Hz Laser: 405 nm, 488 nm, 532 nm Emission: PMT1 (405) 437 nm – 492 nm PMT2 (488) 500 nm – 550 nm PMT3 (532) 545 nm – 625 nm PTM4 (635) 651 nm – 800 nm
Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5	ACS APO 10 ×/0.30 DRY ACS APO 20 x/0.70 DRY UV Resolution: 8 bit Format: 1024 × 1024 pixels Speed: 400 Hz Laser: 405 nm, 488 nm, 532 nm Emission: PMT1 (405) 437 nm – 492 nm PMT2 (488) 500 nm – 550 nm PMT3 (532) 545 nm – 625 nm PTM4 (635) 651 nm – 800 nm
Leica SPE inverses Konfokalmikroskop	HC PL FLUOTAR 10.0×0.30 DRY Resolution: 8 bit Format: 1024 × 1024 pixels Speed: 400 Hz Laser: 405 nm, 488 nm, 532 nm Emission: PMT1 (405) 437 nm – 492 nm PMT2 (488) 500 nm – 550 nm PMT3 (532) 545 nm – 625 nm PTM4 (635) 651 nm – 800 nm
Lichtmikroskop Leica DM IL LED inverses Mikroskop	Universal 4 x/0.10 DRY Universal 10 x /0.22 DRY Universal 20 x/0.40 DRY Universal 40 x/0,65 DRY

6.1.9 Software

- ApE – plasmid editor
- Bio-Rad CFX Maestro
- Bio-Rad Image Lab 6.1
- CETONI Elements Basic Software
- ChemDRAW Professional 16.0, Cambridge Soft
- Citavi 6
- CorelDRAW X4
- Fiji Image J 1.53r
- IncuCyte Software, sartorius

- Leica Application Suite X (LAS X)
- Microsoft Office 2016
- Serial Cloner 2.6
- ZEN (blue edition), Zeiss

6.2 Methoden

6.2.1 Allgemeine Zellkultur

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in zellspezifischem Kultivierungsmedium im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C, einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit, was als Standardbedingung definiert wird. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

6.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen bei -196° C im Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen wurden zunächst mit 0,25 % Trypsin-EDTA bei einer Inkubation unter Standardbedingungen für 3 min abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt und die Zellkonzentration mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 180 g für 5 min zentrifugiert. Der Medienüberstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Um eine Kristallisation des Mediums zu vermeiden wurde das Medium mit 10 % DMSO versetzt oder ein Zellspezifisches Einfriermedium verwendet. Das MM der mESC-Rx-GFP wurde mit 10 % DMSO versetzt. Die Zellsuspension wurde in ein Cryovial überführt und für mindestens 90 min in einer Cryobox bei -80° C eingefroren bevor die Zellen in den Stickstoff überführt wurden. Beim Auftauen der Zellen wurde die Passage der Zellen um eins erhöht. Das Cryovial wurde nach einer Desinfektion mit Ethanol unter der Sterilbank kurz geöffnet. Anschließend wurden die Zellen bei 37° C aufgetaut und in ein Falcon-Röhrchen mit 9 ml Medium überführt. Die Zellen wurden bei 180 g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet anschließend in zellspezifischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine T25 Kultivierungsflasche mit 5 ml Medium überführt.

6.2.1.2 Kultivierung von adhärennten Zellen

mESC-Rx-GFP Kultivierung

Die mESC-Rx-GFP wurden wie beschrieben aufgetaut. Eine T25 Kultivierungsflasche wurde mit 5 ml einer 0,1 %igen Gelatinelösung für 30 min bei RT beschichtet. Die Gelatine Typ A wurde als 10 %ige Stammlösung mit destilliertem Wasser angesetzt, anschließend autoklaviert und als 1 ml Aliquot bei -20° C gelagert. Nach dem Abnehmen der Beschichtungslösung wurde die Kultivierungsflasche mit 5 ml DPBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurden 5 ml MM, versetzt mit 2000 U/μl LIF, 1 μM PD0325901

sowie 0,02 mg/ μ l Blastocidin, in die Kultivierungsflasche gegeben. Die mESC wurden zunächst mit 5 ml DPBS^{-/-} gewaschen und anschließend bei 37 °C für 3 min mit 500 μ l 0,25 % Trypsin/ EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 4,5 ml Maintenance Medium (MM) aufgenommen, in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 180 g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml MM resuspendiert und die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. $4,2 \cdot 10^5$ Zellen wurden für eine Routine im 2 Tages Rhythmus ausgesät und $1,5 \cdot 10^5$ Zellen für einen 3 Tages Rhythmus.

B129 REC

Eine T25 Kultivierungsflasche wurde mit 2 ml einer *Gelatine-based speed coating solution* für 2 min bei RT beschichtet. Die *Coating*-Lösung wurde abgenommen und 5 ml RECM in die T25 Kultivierungsflasche gegeben. Die Zellen werden wie beschrieben aufgetaut und bis zu einer 90 %igen Konfluenz unter Standardbedingungen bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS^{-/-}) gewaschen und anschließend mit 500 μ l 0,25 % Trypsin-EDTA bei 37° C für 3 min von der Oberfläche abgelöst. Zum Stoppen der Reaktion wurden 4,5 ml RECM hinzugegeben und die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 180 g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml RECM resuspendiert und eine Zellzahl von mindestens $8 \cdot 10^5$ REC in die zuvor beschichtete T25 Flasche gegeben. Ein Mediums Wechsel wurde jeden zweiten bzw. dritten Tag durchgeführt.

HUVEC

Die Kultivierung der HUVECs erfolgte ähnlich der Kultivierung von B129 REC. Für die Kultivierung von HUVECs wurde allerdings keine Beschichtung der Kultivierungsflasche benötigt. Als Kultivierungsmedium wurde EGM2 Medium mit 1 % Pen/Strep verwendet. Die Zentrifugation fand bei 210 g für 2 min statt.

ARPE19

Die Kultivierung der ARPE19 erfolgte ab Passage 21 wie bei den B129 REC beschrieben. Für die Kultivierung von ARPE19 wurde keine Beschichtung der Kultivierungsflasche benötigt. Als Kultivierungsmedium wurde ARPE-M verwendet, das DMEM/F12 mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep entspricht. Die Zentrifugation fand bei 180 g für 5 min statt. Um die charakteristische Morphologie und die Ausbildung von *Tight Junctions* zu erhalten war eine Kultivierungsdauer von mindestens 4 Wochen notwendig. Für eine Subkultivierung wurde ein Verhältnis von 1:3 angewandt.

6.2.1.3 Beschichtung von Kultivierungsmaterialien zur REC Kultivierung

Es wurden unterschiedliche EZM-Protein zur Beschichtung eingesetzt. In einer 24 well-Platte wurde PC-Membran mit doppelseitigem Klebeband eingebracht. Die Wells wurden mit 300 µl Gelatine - basierter *Speed coating* Lösung, 0,1 % Gelatine, 0,1 mg/ml Kollagen I, 2 µg/cm² Laminin, 2 µg/cm² Fibronectin oder 1 µg/cm² Vitronectin für 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Beschichtung abgenommen und die Wells mit DPBS^{-/-} gewaschen bevor 300 µl RECM mit 3*10⁴ REC pro Well eingebracht wurden. Als positiv Kontrolle dient ein Well ohne PC-Membran und als negativ Kontrolle die PC-Membran ohne Beschichtung. Es werden jeweils Triplikate erstellt.

6.2.1.4 Wachstumskurven von REC und HUVEC

Eine 24-Well Kultivierungsplatte wurde für 2 min mit 300 µl Speed Coating Lösung bei RT beschichtet. Danach wurde die Beschichtung abgenommen und jeweils 7*10⁴ REC pro ml RECM in jedes Well ausgebracht. Die Kultivierung fand mit je 1 ml Medium in Triplikaten statt. Als Positivkontrolle diente 1 ml RECM und als Negativkontrolle 1 ml DMEM pro Well. Weitere eingesetzte Medien waren RMM2 in der Zusammensetzung von DD11 der RPE Differenzierung und RPE-M in der Zusammensetzung von DD15 der RPE Differenzierung. Für eine mögliche Ko-Kultivierung der HUVEC mit den ARPE-19 Zellen wurden diese zusätzlich in ARPE-M kultiviert wurden. In eine unbeschichtete 24-Well, Kultivierungsplatte wurden zudem jeweils 7*10⁴ HUVEC pro ml RECM in jedes Well ausgebracht. Die Kultivierung fand mit je 1 ml Medium in Triplikaten statt. Als Positivkontrolle diente 1 ml EGM2 und als Negativkontrolle 1 ml DMEM pro Well. Weitere eingesetzte Medien waren RMM2 in der Zusammensetzung von DD11 der RPE Differenzierung, RPE-M in der Zusammensetzung von DD15 der RPE Differenzierung sowie ARPE-M. An den Kultivierungstagen 1, 3 und 7 wurde zunächst das Medium von den Endothelzellen abgenommen. Es folgte ein Waschschrift durch 1 ml DPBS^{-/-}. Durch Inkubation mit jeweils 500 µl 0,25 % Trypsin-EDTA für 3 min unter Standardbedingungen wurden die Zellen abgelöst. Die Zellkonzentration wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt.

6.2.2 RPE-Differenzierung aus mESC-Rx-GFP

Retinale Induktion

Für die retinale Induktion der mESC wurde eine abgewandelte Variante der *Serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick aggregation* (SFEBq) Methode von Iwasaki et al 2016 ^[42] verwendet. mESC-Rx-GFP wurden wie beschrieben mit Trypsin von der Kultivierungsflasche abgelöst und die Zellkonzentration mittels Neubauerzählkammer bestimmt. In eine 96 Well *Nunclon Sphera-Treated, U-Shaped-Bottom* Kultivierungsplatte (Art. Nr. 174925) wurden pro Well 3000 mESC-Rx-GFP in 100 µl Retinalem Differenzierungsmedium (RDM) mit 0,1 µM AGN193109 eingefügt. An

Differenzierungstag 1 (DD1) wurde in jedes Well eine finale Konzentration von 2 % Matrigel zu dem Gesamtvolumen von 120 µl zugegeben.

Adhärente Zellkultur

Eine 12 Well Kultivierungsplatte wurde für 2 h bei 37° C mit 1 µg/cm² Laminin in DPBS ^{+/+} inkubiert. Nach dem Entfernen der Beschichtungslösung folgte ein Waschschrift mit 1 ml DPBS ^{+/+}. Anschließend wurde Retinales Maturation Medium 2 (RMM2) mit 10 µM Y27632, 3 µM CHIR99021 und 5 µM SU5402 versetzt und 3 ml pro Well eingefügt. An DD7 wurden die GFP-positiven Organoide mit einer abgeschnittenen gelben Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und RMM2 bis zu einem finalen Volumen von 1 ml zugegeben. Durch das einmalige Aufziehen der Organoidsuspension mit einer 23 G Kanüle und anschließend mit einer 26 G Kanüle wurden die Organoide aufgebrochen. Die Organoidsuspension wurde in einem Zentrifugationsröhrchen überführt und zwei Mal bei 180 g für je 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml RMM2 resuspendiert und je 500 µl in ein 12 Well eingebracht. An DD8 konnte optional ein Mediumwechsel vorgenommen werden.

Reinigung der adhärenen Zellkultur

Eine gewünschte Kultivierungsoberfläche wurde für 2 h bei 37° C mit 1 µg/cm² Laminin in DPBS ^{+/+} inkubiert. Nach dem Entfernen der Beschichtungslösung folgte ein Waschschrift mit 1 ml DPBS ^{+/+}. Anschließend wurde RMM2 mit 10 µM Y27632, 3 µM CHIR99021 und 5 µM SU5402 eingefügt. An DD11 wurde das Medium abgenommen und die Kolonien mit 2 ml DPBS ^{-/-} gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation mit 500 µl Accutase für 5 min unter Standardbedingungen. Zum Stoppen der Reaktion wurden 2 ml RMM2 hinzugegeben und die abgelösten Zellen mit Hilfe einer Pipette entfernt. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit 1 ml DPBS ^{-/-}. Die restlichen Zellen wurden dann für 2 min mit 500 µl Trypsin unter Standardbedingungen inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 ml RMM2 hinzugegeben und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde bei 180 g für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in RMM2 mit 10 µM Y27632, 3 µM CHIR99021 und 5 µM SU5402 resuspendiert. 1*10⁶ Zellen wurden für eine Fläche von 3,5 cm² benötigt.

RPE Zellreifung

An DD13 wurde das Medium durch RMM2 versetzt mit 3 µM CHIR99021 und 5 µM SU5402 ersetzt. Ab DD15 wurden die Zellen in Retinalen Pigment Epithel Medium (RPE-M) versetzt mit 250 mg/l Taurin, 20 µg/l Hydrocortison sowie 0,013 µg/l Triiodo-thyronin kultiviert. Ein Medienwechsel wurde jeden zweiten Tag vorgenommen. Das Passagieren des RPEs war ohne Verlust der charakteristischen Eigenschaften nicht mehr möglich, weshalb der finite Kultivierungsort an DD11 bestimmt werden musste.

6.2.2.1 Beschichtungen für die Organoidbildung von mESC-Rx-GFP

Für die Organoidbildung der mESC-Rx-GFP wurden unterschiedliche Kultivierungsmaterialien untersucht.

Poly-Hema

Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (Poly-Hema) ist dafür bekannt, die Zelladhäsion und -ausbreitung zu verhindern (Lombello et al. 2000). Es wurde eine 10-fache Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 2,4 g Poly-Hema in 20 ml 95 %igem Ethanol bei 55° C über Nacht gelöst. Für eine 1,2 %ige Arbeitslösung wurde der Stock 1:10 mit 95 %igem Ethanol verdünnt. Pro 96 Well wurden 100 µl der Beschichtung eingefügt und über Nacht abgedampft. Dieser Vorgang wurde wiederholt durchgeführt bis das Ethanol vollständig verdampft war. Anschließend konnte die Platte verwendet oder bei 4° C gelagert werden.

Agarose

1,5 % Agarose wurde in Wasser durch Erhitzen gelöst. Anschließend wurden 100 µl der gelösten Agarose pro 96 Well eingefügt und bei RT für 30 min ausgehärtet. Anschließend konnten die Platten verwendet oder bei 4° C gelagert werden.

6.2.2.2 Vermessung des Neuroektoderms

An DD7 wurden die GFP-positiven Organoide aus mESC-Rx-GFP mittels Auflichtmikroskopie visualisiert. Anschließend wurde bei 16 Organoide mit Hilfe der LasX Software das Neuroektoderm an jeweils 5 Stellen vermessen und die Ergebnisse graphisch in einem Boxplot dargestellt.

6.2.2.3 Lebend-/Tot-Nachweis

Für den Lebend/Tot Nachweis von mESC-Rx-GFP Organoiden wurden mESC-Rx-GFP wie beschrieben bis DD7 differenziert und anschließend in ein µ-Slide überführt. Als Negativkontrolle dienten DD2 Organoide. Es folgte eine Inkubation von 30 min unter Standardbedingungen in 200 µl MM mit 20 µg/ml Propidiumiodid und 4 µg/ml Calcein. Nach dem Entfernen der Färbelösung folgte ein Waschschrift mit DPBS ^{-/-}. Für die mikroskopische Visualisierung wurde das MM ersetzt.

Für den Lebend/Tot Nachweis von RPE wurde dieses wie beschrieben aus mESC-Rx-GFP bis DD18 in einer 96-Well Kultivierungsplatte differenziert. Es folgte eine Inkubation von 30 min unter Standardbedingungen in 100 µl RPE-M mit 20 µg/ml Propidiumiodid und 4 µg/ml Calcein. Nach dem Entfernen der Färbelösung folgte ein Waschschrift mit DPBS ^{-/-}. Für die mikroskopische Visualisierung wurde das RPE-M ersetzt.

6.2.3 Ko-Kultivierung von REC und RPE im Transwell

Für die Ko-Kultivierung von REC und dem aus mESC-Rx-GFP differenziertem RPE wurde ein Transwell mit einer Porengröße von 0,4 µm verwendet. Die Innenseite wurde mit 1 µg/cm² Laminin in DPBS ^{+/+} für 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Unterseite wurde mit 700 µl *Speed Coating* Lösung für 2 min bei RT inkubiert. Zunächst wurden 9,4*10⁴ RPE-Vorläuferzellen an DD11 in die Innenseite des Transwells eingebracht und bis DD18 differenziert. Anschließend wurde das Transwell in eine 6 Well Kultivierungsplatte mit 5 ml RPE-M überführt und Luftblasenfrei gewendet, sodass die Innenseite nach unten zeigte. Auf die jetzt obenliegende Seite des Transwells wurden 200 µl RECM mit 3*10⁴ REC aufgebracht. Es folgte eine Inkubation unter Standardbedingungen über Nacht, damit die Endothelzellen adhären konnten. Anschließend wurde das Transwell zurück in eine 24 Well Kultivierungsplatte in korrekter Orientierung überführt. In das untere Kompartiment wurden 500 µl RPE-M eingefügt und in die Innenseite des Transwells 200 µl RPE-M. Jeden zweiten bzw. dritten Tag wurde das Medium gewechselt.

6.2.3.1 Bestimmung der Barriereintegrität mit Hilfe von TEER-Messungen

Für die TEER- Messung wurden Transwells mit einer Porengröße von 0,4 µm verwendet. Die Innenseite wurde mit 1 µg/cm² Laminin in DPBS ^{+/+} für 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Unterseite wurde mit 700 µl *Speed Coating* Lösung für 2 min bei RT inkubiert. Ein Transwell ohne Zellen mit 700 µl RPE-M im unteren Kompartiment und 300 µl RPE-M in der Transwellinnenseite diente als Blank. Als erste Probe wurden 9,4*10⁴ RPE-Vorläuferzellen an DD11 in die Innenseite des Transwells eingebracht und bis DD18 differenziert. An DD18 wurden für die Ko-Kultur 3*10⁴ REC auf der Unterseite des Transwells in RPE-M eingebracht. Als zweite Probe wurden 9,4*10⁴ RPE-Vorläuferzellen an DD11 in die Innenseite des Transwells eingebracht und bis DD18 differenziert. Als dritte Probe wurden 3*10⁴ REC auf der Innenseite des Transwells in 300 µl RPE-M eingebracht. Zudem wurden 3*10⁴ REC in 500 µl als Kontrolle auf dem Well-Boden der Kultivierungsplatte ausgesät. Die TEER-Messung wurde mit dem EVOM3 Gerät von WPI durchgeführt. Dabei wurde die Range auf 10000 Ω eingestellt. Die Elektrode wurde zunächst mit Domestos chloriert. Vor dem Einsatz wurde die Elektrode erst in Ethanol desinfiziert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Zunächst wurde der Blank im Transwell ohne Zellen gemessen. Dabei war darauf zu achten, dass die Elektroden keinen Kontakt zu den Kultivierungsmaterialien hatten und vollständig mit Medium bedeckt waren. Anschließend konnten die Proben gemessen auf die gleiche Weise in Relation gemessen werden. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt, wobei vor jeder Messung das Medium für mindestens 30 min unter Standardbedingungen äquilibriert werden musste.

6.2.3.2 Bestimmung der Permeabilität mit Hilfe von Dextran-FITC

In eine 24-Well Kultivierungsplatte wurden Transwelleinsätze mit einer Porengröße von 0,4 μm eingebracht. Diese wurden auf der Innenseite für 1 h unter Standardbedingungen mit 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin beschichtet. Die Unterseite wurde für 2 Minuten mit Speed Coating Lösung beschichtet. Für die Kontrolle wurden beschichtete Transwells ohne Zellen verwendet. Auf die Innenseite des Transwells wurden $9,4 \cdot 10^4$ RPE Vorläuferzellen von DD11 ausgebracht und bis DD18 differenziert. Auf die Unterseite des Transwells jeweils $3 \cdot 10^4$ REC in 200 μl REC ausgebracht. Auf den Wellboden der 24 Well Kultivierungsplatte wurden je $3 \cdot 10^4$ REC zur vergleichenden Betrachtung ausgebracht und über einen Zeitraum von 3 Tagen bis zur Konfluenz kultiviert. Eine mögliche Behandlung der Zellen fand vor der Zugabe von Dextran statt. 10 kDa Dextran-FITC in einer Konzentration von 20 mg/ml wurde in RPE-M gelöst und 200 μl in die Innenseite des Transwells gegeben. Nach einer Inkubation für 24 h unter Standardbedingungen wurde das Kultivierungsmedium für die konfokalmikroskopische Analyse ersetzt. Die korrigierte totale Zellfluoreszenz (CTCF) wurde mit Hilfe der FIJI Software ermittelt und das Produkt aus mittlerer Hintergrundfluoreszenz und ausgewählter Fläche von der integrierten Dichte subtrahiert.

6.2.4 Isolierung des RPEs aus dem Mausauge für die RNA Extraktion

Die Augen wurden den euthanasierten Mäusen (C57BL/6J) mit Hilfe einer Pinzette entnommen. Pro Ansatz wurde das RPE von 4 Mausaugen verwendet. Zunächst wurde das entnommene Auge kurz in 75 %igem Ethanol desinfiziert und in einer 6 Well Kultivierungsplatte mit 3 ml HBSS-H- auf Eis gelagert. Das HBSS-H Medium setzt sich aus HBSS ohne Calcium/ohne Magnesium, 10 mM HEPES sowie 1 % P/S zusammen ^[266]. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das konnektive Gewebe unter einem Binokular mit Hilfe einer Schere entfernt. Dann wurde entlang des Hornhautlimbus (Pfeil) geschnitten, um die Hornhaut vom Rest des Auges zu trennen und die Linse zu entfernen. Dann folgte ein Schnitt senkrecht des Hornhautlimbus zum Sehnerv. Dadurch konnte die neuronale Retina von dem RPE-Choroid-Sklera Komplex gelöst werden. Anschließend wurde das pigmentierte RPE sanft mit Hilfe eines Skalpells vom Choroid getrennt und in ein Reaktionsgefäß mit 400 μl TRIzol überführt. Dies konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

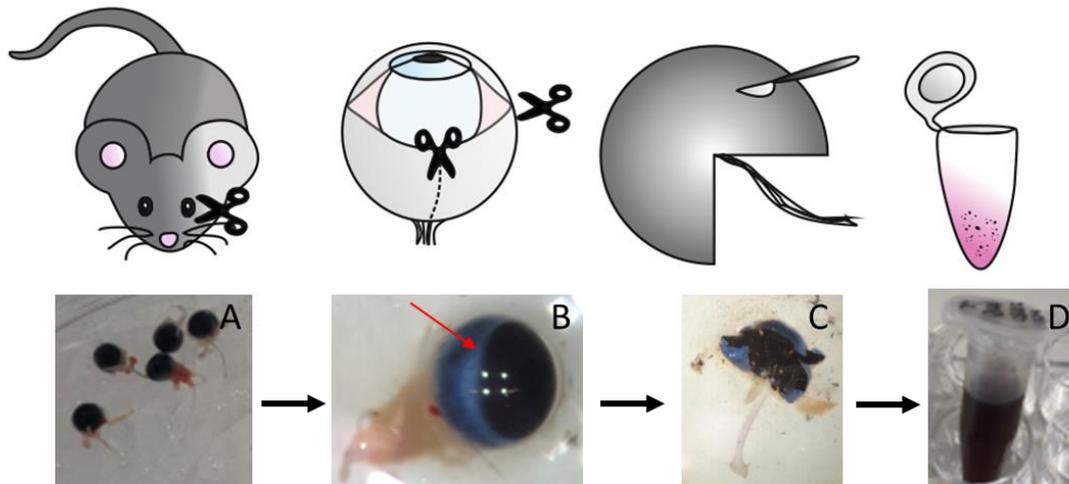


Abbildung 79: Isolation des RPEs aus einem Mauseuge. Zuerst wurde das Auge mit Hilfe einer Pinzette entnommen (A). Anschließend wurde entlang des Hornhautlimbus geschnitten, um die Linse zu entfernen (B). Ein senkrechter Schnitt zum Sehnerv diente dem Entfernen der neuronalen Retina (C). Das RPE wurde in ein Reaktionsgefäß mit TRIZOL überführt (D). Modifiziert nach Shao et al 2013. ^[568]

6.2.5 Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der Genexpression

RNA Isolation durch TRIZOL

Das Medium wurde von den Zellen (10^5 bis 10^7 Zellen) abgenommen und 400 μ l TRIZOL zu der Probe gegeben. Zur vollständigen Lyse wurde die Probe durch Pipettieren homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation bei RT folgte über 5 min. 0,2 ml Chloroform wurden pro ml TRIZOL zu der Probe gefügt. Die Proben wurden für 15 s gemischt und anschließend für 15 min bei 12000 g und 4° C zentrifugiert. Die obere farblose Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Pro ml verwendetem TRIZOL wurden 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und 4° C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol pro verwendetem ml TRIZOL resuspendiert. Nachdem die Probe gevortext wurde folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 75000 g und 4° C. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA für 10 min an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 50 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei 60° C für 15 min inkubiert. Der RNA-Gehalt wurde mit Hilfe der Nanodrop-Messung bestimmt. Bis zur Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

DNA-Verdau

1 μ g der jeweiligen RNA wurde mit 1 μ l RQ1 RNA-free DNase und 1 μ l RQ1 RNase-free DNase 10x Reaktionspuffer gemischt und mit nucleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 10 μ l gebracht.

Die Proben wurden für 30 min bei 37° C inkubiert. 1 µl DNase Stop Solution wurde zur Reaktionslösung gegeben und für 10 min auf 65° C im Thermocycler inkubiert.

Reverse-Transkription zur cDNA Synthese

2 µl Random Primer in einer Konzentration von 200 ng/µl wurden in die verdaut RNA gegeben und für 5 min bei 70° C im Thermocycler inkubiert. Für die cDNA Transkription wurden zwei Ansätze mit einem Endvolumen von 22 µl erstellt, und jeweils 10 µl eines Mastermixes mit bzw. ohne Reverse Transkriptase hinzugegeben. Anhand der Negativkontrollen wurde die Anwesenheit von genomischer DNA überprüft. Die Probe wurde 10 min bei 25° C, 60 min bei 42° C und 10 min bei 70° C im Thermocycler inkubiert bevor die erstellte cDNA mit 100 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt wurde. Die cDNA Proben wurden bis zur Verwendung bei -20° C gelagert.

Tabelle 8: Mastermix für die Reverse Transkription

Reagenzien	+ Reverser Transkriptase	- Reverse Transkriptase
5x Puffer	4 µl	4 µl
dNTPs (10 nM)	2 µl	2 µl
Reverse Transkriptase MLRVT	0,5 µl	-
Nucleasefreies Wasser	3,5 µl	4 µl

Kontroll-PCR

Die Reverse Transkription wurde anhand einer Kontroll-PCR überprüft. 3 µl der cDNA wurde mit 4 µl 5x Puffer, 0,5 µl dNTPs (10 mM), 10,25 µl nucleasefreiem Wasser, 1 µl Forward Primer (10 pmol/µl) und 1 µl Reverse Primer (10 pmol/µl) auf Eis gemischt. Es folgte eine Inkubation im Thermocycler mit folgendem Programm:

Tabelle 9: cPCR Programm

1 Zyklus	2 min bei 95° C
35 Zyklen	30 s bei 95° C 30 s bei 60° C 30 s bei 72° C
1 Zyklus	5 min bei 72° C
bis zur Weiterverarbeitung	RT

Die entstandenen Amplifikate wurden auf ein 2%-iges Agarosegel mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und in Referenz zu einem 100 bp DNA-Marker ausgewertet.

Quantitative RT-PCR (qPCR)

Auf Eis wurden in eine 96-Well Kultivierungsplatte pro Well je 10 µl Promega Mastermix, 1 µl Forward Primer (10 pmol/µl), 1 µl Reverse Primer (10 pmol/µl) sowie 4 µl nukleasefreies Wasser gegeben. 4 µl der entsprechenden cDNA wurden zu jedem Well hinzugegeben. Es wurden für jede Probe Triplikate

erzeugt. Die Platten wurden nach dem Versiegeln für 2 min bei 180 g zentrifugiert und folgendem Programm im BioRad *CFX96 RT-PCR Detection System* unterzogen:

Tabelle 10: RT-qPCR Programm

1 Zyklus	2 min bei 95° C
40 Zyklen	15 s bei 95° C 60 s bei 60° C
1 Zyklus	60 s bei 95° C

Die Amplifikation wurde anhand der Schmelzkurve und dem Auftragen der Proben auf ein 2 %iges Agarosegel überprüft. Die Auswertung erfolgte mit der Berechnung der relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durch Normierung auf GAPDH als Referenzgen.

6.2.6 Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden zunächst mit 0,25 % Trypsin-EDTA vereinzelt und mit 1 ml 4 %igem PFA für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 120 g für 10 min zentrifugiert und mit 1 ml FACS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml 0,1 %igem Triton-X für 4 min bei RT inkubiert und anschließend mit 1 ml FACS Puffer bei 180 g für 5 min gewaschen. Es wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μ l FACS Puffer resuspendiert. Die Zugabe von 2 μ l Fc-Block zu $1 \cdot 10^6$ Zellen verhinderte unspezifische Bindungen und wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Pro Kondition wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen benötigt. 20 μ l Antikörper wurde zu $1 \cdot 10^6$ Zellen hinzugegeben, genauso wie bei der Isotypkontrolle und bei 4° C über Nacht. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden ebenfalls ohne weitere Zugabe bei 4° C über Nacht inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml FACS Puffer pro $1 \cdot 10^6$ Zellen. Das Pellet wurde in 200 μ l FACS Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4° C gelagert. Die Durchflusszytometrie wurde am BD FACSAria Fusion Flow Cytometer mit freundlicher Unterstützung von Dr. Yvonne Heneka und M. Sc. Steffen Sonntag durchgeführt.

6.2.7 Hydrogele

Kollagen I Hydrogel

REC wurden abgelöst und das Zellpellet in RECM in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Für 200 μ l eines 1 mg/ml Kollagen I Hydrogels wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 20 μ l 10x DPBS, 40 μ l Kollagen I (5 mg/ml Stock), 50 μ l Zellsuspension sowie 89 μ l DPBS⁻ auf Eis zusammengefügt. Durch die Zugabe von 1 μ l 1 M NaOH wurde die Polymerisation des Hydrogels initiiert. Die Lösung wurde vorsichtig resuspendiert und 200 μ l in ein μ -Slide 8 Well ibidi oder eine 48-Well Kultivierungsplatte überführt. Das Hydrogel wurde für 30 min unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend mit 300 μ l RECM überschichtet. Es erfolgte eine Kultivierung über einen

Zeitraum von bis zu 7 Tagen. Ein Medienwechsel erfolgte jeden zweite Tag. Zur Erstellung der Gele ohne Zellen wurden 96-Wellkultivierungsplatten verwendet und je 100 μl Hydrogel eingefügt. Die Zellsuspension wurde durch 50 μl DPBS^{-/-} ersetzt. $3 \cdot 10^4$ Zellen wurden in 200 μl zellspezifischem Medium auf der Oberfläche ausgebracht.

Fibrinhydrogel

Um eine 10 mg/ml Stocklösung zu erhalten wurden in ein Reaktionsgefäß 10 mg Fibrinogen abgewogen, dieses mit 1 ml DPBS^{-/-} versetzt und unter Standardbedingungen im Inkubator in Lösung gebracht. REC wurden abgelöst und das Zellpellet in RECM in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Für 200 μl eines 5 mg/ml Fibrinhydrogels wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 20 μl 2 U/ml Thrombin mit dem gelösten Fibrinogen und 50 μl REC in RECM auf Eis zusammengefügt. Die Lösung wurde vorsichtig resuspendiert und 200 μl in ein μ -Slide 8 Well ibidi überführt. Das Hydrogel wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend mit 300 μl RECM überschichtet. Es erfolgte eine Kultivierung über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen. Ein Medienwechsel erfolgte jeden zweite Tag. Zur Erstellung der Gele ohne Zellen wurden 96-Wellkultivierungsplatten verwendet und je 100 μl Hydrogel eingefügt. Die Zellsuspension wurde durch DPBS^{-/-} ersetzt. $3 \cdot 10^4$ Zellen wurden in 200 μl auf zellspezifischem Medium auf der Oberfläche ausgebracht.

GelMA Hydrogel

1 g Gelatine (0,266 mmol NH₂-Gruppen) wurde für die GelMA Synthese in 10 % (w/v) in DPBS^{-/-} unter Rühren bei 50° C gelöst. Für einen Methacrylierungsgrad von 8 Äq wurden 316 μl (*medium*, 2,128 mmol, 8 Äq) Methacrylsaureanhydrid tropfenweise zugegeben und für 2 h bei 50° C gerührt. Ein äquivalentes Volumen zu der zuvor gelösten Menge an 50° C warmem DPBS^{-/-} wurde zur Reaktionslösung gegeben und für 10 min bei 50° C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Dialysemembranen gegeben (Cellulose, 12-14 kDa) und 7 Tage gegen ddH₂O bei 40° C dialysiert, wobei ein Wasserwechsel 2-mal täglich durchgeführt wurde. Die dialysierte Lösung wurde im gleichen Volumen Reinstwasser gelöst und für 15 min bei 40° C inkubiert. Nach einer anschließenden Lagerung über Nacht bei -80° C fand eine Lyophilisierung statt, wobei das Produkt bis zur Verwendung bei -20° C gelagert wurde. Die Synthese wurde von M. Sc Alisa Grimm und M. Sc Sonja Leopold durchgeführt.

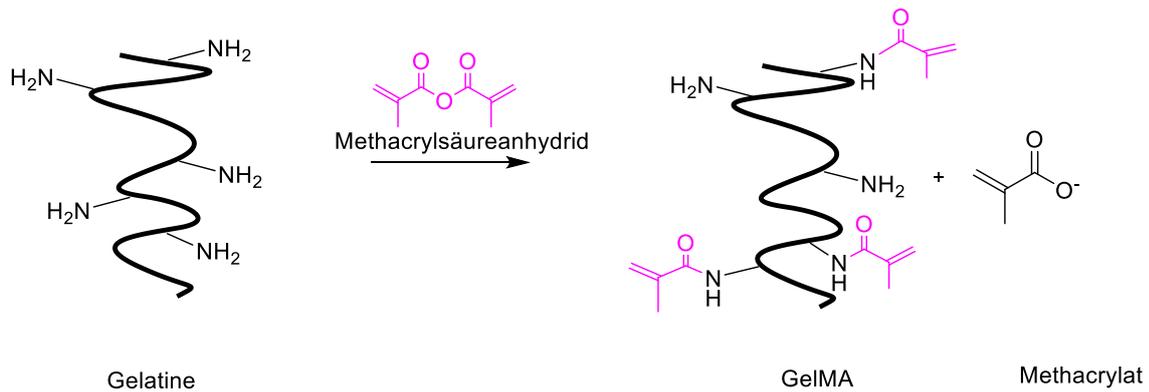


Abbildung 80: GelMA Synthese. Über eine nucleophile Acylsubstitution wurden die primären Aminogruppen der in DPBS^{-/-} gelösten Gelatine mit Methacrylsäureanhydrid zum Photopolymer funktionalisiert. ^[94]

Lyophilisiertes GelMA 8 Äq wurde als 10 %ige (w/v) Stocklösung mit DPBS^{-/-} angesetzt und bei 50° C gelöst. REC wurden abgelöst und das Zellpellet in RECM in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Für 200 µl eines 4%igen GelMA Hydrogels wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß die Komponenten wie in **Tabelle 11** zusammengesetzt. Die Lösung wurde vorsichtig resuspendiert und 200 µl in ein µ-Slide 8 Well ibidi überführt und für 30 s bei 500 mW/cm² mit einer OSRAM Ultra Vitalux 300 W E27-Lampe vernetzt. Das Hydrogel wurde mit 300 µl RECM überschichtet. Es erfolgte eine Kultivierung über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen. Ein Medienwechsel erfolgte jeden zweite Tag. Zur Erstellung der Gele ohne Zellen wurden 96-Wellkultivierungsplatten verwendet und je 100 µl Hydrogel eingefügt. Die Zellsuspension wurde durch DPBS^{-/-} ersetzt. $3 \cdot 10^4$ REC wurden in 200 µl RECM auf der Oberfläche ausgebracht.

Tabelle 11: Zusammensetzung der verschiedenen Hydrogele mit 200 µl Gesamtvolumen.

Hydrogel	Bestandteile	Volumen in µl
4 % GelMA (8 Äq)	10 % GelMA medium	80
	10 % LAP in H ₂ O	6
	DPBS ^{-/-}	114
4 % GelMA (8 Äq) mit Zellen	10 % GelMA medium	80
	10 % LAP in H ₂ O	6
	RECM	64
	REC ($1 \cdot 10^5$)	50
4 % GelMA (8 Äq) mit Kollagen I	10 % GelMA medium	80
	10 % LAP in H ₂ O	6
	DPBS ^{-/-}	64
	Kollagen I	50

GelN/S Hydrogel

GelN wurde mit verschiedenen Funktionalisierungsgraden durch Mengenänderungen von 5-Norborne-2-Carbonsäure, EDC-HCl und NHS erzeugt. Der lyophilisierte Feststoff wurde bei -20°C gelagert. GelS wurde mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden durch Variation der Menge an N-Acetyl DL-Homocystein-Thiolacton synthetisiert. Der lyophilisierte Feststoff wurde unter Argon-Atmosphäre versetzt und bei -80°C gelagert. Die Synthesen wurde von M. Sc Alisa Grimm und M. Sc Sonja Leopold durchgeführt.

Für GelN/S Hydrogele wurden Stocklösungen in DPBS^{-/-} hergestellt. Die 10 %ige Stocklösung von GelN 2 Äq wurde bei 50°C und die 5 %ige GelS 5 Äq bei 70°C gelöst. Für 200 µl Hydrogel wurden 5 % der GelN Stocklösung, 5 % der GelS Stocklösung, 1 mM LAP (0,03 %) aus einer 10 %igen Stocklösung, sowie $1 \cdot 10^5$ REC in 50 µl RECM gemischt. DBPS^{-/-} wurde zum Erreichen des Endvolumens hinzugefügt. Die Lösung wurde vorsichtig resuspendiert und 200 µl in ein μ -Slide 8 Well überführt und für mindestens 20 s bei 500 mW/cm^2 mit einer OSRAM Ultra Vitralux 300 W E27-Lampe vernetzt. Das Hydrogel wurde mit 300 µl RECM überschichtet. Es erfolgte eine Kultivierung über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen. Ein Medienwechsel erfolgte jeden zweite bzw. dritten Tag. Zur Erstellung der Gele ohne Zellen wurden 96-Wellkultivierungsplatten verwendet und je 100 µl Hydrogel eingefügt. Die Zellsuspension wurde durch DPBS^{-/-} ersetzt. $3 \cdot 10^4$ REC wurden in 200 µl RECM auf der Oberfläche ausgebracht.

PEGDA Hydrogel

Für 200 µl eines 0,1 g/ml PEGDA Hydrogels wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 0,02 g PEGDA, 1 % LAP (Stock 10 % gelöst in Wasser) und 145,5 µl DPBS^{-/-} zusammengefügt. Bei einer Strahlungsintensität von 500 mW/cm^2 wurden 100 µl des Hydrogels in einer 96-Well Kultivierungsplatte für 60 Sekunden mit einer OSRAM Ultra Vitralux 300 W E27-Lampe vernetzt. $3 \cdot 10^4$ REC wurden nach dem Vernetzen in 200 µl RECM wurden abgelöst und das Zellpellet in RECM in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Es erfolgte eine Kultivierung über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen. Ein Medienwechsel erfolgte jeden zweite Tag.

6.2.8 vasQchip

6.2.8.1 Produktion und Ätzen des Mikrokanals

Der poröse Mikrokanal wird mittels SMART-Technologie (*engl. Substrate Modification And Replication by Thermoforming*) hergestellt ^[127]. Zum Erstellen der Mikrokanäle wurde eine mit Schwerionen beschossene Polycarbonat-Membran (50 µm Dicke, 10^6 Ionen/cm², it4ip) in einer Formmaske aus Messing platziert. Durch einen Thermoformprozess wurden die Mikrokanalstrukturen mit Hilfe von Druck (4 bar) und Temperatur (147°C) generiert. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde das Formwerkzeug auf Raumtemperatur abgekühlt und die geformten Folien entnommen. Die

Kanalstrukturen wurden mittels Stanzvorrichtung in einem Durchmesser von 24 mm ausgestanzt werden. Zum Öffnen der latenten Ionenspur wurden die gestanzten Mikrokanäle in gleicher Orientierung in spezielle Polytetrafluorethylen (PTFE) Rahmen eingespannt. Es wurde eine 5 M Natrimhydroxid (NaOH)-Lösung aus 120 g NaOH in 600 ml destilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt. 60 µl (0,01 %) bzw. 12 µl (0,002 %) der Detergens Dowfax 2A1TM wurden unter Rühren bis zum Erreichen von 70° C hinzugefügt. Je nach gewünschter Porengröße wurden die Membranen 4,0 h (1 µm) bzw. 5 h (3 µm) bzw. 5,5 h (5 µm) geätzt. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Membranen mit demineralisiertem Wasser und eine Trocknung bei RT vor Verwendung.

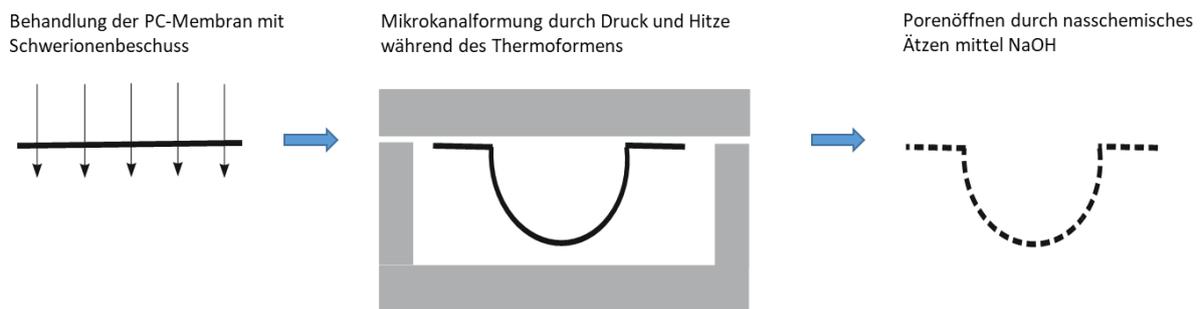


Abbildung 81: Herstellung des Mikrokanals aus einer, mit Schwerionen beschossenen, PC-Membran durch Thermoformen und anschließendem Öffnen der Poren durch nasschemisches Ätzen.

6.2.8.2 Assemblierung des vasQchips

Ein Klebering (500 µm Dicke) mit einem Durchmesser von 24 mm wurden auf den vasQchip aufgebracht. Die geätzte PC-Membran wurde mit Hilfe einer 25 G Kanüle mit Löchern für die Anschlüsse versehen. Die PC-Membran wurde mit der Kanalwölbung nach oben aufgeklebt. Ein Klebering (500 µm Dicke) mit einem Innendurchmesser von 24 mm und einem Außendurchmesser von 32 mm wurden auf den vasQchip Rand aufgebracht. Das Kompartiment wurde mit einem runden Deckglas (32 mm Durchmesser) verschlossen. Mit Hilfe von Pattex wurde das Deckglas außen am Rand versiegelt und für 10 min bei RT getrocknet. Vor dem Gebrauch in der Zellkultur wurde der vasQchip unter einer UV-Quelle über Nacht sterilisiert.

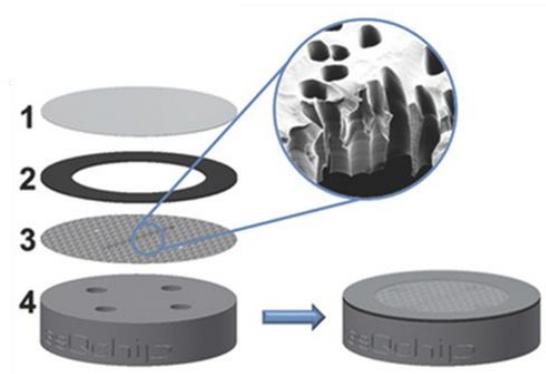


Abbildung 82 Assemblierung des vasQchips. 1) Deckglas; 2) Klebering; 3) PC-Membran und 4) Trägerblock (Dr. Vanessa Kappings^[569])

6.2.8.3 Beschichten des vasQchips

Die Zugänge zum äußeren Kompartiment des vasQchips wurden mit Luerplugs verschlossen. Für die Beschichtung des Mikrokanals wurden 0,1 mg/ml Kollagen I, $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin und 0,1 % Gelatine in DPBS^{-/-} verwendet. Es wurden 20 μl der jeweiligen Lösung in den Mikrokanal eingebracht. Es folgte eine Inkubation für 1 h unter Standardbedingungen. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und der Mikrokanal mit DPBS^{-/-} gewaschen bevor 200 μl RECM eingefügt wurden. Es folgte die Befüllung des äußeren Kompartiments mit 600 μl RECM und einer anschließenden Inkubation bei Standardbedingungen über Nacht.

6.2.8.4 Besiedeln des Mikrokanals

Das Medium der über Nacht inkubierten vasQchips wurde durch leichtes Klopfen von Luftblasen befreit. Für die Besiedelung des porösen Mikrokanals wurde das im Mikrokanal befindliche Medium entfernt. 20 μl einer Zellsuspension mit $1 \cdot 10^5$ REC wurden in den beschichteten Mikrokanal gegeben. Der vasQchip mit den Endothelzellen wurde für 1,5 h im vasQturn unter permanenter Rotation um die eigene Achse mit 0,25 rpm unter Standardbedingungen inkubiert. Es folgte eine weitere Stunde statische Inkubation unter Standardbedingungen. Die Zelladhäsion an der Mikrokanalwand wurde anschließend mikroskopisch überprüft, bevor 100 μl Medium in den Mikrokanal gegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit über Nacht konnte der Mikrokanal sofern gewünscht, an die Mikrofluidik angeschlossen werden. Ein Medienwechsel folgte jeden zweiten Tag, indem 600 μl RECM durch den Eingang des Kompartiments gegeben wurden oder 200 μl in den Mikrokanaleingang bei statischer Kultivierung.

6.2.8.5 Mikrofluidische Kultivierung des vasQchips mit Hilfe der Peristaltikpumpe

Ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen wurde mit 5 ml RECM präpariert. Das Schlauchset wurde in die Peristaltikpumpe eingespannt und das Medium über Nacht unter Standardbedingungen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,100 ml/min äquilibriert. Der mit dem im Medium in Verbindung stehende Schlauch im Zentrifugationsröhrchen, wurde mit dem Kanaleingang des vasQchips luftblasenfrei verbunden. Dazu wurden die Schläuche vor und nach dem Verbindungsstück abgeklemmt. Das Schlauchende endete im Zentrifugationsröhrchen oberhalb der Mediengrenze. Alle zwei Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,005 ml/min.

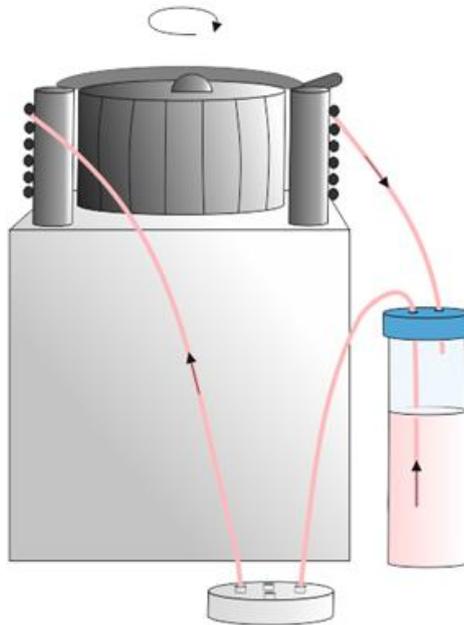


Abbildung 83: Mikrofluidische Kultivierung des vasQchips durch einen mechanischen Fluss einer Peristaltikpumpe.

6.2.8.6 Reinigung

Nach Beenden der Kultivierungsdauer wurden die verwendeten vasQchip Blöcke erst in Isopropanol eingelegt, um die Kleberinge und die PC- Membran vom vasQchip Block zu lösen, dann in 70 %iges Ethanol zum Sterilisieren gegeben und anschließend autoklaviert. Die verwendeten Mediumreservoirs sowie die Schläuche der Pumpensysteme und Verschlüsse wurden zunächst entleert, dann mit 70 %igem Ethanol und anschließend 2-mal mit Wasser durchgespült. Die Schläuche wurden entleert aufbewahrt. Das Zentrifugationsröhrchen wurde zur Lagerung erneuert. Bei nachfolgenden Versuchen konnten die Materialien wiederverwendet werden.

6.2.9 HB-flow System

6.2.9.1 Drucken der Gerüststruktur

Die Gerüststruktur wurde mit SE1700 auf einem Deckglas gedruckt. Das Deckglas wurde zuvor mit Ethanol auf einem Objektträger aufgebracht. Es wurden 2 g Dowsil Basis in ein 5 ml Reaktionsgefäß abgewogen und mit einer abgeschnittenen Spitze 0,2 g Dowsil Katalysator dazu gewogen (Verhältnis 10:1). Die Mischung wurde für 2 min bei 200 g zentrifugiert, anschließend mit einem Spatel vermischt und nochmals für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Mischung mit einer 1 ml Spritze aufgenommen und mit Hilfe von Verbindungsstücke luftblasenfrei in eine weitere Spritze überführt. Die Spritze wurde mit einer konischen 25 G Kanüle versehen. Die Gerüststruktur wurde mit einem extrusionsbasierten 3D Drucker der AG Huang (Cambridge University, England) erstellt und anschließend bei 60° C über Nacht zur Aushärtung inkubiert.

6.2.9.2 Erstellen des Mikrokanals mit Hilfe der Nadeltechnik

Es wurde eine 26 G Kanüle durch die Aussparungen der Gerüststruktur geführt. Anschließend wurden 150 µl Hydrogel (GelMA) in das *HB-flow* System eingebracht und vernetzt. Nach dem Entfernen der Kanüle war der Mikrokanal vorhanden.

6.2.9.3 Erstellen des Mikrokanals durch das 3D Drucken von Pluronic F-127

Eine 40 %ige Pluronic F-127 Lösung wurde in destilliertem Wasser angesetzt. Das Pluronic F-127 wurde bei 4° C über mehrere Tage gelöst. Mit einer Spritze wurde die Pluronic-Lösung aufgezogen und diese mit einer konischen 27 G Kanüle versehen. Es wurden 50 µl Hydrogel in das *HB-flow* System eingebracht. Anschließend wurde bei RT Pluronic F-127 extrudiert. Das extrudierte Material wurde von dem Gerüsteintritt zu dem Gerüstaustritt mit dem extrusionsbasierten 3D Biodrucker von Biospot BP Biofluidix bei RT gedruckt. Die Überstände wurden durch eine Pipettenspitze entfernt und die Struktur mit 100 µl Hydrogel überschichtet. Nachdem das Hydrogel vernetzt wurde fand eine Inkubation bei 4° C für 10 min statt, um das Pluronic F-127 zu solubilisieren. Anschließend konnte das Pluronic-F127 mit Hilfe von Filterpapier entfernt werden und der entstandene Mikrokanal wurde zweimal mit DBPS ^{-/-} gewaschen.

6.2.9.4 Besiedelung des Mikrokanals

Um den Mikrokanal des *HB-flow* Systems zu besiedeln wurde dieses zunächst über Nacht in einer 6 Well Kultivierungsplatte in 5ml Medium unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden $1 \cdot 10^5$ Endothelzellen in 10 µl Zellspezifischem Medium in den Mikrokanal eingebracht und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das *HB-Flow* System gewendet, um die

obere Seite des Mikrokanals zu besiedeln. Dazu wurden erneut $1 \cdot 10^5$ Endothelzellen in 10 μl Zellspezifischem Medium in den Mikrokanal eingebracht und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Danach konnte das *HB-flow* System gewendet werden und gegebenenfalls an die Mikrofluidik angeschlossen werden.

6.2.9.5 Kultivierung des RPEs

In der Gerüststruktur des *HB-flow* Systems wurden 110 μl eines GelMA- Kollagen I Hydrogels vernetzt und der Mikrokanal erstellt. Anschließend wurden 50 μl eines Fibrinhydrogels (5 mg/ml Fibrinogen) eingebracht und bei RT für 10 min inkubiert. $1 \cdot 10^5$ RPE Zellen wurden in 200 μl Medium auf der Oberfläche des Hydrogels ausgebracht und für mindestens 6 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das *HB-flow* System in 5 ml Medium in einer 6 Well Kultivierungsplatte kultiviert. Ein Medium Wechsle wurde jeden zweiten Tag durchgeführt.

6.2.9.6 Ko-Kultivierung von RPE und REC

Für eine Ko-Kultivierung von REC im Mikrokanal und RPE auf dem Hydrogel wurde zunächst eine 26 G Kanüle durch die Aussparungen der Gerüststruktur geführt. Anschließend wurden 110 μl 4 %iges GelMA / Kollagen I Hydrogel in das *HB-flow* System eingebracht und bei 500 mW/cm^2 für 60 s vernetzt. Die Kanüle wurde entfernt und 50 μl eines Fibrinhydrogels (5 mg/ml Fibrinogen) eingebracht, das bei RT für 10 min inkubiert wurde. In den Mikrokanal wurden wie beschrieben 24 h versetzt, 2-mal je $1 \cdot 10^5$ REC Zellen in 10 μl RECM eingebracht. Anschließend wurde das Medium von der Hydrogeloberfläche abgenommen und $1 \cdot 10^5$ RPE Zellen in 200 μl Medium für mindestens 6 h inkubiert, bevor die 6 Well Kultivierungsplatte wieder mit 5 ml ARPE-M oder RPE-M befüllt wurde.

6.2.9.7 Mikrofluidik mit Hilfe einer Peristaltikpumpe

Zur Mikrofluidischen Kultivierung des *HB-flow* Systems wurde eine Peristaltikpumpe verwendet sowie ein Tygonschlauchset mit 2 Stoppfern. Der aus dem Medienreservoir (7 ml Medium) führende Schlauch wurde in der Peristaltikpumpe in Pumprichtung eingespannt und mit dem Eingang des *HB-flow* Systems verbunden. Der vom Ausgang des *HB-flow* Systems wegführende Schlauch wurde gegen die Pumprichtung in die Peristaltikpumpe eingespannt und zurück in das Zentrifugationsröhrchen geführt. Ein Medium Wechsel fand jeden zweiten bzw. dritten Tag statt.

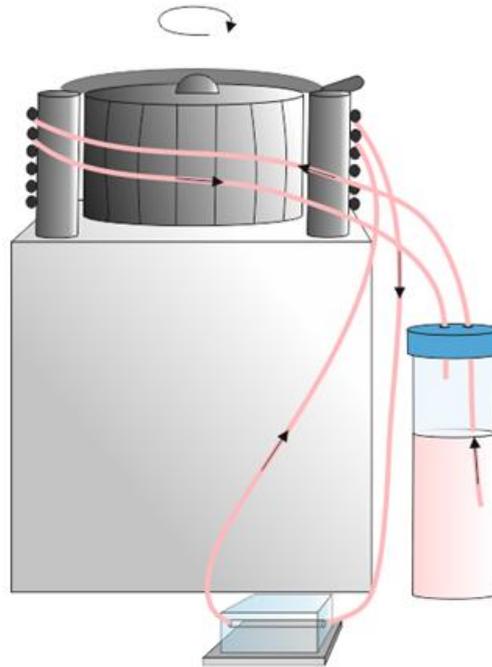


Abbildung 84: Mikrofluidische Kultivierung des *HB-flow* Systems mit Hilfe einer Peristaltikpumpe.

6.2.9.8 Reinigung des *HB-flow* Systems

Nach Beenden der Kultivierung wurde das Hydrogel aus der Gerüststruktur entfernt. Die Gerüststruktur wurde zunächst mit 1 ml 0,25 %igem Trypsin-EDTA behandelt, dann mit 1 ml 75 %igem Ethanol gesäubert und anschließend autoklaviert.

6.2.10 Hypoxische Umgebung

6.2.10.1 H_2O_2 und CoCl_2

$3 \cdot 10^4$ Zellen pro Well wurden jeweils in einer 96-Well Kultivierungsplatte ausgebracht. Nach 24 h wurden 100 μl Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 (1 mM, 0,25 mM und 0,125mM) oder CoCl_2 (1,5 mM, 150 nM, 50 nM) zu den Zellen gegeben und für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium ersetzt.

6.2.10.2 MTT-Toxizitätstest

Die Zellen wurden in einer 96-Well Kultivierungsplatte Zellen in einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 100 μl ausgebracht und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Die zu untersuchenden Substanzen wurden dann in entsprechender Konzentration zugegeben und eine Inkubation von 72 h folgte. 5 μl 1 % Triton X (20 % Stock) wurde zur Totkontrolle zugegeben und anschließend zu jedem Well jeweils 15 μl des Farbstoffes MTT. Nach einer Inkubation von 3 h wurde in jedes Well 100 μl Stop Lösung gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde die Absorption bei einer

Wellenlänge von 595 nm im Spektrophotometer ermittelt. Referenziert wurden die Werte bei der Auswertung auf die Lebend- und Totkontrollen, bei denen keine Behandlung erfolgt war.

6.2.11 Immunfluoreszenz

Fixierung

Das Medium wurde abgenommen und die zu fixierende Probe mit DPBS ^{+/+} gewaschen. Die Probe wurde mit einer 4 %igen PFA-Lösung (in DPBS ^{-/-}) für 10 min bei RT inkubiert. Nachdem dem Waschen der Probe mit DPBS ^{-/-} konnte diese bei 4° C gelagert werden.

Permeabilisierung

Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde die fixierte Probe mit einer 0,1 %igen Triton X-100-Lösung (in DPBS ^{-/-}) für 4 min bei RT inkubiert und anschließend mit DPBS ^{-/-} gewaschen.

Blockierung

Um unspezifischen Bindungen der Antikörper entgegen zu wirken, wurde die fixierte und permeabilisierte Probe mit CasBlock für 30 min bei RT inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

Antikörper

Spezifische Zell- und Gewebestrukturen wurden anhand Fluoreszenz-markierter Antikörper visualisiert. Die zuvor fixierte, permeabilisierte und blockierte Probe wurde mit einem spezifischen Primärantikörper in CasBlock™ über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Probe zweimal mit DPBS ^{-/-} gewaschen und anschließend mit dem Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht bei 4° C wurde die Probe mit DPBS ^{-/-} gewaschen und mikroskopiert.

Visualisierung der Zellkerne

Die Zellkerne lebender und fixierter Zellen wurden durch Hoechst33342 visualisiert. Hoechst wurde in einer Endkonzentration von 2 µg/ml in DPBS ^{-/-} ohne Lichteinfluss verwendet. Nach einer Inkubation von 5 min unter Standardbedingungen wurde die Färbelösung abgenommen und die Probe mit DPBS ^{-/-} gewaschen. Das Extinktionsmaximum liegt 405 nm, das Emissionsmaximum bei 415/480 nm.

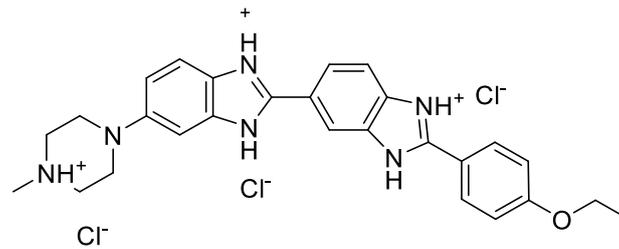


Abbildung 85: Strukturformel von Hoechst33342

Visualisierung des Aktinzytoskeletts

Phalloidin-TRITC wurde zur Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts bei fixierten, permeabilisierten Proben verwendet. Für eine Stammlösung von 100 μM Phalloidin-TRITC wurden 0,1 mg Phalloidin-TRITC in 766 μl DMSO gelöst. Die Stammlösung wurde in DPBS ^{-/-} verdünnt und in einer Endkonzentration von 100 nM zu der Probe gegeben. Nach einer Inkubation bei RT für 20 min wurde die Probe 2-mal mit DPBS ^{-/-} gewaschen. Das Extinktionsmaximum lag bei 532 nm, das Emissionsmaximum zwischen 545-625 nm.

Markierung des Zytosols mittels CellTracker Green CMFDA

Zur Markierung des Zytosols wurde der Fluoreszenzfarbstoff der Marke CellTracker™ verwendet. Die Endkonzentration des CellTracker Green™ CMFDA lag bei 10 μM , wobei 50 μg des CellTracker Green™ in 10,76 μl DMSO gelöst wurden. Für die Markierung von Zellen wurde CellTracker Green™ CMFDA in zellspezifischem Medium verdünnt und die Probe für 30 min unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium ersetzt und die Probe mikroskopiert. Das Extinktionsmaximum lag bei 492 nm, das Emissionsmaximum bei 517 nm.

6.2.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz wurde durch zweiseitige Student t-Tests bestimmt, wobei alle Ergebnisse mit $P < 0,05$ als statistisch signifikant galten.

7. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 12: Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
%	Prozent
Δ	Delta
ϵ	Dielektrizitätskonstante
°	Grad
° C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AK	Arbeitskreis
AMD	Age related macular disease
Äq	Äquivalent
ARPE19	spontaneously arising retinal pigment epithelial cell line
B. Sc.	Bachelor of Science
bzw	beziehungsweise
Calcein-AM	Calcein- Acetoxymethylester
cDNA	Komplementäre DANN
CellTracker CMDFA	5-Chlormethylfluoresceindiacetat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobaltchlorid
CTCF	Corrected total cell fluorescence
DD	Differenzierungstag
ddH ₂ O	doppelt-distilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Dr.	Doktorgrad
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM2	Endothelial growth medium
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fätales Kälberserum
FGF-R	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramm
G	Gauge
g	Beschleunigungsgröße
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCU	Green calibrated unit
GelMA	Gelatine-Methacryloyl
GelN	Norbonen-funktionalisierte Gelatine

GeIS	thiolierte Gelatine
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
<i>HB-flow</i>	Hydrogel basiertes- flow System
hESC	humane embryonale Stammzellen
hREC	humane retinale Endothelzellen
HUVEC	Human umbelical vein endothelial cells
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin-G
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
kDa	Kilodalton
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LAP	Lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat
LD ₅₀	letale Dosis 50 %
M. Sc.	Master of Science
Mertk	Protoonkogen-Tyrosin-Protein-Kinase MER
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
mESC	Murine embryonale Stammzellen
min	Minute
Mitf	Melanocyte Inducing Transcription Factor
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MM	Maintance medium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
mW	Milliwatt
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
oBRB	äußere Blut-Retina-Schranke (outer blood retinal barrier)
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
OD	Optische Dichte
Otx2	Orthodenticle Homeobox 2
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pa	Pascal
Pax6	Paired Box 6
PE	R-Phycoerythrin
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEDF	Serpin Family F Member 1
PEGDA	Poly(ethylene glycol) diacrylate
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential des Wasserstoffs
PI	Propidiumiodid

PTFE	Polytetrafluorethylen
P-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert
qPCR	quantitative Echtzeit- Polymerase-Kettenreaktion
RDM	Retinal differentiation medium
REC	Retinale Endothelzellen
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RMM2	Retinal Maturation medium 2
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein
RPE-M	Retinales Pigmentepithel medium
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT +	Reverse Transkriptase
Rx	Retinales Homeoboxprotein
s	Sekunde
SFEBq	serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation
SSC	Side Scatter
TEER	Transepitheliale elektrische Resistenz
TRITC	Tetramethylrhodamine
TJ	Tight Junctions
ULW	Ultra-Low attachment Wells
UV	Ultraviolettestrahlung
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewichtsteil
Wnt	Signalweg, Zusammensetzung aus <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
ZO-1	Zonula occludens-1

8. Literaturverzeichnis

- [1] **Langer R, Vacanti J P. (1993).** Tissue engineering. *Science*. 260(5110):920–926.
DOI: 10.1126/science.8493529.
- [2] **Katari R S., Peloso A, Orlando G (2014).** Tissue engineering. *Adv Surg*. 48():137–154.
DOI: 10.1016/j.yasu.2014.05.007.
- [3] **Meyer U (2009).** The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective:5–12
Meyer UThe History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective.
- [4] **Howard D, Buttery L D., Shakesheff K M., Roberts S J. (2008).** Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat*. 213(1):66–72.
DOI: 10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
- [5] **Kwon S Gyu, Kwon Y Woo, Lee T Wook, Park G Tae, Kim J Ho (2018).** Recent advances in stem cell therapeutics and tissue engineering strategies. *Biomater Res*. 22():36.
DOI: 10.1186/s40824-018-0148-4.
- [6] **Murphy S Vincent, Atala A (2013).** Organ engineering--combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *Bioessays*. 35(3):163–172.
DOI: 10.1002/bies.201200062.
- [7] **Kim Y, Ko H, Kwon I Keun, Kwon I Keun, Shin K (2016).** Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering. *Int Neurourol J*. 20(Suppl 1):S23-29.
DOI: 10.5213/inj.1632600.318.
- [8] **Koh C J., Atala A (2004).** Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol*. 15(5):1113–1125.
DOI: 10.1097/01.asn.0000119683.59068.f0.
- [9] **Weissman I L. (2000).** Stem Cells. *Cell*. 100(1):157–168.
DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.
- [10] **Brivanlou A H., Gage F H., Jaenisch R, Jessell T, Melton D, Rossant J (2003).** Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*. 300(5621):913–916.
DOI: 10.1126/science.1082940.
- [11] **Dzobo K, Thomford N Ekow, Senthebane D Alice, Shipanga H, Rowe A, Dandara C, Pillay M, Motaung K Shirley Caroline M. (2018).** Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. *Stem Cells Int*. 2018():2495848.
DOI: 10.1155/2018/2495848.
- [12] **Williams D F. (2019).** Challenges With the Development of Biomaterials for Sustainable Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 7():127.
DOI: 10.3389/fbioe.2019.00127.
- [13] **Zhang F, Citra F, Wang D-A (2011).** Prospects of induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*. 17(2):115–124.
DOI: 10.1089/ten.TEB.2010.0549.
- [14] **Ma C, Peng Y, Li H, Chen W (2021).** Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development. *Trends Pharmacol Sci*. 42(2):119–133.
DOI: 10.1016/j.tips.2020.11.009.
- [15] **Ekenseair A K., Kasper F Kurtis, Mikos A G. (2013).** Perspectives on the interface of drug delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 65(1):89–92.
DOI: 10.1016/j.addr.2012.08.017.
- [16] **Bédard P, Gauvin S, Ferland K, Caneparo C, Pellerin È, Chabaud S, Bolduc S (2020).** Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. *Bioengineering (Basel)*. 7(3).
DOI: 10.3390/bioengineering7030115.

- [17] **Jensen C, Teng Y (2020)**. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 7():33.
DOI: 10.3389/fmolb.2020.00033.
- [18] **Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro A F., Fredberg J, Chen Z (2017)**. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 32(4):266–277.
DOI: 10.1152/physiol.00036.2016.
- [19] **Sun M, an Liu, Yang X, Gong J, Yu M, Yao X, Wang H, He Y (2021)**. 3D Cell Culture—Can It Be As Popular as 2D Cell Culture? *Adv NanoBio Res.* 1(5):2000066.
DOI: 10.1002/anbr.202000066.
- [20] **Fatehullah A, Tan S Hui, Barker N (2016)**. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol.* 18(3):246–254.
DOI: 10.1038/ncb3312.
- [21] **Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K (2018)**. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 14(4):910–919.
DOI: 10.5114/aoms.2016.63743.
- [22] **Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J (2018)**. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci.* 19(1).
DOI: 10.3390/ijms19010181.
- [23] **Edmondson R, Broglie J Jenkins, Adcock A F., Yang L (2014)**. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 12(4):207–218.
DOI: 10.1089/adt.2014.573.
- [24] **Huh D, Hamilton G A., Ingber D E. (2011)**. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology.* 21(12):745–754.
DOI: 10.1016/j.tcb.2011.09.005.
- [25] **Baharvand H, Hashemi S M., Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A (2006)**. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol.* 50(7):645–652.
DOI: 10.1387/ijdb.052072hb.
- [26] **Nelson C M., Bissell M J. (2006)**. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22():287–309.
DOI: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315.
- [27] **Ravi M, Paramesh V, Kaviya S R., Anuradha E, Solomon F D. Paul (2015)**. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol.* 230(1):16–26.
DOI: 10.1002/jcp.24683.
- [28] **Mark K von der, Gauss V, Mark H von der, Müller P (1977)**. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 267(5611):531–532.
DOI: 10.1038/267531a0.
- [29] **Benya P (1982)**. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 30(1):215–224.
DOI: 10.1016/0092-8674(82)90027-7.
- [30] **Tibbitt M W., Anseth K S. (2009)**. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 103(4):655–663.
DOI: 10.1002/bit.22361.
- [31] **Bhatia S N., Ingber D E. (2014)**. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol.* 32(8):760–772.
DOI: 10.1038/nbt.2989.
- [32] **Park Y, Huh K Moo, Kang S-W (2021)**. Applications of Biomaterials in 3D Cell Culture and Contributions of 3D Cell Culture to Drug Development and Basic Biomedical Research. *Int J Mol Sci.* 22(5).
DOI: 10.3390/ijms22052491.

- [33] **Weaver V M., Petersen O W., Wang F, Larabell C A., Briand P, Damsky C, Bissell M J. (1997).** Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol.* 137(1):231–245.
DOI: 10.1083/jcb.137.1.231.
- [34] **Mahmud G, Campbell C J., Bishop K J. M., Komarova Y A., Chaga O, Soh S, Huda S, Kandere-Grzybowska K, Grzybowski B A. (2009).** Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nature Phys.* 5(8):606–612.
DOI: 10.1038/nphys1306.
- [35] **Zietarska M, Maugard C M., Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin P N., Provencher D M., Mes-Masson A-M (2007).** Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog.* 46(10):872–885.
DOI: 10.1002/mc.20315.
- [36] **Greiner A M., Richter B, Bastmeyer M (2012).** Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies. *Macromol Biosci.* 12(10):1301–1314.
DOI: 10.1002/mabi.201200132.
- [37] **Adams J C., Watt F M. (1993).** Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development.* 117(4):1183–1198.
DOI: 10.1242/dev.117.4.1183.
- [38] **Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L (1990).** Extracellular matrix. *FEBS Letters.* 268(2):386–393.
DOI: 10.1016/0014-5793(90)81291-U.
- [39] **Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I (2005).** Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology.* 15(5):405–412.
DOI: 10.1016/j.semcancer.2005.06.009.
- [40] **Bhadriraju K, Chen C S. (2002).** Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discovery Today.* 7(11):612–620.
DOI: 10.1016/S1359-6446(02)02273-0.
- [41] **Knight E, Przyborski S (2015).** Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat.* 227(6):746–756.
DOI: 10.1111/joa.12257.
- [42] **Iwasaki Y, Sugita S, Mandai M, Yonemura S, Onishi A, Ito S-I, Mochizuki M, Ohno-Matsui K, Takahashi M (2016).** Differentiation/Purification Protocol for Retinal Pigment Epithelium from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells as a Research Tool. *PLoS One.* 11(7):e0158282.
DOI: 10.1371/journal.pone.0158282.
- [43] **Frantz C, Stewart K M., Weaver V M. (2010).** The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 123(Pt 24):4195–4200.
DOI: 10.1242/jcs.023820.
- [44] **Nicolas J, Magli S, Rabbachin L, Sampaolesi S, Nicotra F, Russo L (2020).** 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate. *Biomacromolecules.* 21(6):1968–1994.
DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00045.
- [45] **Liu D, Chen S, Win Naing M (2021).** A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development. *Biotechnol Bioeng.* 118(2):542–554.
DOI: 10.1002/bit.27620.
- [46] **Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K (2020).** Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci.* 21(17).
DOI: 10.3390/ijms21176225.
- [47] **Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart L A. (2009).** Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* 4(3):309–324.
DOI: 10.1038/nprot.2008.226.

- [48] **Mittler F, Obeid P, Rulina A V., Haguët V, Gidrol X, Balakirev M Y. (2017).** High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. *Front Oncol.* 7():293.
DOI: 10.3389/fonc.2017.00293.
- [49] **Breslin S, O'Driscoll L (2013).** Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 18(5-6):240–249.
DOI: 10.1016/j.drudis.2012.10.003.
- [50] **Close D A., Camarco D P., Shan F, Kochanek S J., Johnston P A. (2018).** The Generation of Three-Dimensional Head and Neck Cancer Models for Drug Discovery in 384-Well Ultra-Low Attachment Microplates. *Methods Mol Biol.* 1683():355–369.
DOI: 10.1007/978-1-4939-7357-6_20.
- [51] **Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y (2008).** Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell.* 3(5):519–532.
DOI: 10.1016/j.stem.2008.09.002.
- [52] **Eiraku M, Sasai Y (2011).** Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. *Nat Protoc.* 7(1):69–79.
DOI: 10.1038/nprot.2011.429.
- [53] **Shri M, Agrawal H, Rani P, Singh D, Onteru S Kumar (2017).** Hanging Drop, A Best Three-Dimensional (3D) Culture Method for Primary Buffalo and Sheep Hepatocytes. *Sci Rep.* 7(1):1203.
DOI: 10.1038/s41598-017-01355-6.
- [54] **Pinto B, Henriques A C., Silva P M. A., Bousbaa H (2020).** Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics.* 12(12).
DOI: 10.3390/pharmaceutics12121186.
- [55] **Keenan T M., Folch A (2008).** Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip.* 8(1):34–57.
DOI: 10.1039/b711887b.
- [56] **Yeste J, Illa X, Alvarez M, Villa R (2018).** Engineering and monitoring cellular barrier models. *J Biol Eng.* 12():18.
DOI: 10.1186/s13036-018-0108-5.
- [57] **Goers L, Freemont P, Polizzi K M. (2014).** Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface.* 11(96).
DOI: 10.1098/rsif.2014.0065.
- [58] **Villars F, Conrad V, Rouais F, Lefebvre F, Amédée J, Bordenave L (1996).** Ability of various inserts to promote endothelium cell culture for the establishment of coculture models. *Cell Biol Toxicol.* 12(4-6):207–214.
DOI: 10.1007/BF00438147.
- [59] **Thompson C L., Fu S, Knight M M., Thorpe S D. (2020).** Mechanical Stimulation: A Crucial Element of Organ-on-Chip Models. *Front Bioeng Biotechnol.* 8():602646.
DOI: 10.3389/fbioe.2020.602646.
- [60] **Kaarj K, Yoon J-Y (2019).** Methods of Delivering Mechanical Stimuli to Organ-on-a-Chip. *Micromachines (Basel).* 10(10).
DOI: 10.3390/mi10100700.
- [61] **Danku A Ede, Dulf E-H, Braicu C, Jurj A, Berindan-Neagoe I (2022).** Organ-On-A-Chip: A Survey of Technical Results and Problems. *Front Bioeng Biotechnol.* 10():840674.
DOI: 10.3389/fbioe.2022.840674.
- [62] **Mosig A S. (2017).** Organ-on-chip models: new opportunities for biomedical research. *Future Sci OA.* 3(2):FSO130.
DOI: 10.4155/fsoa-2016-0038.
- [63] **Pfister RS (2022).** In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheit auf dem Chip. Online Bibliothek KIT.

- [64] **Heisenberg C-P, Bellaïche Y (2013)**. Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell*. 153(5):948–962. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.008.
- [65] **Dike L E., Farmer S R. (1988)**. Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(18):6792–6796. DOI: 10.1073/pnas.85.18.6792.
- [66] **Lauffenburger D A., Horwitz A F. (1996)**. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*. 84(3):359–369. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5.
- [67] **Wilson S H., Ljubimov A V., Morla A O., Caballero S, Shaw L C., Spoerri P E., Tarnuzzer R W., Grant M B. (2003)**. Fibronectin fragments promote human retinal endothelial cell adhesion and proliferation and ERK activation through alpha5beta1 integrin and PI 3-kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44(4):1704–1715. DOI: 10.1167/iovs.02-0773.
- [68] **Billman G E. (2020)**. Homeostasis: The Underappreciated and Far Too Often Ignored Central Organizing Principle of Physiology. *Front Physiol*. 11():200. DOI: 10.3389/fphys.2020.00200.
- [69] **Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight T N., Penttinen R (2009)**. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 61(2):198–223. DOI: 10.1124/pr.109.001289.
- [70] **Daley W P., Peters S B., Larsen M (2008)**. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*. 121(Pt 3):255–264. DOI: 10.1242/jcs.006064.
- [71] **Caliari S R., Burdick J A. (2016)**. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods*. 13(5):405–414. DOI: 10.1038/nmeth.3839.
- [72] **Nguyen K Truong, West J L. (2002)**. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 23(22):4307–4314. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00175-8.
- [73] **Liu J, Zheng H, Poh P S. P., Machens H-G, Schilling A F. (2015)**. Hydrogels for Engineering of Perfusable Vascular Networks. *Int J Mol Sci*. 16(7):15997–16016. DOI: 10.3390/ijms160715997.
- [74] **Lin C-C, Ki C Seok, Shih H (2015)**. Thiol-norbornene photo-click hydrogels for tissue engineering applications. *J. Appl. Polym. Sci*. 132(8). DOI: 10.1002/app.41563.
- [75] **Madduma-Bandarage U S. K., Madihally S V. (2021)**. Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *J. Appl. Polym. Sci*. 138(19):50376. DOI: 10.1002/app.50376.
- [76] **Caló E, Khutoryanskiy V V. (2015)**. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 65():252–267. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
- [77] **Fernandez-Yague M A., Hymel L A., Olingy C E., McClain C, Ogle M E., García J R., Minshew D, Vyshnya S, Lim H Seo, Qiu P, García A J., Botchwey E A. (2022)**. Analyzing immune response to engineered hydrogels by hierarchical clustering of inflammatory cell subsets. *Sci Adv*. 8(8):eabd8056. DOI: 10.1126/sciadv.abd8056.
- [78] **Graham N B. (1998)**. Hydrogels: their future, Part I. *Med Device Technol*. 9(1):18–22.
- [79] **Graham N B. (1998)**. Hydrogels: their future, Part II. *Med Device Technol*. 9(3):22–25.
- [80] **Hoffman G S., Calabrese L H. (2014)**. Vasculitis: determinants of disease patterns. *Nat Rev Rheumatol*. 10(8):454–462. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.89.

- [81] **Annabi N, Nichol J W., Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, Dehghani F (2010)**. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 16(4):371–383. DOI: 10.1089/ten.TEB.2009.0639.
- [82] . Peppas, Nicholas A. (2019). . 1Hydrogels in Medicine and Pharmacy. CRC Press. 9780429285097.
- [83] **Hill-West J L., Chowdhury S M., Slepian M J., Hubbell J A. (1994)**. Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(13):5967–5971. DOI: 10.1073/pnas.91.13.5967.
- [84] **Herrmann A, Haag R, Schedler U (2021)**. Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Adv Healthc Mater.* 10(11):e2100062. DOI: 10.1002/adhm.202100062.
- [85] **Lu S, Ramirez W Fred, Anseth K S. (2000)**. Photopolymerized, Multilaminated Matrix Devices with Optimized Nonuniform Initial Concentration Profiles To Control Drug Release. *J Pharm Sci.* 89(1):45–51. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<45::AID-JPS5>3.0.CO;2-8.
- [86] **Li J, Mooney D J. (2016)**. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater.* 1(12). DOI: 10.1038/natrevmats.2016.71.
- [87] **Catoira M Calvo, Fusaro L, Di Francesco D, Ramella M, Boccafocchi F (2019)**. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J Mater Sci Mater Med.* 30(10):115. DOI: 10.1007/s10856-019-6318-7.
- [88] **Aswathy S H., Narendrakumar U, Manjubala I (2020)**. Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon.* 6(4):e03719. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03719.
- [89] **Ahmed E M. (2015)**. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res.* 6(2):105–121. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [90] **Mauri E, Sacchetti A, Rossi F (2016)**. The Synthesis of RGD-functionalized Hydrogels as a Tool for Therapeutic Applications. *J Vis Exp(116)*. DOI: 10.3791/54445.
- [91] **Hoffman A S. (2012)**. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 64():18–23. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.010.
- [92] **Nicodemus G D., Bryant S J. (2008)**. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 14(2):149–165. DOI: 10.1089/ten.teb.2007.0332.
- [93] **Hutano D (2014)**. Recent Applications of Polyethylene Glycols (PEGs) and PEG Derivatives. *Mod Chem Appl.* 02(02). DOI: 10.4172/2329-6798.1000132.
- [94] **van den Bulcke A I., Bogdanov B, Rooze N de, Schacht E H., Cornelissen M, Berghmans H (2000)**. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules.* 1(1):31–38. DOI: 10.1021/bm990017d.
- [95] **Park S, Park K Min (2016)**. Engineered Polymeric Hydrogels for 3D Tissue Models. *Polymers (Basel).* 8(1). DOI: 10.3390/polym8010023.
- [96] **Liu D, Nikoo M, Boran G, Zhou P, Regenstein J M. (2015)**. Collagen and gelatin. *Annu Rev Food Sci Technol.* 6():527–557. DOI: 10.1146/annurev-food-031414-111800.
- [97] **Choi J Ru, Yong K Wey, Choi J Yu, Cowie A C. (2019)**. Recent advances in photo-crosslinkable hydrogels for biomedical applications. *Biotechniques.* 66(1):40–53. DOI: 10.2144/btn-2018-0083.

- [98] **Allen N S. (1996)**. Photoinitiators for UV and visible curing of coatings: Mechanisms and properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 100(1-3):101–107.
DOI: 10.1016/S1010-6030(96)04426-7.
- [99] **Tomal W, Ortyl J (2020)**. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. 12(5).
DOI: 10.3390/polym12051073.
- [100] **Göckler T, Haase S, Kempter X, Pfister R, Maciel B R., Grimm A, Molitor T, Willenbacher N, Schepers U (2021)**. Tuning Superfast Curing Thiol-Norbornene-Functionalized Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *Adv Healthc Mater*. 10(14):e2100206.
DOI: 10.1002/adhm.202100206.
- [101] **Göckler T (2021)**. Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering. Karlsruhe Institut für Technologie.
- [102] **Hein C D., Liu X-M, Wang D (2008)**. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res*. 25(10):2216–2230.
DOI: 10.1007/s11095-008-9616-1.
- [103] **Fairbanks B D., Schwartz M P., Halevi A E., Nuttelman C R., Bowman C N., Anseth K S. (2009)**. A Versatile Synthetic Extracellular Matrix Mimic via Thiol-Norbornene Photopolymerization. *Adv Mater*. 21(48):5005–5010.
DOI: 10.1002/adma.200901808.
- [104] **Xia Z, Jin S, Ye K (2018)**. Tissue and Organ 3D Bioprinting. *SLAS Technol*. 23(4):301–314.
DOI: 10.1177/2472630318760515.
- [105] **Murphy S V., Atala A (2014)**. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*. 32(8):773–785.
DOI: 10.1038/nbt.2958.
- [106] **Ozbolat I T., Hospodiuk M (2016)**. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*. 76():321–343.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076.
- [107] **Moldovan F (2019)**. Recent Trends in Bioprinting. *Procedia Manufacturing*. 32():95–101.
DOI: 10.1016/j.promfg.2019.02.188.
- [108] **Agarwal S, Saha S, Balla V Krishna, Pal A, Barui A, Bodhak S (2020)**. Current Developments in 3D Bioprinting for Tissue and Organ Regeneration—A Review. *Front. Mech. Eng*. 6().
DOI: 10.3389/fmech.2020.589171.
- [109] **Ramadan Q, Zourob M (2020)**. 3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries. *Front Med Technol*. 2():607648.
DOI: 10.3389/fmedt.2020.607648.
- [110] **Coakley M, Hurt D E. (2016)**. 3D Printing in the Laboratory: Maximize Time and Funds with Customized and Open-Source Labware. *J Lab Autom*. 21(4):489–495.
DOI: 10.1177/2211068216649578.
- [111] **Gungor-Ozkerim P Selcan, Inci I, Zhang Y Shrike, Khademhosseini A, Dokmeci M Remzi (2018)**. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*. 6(5):915–946.
DOI: 10.1039/c7bm00765e.
- [112] **Mancha Sánchez E, Gómez-Blanco J Carlos, López Nieto E, Casado J G., Macías-García A, Díaz Díez M A., Carrasco-Amador J Pablo, Torrejón Martín D, Sánchez-Margallo F Miguel, Pagador J Blas (2020)**. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. *Front Bioeng Biotechnol*. 8():776.
DOI: 10.3389/fbioe.2020.00776.
- [113] **You F, Eames B Frank, Chen X (2017)**. Application of Extrusion-Based Hydrogel Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 18(7).
DOI: 10.3390/ijms18071597.

- [114] **Malda J, Visser J, Melchels F P., Jüngst T, Hennink W E., Dhert W J. A., Groll J, Hutmacher D W. (2013).** 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater.* 25(36):5011–5028. DOI: 10.1002/adma.201302042.
- [115] **Kačarević Ž P., Rider P M., Alkildani S, Retnasingh S, Smeets R, Jung O, Ivanišević Z, Barbeck M (2018).** An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials (Basel)*. 11(11). DOI: 10.3390/ma11112199.
- [116] **Leberfinger A N., Ravnic D J., Dhawan A, Ozbolat I T. (2017).** Concise Review: Bioprinting of Stem Cells for Transplantable Tissue Fabrication. *Stem Cells Transl Med.* 6(10):1940–1948. DOI: 10.1002/sctm.17-0148.
- [117] **Bishop E S., Mostafa S, Pakvasa M, Luu H H., Lee M J., Wolf J Moriatis, Ameer G A., He T-C, Reid R R. (2017).** 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes & Diseases.* 4(4):185–195. DOI: 10.1016/j.gendis.2017.10.002.
- [118] **Zhang Y, Kumar P, Lv S, Di Xiong, Zhao H, Cai Z, Zhao X (2021).** Recent advances in 3D bioprinting of vascularized tissues. *Materials & Design.* 199():109398. DOI: 10.1016/j.matdes.2020.109398.
- [119] **Mastrangeli M, van den Eijnden-van Raaij J (2021).** Organs-on-chip: The way forward. *Stem Cell Reports.* 16(9):2037–2043. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.06.015.
- [120] **Bettinger C J., Weinberg E J., Kulig K M., Vacanti J P., Wang Y, Borenstein J T., Langer R (2005).** Three-Dimensional Microfluidic Tissue-Engineering Scaffolds Using a Flexible Biodegradable Polymer. *Adv Mater.* 18(2):165–169. DOI: 10.1002/adma.200500438.
- [121] **O'Brien F J. (2011).** Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today.* 14(3):88–95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [122] **Osório L A., Silva E, Mackay R E. (2021).** A Review of Biomaterials and Scaffold Fabrication for Organ-on-a-Chip (OOAC) Systems. *Bioengineering (Basel).* 8(8). DOI: 10.3390/bioengineering8080113.
- [123] **van Vlierberghe S, Dubrue P, Schacht E (2011).** Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules.* 12(5):1387–1408. DOI: 10.1021/bm200083n.
- [124] **Arik Y B., Buijsman W, Loessberg-Zahl J, Cuartas-Vélez C, Veenstra C, Logtenberg S, Grobbink A M., Bergveld P, Gagliardi G, Hollander A I. den, Bosschaart N, van den Berg A, Passier R, van der Meer A D. (2021).** Microfluidic organ-on-a-chip model of the outer blood-retinal barrier with clinically relevant read-outs for tissue permeability and vascular structure. *Lab Chip.* 21(2):272–283. DOI: 10.1039/d0lc00639d.
- [125] **Kappings V, Grün C, Ivannikov D, Hebeiss I, Kattge S, Wendland I, Rapp B E., Hettel M, Deutschmann O, Schepers U (2018).** vasQchip: A Novel Microfluidic, Artificial Blood Vessel Scaffold for Vascularized 3D Tissues. *Adv. Mater. Technol.* 3(4):1700246. DOI: 10.1002/admt.201700246.
- [126] **Ferain E, Legras R (1994).** Track-etched membrane: dynamics of pore formation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 84(3):331–336. DOI: 10.1016/0168-583X(94)95725-8.
- [127] **Truckenmüller R, Giselbrecht S, van Blitterswijk C, Dambrowsky N, Gottwald E, Mappes T, Rolletschek A, Saile V, Trautmann C, Weibezahn K-F, Welle A (2008).** Flexible fluidic microchips based on thermoformed and locally modified thin polymer films. *Lab Chip.* 8(9):1570–1579. DOI: 10.1039/b803619e.
- [128] **Young E W. K., Beebe D J. (2010).** Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem Soc Rev.* 39(3):1036–1048. DOI: 10.1039/b909900j.

- [129] **Roux E, Bougaran P, Dufourcq P, Couffignal T (2020).** Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol.* 11():861.
DOI: 10.3389/fphys.2020.00861.
- [130] **Halldorsson S, Lucumi E, Gómez-Sjöberg R, Fleming R M. T. (2015).** Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens Bioelectron.* 63():218–231.
DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029.
- [131] **Golden A P., Tien J (2007).** Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element. *Lab Chip.* 7(6):720–725.
DOI: 10.1039/b618409j.
- [132] **Huang G, Wang S, He X, Zhang X, Lu T Jian, Xu F (2013).** Helical spring template fabrication of cell-laden microfluidic hydrogels for tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 110(3):980–989.
DOI: 10.1002/bit.24764.
- [133] **Loessner D, Meinert C, Kaemmerer E, Martine L C., Yue K, Levett P A., Klein T J., Melchels F P. W., Khademhosseini A, Hutmacher D W. (2016).** Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat Protoc.* 11(4):727–746.
DOI: 10.1038/nprot.2016.037.
- [134] **Burchak, Vadym (2021).** Charakterisierung der Hydrogele GelNB/S und GelNB/DTT für das 3D Bioprinting von Knochen-, Knorpel- und Fettersatzgeweben. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- [135] **Lee J Hyun (2018).** Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater Res.* 22():27.
DOI: 10.1186/s40824-018-0138-6.
- [136] **Wang M, Duan B (2018).** Materials and Their Biomedical Applications:135–152
Wang M, Duan B Materials and Their Biomedical Applications.
- [137] **Huh D Dan (2015).** A human breathing lung-on-a-chip. *Ann Am Thorac Soc.* 12 Suppl 1():S42-4.
DOI: 10.1513/AnnalsATS.201410-442MG.
- [138] **Beckwitt C H., Clark A M., Wheeler S, Taylor D Lansing, Stolz D B., Griffith L, Wells A (2018).** Liver 'organ on a chip'. *Experimental Cell Research.* 363(1):15–25.
DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.12.023.
- [139] **Risueño I, Valencia L, Jorcano J L., Velasco D (2021).** Skin-on-a-chip models: General overview and future perspectives. *APL Bioeng.* 5(3):30901.
DOI: 10.1063/5.0046376.
- [140] **Ashammakhi N, Wesseling-Perry K, Hasan A, Elkhammas E, Zhang Y Shrike (2018).** Kidney-on-a-chip: untapped opportunities. *Kidney Int.* 94(6):1073–1086.
DOI: 10.1016/j.kint.2018.06.034.
- [141] **Xiang Y, Wen H, Yu Y, Li M, Fu X, Huang S (2020).** Gut-on-chip: Recreating human intestine in vitro. *J Tissue Eng.* 11():2041731420965318.
DOI: 10.1177/2041731420965318.
- [142] **Abulaiti M, Yalikulon Y, Murata K, Sato A, Sami M M., Sasaki Y, Fujiwara Y, Minatoya K, Shiba Y, Tanaka Y, Masumoto H (2020).** Establishment of a heart-on-a-chip microdevice based on human iPS cells for the evaluation of human heart tissue function. *Sci Rep.* 10(1):19201.
DOI: 10.1038/s41598-020-76062-w.
- [143] **Wevers N R., Kasi D G., Gray T, Wilschut K J., Smith B, van Vught R, Shimizu F, Sano Y, Kanda T, Marsh G, Trietsch S J., Vulto P, Lanz H L., Obermeier B (2018).** A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport. *Fluids Barriers CNS.* 15(1):23.
DOI: 10.1186/s12987-018-0108-3.
- [144] **Zhang P (2021).** Organ-on-a-chip:181–198
Zhang P Organ-on-a-chip.
- [145] **Chung M, Lee S, Lee B Joo, Son K, Jeon N Li, Kim J Hun (2018).** Wet-AMD on a Chip: Modeling Outer Blood-Retinal Barrier In Vitro. *Adv Healthc Mater.* 7(2).
DOI: 10.1002/adhm.201700028.

- [146] **Ragelle H, Goncalves A, Kustermann S, Antonetti D A., Jayagopal A (2020).** Organ-On-A-Chip Technologies for Advanced Blood-Retinal Barrier Models. *J Ocul Pharmacol Ther.* 36(1):30–41. DOI: 10.1089/jop.2019.0017.
- [147] **Ptito M, Bleau M, Bouskila J (2021).** The Retina: A Window into the Brain. *Cells.* 10(12). DOI: 10.3390/cells10123269.
- [148] **Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong R O. L. (2014).** Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res.* 42():44–84. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.06.003.
- [149] **Hosoya K, Tachikawa M (2012).** The Inner Blood-Retinal Barrier. 763:85–104
Hosoya K, Tachikawa MThe Inner Blood-Retinal Barrier.
- [150] **Balda M S., Matter K (2009).** Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1788(4):761–767. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.11.024.
- [151] **Baden T, Euler T, Berens P (2020).** Understanding the retinal basis of vision across species. *Nat Rev Neurosci.* 21(1):5–20. DOI: 10.1038/s41583-019-0242-1.
- [152] **Sampath A P., Rieke F (2004).** Selective Transmission of Single Photon Responses by Saturation at the Rod-to-Rod Bipolar Synapse. *Neuron.* 41(3):431–443. DOI: 10.1016/S0896-6273(04)00005-4.
- [153] **Mashige K P., Oduntan O A. (2016).** A review of the human retina with emphasis on nerve fibre layer and macula thicknesses. *African Vision and Eye Health.* 75(1). DOI: 10.4102/aveh.v75i1.330.
- [154] **Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M (2010).** The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2010():190724. DOI: 10.1155/2010/190724.
- [155] **Boulton M, Dayhaw-Barker P (2001).** The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond).* 15(Pt 3):384–389. DOI: 10.1038/eye.2001.141.
- [156] **Bill A, Sperber G, Ujji K (1983).** Physiology of the choroidal vascular bed. *Int Ophthalmol.* 6(2):101–107. DOI: 10.1007/BF00127638.
- [157] **Nickla D L., Wallman J (2010).** The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res.* 29(2):144–168. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.12.002.
- [158] **Booij J C., Baas D C., Beisekeeva J, Gorgels T G. M. F., Bergen A A. B. (2010).** The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res.* 29(1):1–18. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.08.003.
- [159] **Curcio C A., Johnson M (2013).** Structure, Function, and Pathology of Bruch's Membrane:465–481
Curcio C A., Johnson MStructure, Function, and Pathology of Bruch's Membrane.
- [160] **Fields M A., Del Priore L V., Adelman R A., Rizzolo L J. (2020).** Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal-barrier. *Prog Retin Eye Res.* 76():100803. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.100803.
- [161] **ANDERSON B, SALTZMAN H A. (1964).** RETINAL OXYGEN UTILIZATION MEASURED BY HYPERBARIC BLACKOUT. *Arch Ophthalmol.* 72():792–795. DOI: 10.1001/archophth.1964.00970020794009.
- [162] **Ramrattan R S., van der Schaft T L., Mooy C M., Bruijn W C. de, Mulder P G., Jong P T. de (1994).** Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35(6):2857–2864.

- [163] . Félétou, Michel (2011). . 3The Endothelium, Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells -- Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators.
- [164] Galley H F., Webster N R. (2004). Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 93(1):105–113.
DOI: 10.1093/bja/ae163.
- [165] Campbell M, Humphries P (2012). The blood-retina barrier: tight junctions and barrier modulation. *Adv Exp Med Biol.* 763():70–84.
- [166] Tornavaca O, Chia M, Dufton N, Almagro L Osuna, Conway D E., Randi A M., Schwartz M A., Matter K, Balda M S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol.* 208(6):821–838.
DOI: 10.1083/jcb.201404140.
- [167] Duong C Nguyen, Vestweber D (2020). Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin. *Front Physiol.* 11():519.
DOI: 10.3389/fphys.2020.00519.
- [168] Stan R V. (2007). Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 11(4):621–643.
DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00075.x.
- [169] Pries A R., Kuebler W M. (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1):1–40.
DOI: 10.1007/3-540-32967-6_1.
- [170] Reitsma S, Slaaf D W., Vink H, van Zandvoort M A. M. J., oude Egbrink M G. A. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 454(3):345–359.
DOI: 10.1007/s00424-007-0212-8.
- [171] Yilmaz O, Afsar B, Ortiz A, Kanbay M (2019). The role of endothelial glycocalyx in health and disease. *Clin Kidney J.* 12(5):611–619.
DOI: 10.1093/ckj/sfz042.
- [172] Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386(6626):671–674.
DOI: 10.1038/386671a0.
- [173] Risau W, Flamme I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11():73–91.
DOI: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
- [174] Vailhé B, Vittet D, Feige J J. (2001). In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest.* 81(4):439–452.
DOI: 10.1038/labinvest.3780252.
- [175] Gerritsen M E. (2008). Angiogenesis:351–383Gerritsen M E.Angiogenesis.
- [176] Shibuya M (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 2(12):1097–1105.
DOI: 10.1177/1947601911423031.
- [177] Gupta K, Zhang J (2005). Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.* 81(954):236–242.
DOI: 10.1136/pgmj.2004.023309.
- [178] Folkman J (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1(1):27–31.
DOI: 10.1038/nm0195-27.
- [179] Gheorghe A, Mahdi L, Musat O (2015). AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *Rom J Ophthalmol.* 59(2):74–77.
- [180] Jeong H-S, Yun J-H, Lee D-H, Lee E Hui, Cho C-H (2019). Retinal pigment epithelium-derived transforming growth factor- β 2 inhibits the angiogenic response of endothelial cells by decreasing vascular endothelial growth factor receptor-2 expression. *J Cell Physiol.* 234(4):3837–3849.
DOI: 10.1002/jcp.27156.
- [181] Rizzolo L J. (1997). Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histol Histopathol.* 12(4):1057–1067.

- [182] **Lakkaraju A, Umapathy A, Tan L Xuan, Daniele L, Philp N J., Boesze-Battaglia K, Williams D S. (2020).** The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*():100846.
DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100846.
- [183] **Rizzolo L J. (2007).** Development and Role of Tight Junctions in the Retinal Pigment Epithelium. 258:195–234
Rizzolo L J. Development and Role of Tight Junctions in the Retinal Pigment Epithelium.
- [184] **Bharti K, Miller S S., Arnheiter H (2011).** The new paradigm: retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24(1):21–34.
DOI: 10.1111/j.1755-148X.2010.00772.x.
- [185] **Klimanskaya I (2006).** Retinal Pigment Epithelium. 418:169–194
Klimanskaya I Retinal Pigment Epithelium.
- [186] **Bailey T J., El-Hodiri H, Zhang L, Shah R, Mathers P H., Jamrich M (2004).** Regulation of vertebrate eye development by Rx genes. *Int J Dev Biol.* 48(8-9):761–770.
DOI: 10.1387/ijdb.041878tb.
- [187] **Fuhrmann S, Zou C, Levine E M. (2014).** Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis. *Exp Eye Res.* 123():141–150.
DOI: 10.1016/j.exer.2013.09.003.
- [188] **Strauss O (2005).** The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85(3):845–881.
DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.
- [189] **Molday R S., Moritz O L. (2015).** Photoreceptors at a glance. *J Cell Sci.* 128(22):4039–4045.
DOI: 10.1242/jcs.175687.
- [190] **Yang S, Zhou J, Li D (2021).** Functions and Diseases of the Retinal Pigment Epithelium. *Front Pharmacol.* 12():727870.
DOI: 10.3389/fphar.2021.727870.
- [191] **Herman K G., Steinberg R H. (1982).** Melanosome metabolism in the retinal pigmented epithelium of the opossum. *Cell Tissue Res.* 227(3):485–507.
DOI: 10.1007/BF00204780.
- [192] **Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M (2018).** An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front Neurosci.* 12():464.
DOI: 10.3389/fnins.2018.00464.
- [193] **Beatty S, Koh H-H, Phil M, Henson D, Boulton M (2000).** The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology.* 45(2):115–134.
DOI: 10.1016/S0039-6257(00)00140-5.
- [194] **Fain G L., Hardie R, Laughlin S B. (2010).** Phototransduction and the evolution of photoreceptors. *Curr Biol.* 20(3):R114-24.
DOI: 10.1016/j.cub.2009.12.006.
- [195] **Kwon W, Freeman S A. (2020).** Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium: Recognition, Resolution, Recycling. *Front Immunol.* 11():604205.
DOI: 10.3389/fimmu.2020.604205.
- [196] **Choi E H., Daruwalla A, Suh S, Leinonen H, Palczewski K (2021).** Retinoids in the visual cycle: role of the retinal G protein-coupled receptor. *J Lipid Res.* 62():100040.
DOI: 10.1194/jlr.TR120000850.
- [197] **Rizzolo L J., Peng S, Luo Y, Xiao W (2011).** Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 30(5):296–323.
DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.06.002.
- [198] **Naylor A, Hopkins A, Hudson N, Campbell M (2019).** Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier. *Int J Mol Sci.* 21(1).
DOI: 10.3390/ijms21010211.

- [199] **Miller S S., Steinberg R H. (1977).** Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 25(3):235–248.
DOI: 10.1016/0014-4835(77)90090-2.
- [200] **Dvoriashyna M, Foss A J. E., Gaffney E A., Repetto R (2020).** Fluid and solute transport across the retinal pigment epithelium: a theoretical model. *J R Soc Interface.* 17(163):20190735.
DOI: 10.1098/rsif.2019.0735.
- [201] **Rizzolo L J. (2008).** Glucose Transporters in Retinal Pigment Epithelium Development:185–199
Rizzolo L J. Glucose Transporters in Retinal Pigment Epithelium Development.
- [202] **He X, Cheng R, Benyajati S, Ma J (2015).** PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin Sci (Lond).* 128(11):805–823.
DOI: 10.1042/CS20130463.
- [203] **Dawson D W., Volpert O V., Gillis P, Crawford S E., Xu H, Benedict W, Bouck N P. (1999).** Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 285(5425):245–248.
DOI: 10.1126/science.285.5425.245.
- [204] **Geisen P, McColm J R., King B M., Hartnett M Elizabeth (2006).** Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture. *Current Eye Research.* 31(9):739–748.
DOI: 10.1080/02713680600837408.
- [205] **Xu H-Z, Le Y-Z (2011).** Significance of outer blood-retina barrier breakdown in diabetes and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(5):2160–2164.
DOI: 10.1167/iovs.10-6518.
- [206] **Matter K, Balda M S. (2003).** Functional analysis of tight junctions. *Methods.* 30(3):228–234.
DOI: 10.1016/S1046-2023(03)00029-X.
- [207] **O'Leary F, Campbell M (2021).** The blood-retina barrier in health and disease. *FEBS J()*.
DOI: 10.1111/febs.16330.
- [208] **Stevenson B R., Siliciano J D., Mooseker M S., Goodenough D A. (1986).** Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 103(3):755–766.
DOI: 10.1083/jcb.103.3.755.
- [209] **Dejana E (2004).** Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(4):261–270.
DOI: 10.1038/nrm1357.
- [210] **Gavard J (2014).** Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr.* 8(2):158–164.
DOI: 10.4161/cam.29026.
- [211] **Harris E S., Nelson W James (2010).** VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Current Opinion in Cell Biology.* 22(5):651–658.
DOI: 10.1016/j.ceb.2010.07.006.
- [212] **Vestweber D (2008).** VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(2):223–232.
DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.158014.
- [213] **Bazzoni G, Martinez-Estrada O M., Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E (2000).** Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem.* 275(27):20520–20526.
DOI: 10.1074/jbc.M905251199.
- [214] **Cummins P M. (2012).** Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol.* 32(2):242–250.
DOI: 10.1128/MCB.06029-11.
- [215] **Liao D, Sundlov J, Zhu J, Mei H, Hu Y, Newman D K., Newman P J. (2022).** Atomic Level Dissection of the Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1) Homophilic Binding Interface: Implications

- for Endothelial Cell Barrier Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 42(2):193–204.
DOI: 10.1161/ATVBAHA.121.316668.
- [216] **Natarajan S (2011).** Retinitis pigmentosa: a brief overview. *Indian J Ophthalmol.* 59(5):343–346.
DOI: 10.4103/0301-4738.83608.
- [217] **Piotter E, McClements M E., MacLaren R E. (2021).** Therapy Approaches for Stargardt Disease. *Biomolecules.* 11(8).
DOI: 10.3390/biom11081179.
- [218] **Ambati J, Fowler B J. (2012).** Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron.* 75(1):26–39.
DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.018.
- [219] **Blenkinsop T A., Salero E, Stern J H., Temple S (2013).** The culture and maintenance of functional retinal pigment epithelial monolayers from adult human eye. *Methods Mol Biol.* 945():45–65.
DOI: 10.1007/978-1-62703-125-7_4.
- [220] **Aoki H, Hara A, Nakagawa S, Motohashi T, Hirano M, Takahashi Y, Kunisada T (2006).** Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors in vitro develop into RPE cell monolayers in vivo. *Exp Eye Res.* 82(2):265–274.
DOI: 10.1016/j.exer.2005.06.021.
- [221] **Foltz L P., Clegg D O. (2017).** Rapid, Directed Differentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells from Human Embryonic or Induced Pluripotent Stem Cells. *J Vis Exp*(128).
DOI: 10.3791/56274.
- [222] **Rowland T J., Blaschke A J., Buchholz D E., Hikita S T., Johnson L V., Clegg D O. (2013).** Differentiation of human pluripotent stem cells to retinal pigmented epithelium in defined conditions using purified extracellular matrix proteins. *J Tissue Eng Regen Med.* 7(8):642–653.
DOI: 10.1002/term.1458.
- [223] **Chen L-J, Ito S, Kai H, Nagamine K, Nagai N, Nishizawa M, Abe T, Kaji H (2017).** Microfluidic co-cultures of retinal pigment epithelial cells and vascular endothelial cells to investigate choroidal angiogenesis. *Sci Rep.* 7(1):3538.
DOI: 10.1038/s41598-017-03788-5.
- [224] **Cabral de Guimaraes T Antonio, Daich Varela M, Georgiou M, Michaelides M (2022).** Treatments for dry age-related macular degeneration: therapeutic avenues, clinical trials and future directions. *Br J Ophthalmol.* 106(3):297–304.
DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-318452.
- [225] **Michalska-Matecka K, Kabiesz A, Nowak M, Śpiewak D (2015).** Age related macular degeneration – challenge for future: Pathogenesis and new perspectives for the treatment. *European Geriatric Medicine.* 6(1):69–75.
DOI: 10.1016/j.eurger.2014.09.007.
- [226] **Deng Y, Qiao L, Du M, Qu C, Wan L, Li J, Huang L (2022).** Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes & Diseases.* 9(1):62–79.
DOI: 10.1016/j.gendis.2021.02.009.
- [227] **Bowes Rickman C, Farsiu S, Toth C A., Klingeborn M (2013).** Dry age-related macular degeneration: mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(14):ORSF68-80.
DOI: 10.1167/iovs.13-12757.
- [228] **Hadziahmetovic M, Malek G (2020).** Age-Related Macular Degeneration Revisited: From Pathology and Cellular Stress to Potential Therapies. *Front Cell Dev Biol.* 8():612812.
DOI: 10.3389/fcell.2020.612812.
- [229] **Bird A C. (2010).** Therapeutic targets in age-related macular disease. *J Clin Invest.* 120(9):3033–3041.
DOI: 10.1172/JCI42437.
- [230] **Schlanitz F, Baumann B, Sacu S, Baumann L, Pircher M, Hitzenberger C K., Schmidt-Erfurth U Margarethe (2019).** Impact of drusen and drusenoid retinal pigment epithelium elevation size and structure on the integrity of the retinal pigment epithelium layer. *Br J Ophthalmol.* 103(2):227–232.
DOI: 10.1136/bjophthalmol-2017-311782.

- [231] **Somasundaran S, Constable I J., Mellough C B., Carvalho L S. (2020).** Retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration: A review of major disease mechanisms. *Clin Exp Ophthalmol.* 48(8):1043–1056.
DOI: 10.1111/ceo.13834.
- [232] **Fleckenstein M, Keenan T D. L., Guymer R H., Chakravarthy U, Schmitz-Valckenberg S, Klaver C C., Wong W T., Chew E Y. (2021).** Age-related macular degeneration. *Nat Rev Dis Primers.* 7(1):31.
DOI: 10.1038/s41572-021-00265-2.
- [233] **Dulull N K., Dias D A., Thrimawithana T R., Kwa F A. A. (2018).** L-Sulforaphane Confers Protection Against Oxidative Stress in an In Vitro Model of Age-Related Macular Degeneration. *Curr Mol Pharmacol.* 11(3):237–253.
DOI: 10.2174/1874467211666180125163009.
- [234] **Cai J, Nelson K C., Wu M, Sternberg P, Jones D P. (2000).** Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res.* 19(2):205–221.
DOI: 10.1016/S1350-9462(99)00009-9.
- [235] **Kim J, Lee Y Jin, Won J Yon (2021).** Molecular Mechanisms of Retinal Pigment Epithelium Dysfunction in Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci.* 22(22).
DOI: 10.3390/ijms222212298.
- [236] **Blasiak J, Petrovski G, Veréb Z, Facskó A, Kaarniranta K (2014).** Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed Res Int.* 2014():768026.
DOI: 10.1155/2014/768026.
- [237] **Mammadzada P, Corredoira P M., André H (2020).** The role of hypoxia-inducible factors in neovascular age-related macular degeneration: a gene therapy perspective. *Cell Mol Life Sci.* 77(5):819–833.
DOI: 10.1007/s00018-019-03422-9.
- [238] **Handa J T., Bowes Rickman C, Dick A D., Gorin M B., Miller J W., Toth C A., Ueffing M, Zarbin M, Farrer L A. (2019).** A systems biology approach towards understanding and treating non-neovascular age-related macular degeneration. *Nat Commun.* 10(1):3347.
DOI: 10.1038/s41467-019-11262-1.
- [239] **Holz F G., Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M (2014).** Recent developments in the treatment of age-related macular degeneration. *J Clin Invest.* 124(4):1430–1438.
DOI: 10.1172/JCI71029.
- [240] **Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L (2012).** Embryonic stem cell markers. *Molecules.* 17(6):6196–6236.
DOI: 10.3390/molecules17066196.
- [241] **Pan G Jin, Chang Z Yi, Schöler H R., Pei D (2002).** Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 12(5-6):321–329.
DOI: 10.1038/sj.cr.7290134.
- [242] **Wray J, Kalkan T, Smith A G. (2010).** The ground state of pluripotency. *Biochem Soc Trans.* 38(4):1027–1032.
DOI: 10.1042/BST0381027.
- [243] **Evans M J., Kaufman M H. (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292(5819):154–156.
DOI: 10.1038/292154a0.
- [244] . Klimanskaya, Irina (2006). . v. 418Embryonic stem cells. Elsevier Academic Press. 9780123736482.
- [245] **Burdon T, Smith A, Savatier P (2002).** Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology.* 12(9):432–438.
DOI: 10.1016/S0962-8924(02)02352-8.
- [246] **Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003).** Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell.* 113(5):643–655.
DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00392-1.

- [247] **Gawlik-Rzemieniewska N, Bednarek I (2016)**. The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 17(1):1–10.
DOI: 10.1080/15384047.2015.1121348.
- [248] **Zeineddine D, Hammoud A Abou, Mortada M, Boeuf H (2014)**. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells.* 3(2):74–82.
- [249] **Pesce M, Schöler H R. (2001)**. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells.* 19(4):271–278.
DOI: 10.1634/stemcells.19-4-271.
- [250] **Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003)**. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell.* 113(5):631–642.
DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00393-3.
- [251] **IzuMi M, Miyazawa H, Kamakura T, Yamaguchi I, Endo T, Hanaoka F (1991)**. Blastocidin S-resistance gene (bsr): A novel selectable marker for mammalian cells. *Experimental Cell Research.* 197(2):229–233.
DOI: 10.1016/0014-4827(91)90427-V.
- [252] **Im K, Mareninov S, Diaz M Fernando Palma, Yong W H. (2019)**. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 1897():299–311.
DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5_26.
- [253] **van Schaijik B, Davis P F., Wickremesekera A C., Tan S T., Itinteang T (2018)**. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *J Clin Pathol.* 71(1):88–91.
DOI: 10.1136/jclinpath-2017-204815.
- [254] **Mikulenkova E, Neradil J, Vymazal O, Skoda J, Veselska R (2020)**. NANOG/NANOGP8 Localizes at the Centrosome and is Spatiotemporally Associated with Centriole Maturation. *Cells.* 9(3).
DOI: 10.3390/cells9030692.
- [255] **Hambiliki F, Ström S, Zhang P, Stavreus-Evers A (2012)**. Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells. *J Assist Reprod Genet.* 29(10):1021–1028.
DOI: 10.1007/s10815-012-9824-9.
- [256] **Romito A, Cobellis G (2016)**. Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. *Stem Cells Int.* 2016():9451492.
DOI: 10.1155/2016/9451492.
- [257] **McKinnon K M. (2018)**. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 120():5.1.1-5.1.11.
DOI: 10.1002/cpim.40.
- [258] **Picot J, Guerin C L., van Kim C, Boulanger C M. (2012)**. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology.* 64(2):109–130.
DOI: 10.1007/s10616-011-9415-0.
- [259] **Renz H, Gierten B (2019)**. Durchflusszytometrie:735**Renz H, Gierten B**Durchflusszytometrie.
- [260] **Novo D, Wood J (2008)**. Flow cytometry histograms: transformations, resolution, and display. *Cytometry A.* 73(8):685–692.
DOI: 10.1002/cyto.a.20592.
- [261] **Pan G, Thomson J A. (2007)**. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 17(1):42–49.
DOI: 10.1038/sj.cr.7310125.
- [262] **Manso B A., Medina K L. (2021)**. Standardized flow-cytometry-based protocol to simultaneously measure transcription factor levels. *STAR Protoc.* 2(2):100485.
DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100485.
- [263] **Ouyang L, Yao R, Mao S, Chen X, Na J, Sun W (2015)**. Three-dimensional bioprinting of embryonic stem cells directs highly uniform embryoid body formation. *Biofabrication.* 7(4):44101.
DOI: 10.1088/1758-5090/7/4/044101.

- [264] **Flamier A, Singh S, Rasmussen T P. (2017).** A standardized human embryoid body platform for the detection and analysis of teratogens. *PLoS One*. 12(2):e0171101.
DOI: 10.1371/journal.pone.0171101.
- [265] **Shang P, Stepicheva N A., Hose S, Zigler J Samuel, Sinha D (2018).** Primary Cell Cultures from the Mouse Retinal Pigment Epithelium. *J Vis Exp*(133).
DOI: 10.3791/56997.
- [266] **Fernandez-Godino R, Garland D L., Pierce E A. (2016).** Isolation, culture and characterization of primary mouse RPE cells. *Nat Protoc*. 11(7):1206–1218.
DOI: 10.1038/nprot.2016.065.
- [267] **Hellinen L, Pirskanen L, Tengvall-Unadike U, Urtti A, Reinisalo M (2019).** Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Fast Differentiation and Improved Barrier Properties. *Pharmaceutics*. 11(8).
DOI: 10.3390/pharmaceutics11080412.
- [268] **Dunn K C., Aotaki-Keen A E., Putkey F R., Hjelmeland L M. (1996).** ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. 62(2):155–169.
DOI: 10.1006/exer.1996.0020.
- [269] **Haruta M (2005).** Embryonic stem cells: potential source for ocular repair. *Semin Ophthalmol*. 20(1):17–23.
DOI: 10.1080/08820530590921846.
- [270] **Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, Amemiya K, Ooto S, Kitada M, Suemori H, Nakatsuji N, Ide C, Honda Y, Takahashi M (2004).** In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45(3):1020–1025.
DOI: 10.1167/iovs.03-1034.
- [271] **Lund R D., Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, Girman S, Bischoff N, Sauv e Y, Lanza R (2006).** Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells*. 8(3):189–199.
DOI: 10.1089/clo.2006.8.189.
- [272] **Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, Khaner H, Smith Y, Wisner O, Gropp M, Cohen M A., Even-Ram S, Berman-Zaken Y, Matzrafi L, Rechavi G, Banin E, Reubinoff B (2009).** Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell*. 5(4):396–408.
DOI: 10.1016/j.stem.2009.07.002.
- [273] **Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S-I, Nakatsuji N, Sasai Y (2002).** Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(3):1580–1585.
DOI: 10.1073/pnas.032662199.
- [274] **Klimanskaya I, Hipp J, Rezai K A., West M, Atala A, Lanza R (2004).** Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells*. 6(3):217–245.
DOI: 10.1089/clo.2004.6.217.
- [275] **Llames S, Garc a-P erez E, Meana  , Larcher F, del R o M (2015).** Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 21(4):345–353.
DOI: 10.1089/ten.TEB.2014.0547.
- [276] **Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y (2011).** Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*. 472(7341):51–56.
DOI: 10.1038/nature09941.
- [277] **Agarwal C, Chandraratna R A., Johnson A T., Rorke E A., Eckert R L. (1996).** AGN193109 is a highly effective antagonist of retinoid action in human ectocervical epithelial cells. *J Biol Chem*. 271(21):12209–12212.
DOI: 10.1074/jbc.271.21.12209.

- [278] **Zhu Y, Carido M, Meinhardt A, Kurth T, Karl M O., Ader M, Tanaka E M. (2013).** Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One*. 8(1):e54552.
DOI: 10.1371/journal.pone.0054552.
- [279] **Wagstaff P E., Asbroek A L. M. A. ten, Brink J B. ten, Jansonius N M., Bergen A A. B. (2021).** An alternative approach to produce versatile retinal organoids with accelerated ganglion cell development. *Sci Rep*. 11(1):1101.
DOI: 10.1038/s41598-020-79651-x.
- [280] **Wagstaff P E., Heredero Berzal A, Boon C J. F., Quinn P M. J., Asbroek A L. M. A. ten, Bergen A A. (2021).** The Role of Small Molecules and Their Effect on the Molecular Mechanisms of Early Retinal Organoid Development. *Int J Mol Sci*. 22(13).
DOI: 10.3390/ijms22137081.
- [281] **Leach L L., Buchholz D E., Nadar V P., Lowenstein S E., Clegg D O. (2015).** Canonical/ β -catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 56(2):1002–1013.
DOI: 10.1167/iovs.14-15835.
- [282] **Modi S J., Kulkarni V M. (2019).** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Medicine in Drug Discovery*. 2():100009.
DOI: 10.1016/j.medidd.2019.100009.
- [283] **Dai S, Zhou Z, Chen Z, Xu G, Chen Y (2019).** Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs): Structures and Small Molecule Inhibitors. *Cells*. 8(6).
DOI: 10.3390/cells8060614.
- [284] **Hallam D, Hilgen G, Dorgau B, Zhu L, Yu M, Bojic S, Hewitt P, Schmitt M, Uteng M, Kustermann S, Steel D, Nicholds M, Thomas R, Treumann A, Porter A, Sernagor E, Armstrong L, Lako M (2018).** Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generate Light Responsive Retinal Organoids with Variable and Nutrient-Dependent Efficiency. *Stem Cells*. 36(10):1535–1551.
DOI: 10.1002/stem.2883.
- [285] **Osakada F, Jin Z-B, Hirami Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takahashi M (2009).** In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci*. 122(Pt 17):3169–3179.
DOI: 10.1242/jcs.050393.
- [286] **Emre N, Vidal J G., Elia J, O'Connor E D., Paramban R I., Hefferan M P., Navarro R, Goldberg D S., Varki N M., Marsala M, Carson C T. (2010).** The ROCK inhibitor Y-27632 improves recovery of human embryonic stem cells after fluorescence-activated cell sorting with multiple cell surface markers. *PLoS One*. 5(8):e12148.
DOI: 10.1371/journal.pone.0012148.
- [287] **Lai T-Y, Cao J, Ou-Yang P, Tsai C-Y, Lin C-W, Chen C-C, Tsai M-K, Lee C-Y (2022).** Different methods of detaching adherent cells and their effects on the cell surface expression of Fas receptor and Fas ligand. *Sci Rep*. 12(1):5713.
DOI: 10.1038/s41598-022-09605-y.
- [288] **Voaden M J., Lake N, Marshall J, Morjaria B (1977).** Studies on the distribution of taurine and other neuroactive amino acids in the retina. *Exp Eye Res*. 25(3):249–257.
DOI: 10.1016/0014-4835(77)90091-4.
- [289] **Bridges C C., Ola M S., Prasad P D., El-Sherbeny A, Ganapathy V, Smith S B. (2001).** Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281(6):C1825-36.
DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.6.C1825.
- [290] **Takeda M, Kakegawa T, Suzuki M (1996).** Effect of thyroidectomy on photoreceptor cells in adult rat retina. *Life Sciences*. 58(7):631–637.
DOI: 10.1016/0024-3205(95)02331-3.

- [291] **Duncan K G., Bailey K R., Baxter J D., Schwartz D M. (1999).** The human fetal retinal pigment epithelium: A target tissue for thyroid hormones. *Ophthalmic Res.* 31(6):399–406.
DOI: 10.1159/000055564.
- [292] **Takagi M, Ueda K (1994).** Comparison of the optimal culture conditions for cell growth and tissue plasminogen activator production by human embryo lung cells on microcarriers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41(5):565–570.
DOI: 10.1007/BF00178490.
- [293] **Watanabe I, Okada S (1967).** Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y). *J Cell Biol.* 32(2):309–323.
DOI: 10.1083/jcb.32.2.309.
- [294] **Michl J, Park K Chan, Swietach P (2019).** Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Commun Biol.* 2():144.
DOI: 10.1038/s42003-019-0393-7.
- [295] **Place T L., Domann F E., Case A J. (2017).** Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med.* 113():311–322.
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003.
- [296] **Segeritz C-P, Vallier L (2016).** Cell Culture:151–172
Segeritz C-P, Vallier L Cell Culture.
- [297] **Arora M (2013).** Cell Culture Media: A Review. *MATER METHODS.* 3().
DOI: 10.13070/mm.en.3.175.
- [298] **van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks W G., Fu J, Hickman J J., Hohensee C, Kolar R, Liebsch M, Pistollato F, Schulz M, Thieme D, Weber T, Wiest J, Winkler S, Gstraunthaler G (2018).** Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX.* 35(1):99–118.
DOI: 10.14573/altex.1705101.
- [299] **van der Valk J (2022).** Fetal bovine serum-a cell culture dilemma. *Science.* 375(6577):143–144.
DOI: 10.1126/science.abm1317.
- [300] **Akimoto M, Cheng H, Zhu D, Brzezinski J A., Khanna R, Filippova E, Oh E C. T., Jing Y, Linares J-L, Brooks M, Zarepari S, Mears A J., Hero A, Glaser T, Swaroop A (2006).** Targeting of GFP to newborn rods by Nr1 promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(10):3890–3895.
DOI: 10.1073/pnas.0508214103.
- [301] **van der Sanden B, Dhobb M, Berger F, Wion D (2010).** Optimizing stem cell culture. *J Cell Biochem.* 111(4):801–807.
DOI: 10.1002/jcb.22847.
- [302] **Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj J Durairaj, Rajagopalan K, Yesudhasan B Vedha, Venkatachalam S, Mohan M, Chellathurai Vasantha N, Selvan Christyraj J Retnaraj Samuel (2021).** Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon.* 7(8):e07686.
DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07686.
- [303] **Kozłowski M T., Crook C J., Ku H Teresa (2021).** Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol.* 4(1):1387.
DOI: 10.1038/s42003-021-02910-8.
- [304] **Hofer M, Lutolf M P. (2021).** Engineering organoids. *Nat Rev Mater.* 6(5):402–420.
DOI: 10.1038/s41578-021-00279-y.
- [305] **Kim J, Koo B-K, Knoblich J A. (2020).** Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21(10):571–584.
DOI: 10.1038/s41580-020-0259-3.
- [306] **Yin X, Mead B E., Safaee H, Langer R, Karp J M., Levy O (2016).** Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell.* 18(1):25–38.
DOI: 10.1016/j.stem.2015.12.005.

- [307] **Banerjee M, Bhonde R R. (2006).** Application of hanging drop technique for stem cell differentiation and cytotoxicity studies. *Cytotechnology*. 51(1):1–5.
DOI: 10.1007/s10616-006-9001-z.
- [308] **Lee S, Chang J, Kang S-M, Parigoris E, Lee J-H, Huh Y Suk, Takayama S (2022).** High-throughput formation and image-based analysis of basal-in mammary organoids in 384-well plates. *Sci Rep*. 12(1):317.
DOI: 10.1038/s41598-021-03739-1.
- [309] **Tehranirokh M, Kouzani A Z., Francis P S., Kanwar J R. (2013).** Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. *Biomicrofluidics*. 7(5):51502.
DOI: 10.1063/1.4826935.
- [310] **Lombello C B., Malmonge S M., Wada M L. (2000).** PolyHEMA and polyHEMA-poly(MMA-co-AA) as substrates for culturing Vero cells. *J Mater Sci Mater Med*. 11(9):541–546.
DOI: 10.1023/a:1008915801187.
- [311] **Zare M, Bigham A, Zare M, Luo H, Rezvani Ghomi E, Ramakrishna S (2021).** pHEMA: An Overview for Biomedical Applications. *Int J Mol Sci*. 22(12).
DOI: 10.3390/ijms22126376.
- [312] **Lawrenson K, Grun B, Gayther S A. (2012).** Heterotypic three-dimensional in vitro modeling of stromal-epithelial interactions during ovarian cancer initiation and progression. *J Vis Exp*(66):e4206.
DOI: 10.3791/4206.
- [313] **Han H-W, Asano S, Hsu S (2019).** Cellular Spheroids of Mesenchymal Stem Cells and Their Perspectives in Future Healthcare. *Applied Sciences*. 9(4):627.
DOI: 10.3390/app9040627.
- [314] **Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, Mizuseki K, Haraguchi T, Miyoshi H, Kamiya D, Honda Y, Sasai N, Yoshimura N, Takahashi M, Sasai Y (2005).** Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(32):11331–11336.
DOI: 10.1073/pnas.0500010102.
- [315] **Martinez-De Luna R I., Kelly L E., El-Hodiri H M. (2011).** The Retinal Homeobox (Rx) gene is necessary for retinal regeneration. *Dev Biol*. 353(1):10–18.
DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.02.008.
- [316] **Rodgers H M., Huffman V J., Voronina V A., Lewandoski M, Mathers P H. (2018).** The role of the Rx homeobox gene in retinal progenitor proliferation and cell fate specification. *Mech Dev*. 151():18–29.
DOI: 10.1016/j.mod.2018.04.003.
- [317] **Barondeau D P., Putnam C D., Kassmann C J., Tainer J A., Getzoff E D. (2003).** Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(21):12111–12116.
DOI: 10.1073/pnas.2133463100.
- [318] **Mathers P H., Grinberg A, Mahon K A., Jamrich M (1997).** The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature*. 387(6633):603–607.
DOI: 10.1038/42475.
- [319] **Mullassery D, Horton C A., Wood C D., White M R. H. (2008).** Single live-cell imaging for systems biology. *Essays Biochem*. 45():121–133.
DOI: 10.1042/BSE0450121.
- [320] **Aisenbrey E A., Murphy W L. (2020).** Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater*. 5(7):539–551.
DOI: 10.1038/s41578-020-0199-8.
- [321] **Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M (2009).** Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc*. 4(6):811–824.
DOI: 10.1038/nprot.2009.51.
- [322] **Kleinman H K., Kim K, Kang H (2018).** Matrigel uses in cell biology and for the identification of thymosin β 4, a mediator of tissue regeneration. *Appl Biol Chem*. 61(6):703–708.
DOI: 10.1007/s13765-018-0400-6.

- [323] **Martínez-Morales J Ramón, Rodrigo I, Bovolenta P (2004)**. Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays*. 26(7):766–777.
DOI: 10.1002/bies.20064.
- [324] **Chow R L., Lang R A. (2001)**. Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17():255–296.
DOI: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.255.
- [325] **DiStefano T, Chen H Yu, Panebianco C, Kaya K Dogan, Brooks M J., Gieser L, Morgan N Y., Pohida T, Swaroop A (2018)**. Accelerated and Improved Differentiation of Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells in Rotating-Wall Vessel Bioreactors. *Stem Cell Reports*. 10(1):300–313.
DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.11.001.
- [326] **Bruning J W., Kardol M J., Arentzen R (1980)**. Carboxyfluorescein fluorochromasia assays. I. Non-radio actively labeled cell mediated lympholysis. *Journal of Immunological Methods*. 33(1):33–44.
DOI: 10.1016/0022-1759(80)90080-0.
- [327] **Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J (2005)**. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*. 66(1):78–84.
DOI: 10.1002/cyto.a.20152.
- [328] **Rotman B, Papermaster B W. (1966)**. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 55(1):134–141.
DOI: 10.1073/pnas.55.1.134.
- [329] **Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A (2001)**. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8(6):1131–1135.
DOI: 10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001.
- [330] **Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola G C. (1998)**. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J Histochem Cytochem*. 46(8):895–900.
DOI: 10.1177/002215549804600804.
- [331] **Crowley L C., Scott A P., Marfell B J., Boughaba J A., Chojnowski G, Waterhouse N J. (2016)**. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016(7).
DOI: 10.1101/pdb.prot087163.
- [332] **Jones K H., Senft J A. (1985)**. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem*. 33(1):77–79.
DOI: 10.1177/33.1.2578146.
- [333] **Choe M Seog, Kim S Jin, Oh S Taek, Bae C Min, Choi W-Y, Baek K Min, Kim J Sun, Lee M Young (2021)**. A simple method to improve the quality and yield of human pluripotent stem cell-derived cerebral organoids. *Heliyon*. 7(6):e07350.
DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07350.
- [334] **Grebenyuk S, Ranga A (2019)**. Engineering Organoid Vascularization. *Front Bioeng Biotechnol*. 7():39.
DOI: 10.3389/fbioe.2019.00039.
- [335] **Kuroda T, Ando S, Takeno Y, Kishino A, Kimura T (2019)**. Robust induction of retinal pigment epithelium cells from human induced pluripotent stem cells by inhibiting FGF/MAPK signaling. *Stem Cell Research*. 39():101514.
DOI: 10.1016/j.scr.2019.101514.
- [336] **Stern J, Temple S (2015)**. Retinal pigment epithelial cell proliferation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 240(8):1079–1086.
DOI: 10.1177/1535370215587530.
- [337] **Kim K S., Tezel T H., Del Priore L V. (1998)**. Minimum number of adult human retinal pigment epithelial cells required to establish a confluent monolayer in vitro. *Current Eye Research*. 17(10):962–969.
DOI: 10.1076/ceyr.17.10.962.5243.

- [338] **Grierson I, Hiscott P, Hogg P, Robey H, Mazure A, Larkin G (1994).** Development, repair and regeneration of the retinal pigment epithelium. *Eye (Lond)*. 8 (Pt 2):255–262.
DOI: 10.1038/eye.1994.54.
- [339] **Fronk A H., Vargis E (2016).** Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations. *J Tissue Eng*. 7():2041731416650838.
DOI: 10.1177/2041731416650838.
- [340] **Cao S, Walker G B., Wang X, Cui J Z., Matsubara J A. (2013).** Altered cytokine profiles of human retinal pigment epithelium: oxidant injury and replicative senescence. *Mol Vis*. 19():718–728.
- [341] **Sparrow J R., Hicks D, Hamel C P. (2010).** The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*. 10(9):802–823.
DOI: 10.2174/156652410793937813.
- [342] **Murali A, Krishnakumar S, Subramanian A, Parameswaran S (2020).** Bruch's membrane pathology: A mechanistic perspective. *Eur J Ophthalmol*. 30(6):1195–1206.
DOI: 10.1177/1120672120919337.
- [343] **Lai J-Y, Li Y-T, Wang T-P (2010).** In vitro response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers. *Int J Mol Sci*. 11(12):5256–5272.
DOI: 10.3390/ijms11125256.
- [344] **Jones S (2004).** An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol*. 5(6):226.
DOI: 10.1186/gb-2004-5-6-226.
- [345] **Goding C R. (2000).** Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*. 14(14):1712–1728.
- [346] **Ma X, Li H, Chen Y, Yang J, Chen H, Arnheiter H, Hou L (2019).** The transcription factor MITF in RPE function and dysfunction. *Prog Retin Eye Res*. 73():100766.
DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.06.002.
- [347] **Husset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Béby F, Billon N, Lamonerie T (2013).** Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. *J Neurosci*. 33(24):9890–9904.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1099-13.2013.
- [348] **Simeone A, Puelles E, Acampora D (2002).** The Otx family. *Current Opinion in Genetics & Development*. 12(4):409–415.
DOI: 10.1016/S0959-437X(02)00318-0.
- [349] **Bovolenta P, Mallamaci A, Briata P, Corte G, Boncinelli E (1997).** Implication of OTX2 in pigment epithelium determination and neural retina differentiation. *J Neurosci*. 17(11):4243–4252.
- [350] **Liao J-L, Yu J, Huang K, Hu J, Diemer T, Ma Z, Dvash T, Yang X-J, Travis G H., Williams D S., Bok D, Fan G (2010).** Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Hum Mol Genet*. 19(21):4229–4238.
DOI: 10.1093/hmg/ddq341.
- [351] **Martínez-Morales J Ramón, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P, Saule S (2003).** OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J Biol Chem*. 278(24):21721–21731.
DOI: 10.1074/jbc.M301708200.
- [352] **Verma A S., Fitzpatrick D R. (2007).** Anophthalmia and microphthalmia. *Orphanet J Rare Dis*. 2():47.
DOI: 10.1186/1750-1172-2-47.
- [353] **Grindley J C., Davidson D R., Hill R E. (1995).** The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development*. 121(5):1433–1442.
DOI: 10.1242/dev.121.5.1433.
- [354] **Bäumer N, Marquardt T, Stoykova A, Spieler D, Treichel D, Ashery-Padan R, Gruss P (2003).** Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development*. 130(13):2903–2915.
DOI: 10.1242/dev.00450.

- [355] **Thompson D A., Gal A (2003).** Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res.* 22(5):683–703.
DOI: 10.1016/S1350-9462(03)00051-X.
- [356] **Cai X, Conley S M., Naash M I. (2009).** RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genet.* 30(2):57–62.
DOI: 10.1080/13816810802626399.
- [357] **Huang J, Possin D E., Saari J C. (2009).** Localizations of visual cycle components in retinal pigment epithelium. *Mol Vis.* 15():223–234.
- [358] **Kiser P D. (2021).** Retinal pigment epithelium 65 kDa protein (RPE65): An update. *Prog Retin Eye Res()*:101013.
DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.101013.
- [359] **Obert E, Strauss R, Brandon C, Grek C, Ghatnekar G, Gourdie R, Rohrer B (2017).** Targeting the tight junction protein, zonula occludens-1, with the connexin43 mimetic peptide, α CT1, reduces VEGF-dependent RPE pathophysiology. *J Mol Med (Berl).* 95(5):535–552.
DOI: 10.1007/s00109-017-1506-8.
- [360] **Georgiadis A, Tschernutter M, Bainbridge J W. B., Balaggan K S., Mowat F, West E L., Munro P M. G., Thrasher A J., Matter K, Balda M S., Ali R R. (2010).** The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice. *PLoS One.* 5(12):e15730.
DOI: 10.1371/journal.pone.0015730.
- [361] **Planque N, Leconte L, Coquelle F M., Martin P, Saule S (2001).** Specific Pax-6/microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins. *J Biol Chem.* 276(31):29330–29337.
DOI: 10.1074/jbc.M101812200.
- [362] **Hamel C P., Tsilou E, Pfeiffer B A., Hooks J J., Detrick B, Redmond T M. (1993).** Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J Biol Chem.* 268(21):15751–15757.
- [363] **Chae J-B, Jang H, Son C, Park C-W, Choi H, Jin S, Lee H-Y, Lee H, Ryu J-H, Kim N, Kim C, Chung H (2021).** Targeting senescent retinal pigment epithelial cells facilitates retinal regeneration in mouse models of age-related macular degeneration. *Geroscience.* 43(6):2809–2833.
DOI: 10.1007/s11357-021-00457-4.
- [364] **Finnemann S C., Nandrot E F. (2006).** MerTK activation during RPE phagocytosis in vivo requires α v β 5 integrin. *Adv Exp Med Biol.* 572():499–503.
DOI: 10.1007/0-387-32442-9_69.
- [365] **Edwards R B., Szamier R B. (1977).** Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science.* 197(4307):1001–1003.
DOI: 10.1126/science.560718.
- [366] **Gal A, Li Y, Thompson D A., Weir J, Orth U, Jacobson S G., Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D (2000).** Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 26(3):270–271.
DOI: 10.1038/81555.
- [367] **Subramanian P, Notario P M., Becerra S Patricia (2010).** Pigment epithelium-derived factor receptor (PEDF-R): a plasma membrane-linked phospholipase with PEDF binding affinity. *Adv Exp Med Biol.* 664():29–37.
DOI: 10.1007/978-1-4419-1399-9_4.
- [368] **Wang X, Liu X, Ren Y, Liu Y, Han S, Zhao J, Gou X, He Y (2019).** PEDF protects human retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via upregulation of UCP2 expression. *Mol Med Rep.* 19(1):59–74.
DOI: 10.3892/mmr.2018.9645.
- [369] **Bharti K, Liu W, Csermely T, Bertuzzi S, Arnheiter H (2008).** Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Development.* 135(6):1169–1178.
DOI: 10.1242/dev.014142.

- [370] **Bora N, Conway S J., Liang H, Smith S B. (1998).** Transient overexpression of the Microphthalmia gene in the eyes of Microphthalmia vitiligo mutant mice. *Dev Dyn.* 213(3):283–292.
DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199811)213:3<283::AID-AJA5>3.0.CO;2-H.
- [371] **Baas D, Bumsted K, Martinez J, Vaccarino F, Wikler K, Barnstable C (2000).** The subcellular localization of OTX2 is cell-type specific and developmentally regulated in the mouse retina. *Molecular Brain Research.* 78(1-2):26–37.
DOI: 10.1016/S0169-328X(00)00060-7.
- [372] **Chhablani J, Wong I Y., Kozak I (2014).** Choroidal imaging: A review. *Saudi J Ophthalmol.* 28(2):123–128.
DOI: 10.1016/j.sjopt.2014.03.004.
- [373] **Liddelow S A. (2015).** Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Front Neurosci.* 9():32.
DOI: 10.3389/fnins.2015.00032.
- [374] **Cunha-Vaz J G. (1976).** The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol.* 41(2):287–327.
DOI: 10.1007/BF00146764.
- [375] **Krüger-Genge A, Blocki A, Franke R-P, Jung F (2019).** Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 20(18).
DOI: 10.3390/ijms20184411.
- [376] **Nachman R L., Jaffe E A. (2004).** Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest.* 114(8):1037–1040.
DOI: 10.1172/JCI23284.
- [377] **Seigel G M. (1999).** The golden age of retinal cell culture. *Mol Vis.* 5():4.
- [378] **Geraghty R J., Capes-Davis A, Davis J M., Downward J, Freshney R I., Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters J R. W., Meredith J, Stacey G N., Thraves P, Vias M (2014).** Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer.* 111(6):1021–1046.
DOI: 10.1038/bjc.2014.166.
- [379] **Shay J W., Wright W E. (2000).** Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):72–76.
DOI: 10.1038/35036093.
- [380] **Liberio M S., Sadowski M C., Soekmadji C, Davis R A., Nelson C C. (2014).** Differential effects of tissue culture coating substrates on prostate cancer cell adherence, morphology and behavior. *PLoS One.* 9(11):e112122.
DOI: 10.1371/journal.pone.0112122.
- [381] **Paulsson M (1992).** The role of laminin in attachment, growth, and differentiation of cultured cells: a brief review. *Cytotechnology.* 9(1-3):99–106.
DOI: 10.1007/BF02521736.
- [382] **Ingber D E. (1990).** Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(9):3579–3583.
DOI: 10.1073/pnas.87.9.3579.
- [383] **Fratzl P (2008).** Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction:1–13 **Fratzl P** Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction.
- [384] **Bershadsky A D., Balaban N Q., Geiger B (2003).** Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19():677–695.
DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153011.
- [385] **Zhang Y, He Y, Bharadwaj S, Hammam N, Carnagey K, Myers R, Atala A, van Dyke M (2009).** Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials.* 30(23-24):4021–4028.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.005.
- [386] **Chung H H., Mireles M, Kwartá B J., Gaborski T R. (2018).** Use of porous membranes in tissue barrier and co-culture models. *Lab Chip.* 18(12):1671–1689.
DOI: 10.1039/c7lc01248a.

- [387] **Dewez J-L, Deren A, Rouxhet P G., Schneider Y-J, Legras R (1991).** Surface study of polycarbonate membranes used as a substratum for animal cell culture. *Surf. Interface Anal.* 17(7):499–502.
DOI: 10.1002/sia.740170715.
- [388] **Kular J K., Basu S, Sharma R I. (2014).** The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng.* 5():2041731414557112.
DOI: 10.1177/2041731414557112.
- [389] **Edwards M M., Lefebvre O (2013).** Laminins and retinal vascular development. *Cell Adh Migr.* 7(1):82–89.
DOI: 10.4161/cam.22480.
- [390] **McIntosh L C., Muckersie L, Forrester J V. (1988).** Retinal capillary endothelial cells prefer different substrates for growth and migration. *Tissue and Cell.* 20(2):193–209.
DOI: 10.1016/0040-8166(88)90041-9.
- [391] **Sgarioto M, Vigneron P, Patterson J, Malherbe F, Nagel M-D, Egles C (2012).** Collagen type I together with fibronectin provide a better support for endothelialization. *C R Biol.* 335(8):520–528.
DOI: 10.1016/j.crvi.2012.07.003.
- [392] **Rozario T, DeSimone D W. (2010).** The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 341(1):126–140.
DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
- [393] **FELDINGHABERMANN B, CHERESH D (1993).** Vitronectin and its receptors. *Current Opinion in Cell Biology.* 5(5):864–868.
DOI: 10.1016/0955-0674(93)90036-P.
- [394] **Relou I A.M., Damen C A., van der Schaft D W.J., Groenewegen G, Griffioen A W. (1998).** Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. *Tissue and Cell.* 30(5):525–530.
DOI: 10.1016/S0040-8166(98)80032-3.
- [395] **Bello A Bacero, Kim D, Kim D, Park H, Lee S-H (2020).** Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 26(2):164–180.
DOI: 10.1089/ten.TEB.2019.0256.
- [396] **Krüger-Genge A, Hauser S, Neffe A T., Liu Y, Lendlein A, Pietzsch J, Jung F (2021).** Response of Endothelial Cells to Gelatin-Based Hydrogels. *ACS Biomater Sci Eng.* 7(2):527–540.
DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c01432.
- [397] **Rahimi N (2017).** Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function. *Front Immunol.* 8():1847.
DOI: 10.3389/fimmu.2017.01847.
- [398] **Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman P J. (2016).** Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 23(3):253–259.
DOI: 10.1097/MOH.0000000000000239.
- [399] **Sobers C J., Wood S E., Mrksich M (2015).** A gene expression-based comparison of cell adhesion to extracellular matrix and RGD-terminated monolayers. *Biomaterials.* 52():385–394.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.045.
- [400] **Di Russo J, Luik A-L, Yousif L, Budny S, Oberleithner H, Hofschröder V, Klingauf J, van Bavel E, Bakker E Ntp, Hellstrand P, Bhattachariya A, Albinsson S, Pincet F, Hallmann R, Sorokin L M. (2017).** Endothelial basement membrane laminin 511 is essential for shear stress response. *EMBO J.* 36(2):183–201.
DOI: 10.15252/embj.201694756.
- [401] **Schlosshauer B (2007).** Blood–Retina Barriers:486–506Schlosshauer B Blood–Retina Barriers.
- [402] **Vis M A. M., Ito K, Hofmann S (2020).** Impact of Culture Medium on Cellular Interactions in in vitro Co-culture Systems. *Front Bioeng Biotechnol.* 8():911.
DOI: 10.3389/fbioe.2020.00911.
- [403] **Browning A C., Halligan E P., Stewart E A., Swan D C., Dove R, Samaranayake G J., Amoaku W M. (2012).** Comparative gene expression profiling of human umbilical vein endothelial cells and ocular

- vascular endothelial cells. *Br J Ophthalmol*. 96(1):128–132.
DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300572.
- [404] **Chen L-J, Raut B, Nagai N, Abe T, Kaji H (2020)**. Prototyping a Versatile Two-Layer Multi-Channel Microfluidic Device for Direct-Contact Cell-Vessel Co-Culture. *Micromachines (Basel)*. 11(1).
DOI: 10.3390/mi11010079.
- [405] **Kumar R, Harris-Hooker S, Kumar R, Sanford G (2011)**. Co-culture of Retinal and Endothelial Cells Results in the Modulation of Genes Critical to Retinal Neovascularization. *Vasc Cell*. 3():27.
DOI: 10.1186/2045-824X-3-27.
- [406] **Skottman H, Muranen J, Lähdekorpi H, Pajula E, Mäkelä K, Koivusalo L, Koistinen A, Uusitalo H, Kaarniranta K, Juuti-Uusitalo K (2017)**. Contacting co-culture of human retinal microvascular endothelial cells alters barrier function of human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelial cells. *Experimental Cell Research*. 359(1):101–111.
DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.08.004.
- [407] **Busch C, Rehak M, Hollborn M, Wiedemann P, Lang G K., Lang G E., Wolf A, Deissler H L. (2021)**. Type of culture medium determines properties of cultivated retinal endothelial cells: induction of substantial phenotypic conversion by standard DMEM. *Heliyon*. 7(1):e06037.
DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06037.
- [408] **Hamilton R D., Foss A J., Leach L (2007)**. Establishment of a human in vitro model of the outer blood-retinal barrier. *J Anat*. 211(6):707–716.
DOI: 10.1111/j.1469-7580.2007.00812.x.
- [409] **Frost T S., Jiang L, Lynch R M., Zohar Y (2019)**. Permeability of Epithelial/Endothelial Barriers in Transwells and Microfluidic Bilayer Devices. *Micromachines (Basel)*. 10(8).
DOI: 10.3390/mi10080533.
- [410] **Miyazaki K, Hashimoto K, Sato M, Watanabe M, Tomikawa N, Kanno S, Kawasaki Y, Momoi N, Hosoya M (2017)**. Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF- α in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy. *Pediatr Res*. 81(6):942–947.
DOI: 10.1038/pr.2017.28.
- [411] **Neely W Brock (1960)**. Dextran: Structure and Synthesis. 15:341–369
Neely W BrockDextran: Structure and Synthesis.
- [412] **Bednarek R (2022)**. In Vitro Methods for Measuring the Permeability of Cell Monolayers. *Methods Protoc*. 5(1).
DOI: 10.3390/mps5010017.
- [413] **Weksler B, Romero I A., Couraud P-O (2013)**. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 10(1):16.
DOI: 10.1186/2045-8118-10-16.
- [414] **Sarrigiannidis S O., Rey J M., Dobre O, González-García C, Dalby M J., Salmeron-Sanchez M (2021)**. A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. *Mater Today Bio*. 10():100098.
DOI: 10.1016/j.mtbio.2021.100098.
- [415] **Matsukawa Y, Lee V H., Crandall E D., Kim K J. (1997)**. Size-dependent dextran transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J Pharm Sci*. 86(3):305–309.
DOI: 10.1021/js960352x.
- [416] **Benson K, Cramer S, Galla H-J (2013)**. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS*. 10(1):5.
DOI: 10.1186/2045-8118-10-5.
- [417] **Srinivasan B, Kolli A Reddy, Esch M Brigitte, Abaci H Erbil, Shuler M L., Hickman J J. (2015)**. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*. 20(2):107–126.
DOI: 10.1177/2211068214561025.

- [418] **Robinson B Darnell, Shaji C Anasooya, Lomas A, Tharakan B (2018)**. Measurement of Microvascular Endothelial Barrier Dysfunction and Hyperpermeability In Vitro. *Methods Mol Biol.* 1717():237–242. DOI: 10.1007/978-1-4939-7526-6_19.
- [419] **Watson P Marc D., Paterson J C., Thom G, Ginman U, Lundquist S, Webster C I. (2013)**. Modelling the endothelial blood-CNS barriers: a method for the production of robust in vitro models of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier. *BMC Neurosci.* 14():59. DOI: 10.1186/1471-2202-14-59.
- [420] . Mark Ivan Melhorn **(2012)**. A Model to Examine the Outer Blood-Retinal Barrier in Rodents. Unpublished.
- [421] **Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M (2014)**. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports.* 2(2):205–218. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.12.007.
- [422] **Blume L-F, Denker M, Gieseler F, Kunze T (2010)**. Temperature corrected transepithelial electrical resistance (TEER) measurement to quantify rapid changes in paracellular permeability. *Pharmazie.* 65(1):19–24.
- [423] **Felix K, Tobias S, Jan H, Nicolas S, Michael M (2021)**. Measurements of transepithelial electrical resistance (TEER) are affected by junctional length in immature epithelial monolayers. *Histochem Cell Biol.* 156(6):609–616. DOI: 10.1007/s00418-021-02026-4.
- [424] **Sung J Hwan (2018)**. Pharmacokinetic-based multi-organ chip for recapitulating organ interactions. *Methods Cell Biol.* 146():183–197. DOI: 10.1016/bs.mcb.2018.05.008.
- [425] **Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, Wen W, Gong X (2020)**. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomed Eng Online.* 19(1):9. DOI: 10.1186/s12938-020-0752-0.
- [426] . Detlev Ganten, Klaus Ruckpaul **(2006)**. Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine. Springer. 9783540442448.
- [427] **Andrzejewska A, Jablonska A, Seta M, Dabrowska S, Walczak P, Janowski M, Lukomska B (2019)**. Labeling of human mesenchymal stem cells with different classes of vital stains: robustness and toxicity. *Stem Cell Res Ther.* 10(1):187. DOI: 10.1186/s13287-019-1296-8.
- [428] **Halabi E A., Arasa J, Püntener S, Collado-Diaz V, Halin C, Rivera-Fuentes P (2020)**. Dual-Activatable Cell Tracker for Controlled and Prolonged Single-Cell Labeling. *ACS Chem Biol.* 15(6):1613–1620. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00208.
- [429] **Song J W., Cavnar S P., Walker A C., Luker K E., Gupta M, Tung Y-C, Luker G D., Takayama S (2009)**. Microfluidic endothelium for studying the intravascular adhesion of metastatic breast cancer cells. *PLoS One.* 4(6):e5756. DOI: 10.1371/journal.pone.0005756.
- [430] **Wilson H K., Canfield S G., Hjortness M K., Palecek S P., Shusta E V. (2015)**. Exploring the effects of cell seeding density on the differentiation of human pluripotent stem cells to brain microvascular endothelial cells. *Fluids Barriers CNS.* 12():13. DOI: 10.1186/s12987-015-0007-9.
- [431] **Wu Y-K, Tu Y-K, Yu J, Cheng N-C (2020)**. The Influence of Cell Culture Density on the Cytotoxicity of Adipose-Derived Stem Cells Induced by L-Ascorbic Acid-2-Phosphate. *Sci Rep.* 10(1):104. DOI: 10.1038/s41598-019-56875-0.
- [432] **Bitar M, Brown R A., Salih V, Kidane A G., Knowles J C., Nazhat S N. (2008)**. Effect of cell density on osteoblastic differentiation and matrix degradation of biomimetic dense collagen scaffolds. *Biomacromolecules.* 9(1):129–135. DOI: 10.1021/bm701112w.

- [433] **Kim K, Dean D, Mikos A G., Fisher J P. (2009).** Effect of initial cell seeding density on early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells cultured on cross-linked poly(propylene fumarate) disks. *Biomacromolecules*. 10(7):1810–1817.
DOI: 10.1021/bm900240k.
- [434] **Wang L, Seshareddy K, Weiss M L., Detamore M S. (2009).** Effect of initial seeding density on human umbilical cord mesenchymal stromal cells for fibrocartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 15(5):1009–1017.
DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0012.
- [435] **Zhou H, Weir M D., Xu H H. K. (2011).** Effect of cell seeding density on proliferation and osteodifferentiation of umbilical cord stem cells on calcium phosphate cement-fiber scaffold. *Tissue Eng Part A*. 17(21-22):2603–2613.
DOI: 10.1089/ten.tea.2011.0048.
- [436] **Reynolds P M., Holzmann Rasmussen C, Hansson M, Dufva M, Riehle M O., Gadegaard N (2018).** Controlling fluid flow to improve cell seeding uniformity. *PLoS One*. 13(11):e0207211.
DOI: 10.1371/journal.pone.0207211.
- [437] **Kwist K, Bridges W C., Burg K J. L. (2016).** The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology*. 68(4):1661–1667.
DOI: 10.1007/s10616-015-9883-8.
- [438] **Han Y, Lian M, Wu Q, Qiao Z, Sun B, Dai K (2021).** Effect of Pore Size on Cell Behavior Using Melt Electrowritten Scaffolds. *Front Bioeng Biotechnol*. 9():629270.
DOI: 10.3389/fbioe.2021.629270.
- [439] **Loh Q Li, Choong C (2013).** Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*. 19(6):485–502.
DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0437.
- [440] **Narayan D, Venkatraman S S. (2008).** Effect of pore size and interpore distance on endothelial cell growth on polymers. *J Biomed Mater Res A*. 87(3):710–718.
DOI: 10.1002/jbm.a.31749.
- [441] **Casillo S M., Peredo A P., Perry S J., Chung H H., Gaborski T R. (2017).** Membrane Pore Spacing Can Modulate Endothelial Cell-Substrate and Cell-Cell Interactions. *ACS Biomater Sci Eng*. 3(3):243–248.
DOI: 10.1021/acsbomaterials.7b00055.
- [442] **Siddique A ().** Surface modification for enhanced cell adhesion under high shear stress conditions. *Darmstadt, Technische Universität, Dissertation*. 2020().
DOI: 10.25534/tuprints-00011862.
- [443] **().** different ECM coating for 2D and microfluidics - Google Suche().
- [444] **Choi N Won, Cabodi M, Held B, Gleghorn J P., Bonassar L J., Stroock A D. (2007).** Microfluidic scaffolds for tissue engineering. *Nat Mater*. 6(11):908–915.
DOI: 10.1038/nmat2022.
- [445] **Gao D, Liu H, Jiang Y, Lin J-M (2012).** Recent developments in microfluidic devices for in vitro cell culture for cell-biology research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 35():150–164.
DOI: 10.1016/j.trac.2012.02.008.
- [446] **Hung P J., Lee P J., Sabounchi P, Aghdam N, Lin R, Lee L P. (2005).** A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array. *Lab Chip*. 5(1):44–48.
DOI: 10.1039/b410743h.
- [447] **Leclerc E, Sakai Y, Fujii T (2003).** . *Biomedical Microdevices*. 5(2):109–114.
DOI: 10.1023/A:1024583026925.
- [448] **Meier S J., Hatton T Alan, Wang D I. C. (1999).** Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. *Biotechnol. Bioeng*. 62(4):468–478.
DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990220)62:4<468::AID-BIT10>3.0.CO;2-N.

- [449] **Michaels J D., Mallik A K., Papoutsakis E T. (1996).** Sparging and agitation-induced injury of cultured animals cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? *Biotechnol. Bioeng.* 51(4):399–409.
DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960820)51:4<399::AID-BIT3>3.0.CO;2-D.
- [450] **Kim L, Toh Y-C, Voldman J, Yu H (2007).** A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab Chip.* 7(6):681–694.
DOI: 10.1039/b704602b.
- [451] . Gorbunov, Nikolaï Vasil'evich (2021). Tissue barriers in disease, injury and regeneration. Elsevier. 9780128185612.
- [452] **Nichol J W., Koshy S T., Bae H, Hwang C M., Yamanlar S, Khademhosseini A (2010).** Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials.* 31(21):5536–5544.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.064.
- [453] **Akther F, Yakob S Binte, Nguyen N-T, Ta H T. (2020).** Surface Modification Techniques for Endothelial Cell Seeding in PDMS Microfluidic Devices. *Biosensors (Basel).* 10(11).
DOI: 10.3390/bios10110182.
- [454] **Wang X-Y, Jin Z-H, Gan B-W, Lv S-W, Xie M, Huang W-H (2014).** Engineering interconnected 3D vascular networks in hydrogels using molded sodium alginate lattice as the sacrificial template. *Lab Chip.* 14(15):2709–2716.
DOI: 10.1039/c4lc00069b.
- [455] **Pitingolo G, Riaud A, Nastruzzi C, Taly V (2019).** Gelatin-Coated Microfluidic Channels for 3D Microtissue Formation: On-Chip Production and Characterization. *Micromachines (Basel).* 10(4).
DOI: 10.3390/mi10040265.
- [456] **Heth C A., Yankauckas M A., Adamian M, Edwards R B. (1987).** Characterization of retinal pigment epithelial cells cultured on microporous filters. *Current Eye Research.* 6(8):1007–1019.
DOI: 10.3109/02713688709034872.
- [457] **Aisenbrey S, Zhang M, Bacher D, Yee J, Brunken W J., Hunter D D. (2006).** Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47(12):5537–5544.
DOI: 10.1167/iovs.05-1590.
- [458] **Pilgrim M G., Lengyel I, Lanzirotti A, Newville M, Fearn S, Emri E, Knowles J C., Messinger J D., Read R W., Guidry C, Curcio C A. (2017).** Subretinal Pigment Epithelial Deposition of Drusen Components Including Hydroxyapatite in a Primary Cell Culture Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 58(2):708–719.
DOI: 10.1167/iovs.16-21060.
- [459] **Liu H, Jing L, Sun J, Huang D (2021).** An Overview of Scaffolds for Retinal Pigment Epithelium Research. *Procedia Manufacturing.* 53():492–499.
DOI: 10.1016/j.promfg.2021.06.051.
- [460] **Pattanayak P, Singh S Kumar, Gulati M, Vishwas S, Kapoor B, Chellappan D Kumar, Anand K, Gupta G, Jha N Kumar, Gupta P Kumar, Prasher P, Dua K, Dureja H, Kumar D, Kumar V (2021).** Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives. *Microfluid Nanofluidics.* 25(12):99.
DOI: 10.1007/s10404-021-02502-2.
- [461] **Trinh K The Loan, Thai D Anh, Chae W Ri, Lee N Yoon (2020).** Rapid Fabrication of Poly(methyl methacrylate) Devices for Lab-on-a-Chip Applications Using Acetic Acid and UV Treatment. *ACS Omega.* 5(28):17396–17404.
DOI: 10.1021/acsomega.0c01770.
- [462] **Wu M-H, Huang S-B, Lee G-B (2010).** Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab Chip.* 10(8):939–956.
DOI: 10.1039/b921695b.
- [463] **Burdick J A., Vunjak-Novakovic G (2009).** Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A.* 15(2):205–219.
DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0131.

- [464] **Wu H-W, Lin C-C, Lee G-B (2011)**. Stem cells in microfluidics. *Biomicrofluidics*. 5(1):13401.
DOI: 10.1063/1.3528299.
- [465] **Young E W. K., Simmons C A. (2010)**. Macro- and microscale fluid flow systems for endothelial cell biology. *Lab Chip*. 10(2):143–160.
DOI: 10.1039/b913390a.
- [466] **Velve-Casquillas G, Le Berre M, Piel M, Tran P T. (2010)**. Microfluidic tools for cell biological research. *Nano today*. 5(1):28–47.
DOI: 10.1016/j.nantod.2009.12.001.
- [467] **Achberger K, Probst C, Haderspeck J, Bolz S, Rogal J, Chuchuy J, Nikolova M, Cora V, Antkowiak L, Haq W, Shen N, Schenke-Layland K, Ueffing M, Liebau S, Loskill P (2019)**. Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform. *Elife*. 8().
DOI: 10.7554/eLife.46188.
- [468] **Nie J, Gao Q, Wang Y, Zeng J, Zhao H, Sun Y, Shen J, Ramezani H, Fu Z, Liu Z, Xiang M, Fu J, Zhao P, Chen W, He Y (2018)**. Vessel-on-a-chip with Hydrogel-based Microfluidics. *Small*. 14(45):e1802368.
DOI: 10.1002/smll.201802368.
- [469] **Ertl P (2015)**. Recent Advances of Biologically Inspired 3D Microfluidic Hydrogel Cell Culture Systems. *CBCM*. 2(1):1–14.
DOI: 10.24966/CBCM-1943/100005.
- [470] **Oliva N, Conde J, Wang K, Artzi N (2017)**. Designing Hydrogels for On-Demand Therapy. *Acc Chem Res*. 50(4):669–679.
DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00536.
- [471] **Choi M, Choi J Woo, Kim S, Nizamoglu S, Hahn S Kwang, Yun S Hyun (2013)**. Light-guiding hydrogels for cell-based sensing and optogenetic synthesis in vivo. *Nat Photonics*. 7():987–994.
DOI: 10.1038/nphoton.2013.278.
- [472] **He Y, Gu Z, Xie M, Fu J, Lin H (2020)**. Why choose 3D bioprinting? Part II: methods and bioprinters. *Bio-des. Manuf.* 3(1):1–4.
DOI: 10.1007/s42242-020-00064-w.
- [473] **Hölzl K, Lin S, Tytgat L, van Vlierberghe S, Gu L, Ovsianikov A (2016)**. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*. 8(3):32002.
DOI: 10.1088/1758-5090/8/3/032002.
- [474] **Kolesky D B., Homan K A., Skylar-Scott M A., Lewis J A. (2016)**. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(12):3179–3184.
DOI: 10.1073/pnas.1521342113.
- [475] **Yang J-H, Wu U-I, Tai H-M, Sheng W-H (2019)**. Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens. *J Microbiol Immunol Infect.* 52(3):487–493.
DOI: 10.1016/j.jmii.2017.08.017.
- [476] **Nemir S, Hayenga H N., West J L. (2010)**. PEGDA hydrogels with patterned elasticity: Novel tools for the study of cell response to substrate rigidity. *Biotechnol. Bioeng.* 105(3):636–644.
DOI: 10.1002/bit.22574.
- [477] **Cavallo A, Madaghiale M, Masullo U, Lionetto M Giulia, Sannino A (2017)**. Photo-crosslinked poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) hydrogels from low molecular weight prepolymer: Swelling and permeation studies. *J. Appl. Polym. Sci.* 134(2).
DOI: 10.1002/app.44380.
- [478] **Fairbanks B D., Schwartz M P., Bowman C N., Anseth K S. (2009)**. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*. 30(35):6702–6707.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.055.

- [479] **White C, DiStefano T, Olabisi R (2017)**. The influence of substrate modulus on retinal pigment epithelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 105(5):1260–1266.
DOI: 10.1002/jbm.a.35992.
- [480] **Schneider-Barthold C, Baganz S, Wilhelmi M, Scheper T, Pepelanova I (2016)**. Hydrogels based on collagen and fibrin – frontiers and applications. *BioNanoMaterials*. 17(1-2).
DOI: 10.1515/bnm-2015-0025.
- [481] **Weisel J W. (2005)**. Fibrinogen and Fibrin. 70:247–299 **Weisel J W.** Fibrinogen and Fibrin.
- [482] **Gandhi J K., Manzar Z, Bachman L A., Andrews-Pfannkoch C, Knudsen T, Hill M, Schmidt H, Iezzi R, Pulido J S., Marmorstein A D. (2018)**. Fibrin hydrogels as a xenofree and rapidly degradable support for transplantation of retinal pigment epithelium monolayers. *Acta Biomater*. 67():134–146.
DOI: 10.1016/j.actbio.2017.11.058.
- [483] **Zhao N, Suzuki A, Zhang X, Shi P, Abune L, Coyne J, Jia H, Xiong N, Zhang G, Wang Y (2019)**. Dual Aptamer-Functionalized in Situ Injectable Fibrin Hydrogel for Promotion of Angiogenesis via Codelivery of Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor-BB. *ACS Appl Mater Interfaces*. 11(20):18123–18132.
DOI: 10.1021/acsami.9b02462.
- [484] **Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax P H. A., van Lent N, Grimbergen J, Peters E, Koolwijk P, van Hinsbergh V W. M. (2003)**. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*. 101(5):1810–1817.
DOI: 10.1182/blood-2002-05-1593.
- [485] **Lorentz K M., Kontos S, Frey P, Hubbell J A. (2011)**. Engineered aprotinin for improved stability of fibrin biomaterials. *Biomaterials*. 32(2):430–438.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.109.
- [486] **Cholewinski E, Dietrich M, Flanagan T C., Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S (2009)**. Tranexamic acid--an alternative to aprotinin in fibrin-based cardiovascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 15(11):3645–3653.
DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0235.
- [487] **Mühleder S, Pill K, Schaupper M, Labuda K, Priglinger E, Hofbauer P, Charwat V, Marx U, Redl H, Holthöner W (2018)**. The role of fibrinolysis inhibition in engineered vascular networks derived from endothelial cells and adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 9(1):35.
DOI: 10.1186/s13287-017-0764-2.
- [488] **Calderon G A., Thai P, Hsu C W., Grigoryan B, Gibson S M., Dickinson M E., Miller J S. (2017)**. Tubulogenesis of co-cultured human iPS-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in fibrin and gelatin methacrylate gels. *Biomater Sci*. 5(8):1652–1660.
DOI: 10.1039/c7bm00223h.
- [489] . Liu, Xin; Wang, Xinhuan; Zhang, Liming; Sun, Lulu; Wang, Heran; Zhao, Hao; Zhang, Zhengtao; Huang, Yiming; Zhang, Jingjinqiu; Song, Biaobiao; Li, Chun; Zhang, Hui; Li, Song; Wang, Shu; Zheng, Xiongfei; Gu, Qi **(2021)**. A novel method for generating 3D constructs with branched vascular networks using multi-materials bioprinting and direct surgical anastomosis.
- [490] **Coradin T, Wang K, Law T, Trichet L (2020)**. Type I Collagen-Fibrin Mixed Hydrogels: Preparation, Properties and Biomedical Applications. *Gels*. 6(4).
DOI: 10.3390/gels6040036.
- [491] **Smith J D., Chen A, Ernst L A., Waggoner A S., Campbell P G. (2007)**. Immobilization of aprotinin to fibrinogen as a novel method for controlling degradation of fibrin gels. *Bioconjug Chem*. 18(3):695–701.
DOI: 10.1021/bc060265o.
- [492] **Yamamura N, Sudo R, Ikeda M, Tanishita K (2007)**. Effects of the mechanical properties of collagen gel on the in vitro formation of microvessel networks by endothelial cells. *Tissue Eng*. 13(7):1443–1453.
DOI: 10.1089/ten.2006.0333.
- [493] **Sohutskay D O., Puls T J., Voytik-Harbin S L. (2020)**. Collagen Self-assembly: Biophysics and Biosignaling for Advanced Tissue Generation. 23:203–245 **Sohutskay D O., Puls T J., Voytik-Harbin S L.** Collagen Self-assembly: Biophysics and Biosignaling for Advanced Tissue Generation.

- [494] **Diamantides N, Wang L, Pruiksmá T, Siemiatkoski J, Dugopolski C, Shortkroff S, Kennedy S, Bonassar L J. (2017).** Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH. *Biofabrication*. 9(3):34102.
DOI: 10.1088/1758-5090/aa780f.
- [495] **Goodarzi H, Jadidi K, Pourmotabed S, Sharifi E, Aghamollaei H (2019).** Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen-gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*. 126():620–632.
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.125.
- [496] **Wallace D G., Rosenblatt J (2003).** Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 55(12):1631–1649.
DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.004.
- [497] **Xu H, Casillas J, Krishnamoorthy S, Xu C (2020).** Effects of Irgacure 2959 and lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs. *Biomed Mater*. 15(5):55021.
DOI: 10.1088/1748-605X/ab954e.
- [498] **Grimm AL (2020).** Synthese und Charakterisierung gelatinebasierter Hydrogele.
- [499] **Skardal A, Zhang J, McCoard L, Xu X, Oottamasathien S, Prestwich G D. (2010).** Photocrosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogels for two-step bioprinting. *Tissue Eng Part A*. 16(8):2675–2685.
DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0798.
- [500] **Pepelanova I, Kruppa K, Scheper T, Lavrentieva A (2018).** Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering (Basel)*. 5(3).
DOI: 10.3390/bioengineering5030055.
- [501] **Sun M, Sun X, Wang Z, Guo S, Yu G, Yang H (2018).** Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue. *Polymers (Basel)*. 10(11).
DOI: 10.3390/polym10111290.
- [502] **Yung C W., Wu L Q., Tullman J A., Payne G F., Bentley W E., Barbari T A. (2007).** Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 83(4):1039–1046.
DOI: 10.1002/jbm.a.31431.
- [503] **Chen Y-C, Lin R-Z, Qi H, Yang Y, Bae H, Melero-Martin J M., Khademhosseini A (2012).** Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Adv Funct Mater*. 22(10):2027–2039.
DOI: 10.1002/adfm.201101662.
- [504] **Krishnamoorthy S, Noorani B, Xu C (2019).** Effects of Encapsulated Cells on the Physical-Mechanical Properties and Microstructure of Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Int J Mol Sci*. 20(20).
DOI: 10.3390/ijms20205061.
- [505] **Dong Z, Yuan Q, Huang K, Xu W, Liu G, Gu Z (2019).** Gelatin methacryloyl (GelMA)-based biomaterials for bone regeneration. *RSC Adv*. 9(31):17737–17744.
DOI: 10.1039/C9RA02695A.
- [506] **Múnoz Z, Shih H, Lin C-C (2014).** Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomater Sci*. 2(8):1063–1072.
DOI: 10.1039/c4bm00070f.
- [507] **Tibbitt M W., Kloxin A M., Sawicki L, Anseth K S. (2013).** Mechanical Properties and Degradation of Chain and Step Polymerized Photodegradable Hydrogels. *Macromolecules*. 46(7).
DOI: 10.1021/ma302522x.
- [508] **McCall J D., Anseth K S. (2012).** Thiol-ene photopolymerizations provide a facile method to encapsulate proteins and maintain their bioactivity. *Biomacromolecules*. 13(8):2410–2417.
DOI: 10.1021/bm300671s.

- [509] **Pereira R F., Bártolo P J. (2015).** 3D Photo-Fabrication for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Engineering*. 1(1):90–112.
DOI: 10.15302/J-ENG-2015015.
- [510] **Hoyle C E., Bowman C N. (2010).** Thiol-ene click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*. 49(9):1540–1573.
DOI: 10.1002/anie.200903924.
- [511] . Kempster, Xenia (2021). Gelatine-basierte Hydrogele für den 3D Biodruck von Gewebemodellen. Karlsruher Institut für Technologie.
- [512] **Nguyen A K., Goering P L., Elespuru R K., Sarkar Das S, Narayan R J. (2020).** The Photoinitiator Lithium Phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) Phosphinate with Exposure to 405 nm Light Is Cytotoxic to Mammalian Cells but Not Mutagenic in Bacterial Reverse Mutation Assays. *Polymers (Basel)*. 12(7).
DOI: 10.3390/polym12071489.
- [513] **Mosmann T (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2):55–63.
DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [514] **Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021).** The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 22(23).
DOI: 10.3390/ijms222312827.
- [515] **Berridge M V., Herst P M., Tan A S. (2005).** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. 11:127–152 **Berridge M V., Herst P M., Tan A S.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.
- [516] **Stockert J C., Horobin R W., Colombo L L., Blázquez-Castro A (2018).** Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 120(3):159–167.
DOI: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
- [517] **Xie R, Zheng W, Guan L, Ai Y, Liang Q (2020).** Engineering of Hydrogel Materials with Perfusable Microchannels for Building Vascularized Tissues. *Small*. 16(15):e1902838.
DOI: 10.1002/smll.201902838.
- [518] **Dahle J, Kvam E (2003).** Induction of delayed mutations and chromosomal instability in fibroblasts after UVA-, UVB-, and X-radiation. *Cancer Res*. 63(7):1464–1469.
- [519] **Dahle J, Kvam E, Stokke T (2005).** Bystander effects in UV-induced genomic instability: antioxidants inhibit delayed mutagenesis induced by ultraviolet A and B radiation. *J Carcinog*. 4():11.
DOI: 10.1186/1477-3163-4-11.
- [520] **Lim K S., Klotz B J., Lindberg G C. J., Melchels F P. W., Hooper G J., Malda J, Gawlitta D, Woodfield T B. F. (2019).** Visible Light Cross-Linking of Gelatin Hydrogels Offers an Enhanced Cell Microenvironment with Improved Light Penetration Depth. *Macromol Biosci*. 19(6):e1900098.
DOI: 10.1002/mabi.201900098.
- [521] **Lavker R, Kaidbey K (1997).** The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin. *J Invest Dermatol*. 108(1):17–21.
DOI: 10.1111/1523-1747.ep12285613.
- [522] **Urushibara A, Kodama S, Yokoya A (2014).** Induction of genetic instability by transfer of a UV-A-irradiated chromosome. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 766():29–34.
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.02.005.
- [523] **Cabodi M, Choi N Won, Gleghorn J P., Lee C S. D., Bonassar L J., Stroock A D. (2005).** A microfluidic biomaterial. *J Am Chem Soc*. 127(40):13788–13789.
DOI: 10.1021/ja054820t.
- [524] **Zheng Y, Chen J, Craven M, Choi N Won, Totorica S, Diaz-Santana A, Kermani P, Hempstead B, Fischbach-Teschl C, López J A., Stroock A D. (2012).** In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(24):9342–9347.
DOI: 10.1073/pnas.1201240109.

- [525] **Cuchiara M P., Allen A C. B., Chen T M., Miller J S., West J L. (2010).** Multilayer microfluidic PEGDA hydrogels. *Biomaterials*. 31(21):5491–5497.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.031.
- [526] **van Dijk C G. M., Brandt M M., Poulis N, Anten J, van der Moolen M, Kramer L, Homburg E F. G. A., Louzao-Martinez L, Pei J, Krebber M M., van Balkom B W. M., Graaf P de, Duncker D J., Verhaar M C., Luttge R, Cheng C (2020).** A new microfluidic model that allows monitoring of complex vascular structures and cell interactions in a 3D biological matrix. *Lab Chip*. 20(10):1827–1844.
DOI: 10.1039/d0lc00059k.
- [527] **Kolesky D B., Truby R L., Gladman A Sydney, Busbee T A., Homan K A., Lewis J A. (2014).** 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater*. 26(19):3124–3130.
DOI: 10.1002/adma.201305506.
- [528] **Takei T, Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K (2006).** Fabrication of endothelialized tube in collagen gel as starting point for self-developing capillary-like network to construct three-dimensional organs in vitro. *Biotechnol. Bioeng*. 95(1):1–7.
DOI: 10.1002/bit.20903.
- [529] **Takahashi H, Kato K, Ueyama K, Kobayashi M, Baik G, Yukawa Y, Suehiro J-I, Matsunaga Y T. (2017).** Visualizing dynamics of angiogenic sprouting from a three-dimensional microvasculature model using stage-top optical coherence tomography. *Sci Rep*. 7():42426.
DOI: 10.1038/srep42426.
- [530] **Chrobak K M., Potter D R., Tien J (2006).** Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro. *Microvasc Res*. 71(3):185–196.
DOI: 10.1016/j.mvr.2006.02.005.
- [531] **Djigo A Dede, Bérubé J, Landreville S, Proulx S (2019).** Characterization of a tissue-engineered choroid. *Acta Biomater*. 84():305–316.
DOI: 10.1016/j.actbio.2018.11.033.
- [532] **Klotz B J., Lim K S., Chang Y X., Soliman B G., Pennings I, Melchels F P. W., Woodfield T B. F., Rosenberg A J., Malda J, Gawlitta D (2018).** Engineering of a complex bone tissue model with endothelialised channels and capillary-like networks. *Eur Cell Mater*. 35():335–348.
DOI: 10.22203/eCM.v035a23.
- [533] **Soliman B G., Major G S., Atienza-Roca P, Murphy C A., Longoni A, Alcalá-Orozco C R., Rnjak-Kovacina J, Gawlitta D, Woodfield T B. F., Lim K S. (2022).** Development and Characterization of Gelatin-Norbornene Bioink to Understand the Interplay between Physical Architecture and Micro-Capillary Formation in Biofabricated Vascularized Constructs. *Adv Healthc Mater*. 11(2):e2101873.
DOI: 10.1002/adhm.202101873.
- [534] **Lim K S., Baptista M, Moon S, Woodfield T B. F., Rnjak-Kovacina J (2019).** Microchannels in Development, Survival, and Vascularisation of Tissue Analogues for Regenerative Medicine. *Trends Biotechnol*. 37(11):1189–1201.
DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.04.004.
- [535] **Nikkhah M, Eshak N, Zorlutuna P, Annabi N, Castello M, Kim K, Dolatshahi-Pirouz A, Edalat F, Bae H, Yang Y, Khademhosseini A (2012).** Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 33(35):9009–9018.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.068.
- [536] **Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi T, Yamamoto K, Kamiya A, Ando J, Yoshida A (2011).** Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52(11):8496–8504.
DOI: 10.1167/iovs.11-7686.
- [537] **Papaioannou T G., Stefanadis C (2005).** Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol*. 46(1):9–15.
- [538] **Lippens E, Swennen I, Gironès J, Declercq H, Vertenten G, Vlamincx L, Gasthuys F, Schacht E, Cornelissen R (2013).** Cell survival and proliferation after encapsulation in a chemically modified

- Pluronic(R) F127 hydrogel. *J Biomater Appl.* 27(7):828–839.
DOI: 10.1177/0885328211427774.
- [539] **Shirwaiker R A., Purser M F., Wysk R A. (2014).** Scaffolding hydrogels for rapid prototyping based tissue engineering:176–200**Shirwaiker R A., Purser M F., Wysk R A.**Scaffolding hydrogels for rapid prototyping based tissue engineering.
- [540] **Xu Y, Hu Y, Liu C, Yao H, Liu B, Mi S (2018).** A Novel Strategy for Creating Tissue-Engineered Biomimetic Blood Vessels Using 3D Bioprinting Technology. *Materials (Basel).* 11(9).
DOI: 10.3390/ma11091581.
- [541] **Suntornnond R, Tan E Yong Sheng, An J, Chua C Kai (2017).** A highly printable and biocompatible hydrogel composite for direct printing of soft and perfusable vasculature-like structures. *Sci Rep.* 7(1):16902.
DOI: 10.1038/s41598-017-17198-0.
- [542] **Miller J S., Stevens K R., Yang M T., Baker B M., Nguyen D-H T., Cohen D M., Toro E, Chen A A., Galie P A., Yu X, Chaturvedi R, Bhatia S N., Chen C S. (2012).** Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat Mater.* 11(9):768–774.
DOI: 10.1038/nmat3357.
- [543] **Bhatt N S., Newsome D A., Fenech T, Hessburg T P., Diamond J G., Miceli M V., Kratz K E., Oliver P D. (1994).** Experimental Transplantation of Human Retinal Pigment Epithelial Cells on Collagen Substrates. *American Journal of Ophthalmology.* 117(2):214–221.
DOI: 10.1016/s0002-9394(14)73079-x.
- [544] **Lu L, Yaszemski M J., Mikos A G. (2001).** Retinal pigment epithelium engineering using synthetic biodegradable polymers. *Biomaterials.* 22(24):3345–3355.
DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00172-7.
- [545] **Lu B, Zhu D, Hinton D, Humayun M S., Tai Y-C (2012).** Mesh-supported submicron parylene-C membranes for culturing retinal pigment epithelial cells. *Biomedical Microdevices.* 14(4):659–667.
DOI: 10.1007/s10544-012-9645-8.
- [546] **Lee C J., Vroom J A., Fishman H A., Bent S F. (2006).** Determination of human lens capsule permeability and its feasibility as a replacement for Bruch's membrane. *Biomaterials.* 27(8):1670–1678.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.09.008.
- [547] **Hynes S Royce, Lavik E B. (2010).** A tissue-engineered approach towards retinal repair: scaffolds for cell transplantation to the subretinal space. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 248(6):763–778.
DOI: 10.1007/s00417-009-1263-7.
- [548] **Huang C P., Lu J, Seon H, Lee A P., Flanagan L A., Kim H-Y, Putnam A J., Jeon N Li (2009).** Engineering microscale cellular niches for three-dimensional multicellular co-cultures. *Lab Chip.* 9(12):1740–1748.
DOI: 10.1039/b818401a.
- [549] **Alswailmi F Khashim (2018).** Global prevalence and causes of visual impairment with special reference to the general population of Saudi Arabia. *Pak J Med Sci.* 34(3):751–756.
DOI: 10.12669/pjms.343.14510.
- [550] **Rho J, Percelay P, Pilkinton S, Hollingsworth T J., Kornblau I, M. Jablonski M (2022).** An Overview of Age-Related Macular Degeneration: Clinical, Pre-Clinical Animal Models and Bidirectional Translation**Rho J, Percelay P, Pilkinton S, Hollingsworth T J., Kornblau I, M. Jablonski M**An Overview of Age-Related Macular Degeneration: Clinical, Pre-Clinical Animal Models and Bidirectional Translation.
- [551] **Liang F-Q, Godley B F. (2003).** Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 76(4):397–403.
DOI: 10.1016/S0014-4835(03)00023-X.
- [552] **Kang K Hwa, Lemke G, Kim J Woo (2009).** The PI3K-PTEN tug-of-war, oxidative stress and retinal degeneration. *Trends Mol Med.* 15(5):191–198.
DOI: 10.1016/j.molmed.2009.03.005.

- [553] **Liu H, Liu W, Zhou X, Long C, Kuang X, Hu J, Tang Y, Liu L, He J, Huang Z, Fan Y, Jin G, Zhang Q, Shen H (2017).** Protective effect of lutein on ARPE-19 cells upon H₂O₂-induced G₂/M arrest. *Mol Med Rep.* 16(2):2069–2074.
DOI: 10.3892/mmr.2017.6838.
- [554] **Golestaneh N, Chu Y, Cheng S Kei, Cao H, Poliakov E, Berinstein D M. (2016).** Repressed SIRT1/PGC-1 α pathway and mitochondrial disintegration in iPSC-derived RPE disease model of age-related macular degeneration. *J Transl Med.* 14(1):344.
DOI: 10.1186/s12967-016-1101-8.
- [555] **Catalioto R-M, Festa C, Triolo A, Altamura M, Maggi C Alberto, Giuliani S (2009).** Differential effect of ethanol and hydrogen peroxide on barrier function and prostaglandin E₂ release in differentiated Caco-2 cells: selective prevention by growth factors. *J Pharm Sci.* 98(2):713–727.
DOI: 10.1002/jps.21439.
- [556] **Ni T, Yang W, Xing Y (2019).** Protective effects of delphinidin against H₂O₂-induced oxidative injuries in human retinal pigment epithelial cells. *Biosci Rep.* 39(8).
DOI: 10.1042/BSR20190689.
- [557] **Jepson M A. (2003).** Disruption of epithelial barrier function by H₂O₂: distinct responses of Caco-2 and Madin-Darby canine kidney (MDCK) strains. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 49(1):101–112.
- [558] **Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas M E. (2019).** The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol.* 39(4):556–570.
DOI: 10.1002/jat.3749.
- [559] **Engelhardt S, Al-Ahmad A J., Gassmann M, Ogunshola O O. (2014).** Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 229(8):1096–1105.
DOI: 10.1002/jcp.24544.
- [560] **Page S, Munsell A, Al-Ahmad A J. (2016).** Cerebral hypoxia/ischemia selectively disrupts tight junctions complexes in stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells. *Fluids Barriers CNS.* 13(1):16.
DOI: 10.1186/s12987-016-0042-1.
- [561] **Rastoin O, Pagès G, Dufies M (2020).** Experimental Models in Neovascular Age Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci.* 21(13).
DOI: 10.3390/ijms21134627.
- [562] **Alizadeh E, Mammadzada P, André H (2018).** The Different Facades of Retinal and Choroidal Endothelial Cells in Response to Hypoxia. *Int J Mol Sci.* 19(12).
DOI: 10.3390/ijms19123846.
- [563] **Kevil C (1998).** Role of Cadherin Internalization in Hydrogen Peroxide-Mediated Endothelial Permeability. *Free Radical Biology and Medicine.* 24(6):1015–1022.
DOI: 10.1016/S0891-5849(97)00433-4.
- [564] **Kevil C G., Oshima T, Alexander B, Coe L L., Alexander J S. (2000).** H₂O₂-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(1):C21-30.
DOI: 10.1152/ajpcell.2000.279.1.C21.
- [565] **Bailey T A., Kanuga N, Romero I A., Greenwood J, Luthert P J., Cheetham M E. (2004).** Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45(2):675–684.
DOI: 10.1167/iovs.03-0351.
- [566] **Thurman J M., Renner B, Kunchithapautham K, Ferreira V P., Pangburn M K., Ablonczy Z, Tomlinson S, Holers V Michael, Rohrer B (2009).** Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury. *J Biol Chem.* 284(25):16939–16947.
DOI: 10.1074/jbc.M808166200.
- [567] **Ho T-C, Yang Y-C, Cheng H-C, Wu A-C, Chen S-L, Tsao Y-P (2006).** Pigment epithelium-derived factor protects retinal pigment epithelium from oxidant-mediated barrier dysfunction. *Biochem Biophys Res*

Commun. 342(2):372–378.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.01.164.

- [568] **Shao Z, Friedlander M, Hurst C G., Cui Z, Pei D T., Evans L P., Juan A M., Tahiri H, Tahir H, Duhamel F, Chen J, Sapiaha P, Chemtob S, Joyal J-S, Smith L E. H. (2013).** Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis. *PLoS One.* 8(7):e69552.
DOI: 10.1371/journal.pone.0069552.

- [569] . Kappings, Vanessa **(2018)**. Tumormodelle in vitro. Cuvillier Verlag. 9783736987395.

9. Anhang

Zu Kapitel 4.5.4.2: Aus mESC-Rx-GFP differenziertes RPE im Mikrokanal des vasQchips

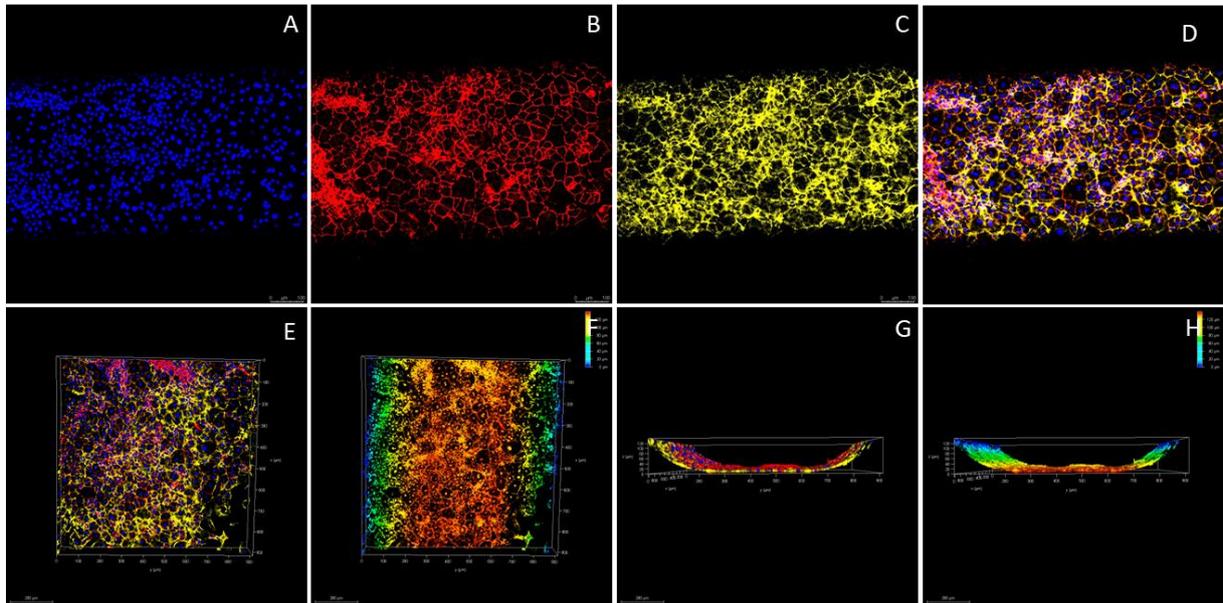


Abbildung 86: Differenziertes RPE aus mESC-Rx-GFP anDD21 im Mikrokanal des vasQchips. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (2 µg/ml) (A) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 µM) (C) visualisiert. Die Tight Junctions wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz durch einen Antikörper gegen ZO-1 aus der Ratte (1:100) nachgewiesen. Maßstab 100 µm. Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala: 0 µm= blau; 120 µm = rot

Zu Kapitel 4.6.4.1: HUVEC im Mikrokanal des *HB-flow* Systems mit Gerüststrukturen aus GelMA-Hydrogelen und GelN/S Hydrogelen

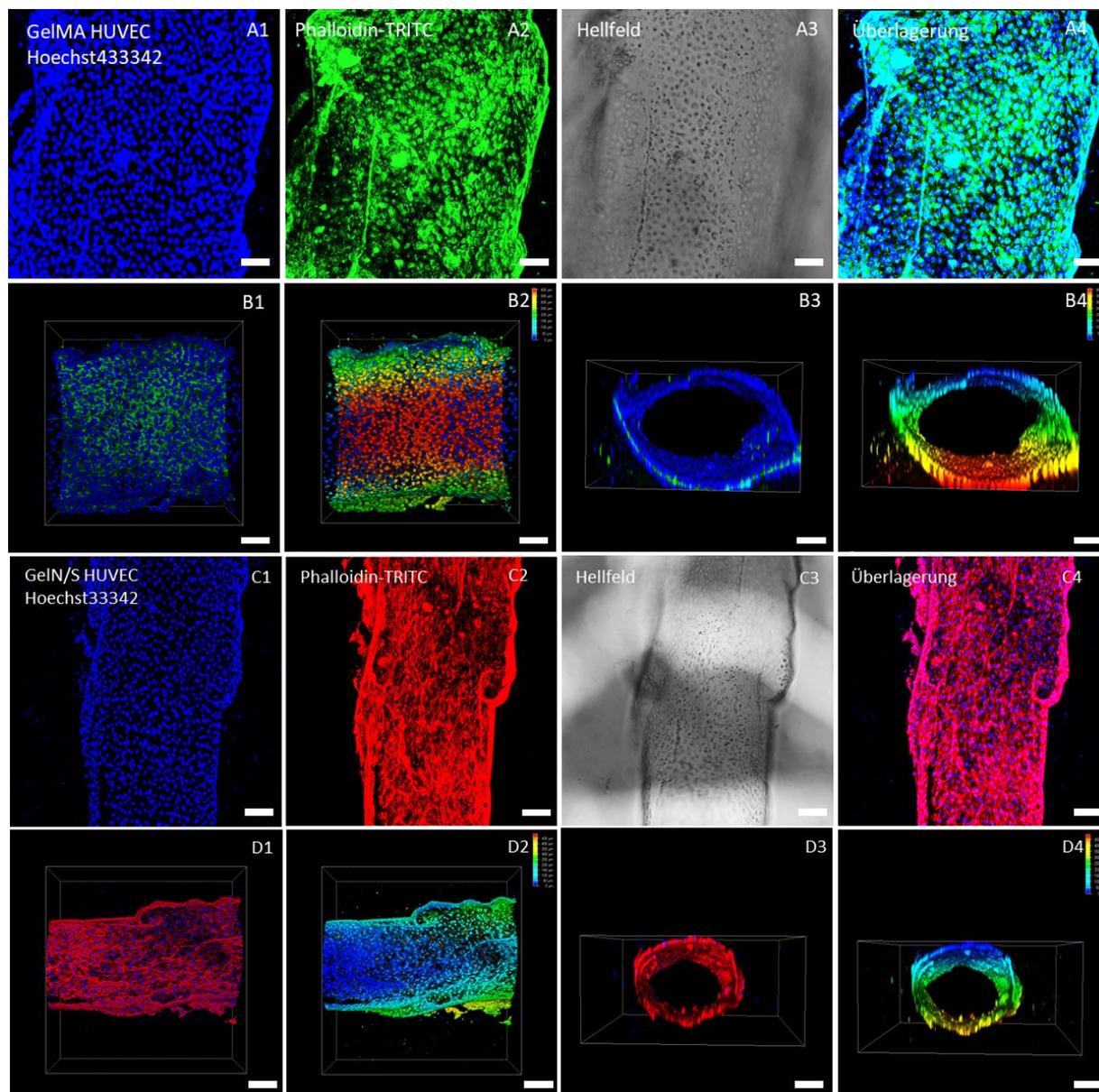


Abbildung 87: HUVEC im Mikrokanal des *HB-flow* Systems. Dazu wurden 150 μl eines 4 %igen GelMA (8 \AA q) Hydrogels mit 40 % Kollagen I bzw. eines 5 %igen GelN/S Hydrogels aus GelN (2 \AA q) und GelS (5 \AA q) mit einem Anteil von 40 % bzw. 25 % Kollagen I in die Vertiefung des *HB-flow* Systems gegeben und durch 500 mW/cm^2 für 30 s vernetzt. Nach dem Entfernen der Kanüle wurde das *HB-flow* System in EGM2 über Nacht inkubiert. Insgesamt $2 \cdot 10^5$ HUVEC wurden in den Mikrokanal eingebracht. Eine Kultivierung der Endothelzellen erfolgte über 7 Tage, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Nach Beenden der Kultivierungszeit wurden die Zellen im Mikrokanal mit PFA (4 %; 10 min; RT) fixiert, mit Triton-X (0,1 %; 4 min RT) permeabilisiert, um die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC (0,1 μM) zu visualisieren. Anschließend wurde das retinale Endothel konfokalmikroskopisch untersucht. Anhand von Z-Stack-Projektion wurden die Zellstrukturen visualisiert und als 3D Projektion dargestellt. Anhand der Tiefenfärbung fand eine 2D-Projektionsvisualisierung des 3D-Volumens statt. Maßstab: 75 μm (A1-B4); 100 μm (C1-D4). Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. Skala: 0 μm = blau; 450 μm = rot.

