

***In vitro* Rekonstruktion des Lebersinusoids im  
mikrofluidischen *Organ-on-a-Chip* System als  
humanes Modell zur verbesserten  
Wirkstoffentwicklung**

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. Hannah Buntz

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referent: Prof. Dr. Frank Breitling

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2023



Die vorgelegte Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ute Schepers am Institut für Funktionelle Grenzflächen des Karlsruher Instituts für Technologie im Zeitraum vom März 2020 bis Juli 2023 angefertigt. Von 01.09.2022 bis 30.11.2022 erfolgte ein Aufenthalt an der *University of Oxford*, England in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hodson am *Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism*. Die dabei entstandenen Ergebnisse sind entsprechend gekennzeichnet.

Prof. Dr. Breitling danke ich der freundlichen Übernahme des Korreferats.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtlich 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 (Hannah Buntz)



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Tissue Engineering</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Zellkultivierungsmethoden .....	3
1.1.2 <i>Organ-on-a-Chip</i> Systeme .....	5
1.1.2.1 Ein vaskularisiertes <i>Organ-on-a-Chip</i> System: der vasQchip .....	6
<b>1.2 Die Leber</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Histologie der Leber .....	8
1.2.1.1 Lebersinusoid .....	9
1.2.1.2 Lebersinusoidale Endothelzellen.....	10
1.2.1.3 Hepatozyten .....	11
1.2.2 Lebererkrankungen.....	13
1.2.2.1 Nicht-alkoholische Fettleber .....	13
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>15</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Lebersinusoidale Endothelzellen und deren Etablierung im vasQchip</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Kultivierung der LSEC .....	19
3.1.1.1 Zellmedientest.....	19
3.1.1.2 Beschichtung.....	21
3.1.1.3 LSEC Passagen .....	23
3.1.2 Funktionsanalyse der LSEC außerhalb des vasQchips.....	24
3.1.2.1 Barriere der LSEC .....	24
3.1.2.2 Angiogenesepotential der LSEC.....	27
3.1.2.3 <i>Scavanger</i> Funktion von LSEC.....	28
3.1.3 Etablierung der LSEC im Mikrokanal des vasQchip .....	29
3.1.3.1 Bestimmung der Porengröße des vasQchip.....	29
3.1.3.2 Volumenstrom, Beschichtung und Besiedelungsmethode .....	32
3.1.3.3 Langzeitkultivierung der Endothelzellen im System .....	36
<b>3.2 Hepatozyten und deren Etablierung im vasQchip</b> .....	<b>39</b>
3.2.1 Kultivierung der Hepatozyten .....	40
3.2.2 Etablierung der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment des vasQchip .....	42
3.2.3 Hepatozyten im fluidischen vasQchip .....	44
3.2.3.1 Aktivitätsanalyse der Hepatozyten im vasQchip .....	45

<b>3.3</b>	<b>Kokultur aus Hepatozyten und LSEC und deren Etablierung im vasQchip</b>	<b>47</b>
3.3.1	Etablierung der Kokultur von Hepatozyten und LSEC.....	47
3.3.1.1	Medientest für die Kokultur.....	48
3.3.1.2	Direkte Kokultur von Hepatozyten und LSEC.....	51
3.3.1.3	Barriere-Integrität der Kokultur im Transwell®.....	53
3.3.2	Kokultur von LSEC und Hepatozyten im vasQchip.....	55
3.3.2.1	Etablierung der Kokultur im vasQchip .....	56
3.3.2.2	Analyse der Kokultur aus LSEC und Hepatozyten im vasQchip....	58
	Vergleich der Kokultur im statischen und fluidischen vasQchip .....	58
	Verhalten der Hepatozyten in der fluidischen Kokultur im vasQchip	61
	Viabilitätsanalyse der Kokultur im vasQchip.....	63
<b>3.4</b>	<b>Anwendungsmöglichkeiten des etablierten Lebermodells im vasQchip....</b>	<b>66</b>
3.4.1	Validierung des Lebermodells für dessen Anwendung in der Medikamentenforschung.....	66
3.4.1.1	Paracetamol induzierte Leberschäden.....	67
	Einfluss von Paracetamol auf das Lebersinusoid im Transwell®.....	70
	Paracetamol induzierte Leberschäden im vasQchip.....	71
3.4.1.2	CYP3A4 Aktivität der Hepatozyten im vasQchip.....	72
	Voruntersuchungen für die Aktivitätsanalyse von CYP3A4 im vasQchip .....	73
	Aktivitätsanalyse von CYP3A4 im Lebermodell des vasQchips.....	75
3.4.2	<i>Drug Targeting</i> im Lebermodell mithilfe von Peptoiden .....	77
3.4.2.1	Peptidsynthese .....	78
3.4.2.2	Toxizitätsanalyse von Peptoiden auf Leberzellen .....	80
3.4.2.3	Zelllokalisierung der Peptide .....	84
3.4.2.4	Wirkungsanalyse von Peptoid P216 im Lebersinusoid.....	88
	Peptoidanalyse im statischen Lebermodell im Transwell®-System.....	88
	Peptoidanalyse im fluidischen Lebermodell des vasQchips .....	91
3.4.3	Vaskularisiertes Lebertumormodell im vasQchip.....	94
<b>3.5</b>	<b>Erweiterungsmöglichkeiten des Lebermodells im vasQchip.....</b>	<b>97</b>
3.5.1	Hepatischer Fettmetabolismus und damit einhergehende Lebererkrankungen.....	97
3.5.1.1	2D Lebermodell eines physiologisch angepassten Fettsäurenmediums im Hinblick auf die Induktion einer hepatischen Steatose .....	97
	2D-Kultivierung der Huh7 und Behandlung mit zusätzlichen Fettsäuren .....	99

3D-Kultivierung der Huh7 im Zusammenhang mit zusätzlichen Fettsäuren.....	100
Huh7 Kultivierung im statischen vasQchip.....	105
Der Effekt von Nährstoffzusätzen auf den Lipidmetabolismus in unterschiedlichen Kultivierungsmethoden von Huh7.....	106
3.5.1.2 Verhalten von primären Leberzellen in einem supplementierten Nährmedium.....	112
Induzierte Lipidakkumulation in Hepatozyten.....	112
3.5.2 Erweiterte Dreidimensionalität durch Verwendung eines artifiziellen Gewebes im umgebenden Kompartiment des vasQchips.....	117
3.5.2.1 Voruntersuchungen für die Kultivierung der Hepatozyten im Hydrogel.....	118
3.5.2.2 Applikation des Hydrogels im vasQchip.....	124
3.5.3 Differenzierte Leberzellen – Die alternative, erneuerbare Leberzellenquelle aus Stammzellen.....	127
3.5.3.1 Pluripotenznachweis der Stammzellen.....	127
3.5.3.2 Differenzierung von LSEC aus hiPSC.....	129
<b>4 Material und Methoden.....</b>	<b>135</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>135</b>
4.1.1 Zelllinien.....	135
4.1.2 Verbrauchsmaterial.....	135
4.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	137
4.1.4 Antikörper.....	140
4.1.5 Zellkulturmedien.....	140
4.1.6 Puffer.....	142
4.1.7 Enzyme.....	142
4.1.8 Primer.....	143
4.1.9 Technische Geräte und Software.....	143
<b>4.2 Methoden.....</b>	<b>146</b>
4.2.1 Allgemeine Zellkultur.....	146
4.2.1.1 Beschichtung der Zellkulturoberflächen.....	146
Primäre Leberzellen.....	146
Stammzellen.....	146
4.2.1.2 Zellkultivierung.....	146
Langzeitlagerung und Auftauen der Zellen.....	147
Primäre Leberzellen.....	147
hiPSC (WTC11).....	147
LSEC-Differenzierung.....	147
4.2.2 3D-Zellkultur.....	149

4.2.2.1 Sphäroid-Präparation .....	149
4.2.2.2 Kokultur im Transwell® .....	149
4.2.2.3 vasQchip.....	150
Fertigung des vasQchip.....	150
Handhabung des vasQchip .....	150
4.2.2.4 Hydrogel .....	151
GelMA-Synthese.....	151
GelNB-Synthese.....	152
Gels-Synthese .....	152
GelMA-Hydrogel .....	153
GelNB/Gels-Hydrogel.....	153
4.2.3 Analysemethoden in der Zellkultur .....	154
4.2.3.1 Zelluläre Visualisierungen.....	154
Fixierung.....	154
Permeabilisierung .....	154
Markierung des Aktinzytoskelett .....	154
Markierung der DNA im Zellkern .....	155
<i>MitoTracker</i> <sup>TM</sup> Markierung der Mitochondrien .....	155
<i>CellTracker</i> <sup>TM</sup> Markierung des Zytosols.....	155
Immunfluoreszenzmarkierung .....	155
Durchflusszytometrie .....	156
4.2.3.2 Viabilitätsanalysen.....	157
PrestoBlue <sup>TM</sup> Assay .....	157
MTT-Assay .....	157
<i>CellTiterGlo</i> <sup>®</sup> Luminizenz Zellviabilität-Assay .....	157
Lebend-/Tod-Färbung .....	158
Wachstumskurven .....	158
4.2.3.3 Funktionalitätstests.....	158
Barriereintegritätsbestimmung mithilfe TEER-Messungen.....	158
P450-Glo <sup>TM</sup> CYP3A4 <i>Assay</i> .....	159
<i>Scavenger</i> -Funktion der LSEC mithilfe von Ovalbumin .....	159
Tubeformation- <i>Assay</i> .....	159
4.2.3.4 Lipidextraktion / Analyse .....	160
Proteinbestimmung (DC-Protein <i>Assay</i> ) .....	160
Lipidextraktion.....	160
Gaschromatographie/ Massenspektrometrie .....	161
Biochemische Analyse des Zellmediums .....	161
BODIPY Lipidmarkierung und Quantifizierung.....	162
<i>Oil-Red-O</i> -Lipidfärbung .....	162
4.2.4 Mikrobiologische Methoden.....	162



4.2.4.1 RNA-Isolation .....	162
4.2.4.2 DNA-Verdau .....	163
4.2.4.3 Reverse Transkription.....	163
4.2.4.4 Kontroll-PCR .....	163
4.2.4.5 RT-qPCR.....	164
4.2.5 Peptoid-Synthese.....	164
4.2.6 Statistische Auswertung.....	166
<b>5 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>167</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>169</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>A</b>



# Zusammenfassung

Ungefähr 40 % aller potenziellen Wirkstoffkandidaten für den Menschen werden auf Grund von Leberschäden verworfen. Dies geschieht häufig erst zu einem späten Zeitpunkt in der klinischen Testphase und zeigt, dass ein deutliches quantitatives Defizit in dem Vorhersagepotential von präklinischen Modellen besteht. Diese Unzuverlässigkeit in der präklinischen Phase kann zum einen durch die speziesspezifischen metabolischen Unterschiede zu Tiermodellen erklärt werden. Zum anderen wird in der herkömmlichen 2D-Zellkultur die natürliche 3D-Mikroumgebung sowie weitere physiologische Parameter der jeweiligen Zellen im Gewebe nicht korrekt nachgebildet, wodurch eine humane Lebertoxizität von potenziellen Wirkstoffen innerhalb der Medikamentenentwicklung erst während der klinischen Phase detektiert werden kann. Mit biochemischen Verfahren aus der artifiziellen Geweberekonstruktion, dem *Tissue Engineering*, können die Defizite der weit verbreiteten 2D-Zellkultur überwunden und die Aussagekraft von *in vitro* Modellen erhöht werden. Ein großer Bereich des *Tissue Engineerings* umfasst sogenannten *Organ-on-a-Chip* Systeme. Dies sind Modelle, welche eine *in vitro* Rekonstruktion menschlicher Organstrukturen auf zellulärer Ebene erlauben. *Organ-on-a-Chip* Systeme ermöglichen neben einer Dreidimensionalität auch einen artifiziellen, mikrofluidischen Blutstrom, wodurch vaskuläre Eigenschaften im Modellsystem nachgebildet werden können was in einer verbesserten, naturgetreuen Wirkstofftestung resultiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die funktionelle Einheit der Leber, das Sinusoid, in einem *Organ-on-a-Chip* System, dem vasQchip, rekonstruiert. Der vasQchip besteht aus zwei Kompartimenten, einem porösen halbrunden Mikrokanal und einem umgebenden Kompartiment. Der Mikrokanal eignet sich aufgrund der Integration eines artifiziellen Blutflusses hervorragend für die Nachbildung von Blutgefäßen der Leber, während in das umgebende Kompartiment leberspezifische 3D-Gewebestrukturen eingebracht werden können.

Für die Rekonstruktion der Leber wurden in dieser Dissertation ausschließlich primär modifizierte humane Leberzellen verwendet, um ein möglichst naturgetreues humanes Lebermodell aufzubauen. Daneben wurden auch pluripotente Stammzellen in einer Leberzellendifferenzierung eingesetzt. Für die Validierung der Methode wurde zunächst das Verhalten der primären Leberzellen in herkömmliche 2D-Zellkulturen in verschiedenen Nährmedien und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen mithilfe von quantitativen mRNA-Expressionsanalysen (RT-qPCR) und Immunfluoreszenzanalysen leberspezifischer Proteine analysiert. Neben der Untersuchung der Metabolisierungskapazität von Glucose und verschiedenen Fettsäuren, wurde auch die Lebertoxizität von Ethanol und zytostatischen Molekülen untersucht. Die vorgenommenen Untersuchungen beinhalteten die Charakterisierung der Barrierefunktion des leberspezifischen Endothels in einer Kokultur mit Hepatozyten wofür unter anderem TEER-Messungen eingesetzt wurden. Weiter wurde durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen und Besiedelungsmethode die Etablierung der LSEC in Kombination mit einer mikrofluidischen Strömung im Mikrokanal des

vasQchips ermöglicht. Expressionsanalysen und immunhistochemische Markierungen mit anschließender konfokalmikroskopischer Visualisierung bestätigten einen positiven Einfluss des mikrofluidischen Flusses auf die LSEC. Die parenchymalen Hepatozyten der Leber konnten erfolgreich im umgebenden Kompartiment des vasQchips eingebracht und hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität von CYP3A4 untersucht werden. Nach Validierung der Kokultur von LSEC und Hepatozyten im mikrofluidischen vasQchip bezüglich der Zellviabilität und des Expressionsverhaltens bedeutsamer Leberproteine konnte ein signifikanter Vorteil in der Zellviabilität des fluidisch kultivierten Lebermodells gegenüber einem statischen Modell bestätigt werden. Für das implementierte Lebermodell konnte eine 7-tägige bis 3-wöchige Kultivierungszeit erzielt werden. Darüber hinaus konnte mit Hilfe einer gelatinebasierten Stützmatrix, einem photovernetzbaarem GelNB/GelS-Hydrogel, ein 3D-Hepatozytengewebe im umgebenden Kompartiment aufgebaut werden. Das validierte Lebermodell im vasQchip wurde zur Lebertoxizitätsanalyse des Analgetikums Paracetamol und des Antibiotikums Rifampicin eingesetzt. So konnte eine dosisabhängige Reaktion von Paracetamol mit induzierter toxischer Überdosis beobachtet werden. Ebenfalls wurden im Rahmen dieser Dissertation leberspezifische Peptide synthetisiert und auf Toxizität und deren Wirkungsort in den etablierten Lebermodellen untersucht. So wurde ein vielversprechendes Peptoid als potenzielles Anti-Krebstherapeutikum im mikrofluidischen Lebermodell identifiziert. Zusätzlich wurden erste Schritte unternommen um das Krankheitsbild der nicht-alkoholischen Fettleber ausgehend von einem gesunden Lebermodell zu rekonstruieren, indem Hepatozyten (in einer 2D- und 3D-Zellkultur) mit einem fettsäurehaltigem Nährmedium behandelt wurden. Durch Analyse des Hepatozyten-Fettstoffwechsels konnten erste vielversprechende Sekretionen von Triacylglycerol, Lactat und 3-Hydroxybuterat in der 3D-Zellkultur gemessen und mit einer 2D-Zellkultur verglichen werden.

Das Lebersinusoid im vasQchip konnte im Rahmen dieser Dissertation erfolgreich implementiert und evaluiert werden. Die Viabilität-, Aktivität- und Wirkstoffanalysen des etablierten Modells zeigen ein großes Potenzial für eine verbesserte Medikamentenforschung in der präklinischen Phase und ermöglicht eine frühe Identifizierung von potenziell lebertoxischen Medikamenten. Weitere mögliche Anwendungsgebiete sind Krankheitsmodelle, Stammzelltechnologien und 3D-Biodruckverfahren.

# 1 Einleitung

Mehrere Milliarden US-Dollar werden für die Entwicklung eines neuen Medikaments bis zur Markteinführung benötigt.<sup>[1-3]</sup> Der Entwicklungszeitraum erstreckt sich im Durchschnitt über 10 Jahre, wobei 96 % der potenziellen Arzneistoffe scheitern, wovon ca. 90 % erst spät in der klinischen Phase, direkt vor der Zulassung und Markteinführung disqualifiziert werden.<sup>[4,5]</sup> Häufig ist das Scheitern zu einem so späten Zeitpunkt in der Entwicklungsphase von Medikamenten, auf eine Lebertoxizität zurückzuführen, welche in der präklinischen Phase nicht detektiert werden konnte. So werden etwa 40 % der abgewiesenen Pharmazeutika auf Grund medikamenteninduzierter Leberschäden als potentiell toxisch eingestuft und verworfen.<sup>[6]</sup> Diese Ineffizienz in der Präklinischen Testphase und insbesondere in der Vorhersage von medikamenteninduzierter Leberschäden ist bis heute ein Problem in der Medikamentenforschung. Heutzutage besteht die präklinische Testphase von potenziellen Wirkstoffen fast ausschließlich aus zweidimensionalen (2D)-Zellkulturuntersuchungen und *in vivo* Tierversuchen. Diese ermöglichen es Informationen über den potenziellen Wirkstoff nach dem AMED (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicology*) Prinzip zu sammeln und zusätzlich physiochemische und pharmakokinetische Untersuchungen durchzuführen.<sup>[7]</sup> Ein potentieller Wirkstoff wird so zunächst charakterisiert und validiert, um anschließend in der klinischen Phase am Menschen getestet zu werden. Die jeweiligen Stufen der Medikamentenforschung sind in Abbildung 1 dargestellt. Die unzureichende Verifizierung von Wirkstoffen in der präklinischen Phase wird in erster Linie auf eine unzureichende Berücksichtigung der humanen *in vivo*-Bedingungen in den präliminären Untersuchungen zurückgeführt.<sup>[8]</sup> So ist eine 2D-Zellkultur nicht mit einer multizellulären 3D-Kultur vergleichbar, während Tierversuche die physiologischen Bedingungen im Menschen nur unzureichend repräsentieren und der abweichender Genotyp zu abweichendem Verhalten gegenüber den Testsubstanzen führen kann.<sup>[9,10]</sup>

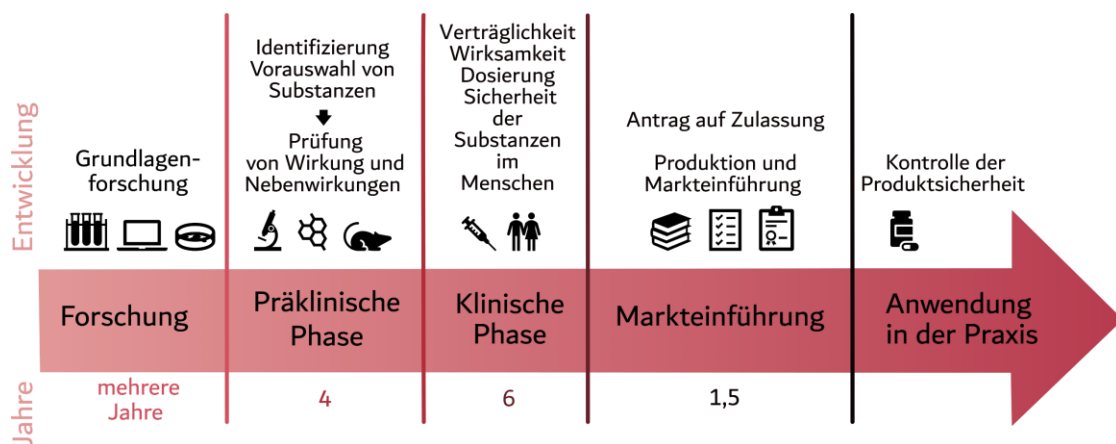


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Medikamentenforschung. Modifiziert nach Hughes *et al.*<sup>[7]</sup>

Diese Diskrepanz ist besonders in Bezug auf hepatotoxische Substanzen mit einer beobachteten 40 %igen Fehlerrate sehr prägnant.<sup>[11,12]</sup> Insbesondere zeigt die metabolischen Enzymaktivitäten von Cytochrom P450 (CYP450) im Medikamentenstoffwechsel erhebliche Unterschiede zwischen Menschen und Tieren.<sup>[13]</sup> Neben den Differenzen im Metabolismus ist der Einsatz von Tierversuchen in der Forschung ethisch kritisch angesehen, weshalb an alternativen Methoden mit hoher Priorität geforscht wird. Eine dieser Methoden ist das sogenannten *Tissue Engineering* in welcher die *in vitro* Rekonstruktion von Geweben und Organen, mit dem Ziel diese im Menschen zu implantieren, nachgegangen wird.<sup>[14,15]</sup> In Kombination mit einer artifiziellen Mikrofluidik im rekonstruierten Gewebe, können sogenannte *Organ-on-a-Chip* Systeme entstehen, welche nicht nur eine authentischere Rekonstruktion physiologischer Bedingungen erlauben, sondern auch die Herstellung personalisierter und patientenspezifischer Lebermodelle fördern.<sup>[16]</sup> Dieser Forschungsbereich ist darüber hinaus von großem Interesse für die präklinische Medikamentenforschung und bereits auf einem Niveau das die US-amerikanische Arzneimittelbehörde *Food and Drug Administration* (FDA) im April 2023 Tierversuche als optional erklärte, falls zellbasierte Untersuchungen oder Computermodellierungen diese ersetzen können.<sup>[17-19]</sup>

## 1.1 Tissue Engineering

Das interdisziplinäre *Tissue Engineering* vereint verschiedene fachliche Disziplinen aus Maschinenbau, Materialwissenschaft, Physik, Biologie und Medizin.<sup>[20]</sup> Der Fokus liegt dabei immer auf der Rekonstruktion von Gewebe und komplexen, dreidimensionalen (3D) Organstrukturen in einer Laborumgebung außerhalb des menschlichen Körpers.<sup>[15]</sup> Das Ziel ist es, biologische Ersatzstrukturen zu erschaffen, welche die Gewebe- und Organfunktionen für deren Untersuchung oder Anwendung im Bereich der Transplantation beibehalten.<sup>[21]</sup> So können bereits definierte Strukturen gezielt dreidimensional mit Biodruckverfahren hergestellt werden.<sup>[22-24]</sup> Durch Mikrorekonstruktion funktioneller Organeinheiten in mikrofluidischen *Organ-on-a-Chip* Modellen werden Diffusionsstudien, verbesserte Zellversorgung und physiologische Bedingungen imitiert. Die Verwendung von Stammzelltechnologien in der Geweberekonstruktion ermöglicht einen nahezu unlimitierten Zugang zu einer Vielzahl an verschiedenen Zelltypen und es können bereits Knorpel, Haut und Knochen im Labor nachgebildet und klinisch eingesetzt werden.<sup>[23,25,26]</sup> Die unterschiedlichen Arten der 3D-Zellkultur ermöglichen eine authentischere Rekonstruktion von verschiedensten physiologischen Bedingungen, was ein enormes Potential in Anwendung, Forschung und Entwicklung birgt.<sup>[8,15,22,23]</sup>

### 1.1.1 Zellkultivierungsmethoden

Eine zuverlässige, authentische *in vitro* Leberzellkultur ist ausschlaggebend für eine effiziente und erfolgreiche Untersuchung von potenziellen Wirkstoffen.<sup>[27]</sup> Komplexe Zusammenhänge der Zellbiologie des Menschen wurden über ein Jahrhundert mit diverse *in vitro* zellbasierte Studien untersucht. Mit der modernen Forschung zeichnet sich jedoch immer mehr ab, dass 2D-Zellkulturmodelle abweichende Eigenschaften bezüglich der *in vivo* Bedingungen aufweisen, deren Nachstellung nur mit einer 3D-Zellkultur möglich ist.<sup>[23,28]</sup> So wird durch die planare 2D-Kultivierungsform unter anderem die natürliche Zellform verändert, was wiederum Folgen auf deren Bioaktivität hat.<sup>[28]</sup> Zellen sind im Körper in allen Dimensionen von einer komplexen Mikroumgebung bestehend aus einer extrazellulären Matrix (ECM) und weiteren Zellen umgeben.<sup>[29]</sup> Die ECM ist eine Stützstruktur aus Wasser, Proteinen und Polysacchariden, welche unter anderem mit biochemischen und biomechanischen Reize auf die Zellen einwirkt.<sup>[30]</sup> Die davon ausgehenden Einflüsse, Stimuli und Signale führen zur Expression von zellspezifischen Funktionen und initiieren eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen.<sup>[28]</sup> Infolgedessen wurden 3D-Zellkultursysteme entwickelt, welche die Defizite der 2D-Zellkultur durch eine repräsentativere, detailliertere 3D-Anordnung von verschiedenen Zellen und Stützstrukturen überwinden. In Abbildung 2 wird ein Überblick der unterschiedlichen 2D, 2,5D und 3D-Zellkulturmodelle schematisch dargestellt. Eine authentischere Imitation des zellulären Gewebes ist durch die Kultivierung in Zellaggregaten, sogenannten Sphäroiden bzw. Organoiden möglich. Durch die Zellaggregation synthetisieren die Zellen eine ECM, wodurch eine artifizielle Stützmatrix nicht benötigt wird.<sup>[28]</sup> Die Kokultur unterschiedlicher Zelltypen in Sphäroidform und die Differenzierung von Stammzellen in multizelluläre Organoide ermöglicht unter anderem die Rekonstruktion von Leberkrankheitsmodellen wie der nicht-alkoholischen Fettleber (NAFLD) oder medikamenteninduzierte Leberschäden.<sup>[31-33]</sup> Die 3D-Zellkultivierung in Sphäroid- bzw. Organoidform ist jedoch abhängig von deren Form und Größe und durch die begrenzte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Sphäroidkerns limitiert.<sup>[8,34]</sup> Stützmatrizen aus biologischen oder artifiziellen Ausgangsmaterialien können diese Limitierung aufheben.<sup>[8]</sup> Hydrogele, die aus einem Netzwerk aus hydrophilen Makromolekülen bestehen und durch Wasserstoffbrücken eine hohe Wasserspeicherkapazität besitzt, repräsentieren ein solches Zellgerüst.<sup>[14,28,35,36]</sup> Durch ihre gewebeähnliche Elastizität und Permeabilität haben sie eine Vielzahl von Anwendung im Bereich des *Tissue Engineerings* gefunden.<sup>[37,38]</sup> Polymere, die den Anforderungen eines Hydrogels entsprechen, können biologischen Ursprungs sein oder artifiziell synthetisiert werden. Natürliche Hydrogele wie Alginat, Kollagene und Gelatine werden kontinuierlich durch synthetische oder semisynthetische Hydrogele ersetzt.<sup>[23]</sup> Durch eine Modifizierung der Grundstrukturen von natürlichen vorkommenden Hydrogelen oder der Verwendung von vollsynthetischen Hydrogelen kann deren Gelstabilität, Wasserspeicherung und Anwendungsdauer verbessert werden, was sie gegenüber den natürlichen Hydrogelen abhebt.<sup>[23,36]</sup>

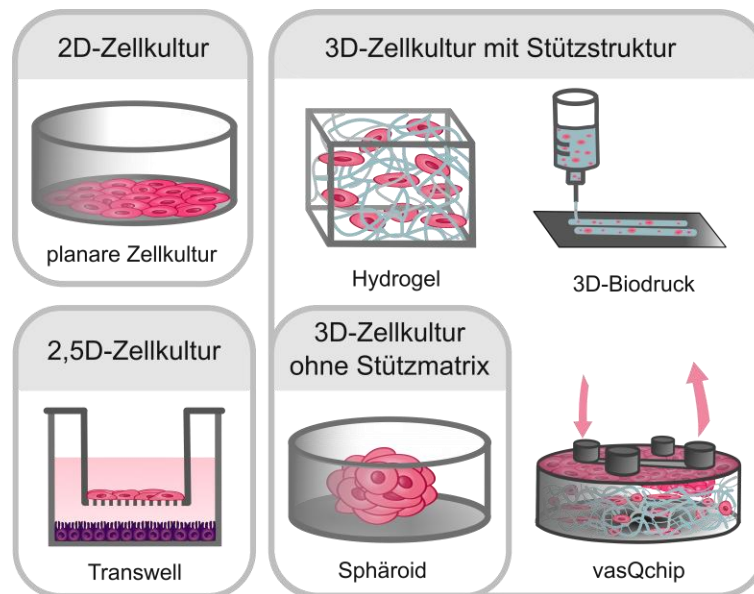


Abbildung 2: Zellkultivierungsmethoden im *Tissue Engineering*. Die herkömmliche 2D-Zellkultur ist durch die planare Zellschicht einfach in der Handhabung und weitverbreitet. Sphäroide sind akkumulierte Zellen welche ohne Stützmatrix ein 3D-Zellgewebe bilden. Durch Anwendung von Stützgeweben können, komplexere 3D-Zellkulturmodelle, entsprechend natürlichen Gewebsstrukturen rekonstruiert werden. Durch die Verwendung eines Makromolekül-Netzwerks, wie den Hydrogelen können Zellen in einer 3D-Mikroumgebung kultiviert und definierte Strukturen durch den 3D-Biodruck erschaffen werden. Kokultursysteme wie das Transwell® ermöglichen eine Kultivierung von unterschiedlichen Zelltypen mit Signalaustauschkapazitäten durch eine poröse Polycarbonatmembran. Der vasQchip gehört zu den *Organ-on-a-Chip* Modellen welche sich durch ein mikrofluidischen Strom gegenüber anderen Zellkultivierungssystemen abhebt.

Der prominenteste Vertreter der Hydrogele ist das hydrolysierte Kollagen, welches auch unter dem Namen Gelatine bekannt ist.<sup>[24,39-41]</sup> Durch eine chemische Funktionalisierung von Gelatine mit photovernetzbaeren Gruppen entsteht ein semisynthetisches Hydrogel.<sup>[42,43]</sup> Dabei wird die biologische Kompatibilität der Gelatine durch die Präsentation sogenannter RGD Peptiden (Arg-Gly-Asp) welche eine Zelladhäsion ermöglicht, verbunden mit einer mechanischen Stabilität basierend auf einer kovalent Quervernetzung der Proteinstrukturen.<sup>[39]</sup> Die mechanischen und biologischen Eigenschaften der Gelatine basierten Hydrogele ermöglichen eine 3D-Zellkultur, welche bereits heute Anwendung in der Rekonstruktion von Knochen und Hautgeweben findet.<sup>[39,44]</sup> Mithilfe des 3D-Biodrucks können funktionalisierte Hydrogele mit eingeschlossenen Zellen in definierte Strukturen gedruckt werden, wodurch neue innovative Möglichkeiten der Geweberekonstruktion entstehen.<sup>[23,24]</sup> Transport von Nährstoffen, Gas und Abfallprodukten ist in der 3D-Kultivierungsform in Hydrogelen lediglich durch Diffusion gewährleistet. Eine gezielte Perfusion der 3D-Zellkultur kann die *in vitro* Bedingungen eines vaskularisierten Gewebes rekonstruieren und die Zellviabilität und deren spezifische Funktion erhalten.<sup>[16]</sup> *Organ-on-a-Chip* Modelle wie der vasQchip erweitern die natürliche Nachbildung von organspezifischem Gewebe durch eine eingebundene mikrofluidische Kanäle, die Blutgefäße imitieren, dessen Aufbau in Kapitel 1.1.2 genauer erläutert wird.<sup>[16,45]</sup> Für eine gezielte Kokultur von unterschiedlichen Zelltypen werden oft Systeme wie Transwells® eingesetzt (Abbildung 2), deren poröse Polycarbonatmembran das basale vom apikalen Kompartiment trennt



und einen Signalaustausch von verschiedenen Zelltypen zwischen den Kompartimenten ermöglicht.<sup>[46]</sup> Medikamenten- und Efflux-Studien können beispielsweise in diesem Zusammenhang an einer etablierten Barriere durchgeführt werden.<sup>[47]</sup> Die 3D-Zellkultur im Bereich des *Tissue Engineerings* ist somit ein Begriff, welcher diverse Zellkultivierungsmethoden zusammenfasst. Alle Methoden versuchen durch strukturelle und mechanische Annäherungen, die *in vivo* Bedingungen von Geweben und Organe authentisch widerzuspiegeln.

### 1.1.2 *Organ-on-a-Chip* Systeme

Die Notwendigkeit einer adäquaten Alternative für Tierversuche wurde in Kapitel 1 bereits im vorgestellt. Meist rechtfertigen die hohen Kosten, der Zeitaufwand und ethische Fragen die daraus resultierenden unzuverlässigen Vorhersagen bezüglich klinischer Studien nicht.<sup>[9,18]</sup> Hervorgehend aus dem *Tissue Engineering*, der Mikroprozesstechnik und dem Zugang zu menschlichen Zellen wurde die Entwicklung von sogenannte *Organ-on-a-Chip* Systeme vorangetrieben.<sup>[48]</sup> Diese ermöglichen unter Berücksichtigung von entsprechenden molekularen und extrazellulären Einflüssen die *in vitro* Kultivierung von humanen Zellen in Gewebe typischen 3D-Umgebungen.<sup>[48]</sup> Das Ziel ist die Etablierung einer funktionellen Einheit, die bestimmte physiologische Kompartimente und Prozesse in einer kontrollierten Umgebung nachbildet.<sup>[48]</sup> Die unterschiedlichen *Organ-on-a-Chip* Plattformen für die Kultivierung von organspezifischen zellulären Strukturen und Gewebe variieren in ihrer Größe und Form. Sie sind jedoch aus vaskularen Strukturen aufgebaut und besitzen meist Mikrokanäle, in welchen ein dynamischer Fluss angelegt werden kann.<sup>[18]</sup> Die Integration eines artifiziellen Blutstroms im System erlaubt die Versorgung der rekonstruierten Gewebe mit Nährstoffen, wodurch sich diese Kultivierungsmethode von der 2D-Zellkultur und den Sphäroiden und Organoiden abhebt.<sup>[8,18,48]</sup> Neben der verbesserten Nährstoff- und Gaszufuhr können in *Organ-on-a-Chip* Systemen Sensoren für Echtzeitanalysen, sowie mechanische Stimulationseinheiten verbaut werden.<sup>[49]</sup> Innerhalb der letzten 13 Jahre wurde eine Vielzahl an Organ- und Krankheitsmodellen im *Organ-on-a-Chip* rekonstruiert, welche zukünftig in der Wirkstoffentwicklung und personalisierten Medizin eingesetzt werden könnten.<sup>[18]</sup> Dazu zählen Organe und deren funktionelle Einheiten wie Gehirn, Herz, Niere, Lunge und Leber.<sup>[50-55]</sup> Im Bereich der Wirkstoffforschung spielt vor allem die Leber eine zentrale Rolle, da sie für die Verstoffwechselung von Xenobiotika mittels chemischer Biotransformation verantwortlich ist.<sup>[56-58]</sup> Xenobiotika, wozu auch Medikamente zählen, sind chemische Substanzen welche nicht natürlich im menschlichen Körper vorkommen und vom Körper abgebaut und ausgeschieden werden.<sup>[56]</sup> *Liver-on-a-Chip* Modelle sind daher für die Untersuchung von Wirkstoffen, deren Metabolismus, sowie deren Hepatotoxizität von großer Bedeutung.<sup>[16,59,60]</sup>

### 1.1.2.1 Ein vaskularisiertes *Organ-on-a-Chip* System: der vasQchip

Der sogenannte vasQchip gehört zu den vaskularisierten *Organ-on-a-Chip* Systemen und wurde in der Gruppe von Prof. Dr. Schepers am Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) entwickelt.<sup>[61]</sup> Der vasQchip hebt sich durch seinen halbrunden Mikrokanal von anderen *Organ-on-a-Chip* Systemen ab (Abbildung 3), welcher aus einer perforierten Polycarbonat-Membran besteht, die einen Stoffaustausch mit dem umgebenden Kompartiment des vasQchips ermöglicht. Eine Mikrofluidik im Mikrokanal repräsentiert dabei den Blutfluss für die Versorgung des umgebenden Kompartiments durch die Poren im Mikrokanal. Dieser Aufbau realisiert eine *in vivo* nahe Nachbildung von Blutgefäßen und jeglichen anderen Barrieren des menschlichen Körpers, wie der Blut-Hirn-Schranke, der Blut-Retina-Schranke im Auge oder das Sinusoid der Leber.<sup>[50,62]</sup> Abbildung 3 zeigt schematisch den Herstellungsprozess des vasQchips, welcher mit der Herstellung des porösen Mikrokanals beginnt. Das Ausgangsmaterial, eine Polycarbonatfolie, wird dabei nach der SMART (*Substrate Modification and Replication by Thermoforming*) Methode modifiziert.<sup>[63,64]</sup> Die mit Schwerionen beschossene Polycarbonatfolie (50 µm Dicke und 10<sup>6</sup> Ionenspuren/cm<sup>2</sup>) wurde kommerziell erworben und durch Mikrothermoformen (147 °C, 4 Bar, 30 s-1,5 min) für die Fabrikation des halbrunden Mikrokanals verwendet. Anschließend erfolgt eine Öffnung der Ionenspuren durch Ätzung mit einer starken Base wie Natriumhydroxid (NaOH) und dem Detergens Dowfax. Die Dauer des nasschemischen Ätzungsverfahrens definiert dabei den Durchmesser der entstehenden Poren (1 – 5 µm). Der poröse Mikrokanal (Breite: 1 mm, Länge: 2 cm, Tiefe: 300 µm) wird anschließend auf eine Halterung angebracht und das umgebende Kompartiment wird durch ein Deckglas versiegelt. Die Halterung enthält außerdem Anschlussmöglichkeiten zur Integration einer Mikrofluidikpumpe für einen mikrofluidischen Fluss im Mikrokanal. Die geformte tubuläre Struktur des Mikrokanals ermöglicht es, Gefäßstrukturen und deren Gegebenheiten im menschlichen Körper verbessert nachzubilden. Die Schubspannung, welche durch den Medienfluss im Mikrokanal auf die Zellen an der Kanalwand wirkt, wird durch die halbrunde Form *in vivo* ähnlich rekonstruiert.<sup>[61]</sup>

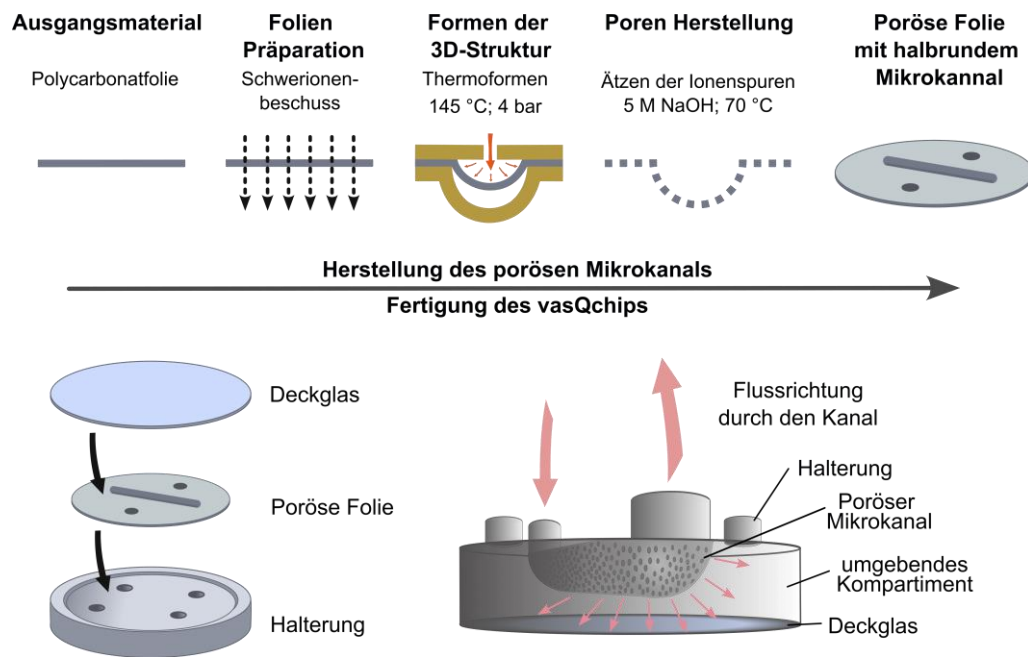


Abbildung 3: Schematische Darstellung der vasQchip-Fertigung. Der poröse Mikrokanal wird mithilfe der SMART-Technologie hergestellt. Durch Modifikation, Thermoformen und Ätzen werden die Poren und die Form des Mikrokanals definiert. Mit anschließender Fertigung des vasQchips durch Anbringung des Mikrokanals auf eine Halterung und Versiegelung des umgebenden Kompartiments entsteht ein Modell für dessen Anwendung in der Zellkultur. Modifiziert nach Kappings *et al.*<sup>[61]</sup>

## 1.2 Die Leber

Die Leber ist ein lebenswichtiges Organ welches metabolische Prozesse wie Glucose- und Fetthomöostase, xenobiotische Verstoffwechslung und Detoxifizierung koordiniert.<sup>[56]</sup> Sie ist das größte Organ im menschlichen Körper und ist im rechten Bereich des Oberkörpers platziert.<sup>[65]</sup> Ungefähr 25 % des sauerstoffreichen Blutes, welches innerhalb eines Herzschlag freigesetzt wird tritt über die Leberarterie in die Leber ein.<sup>[66,67]</sup> Gleichzeitig wird durch die Pfortader nährstoffreiches Blut aus dem Gastrointestinaltrakt in die Leber transportiert, welches sich im Lebersinusoid mit arteriellen Blut in einem Verhältnis von 1:3 vermischt. Anschließend wird dieses durch das Lebergewebe in die Zentralvene geschleust und durch die untere Hohlvene wieder zurück zum Herz transportiert.<sup>[67,68]</sup> In Abbildung 4 ist der Blutfluss in der Leber schematisch dargestellt. Zudem werden Sekrete der Leber, die sogenannte Gallenflüssigkeit durch den Gallengang in den Darm geleitet.<sup>[65]</sup> Die anatomische Struktur der Leber wird in zwei Leberlappen (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*) unterteilt. Sie sind verbunden durch das Sichelband, welches die Leber in der Bauchwand verankert.<sup>[65]</sup> Die mikroskopische Feinstruktur der Leber besteht aus sogenannten Leberläppchen (*Lobuli*).<sup>[69]</sup> Sie bilden das Lebergewebe und sind polygonal geformte strukturelle Einheiten mit der Zentralvene in ihrem Zentrum. Radiär laufen auf die Zentralvene Hepatozytenstränge zu, welche durch Kapillare (Lebersinusoid) und Gallenkanälchen getrennt werden. Das Lebersinusoid mündet dabei in der Zentralvene und die Gallenkanälchen im entgegengesetzten Gallengang. In den Ecken der Leberläppchen befindet sich das Portalfeld mit der Leberarterie, Portalvene und dem Gallengang.<sup>[69,70]</sup>

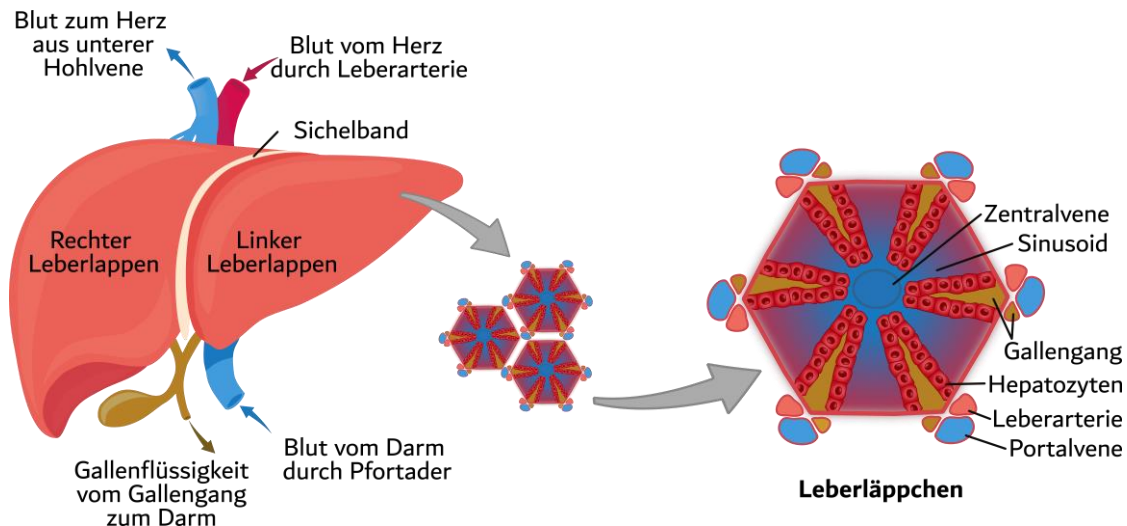


Abbildung 4: Schematischer, struktureller Aufbau der Leber und deren Einbindung im Blutkreislauf. Die anterior dargestellte Leber wird in einen rechten und einen linken Leberlappen unterteilt, welche durch das Sichelband getrennt sind. Die Leber bekommt sauerstoffhaltiges durch die Leberarterie aus dem Herz geliefert. Nährstoffreiches Blut wird über die Pfortader in die Leber geleitet, während das Blut über die Hohlvene die Leber anschließend wieder verlässt. Zudem wird die Gallenflüssigkeit über den Gallengang von der Leber in den Darm transportiert. Das Leberläppchen fasst die Feinstruktur des Lebergewebes zusammen. Bänder aus Hepatozyten laufen radial auf die mittige Zentralvene zu, wobei sich die Hepatozyten von der Portalvene, Gallengang oder Leberarterie erstrecken. Die einlagigen Hepatozytenbänder werden durch Lebersinusoiden oder Gallenkanälchen separiert, welche gegenströmig Gallenflüssigkeit zu den Gallengängen oder Blut zur Zentralvene transportieren. Die Leberläppchen sind repetitive Einheiten, welche aneinandergereiht das Lebergewebe bilden. Modifiziert nach Abdel-Misih *et al.* und Gordillo *et al.*<sup>[65,70]</sup>

## 1.2.1 Histologie der Leber

Wird die Feinstruktur der *Lobuli* in Abbildung 5 betrachtet, dann werden die zellulären Grundlängen der jeweiligen Strukturen der Leber ersichtlich. Hepatozyten, lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC), Stellatzellen und Kupfferzellen sind die Hauptzelltypen welche die Leber aufbauen und deren Funktion aufrechterhalten.<sup>[71]</sup> Hepatozyten repräsentieren mit ungefähr 60 % den Hauptbestandteil der Zellmasse in der Leber.<sup>[72,73]</sup> Die restliche Zellpopulation der Leber besteht zu 20 % aus den nicht-parenchymalen LSEC, zu 5 % aus Stellatzellen und zu 15 % aus Kupfferzellen.<sup>[56,71]</sup> Die LSEC kleiden das Blutgefäß aus und grenzen somit die darunterliegenden Hepatozyten vom sinusoidalen Lumen ab (Abbildung 5).<sup>[74,75]</sup> Der Spalt von Disse ist der räumliche Abstand zwischen den LSEC und Hepatozyten.<sup>[76]</sup> Stellatzellen sind unter anderem in der Speicherung von Vitamin-A und Fetten involviert und im Spalt von Disse zwischen Hepatozyten und LSEC vorzufinden.<sup>[77]</sup> Kupfferzellen sind hepatische Makrophagen und befinden sich im Sinusoid, wo sie in der Immunabwehr beteiligt sind.<sup>[71,78]</sup> In der Leber können drei unterschiedliche Kompartimente identifiziert werden. Die Hepatozyten welche das Lebergewebe bilden, die Gallenkanälchen welche das Lebergewebe durchziehen und das vaskuläre System welches das Lebersinusoid bildet.<sup>[76]</sup>

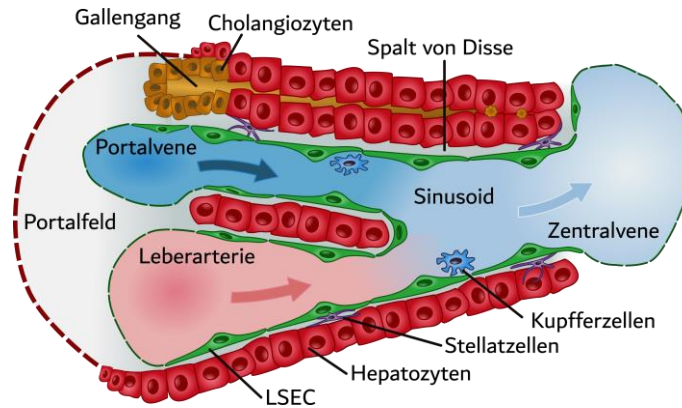


Abbildung 5: Zellulärer Aufbau des Leberläppchens. Das Sinusoid wird durch das diskontinuierliche Endothel aus lebersinusoidalen Endothelzellen (LSEC) definiert. Das sauerstoffreiche Blut aus der Leberarterie wird mit dem nährstoffreichen Blut aus der Portalvene im Sinusoid vermischt und an die Zentralvene weitergeleitet. Stellatzellen befinden sich im Spalt von Disse zwischen Hepatozyten und LSEC, wohingegen Kupferzellen, leberspezifische Makrophagen auf dem Endothel im Sinusoid vorkommen. Hepatozyten sekretieren Gallensalze in das Gallenkanälchen, welche in den von Cholangiozyten definierten Gallengang geleitet werden. Modifiziert nach Gordillo *et al.*<sup>[70]</sup>

### 1.2.1.1 Lebersinusoid

Das Lebersinusoid ist die kleinste funktionelle Einheit der Leber und spielt eine zentrale Rolle in der Funktion der Leber. Für einer Leberrekonstruktion im Bereich der *Organ-on-a-Chip* Systeme wird das Lebersinusoid nachgebildet und validiert, um die wichtigsten Funktionen der Leber zu repäsentieren. Das Lebersinusoid ist eine spezialisierte Blutkapillarnetzwerk der Leber, welches sich durch offene Poren oder sogenannten Fenestrierungen in der LSEC-Schicht von anderen Blutgefäßen unterscheidet.<sup>[79]</sup> Sauerstoffreiches Blut aus der Leberarterie wird im Sinusoid mit nährstoffreichem Blut aus der Portalvene vermischt und durch die Fenestrierungen gefiltert.<sup>[76,79]</sup> Der Porendurchmesser in den LSEC selektiert dabei die Partikel, Substrate und Zellen im Blut nach ihrer Größe.

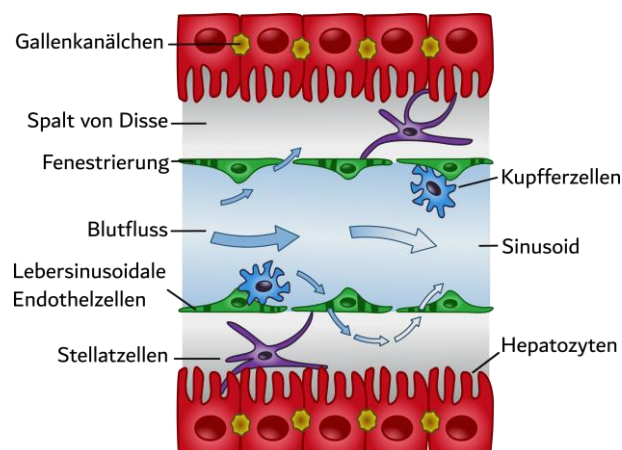


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Lebersinusoids. Der vaskuläre Blutfluss im Sinusoid übt eine Schubspannung auf das diskontinuierliche Endothel der LSEC aus, wodurch es zu einem Plasmaaustausch zwischen Sinusoid und Spalt von Disse kommt. Der Spalt von Disse wird von LSEC und Hepatozyten begrenzt und zeichnet sich durch eine abwesende Basalmembran aus, wodurch ein bidirektionaler freier Fluidaustausch zwischen dem Sinusoid und den Hepatozyten möglich ist. Modifiziert nach Kang *et al.*<sup>[80]</sup>

Dies ermöglicht den bidirektionale Transport von Plasmamolekülen der Größe  $< 150\text{-}175\ \mu\text{m}$  in den Spalt von Disse. Das gemischte Blut wird durch die Fenestrierungen gefiltert. Immunzellen, Metabolite, Plasmaproteine, Wirkstoffe, Lipoproteine sowie Viren diffundieren so über den Spalt von Disse zu den Hepatozyten.<sup>[79,81,82]</sup> Die ECM im Spalt von Disse zeichnet sich durch eine sehr geringe Dichte aus.<sup>[79,83–85]</sup> Infolgedessen ist eine freie Diffusion der selektierten Moleküle möglich und es wird kein osmotischer, oder hydrostatischer Druckgradient für deren Transport zu den Hepatozyten benötigt.<sup>[82]</sup> Stellatzellen sind im Spalt von Disse zwischen LSEC und Hepatozyten vorzufinden, welche für die Speicherung von Vitamin A zuständig sind und sich durch Aktivierung in Myofibroblasten differenzieren.<sup>[76]</sup> Die Myofibroblasten zeichnen sich durch eine erhöhte Kollagen- sowie weitere ECM-Protein-Sekretion aus, welche die Struktur und die Steifigkeit im Raum von Disse verändern und somit die Filtrationseigenschaft der Leber durch Schließung der Fenestrierungen der sinusoidalen Kapillaren beeinflussen. Hohe Kollagengehalte im Spalt von Disse führen ebenfalls zur Differenzierung von Hepatozyten zu myofibroblasten, was zu Krankheiten wie der Leberfibrose und der Leberzirrhose bzw. der Steatohepatits führen.<sup>[76,84]</sup> Die Differenzierung der Stellatzellen kann dabei durch Alkohol katalysiert werden. Kupferzellen können im Sinusoid an die Endothelzellschicht adherieren und sind Teil des unspezifischen Immunsystems. Sie sind die ersten Makrophagen, welche mit pathogenen Stimuli, wie Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in Kontakt kommen und diese mithilfe von anderen Zellen neutralisieren, was die Leber zu einem zentralen Organ in der Immunabwehr macht.<sup>[78]</sup>

### 1.2.1.2 Lebersinusoidale Endothelzellen

Die Lebersinusoidalen Endothelzellen kleiden die Blutgefäße aus und definieren damit eine selektivpermeable Barriere zwischen Leber und vaskulärem Blutstrom und gehören somit zu den Endothelzellen.<sup>[86]</sup> Für den kontrollierten Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe ist die Barriereintegrität von großer Bedeutung. Infolgedessen werden Endothelzellen häufig über Proteine identifiziert, welche wichtige Funktionen im Aufbau des Endothels übernehmen. Dazu zählen unter anderem das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül CD31 (*Cluster of Differentiation 31*) auch PECAM 1 genannt und das vaskulär endotheliale Cadherin (VE-Cadherin).<sup>[87,88]</sup> VE-Cadherin gehört zu dem *Adherens Junction* Komplex, welcher Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Endothelzellen vermittelt.<sup>[88]</sup> CD31 ist ebenso in der interzellularen Verbindung von Endothelzellen unabdingbar.<sup>[87]</sup> LSEC zeichnen sich unter den Endothelzellen insbesondere durch deren Morphologie und Funktion aus, da etwa 2 %-20 % der LSEC-Oberfläche mit Fenestrierungen versehen sind, wodurch ein effizienter Stoffaustausch zwischen dem Sinusoid und den Hepatozyten möglich ist.<sup>[89]</sup> In der Physiologie der Leber spielt die Fenestrierung der LSEC somit eine entscheidende Rolle.<sup>[89]</sup> Darüber hinaus besitzen LSEC eine hohe Aktivität an rezeptorvermittelter Endozytose und die sogenannte *Scavenger*-Funktion dient der Aufnahme aller Arten von Makromolekülen, sowie Nanopartikel aus der Blutzirkulation.<sup>[90]</sup> Die internalisierten Liganden werden in endolysosomalen Kompartimentierungen abgebaut und deaktiviert.<sup>[81]</sup> Der Mannoserezeptor (CD206) selektiert zirkulierendes, denaturiertes

Kollagen anhand der Kollagen- $\alpha$ -Ketten und Glycokonjugate mit terminaler Mannose.<sup>[91,92]</sup> Ein weiterer LSEC spezifischer Marker ist der endotheliale LymphgefäÙe-Hyaluronrezeptor-1 (LYVE-1, der für die rezeptorvermittelte Aufnahme von Hyaluron aus den Lymphen verantwortlich ist und Funktionen in der Entwicklung, Wundheilung und Tumorgenese übernimmt.<sup>[74,81,91,92]</sup> Indem die LSEC charakteristischen Funktion und deren Morphologie betrachtet werden, können diese in einem *ex vivo* Modell eindeutig identifiziert und evaluiert werden.

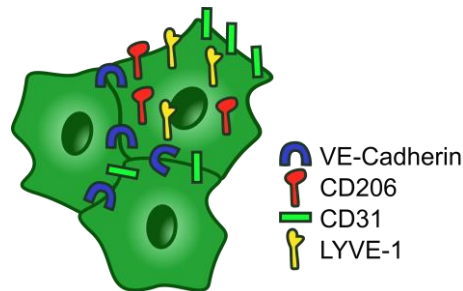


Abbildung 7: Lebersinusoidale Endothelzellen können durch endothelspezifische Proteine wie VE-Cadherin und CD31 eindeutig Endothelzellen zugeordnet werden. Beide Proteine sind in der Aufrechterhaltung der Barriereintegrität durch Zell-Zell-Kontaktvermittelte Verbindungen involviert. Der Mannoserezeptor CD206 vermittelt unter anderem die Aufnahme von Makromolekülen mit terminaler Mannose, wohingegen der LymphgefäÙe-Hyaluronrezeptor-1 (LYVE-1) Hyaluron aufnimmt. CD206 und LYVE-1 dienen in der Leberforschung als LSEC spezifische Marker.

### 1.2.1.3 Hepatozyten

Hepatozyten werden auch als parenchymale Zellen der Leber bezeichnet, da sie den größten Anteil der Leberzellpopulation repräsentieren und die Hauptfunktionen sowie Aufgaben der Leber ausführen.<sup>[71]</sup> Detoxifizierung des Blutes, Homöostase von Proteinen, Glucose und Fetten im Blut sowie die Produktion der Gallenflüssigkeit für die Verdauung sind alles Funktionalitäten der Leber, welche durch Hepatozyten ausgeführt werden.<sup>[67]</sup> In Abbildung 5 wurde die Positionierung der Hepatozyten im Lebergewebe skizziert. Aufgrund des freien Plasmaflusses durch die Fenestrierungen der LSEC und die Sekretion von Gallenflüssigkeit in die Gallenkanälchen sind die Hepatozyten multipolar.<sup>[70]</sup> Die basolaterale Seite ist dem Spalt von Disse zugewandt, während sich auf der apikalen Seite die Gallenkanälchen befinden. Die unterschiedlichen Oberflächenproteine definieren die Polarität der Hepatozyten, da sie durch die komplexe Struktur des Lebergewebes oftmals nah beieinander liegen.<sup>[67]</sup> Der Austausch von Substanzen wird durch zahlreiche Mikrovilli auf der Oberfläche der Hepatozyten verstärkt.<sup>[67]</sup> So werden unter anderem Gerinnungsfaktoren, Transferrin (für den  $\text{Fe}^{3+}$ -Transport),  $\alpha$ -Fetoprotein (ein Indikator des Leberzellkarzinom) und Albumin auf der basolateralen Seite in das Sinusoid sekretiert. Das Serumalbumin hält den kolloidosmotischen Druck des Blutplasma aufrecht, wodurch der Filtrationsdruck in den GefäÙen gewährleistet wird.<sup>[67,93]</sup> Aufgrund dieser essenziellen Eigenschaft von Albumin und dessen hohen Expressionsrate von ca. 10 g/Tag wird die Albuminsynthese als ein wichtige Indikation der Funktionalität von Hepatozyten genutzt.<sup>[67,93,94]</sup> Um die Glucose-Homöostase aufrecht zu halten, katalysieren Hepatozyten im finalen Schritt der Gluconeogenese die Hydrolyse von Glucose-6-Phosphat mithilfe der

Glucose-6-Phosphatase (G6P).<sup>[95]</sup> Weiter können Hepatozyten nicht nur Glucose freisetzen sondern auch bis zu 100 g Glucose in Form von Glykogen in der Leber speichern.<sup>[96]</sup> Neben der Glucosehomöostase sind die Hepatozyten für die Aufnahme, Lagerung, Verstoffwechslung und Abgabe von Lipiden verantwortlich.<sup>[67]</sup> Die genauen Zusammenhänge des hepatischen Fettmetabolismus werden in Kapitel 1.2.2 im Zusammenhang mit einer nicht-alkoholisch induzierten Fettleber näher erläutert. Hepatozyten haben die Fähigkeit Xenobiotika zu metabolisieren und zu entgiften, sowie deren Ausscheidung einzuleiten.<sup>[58,97]</sup> Die Hydrophilie der Xenobiotika wird in der sogenannten Phase I-Reaktion durch Freisetzung oder Anbringung einer funktionellen Gruppe wie Hydroxygruppen (-OH), Thiole (-SH) oder Carbonsäuren (-COOH) erhöht.<sup>[56]</sup> Die Cytochrom P450 (CYP) Proteinfamilie gehört zu den Phase I-Enzymen und ist in der Metabolisierung von biologischen Substanzen und Xenobiotika involviert.<sup>[98]</sup> CYP3A4 ist dabei für die Medikamentenentwicklung von besonderem Interesse. Etwa 30 % der klinisch verabreichten Wirkstoffe werden von CYP3A4 oxidiert, was indirekt deren Ausscheidungsprozess reguliert und die Bioverfügbarkeit der Medikamente bestimmt.<sup>[99,100]</sup> In der darauf folgenden Biotransformation in Phase II werden diese funktionellen Gruppen meist für eine Konjugation von wasserlöslichen Gruppen verwendet, wodurch eine Ausscheidung über den Urin oder Galle ermöglicht wird.<sup>[100]</sup> Hydrophile Substanzen wie Sulfate, Glutathion, Aminosäuren und Glucuronsäure werden in Phase II der Detoxifizierung an die funktionellen Gruppen konjugiert und beschleunigen durch eine erhöhten Wasserlöslichkeit der Metabolite deren Ausscheidung.<sup>[56,100]</sup> Eine zentrale Rolle in der Phase II spielt die Uridin 5'-diphospho-Glucuronosyltransferase, welche eine kovalente Bindung zwischen der Glucuronsäure und den funktionellen Gruppen (-OH, -SH, -COOH) der Metabolite aus Phase I katalysiert. Uridin 5'-diphospho-Glucuronosyltransferase-1A1 (UGT1A1) gehört zu dieser Enzymklasse und ist hauptsächlich für die Glucuronidierung von Bilirubin (Abbauprodukt von Erythrozyten) und anderen lipophilen Substanzen und Medikamenten verantwortlich.<sup>[57]</sup> 40 %-70 % der auf dem Markt vorhandenen Medikamente werden einer Glucuronidierung unterzogen, wodurch die Messung deren Aktivität für die Wirkstoffforschung von großer Bedeutung ist.<sup>[100]</sup> Der Vielzahl an Aufgaben und Funktionen der Hepatozyten liegt eine hohe Effizienz und Präzision zugrunde. Wird das biochemische Gleichgewicht der Hepatozyten gestört, entstehen schnell lebendesbedrohliche Hepatopathien wie Hepatitis, Leberzirrhose, oder Leberkarzinome.<sup>[67]</sup>

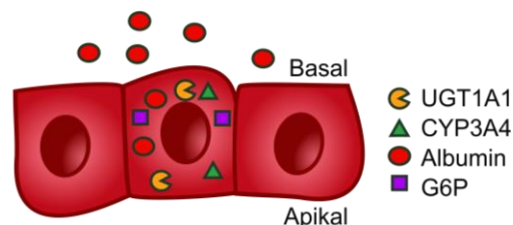


Abbildung 8: Schematisch dargestellte Hepatozyten, welche Stoffe über ihre basolaterale Membran aufnehmen und sekretieren gleichzeitig Proteine wie Albumin. Albumin wird für die Regulation des kolloidosmotischen Druckes des Blutplasmas verwendet und wird exklusiv in Hepatozyten synthetisiert. UGT1A1 und CYP3A4 sind Hepatozyten spezifische Enzyme der Detoxifizierung von Medikamenten und anderen Xenobiotika. Glucose-6-Phosphatase (G6P) ist ein Enzym der Hepatozyten und spielt eine entscheidende Rolle in der Gluconeogenese.



## 1.2.2 Lebererkrankungen

Ungefähr 2 Millionen Menschen sterben weltweit jedes Jahr an Lebererkrankungen.<sup>[101]</sup> Diese werden in drei Kategorien eingeteilt: chronische Lebererkrankung (metabolische Störungen), akutes Leberversagen (Hepatozytensterben mit intaktem Lebergewebe) und chronisches Leberversagen (extensive Gewebeschädigungen und -veränderung).<sup>[102,103]</sup> Leberzirrhose, virale Hepatitis und Leberkarzinome sind die Hauptursachen einer tödlichen Lebererkrankung.<sup>[101]</sup> Meist wird Leberkrebs und Leberzirrhose durch übermäßigen Alkoholkonsum, virale Hepatitis B und Hepatitis C sowie metabolische Syndrome im Zusammenhang mit Übergewicht und Adipositas verursacht.<sup>[104,105]</sup> Leberzirrhose ist das Endstadium vieler chronischer Lebererkrankungen und kann nur mit einer Lebertransplantation erfolgreich behandelt werden. Weiter führen auch Medikamenten-assoziierte Leberschäden immer häufiger zum akuten Leberversagen. Die Überdosierung des Analgetikums Paracetamol verursacht 50 % der Medikamentös-toxischen Leberschäden in den USA sowie Europa und ist in westlichen Ländern die Hauptursache von akutem Leberversagen.<sup>[103,106]</sup> Neu auftretende Leberkrankheiten wie NAFLD und Steatohepatitis, welche durch eine übermäßig fettreiche Ernährung ausgelöst werden, und die zunehmend alternde Bevölkerung erhöhen weltweit die Zahl lebensbedrohlicher Lebererkrankungen. Die stetige Verbesserung in der intensivmedizinischen Therapie und Aufklärungsmaßnahmen bezüglich des Alkoholkonsums, Adipositas und viraler Hepatitis-Impfungen sind positive Entwicklungen.

### 1.2.2.1 Nicht-alkoholische Fettleber

Durch komplexe, spezifisch regulierte Stoffwechselwege wird die Lipidhomöostase im Menschen aufrechterhalten.<sup>[67]</sup> Dabei erhält die Leber entweder aus der Nahrung oder aus endogenen Quellen, wie dem Fettgewebe, Fettsäuren, deren konstante Konzentration im Körper aufrecht erhalten wird.<sup>[67,107]</sup> Im fastenden Zustand werden im weißen Fettgewebe durch Lipolyse freie Fettsäuren oder auch nicht-esterifizierte Fettsäuren (NEFA) genannt, freigesetzt, die über den Blutkreislauf in die Leber transportiert werden wo sie als Energielieferant dienen.<sup>[67,108]</sup> Fettsäuren aus der Nahrung erreichen die Leber in Form von Chylomicron-Resten.<sup>[109]</sup> Zudem kann über die *de novo* Lipidsynthese (DNL) in Hepatozyten aus nicht-lipidischen Edukten neue Fettsäuren synthetisiert werden. Dieser Stoffwechselweg wird über einen hohen Glucosespiegel im Blut aktiviert und kann in Abbildung 9 nachverfolgt werden.<sup>[108]</sup> Sofern ein Fettsäuremangel vorliegt können in Hepatozyten freie Fettsäuren in Form von Triacylglycerol (TAG) in Lipidtropfen gelagert werden. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Fettsäuren-Aufnahme, -Synthese, -Sekretion oder -Verstoffwechslung ist eine der zentralen Funktionen, die von der Leber im Fettsäuremetabolismus übernommen wird. Sind genügend Fettsäurevorräte in der Leber vorhanden, werden diese in Form von *very low-density lipoprotein* TAG (VLDL-TG) in das Blutplasma für einen Weitertransport an andere Organe abgegeben.<sup>[107]</sup> Ein weiterer Möglichkeit den Fettsäurehaushalt zu balancieren, ist über die Verwendung von Fettsäuren in der hepatischen  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung.<sup>[109,110]</sup> Die

Homöostase der Lipide im Körper ist somit durch viele Stoffwechselwege regulierbar und kann bei einer Störung weitreichende Auswirkungen auf verschiedene Organe haben. So ist eine Akkumulation von Lipidtröpfchen in Hepatozyten der Auslöser für die nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD), wovon nach Schätzungen etwa 25 % der erwachsenen Weltbevölkerung betroffen sind.<sup>[111–113]</sup> Die Krankheit äußert sich in einem breiten Spektrum an verschiedenen Symptomen, wovon die sogenannte Fettleber namensgebend ist (*Steatosis hepatitis*). In der hepatischen Steatose ist die reversible Fetteinlagerung im Lipidmetabolismus der Hepatozyten gestört. Wird das Ungleichgewicht im hepatischen Fettmetabolismus chronisch, kann dies zu einer Leberfibrose oder einem Leberkarzinom führen.<sup>[109,113]</sup> Eine Ursache für die immer häufiger auftretende NAFLD-Erkrankung ist die zunehmende Anzahl an Adipositas-Erkrankungen in der Weltbevölkerung.<sup>[114]</sup> Für ein besseres Verständnis der metabolischen Zusammenhänge, Auswirkungen und Behandlungsansätze von NAFLD können *in vitro* Krankheitsmodelle ausschlaggebend sein. Dabei wird mit einer Kombination aus einer strukturellen Rekonstruktion des Lebersinusoids und einer realistischen Nährlösung der Zellen gearbeitet. Jedoch befindet sich dieser Bereich des *Bioengineerings* noch in einem frühen Entwicklungsstadium und voll funktionsfähige komplexere, multizelluläre Modelle benötigen noch weiterer Anpassung und Modifizierungen.<sup>[114,115]</sup>

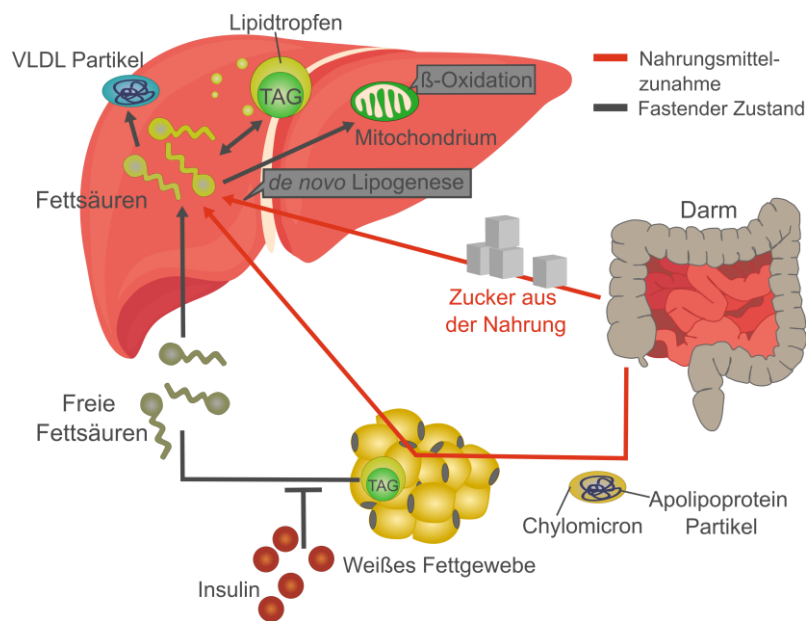


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Fettmetabolismus im Menschen. In einem fastenden Zustand (schwarze Linien) werden freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe hydrolysiert und in das Blut abgegeben, worüber sie die Leber erreichen. Abhängig von der vorhandenen Fettsäurekonzentration in der Leber können die Fettsäuren unterschiedliche metabolische Stoffwechselwege einschlagen. Ist zu viel Fett vorhanden, werden Fettsäuren zu Acetyl-CoA verstoffwechselt, welches in der  $\beta$ -Oxidation oder im Citratzyklus energiegewinnend oxidiert werden kann. Durch eine Esterifizierung der Fettsäuren können diese in Triacylglycerol (TAG) umgewandelt werden. TAG kann in Verbindung mit *very low-density lipoprotein* (VLDL) in das Blutplasma abgegeben werden oder in Lipidtröpfchen in Hepatozyten gelagert werden. Durch eine Nahrungszunahme werden die darin enthaltenen Fettsäuren in Chylomicron für den Transport zur Leber oder anderen Organen gespeichert. Zudem steigt der Glucosespiegel im Blut, welcher die Induktion der *de novo* Lipogenese in der Leber reguliert. Dadurch wird der zelluläre Lipidstoffwechsel von Oxidation zur Esterifizierung verschoben. Modifiziert nach Hodson *et al.*<sup>[109]</sup>

## 2 Zielsetzung

3D-Leberzellkultivierung in Kombination mit Methoden aus dem *Tissue Engineering* bieten ein enormes Potential, die Testsysteme der Wirkstoffentwicklung in der präklinischen Phase zu revolutionieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die funktionelle Einheit der Leber das Sinusoid vaskularisiert und *in vitro* rekonstruiert werden. Für eine näherungsweise ideale humanisierten Rekonstruktion der metabolischen Funktion der Leber sollten ausschließlich Leberzellen humanen und primären Ursprungs im *Liver-on-Chip* Modell eingesetzt werden. Der vasQchip sollte dabei als strukturelle Grundlage des Lebersystems verwendet werden, welcher sich durch seinen halbrunden, perforierten Mikrokanal gegenüber anderen Plattformen abhebt (Abbildung 10). Der artifizielle integrierte Medienfluss sollte die *in vivo* Bedingungen im Lebersinusoid gegenüber statischen Rekonstruktionen verbessert wiedergeben und damit eine dynamische Wirkstoffanalyse ermöglichen. Die Etablierung der LSEC im Mikrokanal und der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment sollte anhand zellspezifischer Funktionen und Eigenschaften zunächst als Monokultur und anschließend in Kokultur evaluiert werden. Nach erfolgreicher Etablierung sollte das Lebermodell als Testmodell für systemisch applizierte Wirkstoffe und Leberkrankheitsmodelle, wie beispielsweise die NAFLD, getestet werden. Zudem sollten Erweiterungsmöglichkeiten des *in vitro* Lebermodells im Bereich der Stammzelltechnologie sowie die Integration eines 3D-Lebergewebes im umgebenden Kompartiment mithilfe von Hydrogelen eingesetzt werden.

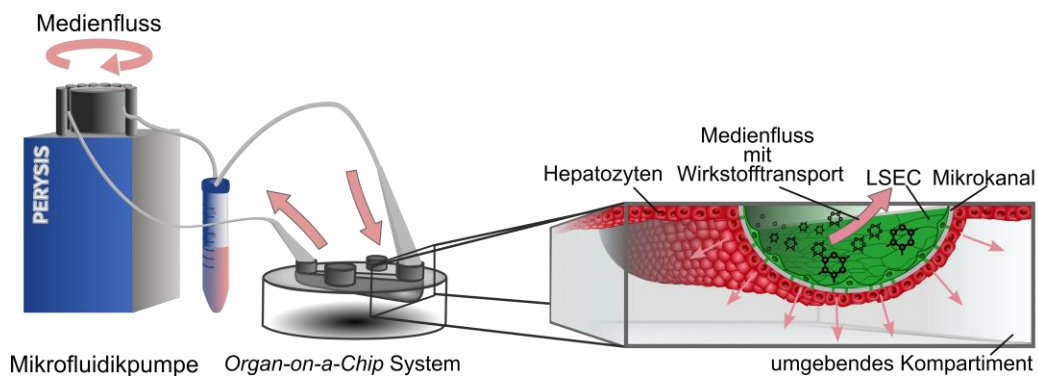


Abbildung 10: Schematische Darstellung des künstlichen Lebermodells im *Organ-on-a-Chip* System vasQchip. LSEC kleiden den halbrunden, porösen Mikrokanal des vasQchip aus, welcher das umgebende Kompartiment abgrenzt. Die im umgebenden Kompartiment angebrachten Hepatozyten stehen durch die Poren des Mikrokanals in direktem Kontakt mit den LSEC und das darüber zugeführte Medium. Eine artifizielle mikrofluidische Strömung durch den Anschluss einer Mikrofluidikpumpe am Mikrokanal ermöglicht eine kontinuierliche Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Der Medienfluss erlaubt zudem eine systemische Wirkstoffapplikation im *in vitro* Lebermodell.



### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die menschliche Leber weist vier verschiedene Zellarten auf: Hepatozyten, Stellatzellen, Kupfferzellen und LSEC.<sup>[71]</sup> Hepatozyten repräsentieren mit 70 % - 90 % des gesamten Leberzellvolumens den größten Teil der Leber und sind für die Funktionsweise der Leber verantwortlich.<sup>[71,73]</sup> Zu ihren Primärfunktionen zählen der Fettmetabolismus, Medikamentenstoffwechselung und das Ausschütten von Komplementfaktoren. Stellatzellen sind für die Lagerung von Vitamin-A essenziell und spielen in der Leberfibrose eine zentrale Rolle. Kupfferzellen sind in der Leber residierende Makrophagen, welche die Toxizität von unerwünschten Pathogenen und Partikeln im Blut reduzieren.<sup>[116]</sup> LSECs sind für die strukturelle Organisation der Leber verantwortlich und trennen die Hepatozyten vom sinusoidalen Blutgefäßlumen.<sup>[71,72]</sup> Für den Aufbau eines aussagekräftigen und repräsentativen humanen Lebermodells sind vor allem die Hepatozyten und LSEC die essenziellen Zelltypen, da Hepatozyten die grundlegenden Funktionen der Leber übernehmen, während LSEC für die strukturelle Organisation der Leber verantwortlich sind. Für die Rekonstruktion des Lebersinusoids wurden in dieser vorgelegten Arbeit primäre humane Hepatozyten und LSEC verwendet, um die menschliche Leber möglichst naturgetreu zu rekonstruieren. Beide Zelltypen wurden in der herkömmlichen zweidimensionalen Kultivierungsmethode etabliert (Kapitel 4.2.1), analysiert und anschließend zu einer Kokultur zusammengeführt. Um die *in vivo*-Bedingungen so naturgetreu wie möglich abzubilden, wurde in dieser Arbeit ein *Organ-on-a-Chip* System (vasQchip) verwendet. Derartige Systeme ermöglichen eine *in vivo* ähnlichere Organisation der Zellen, die es erlaubt ganze Gewebestrukturen nachzubilden. Darüber hinaus kann durch die Integration eines Flusses die Versorgung der Zellen gewährleistet werden.<sup>[13]</sup> Der vasQchip stellt ein solches *Organ-on-a-Chip* System dar und wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Schepers erstmals entwickelt und implementiert. Durch den halbrunden Mikrokanal zeichnet sich dieser von anderen Systemen ab. Da er die Schubspannung die auf die Gefäßinnenwände wirkt im Gegensatz zu rechteckigen Kanälen naturgetreuer nachbildet, was für die Ausbildung eines Lebersinusoid entscheidend ist.<sup>[116][61]</sup> Mit diesem Merkmal ermöglicht der vasQchip eine detailgetreue Rekonstruktion des Sinusoids der Leber. Dessen Etablierung und Evaluation soll in den folgenden Kapiteln vorgestellt und diskutiert werden. Zusätzlich werden verschiedene Anwendungsmöglichkeiten des entwickelten Lebermodells dargestellt.

### 3.1 Lebersinusoidale Endothelzellen und deren Etablierung im vasQchip

Die moderne Leberforschung basiert stark auf der Verwendung von frisch isolierten Leberzellen, da diese in der Lage sind alle Funktionen des *in vivo* Zelltyps abbilden. Da diese jedoch sehr schnell dedifferenzieren und dadurch ihren spezifischen Phänotyp verlieren, ist deren Kultivierung und Funktionsdauer auf ca. 2 Tage begrenzt.<sup>[72,117,118]</sup> Um dennoch adäquate naturgetreue Forschung betreiben zu können, wurde von der Firma *Upcyte-Technologies* ein Verfahren entwickelt, welches den Proliferationsstopp von primären LSEC hinausögert und zeitgleich einige Eigenschaften, wie deren rezeptorvermittelte Endozytose, erhält.<sup>[119]</sup> Diese Eigenschaft soll auch für die nachfolgenden, vorgestellten Experimente genutzt werden, in welchen ausschließlich primär-modifizierten LSEC verwendet wurden (Abbildung 11). Um die *in vivo* Eigenschaften der verwendeten LSEC zu validieren, müssen diese zunächst charakterisiert werden. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt, bei der zellspezifische Proteinstrukturen mithilfe von Antikörpern visualisiert werden.  $2 \cdot 10^4$  LSEC wurden in einem 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten  $\mu$ -Slide-8-Well für 7 Tage kultiviert. Nach der Immunfluoreszenzmarkierung wurde die Expression des Mannoserezeptors CD206 (Kaninchen-Anti-humanes-C206-Primärantikörper) und des Endothelzellmarkers CD31 (FITC gekuppelter Maus-Anti-humanes-CD31-Primärantikörper) immunhistochemisch untersucht (siehe Abbildung 11). Die Markierung von CD31 und CD206 wurde, sofern nicht explizit erwähnt in dieser Arbeit mit den hier vorgestellten Antikörpern durchgeführt. CD206 ist ein LSEC-spezifischer endozytotischer Rezeptor, welcher eine wichtige Rolle in der Cadherin-vermittelten Aufnahme von Makromolekülen aus dem Blut durchführt.<sup>[75]</sup> Unter anderem werden zirkulierende Kollagenreste, oder Glykokonjugate mit terminaler Mannose wie z.B. lysosomale Enzyme aus dem Blutkreislauf selektiert.<sup>[91]</sup>

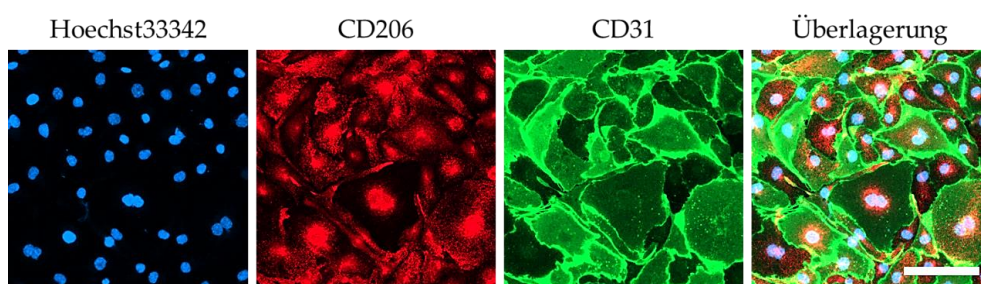


Abbildung 11: Visualisierung der LSEC sowie deren spezifischen Endothelzellmerkmalen, CD31 und CD206. Pro Well eines  $\mu$ -Slide-8-Well wurden  $2 \cdot 10^4$  LSEC wurden ausgesät und 7 Tage bei 37 °C kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und CD206 und CD31 mit Hilfe einer Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor® 488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper; Kaninchen-Anti-human-C206-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-647 Hühnchen-Anti-Kaninchen Sekundärantikörper). Welche mit einer Fluoreszenzkonfokalmikroskopie visualisiert wurden. Zudem wurde die DNA im Zellkern durch eine Hoechst33342-Markierung veranschaulicht.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Rot: CD206 ( $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ .

CD31 ist dagegen ein Zelladhäsionsmolekül von Endothelzellen, welches somit auch in LSEC vorhanden ist. Zellspezifische Strukturproteine konnten erfolgreich über die Immunfluoreszenzmarkierung in den verwendeten LSEC nachgewiesen werden (Abbildung 11). Dieser Nachweis zeigt das die verwendeten LSEC von *Upcyte-Technologies* charakteristische Faktoren besitzen, welche leberspezifische Endothelzellen definieren.

### 3.1.1 Kultivierung der LSEC

Aufgrund der Empfindlichkeit der Leberendothelzellen und ihrer Instabilität den spezifischen Phänotyp *in vitro* zu halten, sind die entsprechenden Kultivierungsbedingungen essentiell für den Erhalt ihrer Spezifität.<sup>[72]</sup> In den nachfolgenden vorgestellten Abschnitten wurde deshalb die Kultivierung der LSEC in unterschiedlichen Zellmedien, Beschichtungen und Verwendungsmöglichkeiten bezüglich ihrer Passagen untersucht.

#### 3.1.1.1 Zellmedientest

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass Spezialzellmedien mit entsprechenden ausgewählten Faktoren eine große Auswirkung auf die Kultivierung von Zellen haben können. Sie verhindern unter anderem die Dedifferenzierung von primären Zellen und ermöglichen deren Proliferation. Aus diesem Grund wird die Forschung mit Hinblick auf die Kultivierung von LSEC mit verschiedenen Spezialzellmedien mit hoher Priorität vorangetrieben.<sup>[72]</sup> Eine zentrale Rolle spielen dabei die Wachstumsfaktoren, bei welchen es sich um Moleküle handelt die unter anderem für die Zellmigration, Proliferation und Differenzierung verantwortlich sind.<sup>[120]</sup> Zur Kultivierung der LSEC wurden in dieser Arbeit zwei wichtige Wachstumsfaktoren (VEGF und SB431542) als Medienzusatz analysiert. Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) wird von Hepatozyten und Stellatzellen in der Leber sekretiert und ist ein wichtiger Regulator für den fenestrierten Phänotyp der LSEC.<sup>[91]</sup> SB431542 ist ein *Transforming-Growth-Factor-β*-Inhibitor (TGF-β-Inhibitor), da TGF-β eine Rolle in der Inflammationsreaktion spielt, sollte dieser in der Homöostase der Leber unterdrückt werden.<sup>[121]</sup> In dieser Arbeit wurden dafür bereits fertig zusammengestellte Spezialmedien für Endothelzellen mit den entsprechenden Faktoren getestet. Ein potenziell passendes Medium ist das *Endothelial-Cell-Growth-Medium-2* (EGM2). Dieses Medium wurde zusätzlich mit 50 ng/ml VEGF und 20 μM SB431542 versetzt und mit dem LSEC-Medium des Herstellers, das speziell auf die *Upcyte*-LSEC angepasst wurde, sowie einer 1:2 Mischung aus LSEC-Medium und EGM2 getestet. Für den Vergleich wurden auf einer Kollagen I beschichteten 24-Well-Platte 3·10<sup>4</sup> LSEC ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Dabei wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Auf molekularbiologischer Ebene kann die Expression von spezifisch ausgewählten Genen quantitativ verfolgt werden, wodurch regulatorische Prozesse in der Zelle und deren Verhalten analysiert werden kann. In einer quantitativen Polymerasenkettenreaktion (RT-qPCR) wurde die Auswirkung der verschiedenen Medienzusammensetzungen auf die Genexpression verschiedener LSEC spezifischer

Marker relativ zu einem Referenzgen und einer Kontrolle untersucht.<sup>[122]</sup> In Abbildung 12 ist das Ergebnis der RT-qPCR dargestellt. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden dabei mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet und auf das LSEC-Medium des Herstellers als Kontrolle normiert (=1 in Abbildung 12). Die beiden allgemeinen Marker für Endothelzellen, CD31 und VE-Cadherin sind in EGM2 ähnlich stark exprimiert wie die im LSEC-Medium kultivierten LSEC. Demgegenüber sind in EGM2 die LSEC spezifischen Marker, LYVE-1 und CD206 um 65 % geringer exprimiert als die LSEC-Medium Kontrolle. Alle weiteren Kombinationen und Varianten an Kultivierungsmedien weisen eine deutlich verringerte Expression aller getesteten Proteine auf. Anhand der in Abbildung 12 vorgestellten Ergebnisse konnte für die Expressionsrate ein deutlicher Trend zugunsten des LSEC-Mediums ausgemacht werden, welches sich als geeignetes Kultivierungsmedium abzeichnet. Auch in der Literatur herrscht Unstimmigkeit bezüglich des zu verwendenden Zellmediums für Leberzellen. Dies ist vermutlich zurückzuführen auf die unterschiedlichen Leberzellquellen, für die entsprechend kompatible Medien zusammengesetzt wurden.<sup>[123]</sup> Parallel zur Expressionsanalyse der Marker wurde die Proliferation der LSEC in den verschiedenen Medien getestet, wobei die Erkenntnisse von der RT-qPCR bestätigt wurden. Für die Proliferationsverfolgung der LSEC in den unterschiedlichen Medien wurde eine Wachstumskurve durch erstellt, welche in Abbildung 13 dargestellt ist. Dazu wurden  $0,5 \cdot 10^4$  Zellen in einer Kollagen I beschichteten 96-Well-Platte für 7 Tage kultiviert und an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 die Zellzahl aus Triplikaten ( $n=3$ ) bestimmt. Abbildung 13 zeigt die Zellzahl in Abhängigkeit der Kultivierungstage, wobei sich ein leichter Trend zugunsten des LSEC-Mediums abzeichnet. Die Proliferation von Zellen kann Rückschlüsse auf deren Viabilität geben und somit Richtungsgebend sein um den Einfluss der unterschiedlichen Medien auf die Zellen abzuschätzen.<sup>[124]</sup>

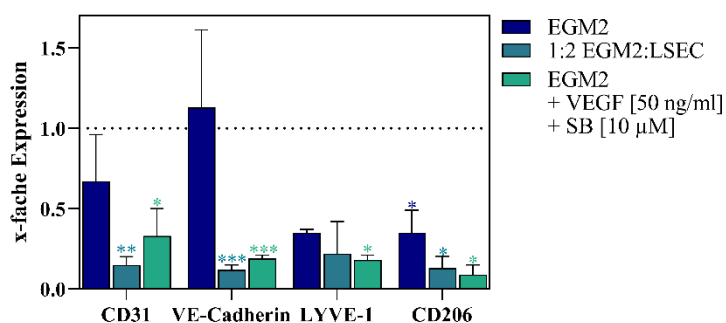


Abbildung 12: RT-qPCR-Analyse der Genexpression zur Untersuchung eines geeigneten Basalmediums zur Kultivierung von LSEC. In einer 24-Well-Platte wurden  $3 \cdot 10^4$  Zellen ausgesät und für 7 Tage mit den entsprechenden Medien kultiviert. Es wurde EGM2, verdünnt mit LSEC-Medium (1:2), EGM2 ergänzt mit 50 ng/ml VEGF und 10 µM SB und als Kontrolle wurde das Herstellermedium LSEC-Medium verwendet. Nach der Zelllyse durch TRIzol® und die anschließende cDNA-Synthese wurde die mRNA-Expression von CD31, VE-Cadherin, LYVE-1 und CD206 analysiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, dabei wurden die Proben auf die Kontrolle des LSEC-Mediums normiert (=1) und die Standardabweichung und Mittelwerte ermittelt ( $n=3$ ). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student t-Test ermittelt.



Da die Proliferationsrate und die Genexpression der LSEC spezifischen Marker im LSEC-Medium am höchsten waren, wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich mit dem LSEC-Medium gearbeitet, um möglichst vorteilhafte Kultivierungsbedingungen zu schaffen.

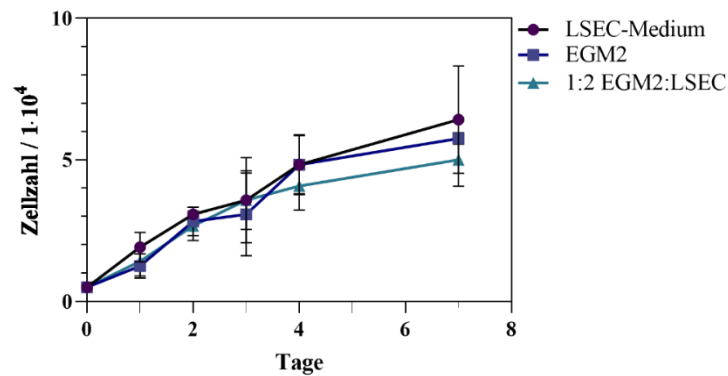


Abbildung 13: Wachstumskurve von LSEC in unterschiedlichen Medien. Es wurden  $0,5 \cdot 10^4$  LSEC in eine Kollagen I beschichtete 96-Well-Platte ausgesät. Nach 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Getestet wurden ein LSEC-Medium, ein *Endothelial Growth Media 2* (EGM2) und eine 1:2 Mischung aus beiden Medien. Mittelwert und deren Standardabweichung wurde aus  $n = 3$  ermittelt.

### 3.1.1.2 Beschichtung

Die Oberfläche, auf der Zellen *in vitro* kultiviert werden, besteht meist aus einer durch Plasmabehandlung hydrophilisierten Oberfläche, was die Adhäsion der Zellen verbessert. Diese Wachstumsumgebung entspricht jedoch nicht den natürlichen Bedingungen in einem Organismus, in welchem Zellen umgeben von einer extrazellulären Matrix (ECM), welche sowohl Strukturen und Bindungsstellen für Zelladhäsion als auch Platz für Zellmigration und -Wachstum bietet.<sup>[125]</sup> Die ECM ist somit eine dynamische Struktur, bestehend aus unterschiedlichen Proteinen und Makromolekülen, die aktiv die Funktionen der Zellen regulieren und beeinflussen können. Fibronektin und Kollagene repräsentieren den Hauptbestandteil der Leber-ECM. Im Spalt von Disse kommen vor allem Kollagen Typ I und III vor, aber auch die Glykoproteine Fibronektin und Vitronektin sind dort zu finden. Laminin, ein weiteres ECM-Protein, wird vermehrt in der Basallamina der Blutgefäße vorgefunden.<sup>[126,127]</sup>

Mit diesem Hintergrund wurden unterschiedliche Beschichtungen für eine optimale Kultivierung der LSEC getestet. Dafür wurden  $\mu$ -Slide-8-Wells mit den zu testenden Substanzen beschichtet (Kollagen I (0,1 mg/ml), Gelatine (1 %), Fibronektin (13,33  $\mu$ g/ml), Vitronektin (5  $\mu$ g/ml) und Laminin (13,33  $\mu$ g/ml)). Anschließend wurden  $3 \cdot 10^4$  Zellen auf die Beschichtung ausgesät und für 7 Tage mit einem Mediumwechsel alle 2-3 Tage kultiviert. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse der LSEC Marker CD31 und CD206 ist in Abbildung 14 dargestellt. Das Membranprotein CD31 kann genutzt werden um Auskunft über die Konfluenz von Endothelzellen zu geben.<sup>[87]</sup> Im Vergleich zu den anderen getesteten Beschichtungen konnte sich auf Gelatine keine konfluente Zellschicht bilden. Gelatine ist kein natürlicher Bestandteil der ECM der Leber, was das abweisende Verhalten der LSEC auf einer Gelatinebeschichtung erklären könnte. Im *Tissue Engineering* zur 3D-Kultivierung von Zellen in Form von Hydrogelen

findet Gelatine jedoch große Anwendung, da sie aus hydrolysiertem Kollagen besteht, was in der ECM häufig aufzufinden ist und so eine natürliche Umgebung für Zellen bietet.<sup>[44]</sup> Hingegen kommen Kollagen I, Fibronectin, Vitronectin und Laminin alle *in vivo* in der Leber vor und bilden konfluente Zellschichten der LSEC auf den jeweiligen Beschichtungen.<sup>[127]</sup>

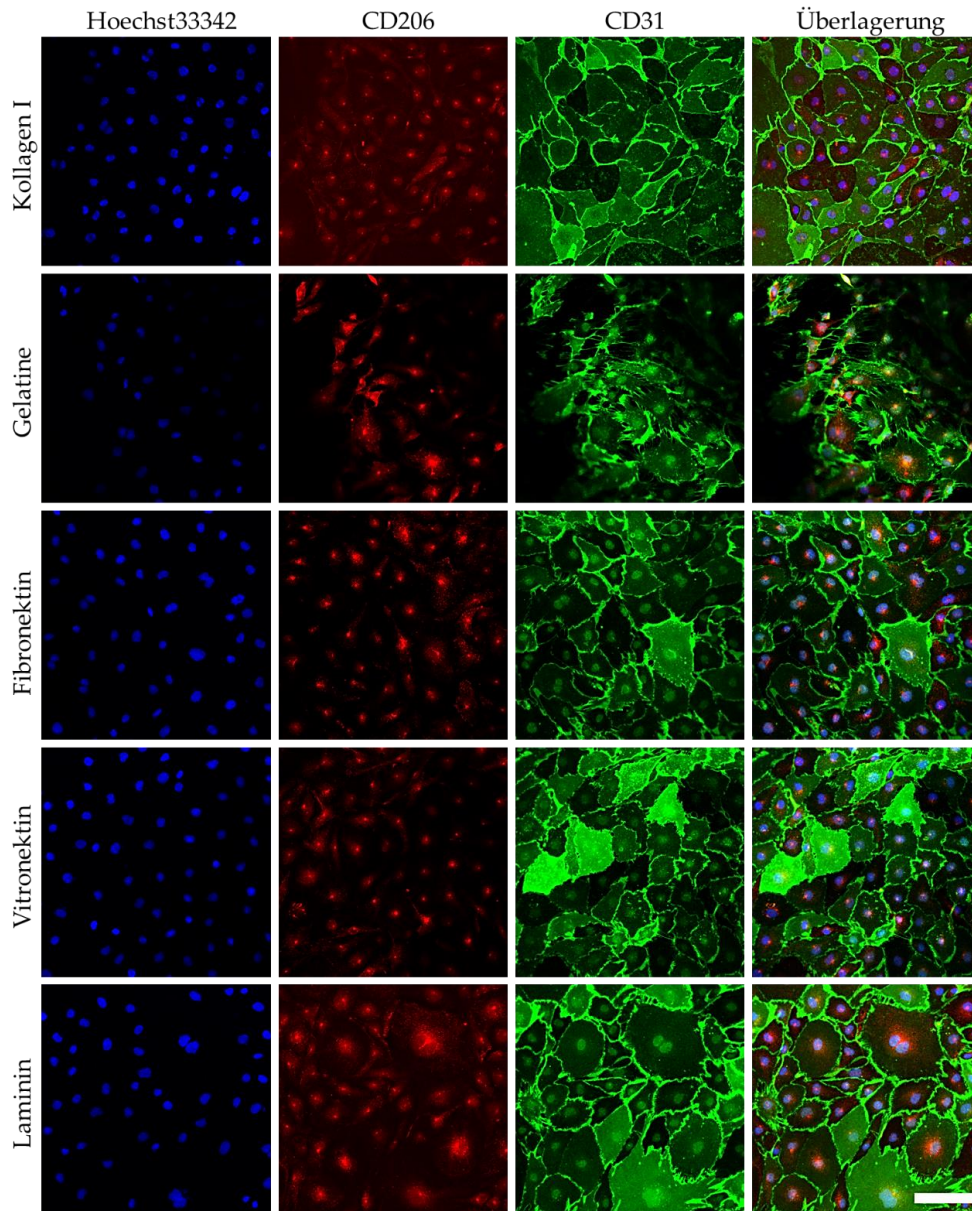


Abbildung 14: Untersuchung unterschiedlicher Beschichtungen zur Kultivierung von LSEC. Es wurden  $3 \cdot 10^4$  LSEC in einem  $\mu$ -Slide-8-Well auf den jeweiligen Beschichtungen ausgesät. Als Konzentrationen wurden 0,1 mg/ml Kollagen I, 13,33  $\mu$ g/ml Fibronectin, 1 % Gelatine, 5  $\mu$ g/ml Vitronectin und 13,33  $\mu$ g/ml Laminin verwendet. Die Zellen wurden für 7 Tage kultiviert, wobei das Medium alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Durch eine Immunfluoreszenzmarkierung mit CD31 und CD206 (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper; Kaninchen-Anti-human-C206-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-647 Hühnchen-Anti-Kaninchen Sekundärantikörper) und anschließender DNA-Markierung mit Hoechst33342, wurden die markierten Zellen mit dem Konfokalmikroskop visualisiert.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Rot: CD206 ( $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, Maßstab = 100  $\mu$ m.

Um einen quantitativen Vergleich zu ermöglichen, wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Dafür wurde eine 24-Well-Platte beschichtet, mit den Zellen besiedelt und kultiviert. In Abbildung 15 finden sich die auf die Kollagen I-Beschichtung normierten Werte der RT-qPCR. Die relativen mRNA-Expressionen der Marker CD31, LYVE-1 und CD206 auf der Beschichtung mit Fibronectin und Laminin, sind mindestens 1,4-fach höher als bei Kollagen I. Hingegen weisen Gelatine und Vitronectin im Vergleich mit Kollagen I eine geringere Expression von CD206 auf. Die Kultivierung von LSEC auf Fibronectin zeigt somit die höchste Expression aller untersuchten Marker, gefolgt von Laminin und Kollagen I. Die Kultivierung auf Galantine und Vitronectin zeigten die geringsten Expressionen der entsprechenden Proteine. Trotz der hohen Viabilität auf Fibronectin wird vom Hersteller *Upcyte Technologies* Kollagen I als Beschichtungsmaterial empfohlen, welches auch in zahlreichen Publikationen die eine erfolgreiche LSEC-Kultivierung auf Kollagen I beschreiben verwendet wurde. [128,129] Daher wurde, sofern nicht anders beschrieben, in allen folgenden Experimenten 0,1 mg/ml Kollagen I zur Kultivierung von LSEC verwendet. Zudem ist Kollagen I eins der häufigsten Bestandteile der ECM und spiegelt die natürliche Umgebung der LSEC wieder.[126,127]

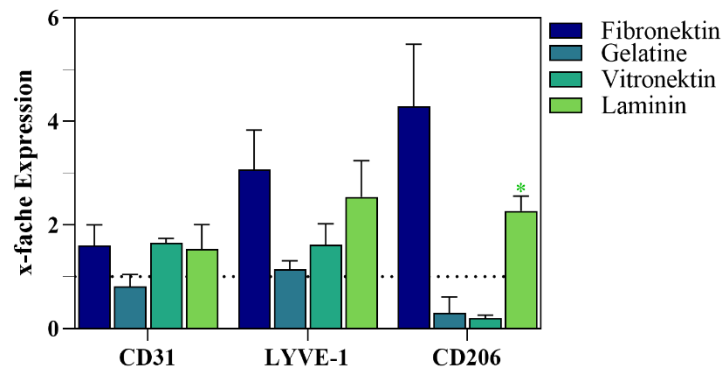


Abbildung 15: mRNA-Genexpressionsanalyse mithilfe RT-qPCR zur Überprüfung unterschiedlicher Beschichtungsmaterialien für die Kultivierung von LSEC. In einer 24-Well-Platte wurden  $4,275 \cdot 10^4$  LSEC auf den jeweiligen Beschichtungen ausgesät. Es wurde mit 0,1 mg/ml Kollagen I, 13,33  $\mu\text{g/ml}$  Fibronectin, 1 % Gelatine, 5  $\mu\text{g/ml}$  Vitronectin und 13,33  $\mu\text{g/ml}$  Laminin beschichtet und über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. Dabei wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Nach der Zelllyse durch TRIzol® und der anschließenden cDNA-Synthese, wurden die Proben auf die mRNA-Expression von CD31, LYVE-1 und CD206 analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode und die Proben wurden auf die Kollagen I Kontrolle normiert (=1) und die Standardabweichung und Mittelwerte ermittelt (n=3). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\* < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

### 3.1.1.3 LSEC Passagen

Bekanntermaßen verlieren LSEC sehr schnell ihre Funktionen und Eigenschaften wenn sie *in vitro* kultiviert werden.[72,117] Die verwendenden LSEC sollten laut Hersteller vor ihrer Verwendung zunächst aufgetaut und anschließend bis zu einer 80%igen Konfluenz kultiviert werden. Dieser Schritt wird als Passage 1 definiert. Werden die Zellen anschließend enzymatisch abgelöst, verdünnt ausgesät und erneut zur 80 %igen Konfluenz kultiviert, wird dies als Passage 2 definiert. Aus wirtschaftlichen Gründen wäre eine längere Expansion der Zellen wünschenswert, weswegen die Integrität der LSEC mit Hilfe einer RT-qPCR der LSEC-Marker untersucht wurde (Abbildung 16).

Dazu wurde über 5 Passagen die mRNA-Expression von CD31, VE-Cadherin, LYVE-1 und CD206 in LSEC mithilfe RT-qPCR analysiert. Dabei nimmt bei allen untersuchten Markern, außer bei CD206 die mRNA-Expression nach jeder Passage kontinuierlich ab. So sinkt die relative Expression von VE-Cadherin in Passage 1 von 1,0 auf 0,36 in Passage 5. Die Zellen verlieren dabei ihre endothelialen Eigenschaften und sollten maximal bis Passage 3 verwendet werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die LSEC einmal expandiert und in Passage 2 konserviert und im Rahmen dieser Arbeit für die Experimente in Passage 3 verwendet.

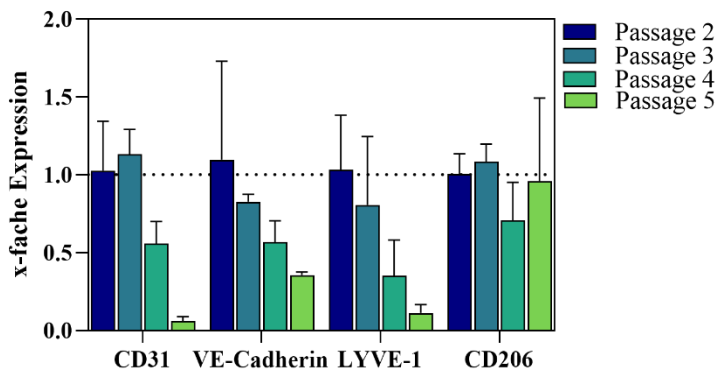


Abbildung 16: Untersuchung der LSEC auf ihre Expression der RNA im Laufe ihrer Passagen durch eine RT-qPCR. Für Passage I wurden  $2,85 \cdot 10^4$  Zellen direkt nach dem Auftauen in einer Kollagen I beschichteten 24-Well-Platte ausgesät. Parallel dazu wurde eine Gewebekulturflasche für Passage 2 weitergeführt. Nach 7 Tagen wurde die Zelllyse durch TRIzol® durchgeführt und gleichzeitig Passage 2 in einer 24-Well-Platte angesetzt und eine Gewebekulturflasche für Passage 3 mitkultiviert. So wurde auch für Passage 4 und 5 vorgegangen. Anschließend folgte eine cDNA-Synthese und die Proben wurden dann auf die mRNA-Expression von CD31, VE-Cadherin, LYVE-1 und CD206 analysiert. Auswertung erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode, dabei wurden die Proben auf die Passage 1 normiert (=1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und die Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ .

### 3.1.2 Funktionsanalyse der LSEC außerhalb des vasQchips

#### 3.1.2.1 Barriere der LSEC

Wie in Kapitel 1.2.1.2 bereits beschrieben haben die LSEC eine charakteristische Morphologie bezüglich ihrer Barrierefunktion entlang der Blutgefäße. Sie kleiden das sinusoidale Endothel mit unterschiedlich großen Fenestrierungen aus. Diese Zytoplasma durchdringenden Poren ermöglichen in Kombination mit der fehlenden Basalmembran einen freien Flüssigkeitsaustausch zwischen dem sinusoidalen Blutgefäß und dem Spalt von Disse.<sup>[91]</sup> Um die Morphologie der LSEC zu untersuchen, wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen auf Kollagen I für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde mithilfe einer Immunfluoreszenzmarkierung der Mannoserezeptor CD206 und das endotheliale Marker Protein CD31 mikroskopisch visualisiert (Abbildung 17). Zur Orientierung wurde die DNA mit Hoechst33342 markiert. Durch die einheitliche Markierung der Membran mit dem Anti-CD31 Antikörper können Lücken in der Membran sichtbar gemacht werden, welche auf eine mögliche Fenestrierung hindeuten könnten.

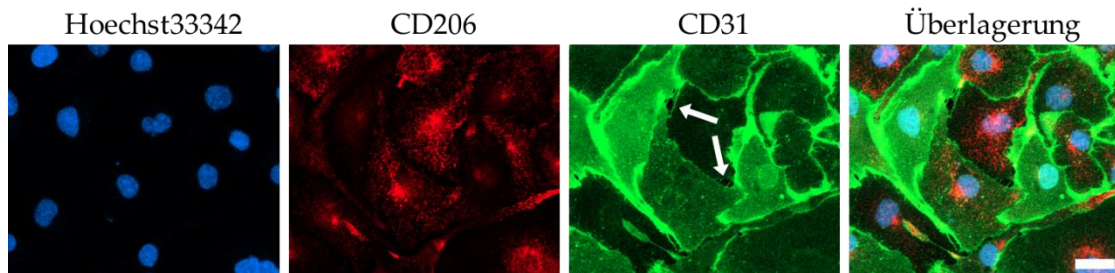


Abbildung 17: Visualisierung der LSEC sowie deren spezifischen Endothelzellmerkmale, CD31 und CD206. Es wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro  $\mu$ -Slide-8-Well eingebracht und für 7 Tage kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden CD31 und CD206 durch Immunfluoreszenzmarkierung (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper; Kaninchen-Anti-human-C206-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-647 Hühnchen-Anti-Kaninchen Sekundärantikörper) und Konfokalmikroskopie visualisiert. Zudem wurde die DNA durch eine Hoechst33342-Markierung veranschaulicht. Mit Pfeilen sind Lücken in der CD31-Markierung markiert, welche auf eine mögliche Fenestrierung der LSEC hindeuten.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 465 \text{ nm}$ ), Rot: CD206 ( $\lambda_{ex} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 675 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{ex} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, Maßstab =  $25 \mu\text{m}$ .

Potenzielle Fenestrierungen sind in Abbildung 17 mit Pfeilen markiert und weisen eine Größe zwischen  $1,5\text{-}5 \mu\text{m}$  auf. In der Literatur werden Porengrößen von  $50\text{-}300 \text{ nm}$  genannt, welche clusterartig auftreten.<sup>[89,91]</sup> Für einen eindeutigen Nachweis der intrazellulären Fenestrierungen sollte zukünftig möglichst ein höher auflösendes Mikroskop, wie ein Rasterelektronenmikroskop verwendet werden. Der direkte Blutfluss durch die Leber kommt nur mit LSEC in Kontakt, welche die Blutgefäße auskleiden und mithilfe von Rezeptoren gezielt Makromolekül und kleinere Partikel aus dem Blut filtern.<sup>[83],[75]</sup> Durch diese Funktion und der exponierten Position in der Leber sind LSEC jedoch auch toxischen Substanzen, wie Paracetamol oder Ethanol (EtOH) ausgesetzt, welche direkt vom Gastrointestinaltrakt in die Leber geleitet werden.<sup>[128]</sup> Dauerhafter Alkoholkonsum führt bekanntermaßen zu chronischer Hepatitis und möglicher Leberfibrose. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die akute Toxizität von Paracetamol und EtOH eine Auswirkung auf die Barriere der LSEC hat und dies somit als frühe Indikation in der Medikamentenforschung fungieren kann.<sup>[128],[129]</sup> Der direkte Kontakt mit EtOH induziert Lücken zwischen benachbarten LSEC, was bei längerer Exposition zu einem Kollaps des Sinusoids führen kann. Dieser Effekt kann durch eine Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) verfolgt werden.<sup>[128]</sup> Um auch diese Eigenschaft in den hier verwendeten LSEC nachzuweisen, wurde die Barriere der LSEC in einem Transwell®-System aufgebaut, deren schematische Darstellung in Abbildung 18 zu sehen ist. Es wurden  $1 \cdot 10^4$  LSEC auf der mit Kollagen I beschichteten apikalen Seite des Transwells® ( $0,4 \mu\text{m}$  Porengröße) ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellen mit  $40 \text{ mM}$  EtOH und  $2 \text{ mM}$  Na-Butyrat oder einer Mischung der beiden auf der apikalen Seite behandelt. Vor der Behandlung nach 6 h und nach 24 h wurde eine Messung des TEER durchgeführt.

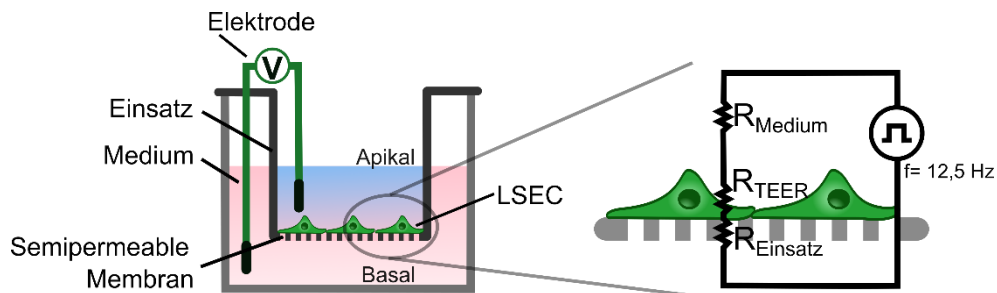


Abbildung 18 Darstellung des Transwell®-Systems zur Messung der Barriere-Integrität von LSEC über den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER). Durch eine Elektrode im apikalen und basalen Bereich des Systems kann durch einen Stromfluss von 12,5 Hz der Widerstand durch die Zellbarriere ermittelt werden. Die dazu benötigten Widerstände des Mediums ( $R_{\text{Medium}}$ ) und der Transwell® Membran ( $R_{\text{Einsatz}}$ ) können durch die Messung des Systems ohne Zellen bestimmt werden. Abbildung modifiziert nach Srinivasan *et al.*<sup>[130]</sup>

Als Nullwert diente das System ohne Zellen, welches mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet wurde. Dabei zeigte sich, dass sich die Barriere in der unbehandelten Kontrolle im Verlauf von 24 h verdichtet, wodurch sich der transendotheliale Widerstand vergrößert (Abbildung 19). Bei einer Behandlung mit 40 mM EtOH nimmt der TEER-Wert im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab und sinkt von  $5,1 \Omega/\text{cm}^2$  auf  $1,9 \Omega/\text{cm}^2$ . Dagegen bleiben die TEER-Werte bei einer Behandlung mit 2 mM Na-Butyrate und der Mischung aus EtOH und Na-Butyrate, bei ca.  $4,5 \Omega/\text{cm}^2$ . Schon Han *et al* hat nachgewiesen, dass die Barriere von humanen umbilikalen venösen endothelialen Zellen (HUVEC) durch EtOH beeinflusst wird und konnten einen ähnlichen Abfall im TEER bei der Behandlung mit EtOH nachweisen.<sup>[128]</sup> Zudem hat die simultane Behandlung von 2 mM Na-Butyrate und 40 mM EtOH, die Wirkung von EtOH auf den Barrierezerfall reduziert, was bereits in der Literatur beschrieben wurde.<sup>[128,131]</sup> Somit konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten LSEC ein ähnliches Barriereverhalten, wie in der Literatur beschrieben, aufweisen.

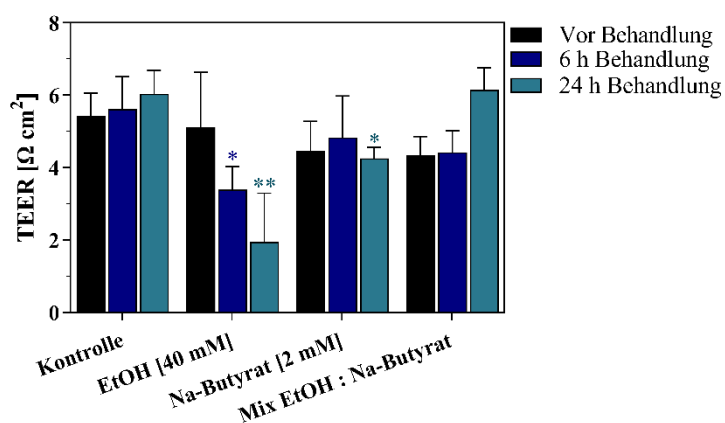


Abbildung 19: Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) zur Ermittlung der Barriere-Integrität der LSEC.  $1 \cdot 10^4$  LSEC wurden für 72 h auf der apikalen Seite eines mit Kollagen I beschichteten Transwells® kultiviert und anschließend mit 40 mM Ethanol, 2 mM Na-Butyrat, oder einer Mischung beider Substanzen behandelt. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Probe. Die TEER-Messung erfolgte an den angegebenen Zeitpunkten und als Nullwert wurde ein beschichtetes Transwell® ohne Zellen verwendet. Die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $< 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und wurden mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

### 3.1.2.2 Angiogenesepotential der LSEC

Ein weiterer Vorgang in welchem die LSEC beteiligt sind ist die Angiogenese. Angiogenese ist ein von Wachstumsfaktoren gesteuerter Prozess, in welchem Endothelzellen differenzieren. Die Endothelzellen kapseln sich dabei von ihrer Originalgefäßstruktur ab, migrieren und formen kapillar ähnliche Gefäße mit einem Lumen. Während der Leberfibrose werden von Hepatozyten und Stellatzellen Angiogenesefaktoren sekretiert, welche die endotheliale Angiogenese regulieren, was zu einer Neovaskularisierung führt. Diese endotheliale Reorganisation induziert eine Zerstörung der zellulären Leberstruktur und somit auch das Sinusoid, wodurch die Leberfibrose weiter verschlimmert wird.<sup>[132]</sup> Dieses Verhalten kann durch Verwendung einer Basalmembranbeschichtung künstlich induziert werden. Die Basalmembran ist eine spezialisierte ECM, welche auf der basalen Seite von Endothelzellen das Blutgefäß strukturell stabilisiert. Sie besteht hauptsächlich aus Laminin 8 und 10 und kann kommerziell als Matrigel® erworben werden.<sup>[133]</sup> Um die Eigenschaft der Angiogenese bei den verwendeten LSEC zu verifizieren, wurden  $4,2 \cdot 10^4$  Zellen für 24 h auf einer wachstumsfaktorreduzierten Matrigel®-Schicht kultiviert. Nach 4 h und 24 h wurde das Wachstum in einer Hellfeldaufnahme mikroskopisch untersucht (Abbildung 20). Die Aufnahmen zeigen, dass sich nach 4 h eine tubuläre Organisation der Zellen andeutet, welche sich nach 24 h vollständig ausgeprägt hat. Dieser sogenannte *Tubeformation-Assay* wurde in der Literatur bei Endothelzellen bereits wiederholt nachgewiesen.<sup>[119,134,135]</sup> Aber auch bei der Verwendung von direkt isolierten LSEC können nach 6 h auf Matrigel® die ähnliche Effekte beobachtet werden.<sup>[136]</sup> Da die in dieser Arbeit verwendeten LSEC somit wesentliche Eigenschaften, die zu einer Leberfibrose beitragen aufweisen, wurde deren Verwendung für weitere Untersuchungen als geeignet betrachtet.

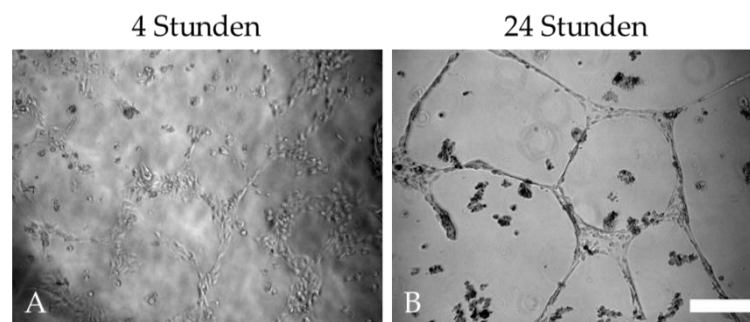


Abbildung 20: Angiogeneseverhalten von LSEC auf Matrigel®. Es wurden  $4,2 \cdot 10^4$  LSEC auf wachstumsfaktorenreduziertes Matrigel® in einem  $\mu$ -Slide-8-Well ausgesät. Anschließend wurde das Wachstumsverhalten nach 4 h- und 24 h durch eine Hellfeldaufnahme mikroskopisch visualisiert. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, Maßstab = 200  $\mu$ m.

### 3.1.2.3 Scavenger Funktion von LSEC

Eine der Hauptaufgaben von LSEC ist es, das Blut aus dem Intestinalbereich zu filtern. Vor allem die hohe endozytotische Kapazität erlaubt es ihnen mit spezifischen Rezeptoren (*Scavenger*-Rezeptoren) bestimmte Makromoleküle aus dem Blut zu binden.<sup>[91]</sup> Dazu zählt der Mannoserezeptor CD206, welcher Kollagen- $\alpha$ -Ketten und Glykokonjugate mit terminaler Mannose endozytiert.<sup>[92]</sup> Um die Endozytoseaktivität der LSEC zu untersuchen, werden in der Forschung häufig mit Fluorophoren konjugierte Ovalbumine (OVA) eingesetzt. OVA ist das in Geflügeleier am häufigsten vorkommende Protein und ist dank seiner einfachen Gewinnung in der Forschung weit verbreitet.<sup>[137,138]</sup> Auch im Zusammenhang mit einer Funktionsanalyse des Mannoserezeptors in LSEC wurde OVA bereits eingesetzt.<sup>[81]</sup> Zur Untersuchung der endozytotischen Funktion des Mannoserezeptors als Scavengerrezeptor wurden  $1,5 \cdot 10^4$  LSEC in einem  $\mu$ -Slide-8-Well für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Alexa Fluor™-488 Fluorophor gekoppelten OVA für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation mit Medium wurde die Probe für eine Immunfluoreszenzmarkierung des CD206 vorbereitet (Abbildung 21, E-H). Abbildungen A bis D zeigen die Lebendmikroskopieanalyse der Zellen nach der simultanen Behandlung mit OVA-488 und *LysoTracker*™ Red. Abbildung 21 zeigt die Kolokalisation von OVA-488 mit CD206 sowie mit der *LysoTracker*™ Red.

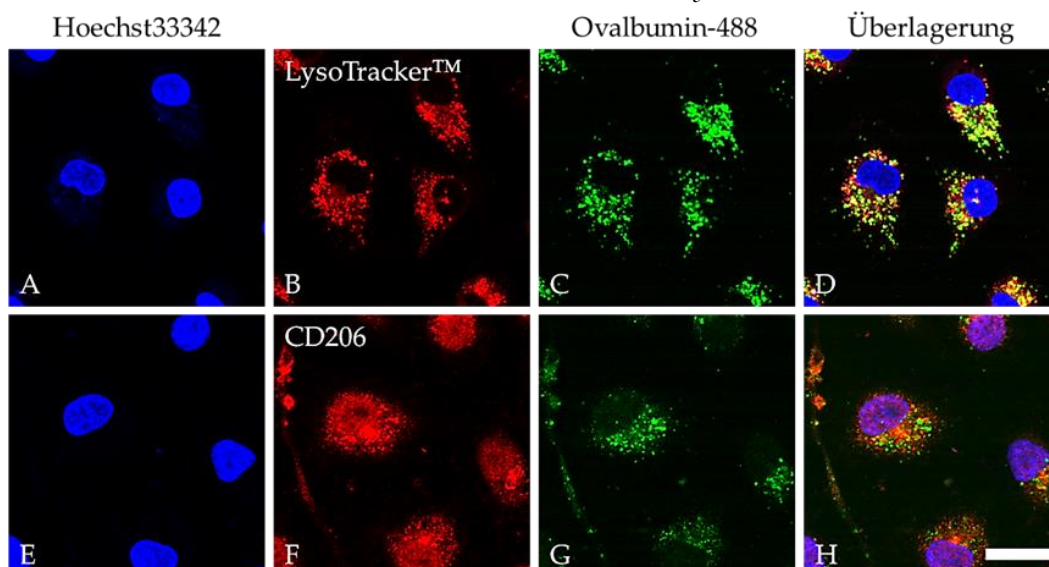


Abbildung 21: Funktionsanalyse der LSEC bezogen auf deren endozytotischen Eigenschaften. Es wurden  $1,5 \cdot 10^4$  LSEC in einem  $\mu$ -Slide-8-Well für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde eine Lebendinkubation mit 100  $\mu$ g/ml OVA-488 für 20 min durchgeführt, daraufhin folgte eine 20-minütige Markierung der Lysosomen mit 50 nM *LysoTracker*™ Red für A-D. Anschließend wurde diese Probe direkt konfokalmikroskopisch untersucht. E-H wurden nach der reinen Medieninkubation fixiert, permeabilisiert und indirekt mit CD206 (Kaninchen-Anti-human-C206-Primärantikörper/ AlexaFluor®-647 Hühnchen-Anti-Kaninchen Sekundärantikörper durch eine Immunfluoreszenzmarkierung markiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden alle Zellen mit Hoechst33342 behandelt

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Rot: CD206 (F) ( $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ) oder *LysoTracker*™ Red ( $\lambda_{\text{ex}} = 577 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ), Grün: OVA-488 ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$ )  
Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5. Der Maßstab beträgt 25  $\mu$ m.



Dieses Ergebnis ist mit anderen publizierten Resultaten über LSEC im Einklang.<sup>[81,119,138]</sup> In dendritischen Zellen kolokalisieren OVA und der Mannoserezeptor, aber sie kolokalisieren nicht mit dem *LysoTracker*<sup>™</sup>, wodurch dieser Zelltyp von LSEC unterschieden werden kann.<sup>[139]</sup> Das Resultat dieses Experimentes zeigt, dass die verwendeten LSEC selektiv Makromoleküle endozytieren können und diese somit ihre *Scavanger*-Funktion beibehalten.

### 3.1.3 Etablierung der LSEC im Mikrokanal des vasQchip

Die Endothelzellen der Leber kleiden die Blutgefäße aus, welche sich durch die Leber ziehen<sup>[91]</sup>. Das *Organ-on-a-Chip* System vasQchip mit seiner runden und porösen Mikrokanalstruktur und dem umgebenden Kompartiment imitiert durch Anlegen eines artifiziellen Blutstroms im Mikrokanal diese Mikroumgebung.<sup>[61]</sup> Abbildung 22 zeigt eine schematische Darstellung des vasQchip mit einem Querschnitt durch den perforierten Mikrokanal. Dabei ermöglicht diese Perforation den Medienaustausch mit dem umgebenden Kompartiment. Für die optimale Einbringung der LSEC im Mikrokanal müssen einige Parameter berücksichtigt und getestet werden. So spielt die Porengröße des Mikrokanals, die Beschichtung, der Volumenstrom und die Besiedlungsmethode eine entscheidende Rolle. Dieser Einfluss wird in den nachfolgenden Kapiteln genauer vorgestellt und diskutiert.

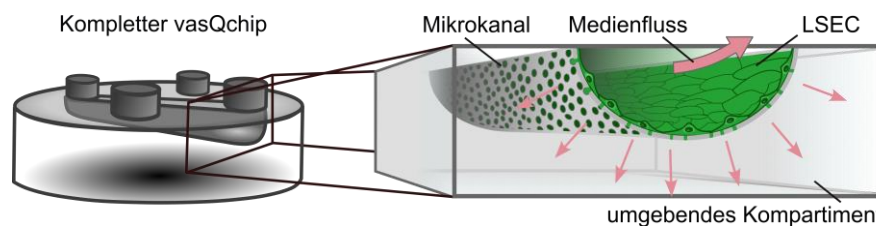


Abbildung 22: Schematische Darstellung und Funktionseise des vasQchips inklusive dessen Querschnitt, mit LSEC im Mikrokanal und Medienfluss durch den Mikrokanal und dessen Poren ins Kompartiment.

#### 3.1.3.1 Bestimmung der Porengröße des vasQchip

Der poröse Mikrokanal im vasQchip ermöglicht einen Medienaustausch zwischen dem Mikrokanal und dem umgebenden Kompartiment. Zudem wird durch die Perforation des Mikrokanals ein direkter Zellkontakt zwischen den Zellen im Mikrokanal und dem umgebenden Kompartiment gewährleistet.<sup>[61]</sup> Die Poren in der Membran des Mikrokanals werden wie in Kapitel 1.1.2.1 beschrieben durch Schwerionenbeschuss der Membran erzeugt, wodurch Materialdefekte entstehen die in einem anschließendem Ionenspur-Ätz-Verfahren herausgewaschen werden. Dabei ist die Porengröße im Mikrokanal variabel einstellbar und wird durch die Dauer des Ätzens bestimmt. Die Porengröße kann so zwischen 1  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$  und 5  $\mu\text{m}$  gewählt werden. Durch die Fenestrierung der LSEC und deren siebartigen Eigenschaften, könnte vermutet werden, dass eine größere Porengröße der sinusoidalen Basalmembran eher entspricht, was im

folgenden Versuch diskutiert werden soll.<sup>[89]</sup> Ziel dieses Versuches ist es, die Porengröße zunächst in einem Transwell®-System zu evaluieren und anschließend am vasQchip zu testen. Das Transwell®-System ist ein vergleichbares System zum vasQchip, wobei dieses jedoch nur statisch verwendet werden kann und keine konstante Flusseigenschaften simuliert. Ähnlich wie der vasQchip besteht dieser aus einer Polycarbonatmembran mit unterschiedlich wählbaren Porengröße auf dem Boden des Einsatzes. Es wurde zunächst das Wachstum der LSEC in einem Transwell®-System mit den Porengrößen 0,4 µm, 3 µm und 5 µm getestet. Für den Wachstumstest auf den unterschiedlichen Poren wurde die 0,33 cm<sup>2</sup> große Membran mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet und mit 1,5·10<sup>4</sup> LSEC besiedelt. Nach einer Kultivierungszeit von 72 h wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD206 und CD31 durchgeführt. Anschließend wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC und die DNA im Zellkern mit Hoechst33342 markiert. Die mikroskopische Auswertung des Transwell®-Systems ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Hellfeldaufnahmen visualisieren die unterschiedlichen Porengrößen der eingesetzten Transwells®. Die Markierung der DNA im Zellkern und des Aktinzytoskeletts ermöglicht es, einzelne Zellen eindeutig zu erkennen. Zudem konnten durch die Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 und CD206 LSEC spezifische Marker nachgewiesen werden. Unabhängig von der Porengröße wurde in allen Transwells® eine konfluente Zellschicht festgestellt. Daher wurden als nächstes die LSEC direkt im vasQchip auf den unterschiedlichen Poren des Mikrokanals unter statischen Bedingungen getestet (Abbildung 24).

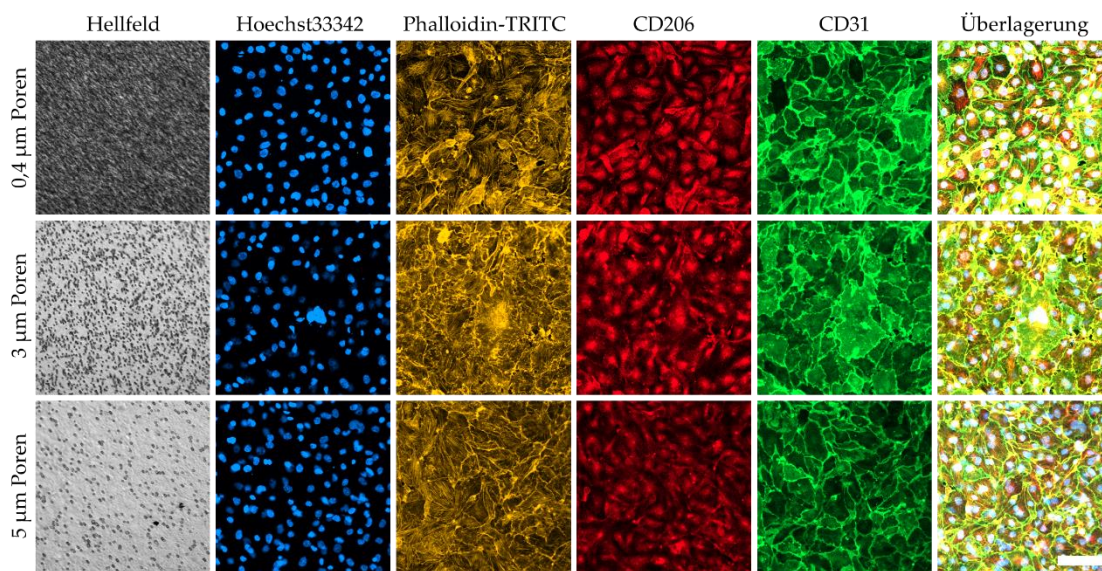


Abbildung 23: Untersuchung des LSEC-Wachstums auf unterschiedlich porösen Transwell®-membranen. 0,33 cm<sup>2</sup> Transwells® mit den Porengrößen 0,4 µm,- 3 µm,- und 5 µm wurden mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet. Es wurden 1,5·10<sup>4</sup> LSEC auf den Membranen ausgesät und für 72 h kultiviert. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD206 und CD31 (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor®.488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper; Kaninchen-Anti-human-C206-Primärantikörper/ Alexa Fluor®.647 Hühnchen-Anti-Kaninchen Sekundärantikörper). Zusätzlich wurde für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen die DNA mit Hoechst3332 und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC gefärbt. Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Rot: CD206 ( $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ )  
Konfokalmikroskop = Zeiss LSM, Maßstab = 100 µm

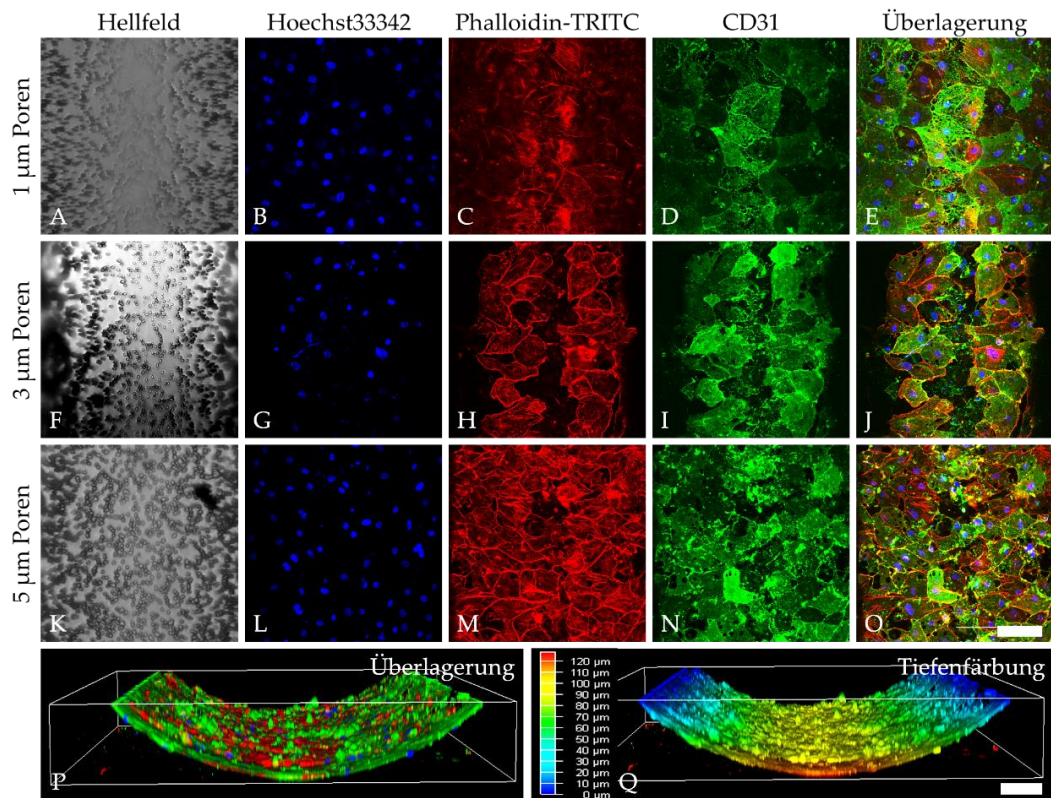


Abbildung 24: Qualitative Untersuchung des LSEC-Wachstums auf unterschiedlich porösen Membranen. LSEC wurden im vasQchip auf unterschiedlichen Porengrößen des Mikrokanals statisch kultiviert. Der Mikrokanal wurde mit 0,1 mg/ml Kollagen I und das umgebende Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Danach wurden  $10 \cdot 10^4$  LSEC in den Mikrokanal eingebracht und für 3 Tage statisch kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper) vorbereitet. Vor der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC und die DNA mit Hoechst33342 markiert. A-O zeigt die 3D-Projektionen der *z-Stack* Messung. P stellt die Seitenansicht des Mikrokanals dar und Q zeigt die entsprechende Tiefenfärbung.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Rot: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, *z-Stack* Parameter: Abstand zwischen Aufnahmen =  $3 \mu\text{m}$ , für  $120 \mu\text{m}$ , Maßstab =  $100 \mu\text{m}$ .

Für den Einfluss der unterschiedlichen Porengrößen im vasQchip auf die Endothelzellschicht, wurde der Mikrokanal mit 0,1 mg/ml und das umgebende Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Für die Besiedlung des Mikrokanals wurde eine Zellzahl von  $10 \cdot 10^4$  LSEC verwendet. Nach einer statischen Kultivierung von 3 Tagen wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmarkierung mit CD31 fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. In Abbildung 24 ist das Ergebnis der konfokalmikroskopischen Untersuchung zu sehen, nachdem die Zellen zusätzlich mit Hoechst33342 und Phalloidin-TRITC markiert wurden. Im Vergleich zu den Transwell®-Experimenten in Abbildung 23 lassen sich deutliche Unterschiede in der Konfluenz der Zellschicht erkennen. In Abbildung 24 L bis O (vasQchip mit einer Porengröße von  $5 \mu\text{m}$ ) konnte anhand der Markierung des Aktinzytoskeletts eine konfluente Zellschicht visualisiert werden. Allerdings sind einige größere Löcher in der Zellschicht durch die CD31-Markierung zu erkennen. Die Zellschicht in dem  $3 \mu\text{m}$  vasQchip zeigt die geringste Konfluenz auf, da größere Lücken zwischen den Zellen zu erkennen sind. Die  $1 \mu\text{m}$  großen Poren haben den kleinsten

Einfluss auf die Zellschicht. Die LSEC-Schicht ist nach 3 Tagen über den gesamten Zeitraum konfluent gewachsen. Ähnliche Porengrößen werden auch in der Literatur genannt, in der 0,4  $\mu\text{m}$  große Poren in Transwells® und mikrofluidischen Systemen erfolgreich für experimentelle Untersuchungen von LSEC eingesetzt wurden.<sup>[80,140,141]</sup> Für alle weiteren Experimente wurde in der hier vorgestellten Arbeit eine Porengröße von 1  $\mu\text{m}$  gewählt.

### 3.1.3.2 Volumenstrom, Beschichtung und Besiedlungsmethode

Während Systeme wie Transwells® nur statisch verwendet werden können, ermöglicht der vasQchip durch eine Integration einer mikrofluidischen Pumpe, einen Medienfluss im Mikrokanal.<sup>[61]</sup> Die Zellen werden durch den Volumenstrom im Mikrokanal Scherkräften ausgesetzt, deren Einfluss und Bedeutung in diesem Kapitel vorgestellt werden soll. Dies erforderte das Anpassen einiger Umgebungsvariablen deren Einfluss in diesem Kapitel diskutiert und herausgearbeitet werden soll. Im Wesentlichen musste der Volumenstrom, die Beschichtung und die Besiedlungsmethoden parallel angepasst werden, sodass eine konfluente Kultivierung der LSEC im Mikrokanal unter fluidischen Bedingungen ermöglicht wird.

Die Leber wird mit Blut durchströmt, welches Nährstoffe, Sauerstoff und andere Moleküle in das angrenzende Gewebe verteilt. Ein gesunder erwachsener Mensch versorgt 14 Millionen Hepatozyten mit 1 ml Blut während im gleichen Zuge sekretierte Faktoren abtransportiert werden.<sup>[13]</sup> Die Wahl einer adäquaten Flussgeschwindigkeit bekommt daher eine zentrale Bedeutung, um vergleichbare Bedingungen *in vitro* zu schaffen. Eine Schlüsselrolle übernimmt der Volumenstrom, für welchen sich bei etablierten Lebermodellen Werte von 2 nl/min bis 5 ml/min finden lassen.<sup>[13,142]</sup> Ehrlich *et al.* zeigte in einem *Organ-on-a-Chip* System, dass für Hepatozyten ein Volumenstrom von 22  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei  $10^6$  Zellen eine optimale Sauerstoffversorgung bei möglichst geringem Stress ermöglicht und so für ideale Wachstumsbedingungen sorgt.<sup>[142,143]</sup> CNBio Innovations haben anhand eines pneumatischem Pumpensystem mit einem Volumenstrom von 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  zeigen können, dass dies etwa einer physiologisch repräsentativen Schubspannung im System entspricht.<sup>[13]</sup> Basierend auf diesen Informationen wurde ein Volumenstrom von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  für den vasQchip als erstrebenswert erachtet. Um einen Fluss im System zu generieren, wurde eine Peristaltikpumpe (peRYSIS, Cetoni) eingesetzt. Bei diesem Pumpensystem wird das Medium kontinuierlich durch mechanische Verengung des formbaren Schlauches im Kreis gepumpt, wobei der Kreislauf durch ein Reservoir unterbrochen wird. Der genaue Aufbau ist in Abbildung 25 skizziert. Um möglichst geeignete Kultivierungsbedingungen im vasQchip zu schaffen, befindet sich das Medienreservoir und der vasQchip in einer kontrollierten Umgebung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Für die Kultivierung der Endothelzellen im Mikrokanal bei einem Volumenstrom von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  wurden die vasQchips zunächst mit  $10 \cdot 10^4$  LSEC besiedelt. Um zusätzlich für ein möglichst konfluentes Wachstum zu sorgen, wurde das System für 1 h auf dem vasQturn gedreht, wodurch die Endothelzellen an allen Seiten des geformten Mikrokanals anwachsen konnten.

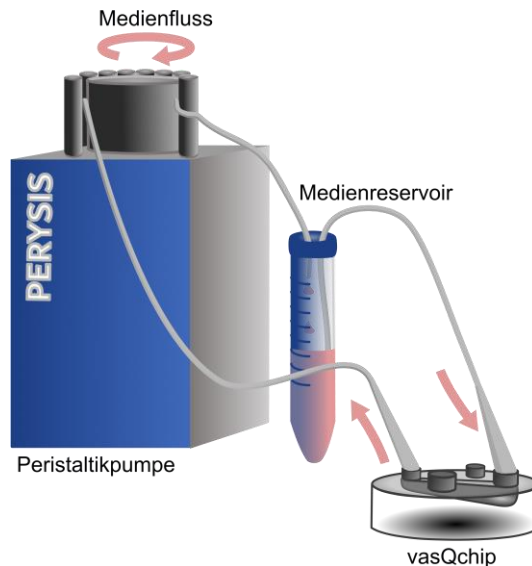


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Pumpensystems für den vasQchip. Die verwendete Peristaltikpumpe von Cetoni pumpt das Medium durch Verformung des Schlauches in einem Kreislauf, welcher durch ein Medienreservoir unterbrochen wird. Der Volumenstrom ist dabei variabel einstellbar.

Abbildung 26 zeigt die montierten, verschlossenen vasQchips am vasQturn in ihrer Rotation um die Mikrokanalachse. Anschließend wurde der vasQchip direkt bei  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  an die Peristaltikpumpe angeschlossen, siehe Abbildung 27 A bis C. Eine Markierung der DNA mit Hoechst33342 ermöglicht den Nachweis von adhärennten Zellen im vasQchip. Die zusätzliche Hellfeldaufnahmen in A, D, und G dienen zur Orientierung im System, wodurch der poröse Mikrokanal identifizierbar wird. Durch eine Überlagerung beider Aufnahmen können so eindeutig LSEC im Mikrokanal des vasQchips nachgewiesen werden. Abbildung 27 A bis C zeigt die Analyse der LSEC-Besiedelung, nachdem der vasQchip direkt mit  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  an die Peristaltikpumpe angeschlossen wurde. Wie zu erkennen, konnte nach einer Kultivierung von 3 Tagen anhand der mit Hoechst33342 markierten Zellkerne, keine konfluente Zellschicht nachgewiesen werden. Die naheliegendste Vermutung ist, dass die Endothelzellen beim schlagartigen Anlegen des Flusses weggespült werden, weswegen ein Programm entwickelt wurde, welches den Volumenstrom langsam auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  steigert.



Abbildung 26: Darstellung des vasQturn zur Besiedelung des Mikrokanals des vasQchips mit Endothelzellen. Die mechanische Rotation entlang der Mikrokanalachse ermöglicht eine homogene Adhäsion der Zellen im halbzyklrischen Mikrokanal. Die Rotation wird mit  $0,25 \text{ rpm}$  für  $1 \text{ h}$  durchgeführt.

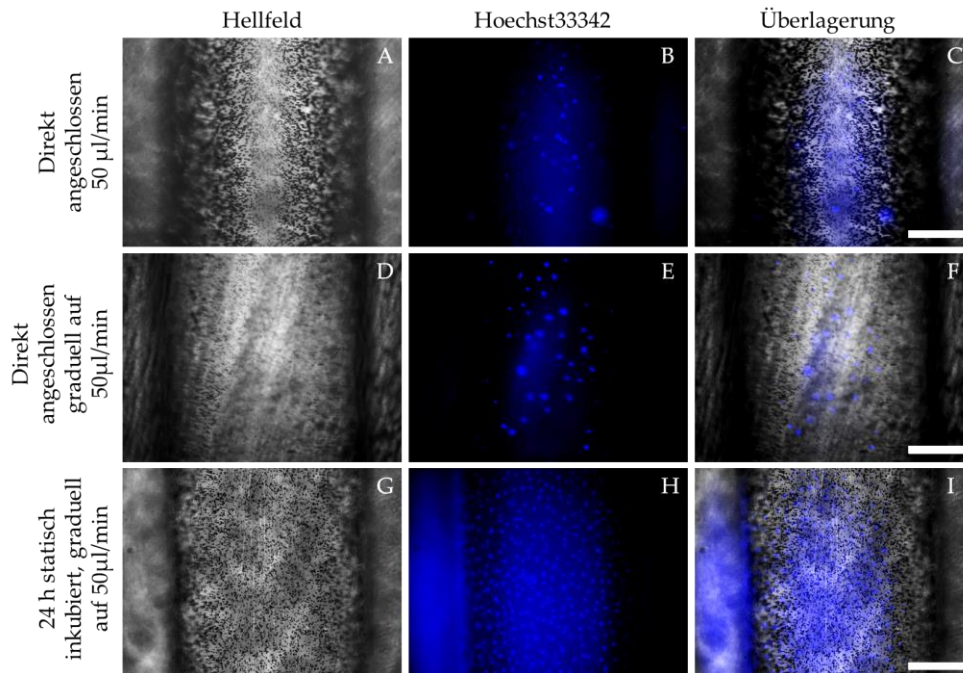


Abbildung 27: Etablierung einer konfluenten LSEC-Schicht im mikrofluidischen Mikrokanal des vasQchips. Der Mikrokanal wurde mit 0,25 mg/ml Fibronektin und im umgebenden Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Es wurden jeweils  $10 \cdot 10^4$  LSEC in den Mikrokanal eingebracht und für eine Stunde auf dem vasQturn bei 0,25 rpm gedreht. Anschließend folgte eine statische Inkubation von 24 h (G-I), während die anderen vasQchips direkt an die Fluidik angeschlossen wurden (A-F). Die vasQchips wurden für insgesamt 3 Tage bei einem finalen Volumenstrom von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  fluidisch kultiviert. Anschließend wurden die DNA der Zellen in den vasQchips mit Hoechst33342 markiert und im LED-Lichtmikroskop visualisiert. A-C zeigt einen vasQchip, welcher direkt an die Mikrofluidik angeschlossen wurde und bei einem Volumenstrom von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  kultiviert wurde. Bei D-F wurde ein Programm verwendet, welches den Volumenstrom graduell auf 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  erhöht. G-I zeigt die Auswirkung einer statischen 24 h Inkubation vor dem Anschluss an die Fluidik mit zusätzlicher langsamer Steigerung des Volumenstroms.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Mikroskop: Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

Tabelle 1 zeigt das verwendete Programm welches den Volumenstrom innerhalb von 3 Tagen von 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  graduell erhöht. Da jedoch auch bei einem graduellen Erhöhen des Volumenstroms kein zufriedenstellendes konfluentes Wachstum der LSEC im Mikrokanal erreicht werden konnte (Abbildung 27, Bild D-F), wurde der besiedelte vasQchip nach dem vasQturn zusätzlich für 24 h statisch inkubiert, bevor die Fluidik angeschlossen wurde. In Abbildung 27 G bis I ist das Ergebnis dieser Besiedlungsmethode zu sehen. Durch die Markierung der DNA mit Hoechst33342 konnte gezeigt werden, dass die LSEC gleichmäßig und konfluent im gesamten Mikrokanal angewachsen sind. Parallel zum Volumenstrom wurde auch getestet, wie sich verschiedene Beschichtungsmethoden auf die Wachstumsrate der Endothelzellen auswirken. Abbildung 28 zeigt, dass die LSEC auf einer 0,1 mg/ml Kollagen I-Beschichtung (D-F) und angelegtem Fluss keine konfluente Zellschicht ausbilden. Wurde hingegen 0,25 mg/ml Fibronektin verwendet (Abbildung 28 A-C), können LSEC bis zu 3 Tage unter mikrofluidischen Bedingungen kultiviert werden.

Tabelle 1: Detaillierte Auflistung der graduell steigenden Volumenströme zur Kultivierung von LSEC im vasQchip unter Verwendung einer Peristaltikpumpe.

Volumenstrom ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Zeit (h)	Volumen (ml)
3	0,5	0,09
7	0,5	0,21
10	31	18,6
15	1	0,9
20	1	1,2
25	17	25,5
30	1	1,8
35	1	2,1
40	1	2,4
45	1	2,7
50	$\infty$	$\infty$

Fibronektin wurde als alternatives Beschichtungsmaterial zu Kollagen I gewählt, da es verbesserte metabolische- und Oberflächeneigenschaften der LSEC aufweist, wie bereits in Kapitel 3.1.1 bereits vorgestellt wurde. Bezüglich des Volumenstroms und der Oberflächenbeschichtung konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen im vasQchip bei einem Volumenstrom von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  kultivierbar sind, sofern 0,25 mg/ml Fibronektin als Beschichtung im Mikrokanal verwendet wird. Zusätzlich sollte nach der Besiedlung und der Rotation am vasQturn eine statische Inkubation von 24 h folgen und anschließend der Volumenstrom graduell auf 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  erhöht werden. Diese Bedingungen stellten sich in dem hier verwendeten Aufbau als optimal heraus und wurden, sofern nicht anderweitig erwähnt, in allen folgenden Experimenten verwendet.

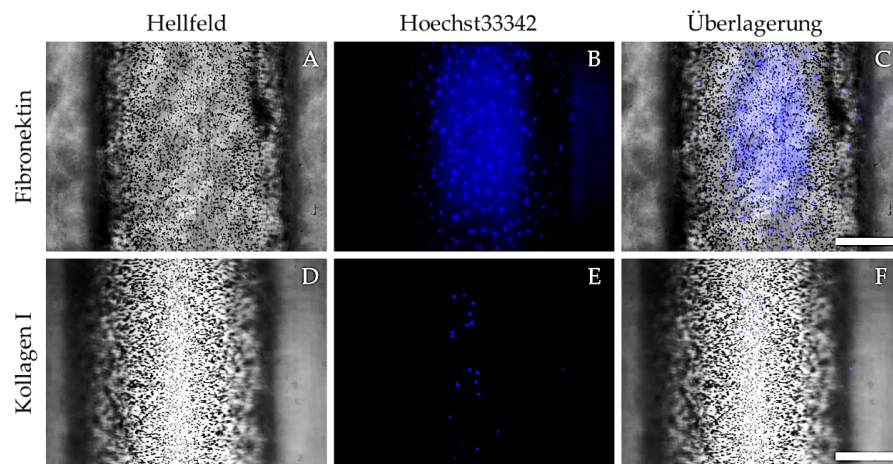


Abbildung 28: LSEC wurden unter mikrofluidischen Bedingungen im Lebermodell auf unterschiedlichen Beschichtungen kultiviert. Die Beschichtung im umgebenden Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I unterschied sich in den beiden Ansätzen nicht. Im Mikrokanal wurden 0,1 mg/ml Kollagen I verwendet und 0,25 mg/ml Fibronektin. Danach wurden jeweils  $10^4 \cdot 10^4$  LSEC in den Mikrokanal eingebracht und für eine Stunde auf dem vasQturn bei 0,25 rpm gedreht, anschließend folgte eine statische Inkubation über 24 h. Die vasQchips wurden für 3 Tage mikrofluidisch, mit einer graduellen Steigerung bis zu einer finalen Flussrate von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  kultiviert und anschließend die Zellkerne mit Hoechst33342 markiert und im LED-Lichtmikroskop ausgewertet. Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Mikroskop: Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3.3 Langzeitkultivierung der Endothelzellen im System

Für die nachhaltige Verwendung eines *in vitro* Lebermodells über einen Zeitraum von mehreren Tagen, ist es wichtig die Kapazitäten bezüglich einer Langzeitanwendung zu abschätzen zu können. An erster Stelle steht die Viabilität der verwendeten Zellen im Modell. Dabei ist davon auszugehen, dass diese durch den zusätzlichen Scherstress der mikrofluidischen Umgebung absterben, oder sich ablösen könnten. Manche Systeme weisen eine zu hohe Schubspannung auf und sind nur für wenige Stunden oder Tage verwendbar. Die Zellen werden dabei durch den zusätzlichen Druck und somit verursachten Stress von der Oberfläche abgelöst.<sup>[144]</sup> Es gibt unterschiedliche Modellsysteme, welche unter optimalen Bedingungen zwischen 5 Tagen und 4 Wochen verwendbar sind.<sup>[13]</sup> Um die LSEC, im vasQchip unter mikrofluidischen Bedingungen in dieses Spektrum einordnen zu können, wurde ein Langzeitversuch durchgeführt. Dafür wurde der vasQchip wie in Kapitel 3.1.3.2 beschrieben mit LSEC im Mikrokanal besiedelt und anschließend für 3, 7 und 21 Tage fluidisch kultiviert. Die Überprüfung erfolgte anschließend über einen visuellen Nachweis der angefärbten Zellen durch die Verwendung eines Konfokalmikroskops und einer 3D-Projektion des Mikrokanals. Abbildung 29 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der LSEC, welche über 3 und 7 Tage kultiviert wurden. Durch die Tiefenfärbung (D, H, J und L) wird deutlich, dass die Endothelzellen auch nach 7 Tagen im gesamten Mikrokanal verteilt adhären. Auch darüber hinaus ist sonst kein ersichtlicher Unterschied zwischen 3 und 7 Tage kultivierten LSEC im Mikrokanal zu erkennen. Erste Unterschiede zeigten sich in der anschließenden RT-qPCR zur Analyse der mRNA-Expression spezifischer LSEC- und Endothelzellmarker. In Abbildung 30 ist die mRNA-Expression der unterschiedlichen LSEC-Marker im 7-tägigen fluidisch und statisch kultivierten vasQchip dargestellt. Verglichen mit den statisch kultivierten vasQchips ist die mRNA-Expression der LSEC-Marker in fluidisch kultivierten LSEC im vasQchip, höher. Der LSEC spezifische CD206 Mannoserezeptor ist im 7 Tage statisch kultivierten Lebermodell im Vergleich zum 3 Tage statisch kultivierten Probe geringer exprimiert. Eine Reduktion der Expression lässt sich in den fluidisch kultivierten Proben dagegen nicht beobachten. Dort sind sowohl die Endothelzellmarker CD31 und VE-Cadherin nach 7 Tage als auch die LSEC-Marker LYVE-1 und CD206 verstärkt exprimiert. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass LSEC auf den angelegten Fluss von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  im System positiv reagieren und eine Anwendung des Systems für mindestens 7 Tage garantiert werden kann. Eine längere Kultivierung bis Tag 21 wurde visuell bestätigt (siehe Abbildung 31). Um jedoch eine Aussage über deren Verfassung und Vitalität treffen zu können, müsste eine Expressionsanalyse durchgeführt werden. Da allerdings auch in der Literatur Modellsysteme bis zu 28 Tage nach Beginn der Kultivierung verwendet wurden, wird vermutet, dass auch ein Langzeitkultivierung im vasQchip potentiell durchführbar ist.<sup>[13]</sup> Ein weiterer Vorteil des hier vorgestellten partiell etablierten Lebermodells ist dessen Verwendung von LSEC. Bisher wurden häufig humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) eingesetzt, welche zwar einen positiven Einfluss auf die Viabilität der Hepatozyten haben, jedoch keine LSEC spezifischen Funktionen aufweisen. HUVEC weisen somit Defizite in LSEC spezifischen Funktionen auf und sind nur eine geringfügige Alternative zu LSEC.<sup>[13,116,145]</sup> Die hier verwendeten LSEC von



*Upcyte Technologies* behalten nachgewiesenermaßen charakteristische LSEC-Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass sie ein endozytotisches Verhalten aufweisen (Kapitel 3.1.2.3) und LSEC spezifische Marker wie LYVE-1 und CD206 exprimieren (Kapitel 3.1.1.3). *Upcyte*<sup>®</sup>-LSEC wurden bereits erfolgreich in einem fluidischen Lebermodell eingesetzt und in Kokultur mit Hepatozyten für Toxizitätsstudien von Paracetamol eingesetzt.<sup>[119]</sup> Die vielversprechenden Erkenntnisse der in dieser Arbeit vorgestellten LSEC-Untersuchungen, in Kombination mit den publizierten Daten unterstreicht deren positiven Einfluss in der Anwendung und Etablierung im hier verwendeten vasQchip. Das Lebermodell wird durch den Einsatz der parenchymalen Hepatozyten zusammen mit LSEC zu einer weitaus authentischeren Rekonstruktion der Leber. In Kapitel 3.2 werden die Hepatozyten evaluiert und im vasQchip etabliert.

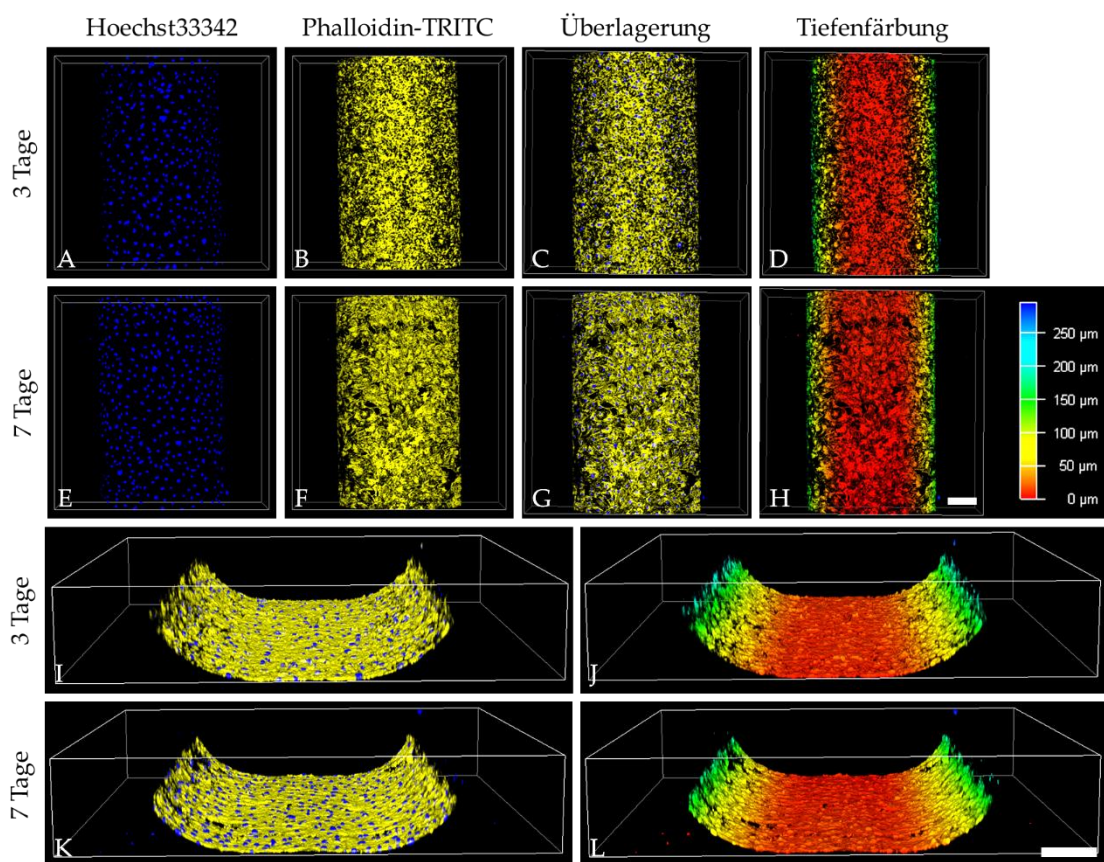


Abbildung 29 Langzeitkultivierung von LSEC unter fluidischen Bedingungen für 3 und 7 Tage im vasQchip.  $10 \cdot 10^4$  LSEC wurden im Mikrokanal auf einer 0,25 mg/ml Fibronektinschicht ausgesät und bei einem finalen Fluss von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 3 und 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und das Aktinzytoskelett mithilfe von Phalloidin-TRITC markiert. Vor der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurde die DNA mit Hoechst33342 markiert. Die Visualisierung erfolgte durch die 3D-Projektion der Aufnahmen in einem *z-Stack*. In D, H, J, und L sind die Tiefenaufnahmen zur Visualisierung der Dreidimensionalität des Mikrokanals, abgebildet.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, *z-Stack* Parameter: Abstand zwischen Aufnahmen = 3  $\mu\text{m}$ , für 300  $\mu\text{m}$ , Maßstab = 200  $\mu\text{m}$ .

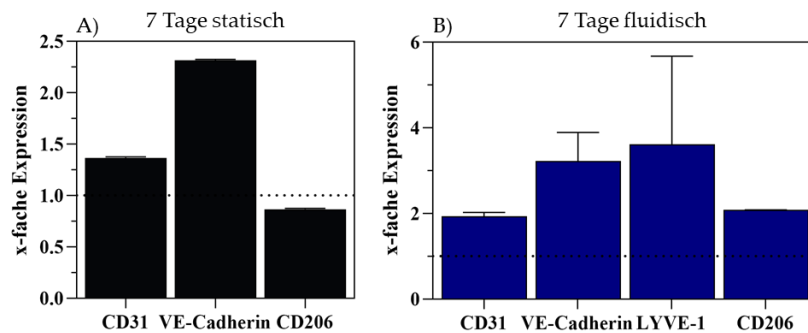


Abbildung 30: RT-qPCR-Analyse der mRNA-Expression von statisch und fluidisch kultivierten LSEC-Markern im vasQchip.  $10 \cdot 10^4$  Endothelzellen wurden in einen mit 0,25 mg/ml Fibronectin beschichteten Mikrokanal des vasQchips eingebracht und bei 0,25 rpm im vasQturn rotiert. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die fluidischen vasQchips an den Fluss angeschlossen und parallel mit den statischen für 3 oder 7 Tage kultiviert. Anschließend folgte eine cDNA-Synthese und die Proben wurden dann auf die Expression von CD31, VE-Cadherin, LYVE-1 und CD206 analysiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode, die Proben wurden auf die jeweilig 3 Tage kultivierte Probe normiert (=1), als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus  $n=3$ .

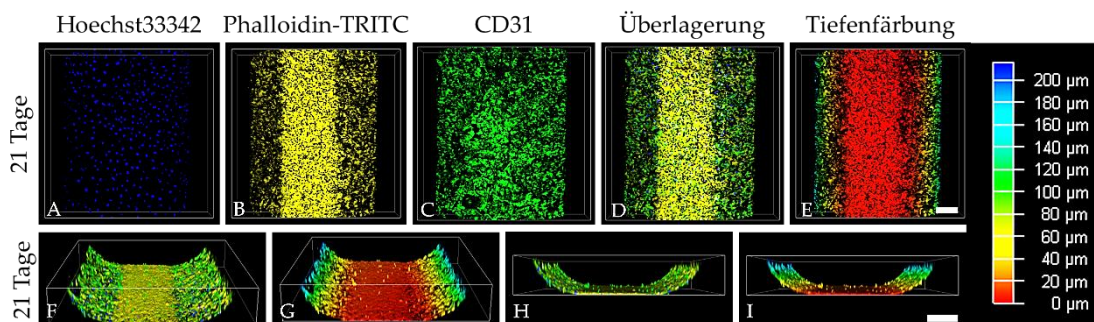


Abbildung 31: Kultivierung der Endothelzellen für 3 Wochen im mikrofluidischen System. Der vasQchip wurde mit 0,25 mg/ml Fibronectin beschichtet, anschließend mit  $10 \cdot 10^4$  LSEC bei 0,25 rpm für eine Stunde um die Mikrokanalachse rotierend besiedelt. Nach einer statischen Inkubation von 24 h wurde der vasQchip bei einer finalen Volumenstrom von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  an die Mikrofluidik angeschlossen. Zur Auswertung des Experimentes wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD31, eine Markierung der DNA durch Hoechst33342 sowie eine Markierung des Aktinzytoskelettes mit Phalloidin-TRITC durchgeführt und konfokalmikroskopisch visualisiert. E, - G und I zeigt die Tiefenfärbung der Unten- (A-E), lateral gekippten- (F, G) und Seitenansicht (H, I).

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ )  
 Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, z-Stack Parameter: 3  $\mu\text{m}$  zwischen Aufnahmen, Gesamthöhe 200  $\mu\text{m}$ , Maßstab = 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Hepatozyten und deren Etablierung im vasQchip

Die Leber besteht zu 70-90 % aus Hepatozyten.<sup>[71,73]</sup> Sie sind verantwortlich für die Sekretion einiger Schlüsselproteine im menschlichen Körper, wie Albumin,  $\alpha$ -Fetoprotein, Transferrin sowie verschiedene Gerinnungsfaktoren. Serum-Albumin ist dabei das Protein, welches am meisten sekretiert wird. Pro Tag werden ca. 10 g in die Blutzirkulation abgegeben und sorgen unter anderem für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes.<sup>[67]</sup> Darüber hinaus nehmen die Hepatozyten eine zentrale Rolle in der Filterfunktion der Leber ein, indem sie Nährstoffe aus dem Blut aufnehmen um sie anschließend zu verstoffwechseln. Dabei kommt es auch zur Aufnahme von anderen, teils toxischen Substanzen und Pathogenen, welche von der Leber derivatisiert oder abgebaut werden müssen.<sup>[67]</sup> Etwa 30 % der medizinisch verwendeten Medikamente werden über das Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) metabolisiert. Dazu zählen unter anderem das Immunsuppressivum Cyclosporin oder das Antibiotikum Erythromycin. Da CYP3A4 die Effizienz und Toxizität von Medikamenten stark beeinflussen kann, wurde ein besonderer Fokus in der Forschung darauf gelegt.<sup>[99]</sup> In der Leberforschung zählt die Verwendung von primär isolierten humanen Hepatozyten als Goldstandard.<sup>[146]</sup> Diese Art von Hepatozyten sind jedoch in ihrer Verfügbarkeit limitiert. Darüber hinaus verlieren sie ihr Proliferationsverhalten und ihre spezifischen Eigenschaften bei einer *in vitro* Kultivierung, weswegen von Burkard *et al.* ein Verfahren entwickelt wurde, welches primäre Hepatozyten mit proliferationsinduzierenden Genen transduziert. Dies ermöglicht es, ausgehend von einem Leberdonor, die primären Hepatozyten zu vervielfältigen und somit aus einer einzigen Zellpopulation mehrere Experimente durchzuführen. Dies gewährleistet die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Experimenten.<sup>[147]</sup> In dieser Arbeit wurden für alle nachfolgenden Experimente die Hepatozyten der Firma *Upcyte Technologies* eingesetzt. In Abbildung 32 sind die verwendeten Hepatozyten mithilfe einer Immunfluoreszenzmarkierung visualisiert dargestellt.

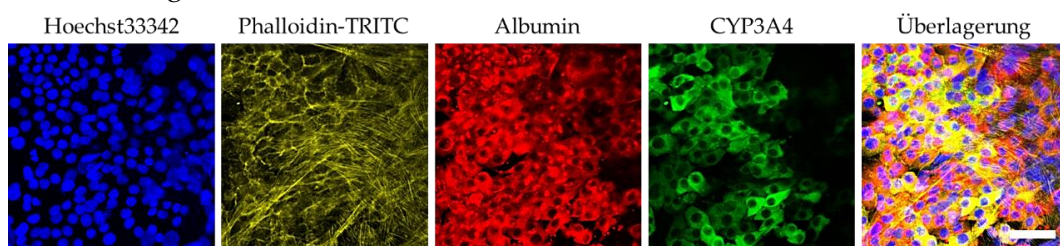


Abbildung 32: Immunfluoreszenzmarkierung der Hepatozyten von *Upcyte-Technologies*. In einem mit 0,05 mg/ml Kollagen I beschichtetem  $\mu$ -Slide-8-Well wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden diese fixiert, permeabilisiert und unspezifische Bindestellen blockiert und eine Immunfluoreszenzmarkierung von Albumin und CYP3A4 (Kaninchen-Anti-human-Albumin Primärantikörper/ Hühnchen-Alexa-Fluor®-647 Anti-Kaninchen Sekundärantikörper; Maus Anti-human-CYP3A4 Primärantikörper/ Ziege-Alexa-Fluor®-488 Anti-Mouse Sekundärantikörper) durchgeführt. Vor der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurde die DNA mit Hoechst33342 und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC markiert.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Rot: Albumin ( $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ), Grün: CYP3A4 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, Maßstab = 50  $\mu\text{m}$ .

Dafür wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten in einem  $\mu$ -Slide-8-Well auf einer 0,05 mg/ml Kollagen I Beschichtung ausgesät und anschließend für 7 Tage kultiviert. Die Proteinexpression von Albumin und CYP3A4 wurde durch eine Immunfluoreszenzmarkierung analysiert und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC und die DNA mit Hoechst33342 markiert. Laut Hersteller sollten die Hepatozyten die Expression von Albumin und CYP3A4 aufweisen.<sup>[147]</sup> Diese beiden Marker der Hepatozyten werden unter anderem verwendet um neue Hepatozytenquellen zu analysieren und deren relevanten Einsatzgebiete zu definieren. Primär isolierten humane Hepatozyten weisen eine hohe CYP-Aktivität auf wohingegen die Leberkrebszelllinie HepG2 diese nur schwach aufweist.<sup>[148]</sup> Für die Medikamentenforschung sollten daher bevorzugt primäre Hepatozyten gegenüber den üblich verwendeten HepG2 verwendet werden. Beide Marker sind wichtige Attribute von Hepatozyten und konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden (Abbildung 32).

### 3.2.1 Kultivierung der Hepatozyten

Aufgrund ihrer metabolischen Aktivität sind Hepatozyten sehr sensibel gegenüber ihrer Mikroumgebung und die gewählten Kultivierungsbedingungen spielen eine entscheidende Rolle um den Erhalt ihrer funktionellen Eigenschaften gewährleisten zu können.<sup>[146]</sup> Eine dieser Eigenschaften ist deren Proliferationsverhalten, da durch jedes Passagieren sich ihre Lebensdauer verkürzt und der Phänotyp verändert wird.<sup>[146,147]</sup> Um eine Aussage über die Verwendbarkeit bezüglich der Anzahl der Passagen treffen zu können, wurde die mRNA-Expression der Hepatozytenmarker CYP3A4, Albumin, G6P und UGT1A1 über 4 Passagen durch eine RT-qPCR verfolgt. Hierfür wurden in einer Kollagen I beschichteten 24-Well-Platte  $15 \cdot 10^4$  Hepatozyten für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die jeweiligen Passagen auf ihre mRNA-Expression durch eine RT-qPCR quantifiziert. Das Ergebnis der RT-qPCR ist in Abbildung 33 dargestellt und zeigt, dass Passage 3 und 4 eine signifikant geringere mRNA-Expression aller Marker in Passage 1 aufweisen. Die Expression von Albumin sinkt um 73 % von Passage 1 auf 4 und die Expression von CYP3A4 wird um den Faktor 0,52 reduziert. Passage 2 hingegen ist in der Expression von Albumin um den Faktor 1,16 erhöht und bei Glucose-6-Phosphatase wird eine 1,07-fache verstärkte mRNA-Expression gegenüber von Passage 1 beobachtet. CYP3A1 wird im Vergleich zu Passage 1 um einen Faktor 0,9 weniger exprimiert als in Passage 2. Dagegen wird UGT1A1 von den Hepatozyten in Passage 2 um 0,62 weniger exprimiert verglichen mit Passage 1. Die Albuminsynthese ist eine der wichtigsten Funktionen der Leber, welche im Wesentlichen von den Hepatozyten übernommen wird. Eine erhöhte, oder zumindest konstante Expression von Albumin ist daher wünschenswert.<sup>[67]</sup> Da dies jedoch nach Passage 2 nicht mehr gegeben ist, wird bei Versuchen betreffend der Albuminsynthese eine maximale Passagenzahl von 2 empfohlen.

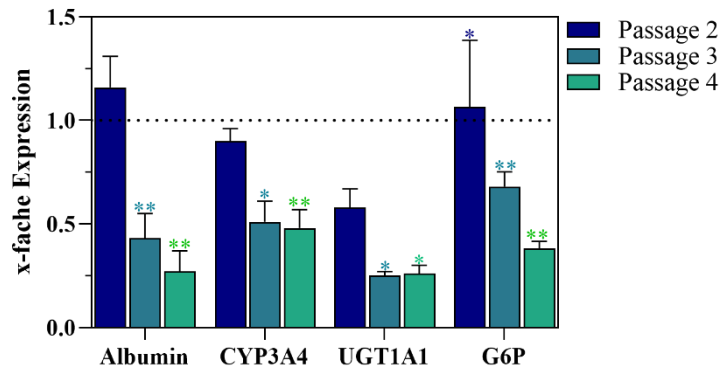


Abbildung 33: RT-qPCR zur Analyse der mRNA-Expression hepatozytenspezifischer Marker in verschiedenen Passagen. Für Passage 1 wurden  $15 \cdot 10^4$  Hepatozyten direkt nach dem Auftauen in einer Kollagen I beschichtete 24-Well-Platte ausgesät. Nach 7 Tage der Kultivierung wurde Passage 1 mithilfe von TRIzol<sup>®</sup> lysiert und die mRNA mit Hilfe der RT-qPCR analysiert. Zudem wurde Passage 2 in einer 24-Well-Platte angesetzt unter gleichen Bedingungen kultiviert. Passage 3 und 4 wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert. Anschließend folgte eine cDNA-Synthese und die Proben wurden dann auf die mRNA-Expression von Albumin, CYP3A4, UGT1A1 und Glucose-6-Phosphatase (G6P) analysiert. Die Auswertung wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt, die Proben wurden auf die Passage 1 normiert (=1), als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zu Passage 1 wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\*  $< 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen, welche durch den Student's t-Test ermittelt wurden.

CYP3A4 und UGT1A1 sind metabolisierenden Enzyme und spielen eine wichtige Rolle in der Eliminierung und Entgiftung von Xenobiotika und anderen Medikamente.<sup>[57]</sup> In der Metabolisierung von Medikamenten in der Leber werden Enzyme in Phase I und II unterschieden. Die Phase I Enzyme katalysieren die Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse der zu verstoffwechselnden Stoffe, wozu auch CYP3A4 zählt. Phase II Enzyme konjugieren funktionelle Gruppen an Medikamente oder chemische Moleküle, um diese für eine erleichterte Ausscheidung löslicher zu machen.<sup>[58]</sup> Ein Beispiel ist die UDP-Glucuronosyltransferase-1A1 (UGT1A1), welche Glucuronsäure an hydrophobe Abbaustoffe konjugiert und diese dadurch löslich macht. Dieses Enzym ist darüber hinaus auch für den enzymatischen Paracetamolabbau verantwortlich.<sup>[57]</sup> CYP3A4 und UGT1A1 repräsentieren zusammen mit der Glucose-6-Phosphatase (G6P) die wesentlichen Eigenschaften der Leber. G6P ist im finalen Schritt der Gluconeogenese für die Hydrolyse von Glucose-6-Phosphat verantwortlich. Die Leber trägt so zur Homöostase der Glucose und dessen zentralen Funktion im Körper bei. Da sowohl Albumin, CYP3A4, UGT1A1 und G6P in Passage 3 geringer exprimiert werden, wurden in den folgenden vorgestellten Experimenten nur Hepatozyten der Passage 2 verwendet.

### 3.2.2 Etablierung der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment des vasQchip

Das Sinusoid wird auf der luminalen Seite von LSEC ausgekleidet, welche im direkten Kontakt mit dem Blutfluss stehen. Auf der basalen Seite schließt sich der Spalt von Disse an, der das fenestrierte Blutgefäß von einem direkten Kontakt mit den Hepatozyten trennt.<sup>[149]</sup> Die Hepatozyten lagern sich in einer Einzelzellschicht um das Sinusoid an. Um diese strukturierte Organisation der Zellen im *Organ-on-a-Chip* Modell zu rekonstruieren, wurden die Hepatozyten im umgebenden Kompartiment eingebracht. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 34 abgebildet. Durch die Positionierung der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment werden sie nicht unmittelbar mit dem Medienfluss im Mikrokanal in Kontakt kommen. Diese strukturelle Organisation spiegelt eine vereinfachte Form der *in vivo*-Bedingung im Sinusoid der Leber wieder.

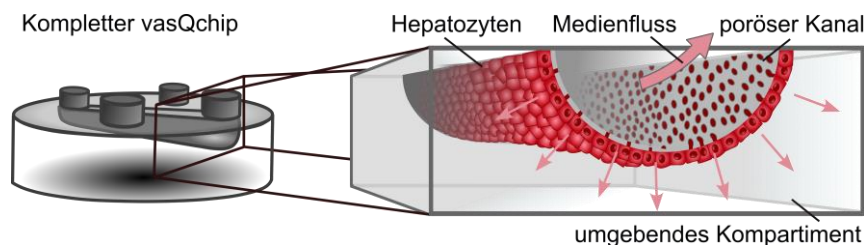


Abbildung 34: Darstellung des vasQchip und dessen Querschnitt zur Veranschaulichung der Position der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment des *Organ-on-a-Chip* Systems.

Für die Etablierung der Hepatozyten im Kompartiment wurden die Parameter, die auch zur Kultivierung der LSEC im Mikrokanal bestimmt wurden, übernommen (Kapitel 3.1.3). Analog dazu wurde die Oberflächen eines 1  $\mu\text{m}$  porösen Mikrokanals des vasQchip mit 0,25 mg/ml Fibronectin und das umgebende Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Der Besiedelung mit  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten im umgebenden Kompartiment folgte eine statische Kultivierung von 3 Tagen. Durch Markierung der DNA mit Hoechst33342 wurde deren Konfluenz bestätigt. In Abbildung 35 ist die mikroskopische Auswertung abgebildet. Da sich die Zellkerne relativ gleichmäßig um den Mikrokanal verteilen, kann auf ein konfluentes Wachstum der Hepatozyten unter den gewählten Bedingungen geschlossen werden. Die Zellschicht erstreckt sich dabei über die gesamte Außenseite des Mikrokanals. Auch bei einer statischen Kultivierung über 18 Tage konnte keine Änderung des Wachstumsverhaltens der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment beobachtet werden. Hepatozyten sind daher resistent gegenüber einer längeren Kultivierung im System. In Abbildung 36 ist deren Wachstum an Tag 3, 7, und 18 durch eine Markierung der DNA und des Aktinzytoskelettes in einer 3D-Aufnahme zu sehen. Dabei ist die homogene Hepatozytenschicht über den Mikrokanal hinweg und dem angrenzenden Kompartiment zu sehen. Die Tiefenfärbung der Aufnahme veranschaulicht die Dimensionen und räumliche Struktur des vasQchips, wodurch die konfluente Zellschicht hervorgehoben wird. Im nächsten Schritt wird das Verhalten der Hepatozyten mit angelegtem Medienfluss durch den Mikrokanal untersucht.

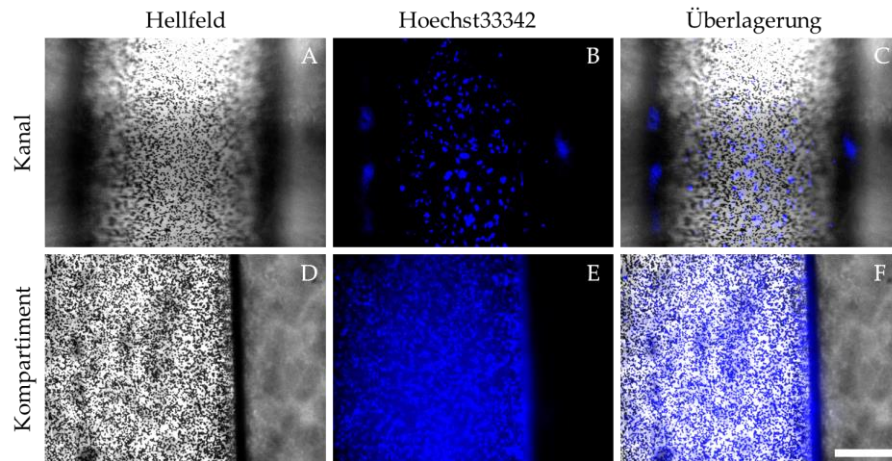


Abbildung 35: Etablierung der Hepatozyten im kanalumgebenden Kompartiment des vasQchips. Das umgebende Kompartiment wurde mit 0,25 mg/ml Kollagen I und der Mikrokanal mit 0,25 mg/ml Fibronektin beschichtet. Es wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in das umgebende Kompartiment eingebracht, anschließend folgte eine statische Inkubation von 3 Tagen. Die Konfluenz der Zellen wurde durch eine Hoechst33342-Markierung der DNA im LED-Lichtmikroskop ausgewertet.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Mikroskop: Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ .

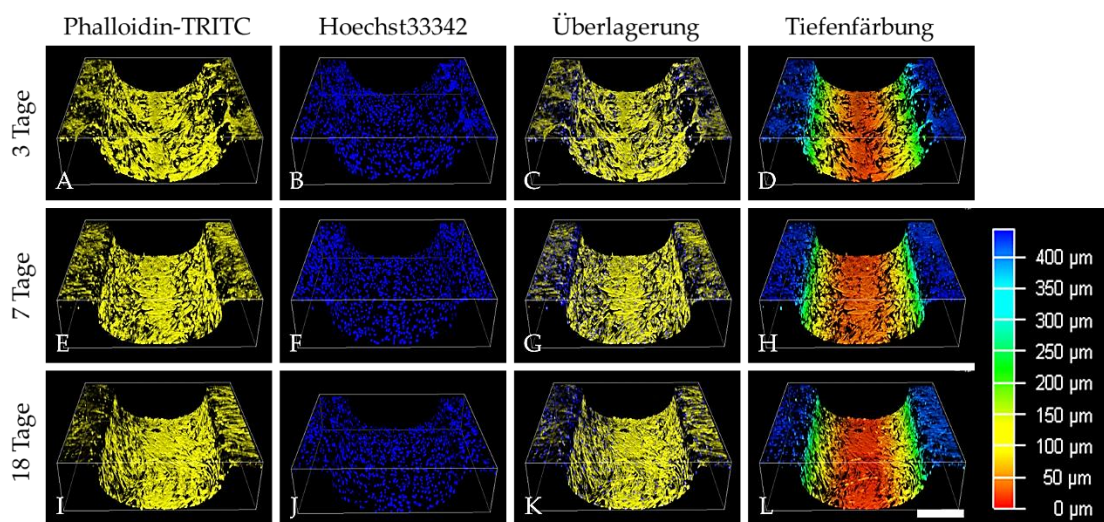


Abbildung 36: Langzeitkultivierung von Hepatozyten im umgebenden Kompartiment des vasQchips unter statischen Bedingungen. Der Mikrokanal mit der Porengröße von 1  $\mu\text{m}$  wurde mit 0,25 mg/ml Fibronektin und im umgebenden Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Anschließend wurde das umgebende Kompartiment mit  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten besiedelt und für 3, 7, und 18 Tage unter statischen Bedingungen und bei einem Medientausch von 2-3 Tagen kultiviert. Nach Beendigung der Kultivierungszeit wurden die Hepatozyten im vasQchip fixiert, permeabilisiert und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC markiert. Vor der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurde die DNA mit Hoechst33342 markiert. In D, H, und L sind die Tiefenaufnahmen zur Visualisierung der Dreidimensionalität des vasQchips zu sehen.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540-545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570-573 \text{ nm}$ ), Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, z-Stack Parameter: 3  $\mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für 450  $\mu\text{m}$ , Maßstab = 400  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 Hepatozyten im fluidischen vasQchip

In der Leber werden durch den konstanten Blutfluss Sauerstoff und Nährstoffe zu den Leberzellen transportiert, während Metabolite und Abbauprodukte abtransportiert werden.<sup>[149]</sup> Eine angelegte Mikrofluidik in einem repräsentativen *Liver-on-a-Chip* Modell ist daher unabdingbar. Wie in Kapitel 3.1.3.2 beschrieben wurde aus der Erfahrung mit vergleichbarer Modelle eine Flussrate von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  gewählt um *in vivo*-Bedingungen möglichst naturgetreu zu imitieren.<sup>[13,142]</sup> Zudem wurden im Hinblick auf eine Kokultur der Hepatozyten mit den LSEC ein spezifisches Programm angewandt, welches den Volumenstrom innerhalb von 3 Tagen schrittweise von 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  erhöht (Tabelle 1). In Abbildung 37 ist das Ergebnis einer 3 und 7 Tage langen Kultivierung der Hepatozyten unter fluidischen Bedingungen zu sehen. Dabei wurden keine LSEC in den Mikrokanal eingebracht, während insgesamt  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten ins umgebende Kompartiment des vasQchip eingebracht wurden. Auf den konfokalmikroskopischen Aufnahmen ist zwischen Tag 3 und Tag 7 kein ersichtlicher Unterschied zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass die Hepatozyten vom angelegten Medienfluss in ihrer Konfluenz nicht, oder nur geringfügig beeinträchtigt werden. Eine Quantifizierung der Hepatozyten-Aktivität während einer 7-tägigen Kultivierung im vasQchip ermöglicht, die mRNA-Expressionsanalyse hepatozytenspezifischer Marker mithilfe der RT-qPCR. Abbildung 38 zeigt die relative mRNA-Expression von Albumin und UGT1A1 eines 7 und 14 Tage lang kultivierten vasQchips im Vergleich zu einem 3-tägigen vasQchip. Die mRNA-Expression von Albumin und UGT1A1 reduzierte sich von Tag 3 auf Tag 7 um 46 % und 27 %. Nach einer 14-tägigen fluidischen Kultivierung wiesen die Hepatozyten von UGT1A1 eine 0,96-fache relative Expression auf und Albumin wurde 0,63-fach exprimiert im Vergleich mit Tag 3.

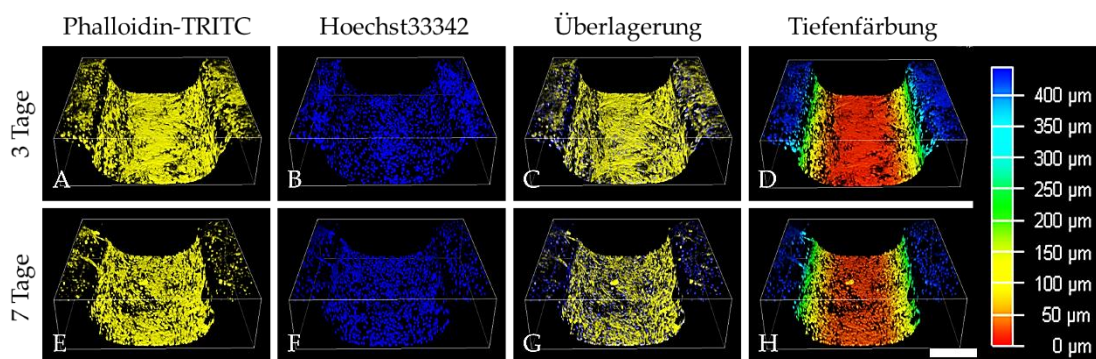


Abbildung 37: Fluidische Kultivierung von Hepatozyten im umgebenden Kompartiment des vasQchip. Der vasQchip wurde im Mikrokanal mit 0,25 mg/ml Fibronektin und im umgebenden Kompartiment mit 0,75 mg/ml Kollagen I beschichtet. Daraufhin wurden dann  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in das umgebende Kompartiment eingebracht und über Nacht statisch inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt und der Mikrokanal an die Peristaltikpumpe angeschlossen. Dabei wurde die Flussrate über 3 Tage kontinuierlich auf einen finalen Volumenstrom von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  erhöht. Die Proben wurden jeweils an Tag 3 und 7 fixiert, permeabilisiert sowie das Aktinzytoskelett durch Phalloidin-TRITC detektiert. Vor der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurde die DNA mit Hoechst33342 markiert. D und H stellen die Tiefenaufnahmen zur Visualisierung der Dreidimensionalität des Systems dar.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, *z-Stack* Parameter: 3  $\mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für 450  $\mu\text{m}$ , Maßstab = 400  $\mu\text{m}$ .



In der Literatur wird für die Validierung eines geeigneten Lebermodells eine konstante Albumin Sekretion vorausgesetzt.<sup>[47]</sup> Um diesbezüglich für den vasQchip eine konkrete Aussage treffen zu können müsste eine längere und mit mehr Stichproben verbundene RT-qPCR durchgeführt werden. Zudem ist eine Verbesserung der Expression durch die Kokultur mit LSEC zu vermuten, was in Kapitel 3.3.2 besprochen wird. Bale *et al.* demonstrierte, dass durch eine Kokultur von LSEC und Hepatozyten die Albuminsynthese um das Doppelte erhöht werden kann, was vielversprechende Aussichten für die Kokultur im vasQchip sind.<sup>[72]</sup>

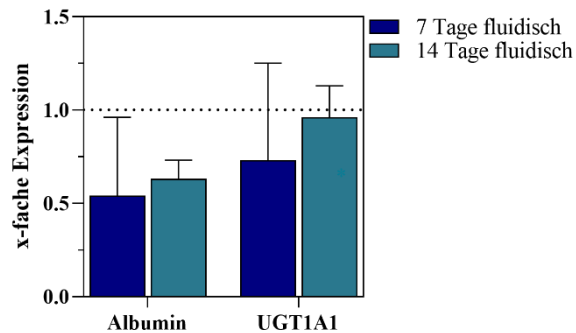


Abbildung 38: mRNA-Expressionsanalyse von Hepatozyten spezifischen Marker im umgebenden Kompartiment des vasQchip, welche für 2 Wochen fluidisch kultiviert wurden. Der vasQchip wurde im Mikrokanal mit 0,25 mg/ml Fibronektin und im umgebenden Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Es folgte eine Besiedlung des Kompartiments mit  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten. Nach einer statischen Inkubation über Nacht wurden die vasQchips an die Mikrofluidik der Peristaltikpumpe angeschlossen, welche einen finalen Medienfluss von 50  $\mu$ l/min generierte. Nach 3, 7 und 14 Tagen wurden die Zellen mit TRIzol<sup>®</sup>. Anschließend folgte eine cDNA-Synthese sowie eine mRNA-Expressionsanalyse von Albumin und UGT1A1. Die Auswertung wurde mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode durchgeführt, die Proben wurden auf Tag 3 normiert (=1), als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus n=3

### 3.2.3.1 Aktivitätsanalyse der Hepatozyten im vasQchip

Wie bereits in Kapitel 1.2.1.3 beschrieben, sind die Enzyme der Cytochrom P450 Familie Phase I Enzyme und für die Biotransformation aller Medikamente verantwortlich. So werden von der Subfamilie CYP3A4 bis zu 30 % aller Medikamente verstoffwechselt.<sup>[47,99]</sup> Die Bedeutung von CYP3A4 ist in der Leberforschung daher zentral und dessen Aktivität ist in einem Lebermodell im Hinblick auf die Medikamentenforschung unabdingbar. Eine Möglichkeit diese Aktivität zu messen ist über die Induktion von Rifampicin. Dieses Antibiotikum aktiviert die Transkription von CYP3A4 und mithilfe eines Biolumineszenz-Assays kann dessen Aktivität gemessen werden.<sup>[99]</sup> Dabei wird das Luciferin-Isopropyl-Acetal Substrat von CYP3A4 zu einem aktiven Luciferin umgewandelt. Das aktive Luciferin wird vom Luciferase-Enzym verstoffwechselt, wodurch in einer sekundären Reaktion Biolumineszenz entsteht. Diese Biolumineszenz kann anschließend als Indikator zur proportional Enzymaktivität detektiert werden.<sup>[150]</sup> In Abbildung 39 (A) ist das Resultat aktivierter Hepatozyten durch 20  $\mu$ M Rifampicin im Vergleich zwischen statisch und fluidischer Kultivierung im vasQchip abgebildet. Wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurden die Hepatozyten in den vasQchip eingebracht, statisch oder fluidisch für 3 Tage kultiviert und anschließend mit 20  $\mu$ M Rifampicin für 48 h behandelt. Durch den Biolumineszenz-Assay konnte gezeigt

werden, dass die Hepatozyten durch die zwei verschiedenen Kultivierungsmethoden eine unterschiedliche CYP3A4-Aktivität aufweisen. Durch Zugabe des Rifampicins im fluidischen vasQchip wird eine 3,6-fache Aktivierung von CYP3A4 erlangt, wohingegen im statischen vasQchip nur eine 1,6-fache Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig wurde die Viabilität der Hepatozyten zwischen statisch und fluidischer Kultivierung betrachtet. In Abbildung 38 B wird die relative Fluoreszenz des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* gegenüber der mit Rifampicin behandelten und deren unbehandelten Kontrolle dargestellt. Durch Vergleich der unbehandelten vasQchips wird deutlich, dass die Fluidik im System eine positive Auswirkung auf die ATP-Produktion hat. So weisen die fluidisch kultivierten Hepatozyten im vasQchip eine 1,7-fach höhere Viabilität gegenüber der statisch kultivierten Hepatozyten auf. Das Rifampicin verrichtet keinen signifikant negativen Einfluss auf die Viabilität der Hepatozyten. Ehrlich *et al.* stipuliert in seinem Review *Challenges and Opportunities in the Design of Liver-on-Chip Microdevices* das ein brauchbares Lebermodell eine 5-fache CYP3A4-Aktivierung bei 20  $\mu\text{M}$  Rifampicin aufweisen sollte.<sup>[143]</sup> Durch den angelegten Fluss von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , der fluidischen vasQchips wird eine 3,6-fache Aktivierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle erreicht, was im Vergleich mit dem statischen Ansatz mit 1,6-facher Aktivierung deutlich näher an der geforderten Aktivierung liegt. Eine Kokultur zusammen mit den Leberendothelzellen könnte eventuell die Aktivierung, wie auch die Viabilität des Lebermodells verbessern, worauf in den folgenden Kapiteln eingegangen wird

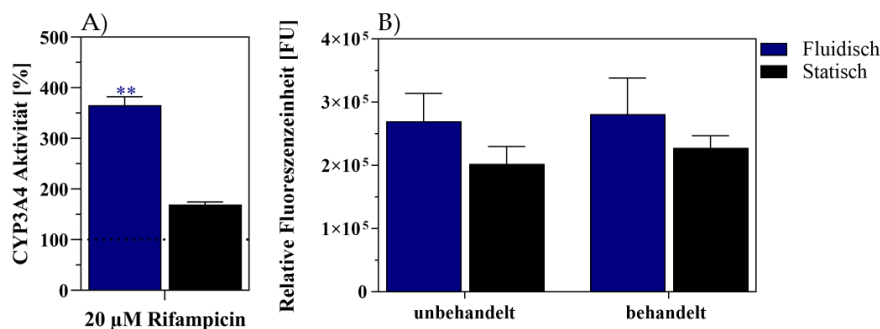


Abbildung 39: Vergleich der Induktionsfähigkeit von CYP3A4 in Hepatozyten und deren Viabilität in statisch und fluidisch kultivierten vasQchip. Es wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in das umgebende Kompartiment eines vasQchip eingebracht und über Nacht statisch inkubiert. Danach wurde bei allen Ansätzen das Medium gewechselt und die fluidischen vasQchips wurden an die Pumpe angeschlossen. Nach einer 3-tägigen Kultivierung wurde ein erneuter Medienwechsel durchgeführt und bei den behandelten vasQchips 20  $\mu\text{M}$  Rifampicin hinzugefügt und diese über 48 h behandelt. In A) wurde die Aktivität von CYP3A4 durch den *P450-Glo™ CYP3A4 Assay* gemessen. Anschließend wurde jede Probe auf deren unbehandelte Kontrolle normiert. B) Zeigt das Ergebnis eines Viabilitätstest (*CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*) bezogen auf die ATP-Konzentration. Dabei wurde die Viabilität zwischen den mit 20  $\mu\text{M}$  Rifampicin behandelten Proben und der entsprechenden unbehandelten Kontrolle verglichen. Zugleich wurden statisch und fluidisch kultivierte vasQchips gegenübergestellt. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

### 3.3 Kokultur aus Hepatozyten und LSEC und deren Etablierung im vasQchip

Für eine physiologische *in vitro* Nachbildung des Sinusoids wird eine gemeinsame Kultivierung von Hepatozyten und LSEC angestrebt, da eine Kokultivierung beider Zelltypen nachweislich einen positiven Effekt auf die Aktivität der Zellen hat.<sup>[72,80]</sup> Erst in den letzten 10 Jahren wurde dabei auf die räumliche Organisation der Leberzellen geachtet, welche den strukturellen Aufbau des Sinusoids nachbilden sollen. Da dieser eine grundlegende Funktion der Leber darstellt, ist dessen Berücksichtigung in einem repräsentativen Lebermodell unabdingbar.<sup>[80]</sup> Deswegen wurde auch in dieser Arbeit auf eine strukturelle Organisation der Leberzellen durch Verwendung des vasQchip Wert gelegt. In den nachfolgenden Kapiteln wird zunächst die gemeinsame Kultivierung von Hepatozyten und LSEC etabliert und anschließend die Einbringung im vasQchip zu einem repräsentativen *Liver-on-a-Chip* Modell diskutiert.

#### 3.3.1 Etablierung der Kokultur von Hepatozyten und LSEC

Um eine Kokultur bestehend aus zwei Zelltypen in der Zellkultur zu organisieren, kann auf verschiedene Verfahren zurückgegriffen werden. Eine Möglichkeit ist es synthetische oder biologische Trennmateriale zu verwenden, welche als natürliche Barriere dienen und die Zelltypen räumlich voneinander separieren.<sup>[80]</sup> Häufig kommen Kollagenschichten als Trennmateriale zum Einsatz, die jedoch den Nachteil haben, dass die eingesetzten Zelltypen nicht mehr getrennt voneinander untersucht werden können.<sup>[72]</sup> Das Transwell®-System ist hier besser geeignet, da dieses aus einem Einsatz für eine herkömmliche Well-Platte und einer porösen synthetischen Polycarbonat Membran besteht. Dies ermöglicht es einen Zelltyp im Einsatz auf der Membran einzubringen, während der zweite Zelltyp in der Well-Platte kultiviert wird.<sup>[80]</sup> Dadurch können beide Zelltypen zu einem späteren Zeitpunkt flexibel und getrennt voneinander analysiert werden. In Abbildung 40 ist deren Vergleich dargestellt. Neben der räumlichen Organisation der Zellen ist das Zellzahlverhältnis eine weitere Steuergröße in einer Kokultur. In der Leber herrscht ein Verhältnis von ca. 60 % Hepatozyten, 10-20 % LSEC, 10 % Kupfferzellen und 10 % Stellatzellen.<sup>[149]</sup> Für die folgenden Versuche wurde daher ein Verhältnis von 1:3 LSEC zu Hepatozyten angestrebt.

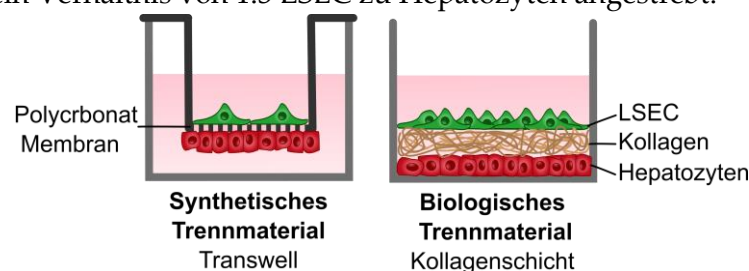


Abbildung 40: Vergleich von strukturell definierten Kultivierungsmethoden. Mit einer porösen Polycarbonat-Membran wird im Transwell® für eine räumliche Trennung der Zellen gesorgt. Biologische Materialien wie beispielsweise Kollagen führen ebenso zu einer räumlichen Trennung der Zellen.

### 3.3.1.1 Medientest für die Kokultur

In Kapitel 3.1.1.1 wurde bereits auf die bedeutende Rolle eines geeigneten Nährmediums für die jeweiligen Zelltypen hingewiesen. Diese kann die Viabilität, Aktivität und Proliferation von Zellen stark beeinflussen. Da bei einer Kokultur zwei verschiedene Zelltypen berücksichtigt werden müssen, kann eine Kombination der Basalmedien der jeweiligen Zelltypen verwendet werden. Im Folgenden soll der Einfluss der verwendeten Basalmedien in verschiedenen Kombinationen auf die Zellkultivierung diskutiert werden. Zusätzlich wurde das vom Hersteller der Zellen empfohlene Kokulturmedium getestet und mit den anderen Medien verglichen. Für einen möglichst aussagekräftigen Vergleich wurde sowohl das Proliferationsverhalten in Form einer Wachstumskurve (Abbildung 41) festgehalten, als auch die mRNA-Expression zellspezifischer Marker in einer RT-qPCR (Abbildung 42) analysiert. Für die Wachstumskurve wurden in eine Kollagen I beschichtete 96-Well-Platte, jeweils  $0,5 \cdot 10^4$  Hepatozyten und LSEC an Tag 0 ausgesät. An Tag 1, 2, 3, 4 und 7 wurde deren Zellzahl bestimmt. In Abbildung 41 wurde die Zellzahl der Hepatozyten in Graph A) und die Zellzahl der LSEC in B) in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit aufgetragen. Für beide Zelltypen ist die Proliferation im Hepatozyten-Medium am geringsten. An Tag 7 wurde eine Zellzahl von  $0,9 \cdot 10^4$  LSEC und  $14,4 \cdot 10^4$  Hepatozyten im Hepatozyten-Medium ermittelt. Zur gleichen Zeit konnte im Kokulturmedium jeweils eine 3-fache und eine 4-fache Zellzahlen von  $3,1 \cdot 10^4$  LSEC und  $49,1 \cdot 10^4$  Hepatozyten nachgewiesen werden. Beide Zelltypen zeigten eine ähnliche Proliferationsrate im Kokulturmedium und der Mischung aus Hepatozyten- und LSEC-Medium. Im Basalmedium der LSEC ist eine Proliferation der Hepatozyten innerhalb von 7 Tagen um das 56-fache nachzuweisen. Das LSEC-Medium ist für die Hepatozyten somit hinsichtlich ihrer Zellteilungsrate hinter dem Kokulturmedium und der Mischung der beiden Basalmedien einzuordnen. Demgegenüber ist bei den Endothelzellen die Proliferation im LSEC-Medium mit einer 10,8-fachen Steigerung innerhalb von 7 Tagen am stärksten.

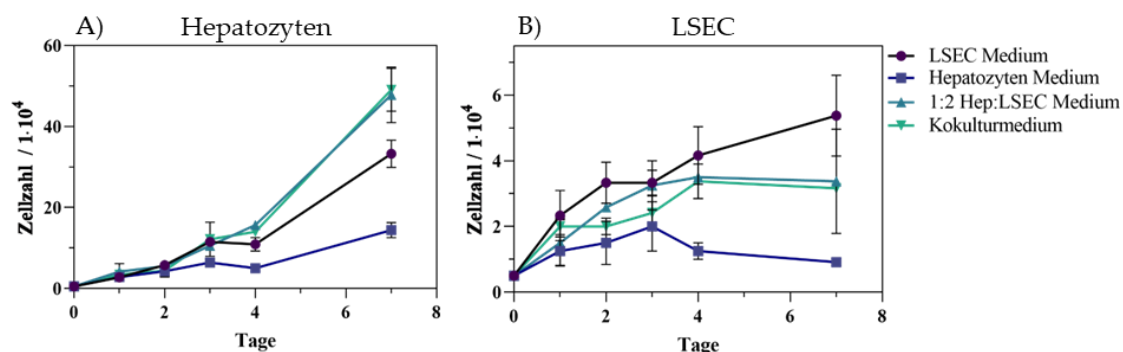


Abbildung 41: Wachstumskurve von A) Hepatozyten und B) LSEC zur Bestimmung eines geeigneten Nährmediums zur Kokultivierung der beiden Zelltypen. Es wurden jeweils  $0,5 \cdot 10^4$  Hepatozyten und LSEC in eine 96-Well-Platte ausgesät. Zuvor wurde diese mit Kollagen I beschichtet. Für LSEC wurde  $0,1 \text{ mg/ml}$  und für Hepatozyten wurde  $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$  Kollagen I verwendet. Es folgte eine Kultivierung für 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen in den jeweiligen Medien, mit anschließender enzymatischer Ablösung der Zellen und deren Zellzahlbestimmung. Mittelwert und deren Standardabweichung wurde aus  $n = 3$  ermittelt.

Auch mit den LSEC lässt sich kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Kokulturmedium und der Mischung der beiden Basalmedia ermitteln. Sie wirken sich aber im Vergleich mit dem LSEC-Medium, proliferationshemmend gegenüber den LSEC aus. Eine Erklärung für das geringe Proliferationsverhalten der beiden Zelltypen im Hepatozyten-Medium könnte das fehlende fetale Kälberserum (FCS) sein. Dieses enthält unter anderem nicht definierte Zytokine und diverse Wachstumsfaktoren, ohne welche viele Zelllinien jedoch nicht viabel sind.<sup>[151]</sup> Die FCS-Konzentration ist im LSEC-Medium mit 10 % am höchsten, während sich in der Kokultur und dem 1:2-Medium anteilig jeweils nur 5 % FCS befinden. Alle weiteren Zusätze werden vom Hersteller nicht angegeben. Die unterschiedliche Zellproliferation der LSEC in Abbildung 41 B) kann so nur detailliert an den unterschiedlichen FCS-Konzentrationen erklärt werden. Die doppelte FCS-Konzentration führt teilweise zu einer 1,7-fachen Zellzahl an LSEC im LSEC-Medium, während die Hepatozyten durch die Wachstumsfaktoren oder unbekanntes Zusätze im LSEC-Medium in ihrem Proliferationsverhalten hemmend beeinflusst werden. Für eine genauere Analyse der Auswirkung der verschiedenen Medien auf das mRNA-Expressionsverhalten von LSEC und Hepatozytenmarkern wurde zusätzlich eine RT-qPCR durchgeführt. Dafür wurden die Zellen für 7 Tage in den entsprechenden Medien kultiviert und anschließend analysiert. Abbildung 42 zeigt das Ergebnis der relativen Expressionsanalyse der getesteten Hepatozyten, normiert auf die Expression im Hepatozyten-Medium. Dies zeigte, dass die Expression von Albumin unabhängig vom verwendeten Medium mit einer relativen Expression von ca. 0,76 im Vergleich mit dem Hepatozyten-Medium durchweg am geringsten ist. CYP3A4, UGT1A1 und G6P sind dagegen verglichen mit dem Hepatozyten-Medium stets überexprimiert. Weiter konnte festgestellt werden, dass auch hier das Kokulturmedium sowie die 1:2-Mischung ein ähnliches Expressionsverhalten induzieren. Acikgöz *et al.* hat die Auswirkungen von FCS im Medium auf Hepatozyten-Sphäroide, in Bezug auf die Albuminsynthese getestet und konnte eine verringerte mRNA-Expression feststellen.<sup>[151]</sup> Dies konnte auch durch die ermittelte 0,76-fache Reduktion der Albuminexpression in FCS-haltigen Zellmedien, mit Hilfe der in Abbildung 42 dargestellten RT-qPCR nachgewiesen werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass CYP3A4, UGT1A1 und die Gluconeogenese durch zusätzliche Faktoren gegenüber dem Hepatozyten-Medium aktiviert wurden. So wurde UGT1A1 im LSEC-Medium um das 2,6-fache erhöht exprimiert. UGT1A1 ist in der metabolischen Beseitigung von Molekülen und Xenobiotika involviert. Die verstärkte Aktivität von UGT1A1 könnte auf eine nicht toxische Substanz im LSEC-Medium für die Hepatozyten hindeuten welche eliminiert werden muss.<sup>[57]</sup> Die relative Expression der LSEC-Marker gegenüber dem LSEC-Medium ist in Abbildung 43 dargestellt. Diese zeigt, dass kein alternatives Medium eine ähnlich starke Expression der gewählten Marker von CD31, VE-Cadherin, LYVE-1 und CD206 hervorbringt. Lediglich CD31 wird im Hepatozyten-Medium 1,5-fach verstärkt exprimiert. Jedoch werden nur im Kokulturmedium alle vier Marker exprimiert und erreichen dadurch ähnliches Expressionsverhalten wie im LSEC-Medium. So wurde die relative Expression von CD206 im Kokulturmedium 0,95-fach, LYVE-1 0,54-fach, VE-Cadherin 0,33-fach und CD31 0,81-fach exprimiert.

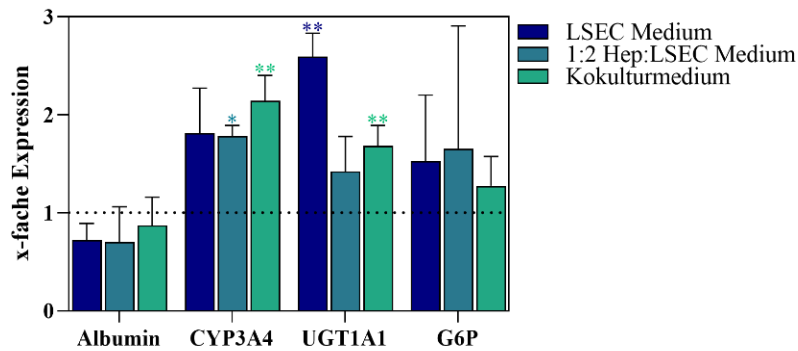


Abbildung 42: RT-qPCR der mRNA-Expression von hepatozytenspezifischen Markern in verschiedenen Nährmedien. Getestet wurden jeweils die Basalmedien der Zelltypen, eine 1:2-Mischung und das vom Hersteller empfohlene Kokulturmedium. Dafür wurden auf einer Kollagen I beschichteten 24-Well-Platte  $2,85 \cdot 10^4$  Hepatozyten in Triplikaten ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert, gefolgt von einer cDNA-Synthese und mRNA-Expressionsanalyse von Albumin, CYP3A4, UGT1A1 und Glucose-6-Phosphatase. Die Auswertung wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt, die Proben wurden auf das Hepatozyten-Medium normiert (=1), als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl das Kokulturmedium als auch die 1:2-Mischung des LSEC-Medium mit Hepatozyten-Medium, ein geeignetes Medium für die Kokultivierung beider Zelltypen ist. Die Hepatozyten wurden in beiden Medien verstärkt aktiviert und zeigten eine erhöhte Proliferation im Vergleich zu deren Basalmedium. Zwischen Kokulturmedium und der 1:2 Mischung der Basalmedien ließ sich kein ausschlaggebender Unterschied erkennen. Für die Endothelzellen stellte sich jedoch das Kokulturmedium als geeigneter heraus, was mithilfe der Expressionsanalyse durch eine RT-qPCR belegt wurde. Basierend auf den Erkenntnissen der Wachstumskurve und der Expressionsanalyse wurde für alle folgenden Kokulturen von LSEC und Hepatozyten das Kokulturmedium verwendet.

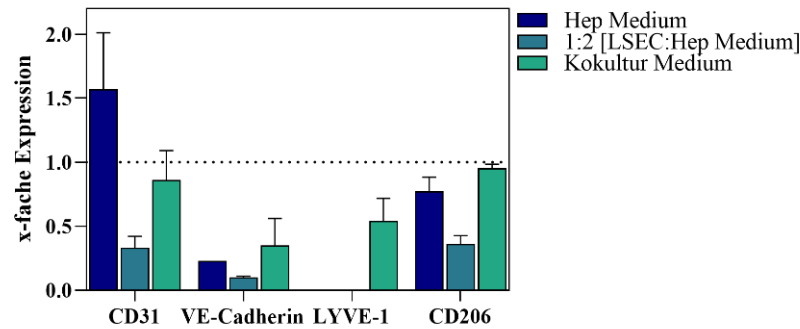


Abbildung 43: RT-qPCR der mRNA-Expression von LSEC bezüglich des Medientests für die Kokultur von LSEC mit Hepatozyten. Eine 24-Well-Platte wurde mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet und mit  $2,85 \cdot 10^4$  LSEC besiedelt. Diese wurden in den unterschiedlichen Medien für 7 Tage kultiviert. Für den Medientest wurden die zwei Basalmedien der Hepatozyten und LSEC sowie eine 1:2-Mischung und das vom Hersteller empfohlene Kokulturmedium getestet. Die Zellen wurden nach 7 Tagen mit TRIzol<sup>®</sup> lysiert und die isolierte RNA in cDNA transkribiert. Anschließend wurde eine mRNA-Expressionsanalyse mit CD31, VE-Cadherin, LYVE-1 und CD206 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode dabei wurden die Proben auf das LSEC-Medium normiert (=1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus n=3.

### 3.3.1.2 Direkte Kokultur von Hepatozyten und LSEC

Der Spalt von Disse trennt die Endothelzellen der Leber von den darunterliegenden Hepatozyten.<sup>[152]</sup> Mit einem Spaltdurchmesser von 5-10  $\mu\text{m}$  ist eine räumliche Nähe gewährleistet, welche den Stoffwechselfaustausch zwischen den Zelltypen zulässt.<sup>[81]</sup> Für die Untersuchung einer direkten Kokultur wurden die Endothelzellen auf einer Kollagenschicht bis zur Konfluenz kultiviert. Zeitgleich wurden Sphäroide aus  $2 \cdot 10^3$  Hepatozyten in einer Agarose beschichteten 96-Well-Platte hergestellt. Diese Kultivierungsform wurde gewählt damit eine organisierte Einbringung der Hepatozyten möglich war. Nach 3 Tagen haben sich die Hepatozyten zu kompakten Sphäroiden aggregiert, welche auf die Endothelzellschicht überführt wurden. Nach weiterer Kokultur für 3 Tage wurde das Experiment durch Immunfluoreszenzmarkierung spezifischer Hepatozyten und LSEC-Marker ausgewertet. Deren Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt. Die Abbildungen C und D zeigen die LSEC spezifische Markierung von CD31 und CD206. Abbildung H und I zeigt die immunhistochemische Markierung von CYP3A4 und Albumin, welche spezifisch für Hepatozyten sind. Die Überlagerungen in Abbildung E und J der unterschiedlichen Markierung ermöglicht eine Lokalisation der jeweiligen Zelltypen durch die verwendete spezifische Immunfluoreszenzmarkierung. Die Markierung von CD31 (Abbildung 44 (D) in der LSEC-Membran und die Markierung von Albumin (Abbildung 44 (H) in den Hepatozyten zeigen, dass der Hepatozyten-Sphäroid die ursprünglich darunterliegenden LSEC verdrängt hat. Es gibt zudem eine klare Grenze zwischen der Endothelschicht und den Hepatozyten. Durch die Aktinzytoskelett-Markierung wird die kubische Struktur der Hepatozyten verdeutlicht, welche ein Merkmal primär isolierter Hepatozyten ist.<sup>[147]</sup> Die prägnante Albuminfluoreszenz lässt auf eine positive Auswirkung der direkten Kokultur von LSEC und Hepatozyten schließen. Diese Vermutung konnte von Zhou *et al.* bereits nachgewiesen werden.<sup>[153]</sup> Durch

Verwendung einer Proteinschicht auf den Endothelzellen, vor der Zugabe des Hepatozyten-Sphäroids könnte das Verdrängen der LSEC unter den Hepatozyten verhindert werden. Diese Art der so genannten *Sandwich*-Kultur wurde bereits erfolgreich angewandt.<sup>[47,72,123,149]</sup> Jedoch lässt diese Art der Kultivierung keine Analyse der einzelnen Zelltypen zu, weswegen vermehrt Transwell®-Systeme für eine Kokultur von LSEC und Hepatozyten eingesetzt werden.<sup>[13,47,149,154]</sup>

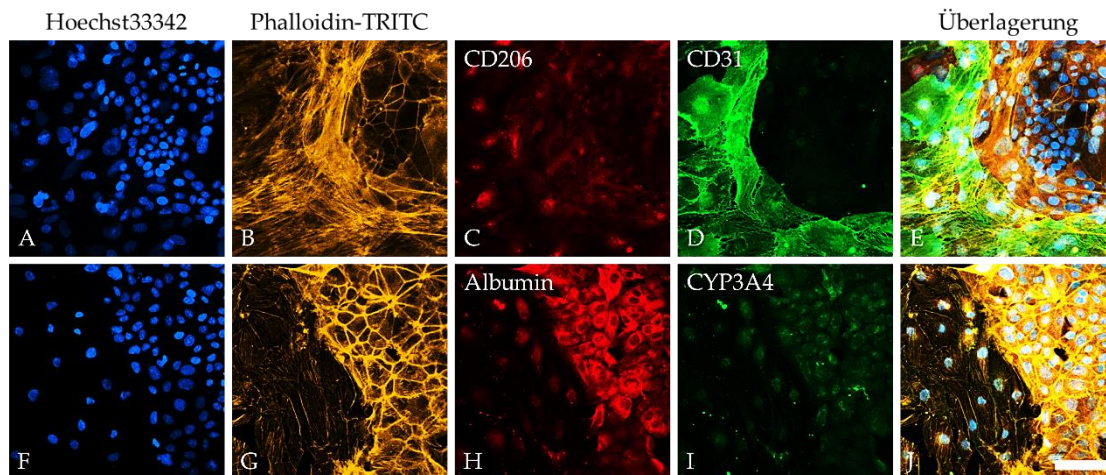


Abbildung 44: Direkte Kokultur durch die Kultivierung eines Hepatozyten-Sphäroid auf einer LSEC-Schicht.  $1,5 \cdot 10^4$  LSEC wurden in einem Kollagen I beschichteten  $\mu$ -Slide-8-Well ausgesät und in 3 Tagen zur Konfluenz gebracht. Währenddessen wurden Sphäroide in einer 96-Well-Agarose-Platte aus jeweils  $0,2 \cdot 10^4$  Hepatozyten geformt. Nach 3 Tagen der Kultivierung wurden die Sphäroide auf die LSEC-Schicht platziert und zusammen für weitere 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Proben nach einer Immunfluoreszenzmarkierung auf CD206 (C) und CD31 (D) (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper; Kaninchen-Anti-human-C206-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-647 Hühnchen-Anti-Kaninchen Sekundärantikörper) als Marker für die LSEC und auf Albumin (H) und CYP3A4 (I) (Kaninchen-Anti-human-Albumin Primärantikörper/ Hühnchen Alexa Fluor®-647 Anti-Kaninchen Sekundärantikörper; Maus Anti-human-CYP3A4 Primärantikörper/ Ziege Alexa Fluor®-488 Anti-Mouse Sekundärantikörper) als Marker für die Hepatozyten mikroskopisch analysiert. Vor der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurde die DNA mit Hoechst33342 und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC markiert.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Rot (C): CD206 ( $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ), Grün (D): CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Rot (H): Albumin ( $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ), Grün (I): CYP3A4 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, Maßstab =  $75 \mu\text{m}$ .



### 3.3.1.3 Barriere-Integrität der Kokultur im Transwell®

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, fungiert die Leber als Filter für die im Blut zirkulierenden Nährstoffe, Moleküle, Schadstoffe, Pathogene, Xenobiotika und einer Vielzahl von weiteren Substanzen. Das Sinusoid der Leber bildet eine natürliche Barriere zum vaskulären Blutfluss und übernimmt eine selektive Siebfunktion.<sup>[91]</sup> Eine Möglichkeit eine solche Barriere zu untersuchen und zu validieren, ist durch die Messung des transendothelialen Widerstands.<sup>[128,155]</sup> Zum messen dieses Widerstandes, muss die Barriere sowohl von der apikalen als auch der basalen Seite zugänglich sein, was durch die Verwendung eines Transwell®-Systems gewährleistet wird. In Abbildung 45 ist der schematische Aufbau der hier genutzten Variationen der Barriere abgebildet. Mit den folgenden vorgestellten Experimenten sollte untersucht werden, ob die räumliche Distanz von Hepatozyten und LSEC einen Einfluss auf die Barriere der LSEC hat. Dazu wurden die Hepatozyten in Ansatz 1 auf der 24-Well-Platte und in Ansatz 2 im direkten Kontakt mit den LSEC an der basalen Seite des Transwells® kultiviert. Abbildung 18 zeigt schematisch den Versuchsaufbau zur Messung des elektrischen Widerstands der Barriere durch eine Elektrode im apikalen und basalen Bereich im verwendeten Transwell®-System. Für die Etablierung der Barriere wurde eine Kollagen I Beschichtung der 24-Well-Platte und des Transwells® durchgeführt. Anschließend folgte eine Besiedelung mit  $10 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> Hepatozyten. Nach 4 h wurden  $3,33 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> in den Einsatz des Transwells® eingefügt. So wurde ein Zellverhältnis von 1:3 LSEC zu den Hepatozyten generiert, welches in Kapitel 3.3.1 besprochen wurde. Die Barriere-Integrität wurde daraufhin für 15 Tage mit einer TEER-Messung verfolgt. Der in Abbildung 46 aufgetragene TEER in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit zeigt, dass Hepatozyten allein eine dichtere Barriere bilden als die LSEC und weisen an Tag 15 einen 4-fach erhöhten TEER gegenüber der LSEC-Monozellschicht auf.

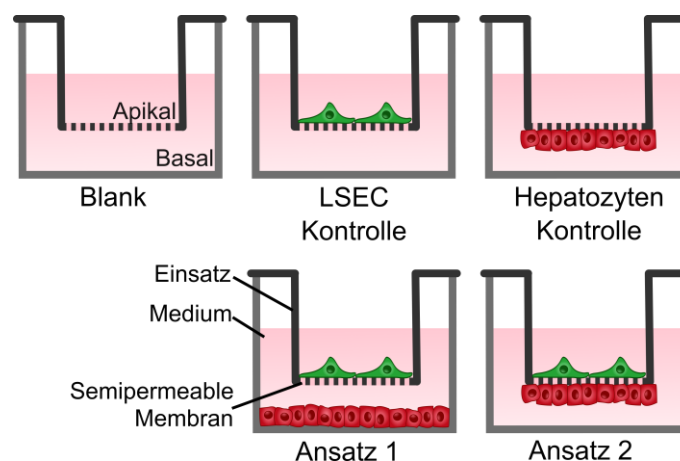


Abbildung 45: Schematischer Aufbau der unterschiedlichen Kombinationen der Kokultur von LSEC und Hepatozyten im Transwell®. Die Leberendothelzellen wurden immer auf der apikalen Seite des Transwell®-Einsatzes kultiviert während sich die Hepatozyten auf der basalen Seite befinden. Die beiden Ansätze unterscheiden sich in ihrem Abstand zu den LSEC. In Ansatz 1 findet kein direkter Zellkontakt statt, die beiden Zelltypen sind räumlich durch eine Medienschiicht getrennt. Dieser Abstand wird verkürzt, indem die Hepatozyten in Ansatz 2 direkt auf der Unterseite der 0,4 µm porösen Membran des Transwell®-Einsatzes kultiviert werden, wodurch ein direkter Zellkontakt stattfinden kann.

Eine kompaktere Barriere wird lediglich durch die direkte Kokultur in Ansatz 2 generiert. Diese unterscheidet sich zu der Barriere der Hepatozyten an Tag 15 durch einen 1,1-fach gesteigerten TEER-Wert. In der Literatur sind keine spezifischen TEER-Werte zu den verwendeten Hepatozyten von *Upcyte Technologies* zu finden. Es sind lediglich TEER-Werte im Bereich um  $500 \Omega\text{-cm}^2$  von differenzierten, oder immortalisierten Hepatozyten bekannt.<sup>[155,156]</sup> Da der TEER-Wert nach 15 Tagen bei ca.  $30 \Omega\text{-cm}^2$  liegt, aber weiterhin steigt, könnte das auf eine nicht vollendete Barrierefunktion der Hepatozyten hindeuten. Jedoch ist die Vergleichbarkeit von Hepatozyten unterschiedlichen Ursprungs schwierig und sollte weiter untersucht werden, um eine abschließende Aussage treffen zu können. *Farooqi et al.* hat in einem Leberfibrose-Modell gezeigt, dass der Widerstand gegenüber einer unbehandelten Kontrolle zunimmt und das Lebermodelle mit einer veränderten Barrierefunktion auf externe Einflüsse reagieren.<sup>[155]</sup> Dies konnte auch für die unterschiedlichen räumlichen Kultivierungen der Hepatozyten in Bezug auf die LSEC-Schicht in Ansatz 1 und 2 beobachtet werden. In Abbildung 46 ist der TEER von Ansatz 2 abzüglich der Hepatozyten-Kontrolle dargestellt. Dies ermöglicht es eine Aussage über die LSEC generierte Barriere innerhalb der in Ansatz 2 apikal kultivierten Hepatozyten treffen zu können. Weiter wurde an Tag 15 eine 0,27-fache Reduktion des TEER gegenüber der in Ansatz 1 gemessenen LSEC-Schicht beobachtet. Wird die LSEC-Barriere in Ansatz 2 mit der LSEC-Kontrolle an Tag 15 verglichen so wird eine ähnliche Reduktion des TEER in Ansatz 2 von 0,5 ermittelt. Daraus lässt sich schließen, dass eine direkte Kokultur von Hepatozyten die LSEC-Barriere beeinflusst. Im direkten Kontakt der Zellen in Ansatz 2 kommt es somit zu einer Abnahme der endothelialen Barriere, wodurch ein größerer Stoffaustausch zu den Hepatozyten ermöglicht wird. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die LSEC durch ihre Fenestrierung im Gegensatz zu den Hepatozyten einen geringeren TEER aufweisen und dass sich die Fenestrierungen aufgrund der räumlichen Nähe der Hepatozyten verstärken. Dieses Experiment ist ein weiterer Hinweis darauf, dass eine Kokultur von LSEC und Hepatozyten in einer effektiven Rekonstruktion der Leber unabdingbar sein sollte. Es ist daher naheliegend eine Zusammenführung beider Zelltypen im *Organ-on-a-Chip* Modell in weiteren Schritten zu untersuchen und die Barriere des Sinusoids und weitere Parameter im Vergleich zu nicht fluidischen Modellen zu analysieren.

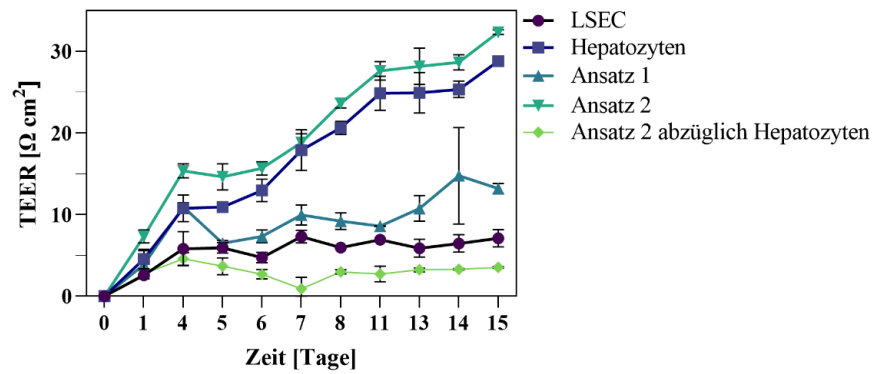


Abbildung 46: Transendotheliale elektrischer Widerstand (TEER) von unterschiedlichen Kokulturbedingungen von LSEC und Hepatozyten. In ein Transwell®-System mit  $0,4 \mu\text{m}$  Poren, wurden auf Kollagen I beschichtete Oberflächen  $10 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>3</sup> und  $3,33 \cdot 10^4$  LSEC ausgesät. Dabei wurden die Hepatozyten in Ansatz 1 in die 24-Well-Platte gegeben und in Ansatz 2 auf der basalen Seite des Transwell®-Einsatzes kultiviert. Die LSEC befanden sich stets auf der apikalen Seite des Transwell®-Einsatzes. Für die Hepatozyten-Kontrolle wurden diese auf der basalen Seite des Einsatzes kultiviert. Das Verhalten des TEER der unterschiedlichen Barrieren wurde über 15 Tage verfolgt. Als Nullwert diente ein Transwell® ohne Zellen, jedoch mit Beschichtung. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 3$  ermittelt.

### 3.3.2 Kokultur von LSEC und Hepatozyten im vasQchip

In Kapitel 3.1.3 und 3.2.2 wurde die Etablierung der jeweiligen Monokultur aus LSEC und Hepatozyten im vasQchip beschrieben. Für eine Rekonstruktion des Lebersinusoids mussten nun die beiden Zelltypen im *Liver-on-a-Chip*-Modell vereint werden. Abbildung 47 veranschaulicht schematisch die Lokalisation der beiden Zelltypen im vasQchip. Die LSEC wurden im Mikrokanal in direktem Kontakt zu den Hepatozyten im umgebenden Kompartiment angesiedelt. Die beiden Zelltypen wurden dabei lediglich durch die poröse Polycarbonatmembran separiert. In den folgenden Kapiteln wird die in Abbildung 47 dargestellte Kokultur von LSEC und Hepatozyten im vasQchip etabliert und evaluiert.

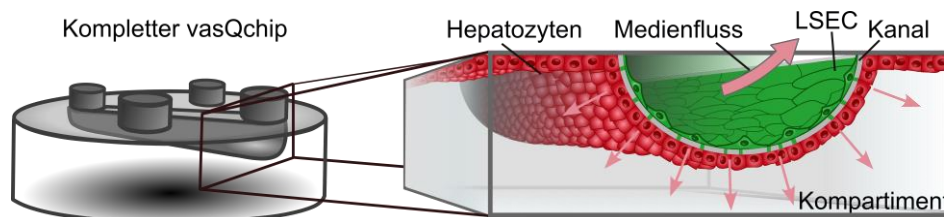


Abbildung 47: Schematische Darstellung des Leber-Sinusoid-Barrieremodells im vasQchip. Das Lebermodell im vasQchip wird durch Integration der lebersinusoidalen Endothelzellen (LSEC) im porösen Mikrokanal und der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment aufgebaut. Deren genauen Lokalisation wird durch einen Querschnitt des Mikrokanals veranschaulicht. Abbildung modifiziert nach Kappings *et al.*<sup>[61]</sup>

### 3.3.2.1 Etablierung der Kokultur im vasQchip

Die Präparation des vasQchips bezüglich der Beschichtungsmethoden wurde von Kapitel 3.1.1.2 übernommen. So wurde der Mikrokanal mit 0,25 mg/ml Fibronectin und das umgebende Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Auch die Zellzahl der jeweiligen Zelltypen wurde aus den zuvor etablierten Untersuchungen übernommen. So wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten im umgebenden Kompartiment eingesetzt, alle Anschlüsse verschlossen und anschließend um  $180^\circ$  gedreht über Nacht statisch kultiviert. In Abbildung 48 ist eine exemplarische Abbildung der gedrehten vasQchip zur Besiedelung der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment abgebildet. Am darauffolgenden Tag wurden  $10 \cdot 10^4$  LSEC in dem Mikrokanal ausgesät und für 1 h am vasQturn bei 0,25 rpm rotiert. Es folgte eine weitere Inkubation über Nacht in der ursprünglichen Position. Nach einer statischen Inkubationszeit von insgesamt 48 h wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt und der Mikrokanal an die Mikrofluidikpumpe angeschlossen. Nach einem Volumenstromanstieg von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  innerhalb von 3 Tagen, wurde die Konfluenz der Zellen durch eine Immunfluoreszenzmarkierung überprüft. In Abbildung 49 sind die konfokalmikroskopischen 3D-Projektionen des kokultivierten vasQchip dargestellt. Der Querschnitt durch den Mikrokanal (Abbildung 49 D) lässt die beiden Zelltypen differenziert erkennen. Neben der Markierung der LSEC über den Endothelzellmarker CD31 wurden die Aktinzytoskelette der Hepatozyten mit Phalloidin-TRITC markiert. Es liegt eine eindeutige räumliche Trennung der beiden Leberzellen durch den Mikrokanal vor. Die ungefärbte poröse Membran des Mikrokanals konnte durch eine farblose Lücke zwischen LSEC und Hepatozyten identifiziert werden. Die LSEC bilden eine fast konfluente Zellschicht (Abbildung 49 B) wohingegen die Hepatozyten einige Lücken aufweisen (Abbildung 49 A). Dies könnte eventuell durch eine verlängerte Kultivierung der Hepatozyten im vasQchip verbessert werden. Insgesamt konnte durch die Immunfluoreszenzmarkierung gezeigt werden, dass die etablierten Methoden der Monokulturen in Kapitel 3.1.3 und 3.2.2 und deren Kombination in der Lage sind, eine Kokultur im vasQchip aufzubauen. In den folgenden Kapiteln wird diese Kokultur untersucht, validiert und diskutiert.



Abbildung 48: Besiedelungsmethode der Hepatozyten im umgebenden Kompartiment. Die Abbildung zeigt die um  $180^\circ$  gedrehten vasQchips, wodurch eine gleichmäßige Verteilung der Hepatozyten an der Außenseite des Mikrokanals gewährleistet wird. Nach einer Inkubation über Nacht wurde für die anschließende Besiedelung der LSEC im Mikrokanal der vasQchip in seine ursprüngliche Position um  $180^\circ$  gedreht.

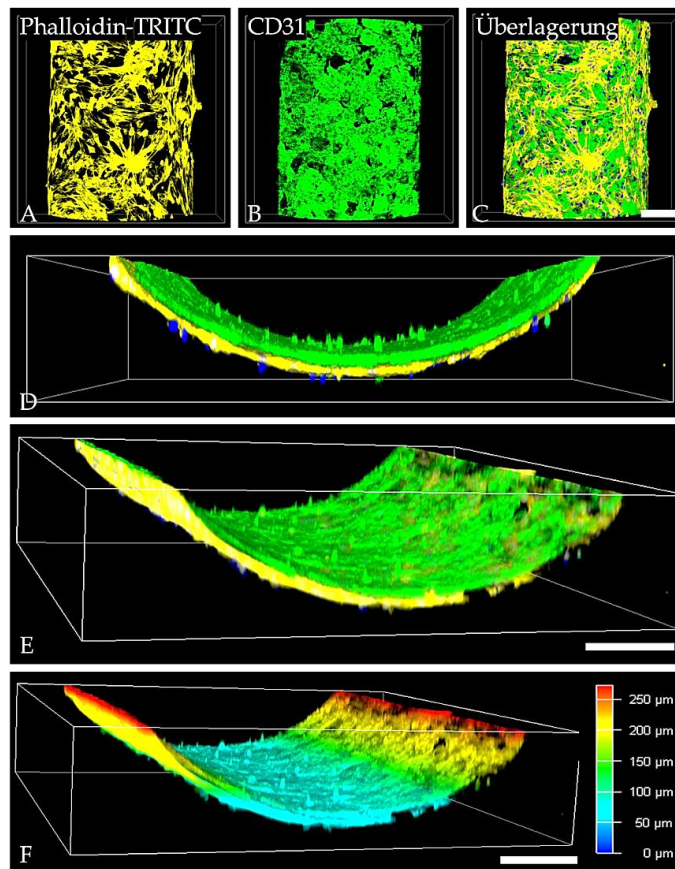


Abbildung 49: Kokultur aus Hepatozyten im umgebenden Kompartiment und LSEC im Mikrokanal des vasQchips unter fluidischen Bedingungen über einen Zeitraum von 3 Tagen. Der Mikrokanal wurde mit 0,25 mg/ml Fibronectin und das umgebende Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Dann wurden im umgebenden Kompartiment  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten eingebracht, die Anschlüsse verschlossen und über Nacht um  $180^\circ$  gedreht kultiviert. Darauf folgte die Besiedelung der LSEC im Mikrokanal mit  $10 \cdot 10^4$  Zellen und einer einstündigen Rotation auf dem vasQturn bei 0,25 rpm, damit die Zellen gleichmäßig im Mikrokanal anwachsen können. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht wurde der Mikrokanal an die Mikrofluidikpumpe angeschlossen und bei einem steigenden Volumenstrom von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  für 3 Tage fluidisch kultiviert. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenzmarkierung des Endothels über CD31 (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Ziege Alexa Fluor®-488 Anti-Maus Sekundärantikörper) (B) und die Markierung der DNA mit Hoechst33342 sowie des Aktinzytoskeletts der Hepatozyten mit Phalloidin-TRITC (A).

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, z-Stack Parameter:  $3 \mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für  $250 \mu\text{m}$ , Maßstab =  $200 \mu\text{m}$

### 3.3.2.2 Analyse der Kokultur aus LSEC und Hepatozyten im vasQchip

Eine Kokultur durch parenchymalen und nicht-parenchymalen Leberzellen ist eine authentische Rekonstruktion der Leber. Zwei Zelltypen welche bewiesenermaßen in einer Kokultur positive Effekte auf deren Integrität und Aktivität haben sind Hepatozyten und LSEC.<sup>[72,153]</sup> Im folgenden Abschnitt wurde die Aktivität und das Verhalten der in Kapitel 3.3.2.1 etablierten Kokultur aus LSEC und Hepatozyten im vasQchip untersucht.

#### Vergleich der Kokultur im statischen und fluidischen vasQchip

Dieses Kapitel fokussiert sich auf die Untersuchung einer angelegten mikrofluidischen Strömung im Mikrokanal des Lebermodells im vasQchip. Fluidischer Fluss ist ein essenzieller Bestandteil der physiologischen Mikroumgebung im Sinusoid der Leber. Dieser verbessert die Albumin- und Harnstoffsekretion sowie die CYP-Funktionen von *in vitro* kultivierten Hepatozyten.<sup>[116,141,149]</sup> Die Integration eines Volumenstroms im Mikrokanal des vasQchip führt zu optimierten Bedingung der *in vitro* Situation des Lebersinusoids im vasQchip, und es wird von einem positiven Effekte auf die Viabilität der Kokultur ausgegangen. Der Unterschied zwischen einer statisch und fluidisch kultivierter Kokultur im vasQchip ist in Abbildung 50 durch eine Immunfluoreszenzmarkierung wichtiger Markerproteine und deren 3D-Projektion einer konfokalmikroskopischen Aufnahme abgebildet. Nach einer 7-tägigen Kultivierung wurde durch eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 und zusätzlicher Markierung des Aktinzytoskeletts sowie der DNA erste Unterschiede zwischen den Kultivierungsmethoden ersichtlich. Die Färbung durch den Endothelzellmarker CD31 (Abbildung 50 E und F) lässt eine diskontinuierliche Konfluenz der Endothelzellen erkennen. Im fluidisch kultivierten vasQchip konnte eine konfluente Zellschicht aufgebaut werden, wohingegen im statischen vasQchip nur eine geringe Zellkonfluenz erreicht wurde. Diese Verringerung der Fluoreszenz im statisch kultivierten vasQchip deutet auf eine geringere Zellzahl im Mikrokanal hin, was durch eine mangelnde Nährstoffversorgung der LSEC im statischen Mikrokanal erklärt werden könnte. Deren Versorgung ist auf 10 µl frisches Zellmedium alle 2-3 Tage begrenzt, da der Mikrokanal des vasQchips ein begrenztes Fassungsvermögen besitzt. Im fluidischen Modell hingegen, wird das Medium mit einem Volumenstrom von 50 µl/min im Mikrokanal ausgetauscht, wodurch den fluidisch kultivierten LSEC mehr Nährstoffe zu Verfügung stehen. Zeitgleich werden schädliche Stoffe abtransportiert und verdünnt, wodurch eine lokale Ansammlung verhindert wird. Der Modellaufbau im vasQchip entspricht zudem mehr der Funktion einer intakten Leber und könnte durch die Kokultur und einer integrierten Mikrofluidik zu einem verbesserten Wachstum der LSEC in einem fluidischen Modell führen.<sup>[149]</sup>

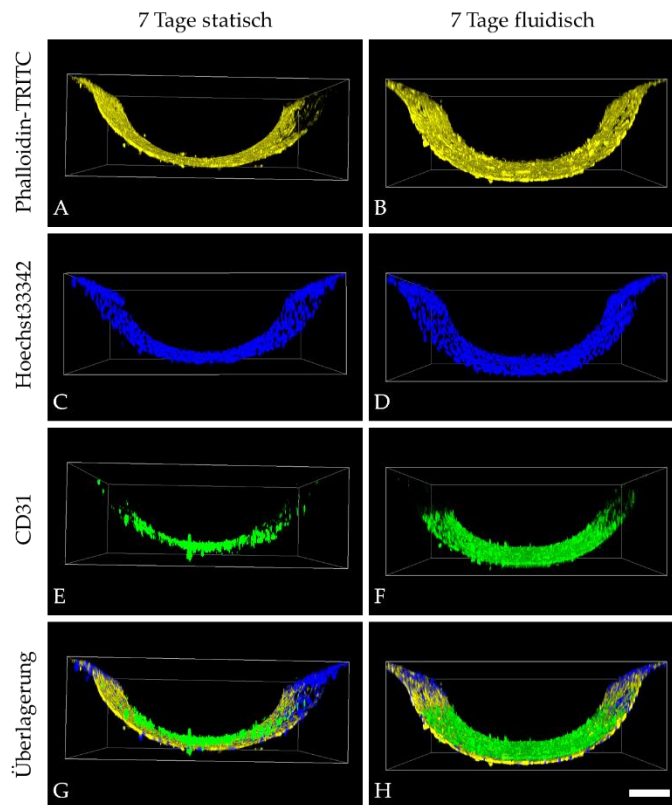


Abbildung 50: Siebentägige Kokultur aus Hepatozyten und LSEC im vasQchip unter fluidischen und statischen Bedingungen. Im umgebenden Kompartiment des vasQchips wurden auf eine 0,25 mg/ml Kollagen I Beschichtung  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten ausgesät und über Nacht inkubiert. In den Mikrokanal kamen auf die 0,25 mg/ml Fibronektinschicht  $10 \cdot 10^4$  LSEC. Nach einer einstündigen Rotation auf dem vasQturn bei 0,25 rpm wurden die LSEC über Nacht statisch inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die fluidischen Proben (B, D, F, H) an die mikrofluidische Pumpe bei einem Volumenstrom von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  der sich innerhalb von 3 Tagen auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  erhöhte, angeschlossen. Die statische Probe wurde parallel dazu unter denselben Bedingungen kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Am Tag 7 wurden die Proben für eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper) vorbereitet. Vor der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC und die DNA mit Hoechst33324 markiert.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ), Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, z-Stack Parameter:  $3 \mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für  $450 \mu\text{m}$ , Maßstab =  $200 \mu\text{m}$

Das Ergebnis der Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 (Abbildung 50) wird durch eine Analyse der mRNA-Expression von CD31 durch eine RT-qPCR bestätigt. Nach einer siebentägigen mikrofluidischen Kultivierung wurde die mRNA-Expression der LSEC spezifischen Marker CD31 und VE-Cadherin mithilfe einer RT-qPCR analysiert. In Abbildung 51 ist deren relative mRNA-Expression im Vergleich zwischen statisch und fluidisch kultivierten vasQchips zu sehen. Die mRNA-Expression an Kultivierungstag 7 wurde jeweils auf die Werte nach Kultivierungstag 3 normiert. Die Auswertung der relativen Expression erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode unter Verwendung von GAPDH als Referenzgen. Der in Abbildung 51 vorgestellten Werte ist zu entnehmen, dass der integrierte Fluss im Mikrokanal eine signifikante Auswirkung auf die mRNA-Expression der Endothelzellmarker CD31 und VE-Cadherin ausübt.

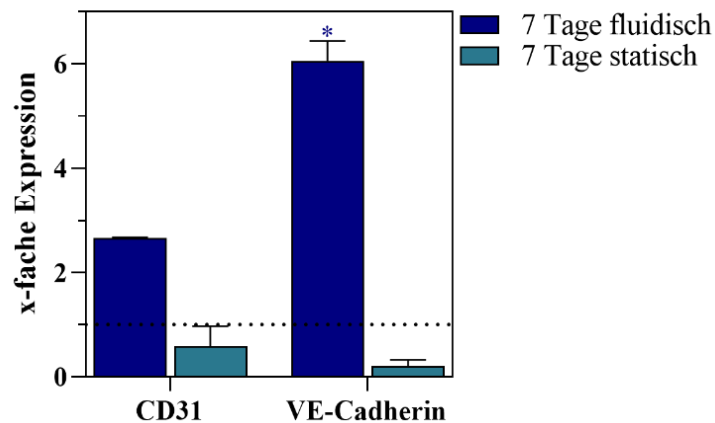


Abbildung 51: Relative mRNA-Expression der LSEC aus einer Kokultur mit Hepatozyten unter statischen und fluidischen Bedingungen im vasQchip. Der Mikrokanal wurde zuvor mit 0,25 mg/ml Fibronektin und das umgebende Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Dann wurden im umgebenden Kompartiment  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten eingebracht, die Anschlüsse verschlossen und über Nacht um  $180^\circ$  gedreht kultiviert. Darauf folgte die Besiedelung der LSEC im Mikrokanal mit  $10 \cdot 10^4$  Zellen und einer einstündigen Rotation auf dem vasQturn bei 0,25 rpm, damit die Zellen konfluent im Mikrokanal anwachsen können. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht wurde der Mikrokanal an die Mikrofluidikpumpe angeschlossen und bei einem steigenden Volumenstrom von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  für 7 Tage fluidisch kultiviert. Die statisch kultivierte Probe wurde parallel, ohne Fluss im Mikrokanal kultiviert. In beiden Ansätzen wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Die Zellen wurden anschließend mit TRIzol<sup>®</sup> lysiert und die isolierte RNA in cDNA transkribiert. Anschließend wurde eine Expressionsanalyse von CD31 und VE-Cadherin mithilfe einer RT-qPCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, die Proben wurden auf Tag 3 normiert (=1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und die Mittelwerte und deren Standardabweichung wurden aus  $n=3$  ermittelt. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\*  $< 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

CD31 wird an Tag 7 der fluidischen Kultivierung, fast 1,5-fach stärker exprimiert und VE-Cadherin 6-fach mehr. Hingegen nimmt die mRNA-Expression in statisch kultivierten vasQchips beider Marker gegenüber der 3-tägigen Kontrolle um das 0,4-fache (CD31) und 0,1-fache (VE-Cadherin) ab. In Kapitel 3.1.3.3 wurde eine verbesserte Expression von CD31 und VE-Cadherin durch eine mikrofluidische Kultivierung der LSEC im vasQchip als Monokultur nachgewiesen. Wird die Expression von CD31 in der fluidischen Monokultur mit der Kokultur in Abbildung 51 verglichen, so steigt diese um das 1,4-fache durch die Anwesenheit von Hepatozyten. VE-Cadherin wird gegenüber einer Monokultur 1,9-fach mehr exprimiert. CD31 ist wie bereits erwähnt ein Endothelzellmarker, welcher für die Bildung von *Tight Junctions* zwischen den Endothelzellen verantwortlich ist.<sup>[87]</sup> Auch VE-Cadherin spielt eine Rolle in der Bildung der *Tight Junctions* von Endothelzellen. Sie gehören zu den *Adherens Junction* Proteine, welche in der Membran verankert sind und sich mit ECM-Proteinen verbinden.<sup>[157]</sup> Die gesteigerte Expression von VE-Cadherin und CD31 führt somit zu Bildung einem dichteren Endothel im mikrofluidischen vasQchip. Insbesondere durch den mikrofluidischen Fluss im Mikrokanal des vasQchips können diese Verbindungen gestärkt angeregt werden, um ein Ablösen der Endothelzellen unter dem Medienstrom zu verhindern. Der Einfluss einer induzierten Fluidik in einem *Organ-on-a-Chip* konnte Sato *et al.* in deren mikrofluidischen Blutgefäß Plattform bereits



nachweisen. Sie konnten die gesteigerte VE-Cadherin Expression der Endothelzellen im Zusammenhang einer induzierten Mikrofluidik in ihrer Plattform belegen.<sup>[158]</sup> Widersprüchlich zu den gewonnenen Erkenntnissen über die LSEC-Barriere im fluidischen vasQchip sind hingegen die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.2.1. Die LSEC-Barriere hat gemäß der TEER-Messung im Zusammenhang mit direkt kokultivierten Hepatozyten abgenommen. In Abbildung 51 wurde ein Nachweis für eine gestärkte LSEC-Barriere durch die fluidische Kokultur im vasQchip geliefert. In der statischen Kokultur im vasQchip wurde eine Reduktion der Endothelzellmarker CD31 und VE-Cadherin ermittelt. Daraus lässt sich schließen, dass ausschließlich die induzierte Fluidik zu einer gesteigerten Barriere beiträgt, da sowohl im statischen Transwell® und im statischen vasQchip dies nicht bestätigt werden konnte. Zukünftig könnte die LSEC-Barriere im vasQchip durch eine Integration von Elektroden noch genauer über den TEER analysiert und verfolgt werden.

### **Verhalten der Hepatozyten in der fluidischen Kokultur im vasQchip**

Fast alle Organe des menschlichen Körpers sind abhängig von Aufgaben, die die parenchymalen Hepatozyten der Leber ausführen.<sup>[72]</sup> Infolgedessen ist es von besonderer Bedeutung deren Aktivität und Verhalten im mikrofluidischen Lebermodell zu evaluieren und zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt wird das Verhalten der Hepatozyten in einer Kokultur mit LSEC im fluidischen vasQchip-Lebermodell betrachtet und analysiert.

Die mRNA-Expression spezifischer Hepatozyten-Marker in Kokultur mit LSEC im fluidischen vasQchip ermöglicht es das Verhalten der Hepatozyten einzuordnen. In Abbildung 52 ist die relative mRNA-Expression von Albumin, CYP3A4 und UGT1A1 in Abhängigkeit zu einer Kultivierungszeit von 7 und 14 Tagen im fluidischen vasQchip dargestellt. Der vasQchip wurde wie zuvor beschreiben mit beiden Zelltypen besiedelt und anschließend für 3, 7 und 14 Tage bei einem Volumenstrom von 50 µl/min fluidisch kultiviert. Anschließend folgte eine mRNA-Expressionsanalyse von Albumin, CYP3A4 und UGT1A1 durch eine RT-qPCR. Die gemessenen Werte wurden auf die mRNA-Expression nach Tag 3 normiert. Es ist zu beobachten, dass Albumin und UGT1A1 nach einer siebentägigen Kultivierung eine geringere Expression aufweisen als an Tag 3. Die Expression von Albumin sinkt auf das 0,42-fache und UGT1A1 um das 0,52-fache. Erst nach 14 Tagen hat sich die Expression von Albumin wieder der dreitägigen angenähert (mit einer 1,04-fachen Expression). Die Aktivität von UGT1A1 ist an Tag 14 sogar 2,29-fach höher im Vergleich zu Tag 3. Lediglich für CYP3A4 steigerte sich die relative mRNA-Expression kontinuierlich über den Kultivierungszeitraum von 2,45-fache auf das 4,71-fache an Tag 14. Der Vergleich der mRNA-Expression von Albumin und UGT1A1 in der fluidischen Kokultur mit der Monokultur der Hepatozyten in Kapitel 3.2.3 zeigte, dass die fluidische Kokultur mit LSEC zu einer erhöhten mRNA-Expression der hepatozytären Marker führt. Dass Hepatozyten in Kokultur mit anderen nicht-parenchymalen Zellen eine verbesserte Aktivität ihrer Funktionen aufweisen, konnte auch in der Literatur mehrfach bestätigt werden.<sup>[72,153,159]</sup> Jedoch sollte die Albuminsekretion und somit dessen Expression in einer Langzeitkultivierung etwa konstant bleiben.<sup>[123]</sup> Diese Eigenschaft konnte jedoch nicht

eindeutig verifiziert werden, wofür eine Analyse der Albuminkonzentration mit mehr Stichproben notwendig wäre. Verglichen mit anderen in der Literatur vorgestellten Lebermodellen, in denen häufig die Leberkarzinomzellen HepG2 verwendet werden, ist dieses Modell jedoch trotz der noch nicht eindeutig nachvollziehbaren Albuminexpression deutlich zu favorisieren, da es im Gegensatz zu HepG2 CYP3A4 exprimiert.<sup>[13]</sup> Wegen der zentrale Rolle von CYP3A4 und UGT1A1 in der Verstoffwechselung von Medikamenten, ist deren nachgewiesene Aktivität in Hepatozyten in einem validen Lebermodell von ausschlaggebender Bedeutung. In Abbildung 52 konnte die Expression von CYP3A4 sowie von UGT1A1 verifiziert werden, womit für eine aussagekräftige Anwendung des Lebermodells im vasQchip immer eine Kokultur gegenüber der Monokultur zu bevorzugen ist. In den folgenden Anwendungen des vasQchip-Lebermodells wurde deswegen nach Möglichkeit stets eine Kokultur aus Hepatozyten und LSEC präferiert.

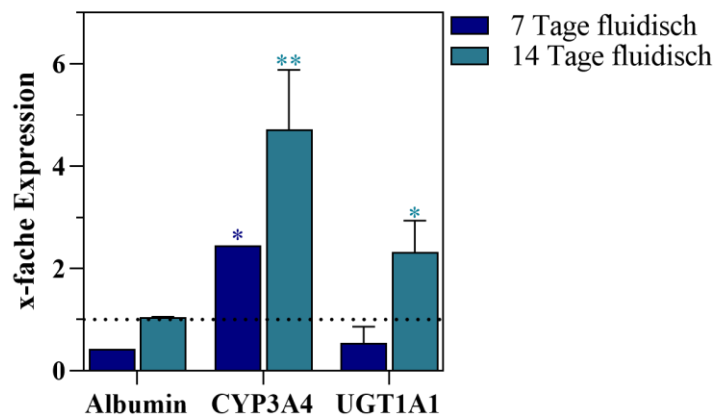
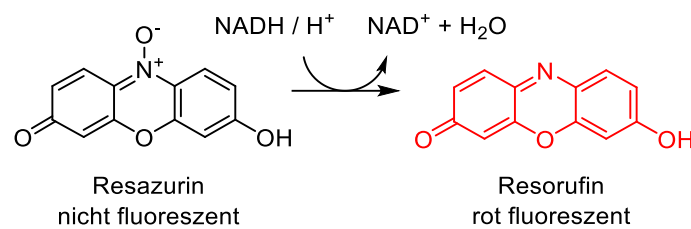


Abbildung 52: Relative mRNA-Expression von Hepatozyten in einer Kokultur mit LSEC im fluidischen vasQchip. Der vasQchip wurde mit 0,25 mg/ml Fibronectin im Mikrokanal und im umgebenden Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet.  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten wurden in das umgebende Kompartiment eingebracht und nach Verschluss aller Anschlüsse um  $180^\circ$  gedreht über Nacht kultiviert. Die  $10 \cdot 10^4$  LSEC wurden danach im Mikrokanal ausgesät und für eine Stunde bei einer Rotation von 0,25 rpm auf dem vasQturn gedreht. Anschließend folgte eine weitere Inkubation über Nacht mit darauffolgendem Anschluss an die Mikrofluidikpumpe und einer kontinuierlichen Erhöhung des Volumenstroms von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  innerhalb von 3 Tagen. Anschließend wurde das Kokulturmedium alle 2-3 Tage im umgebenden Kompartiment gewechselt. Die Zellen wurden an Tag 3, 7 und 14 mit TRIzol<sup>®</sup> lysiert und die isolierte mRNA in cDNA transkribiert. Anschließend erfolgte eine mRNA-Expressionsanalyse von Albumin, CYP3A4 und UGT1A1 mithilfe einer RT-qPCR. Die Auswertung erfolgte durch die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, die Proben wurden auf Tag 3 normiert (=1), als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

## Viabilitätsanalyse der Kokultur im vasQchip

Die Viabilität von Zellen kann auf unterschiedliche Arten bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits in Kapitel 3.3.1.1 die Proliferationsanalyse als ein Viabilitätsnachweis für die Suche eines geeigneten Kokulturmediums verwendet. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Substraten, welche nur von aktiven noch lebenden Zellen verstoffwechselt werden. Auf dieser Grundlage beruht der *PrestoBlue*<sup>TM</sup>-Zellviabilitätsversuch. Darin wird Resazurin von lebenden Zellen zu Resorufin reduziert, was eine detektierbare rote Fluoreszenz aufweist. In Schema 1 ist die Reduktion von Resazurin in Resorufin dargestellt.<sup>[160,161]</sup>



Schema 1: Intrazelluläre Reduktion von Resazurin zu Rot fluoreszierendem Resorufin

Anwendung dieses Viabilitätstests wurde die Kokultur im vasQchip wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben aufgebaut. Die Hälfte der vasQchips wurde anschließend an die Mikrofluidik angeschlossen, während die andere Hälfte statisch kultiviert wurde. An Tag 3 der Kultivierung wurde das Resazurin nach Herstelleranweisungen in den vasQchip gegeben und nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auswertung durch eine Absorptionmessung des reduzierten Resorufins. Das Ergebnis der Viabilitätsmessung ist in Abbildung 53 dargestellt. Die Fluoreszenz des Resorufins ist in Abhängigkeit von den Kultivierungstagen bei unterschiedlichen Bedingungen aufgetragen. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Viabilität der statisch und fluidisch kultivierten vasQchips. Während es zu einer kontinuierlichen und signifikanten Abnahme der Viabilität unter statischen Bedingungen kommt, sind fluidisch kultivierte Leberzellen im vasQchip signifikant viabler. An Tag 3 ist die Viabilität der statisch kultivierten Zellen gegenüber der fluidischen Probe um einen Faktor von 2,6 reduziert und nach 7 Tagen beträgt der Viabilitätsunterschied nur noch das 1,9-fache. Durch den induzierten Medienstrom im Mikrokanal wird deren natürliche Mikroumgebung besser imitiert was vermutlich zu einer verbesserten Viabilität führt.<sup>[47]</sup> Durch den Volumenstrom im Mikrokanal wird eine Schubspannung ausgeübt, welche sich positiv auf die Viabilität und Aktivität von Hepatozyten auswirkt.<sup>[149]</sup> Der positive Einfluss einer Schubspannung auf Leberzellen konnte Rashidi- und Vinci *et al.* bereits in ihren *Liver-on-a-Chip* Modellen beweisen.<sup>[162,163]</sup> In Abbildung 53 ist zudem zu erkennen, dass die Viabilität der statischen Proben von Tag 3 auf Tag 7 einen 1,2-fachen Rückgang aufweist, welcher bei der fluidischen Probe mit dem Faktor 1,6 deutlich höher ist. Ob sich dieser Trend der abnehmenden Viabilität fortsetzt, müsste mit einer längeren Viabilitätsanalyse bestimmt werden. Ein möglicher Rückgang der Viabilität könnte auf eine zu hohe Schubspannung durch den angelegten Fluss im Mikrokanal zurückzuführen sein. Dies sollte in zukünftigen Experimenten analysiert werden.

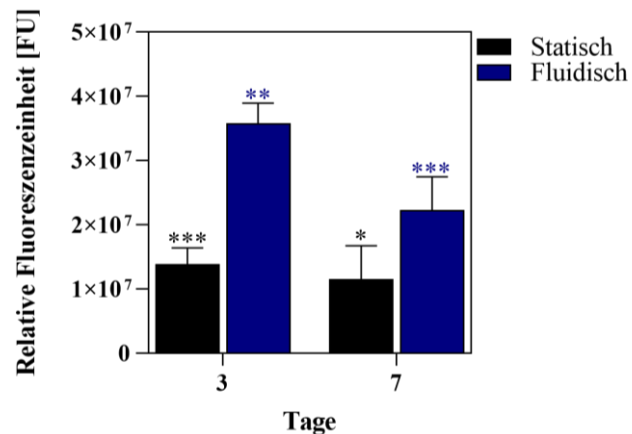


Abbildung 53: Viabilität von statisch und fluidisch kokultivierten LSEC und Hepatozyten im vasQchip. Der vasQchip wurde mit 0,25 mg/ml Fibronectin im Mikrokanal und 0,25 mg/ml Kollagen I im umgebenden Kompartiment beschichtet. Anschließend wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in das umgebende Kompartiment eingebracht und nach Verschluss aller Anschlüsse um  $180^\circ$  gedreht über Nacht kultiviert. Die  $10 \cdot 10^4$  LSEC wurden danach in den Mikrokanal gegeben und für 1 h bei einer Rotation von 0,25 rpm auf dem vasQturn gedreht. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht wurden die fluidischen Proben an die Mikrofluidikpumpe angeschlossen und wie bereits vorher angegeben fluidisch kultiviert. Die statischen Proben wurden parallel dazu kultiviert. An Tag 3 und 7 wurde ein Viabilitätstest mithilfe des *PrestoBlue™ Assays*, nach den Herstelleranweisungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der Absorption des umgesetzten Resazurins ( $\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ). Die Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Das Verhältnis von lebenden und toten Zellen ist eine weitere Möglichkeit die Viabilität von Zellen zu bestimmen. Dafür eignet sich die Verwendung von Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM). Dieses Substrat ist zellgängig, nicht fluoreszent und wird intrazellulär durch Esterasen zu fluoreszierendem Calcein metabolisiert. Diese Reaktion kann somit nur von lebenden Zellen durchgeführt werden. Zudem ist Calcein Zellmembran-undurchgängig, wodurch die viablen Zellen visualisiert werden können.<sup>[164]</sup> Tote Zellen hingegen, können durch Propidiumiodid (PI) markiert werden. PI ist ein fluoreszierender Nukleinsäureninterkalator, welcher sich zwischen die Basen der DNA lagert. Es ist nicht membrangängig und kann somit nur in nekrotische Zellen detektiert werden.<sup>[165]</sup> Dieses Verfahren der so genannten Lebend-/Tod-Färbung, wurde auch für die Analyse der Zellviabilität im fluidisch kultivierten Lebermodell angewandt. Dazu wurde die Kokultur im vasQchip analog zu Kapitel 3.3.2.1 aufgebaut und anschließend für 7 Tage mit einem finalen Volumenstrom von  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  kultiviert. Die Markierung der lebenden Zellen erfolgte mit  $4 \mu\text{M}$  Calcein-AM und der nekrotischen Zellen mit PI. Eine 3D-Projektion anhand konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigt Abbildung 54. Mithilfe einer Tiefenfärbungen und einer Querschnittsperspektiven in Abbildung 54 B, D, und F ist zu erkennen, dass sich nach 7 Tagen eine konfluente Zellschicht im Bereich des Mikrokanals ausgebildet hat. A, C, und E zeigen die überlagerte Färbung mit PI (Rot) und Calcein-AM (Grün). Da die beiden Reagenzien nicht zellspezifisch sind, kann trotz der unterschiedlichen mikroskopischen Ansichten nicht eindeutig zwischen der Hepatozyten-Zellschicht und LSEC-Zellschicht unterschieden werden.

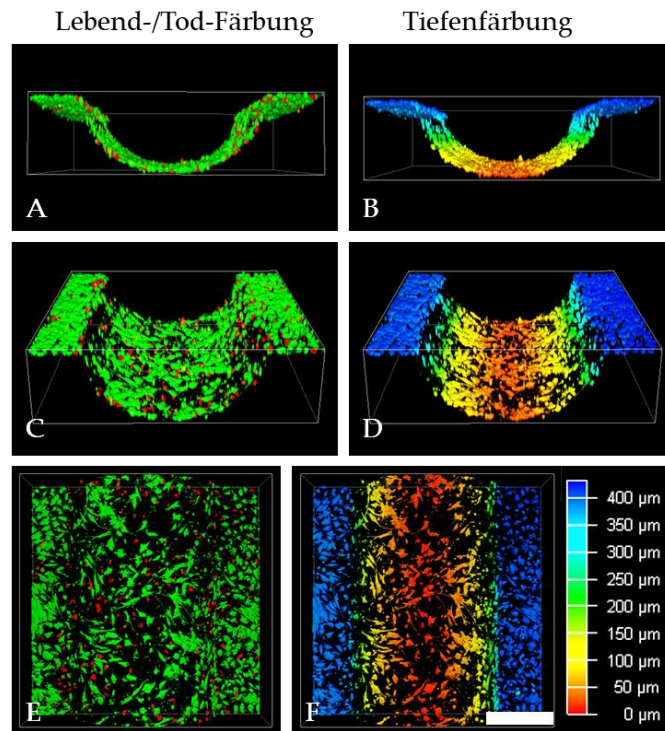


Abbildung 54: Lebend-/Tod-Färbung der Kokultur im fluidischen vasQchip über einen Zeitraum von 7 Tagen. Der Mikrokanal des vasQchips wurde zunächst mit 0,25 mg/ml Fibronectin beschichtet, parallel dazu wurde im umgebenden Kompartiment mit 0,25 mg/ml Kollagen I beschichtet. Anschließend wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in das umgebende Kompartiment eingebracht und nach Verschluss aller Anschlüsse um  $180^\circ$  gedreht über Nacht kultiviert. Die  $10 \cdot 10^4$  LSECs wurden danach im Mikrokanal ausgesät und für 1 h bei einer Rotation von 0,25 rpm auf dem vasQturn gedreht. Es folgte eine zusätzliche Inkubation über Nacht mit folgendem Anschluss des Mikrokanals an die Mikrofluidikpumpe. Der Volumenstrom wurde innerhalb von 3 Tagen von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  erhöht und dann konstant bei  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  gehalten. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt bis am 7. Tag nach Anschluss an die Fluidik unter Verwendung von  $300 \mu\text{M}$  Propidiumiodid und  $4 \mu\text{M}$  Calcein AM eine Lebend-/Tod-Färbung durchgeführt wurde (A, C, E). Zur Veranschaulichung der räumlichen Struktur des vasQchips wurden in B, D, und F die Tiefenfärbungen aufgelistet  
 Rot: Propidiumiodid ( $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 636 \text{ nm}$ ), Grün: Calcein-AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ),  
 Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, z-Stack Parameter:  $5 \mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für  $450 \mu\text{m}$ , Maßstab =  $400 \mu\text{m}$

Durch die horizontale Ansicht in Abbildung E wird ein Überblick über das Verhältnis von lebenden und toten Zellen möglich. Die nekrotischen Zellen sind mengenmäßig den lebenden Zellen um das 2,1-fach unterlegen. Die Anwendung einer Lebend/Tod-Färbung zur Analyse der Viabilität wurde bereits in anderen Lebermodellen erfolgreich eingesetzt.<sup>[13,166]</sup> Durch den visuellen Nachweis der lebenden Leberzellen im vasQchip kann das Ergebnis von Abbildung 53 und die hohe Viabilität im fluidischen System bestätigt werden. Die Evaluation der Kokultur im vasQchip wurde in diesem Kapitel somit erfolgreich abgeschlossen. Die fluidische Kultivierung des Lebermodells im vasQchip ist dem statischen Modell somit nachweislich überlegen. Ein angelegter Fluss im Mikrokanal des vasQchips führt zu einer gesteigerten Viabilität der Leberzellen, sowie zur erhöhten Aktivität zellspezifischer Funktionen. Das fluidische Lebermodell im vasQchip kann somit für spezifische Untersuchungen im Bereich der Leberforschung eingesetzt und weiterentwickelt werden. Im folgenden Kapitel 3.4 werden dessen möglichen Einsatzgebiete vorgestellt und analysiert, mit einem Fokus auf eine potenzielle Anwendung in der Medikamentenforschung.

## **3.4 Anwendungsmöglichkeiten des etablierten Lebermodells im vasQchip**

Die Leber ist für die Regulation des Glucosespiegels im Blut und somit für die Energiespeicherung durch Glykogenproduktion verantwortlich. Die Steuerung der Lipid-Zirkulation und Lagerung wird ebenfalls durch die Leber reguliert.<sup>[80]</sup> Darüber hinaus wird der kolloidosmotische Druck durch die Serumalbumin-Sekretion der Hepatozyten gesteuert.<sup>[67]</sup> Die hohe Stoffwechselrate der Hepatozyten ist für die Aufnahme von Nährstoffen und Xenobiotika verantwortlich. Letztere werden zusammen mit Medikamenten und toxischen Substanzen modifiziert, inaktiviert und anschließend abgebaut.<sup>[80]</sup> Die Vielzahl an unterschiedlich Aufgaben welche von der Leber übernommen werden ermöglichen es, das in Kapitel 3.3.2 etablierte Lebermodell im vasQchip in unterschiedlichen Bereichen der Leberforschung einzusetzen.

### **3.4.1 Validierung des Lebermodells für dessen Anwendung in der Medikamentenforschung**

Die breit gefächerten Aufgaben der Leber machen diese jedoch auch sehr anfällig für Störungen und Fehlfunktionen, welche lebensgefährliche Folgen haben können. So kommt es in der Medikamentenforschung häufig in der klinischen Phase durch den Nachweis von Lebertoxizität zum Ausschluss von potenziellen Medikamenten.<sup>[167]</sup> Die Verwendung von fundierten humanen Systemen in der präklinischen Testphase erlauben es Medikamente bereits in einem früheren Entwicklungsstadium als potentiell toxisch zu identifizieren, wodurch später Rückschläge in der Forschung vermieden werden können. Dies erfordert es jedoch die Lebermodelle mit bekannten Lebertoxinen zu evaluieren, um Aussagen über die Toxizität von unbekanntem Substanzen treffen zu können. Ein bekanntes Beispiel ist das Analgetikum Paracetamol.<sup>[168]</sup> Verabreicht in der vorgeschriebenen Dosis wird es durch Phase II Enzyme metabolisiert und durch Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat abgebaut.<sup>[169]</sup> Kommt es jedoch zu einer Überdosierung von Paracetamol, wird es von Phase I Enzymen zu dem toxischen Zwischenprodukt N-Acetyl-p-Benzoquinon Imin (NAPQI) verarbeitet.<sup>[168]</sup> Dieses reaktive Intermediat oxidiert zelluläre Makromoleküle und initiiert dadurch die Apoptose.<sup>[106]</sup> Da dieser Vorgang der Metabolisierung bereits sehr gut untersucht ist, kann dieser für die Validierung des vasQchip-Lebermodells verwendet werden. Hingegen ist Rifampicin ein Anti-Tuberkulose-Medikament.<sup>[170,171]</sup> In der Medikamentenforschung wird Rifampicin hauptsächlich als CYP3A4-Aktivator eingesetzt.<sup>[118,162,172]</sup> Das Phase I Enzym CYP3A4 spielt eine zentrale Rolle in der Bioverfügbarkeit von Medikamenten. Es katalysiert deren Elimination aus dem System und kann so einen großen Einfluss auf deren Wirksamkeit haben.<sup>[47,99,172]</sup> In den folgenden Kapiteln wird die Toxizität von Paracetamol und das Aktivierungspotential von CYP3A4 durch Rifampicin im vasQchip analysiert.

### 3.4.1.1 Paracetamol induzierte Leberschäden

Paracetamol wird häufig zur Behandlung von Fieber- und Schmerzsymptomen eingesetzt und wurde bereits 1887 klinisch verabreicht.<sup>[173]</sup> Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde, können jedoch Leberschäden durch eine Überdosis an Paracetamol verursacht werden. Um eine schädliche Überdosis für die verwendeten Hepatozyten zu definieren, wurden Toxizitätstest mit unterschiedlichen Paracetamol Konzentrationen durchgeführt. Parallel dazu wurden im Zusammenhang mit Paracetamol weitere Reaktivitäten der Hepatozyten betrachtet wie beispielsweise dessen Einfluss auf die LSEC-Barriere ist. So werden Paracetamol induzierte Leberschäden bekanntermaßen durch die Verwendung von N-Acetylcystein (NAC) kompensiert. Eine Konjugation der freien Thiolgruppen von NAC mit dem toxischen NAPQI neutralisiert damit dessen toxische Wirkung.<sup>[168,174,175]</sup> Es wurden Hepatozyten auf die Toxizität von Paracetamol, NAC und eine Kombination beider Substanzen untersucht. Die verwendeten Konzentrationen orientieren sich an der Veröffentlichung von Szkolnicka *et al.* Hierbei wurden in einer mit Kollagen I beschichteten 96-Well-Platte  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Paracetamol und NAC für 24 und 48 h. Um zu untersuchen, ob in den verwendeten Hepatozyten durch eine NAC-Behandlung eine reduzierte Paracetamol-Toxizität beobachtet werden kann, wurden diese zunächst für 24 h mit 1 mM NAC behandelt und anschließend für 48 h mit unterschiedlichen Paracetamolkonzentrationen behandelt, bevor sie mit einer Viabilitätsanalyse untersucht wurden. Der verwendete 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid Toxizitätstest (*MTT-Assay*) ist ein Substrat, welches durch Dehydrogenasen in den Mitochondrien zu Formazan konvertiert wird. Diese unlösliche Substanz weist eine abweichende Absorption zum Edukt auf und kann so photometrisch eindeutig nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Formazan Absorption gibt Rückschlüsse auf aktive, viable Zellen.<sup>[176]</sup> In Abbildung 55 ist die Viabilität in Abhängigkeit zur Konzentrationen von Paracetamol und NAC aufgetragen. Abbildung A) zeigt die Viabilität der Hepatozyten nach Behandlung mit 1  $\mu$ M-50  $\mu$ M Paracetamol über einen Behandlungszeitraum von 24 h und 48 h. Der Einfluss von NAC auf die Viabilität der Hepatozyten ist in B) abgebildet. In C) wurden die Zellen zunächst mit 1 mM NAC für 24 h und anschließend für 48 h mit Paracetamol behandelt. Das Ergebnis in Abbildung A) reproduziert die in der Literatur vertretenden Aussagen bezüglich der steigenden Toxizität mit steigender Paracetamol Konzentration.<sup>[106,168]</sup> Die Viabilität der Hepatozyten sinkt innerhalb von 24 h bei einer maximal eingesetzten Paracetamolkonzentration von 50 mM auf 69 %. Wird die Viabilität bei gleicher Konzentration nach einer 48 h Behandlung mit Paracetamol verglichen, so sinkt diese auf 0,7 %. Der IC<sub>50</sub>-Wert (*Inhibitory Concentration*) gibt an bei welcher Konzentration 50 % der Zellen die im *Assay* zugrundeliegende Reaktion nicht mehr durchführen können. Bei einer Behandlung für 48 h mit Paracetamol lag dieser Wert für Hepatozyten bei 13,86 mM Paracetamol. Zhou *et al.* haben bei primär isolierten Rattenhepatozyten, welche für 24 h mit Paracetamol behandelt wurden, einen IC<sub>50</sub>-Wert von 7,08 mM Paracetamol ermittelt.<sup>[175]</sup>

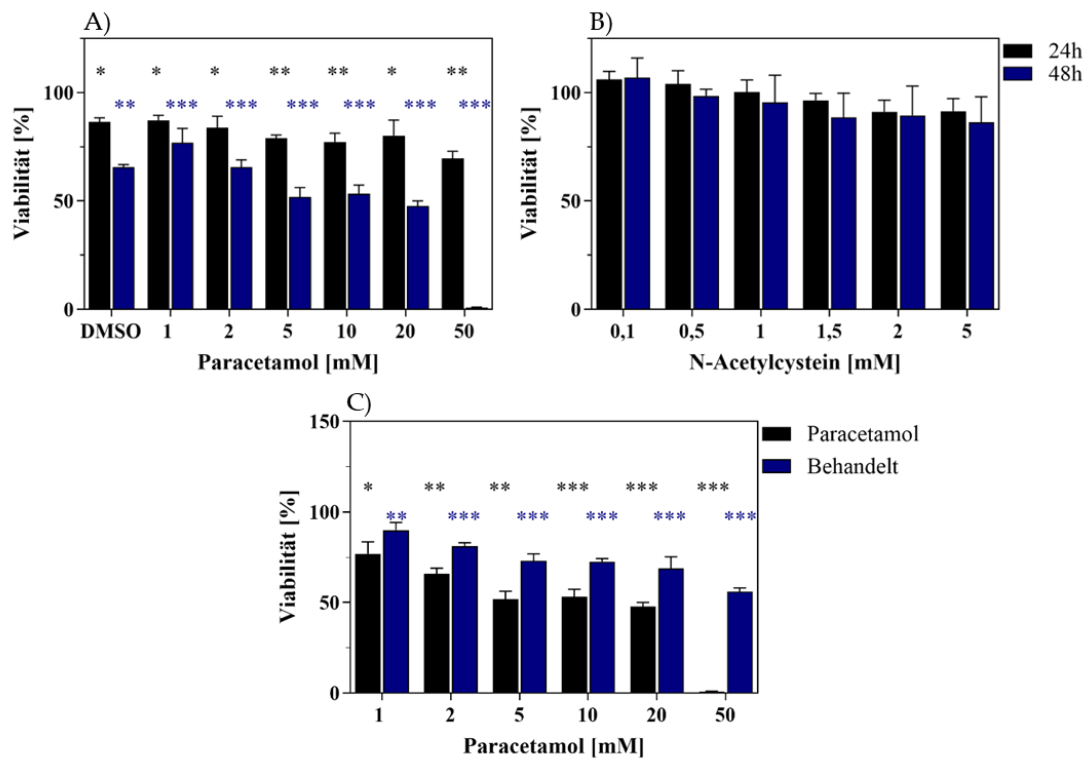


Abbildung 55: Viabilitätsanalyse der Hepatozyten nach Behandlung mit Paracetamol, N-Acetylcystein und deren Kombination. In eine Kollagen I beschichtete 96-Well-Platte wurden  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> ausgesät und für 3 Tage kultiviert, anschließend erfolgte die Behandlung mit den jeweiligen Substanzen. A) Hepatozyten behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Paracetamol für 24 h und 48 h. In B) wurden die Hepatozyten für 1 und 2 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen an N-Acetylcystein behandelt. C) Die Hepatozyten wurden für 24 h mit 1 mM N-Acetylcystein behandelt und anschließend für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Paracetamol (1 mM-50 mM). Als Kontrolle wurden Hepatozyten nur mit der entsprechenden Konzentration an Paracetamol behandelt. Die Viabilität wurde durch einen *MTT-Assay* bestimmt, welcher nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Die Proben wurden auf unbehandelte Kontrollen normiert, die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\* < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Die unterschiedliche Reaktivität auf Paracetamol könnte auf den unterschiedlichen Ursprung der Hepatozyten zurückgeführt werden, sind jedoch alle in einer ähnlichen Größenordnung. Eine konzentrationsabhängige Reduktion der *Upcyte Technologies* Hepatozytenviabilität gegenüber Paracetamol haben Kaden *et al.* bereits mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 3,13 mM publiziert.<sup>[119]</sup> N-Acetylcystein sollte keine lebertoxische Wirkung aufweisen, da es als Antidot bei einer Paracetamolüberdosis verabreicht wird.<sup>[175]</sup>  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> wurden daher mit unterschiedlichen NAC-Konzentrationen (0,1 mM-5 mM) behandelt (Graph B), wobei keine signifikante Toxizität nach einer Behandlung von 48 h zu erkennen war. Nach 48 h, bei einer Dosis von 5 mM NAC wurde lediglich eine nicht signifikante Reduktion der Viabilität um 14 % gemessen. Die Wirkung von NAC wird in Abbildung 55 Graph C) im Zusammenhang mit einer Überdosis an Paracetamol deutlich. Bei vorheriger Gabe von 1 mM NAC und anschließend 50 mM Paracetamol Behandlung steigerte die Viabilität der Hepatozyten signifikant um 55 % gegenüber der Kontrolle ohne NAC-Behandlung. Auch in der Literatur wurde eine Verbesserung der Viabilität bereits erfolgreich



nachgewiesen.<sup>[175]</sup> Die verwendeten Hepatozyten reagieren somit wie erwartet auf Paracetamol und NAC und zeigen das von der Literatur beschriebene Verhalten. Eine Verwendung der Hepatozyten im vasQchip zur Rekonstruktion eines humanoiden Lebermodells in der Wirkstoffforschung ist demzufolge nichts entgegenzusetzen. Im Anschluss wurden zusätzlich das Verhalten der LSEC gegenüber Paracetamol überprüft. Dazu wurde zuerst die Toxizität von Paracetamol gegenüber einem 2D-Monolayer von LSEC untersucht, wofür in einer 96-Well-Platte  $1 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf einer Kollagen I Beschichtung ausgesät und für 3 Tage kultiviert wurden. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Paracetamol in einem Konzentrationspektrum von 1 mM bis 50 mM jeweils für 24 h und 48 h. Die Quantifizierung der Viabilität erfolgte mithilfe des *MTT-Assays*, dessen Auswertung in Abbildung 56 zu sehen ist und die Viabilität der LSEC in Abhängigkeit zu unterschiedlichen Paracetamolkonzentrationen mit Behandlungszeiten von 24 h und 48 h zeigt. Bereits eine 50 mM Paracetamolösung zeigte innerhalb von 24 h einen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Endothelzellen. Eine Paracetamol-Behandlung für 24 h zeigte einen IC<sub>50</sub> von > 50 mM, während die Behandlung für 48 h einen IC<sub>50</sub>-Wert von 11 mM ergab. Die LSEC reagieren somit auf die Toxizität von Paracetamol, was auch von anderen Literaturquellen nachgewiesen wurde.<sup>[81,89,119,177]</sup> Kaden *et al.* beschreiben einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1,39 mM Paracetamol in LSEC des selben Herstellers.<sup>[119]</sup> Bereits mehrere Literaturquellen bestätigten, dass LSEC im Vergleich zu Hepatozyten stärker toxisch auf Paracetamol reagieren.<sup>[81,177]</sup> Werden die IC<sub>50</sub>-Werte von Paracetamol auf Hepatozyten (13,86 mM) und LSEC (11,31 mM) verglichen, so ist in der hier vorliegenden Studie kein Unterschied zu erkennen, wobei in der Literatur der IC<sub>50</sub>-Wert für die LSEC um eine 10er Potenz kleiner ist.<sup>[81,177]</sup> Eventuell kann durch eine Kokultur mit Hepatozyten die Sensibilität erhöht werden. Die ermittelten Toxizitäten und Verhaltensweisen der LSEC und Hepatozyten stimmen jedoch insgesamt mit den Erkenntnissen der Literatur überein. Deswegen wurde im nächsten Schritt der Einfluss von Paracetamol innerhalb einer statischen Kokultur im Transwell® weiter untersucht.

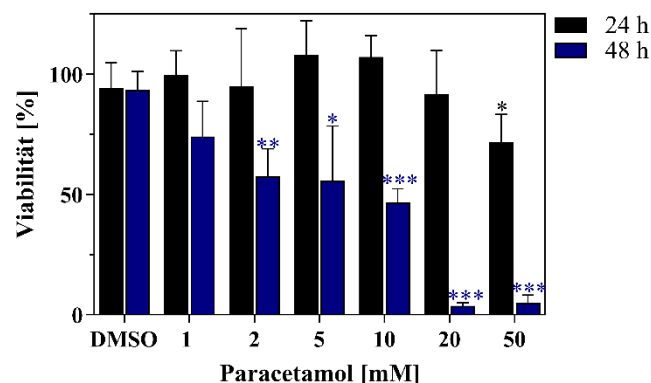


Abbildung 56: Toxizitätsanalyse von Paracetamol auf LSEC. In eine 96-Well-Platte wurden  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> auf einer Kollagen I Beschichtung ausgesät. Nach einer 3-tägigen Wachstumsphase wurden die Zellen mit Konzentrationen von 1 mM bis 50 mM Paracetamol, sowie einer zusätzlichen Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Die Behandlung wurde für 24 h und 48 h durchgeführt und anschließend wurde die Viabilität durch Anwendung eines *MTT-Assays* quantifiziert. Die Proben wurden auf unbehandelte Kontrollen normiert, die Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\* < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

### Einfluss von Paracetamol auf das Lebersinusoid im Transwell®

Der toxische Einfluss von Paracetamol auf LSEC ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden.<sup>[81,89,119,178]</sup> Mit dem Ziel die Wirkung von Paracetamol auf Leberzellen *ex vivo* in einer repräsentativeren Umgebung zu rekonstruieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das Transwell®-System gewählt. Diese statische Kultivierungsform ermöglicht eine strukturelle Kokultur von Hepatozyten und LSEC wie sie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben wurde. Die Kokultur wurde auf Kollagen I beschichteten Oberflächen aufgebaut und insgesamt für zwei Ansätze untersucht. In Ansatz 1 erfolgte die Kultivierung der Hepatozyten mit einem räumlichen Abstand auf dem Boden der 24-Well-Platte, während in Ansatz 2 die Hepatozyten direkt auf der Unterseite des Transwell® kultiviert wurden. Der Aufbau der Kokultur im Transwell® ist in Abbildung 57 schematisch dargestellt. Insgesamt wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> verwendet und im Transwell®-Einsatz wurden  $1,56 \cdot 10^4$  LSEC ausgesät. Nach einer 3-tägigen Kultivierungszeit wurde die LSEC-Monolayer mit 20 mM Paracetamol für 48 h behandelt. In definierten Zeitintervallen wurde dabei der TEER gemessen, um den Einfluss von Paracetamol auf die Barriereintegrität zeitlich zu verfolgen. Parallel erfolgte die Analyse einer unbehandelten Kontrolle um als Referenz zu dienen. In Abbildung 57 ist der TEER in Abhängigkeit der Behandlungszeit aufgetragen. Graph A) zeigt den TEER der unbehandelten Kontrollen über die Zeit, während Graph B) den TEER der mit Paracetamol behandelten Ansätze abbildet. Die unbehandelten Ansätze weisen wie zu erwarten konstante Widerstände auf.

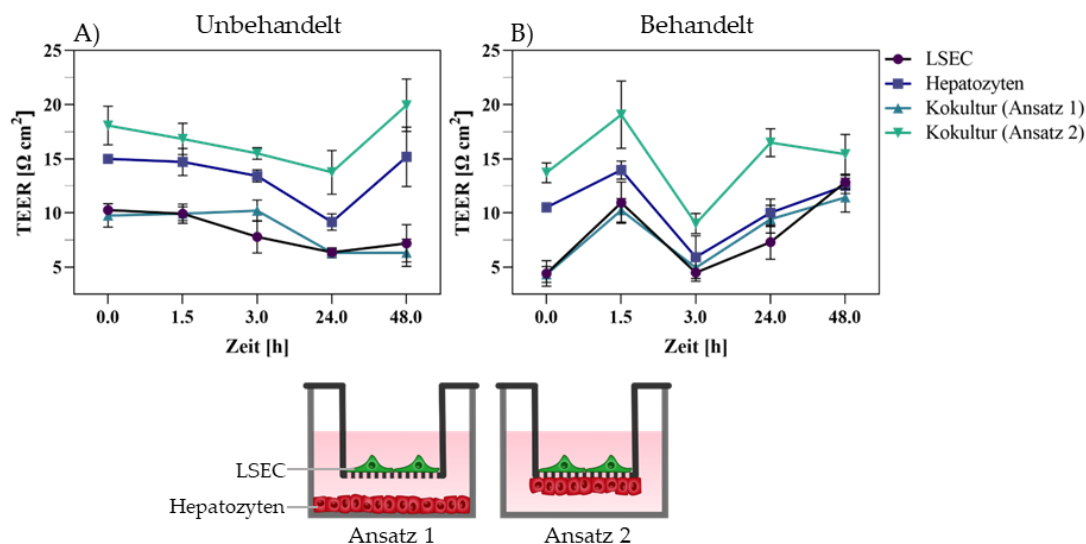


Abbildung 57: Untersuchung des Paracetamoleinflusses auf die Barriere der Kokultur im Transwell®. Die Oberflächen wurden mit Kollagen I beschichtet und es wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> im 24-Well und auf der Unterseite des Transwell®-Einsatzes angebracht. Anschließend wurde der Transwell®-Einsatz mit  $5 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> besiedelt und für 3 Tage kultiviert. Die Mono- und Kokulturen wurden anschließend mit 20 mM Paracetamol behandelt. Die Barriereintegrität wurde durch die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) über 2 Tage verfolgt (B). Parallel dazu wurde eine unbehandelte Kontrolle mit den gleichen Zellkombinationen mitverfolgt (A). Die Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus n=3. Als Nullwert wurde ein mit Kollagen I beschichtetes Transwell® verwendet. Transwell® 0,4 µm Poren, Einsatz für 24-Well-Platte.

1,5 h nach der Paracetamol-Behandlung in Abbildung B) ist ein einheitlicher Anstieg des Widerstandes zu erkennen, welcher aber nach 3 h drastisch sinkt. Die Barriere scheint sich jedoch nach 24 h wieder zu regeneriert. Dieser Abfall ist in der unbehandelten Kontrolle nicht nachweisbar und es konnte ein negativer Effekt von Paracetamol auf die Barriere des Sinusoid dargestellt werden. Wird die Differenz des Widerstands zwischen 1,5 h und 3 h nach Behandlung betrachtet wird ersichtlich, dass die Hepatozyten in Ansatz 1 keinen großen Einfluss auf die Barrierefunktion der LSEC haben. Die TEER-Werte der LSEC-Kontrolle (von 1,5 h auf 3 h) ist lediglich um 1,1-fach verstärkt gegenüber Ansatz 1. Ansatz 2 weist hingegen eine Differenz von  $10,05 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$  gegenüber der Hepatozyten- und LSEC-Kontrolle ( $8,04 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$  und  $6,46 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ ) auf. Somit scheint eine direkte Kokultur robuster gegenüber der Toxizität von Paracetamol zu sein als die Monozellschichten, welche eine Differenz von  $14,5 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$  aufweisen. Der einsetzende Zerfall der Barriere nach ca. 1,5 h wurde von Ito *et al.* im Mausmodell bereits beschrieben.<sup>[178]</sup> Der Anstieg des Widerstandes für die ersten 1,5 h nach Behandlungsstart ließe sich auch durch eine nachgewiesene Schwellung der LSEC unter Einfluss von Paracetamol begründen.<sup>[81]</sup> Erst später folgt ein Zerfall der Barriere durch entstehende Lücken zwischen den Endothelzellen.<sup>[177]</sup> Durch Messung des TEER-Wertes 3 h nach Behandlungsbeginn, konnte dieses Verhalten im aufgebauten Transwell® verifiziert werden (Abbildung 57 B). Durch die Verfolgung des TEER in einem statisch rekonstruierten Lebersinusoid im Transwell®-System konnte das Barriereverhalten gegenüber einer Paracetamolbehandlung verifiziert werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben, führt eine Paracetamolbehandlung in toxischer Konzentration zu einem Zerfall des Sinusoid. Die eingesetzten Leberzellen eignen sich somit für einen Einsatz in der Medikamentenforschung, um präklinische medikamenteninduzierte Leberschäden zu identifizieren.

### **Paracetamol induzierte Leberschäden im vasQchip**

Die Anwendung von *Liver-on-a-Chip*-Plattformen in der Medikamentenforschung ermöglicht realitätsnähere Aussagen bezüglich der Toxizität potenzieller Medikamente zu treffen. Durch strukturelle und morphologische Annäherungen der Lebermodelle an die *in vivo*-Bedingungen einer menschlichen Leber, kann das Verhalten der Leberzellen naturgetreuer abgebildet werden, was eine effizientere Medikamentenforschung ermöglicht.<sup>[119,162,179]</sup> So wurde bereits in einigen Lebermodellen Paracetamol für eine Simulation eines medikamenteninduzierten Leberschaden eingesetzt.<sup>[13,119,179,180]</sup> Da sich jedoch alle Modelle in verschiedenen Aspekten unterscheiden, ist es wichtig ähnliche Umgebungsbedingungen zu finden, um deren gegenseitige Einordnung zu ermöglichen. Der vasQchip wurde wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben im Kompartiment mit Hepatozyten und im Mikrokanal mit LSEC besiedelt. Anschließend wurden die fluidischen vasQchips für 3 Tage bei einem finalen Volumenstrom von  $50 \text{ } \mu\text{l}/\text{min}$  an der Mikrofluidikpumpe kultiviert und mit  $20 \text{ mM}$  Paracetamol behandelt. Die Behandlung wurde nach 48 h durch einen Viabilitätstest beendet. In Abbildung 58 ist die Viabilität der Hepatozyten und LSEC in Form eines ATP-abhängigen Bioluminzenz-Assay durch die Quantifikation der ATP-Konzentration dargestellt. In Kapitel 3.2.3.1 wurde dieser Test bereits für die Viabilitätsbestimmung der Hepatozyten im vasQchip verwendet. Die

Viabilität der Zellen im Mikrokanal und im umgebenden Kompartiment wurde durch die Lumineszenz des ATP-abhängigen Oxyluciferins quantifiziert. Die Lumineszenz im Mikrokanal sinkt zwischen dem unbehandelten fluidischen vasQchip mit einer Lumineszenz von  $36901$  gegenüber dem behandelten vasQchip auf ein nicht detektierbares Level. In vergleichbarer Form wird dieses Verhalten für einen behandelten vasQchip in Abbildung 58 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass die LSEC im Mikrokanal stark von Paracetamol beeinflusst werden und im fluidischen Ansatz nicht mehr im Mikrokanal vorzufinden sind. Paracetamol scheint somit keine negative Auswirkung auf die Hepatozyten im umgebenden Kompartiment zu haben. Kaden *et al.* hatten in einem fluidischen Lebermodell nachgewiesen, dass nach 7-tägiger Paracetamol-Behandlung schon bei einer Konzentration von  $2\text{ mM}$  keine konfluente Endothelzellenschicht mehr ausgebildet wird. Gleichzeitig waren bei  $10\text{ mM}$  Paracetamol nur noch vereinzelt Hepatozyten vorhanden.<sup>[119]</sup> Das in dieser Arbeit etablierte Lebermodell zeigt somit erste, vielversprechende, vergleichbare Effekte von Paracetamol auf das Lebermodell im vasQchip.

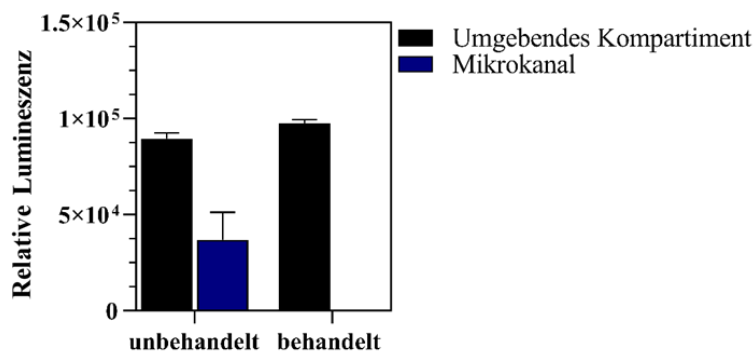


Abbildung 58: Zellviabilität der LSEC und Hepatozyten im fluidischen vasQchip nach Behandlung mit  $20\text{ mM}$  Paracetamol. Die Oberflächen des vasQchip wurden mit  $0,25\text{ mg/ml}$  Fibronectin im Mikrokanal und mit  $0,25\text{ mg/ml}$  Kollagen I im umgebenden Kompartiment beschichtet. Zuerst wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in das Kompartiment eingebracht und nach Verschluss der Anschlüsse wurden die vasQchips um  $180^\circ$  gedreht und über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Besiedelung des Mikrokanals mit  $10 \cdot 10^4$  LSEC, wobei die Rotation am vasQturn bei  $0,25\text{ rpm}$   $1\text{ h}$  eine gleichmäßige Adhäsion der Zellen begünstigte. Nach einer weiteren Inkubationszeit über Nacht wurde am nächsten Tag die vasQchips an die Mikrofluidikpumpe bei einem Volumenstrom von  $3\text{ }\mu\text{l/min}$  angeschlossen. Innerhalb von 3 Tagen erhöhte sich dieser auf  $50\text{ }\mu\text{l/min}$  und es erfolgte die Behandlung durch  $20\text{ mM}$  Paracetamol für  $48\text{ h}$  durch den Mikrokanal des vasQchips. Danach wurde durch den *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* die Viabilität der Zelltypen bestimmt. Die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus  $n=3$  und die Werte wurden relativiert auf ein Blank ohne Zellen und Paracetamol.

### 3.4.1.2 CYP3A4 Aktivität der Hepatozyten im vasQchip

Eine weitere Validierung des vasQchip-Lebermodells als Modell für die Medikamentenforschung erfolgte über die Bestimmung der CYP3A4-Aktivität. Wie bereits in Kapitel 1.2.1.3 erläutert, ist CYP3A4 ein Enzym, welches dauerhaft in Hepatozyten exprimiert wird und in der Metabolisierung von bis zu  $30\%$  der heutzutage verabreichten Medikamente involviert ist.<sup>[57,97,99]</sup> Die Aktivität von CYP3A4 hat daher für die Medikamentenforschung eine Schlüsselbedeutung und es gibt verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren der CYP3A4-Expression, welche verwendet werden, um Lebermodelle zu evaluieren.<sup>[99,147]</sup> So wird unter anderem Rifampicin als

Aktivator und Ketoconazol als Inhibitor für CYP3A4 eingesetzt.<sup>[13,118,147]</sup> Im nachfolgenden Abschnitt wird die Aktivierung von CYP3A4 durch Rifampicin auf den verwendeten Hepatozyten, mit anschließender Anwendung im vasQchip getestet.

### Voruntersuchungen für die Aktivitätsanalyse von CYP3A4 im vasQchip

Damit die Integrität des Lebermodells im vasQchip bezüglich der CYP3A4 Aktivität gewährleistet werden kann, muss zunächst das Verhalten der beteiligten Zelltypen außerhalb des Modells verifiziert werden. Dazu wurde zunächst eine Toxizitätsanalyse von unterschiedlichen Konzentrationen des Aktivators Rifampicin an Hepatozyten und LSEC durchgeführt, indem eine Kollagen I beschichtete mit 96-Well-Platte  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> und  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> ausgesät und für 3 Tage inkubiert wurde. Anschließend erfolgte eine 24 h und 48 h Behandlung mit Rifampicin (1, 5, und 20  $\mu$ M) und dessen Lösungsmittel DMSO. Für die Toxizitätsanalyse wurde die Viabilität der Zellen durch Verwendung eines *MTT-Assays* quantifiziert. Die resultierende Viabilität ist in Abhängigkeit zur Rifampicin-Konzentration in Abbildung 59 dargestellt. Graph A) zeigt die Viabilität der Hepatozyten in Abhängigkeit der Rifampicin-Konzentration, wohingegen in B) die LSEC analysiert wurden. Die in Abbildung 59 dargestellten Toxizitätsanalysen für Rifampicin zeigt, dass innerhalb von 24 h und 48 h weder für Hepatozyten noch für LSEC eine signifikant toxische Wirkung beobachtet wird, da ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $> 20 \mu$ M vorzufinden ist. Somit kann eine Konzentration von bis zu 20  $\mu$ M Rifampicin für die Aktivierung von CYP3A4 bedenkenlos eingesetzt werden. In der Tuberkulose-Forschung, dem Anwendungsgebiet von Rifampicin, ist jedoch von einer leichten Toxizität von Rifampicin berichtet worden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass diese mit einer kombinierte Einnahme eines zusätzlich verabreichten Anti-Tuberkulosemedikament zurückzuführen ist.<sup>[170,181]</sup>

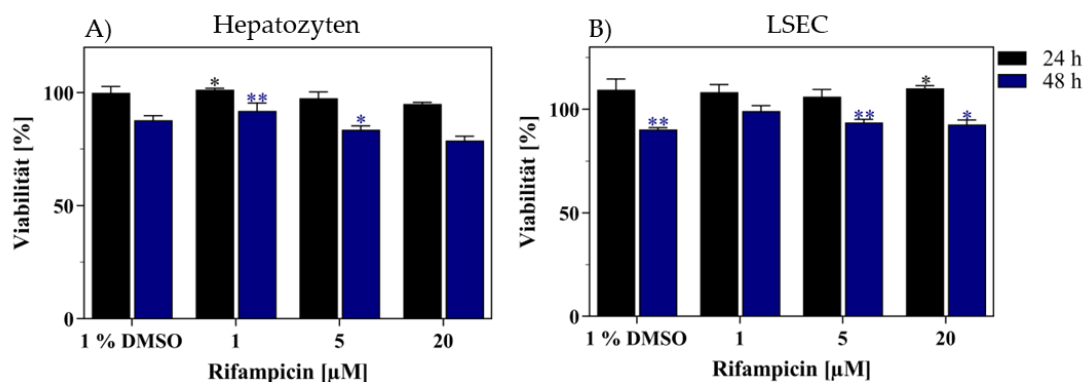


Abbildung 59: Toxizitätstest der Hepatozyten und LSEC, welche mit Rifampicin und dessen Lösungsmittel DMSO behandelt wurden. Eine 96-Well-Platte wurde mit Kollagen I beschichtet und anschließend mit  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> und  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> besiedelt. Es folgte eine 3-tägige Inkubationszeit mit anschließender Behandlung durch Rifampicin in den Konzentrationen 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 20  $\mu$ M. Zusätzlich wurde das Lösungsmittel (DMSO) von Rifampicin getestet. Nach einer Behandlungsphase von 24 h und 48 h wurde die Viabilität durch Anwendung eines *MTT-Assays* quantifiziert, welcher nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Die Proben wurden auf unbehandelte Kontrollen normiert, die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\* < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Die Auswertung der CYP3A4-Aktivität erfolgte mithilfe eines CYP3A4-spezifischen Biolumineszenztest. Zudem wurde die mRNA-Expression von CYP3A4 durch eine RT-qPCR quantifiziert. Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte auf einer Kollagen I-Beschichtung und die Behandlung mit Rifampicin startete nach einer 3-tägigen Inkubationszeit. In Abbildung 60 A) ist die Aktivierung von CYP3A4 durch Rifampicin (1  $\mu$ M-20  $\mu$ M), durch einen Biolumineszenztest dargestellt. Dieser wurde in Kapitel 3.2.3.1 bereits für die Hepatozytenmonokultur im vasQchip eingesetzt und beschrieben. Das Ergebnis in Abbildung 57 A) zeigt, dass die Hepatozyten auf eine steigende Konzentration an Rifampicin mit einer zeitabhängigen erhöhten CYP3A4-Aktivität reagieren. Nach einer 48 h Behandlung von 20  $\mu$ M Rifampicin wurde im Vergleich zur 24 h-Behandlung eine 2,4-fach höhere Aktivität von CYP3A4 gemessen. Korrelierend mit der unbehandelten Kontrolle wird die CYP3A4 Aktivität bei einer 48-stündigen Behandlungszeit und einer Rifampicin-Konzentration von 20  $\mu$ M um einen Faktor von 8,75 erhöht gemessen. Diese maximale Induktion von CYP3A4 folgt einem linearen dosisabhängigen Anstieg der CYP3A4 Aktivität. Auch Burkard *et al.* konnten eine Aktivierung von CYP3A4 durch 20  $\mu$ M Rifampicin in *Upcyte*-Hepatozyten nachweisen.<sup>[147]</sup> In vielen weiteren Hepatozyten, unterschiedlichen Ursprungs, wurde ein ähnliches Verhalten nachgewiesen.<sup>[57,99,181]</sup> Die Aktivierung von CYP3A4 in den Hepatozyten konnten somit validiert werden, was deren Anwendung in einem 3D-vasQchip Lebermodell für eine CYP3A4-Induktionsanalyse ermöglicht. Eine weitere Möglichkeit der CYP3A4-Aktivitätsanalyse ist die Messung der mRNA-Expression. Um das Ergebnis aus Abbildung 60 A) zu untermauern, wurde die Behandlung durch Rifampicin mit einer RT-qPCR verfolgt (Abbildung 57 B). Dazu wurde die relative Expression von CYP3A4, Albumin und G6P mit unterschiedlichen Rifampicin-Konzentrationen ermittelt und dargestellt. Die Hepatozyten wurden insgesamt für 24 h mit Rifampicin und dessen Lösungsmittel DMSO behandelt. Die behandelten Hepatozyten wurden dabei auf die unbehandelte Kontrolle normiert (Abbildung 60 B). Die relative mRNA-Expression von Albumin, CYP3A4 und G6P ist in Abhängigkeit der Aktivierung mit 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 20  $\mu$ M Rifampicin abgebildet. Abbildung B) zeigt die relative mRNA-Expression von Albumin und G6P, welche sich nicht signifikant von der unbehandelten Kontrolle unterscheiden. Anders ist es bei der mRNA-Expression von CYP3A4, welche durch die Rifampicinbehandlung deutlich ansteigt. Die Behandlung mit 20  $\mu$ M Rifampicin induziert eine 15-fach höhere mRNA-Expression von CYP3A4 im Vergleich zur Kontrolle. Das Ergebnis der mRNA-Expressionsanalyse spiegelt die Messung der dosisabhängigen Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin mithilfe des Biolumineszenztest wieder. Beide Untersuchungen reproduzierten damit die in der Literatur beschriebene 5-fache CYP3A4 Aktivität und überschritten diese sogar deutlich.<sup>[143]</sup> Somit sind sie diesbezüglich geeignet um in einem repräsentativen Lebermodell für die Medikamentenforschung eingesetzt zu werden.

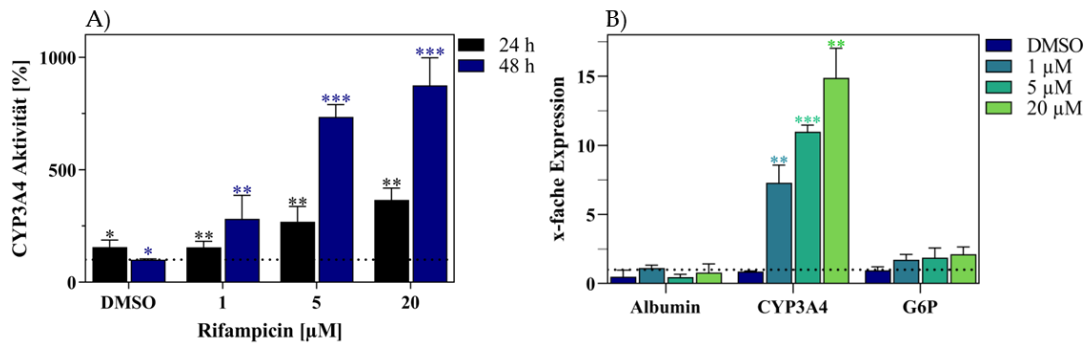


Abbildung 60: Aktivitätsanalyse von CYP3A4 in Hepatozyten unter dem Einfluss von Rifampicin. Es wurden  $15 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> auf einer Kollagen I beschichteten Wellplatte ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 1 µM, 5 µM und 20 µM Rifampicin und dessen Lösungsmittel DMSO (1 %). Parallel dazu wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Aktivitätsanalyse von CYP3A4 erfolgte in A) durch den *P450-Glo*<sup>TM</sup> CYP3A4 Assay durch Messung der Proteinaktivität und in B) durch die Quantifizierung der mRNA-Expression von CYP3A4 durch eine RT-qPCR. Für die RT-qPCR wurden die Proben für 24 h mit Rifampicin behandelt bevor sie durch TRIzol<sup>®</sup> lysiert und die isolierte RNA in cDNA transkribiert in einer RT-qPCR quantifiziert wurden. Es folgte eine mRNA-Expressionsanalyse von Albumin; CYP3A4 und Glucose-6-Phosphatase (G6P). Die Auswertung der RT-qPCR wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt, die Proben wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert (=1) und als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten in beiden Experimenten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\* < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

### Aktivitätsanalyse von CYP3A4 im Lebermodell des vasQchips

Im vorherigen Abschnitt wurde die Qualifizierung der verwendeten Zelltypen im etablierten Lebermodell für eine Anwendung in der Medikamentenforschung besprochen. Es wurde erfolgreich bestätigt, dass Hepatozyten in der planaren Monokultur auf eine Induktion mit Rifampicin reagieren. Nun wird das CYP3A4-Verhalten in Hepatozyten im fluidischen Lebermodell im vasQchip analysiert. Dafür wurde das Lebermodell wie in Kapitel 3.3.2.1 beschreiben aufgebaut und nach einer 3-tägigen Inkubation, unter angelegtem Volumenstrom, oder in der statischen Kontrolle (ohne Fluss) mit 20 µM Rifampicin für 48 h behandelt. Die Aktivitätsanalyse von CYP3A4 wurde mit einem Biolumineszenztest *P450-Glo*<sup>TM</sup> CYP3A4 Assay durchgeführt und dessen Ergebnis ist in Abbildung 61 dargestellt. Diese zeigt die CYP3A4-Aktivität in Abhängigkeit der behandelten statisch und fluidisch kultivierten Lebermodellen im vasQchip, wobei die Aktivität bei einer 20 µM Rifampicin-Behandlung auf die 100 %ige-Aktivität der jeweiligen unbehandelten Proben normiert wurde. Die fluidisch kultivierten und behandelten vasQchips zeigten im Vergleich zur statischen Kultivierung eine um den Faktor 2 erhöhte CYP3A4-Aktivität. Im Vergleich zur unbehandelten Probe zeigt das fluidisch kultivierte Lebermodell eine 3,21-fache Induktion durch 20 µM Rifampicin. Die statische Probe erlangte demgegenüber lediglich eine 1,65-fache Induktion. Dieses Verhalten entspricht nicht der 5-fachen Induktion welche Ehrlich *et al.* für ein Lebermodell fordern.<sup>[143]</sup> Es wäre möglich, die Aktivität des Enzyms durch veränderte Parameter des Volumenstroms zu beeinflussen, was zukünftig untersucht werden sollte. Dennoch konnte mit diesem Versuch der positive Effekt des induzierten Volumenstroms im

Mikrokanal auf die metabolische Aktivität der Hepatozyten nachgewiesen werden. Auch in anderen fluidischen Lebermodellen konnte die erhöhte CYP3A4-Aktivität durch eine Perfusion des Systems nachgewiesen werden.<sup>[59,162]</sup> Zukünftig sollte das Modell auf die Inhibition durch Ketoconazol getestet werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass ein fluidisches Lebermodell für eine Anwendung im Bereich der Medikamentenforschung vielversprechend ist.

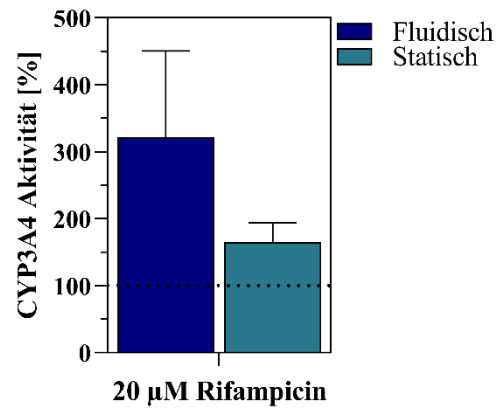


Abbildung 61: CYP3A4-Aktivitätsanalyse im Lebermodell des vasQchips unter statischen und fluidischen Bedingungen. Die Oberflächen des vasQchip wurden mit einer Proteinbeschichtung aus 0,25 mg/ml Fibronectin im Mikrokanal und 0,25 mg/ml Kollagen I im Kompartiment versehen. Daraufhin erfolgte die Einbringung von  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten im Kompartiment. Der vasQchip wurde nach Abdichtung aller Verschlüsse um  $180^\circ$  gedreht, über Nacht kultiviert.  $10 \cdot 10^4$  LSEC wurden anschließend für die Besiedelung des Mikrokanals verwendet. Damit diese in der zylindrischen Form des Mikrokanals überall adhären konnten, wurde für 1 h bei einer Rotation von 0,25 rpm der vasQchip am vasQturn gedreht. Nach einer statischen Inkubation über Nacht erfolgte am nächsten Tag der Anschluss an die mikrofluidische Pumpe. Über 3 Tage wurde der Volumenstrom von 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  erhöht, bevor die Behandlung mit Rifampicin begann. Die statischen Kontrollen wurden parallel dazu unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die 3 Tage alte Kokultur im vasQchip wurde jeweils im statischen und fluidischen Zustand, durch 20  $\mu\text{M}$  Rifampicin für 48 h behandelt. Die darauffolgende CYP3A4-Aktivität wurde durch den *P450-Glo™ CYP3A4 Assay* quantifiziert. Dabei wurde die Aktivität bei einer 20  $\mu\text{M}$  Rifampicin-Behandlung auf die jeweiligen unbehandelten Proben, bei denen eine Aktivität von 100 % vorausgesetzt wird, normiert. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ .



### 3.4.2 *Drug Targeting* im Lebermodell mithilfe von Peptoiden

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist ein zeitaufwendiger Prozess, welcher von vielen Hürden gekennzeichnet ist, die überwunden und berücksichtigt werden müssen. Ein Aspekt davon ist die systemische Arzneimittelgabe. Bei einer systemischen Anwendung müssen hohe Konzentrationen des Wirkstoffs eingesetzt werden, um am Wirkungsort eine genügend hohe Konzentration zu erzielen, um die gewünschten therapeutischen Effekte auszulösen. Durch die hohe Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen von systemisch applizierten Arzneimitteln rückt das *Drug Targeting*, die ortsspezifische Anwendungen von Medikamenten in den Fokus.<sup>[182]</sup> Für einen spezifischen Transport von Wirkstoffen zu Krebszellen wurden unterschiedliche Transportmoleküle diesbezüglich untersucht, welche entweder kovalent oder durch Interaktion mit dem Wirkstoff konjugiert oder assoziiert werden. Darunter fallen Substanzklassen wie z.B. Lipide, supramolekulare Strukturen, Dendrimere, Cyclodextrine aber auch spezifische Proteine, Peptide und *small Molecules* (englisch, kleine Moleküle).<sup>[183]</sup> Peptide sind Polymere aus Aminosäuren, verbunden durch eine Peptidbindung. Durch ihre Biokompatibilität, modulare Struktur und einfachen Synthese sind sie bereits intensiv für den spezifischen Wirkstofftransport untersucht worden.<sup>[183]</sup> Die Molekülklasse der zellpenetrierenden Peptide können die Phospholipidmembran der Zellen, ohne dabei auf rezeptorvermittelten Transportsysteme angewiesen zu sein, überwinden.<sup>[183,184]</sup> Die direkte Verwendung dieser Peptide ist durch deren sofortigen proteolytischen Abbau begrenzt.<sup>[185]</sup> Peptoide sind Oligomere, welche aus Stickstoff substituierten Glycinen aufgebaut sind. Aufgrund ähnlicher, struktureller und funktioneller Eigenschaften gegenüber Peptiden, zählen sie zu den Peptidmimetika. Jedoch erzielen die Peptoide durch die molekulare Veränderung des Rückgrats eine gesteigerte Bioverfügbarkeit.<sup>[184,186]</sup> In Abbildung 62 ist deren struktureller, molekularer Aufbau dargestellt. Durch ihren modularen Aufbau und einen repetitiven Syntheseprozess können große Molekülbibliotheken aufgebaut werden, welche beispielsweise auf Organspezifität, Toxizität, und Biokompatibilität untersucht werden können.<sup>[187]</sup> Dr. Ilona Wehl (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT), hat in ihrer Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Ute Schepers solche Peptoidbibliotheken aufgebaut und untersucht. Dabei wurden auch leberspezifische und Leberkarzinom-toxische Peptoide identifiziert.<sup>[188]</sup> Im folgenden Abschnitt werden drei dieser Peptoide (Tabelle 3) umfangreich auf deren Leberspezifität erstmals auf primären humanen Leberzellen und im etablierten Lebermodell im vasQchip von Kapitel 3.3.2.1 analysiert.

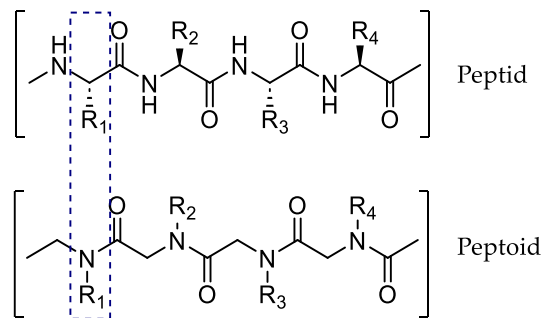
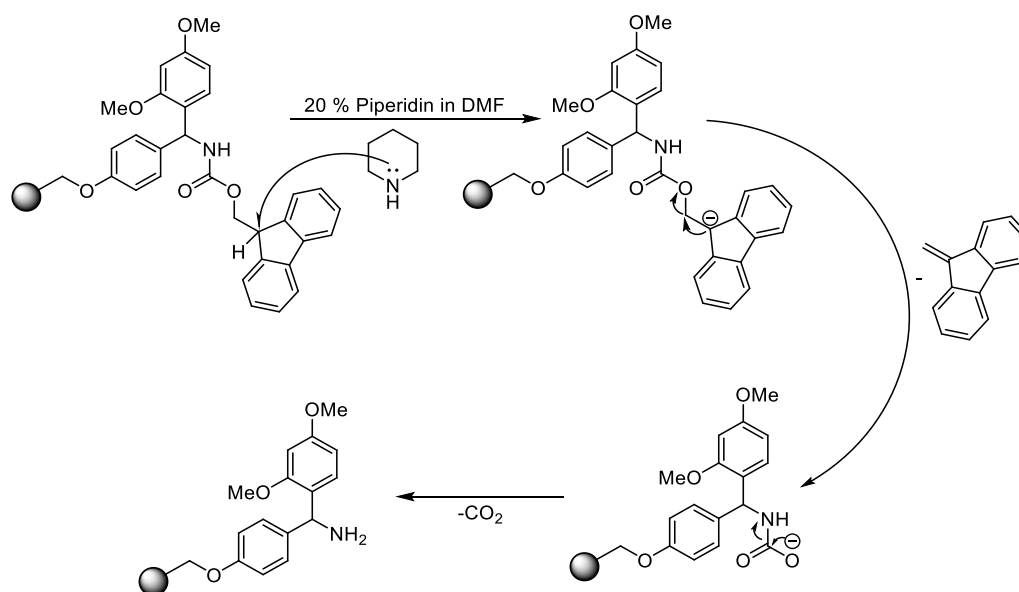


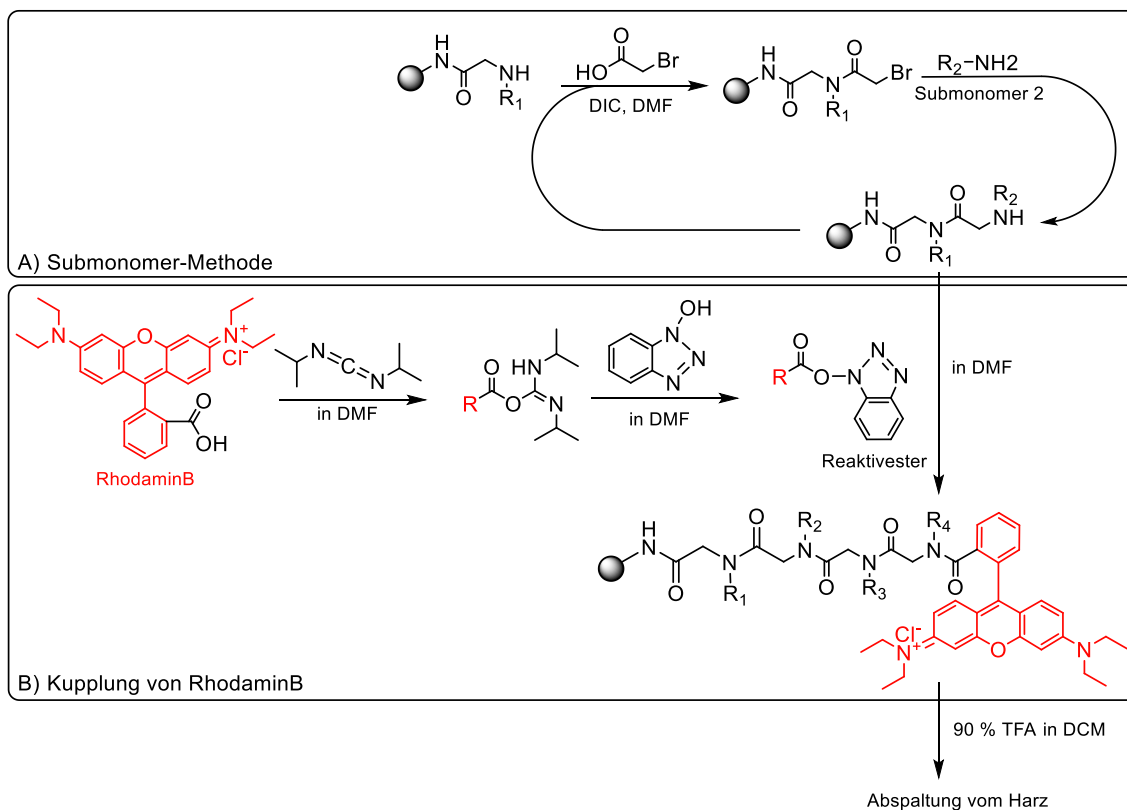
Abbildung 62: Schematischer Vergleich von Peptid und Peptoid. Eine Dislokalisierung der Seitenketten am  $\alpha$ -Kohlenstoff des Peptids auf den Stickstoff generiert ein sogenanntes Peptoid.

### 3.4.2.1 Peptoidsynthese

Peptide werden ähnlich den Peptiden über die Festphasensynthese nach Merrifield synthetisiert.<sup>[189]</sup> Diese Methode ermöglicht eine definierte Konjugation von Seitengruppen auf einem entstehenden Peptidrückgrat. Die Verwendung einer festen Phase für die Synthese erhöht die Reinheit und Ausbeute des Produktes.<sup>[189]</sup> Zuckermann *et al.* hat 1992 diese Festphasensynthese mit der Submonomer-Methode für die Synthese von Peptoiden weiterentwickelt, welche im folgenden Abschnitt beschrieben und angewendet wird.<sup>[190]</sup> Die Festphase, die in dieser Arbeit verwendet wurde, bestand aus Polystyrol das mit einem Rink-Amid-Linker funktionalisiert wurde. Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) ist eine Schutzgruppe, welche das Amid am Harz schützt und durch 20 % Piperidin in Dimethylformamid (DMF), einer schwachen Base, abgespalten werden kann. Der Entschützungsmechanismus ist in Schema 2 abgebildet. Der nächste Schritt ist die Acylierung der endständigen Aminogruppe am Harz durch Bromessigsäure mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in DMF. Durch eine nukleophile  $S_N2$ -Substitution des Broms mit dem primären Amin des neuen Monomers wird das Peptoid um eine Seitengruppe verlängert.



Schema 2: Fmoc-Entschützung des Rink Amid Linkers an der Harz Festphase durch 20 %Piperidin.



Schema 3: Peptoid-Synthese und deren Markierung mit dem Fluorophor RhodaminB.  
 A) Peptoid-Synthese an der Festphase nach der Submonomer-Methode von Zuckermann *et al.*<sup>[190]</sup>  
 B) Kupplung von RhodaminB an den *N*-Terminus des Peptoids.

Tabelle 2: Überblick der verwendeten Submonomere, deren Abkürzung und vollständigen Struktur.

Name	Abkürzung	Struktur
1,4-Diaminobutan	Nlys	<chem>NCCCCN</chem>
Propargylamin	Nprg	<chem>NCC#C</chem>
Benzylamin	Nphe	<chem>NCC1=CC=CC=C1</chem>
4-Chlorbenzylamin	Npcb	<chem>NCC1=CC=C(Cl)C=C1</chem>

Wird dieser Vorgang von Acylierung und Kupplung eines neuen Monomers wiederholt, kann das Peptoid beliebig verlängert werden. Ist die finale Länge erreicht, erfolgt noch eine mögliche Kupplung eines Fluorophors an das Peptoid und eine anschließenden Abspaltung mit 95 % Trifluoressigsäure (TFA) (Schema 3).<sup>[190]</sup> Die variablen Seitenketten der Submonomere werden in der dargestellten Reaktionsgleichung in Schema 3 mit „R“ markiert. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die eingesetzten Submonomere, welche die Seitenketten, und somit „R“ im Peptoid definieren. Die Peptoide P114, P171 und P216, mit der in Tabelle 3 präsentierten Sequenz, wurden von Dr. Ilona Wehl definiert und bereits untersucht.<sup>[188]</sup> Für deren spezifischen Applikation in primären Leberzellen zur Untersuchung einer möglichen Lebertoxizität wurden die Peptoide im Rahmen dieser Arbeit nach der in Schema 2 und Schema 3 präsentierten Synthese hergestellt und durch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) verifiziert (siehe Anhang).

Tabelle 3: Überblick der in dieser Arbeit verwendeten Peptoidsequenzen mit einer möglichen Leberspezifität.<sup>[188]</sup>

Peptoid	Submonomer 1	Submonomer 2	Submonomer 3	Submonomer 4	Fluorophor
P114	Npcb	Nphe	Nprg	Npcb	RhodB
P216	Nphe	Npcb	Npcb	Nphe	
P171	Nlys	Nlys	Nlys	Nlys	

### 3.4.2.2 Toxizitätsanalyse von Peptoiden auf Leberzellen

Die Verwendung von Peptiden als Zytostatika für die Behandlung von Krebs verspricht ein enormes Potential.<sup>[191]</sup> Schneider *et al.* hat dies schon bewiesen, indem sie Peptoide entwickelten, welche spezifisch in Signalwege eingreifen die in bestimmten Krebsformen überstimuliert sind.<sup>[192]</sup> Durch den strukturell ähnlichen Aufbau von Peptoiden gegenüber Peptiden ist es naheliegend, dass auch Peptoide solche Eigenschaften aufweisen könnten. Bei automatisierten Screenings der oben beschriebenen kombinatorischen Peptoidbibliotheken auf ihre organ- und organellspezifischen Eigenschaften konnten auch zytotoxische Peptoide identifiziert werden, die sich durchaus auch als antitumorspezifische Wirkstoffe eignen<sup>[188]</sup>. Um mögliche toxische Eigenschaften der Peptoide P114, P171 und P216 (Tabelle 3) bezüglich primärer und kanzerogener Leberzellen zu ermitteln wurde die Viabilität von Leberzellen in den oben aufgeführten Lebermodellen untersucht. Dazu wurden in einem ersten Schritt 2D-Kulturen von Hepatozyten und LSEC mit dem jeweiligen Peptoid in einem Konzentrationsspektrum von 5  $\mu\text{M}$ -40  $\mu\text{M}$  über einen Zeitraum von 2 h, 24 h, 48 h und 72 h behandelt. Getestet wurden die Substanzen in einer 96-Well-Platte auf  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/ $\text{cm}^2$ ,  $1 \cdot 10^4$  HepG2/ $\text{cm}^2$  und  $1 \cdot 10^4$  LSEC/ $\text{cm}^2$ . In den Abbildung 63, Abbildung 64 und Abbildung 65 ist die Viabilität der unterschiedlichen Zelltypen in Abhängigkeit zur Peptoid-Konzentration, sowie ihre molekulare Struktur aufgetragen. Hierbei zeigt das hydrophile Peptoid P171 (Abbildung 63 A-C) bei den untersuchten Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  keine signifikante toxische Wirkung gegenüber HepG2 und LSEC.

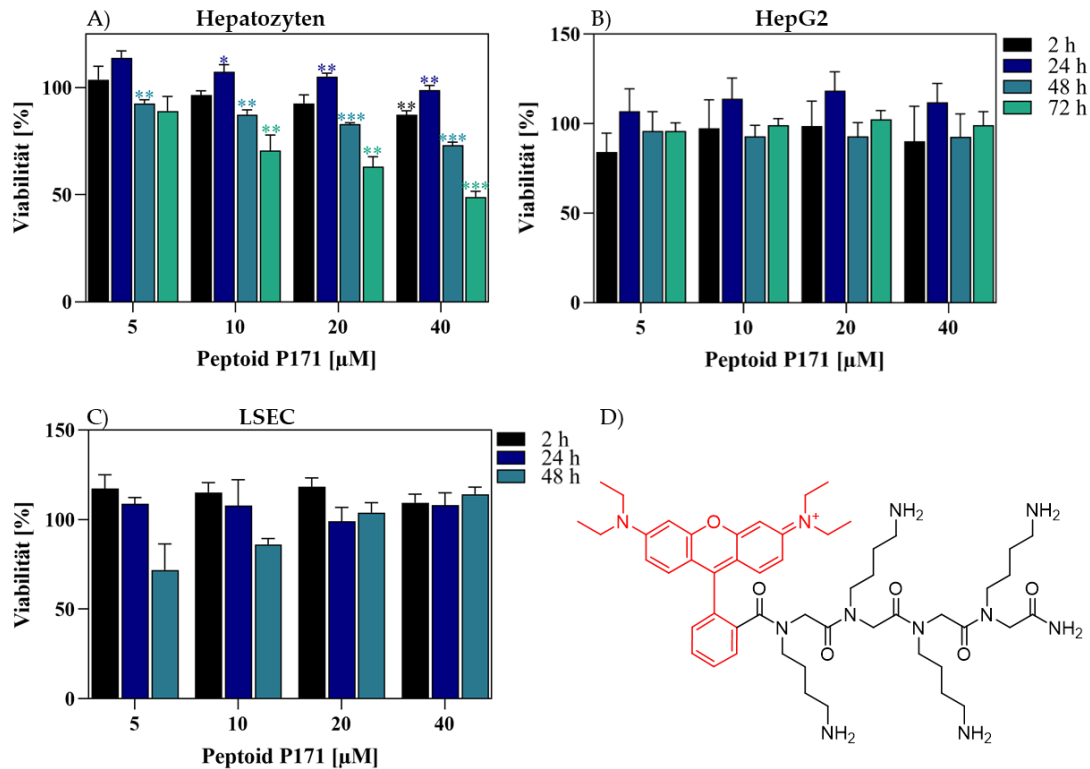


Abbildung 63: Viabilitätstest von P171 auf unterschiedlichen Leberzellen. A) Auf Kollagen I wurden  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> in einer 96-Well-Platte für 3 Tage kultiviert und anschließend mit 5 µM, 10 µM, 20 µM und 40 µM des Peptoids P171 behandelt (D). Dabei wurde ein Behandlungszeitraum von 2 h, 24 h, 48 h und 72 h gewählt. Für die HepG2 in B) wurde die Behandlung gleich durchgeführt, es wurden lediglich  $1 \cdot 10^4$  HepG2/cm<sup>2</sup> und keine Kollagen I-Beschichtung verwendet. C)  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> wurden auf einer Kollagen I-Beschichtung in einer 96-Well-Platte für 3 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Peptoid P171 für 2 h, 24 h und 48 h. Die Viabilität der Zellen wurde durch ein *MTT-Assay* quantifiziert und auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle auf 100 % normiert. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und wurden mithilfe des Student's t-Test ermittelt

In den Hepatozyten jedoch konnte ein toxischer Effekt durch P171 nachgewiesen werden. Sie weisen bei einer Inkubationszeit von 72 h einen  $IC_{50}$ -Wert von 36,6 µM auf (Abbildung 63 A). Die Toxizität von P171 wurde von Dr. Ilona Wehl in ihrer Arbeit nicht untersucht. Ihre Untersuchungen bezogen sich auf die spezifische Lokalisation von P171. Sie konnte in Zebrafischembryonen nachweisen, dass das mit Fluorescein konjugierte P171 spezifisch in der Leber akkumuliert.<sup>[188]</sup> Im Hinblick auf die Verwendung der Peptide als Zytostatika gegenüber Tumorzellen, ist eine erhöhte Toxizität bei der Krebszelllinie HepG2 wünschenswert. P171 zeigte hier jedoch im untersuchten Dosisfenster  $< 40$  µM jedoch keine zytostatische Aktivität gegenüber HepG2 Zellen. P171 eignet sich jedoch in dieser Dosierung als leberspezifischer Transporter, da es wie hier bewiesen, keine Auswirkung auf HepG2 und kaum auf LSEC ausübt. Die genaue Zelllokalisierung wird im folgenden Kapitel 3.4.2.3 besprochen. In Abbildung 64 A)-D) ist die Viabilität von Hepatozyten, HepG2 und LSEC in Abhängigkeit zu einer Behandlung mit dem Peptoid P114 abgebildet. Die Erhöhung der Behandlungskonzentration und Behandlungsdauer verändert die Viabilität der Hepatozyten und LSEC nicht signifikant (Abbildung 64 Graph A) und C).

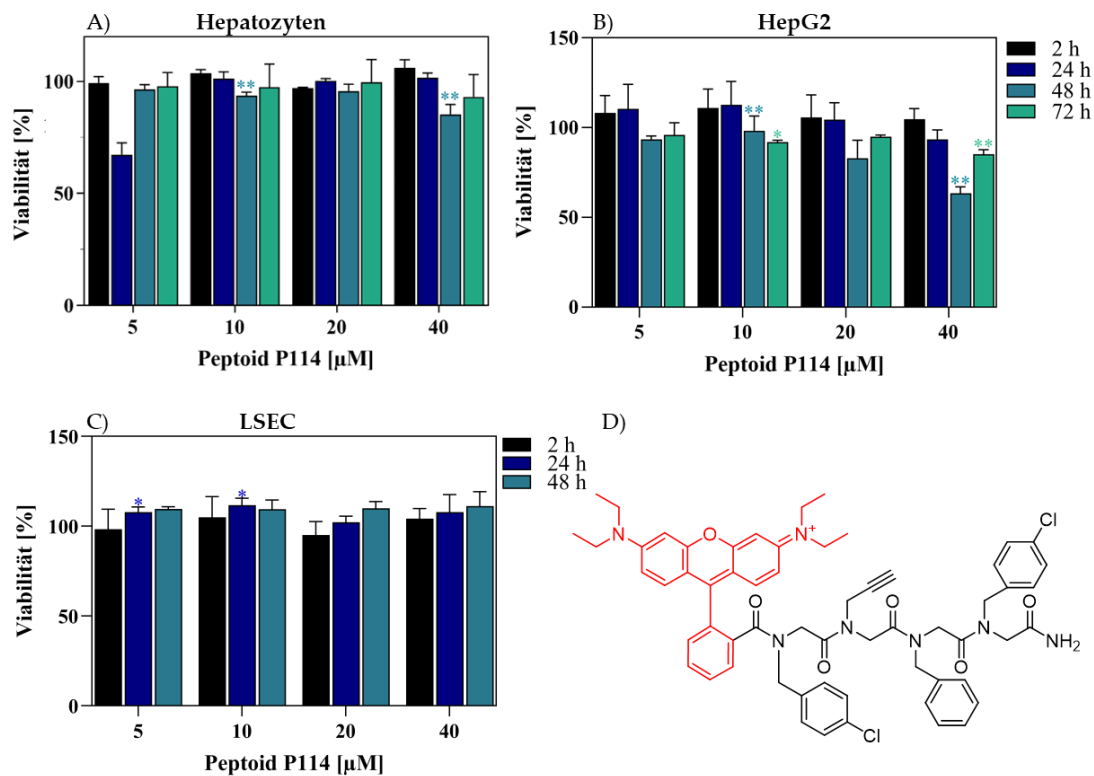


Abbildung 64: Viabilitätstest von Hepatozyten, LSEC und HepG2 nach Behandlung mit dem Peptoid P114. Alle Zelltypen wurden wie folgt gleich mit P114 behandelt. Nach dem Aussäen der Zellen erfolgte eine 3-tägige Kultivierungszeit woraufhin die Zellen in ihrer 96-Well-Platte mit 5 µM, 10 µM, 20 µM und 40 µM P114 für entweder 2 h, 24 h, 48 h oder 72 h behandelt wurden. Die metabolische Aktivität konnte kolorimetrisch durch den *MTT-Assay* quantifiziert werden. Für A) wurden  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> eingesetzt, in B) wurden  $1 \cdot 10^4$  HepG2/cm<sup>2</sup> verwendet und in C) wurden  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die jeweiligen unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % normiert. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\* < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen und wurden mithilfe des Student's t-Test. In D) ist der molekulare Aufbau von P114 zu sehen.

Die Werte der Viabilität liegen im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Wie in Abbildung 64 B) dargestellt, verringert sich die Viabilität der HepG2 mit steigender Konzentration und Inkubationsdauer von P114. P114 wurde von Dr. Ilona Wehl auf dessen Toxizität analysiert. Sie konnte für P114 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 10 µM für HepG2 und einen von 18 µM für humane Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) ermitteln.<sup>[188]</sup> Die abweichende Toxizität gegenüber Krebszellen und primären Zellen kann hier ansatzweise auch nachgewiesen werden. Anhand des Viabilitätstest in Abbildung 64 werden LSEC und Hepatozyten weniger von P114 in ihrer Viabilität beeinträchtigt als die HepG2. Allerdings ist der Unterschied in diesem Fall nicht ausreichend aussagekräftig. Daher sollten weitere Analysen durchgeführt werden, um diese Aussage eindeutig bestätigen zu können. Aufgrund dessen wurde von einer Anwendung von P114 im Lebermodell des vasQchips abgesehen. Die Auswirkung von P216 auf die Viabilität von LSEC, HepG2 und Hepatozyten ist in Abbildung 65 dargestellt. Die Viabilität, welche durch den *MTT-Assay* bestimmt wurde, ist in Abhängigkeit der P216-Konzentration und dessen Behandlungsdauer untersucht worden.

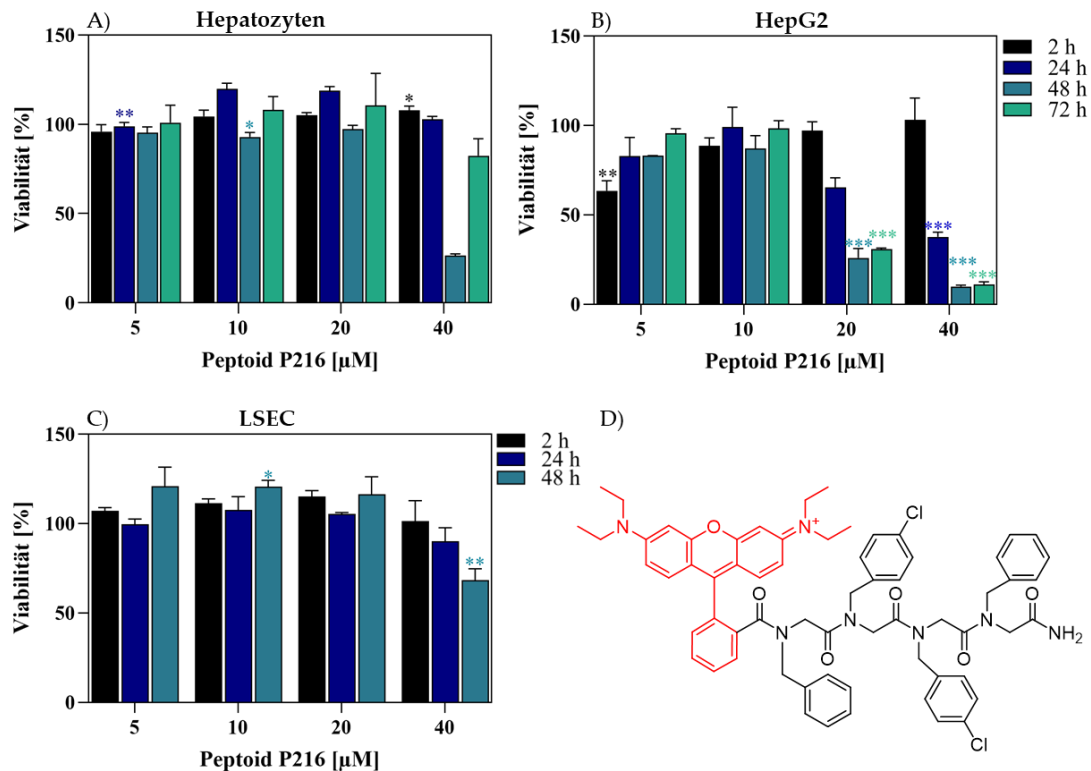


Abbildung 65: Viabilitätstest von Peptoid P216 auf unterschiedlichen Leberzellen. Alle Zelltypen wurden mit P216 behandelt. Nach dem Aussäen der Zellen erfolgte eine 3-tägige Kultivierung, woraufhin die Zellen in ihrer 96-Well-Platte mit 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  P114 für entweder 2 h, 24 h, 48 h oder 72 h behandelt wurden. Die metabolische Aktivität wurde kolorimetrisch durch den *MTT-Assay* quantifiziert. Für A) wurden  $2 \cdot 10^4$  Hepatozyten/ $\text{cm}^2$  eingesetzt, in B) wurden  $1 \cdot 10^4$  HepG2/ $\text{cm}^2$  verwendet und in C) wurden  $1 \cdot 10^4$  LSEC/ $\text{cm}^2$  ausgesät. Die jeweiligen unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % normiert. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgen aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und wurden mithilfe des Student-t-Test ermittelt. In D) ist der molekulare Aufbau von P114 zu sehen.

In Graph A) ist die Viabilität der Hepatozyten nicht signifikant durch die Zugabe von P216 beeinflusst, sie liegt konstant bei 100 %. Hingegen ist bei den LSEC eine leichte toxische Wirkung in einer P216-Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  und einem Behandlungszeitraum von 72 h zu erkennen. Der linear extrapolierte  $\text{IC}_{50}$  liegt dabei mit 56  $\mu\text{M}$  über der getesteten Konzentration. Die HepG2 reagieren zytotoxisch auf die Behandlung mit P216 (Graph B). Sie weisen schon nach 48 h einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 19,4  $\mu\text{M}$  auf. Dr. Wehl konnte in ihrer Arbeit bei einer Behandlungszeit von 72 h einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 8,5  $\mu\text{M}$  für HepG2 nachweisen. Hingegen wurde in dieser Arbeit nach 72 h lediglich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 22,1  $\mu\text{M}$  durch einen linearen Fit ermittelt. Diese Differenzen können durch eine abweichende experimentelle Durchführung erklärt werden und sollten zukünftig dementsprechend mit höheren Replikationen größer als  $n=3$  wiederholt werden. Das hydrophobe Peptoid könnte sich dennoch potenziell für eine mögliche Verwendung als Anti-Leberkarzinom-Zytostatika eignen. Auf Grund seiner nachgewiesenen starken toxischen Wirkung in HepG2 gegenüber der geringen Wirkung auf primären Leberzellen sollte dieses Potenzial näher untersucht werden. In Kapitel 3.4.2.4 wird Peptoid P216 deswegen in einer statischen Leberkokultur und im fluidischen Lebermodell des vasQchip einer genaueren Analyse unterzogen.

### 3.4.2.3 Zelllokalisierung der Peptide

Die Nachverfolgung der intrazellulären Peptidlokalisierung kann über deren potenziellen Eigenschaften Auskunft geben. So kann eine spezifische Lokalisation deren möglichen Einsatz als Transporter-Vehikel für bestimmte Zellregionen bedeuten.<sup>[193]</sup> Es wird dabei ein besonderer Fokus auf die Kolokalisation mit den Mitochondrien gelegt. Diese spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion, der Homöostase von Calcium und dem Energiehaushalt der Zelle. Durch diese zentrale Aufgabe wirkt sich eine Fehlfunktion direkt auf die Physiologie und Viabilität der Zelle aus, weswegen Mitochondrien auch in zahlreichen Krankheiten eine Rolle spielen.<sup>[194]</sup> Es konnten bereits spezifische Peptide identifiziert werden, welche eine Akkumulation in Mitochondrien aufweisen und als Wirkstofftransporter Verwendung finden könnten.<sup>[194,195]</sup> Um dieses Potential zu überprüfen und einen Überblick der Zelllokalisierung von Peptoid P114, P171 und P214 zu erhalten, wurde eine Komarkierung der Mitochondrien, Nuclei und Peptide durchgeführt. Untersucht wurde deren Lokalisation in Hepatozyten, LSEC und HepG2 bei einer Peptoid-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  mit einer Behandlungsdauer von 24 h. In Abbildung 66 ist das Ergebnis der Markierung der mit P114, P171 und P216 behandelten Hepatozyten zu sehen. Der Zellkern wurde simultan mit Hoechst33342 markiert. Zu Kolokalisation wurden die Mitochondrien mit *MitoTracker*<sup>TM</sup>*Green* grün visualisiert und markiert und das Peptoid enthält RhodaminB als Fluorophor. Eine Überlagerung der drei emittierten Fluoreszenzen gibt Auskunft über eine Kolokalisation des jeweiligen Peptoids mit den Mitochondrien. In Abbildung 66 A-D ist die unbehandelte Hepatozyten-Kontrolle zu sehen, welche keine Emission im Spektrum von RhodaminB aufweist. Dadurch kann eine Eigenfluoreszenz der Hepatozyten ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenz von P114 (Abbildung 66 E-H) überlagert sich mit der Fluoreszenz des *MitoTrackers*<sup>TM</sup>*Green*, wodurch ihre Lokalisation in den Mitochondrien der Hepatozyten nachgewiesen ist. Bei P216 ist eine Kolokalisation von Peptoid und Mitochondrien, mit gleichzeitigem Vorkommen im Zytosol, in Abbildung 66 L nachweisbar. Hingegen ist P171 eindeutig nicht in den Mitochondrien akkumuliert, sie befinden sich jedoch in definierten vesikulären Kompartimenten in der Zelle. Die perinukleäre Anordnung der vesikulären Strukturen lässt auf eine Akkumulation in Endosomen schließen. Endosomen sind in der endozytotischen Aufnahme von extrazellulären Partikeln involviert, welche anschließend mit Lysosomen fusionieren und zum enzymatischen Abbau der eingeschlossenen Partikel führt.<sup>[196]</sup> Eine Lokalisation von P171 in Endosomen deutet somit auf eine endozytotische Aufnahme hin. Eine Erklärung der Lokalisation und des möglichen Aufnahmewegs in die Zellen liefert die hohe Hydrophilie von P171. Die lipophile Phospholipidmembran von eukaryotischen Zellen verhindert eine passive Diffusion hydrophiler Partikel, wodurch P171 nachweislich keine zellpenetrierenden Eigenschaften aufweist.<sup>[197]</sup> Dr. Wehl konnte in ihrer Dissertation bereits mit HeLa-Zellen nachweisen, dass P171 in Endosomen vorzufinden ist. Die Akkumulation von P171 in Endosomen ist somit nicht Leberzell-spezifisch.<sup>[188]</sup>



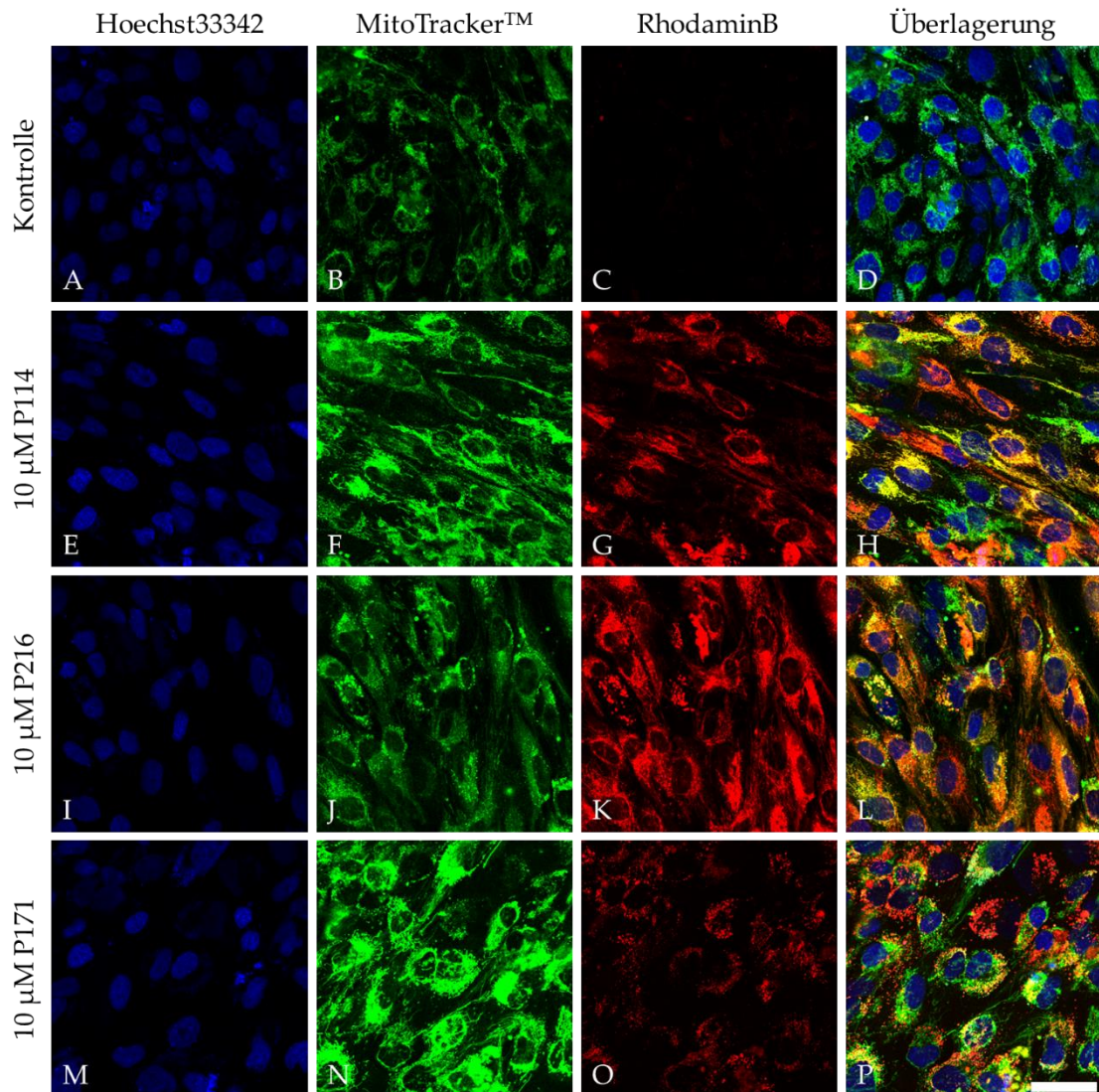


Abbildung 66: Kolokalisationsstudien von Peptiden in Hepatozyten. Es wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> auf einem mit Kollagen t beschichteten  $\mu$ -Slide-8-Well ausgesät. Nach einer 3-tägigen Kultivierung erfolgte die Behandlung der Hepatozyten mit den Peptiden P114, P171 und P216, in einer Konzentration von 10  $\mu$ M für insgesamt 24 h. Für die die Kolokalisation wurden die Zellkerne mit 2  $\mu$ g/ml Hoechst33342 und die Mitochondrien mit 125 nM *MitoTracker™-Green* markiert. Intrazelluläre Akkumulation der Peptide wurde durch die Fluoreszenz des konjugierten RhodaminB verfolgt. Die Lebendfärbung der Hepatozyten wurde mithilfe der Konfokalmikroskopie mit STELLARIS 5 von Leica durchgeführt.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 465$  nm), Grün: 125 nM *MitoTracker™-Green* ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 519$  nm), Rot: RhodaminB/Peptoid ( $\lambda_{\text{ex}} = 561$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 593$ -696 nm), Maßstab = 50  $\mu$ m

In Abbildung 67 wurde die Lokalisation von P114, P171 und P216 in HepG2 betrachtet. Es wurde wie zuvor beschreiben eine Kofärbung von Nukleus, Mitochondrien und Peptoid durchgeführt. Deren Überlagerungen ist in Abbildung D, H, L und P zu sehen und geben Aufschluss über die Kolokalisation der Peptide mit den Mitochondrien. Die Lokalisation der Peptide unterscheidet sich deutlich zwischen der unbehandelten Kontrolle der HepG2 (Abbildung 67 A-D) und der behandelten Zellen (Abbildung 67 E-P). Verglichen mit der Behandlung von Hepatozyten mit P114 in Abbildung 66, ist in HepG2 eine Lokalisation in den Mitochondrien nachweisbar.

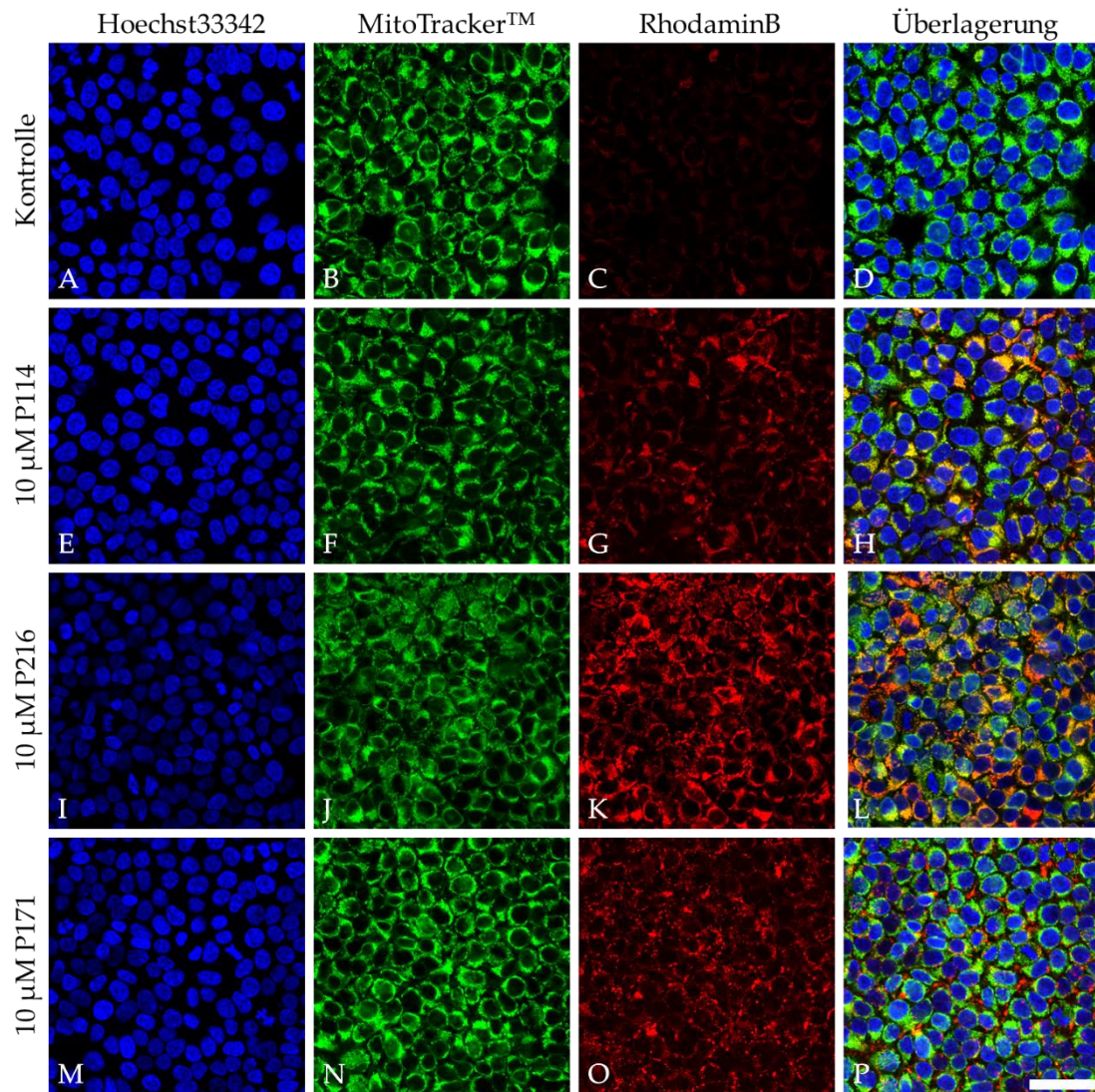


Abbildung 67: Kolokalisationsstudien von Peptoiden in HepG2-Zellen.  $1 \cdot 10^4$  HepG2/cm<sup>2</sup> wurden für 3 Tage in einem  $\mu$ -Slide-8-Well kultiviert. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Behandlung durch 10  $\mu$ M Peptoid (P114, P171 und P216), parallel dazu wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Markierung der DNA und der Mitochondrien wurden durch 2  $\mu$ g/ml Hoechst33342 und 125 nM *MitoTracker™-Green* durchgeführt. Intrazelluläre Akkumulation der Peptide wurde durch die Fluoreszenz des konjugierten RhodaminB verfolgt. Die Lebendfärbung der Hepatozyten wurde mithilfe des Konfokalmikroskops STELLARIS 5 von Leica durchgeführt.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 465$  nm), Grün: 125 nM *MitoTracker™-Green* ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 519$  nm), Rot: RhodaminB/Peptoid ( $\lambda_{\text{ex}} = 561$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 593$ -696 nm), Maßstab = 50  $\mu$ m

Der Farbumschlag durch die Überlagerung der Peptoid-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz des *MitoTrackers™* in Abbildung 67 H) lässt auf eine mitochondriale Kolokalisation von P114 schließen. Hingegen ist die Lokalisation von P216 nicht eindeutig identifizierbar, was auf eine zusätzliche Lokalisation im Zytosol hindeuten könnte. Dahingegen ist die Lokalisation von P171, wie schon zuvor in den Hepatozyten, eindeutig in den Endosomen zuzuordnen. Die Kolokalisation und die Toxizität von 10  $\mu$ M P171, 40  $\mu$ M P216 und 10  $\mu$ M P114 in LSEC mit den Mitochondrien und Zellkernen ist in Abbildung 68 dargestellt. Auch hier ist das Signal der Emission von RhodaminB eindeutig auf eine Peptoidaufnahme zurückzuführen, da die unbehandelte Kontrolle in Abbildung 68 A-D keine Eigenfluoreszenz aufweist. P114 und P216 weisen

in LSEC eine Kolokalisation mit den Mitochondrien auf, wie den Abbildung 68 E-L dargestellt ist. Auch Dr. Wehl konnte die mitochondriale Kolokalisation von P216 schon nachweisen.<sup>[188]</sup> P171 ist ebenfalls wie in Abbildung 68 M-P, ausschließlich in den Endosomen vorzufinden. Die intrazelluläre Lokalisation von P114, P171 und P216 war zwischen den gewählten Leberzelltypen gleich und unterschied sich lediglich in deren Sensitivität. P114 und P216 akkumulieren hauptsächlich in den Mitochondrien, während P171 ausschließlich in Endosomen vorkommt, was bereits von Dr. Wehl in nichtleberspezifischen Zellen nachgewiesen wurde.<sup>[188]</sup>

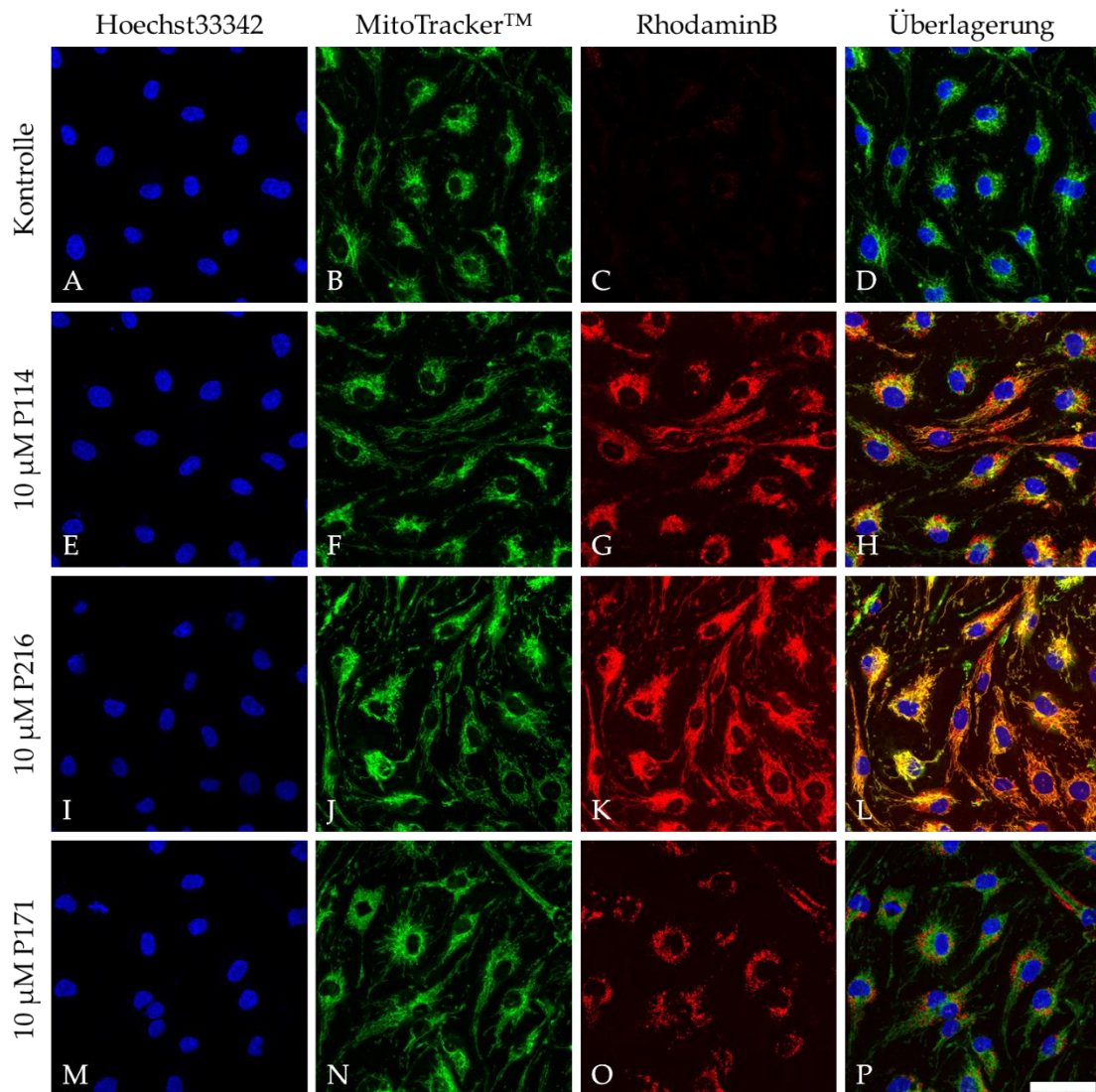


Abbildung 68: Kolokalisation von Peptoiden in LSEC. Es wurden  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> in ein  $\mu$ -Slide-8-Well gegeben und für 3 Tage kultiviert. Die Behandlung der unterschiedlichen Peptide (P114, P171 und P216) erfolgte in einer Konzentration von 10  $\mu$ M für 24 h. Anschließend wurde deren Zelllokalisierung durch die Fluoreszenz des konjugierten RhodaminB nachverfolgt. Zur Orientierung in der Zelle wurde zudem die DNA im Zellkern durch 2  $\mu$ g/ml Hoechst33342 und die Mitochondrien mit 125 nM *MitoTracker™-Green* markiert. Die Lebendfärbung der LSEC wurde mithilfe des Konfokalmikroskops STELLARIS 5 von Leica durchgeführt.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 465$  nm), Grün: 125 nM *MitoTracker™-Green* ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 519$  nm), Rot: RhodaminB/Peptoid ( $\lambda_{\text{ex}} = 561$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 593$ -696 nm), Maßstab = 50  $\mu$ m

### 3.4.2.4 Wirkungsanalyse von Peptoid P216 im Lebersinusoid

In Kapitel 3.4.2.2 wurde bereits eine Toxizitätsanalyse von verschiedenen Peptoiden durchgeführt. Dabei zeigte P216 eine verstärkte toxische Wirkung gegenüber HepG2 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $19,4 \mu\text{M}$  nach 48 h. Anhand dieser Erkenntnisse sollte nun eine möglichst systemische Applikation von P216 simuliert werden. Zunächst wurde im statischen Transwell®-System das Lebersinusoid nach Kapitel 3.3.2.1 rekonstruiert und dessen Barriere und Viabilität im Zusammenhang mit einer P216-Behandlung untersucht. Diesen Analysen folgte eine Anwendung im fluidischen Lebermodell im vasQchip.

#### Peptoidanalyse im statischen Lebermodell im Transwell®-System

Kommt es zu einer intravenösen oder oralen Aufnahme des Arzneimittels, wird es in der Leber durch das Sinusoid entweder aufgenommen oder in die Blutzirkulation weitergeleitet.<sup>[198]</sup> Um dieses Verhalten überprüfen und analysieren zu können wurde in einem Transwell®-System das Sinusoid aus LSEC und Hepatozyten wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben rekonstruiert. Ein basolateraler Leberzelltumor wurde durch die Verwendung einer HepG2-Monolayers im darunterliegenden 24-Well imitiert. In Abbildung 69 wird exemplarisch der Aufbau zur Veranschaulichung des Experimentes dargestellt.

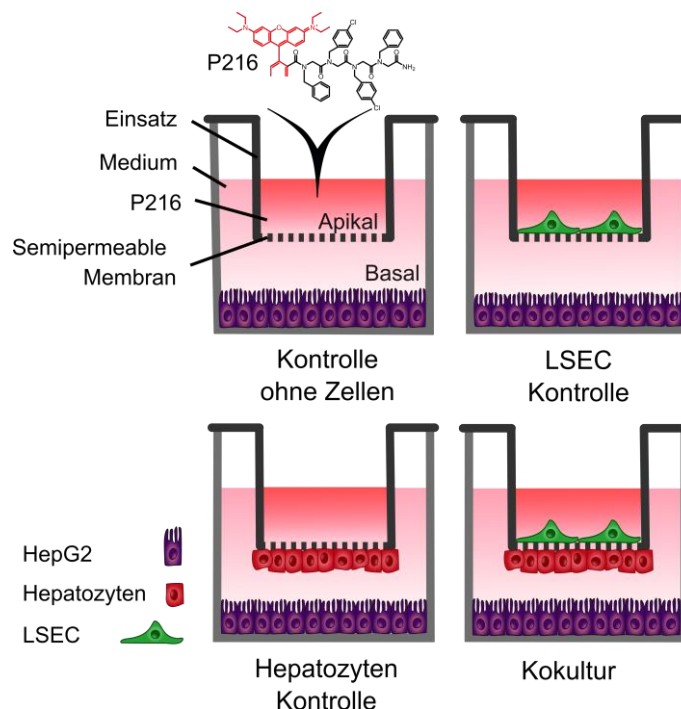


Abbildung 69: Skizze der Leberzellkrebs-Simulation im Transwell®-System. Durch eine permeable Membran auf der Unterseite des Transwell®-Einsatzes entstehen zwei Kompartimente, welche jedoch einen Stoffaustausch zulassen. Das Sinusoid der Leber kann so im statischen durch die Stützstruktur des Transwells® aus einer apikalen LSEC-Schicht und einer basalen Schicht an Hepatozyten aufgebaut werden. Die HepG2 sind auf dem Boden der 24-Well-Platte angesiedelt und können so über die etablierte Barriere aus LSEC und Hepatozyten mit dem Peptoid P216 behandelt werden. Die Kontrollen ohne Zellen, nur LSEC oder Hepatozyten im Transwell® dienen als Vergleich zur vollständigen Barriere aus einer Kokultur von LSEC und Hepatozyten am Transwell®-Einsatz.

Die Behandlung des Systems durch P216 erfolgte ausschließlich apikal in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  und einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$ , im basalen Kompartiment wurde 1 ml Medium verwendet. Nach einer Inkubation von 48 h und einer anschließenden zweiten Behandlung nach 24 h wurde die Viabilität der HepG2 mithilfe eines *MTT-Assays* bestimmt. In Abbildung 70 ist dessen Ergebnis abgebildet, wobei die Viabilität zur unbehandelten Kontrolle auf 100 % normiert wurde. Es wurde die Viabilität in Abhängigkeit zu den unterschiedlich aufgebauten Leberbarrieren, welche in Abbildung 69 dargestellt sind, bestimmt. Wird nun die Viabilität der HepG2 in Abbildung 70 genauer betrachtet ist zu erkennen, dass P216 die Viabilität der HepG2 in keinem Versuchsaufbau reduziert. Jedoch verändert sich die Viabilität in Abhängigkeit der unterschiedlichen Barrieren nicht. Auch die Anordnung ohne Zellen im Transwell®-Einsatz und somit ohne biologische Barriere zeigt keine Reduktion der Viabilität der HepG2 Zellen. Die Viabilität steigt sogar mit zunehmender Barriere in Anwesenheit von LSEC und Hepatozyten oder einer Kokultur aus beiden Zelltypen. Dieses unerwartete positive Verhalten der HepG2 könnte unter anderem durch eine zu hohe Verdünnung des Peptoids erklärt werden. In Kapitel 3.4.2.2 wurde bereits nachgewiesen, dass für HepG2 der  $\text{IC}_{50}$ -Wert bei 19,4  $\mu\text{M}$  liegt. Dementsprechend sollte in einem solchen Versuchsaufbau sichergestellt werden, dass diese Konzentration überall vorhanden ist, um eine toxische Wirkung nachweisen zu können. In Kapitel 3.3.1.3 wurde bereits nachgewiesen, dass die Barriere der Kokultur von Hepatozyten und LSEC eine geringere Dichte als die Monozellschicht der Hepatozyten aufweist. Auch könnte das Peptoid von den Hepatozyten und LSEC in der Barriere aufgenommen werden wodurch eine geringere Konzentration an P216 bei den HepG2 vorliegen. Diese Vermutung könnte durch eine Analyse der finalen Peptoid-Konzentration in den jeweiligen Ansätzen im basalen Kompartiment verifiziert werden. Der Viabilitätstest der HepG2 nach Behandlung mit P216 und einer Sinusoid-Replikation im Transwell®-System in Abbildung 70 gab keinen eindeutigen Aufschluss über das Verhalten der Barriere während einer P216-Behandlung. Die Integrität und die Dynamik der Zellverbindungen in endothelialen Barrieren kann über den TEER quantitativ analysiert werden.<sup>[130]</sup> Ein möglicher Einfluss von P216 auf das nachgebildete Sinusoid im Transwell® kann durch das in Kapitel 3.1.2.1 vorgestellte TEER-Verfahren verfolgt werden. Dafür wurden die Barriere wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben aufgebaut, jedoch wurde auf die Kokultur in Ansatz 1 verzichtet, da eine Kultivierung der Hepatozyten im 24-Well keine signifikante Auswirkung auf die Barriere gezeigt hatte. Somit wurde eine direkte Kokultur aus LSEC auf der apikalen Seite und Hepatozyten auf der basalen Seite aufgebaut. Als Kontrolle dienten die jeweiligen Transwells® mit den einzelnen Zellschichten der beiden Zelltypen. Die P216-Behandlung erfolgte auf der apikalen Seite in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  über einen Zeitraum von 48 h. In Abbildung 71 ist der TEER in Abhängigkeit des Behandlungszeitraums aufgetragen. Die Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  P216 ist in Graph A) zu sehen. Der TEER der Hepatozyten-Monokultur startet bei 16,1  $\Omega/\text{cm}^2$  und endet bei 16,9  $\Omega/\text{cm}^2$  nach 48 h der Behandlung. Eine stärkere Zunahme des TEER ist bei der Kokultur zu verfolgen, dort steigt der TEER-Wert von 12,4  $\Omega/\text{cm}^2$  auf 19,6  $\Omega/\text{cm}^2$  nach 48 h.

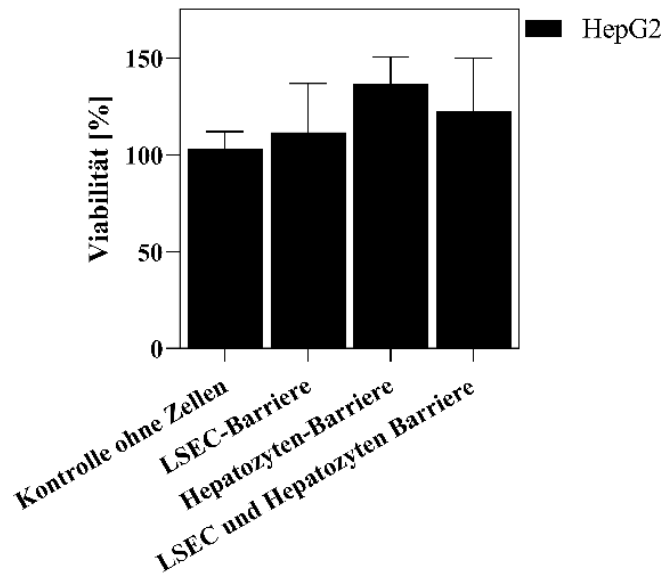


Abbildung 70: Auswirkung einer indirekten P216-Behandlung auf die Viabilität von HepG2. Das Sinusoid der Leber wurde in einem Transwell®-System ansatzweise nachgebildet. Die Oberflächen wurden mit Kollagen I beschichtet und es wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> auf der Unterseite des Transwell®-Einsatzes angesiedelt. Anschließend wurde der Transwell®-Einsatz mit  $5 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> besiedelt und für 3 Tage kultiviert. In der 24-Well-Platte wurden dann  $0,25 \cdot 10^4$  HepG2/cm<sup>2</sup> ausgesät und für einen Tag zusammen kultiviert. Die Behandlung mit 20  $\mu$ M P216 erfolgte auf der apikalen Seite im Transwell®-Einsatz für insgesamt 48 h. Die drei unterschiedlichen Kombinationen von Mono- und Kokultur über den HepG2 wurde entfernt und es wurde ein *MTT-Assay* zur Quantifizierung der HepG2-Viabilität durchgeführt. Die Standardabweichung und Mittelwerte erfolgten aus n=3. Als Nullwert wurde ein Kollagen I beschichtetes Transwell® verwendet. Transwell® 0,4  $\mu$ m Poren, Einsatz für 24-Well-Platte.

Lediglich der TEER der LSEC-Monoschicht ist nach 48h ähnlich wie vor der Behandlung. In Abbildung 71 Graph B) ist das Ergebnis der unbehandelten Kontrollen der drei verschiedenen Barrieremodellen dargestellt. Die LSEC-Kontrolle verringert ihren TEER um das 1,7-fache im Laufe der analysierten 48 h. Hingegen steigert sich in der Hepatozyten-Kontrolle der TEER-Wert von  $14,7 \Omega/\text{cm}^2$  auf  $16 \Omega/\text{cm}^2$ . Bei der direkten Kokultur wurde eine Erhöhung des TEER-Werts von  $16,8 \Omega/\text{cm}^2$  auf  $19,9 \Omega/\text{cm}^2$  ermittelt. Wird die unbehandelte Kontrollen mit der Behandlung durch P216 verglichen, sind ähnliche Trends in der Barriereintegrität zu vermerken. So nimmt sie bei der LSEC-Monokultur in beiden Fällen ab, die Kokultur erzielt die größte Steigerung der TEER-Werte und der TEER-Wert der Hepatozyten-Monoschicht nimmt lediglich leicht zu. Wird der allgemeine Trend beider Ansätze verglichen, ist keine konkrete Aussage über den Einfluss von P216 auf die Barriere zu erkennen. TEER-Messungen wurden im Zusammenhang mit Peptoidanalysen bereits erfolgreich eingesetzt. Zhao *et al.* konnte in einer statischen Replikation der Blut-Hirn-Schranke im Transwell® die Barriereintegrität während einer Peptoidbehandlung verfolgen. Durch Massenspektrometrie konnte dabei die Präsenz des Peptoids auf der basolateralen Seite bestätigt werden.<sup>[199]</sup> Somit wäre die Analyse der Peptoidkonzentration ein zukünftiges Ziel im aufgebauten Lebermodell des statischen Transwells®. Die mögliche Verwendung von P216 als Zytostatika kann weiterhin nachgegangen werden, da ein toxischer Einfluss auf die Barriere des gesunden Sinusoids nicht nachgewiesen werden konnte. Der nächste Schritt in der Untersuchung

von P216 ist die Erweiterung des Modells durch Verwendung eines mikrofluidischen Flusses, welcher die P216-Applikation im Lebersystem noch natürlicher simuliert. Durch die Anwendung des vasQchips wird dies im folgenden Abschnitt thematisiert.

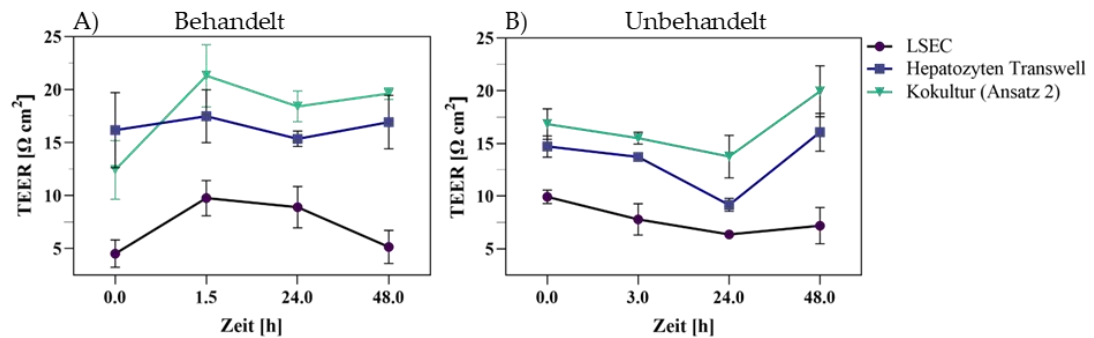


Abbildung 71: Zeitaufgelöste Analyse der Barriere aus LSEC und Hepatozyten unter dem Einfluss des Peptoids P216. In einem Transwell® mit 0,4 µm Poren wurde für die Besiedlung der Unterseite des Einsatzes  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> verwendet. Auf der apikalen Seite wurden  $1,56 \cdot 10^4$  LSEC ausgesät, dabei wurden alle Oberflächen zuvor mit Kollagen I beschichtet. Nach einer 3-tägigen Ruhephase wurde die P216-Behandlung mit einer Konzentration von 20 µM in einem Volumen von 200 µl auf der apikalen Seite gestartet und über Zeitraum von 48 h verfolgt (B). Die Barriereintegrität wurde dabei über den Transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) bestimmt. Parallel dazu wurde eine unbehandelte Kontrolle mit den gleichen Zellkombinationen als Kontrolle mitverfolgt (A). Die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus n=3. Als Nullwert wurde ein Kollagen I beschichtetes Transwell® verwendet. Transwell®, 0,4 µm Poren, Einsatz für 24-Well-Platte.

### Peptoidanalyse im fluidischen Lebermodell des vasQchips

Die fluidischen Lebermodelle zeigen durch die morphologische Veränderung des Sinusoids eine unterschiedliche Diffusionskapazität. Durch die Annäherung der Modelle an *in-vivo* Bedingungen könnten Tierversuche ersetzt werden und bessere Erfolge in der präklinischen Phase erzielt werden.<sup>[60]</sup> Nach erfolgreicher Charakterisierung des Lebermodells im vasQchip sollte nun auch das Peptoid als mögliches Zytostatikum auf seine Akkumulation in dem Lebermodell getestet werden. Dafür wurde zunächst die Viabilität der Zellen im System bestimmt und zugleich das Peptoid im vasQchip durch dessen konjugiertes Fluorophor verfolgt. Das Lebermodell wurde wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben aufgebaut und für 3 Tage unter einem ansteigenden Volumenstrom inkubiert. Parallel dazu wurden nicht-fluidische Lebermodelle im vasQchip präpariert. Die Behandlung mit 20 µM P216 erfolgte für 48 h ausschließlich über den Mikrokanal. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen im Mikrokanal und im umgebenden Kompartiment durch Verwendung des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays* quantifiziert. Zudem erfolgte parallel eine Visualisierung der zellulären Aufnahme des Peptoids über die RhodaminB-Fluoreszenz. Abbildung 72 zeigt das Ergebnis der Viabilitätsanalyse, basierend auf der Quantifizierung der Fluoreszenz als Indikator der ATP-Konzentration in viablen Zellen. Die Viabilität wurde separat in den Zellen im umgebenden Kompartiment und Mikrokanal des vasQchip ermittelt. Dadurch wurde ein quantitativer Vergleich der mit P216 behandelten und deren unbehandelten Kontrollen möglich. In Abbildung 72 Graph A) ist das Ergebnis der statischen Proben dargestellt, wohingegen Abbildung 72 Graph B) die Analyse im fluidischen Modell zeigt. Die Viabilität im umgebenden

Kompartiment variiert kaum durch eine P216 Behandlung, jedoch sind die Zellen im fluidischen vasQchip verglichen mit der statischen unbehandelten Kontrolle um das 1,4-fache viabler. Im Mikrokanal hingegen ist in den fluidischen vasQchips kein Unterschied zwischen der behandelten und unbehandelten Kontrolle zu ermitteln. Im statischen Lebermodell ist die Viabilität der unbehandelten Kontrolle um das 1,2-fache erhöht. Wird die Viabilität der Zellen im Mikrokanal des statisch und fluidisch kultivierten vasQchip verglichen, so ist zu erkennen, dass in Abbildung 72 Graph A) eine 1,1-fach erhöhte Viabilität in der unbehandelten Kontrolle vorliegt. Die verbesserte Viabilität der Zellen in einer fluidischen Kultivierungsform konnte in Kapitel 3.3.2.2 schon durch das Proliferationsverhalten nachgewiesen werden. Auch andere Arbeiten konnten diesen positiven Effekt in mikrofluidischen Lebermodellen nachweisen.<sup>[59,115,180,200]</sup> Durch die verbesserte Nähr- und Sauerstoffversorgung und den zusätzlichen Abtransport von Abbauprodukten durch die laminare Strömung, kann dieses Zellverhalten erklärt werden. Eine toxische Wirkung von P216 auf die Leberzellen im fluidischen vasQchip ist somit nicht signifikant. Lediglich im Mikrokanal des statisch kultivierten vasQchips kommt es zu einer Beeinflussung der Viabilität um 78 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese kann durch die Nachverfolgung von P216 im vasQchip erklärt werden. In Abbildung 73 ist die 3D-Projektion des vasQchips durch eine Markierung der Zellkerne mit Hoechst33342 und der RhodaminB-Fluoreszenz von P216 in den unterschiedlichen Behandlungsstadien gezeigt. Die unbehandelten Kontrollen weisen dabei wie erwartet, keine RhodaminB-Fluoreszenz auf. In den fluidisch und statisch kultivierten und behandelten Lebermodellen im vasQchip ist eine eindeutige Fluoreszenz durch RhodaminB nachzuweisen.

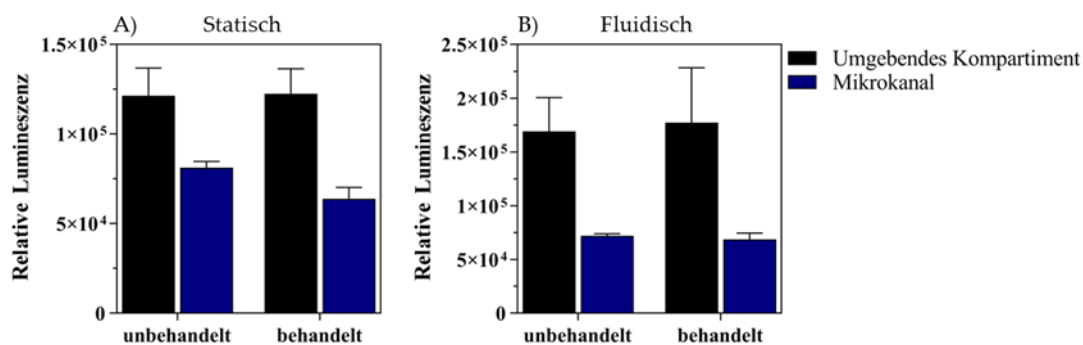


Abbildung 72: Viabilitätsanalyse der Leberzellen im fluidisch und statisch kultivierten vasQchip vor und nach Behandlung mit P216. Die Oberflächen des vasQchips wurden mit einer Kollagen I-Beschichtung versehen bevor die  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten im umgebenden Kompartiment eingebracht wurden. Der vasQchip wurde nach Verschluss aller Öffnungen um  $180^\circ$  gedreht und über Nacht inkubiert. Es folgte anschließend die Besiedelung des Mikrokanals mit  $10 \cdot 10^4$  LSEC. Die Adhäsion der Endothelzellen im gesamten Mikrokanal wurde durch eine 1-stündige Rotation auf dem vasQturn bei 0,25 rpm gewährleistet und anschließend über Nacht statisch inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Hälfte der Proben an die Mikrofluidikpumpe angeschlossen. Der Volumenstrom wurde von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  über 3 Tage hinweg erhöht, wobei die statischen vasQchips parallel dazu kultiviert wurden. Die vollständig etablierte Kokultur wurde dann mit  $20 \mu\text{M}$  P216 für 48 h behandelt und anschließend wurde die Viabilität der Zellen im umgebenden Kompartiment und im Mikrokanal durch den *CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay* quantifiziert. Die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgte aus  $n=3$ .



Die Akkumulation von P216 im statischen vasQchip gegenüber dem fluidisch kultiviertem Modell, kann durch eine erhöhte Transzytose des Peptoids erklärt werden wegen des fehlenden Volumenstroms. Die Diffusion von P216 in die Leberzellen ist durch den mikrofluidischen Fluss möglicherweise unterstützt. Das könnte zu einer erhöhten Ansammlung des P216 in den LSEC führen und somit einer höheren Toxizität. Diese Befunde sind somit im Einklang mit den in Kapitel 3.4.2.2 ermittelten Toxizitätsanalysen. Es wurde für die Behandlung 20  $\mu\text{M}$  P216 eingesetzt, welches weder für LSEC noch für Hepatozyten nach 48 h signifikant toxisch war, lediglich HepG2 wurden unter diesen Bedingungen in ihrer Viabilität beeinträchtigt. Somit entspricht die Viabilitätsanalyse von P216 im Lebermodell in Abbildung 72 den Erwartungen. Diese Untersuchung sollte als Vorversuch dienen, um P216 als mögliches Zytostatikum für HepG2, im vaskularisierten Lebermodell zu analysieren. Für diese Untersuchung würde sich ein Tumormodell mit HepG2 im umgebenden Kompartiment des vasQchips eignen, was im darauffolgenden Kapitel besprochen wird.

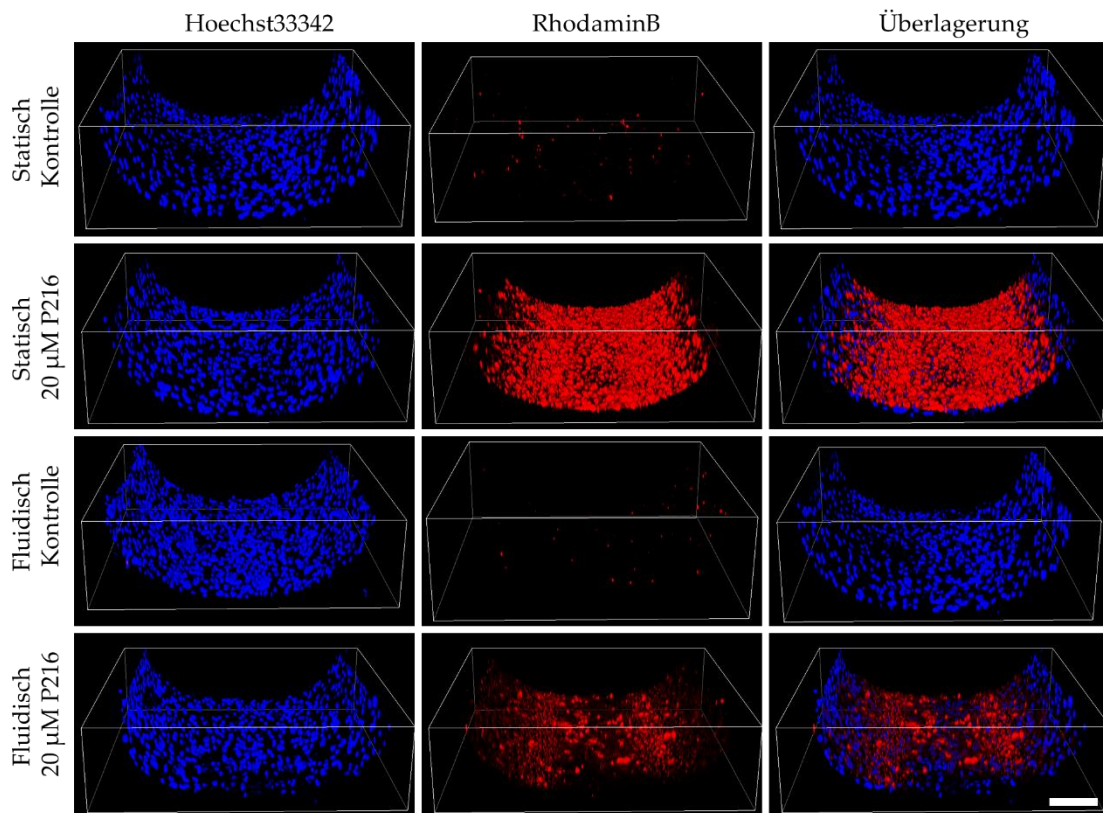


Abbildung 73: Nachverfolgung von P216 im Lebermodell der fluidisch und statisch kultivierten vasQchips. Auf eine Kollagen I-Schicht wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten im umgebenden Kompartiment eingebracht. Der vasQchip wurde um  $180^\circ$  gedreht, über Nacht kultiviert und es folgte die Besiedelung des Mikrokanals mit  $10 \cdot 10^4$  LSEC. Eine Rotation mit 0,25 rpm am vasQturn ermöglichte ein konfluentes Anwachsen über die gesamte Oberfläche des Mikrokanals, welche durch eine weitere Inkubation über Nacht verstärkt wurde. Über drei Tage wurde der Volumenstrom von 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  für die fluidisch kultivierten Proben erhöht. Die statisch kultivierten vasQchips wurden parallel dazu inkubiert. Beide Varianten wurden über den Mikrokanal mit 20  $\mu\text{M}$  P216 für 48 h behandelt. Anschließend folgte eine Markierung der DNA mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst33342 zur Visualisierung der Zellkerne. Mithilfe einer 3D-Projektion mit dem Konfokalmikroskop wurde das RhodaminB (Rot) der Peptide und die Zellkerne im vasQchip aufgenommen.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Rot: RhodaminB/Peptoid ( $\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 593\text{-}696 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, *z-Stack* Parameter: 5  $\mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für 450  $\mu\text{m}$ , Maßstab = 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.3 Vaskularisiertes Lebertumormodell im vasQchip

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass insbesondere humanisierte Lebermodelle als Alternativmodelle zur Testung von Wirkstoffen in 2D-Zellkultur nicht realisierbar sind.<sup>[149,201]</sup> Tuncer *et al.* konnte beispielsweise nachweisen, dass die toxische Wirkung von potenziellen Wirkstoffen in der 2D-Zellkultur und bei 3D-Sphäroiden abweichend ist.<sup>[202]</sup> Im Vergleich zu herkömmlichen 2D-Zellkulturmodellen stellt die Dreidimensionalität in Sphäroiden oder Hydrogelen eine verbesserte Replikation biologischer Bedingungen dar. Es werden daher bereits 3D-Geweberekonstruktionen in Form von HepG2-Sphäroide in Toxizitätsstudien eingesetzt.<sup>[149,201]</sup> Im Hinblick auf Tumormodelle berücksichtigt eine statische Kultivierungsform nicht den Einfluss der mechanischen, fluidischen und biologischen Mikroumgebung. *Organ-on-a-Chip* Systeme können die komplexen Verhältnisse verbessert replizieren und dabei sogar die Dynamik im nativen Organ berücksichtigen.<sup>[203]</sup> Auch das etablierte Lebermodell im vasQchip aus Kapitel 3.3.2.1 soll in diesem Forschungsbereich eingesetzt werden. Damit nach spezifischen Zytostatika für Leberkrebszellen gescreent werden kann, wurde ein Tumormodell mit HepG2-Sphäroiden im umgebenden Kompartiment des vasQchips wie folgt, etabliert. Das Lebermodell wurde wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben aufgebaut und für 3 Tage unter einem steigenden Volumenstrom von 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  kultiviert. Parallel dazu wurden HepG2-Sphäroide auf Agarose-Platten generiert, wie es in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben ist. Dafür wurden  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen auf eine 1,5 %ige Agarose-Beschichtung in ein 96-Well gegeben und für 6 Tage kultiviert. Vor deren Einbringung in den vasQchips wurden sie zur eindeutigen Nachverfolgung mit *CellTracker<sup>TM</sup>Green* markiert. 5-Chloromethylfluorescein-Diacetat (CMFDA) (*CellTracker<sup>TM</sup>Green*) ist ein Molekül das passiv die Zellmembran passieren kann und durch unspezifische Esterasen im Zytosol der Zelle gespalten wird. Das dabei entstandene Fluorescein ist nicht mehr membrangängig und kann durch eine Anregung bei 492 nm fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.<sup>[204]</sup> Nach erfolgter Markierung wurden 4 Sphäroide in das umgebende Kompartiment des vasQchips gegeben und bei einem Volumenstrom im Mikrokanal von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  für weitere 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt und zusätzlich wurden alle Zellen im vasQchip mit *CellTracker<sup>TM</sup>Green* markiert. Abbildung 74 zeigt die 3D-Aufnahme der markierten Zellen im vasQchip. In den Abbildung 74 A-C wurde nur der HepG2-Sphäroid mit *CellTracker<sup>TM</sup>Green* markiert, wohingegen in den Abbildung 74 D-H alle Zellen im vasQchip markiert wurden. Abbildung 74 G und H zeigen die seitliche Ansicht des vasQchips Abbildung 74 H zeigt eine Tiefenfärbung, die eine Veranschaulichung der räumlichen Verteilung der Zellen im vasQchip darstellt. Die Verwendung von *CellTracker<sup>TM</sup>Green* um die HepG2-Sphäroide eindeutig zu markieren, erwies sich als erfolgreich. In Abbildung 74 B sind die markierten Sphäroide (grün) und die Hepatozyten im umgebenden Kompartiment eindeutig zu unterscheiden, wobei die Hepatozyten und LSEC durch die zelltypenspezifische Hoechst33342-Markierung der Zellkerne markiert sind. Die Verwendung von *CellTracker<sup>TM</sup>Green* bietet zudem noch die Möglichkeit das Wachstumsverhalten des Sphäroids über eine längere Zeitspanne nichtinvasiv zu verfolgen.

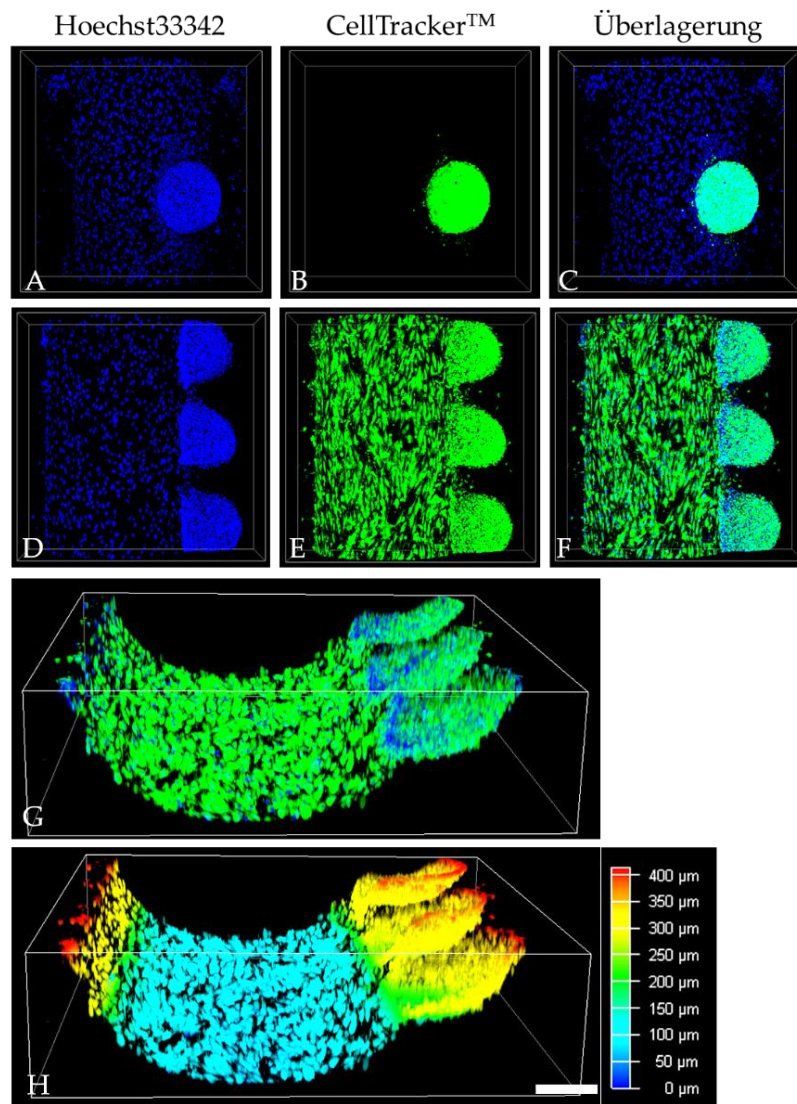


Abbildung 74: Lebertumormodell im fluidischen vasQchip. Das Lebermodell wurde parallel zu der Herstellung von HepG2-Sphäroiden aufgebaut. Dafür wurde der Mikrokanal des vasQchip zunächst mit 0,25 mg/ml Fibronectin beschichtet, parallel dazu wurde im umgebenden Kompartiment 0,25 mg/ml Kollagen I verwendet. Anschließend wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in das umgebende Kompartiment eingebracht und nach Verschluss aller Anschlüsse um  $180^\circ$  gedreht über Nacht kultiviert. Die  $10 \cdot 10^4$  LSECs wurden danach in den Mikrokanal gegeben und für 1 h bei einer Rotation von 0,25 rpm auf dem vasQturn gedreht. Es folgte eine zusätzliche Inkubation über Nacht mit folgendem Anschluss des Mikrokanals an die Mikrofluidikpumpe. Der Volumenstrom wurde innerhalb von 3 Tagen von  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  erhöht und dann konstant bei  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  gehalten. Nach 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und die Einbringung von 4 HepG2-Sphäroiden in das umgebende Kompartiment des vasQchips. Die Sphäroide wurden aus  $1,5 \cdot 10^4$  HepG2 auf einer 1,5 % Agaroseschicht in einer 96-Well-Platte hergestellt, in dem sie 6 Tage kultiviert wurden. Bevor 4 Sphäroide in den vasQchip umgesiedelt wurden, ist eine Zellfärbung mit *CellTracker™ Green* nach Herstelleranweisungen erfolgt. Insgesamt wurde das kombinierte Lebertumormodell für 3 Tage unter einem Volumenstrom von  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  kultiviert. Anschließend erfolgte eine Markierung der Zellkerne mit Hoechst33342 und in Abbildung D-H wurden alle Zellen erneut mit *CellTracker™ Green* markiert. Die konfokalmikroskopische Aufnahmen wurden zu einer 3D-Projektion des vasQchip übereinandergelegt. Zur Veranschaulichung der räumlichen Struktur des Systems wurden in H die Tiefenfärbungen dargestellt.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Grün: *CellTracker™ Green* ( $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, z-Stack Parameter:  $3 \mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für  $400 \mu\text{m}$ , Maßstab =  $200 \mu\text{m}$ .

Damit könnten zukünftige Toxizitätsanalysen der HepG2-Sphäroiden auf einen möglichen Zerfall visuell überprüft werden. Eine Markierung aller Zellen im System liefert den Nachweis, dass die etablierten Zellen des Lebermodells von den HepG2-Tumoren nicht beeinträchtigt wurden und weiterhin eine konfluente Zellschicht ausbilden (Abbildungen 66 D-F). Die komplexe Mikroumgebung eines Tumorgewebes in der Leber enthält neben vaskulären Strukturen, eine dichte ECM, weitere Zelltypen wie z.B. Immun- und Endothelzellen und eine geringe Nährstoffzufuhr.<sup>[203]</sup> Durch Einführung von Tumor-Sphäroiden und komplexen Kokulturen können authentischere Modelle von Tumoren auch direkt über das umgebende Kompartiment im vasQchip eingebracht werden. Es gibt bereits mehrere *Tumor-on-a-Chip* Modelle welche von Wang *et al.* und Liu *et al.* zusammengefasst wurden und Tumore in allen relevanten Organen des Körper abdecken.<sup>[203,205]</sup> Darunter sind auch Lebertumormodelle genannt, beispielsweise hat Skardal *et al.* ein Mikrosystem entwickelt, welches die Metastase von Darmkrebszellen und deren Migration in die Leber simulieren kann.<sup>[60]</sup> So könnte das entwickelte Tumormodell mit weiteren Organen auf anderen Plattformen verbunden werden, um so noch genauere Interaktionen und Reaktionen im Vergleich mit nativem Verhalten von Tumoren zu erzielen. Das Lebertumormodell im vasQchip kann nun benutzt werden, um die zytostatische Wirkung der Peptide aus Kapitel 3.4.2 zu testen. Dabei könnte das Verhalten des HepG2-Sphäroid nach Gabe der Peptide mikroskopisch durch *CellTracker™ Green* auf eine toxische Wirkung untersucht werden. Im Allgemeinen ist das Potential des hier vorgestellten Lebertumormodells noch nicht ausgeschöpft und sollte zukünftig noch weiter analysiert und Anwendung finden.

## 3.5 Erweiterungsmöglichkeiten des Lebermodells im vasQchip

Das in dieser Arbeit etablierte Lebermodell bietet viele mögliche Anwendungsbereiche in der Forschung. Neben der bereits vorgestellten Anwendung in der Wirkstoffforschung ist die Replikation von Leberkrankheiten ein wichtiger Aspekt von *Organ-on-a-Chip* Modellen. Um komplexere Lebermodelle zu generieren, sollte dafür die Dreidimensionalität des vasQchips im umgebenden Kompartiment entsprechend der Lebergewebestrukturen angepasst werden. Als Alternative zu erworbenen Leberzellen besteht die mögliche Anwendung von differenzierten Leberzellen im vasQchip. Diese potenziellen Optimierungs-, und Erweiterungsmöglichkeiten des Lebermodells im vasQchip werden in den nachfolgenden Kapiteln erörtert.

### 3.5.1 Hepatischer Fettmetabolismus und damit einhergehende Lebererkrankungen

Weitere Lebermodelle, die von hoher Relevanz sind, sind solche Modelle, die sich mit dem Fettmetabolismus beschäftigen. Die Leber ist ein zentraler Knotenpunkt für den Fettmetabolismus im menschlichen Körper. Gerät der Fettmetabolismus aus dem Gleichgewicht entstehen unter anderem Krankheiten wie die in Kapitel 1.2.2.1 beschriebene NAFLD. Um die Pathophysiologie von NAFLD besser zu verstehen, bedarf es adäquate Krankheitsmodelle um geeignete Behandlungsmethoden zu identifizieren.<sup>[114]</sup> Eine Möglichkeit ist die Verwendung von konditionierten Zellmedien um eine hepatische Steatose in *in vitro* 2D-Zellkulturmodelle auszulösen.<sup>[206]</sup> Jedoch wird bei solch einer Methode die Interaktion mit nicht-parenchymalen Leberzellen und der physiologische Aufbau der Leber nicht berücksichtigt.<sup>[114,115]</sup> Im folgenden Abschnitt wird die 2D-Kultivierung von Leberzellen unter konditionierten Medien besprochen mit dem Ziel ein Fettmetabolismusmodell im vasQchip zu etablieren.

#### 3.5.1.1 2D Lebermodell eines physiologisch angepassten Fettsäurenmediums im Hinblick auf die Induktion einer hepatischen Steatose

Chronische Lebererkrankungen wie bereits in Kapitel 1.2.2.1 erwähnt, werden meist durch NAFLD verursacht. Deren steigenden Fälle werden immer mehr zu einer Belastung des öffentlichen Gesundheitssystems.<sup>[207]</sup> Um diesem Verlauf entgegenzuwirken wird in der NAFLD-Forschung nach geeigneten Krankheitsmodellen geforscht, welche in der spezifischen Wirkstoffforschung eingesetzt werden können. Die Verwendung von primär isolierten Hepatozyten z.B. aus Biopsien von NAFLD Patienten ist begrenzt, sehr variabel innerhalb unterschiedlicher Zellspender und sind bezüglich ihrer Beibehaltung ihres hepatischen Phänotyps zeitlich limitiert.<sup>[208]</sup> Metabolische, humane Studien im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel sind hoch komplex und teilweise individuell von den gewählten Probanden abhängig.<sup>[113,206]</sup> Alternativ kann auf immortalisierte Leberzelllinien wie Huh7 oder HepG2

zurückgegriffen werden.<sup>[206]</sup> Deren Verwendung wurde jedoch als minderwertigen Ersatz gegenüber primären Hepatozyten angesehen. Studien zeigten jedoch, dass eine supraphysiologische Konzentration an Nährstoffen in der Kultivierung von Leberkrebszelllinien helfen kann, dass diese Zellen Eigenschaften der primären Hepatozyten entwickeln.<sup>[209–211]</sup> Huh7 sind Hepatomazellen welche bereits erfolgreich in *in vitro* NAFLD-Rekonstruktionen eingesetzt wurden.<sup>[206,208,212]</sup> Yki *et al.* haben in einer humanen Studie nachweisen können, dass gesättigte Fettsäuren zu einer verstärkten Akkumulation von TAG in Hepatozyten führen.<sup>[213]</sup> Diese morphologische Veränderung im Metabolismus führt zum Krankheitsbild der hepatischen Steatose, einer Vorstufe von NAFLD. In Hinblick auf eine Simulation von NAFLD wurde im folgenden Abschnitt die optimierte Kultivierung von Huh7-Zellen in unterschiedlich supplementierten Zellmedien ermittelt. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Shilpa Nagarajan am *Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism* (OCDEM) an der Universität Oxford, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Leanne Hodson im Zeitraum vom 01.09.22 bis 30.09.22 durchgeführt. Die Untersuchungen basieren auf deren Erkenntnissen bezüglich veränderter Zellmedienzusammensetzungen und dessen Auswirkungen auf die Akkumulation intrahepatischer TAG, Glucose-Konzentration und Fettsäuremetabolismus in den Leberzellen.<sup>[113,206,208]</sup> Um dieses Verhalten auch *in vitro* belegen zu können, wurden zwei verschiedene Zellkulturmedien in der Arbeitsgruppe von Prof. Hodson entwickelt, welche sich in der ungesättigten (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure (OPLA); Verhältnis 50:35:14:1) und gesättigten Fettsäure-Konzentration (Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure (POLA); Verhältnis 45:40:10:1) unterscheiden. Unabhängig von einer NAFLD-Erkrankung ist Palmitinsäure, neben der Ölsäure, die am häufigsten vorkommende Fettsäure in der menschlichen Leber. Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure sind essenzielle Fettsäuren, welche vom Körper nicht selbst synthetisiert werden können, aber unter anderem indirekt wichtig für die Phospholipidmembran sind. Als Teil der Phospholipiden sind sie für die Fluidität der Membran verantwortlich.<sup>[208,214,215]</sup> Eine Gesamtkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  an Fettsäuren wurde für eine ausgewogene Ernährung gewählt, während 800  $\mu\text{M}$  eine krankhafte, erhöhte Konzentration widerspiegelt.<sup>[206]</sup> Durch eine glucosehaltige und fettreiche Nahrung kann zudem die Senkung von intrazellulären gesättigten Fettsäuren beeinflusst werden.<sup>[113]</sup> Die Analyse des Lipidstoffwechsels fand über die sekretierten Metabolite im Zellmedium, oder durch die intrazelluläre Untersuchung spezifisch gewählter Moleküle statt.

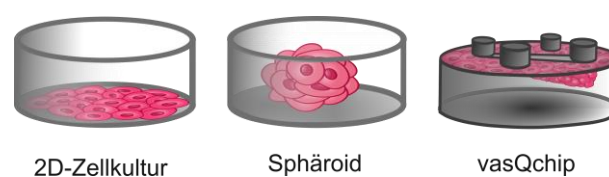


Abbildung 75: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Huh7 Kultivierungsmethoden. Planare 2D-Zellkultur im Vergleich zur 3D-Zellkultur in Form von Zellaggregaten (Sphäroide) und statischer Kultivierung im *Organ-on-a-Chip* Modell (vasQchip).

Die Auswirkung der Gabe einer natürlichen (200  $\mu\text{M}$  Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure (OPLA)) und überhöhten (800  $\mu\text{M}$  OPLA) Fettsäurezufuhr wurde in Huh7-Zellen unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen untersucht. Mit Aussicht auf eine Etablierung dieses Leberkrankheitsmodells im vaskularisierten *Liver-on-a-Chip* Modell wurden Huh7 Zellen und deren Verhalten in einer planaren 2D-Kultur, in einer 3D-Kultur als Sphäroide und im umgebenden Kompartiment des statischen vasQchip untersucht und anschließend verglichen. In Abbildung 75 sind die in den folgenden Abschnitten besprochenen Kultivierungsmethoden veranschaulicht.

### 2D-Kultivierung der Huh7 und Behandlung mit zusätzlichen Fettsäuren

In Anlehnung an Abbildung 75 wurden Huh7-Zellen in einer planaren 6-Well-Platte als 2D-Modell getestet. Dabei wurde nach dem Vorbild aus der Publikation von Nagarajan *et al.* gearbeitet.<sup>[206]</sup> Insgesamt wurden  $15 \cdot 10^4$  Huh7 in eine 6-Well-Platte ausgesät und nach einem Tag des Wachstums mit 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  OPLA behandelt. Die Behandlung wurde für insgesamt 7 Tage durchgeführt, wobei jeden 2. bis 3. Tag das Medium gewechselt wurde. An Tag 7 wurde die Morphologie der unterschiedlich behandelten Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Abbildung 76 zeigt die Aufnahmen der unbehandelten sowie der mit 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  OPLA behandelten Huh7. Die Morphologie der Zellen unterscheidet sich in der Akkumulation von Lipidtropfen zwischen den unterschiedlichen Behandlungsmethoden. In der unbehandelten Kontrolle sind nur vereinzelt Lipidtropfen zu erkennen, wohingegen bei einer Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  OPLA deutlich mehr vorhanden sind. Bei einer Behandlung mit 800  $\mu\text{M}$  ist keine eindeutige Abgrenzung der Lipidtropfenform mehr möglich, wodurch eine quantitative Analyse ausgeschlossen ist. Abhängig von der eingesetzten Fettsäurekonzentration im OPLA-Verhältnis konnte Nagarajan *et al.* einen Unterschied im intrazellulären TAG-Gehaltes nachweisen. Im Gegensatz zu einer 200  $\mu\text{M}$  OPLA-Behandlung wurde eine fast 3-fache TAG-Einlagerung in 800  $\mu\text{M}$  OPLA ermittelt.<sup>[206]</sup> Da TAG bewiesenermaßen in Lipidtropfen in Hepatozyten gelagert wird, kann dieses Ergebnis auf eine erhöhte Anzahl an Lipidtropfen zurückgeführt werden.<sup>[107,216]</sup> Vergleicht man die Fettsäureeinlagerung der *in vitro* Kultur mit natürlichen, systemischen Bedingungen wird deutlich, dass dieses Modell nicht ausreichend ist.

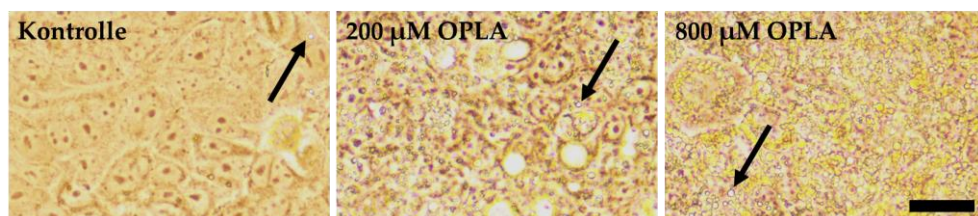


Abbildung 76: Behandlung von Huh7-Zellen mit einer Zusammenstellung aus Fettsäuren. In einer 6-Well-Platte wurden  $15 \cdot 10^4$  Huh7 für 1 Tag kultiviert. Anschließend wurden sie mit einer 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  Mischung aus OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure) im Verhältnis 50:35:14:1 für 7 Tage behandelt. Dabei wurde jeden 2. oder 3. Tag das Medium gewechselt und an Behandlungstag 7 konnte der Phänotyp durch eine Aufnahme mit dem Lichtmikroskop festgehalten werden.

Inverses Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100, Maßstab beträgt 12,5  $\mu\text{m}$ .

Beispielsweise wird die Aufnahme von freien Fettsäuren durch Kupfferzellen beeinflusst oder kann auch durch Sekretion von Gallenflüssigkeit verstärkt werden.<sup>[216,217]</sup> Diese Verhaltensweise wird dementsprechend in folgenden Experimenten im Vergleich mit weiteren Kultivierungsmethoden genauer analysiert.

### **3D-Kultivierung der Huh7 im Zusammenhang mit zusätzlichen Fettsäuren**

Es konnte gezeigt werden, dass primär isolierte Hepatozyten in einer Sphäroid-Kultur ihren Phänotyp, Viabilität und ihre spezifischen Funktionen länger behalten als in einer Monozellschicht.<sup>[32]</sup> Basierend auf einer möglichen Verbesserung der Bioaktivität in sphäroidal kultivierten Huh7-Zellen wurden diese zunächst in ihrem Verhalten gegenüber einer Behandlung mit überwiegend ungesättigten Fettsäuren in Form von 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  OPLA evaluiert. Zudem wurde humanes- und fötales Kälberserum vergleichend bezüglich deren möglichen Einfluss auf den Fettmetabolismus getestet. Durch Aussäen von  $0,2 \cdot 10^4$  Zellen/Well auf einer inadhärenten, runden 96-Well-Platte wurden die Huh7-Sphäroide hergestellt. Innerhalb von 2 Tagen erfolgte die Zellaggregation zu einem definierten Sphäroid, anschließend konnte die 7-tägige OPLA-Behandlung erfolgen. Während der Behandlung wurde das Wachstum der unterschiedlich behandelten Sphäroide mithilfe lichtmikroskopischer Aufnahmen verfolgt. Deren zeitliche Entwicklungen wurde an Behandlungstag 1, 2, 3, 6 und 7 aufgenommen und ist in Abbildung 77 dargestellt. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen der unterschiedlich behandelten Sphäroide lässt sich eine morphologische Veränderung der Sphäroide erkennen. So nimmt der Sphäroid-Durchmesser von Tag 1 bis Behandlungstag 7 zu. In Abbildung 78 ist das Wachstum der Sphäroid-Durchmesser, während der 7-tägigen Behandlung dargestellt. Alle abgebildeten Sphäroide weisen während des verfolgten Zeitraums ein linear zunehmendes Wachstum auf. So nimmt der Durchmesser der unbehandelten Sphäroide um 1,5-fach (FCS-Kontrolle) oder 1,4-fach (Humanserum (HS)-Kontrolle) zu. Dadurch ist ein Einfluss der unterschiedlichen Seren nicht signifikant nachweisbar. Wird das Wachstum in Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  OPLA betrachtet, so ist eine 1,4-fache Vergrößerung des Durchmessers zu beobachten. Außerdem konnte festgestellt werden, dass 800  $\mu\text{M}$  OPLA den Durchmesser innerhalb von 7 Tagen am stärksten mit einem 1,6-fachen Wachstum auf einen Durchmesser von 307  $\mu\text{m}$  vergrößert. Die gemessenen Querschnitte der Sphäroide überschreiten ab Tag 3 die kritische Distanz von 200  $\mu\text{m}$ . Sphäroide mit einem Durchmesser von  $\leq 200 \mu\text{m}$  zeichnen sich dadurch aus, dass sie keinen nekrotischen Kern besitzen, in dem die Zellen wegen Nahrungszufuhrmangel sterben.<sup>[218]</sup> Die 200  $\mu\text{m}$ -Grenze ist ein physiologischer Parameter und die entfernteste Distanz einer Körperzelle zu einem Blutgefäß. Wird dies nicht eingehalten, kann das zu einer Unterversorgung der Zellen führen.<sup>[219]</sup> Dementsprechend sollten in zukünftigen Experimenten eine geringere Zellzahl für die Bildung der Sphäroide gewählt werden um die Gesamtgröße der Sphäroide unter 200  $\mu\text{m}$  zu halten. Zudem könnte ein nekrotischer Kern mithilfe einer Lebend-/Tod-Färbung, wie in Kapitel 3.3.2.2 vorgestellt, detektiert werden.



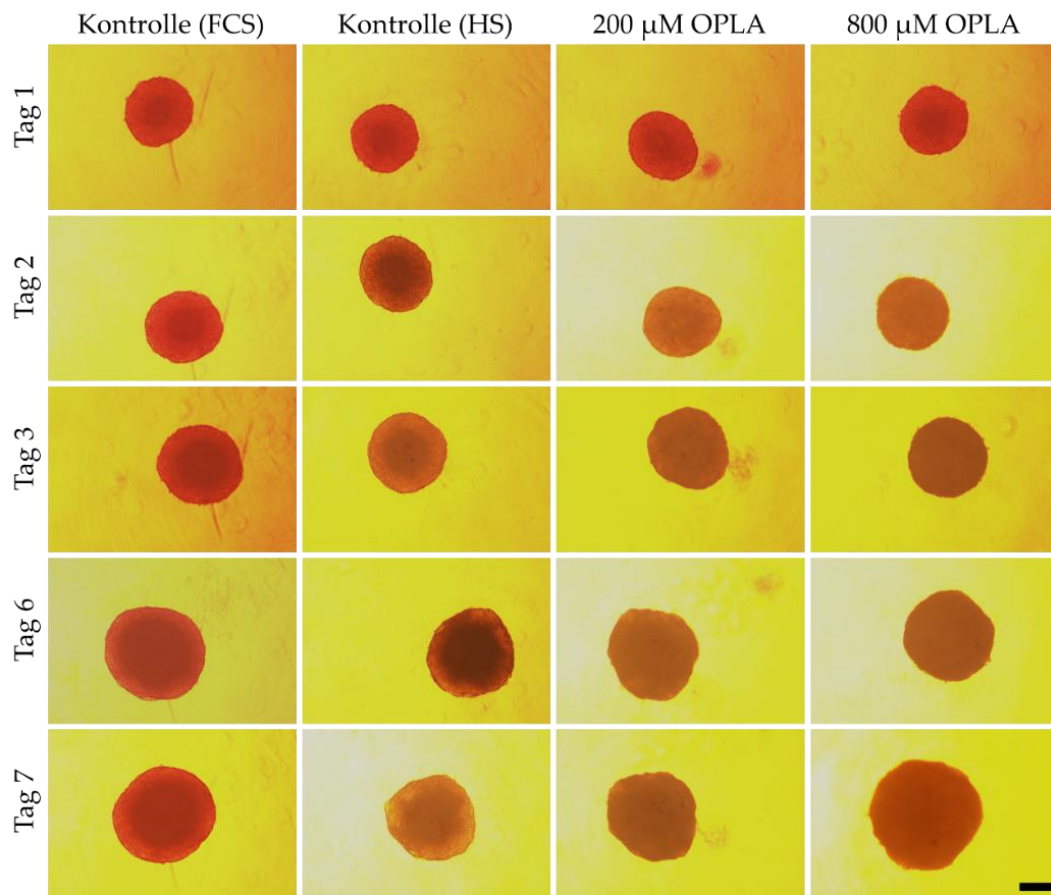


Abbildung 77: Messung des Huh7-Sphäroid-Wachstums in unterschiedlichen Medienzusammensetzungen. Die Huh7-Sphäroide wurden auf einer nicht-adhäsiven, runden 96-Well-Platte hergestellt. Dafür wurden  $0,2 \cdot 10^4$  Zellen/Well ausgesät und 48 h nach der Zellaggregation wurde mit der Behandlung begonnen. Es wurde eine 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  Mischung aus OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure) im Verhältnis 50:35:14:1 mit 2 % humanem Serum (HS) eingesetzt. Als Kontrolle diente das Medium ohne OPLA, welches entweder 2 % HS oder 10 % fötalem Kälberserum (FCS) enthielt. Während der Behandlungsdauer von 7 Tagen wurde das Wachstum der Sphäroide an Tag 1, 2, 3, 6 und 7 durch eine lichtmikroskopische Aufnahme festgehalten.

Inverses Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100, Maßstab beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

Der lineare Verlauf der Wachstumskurve zeigt jedoch, dass die Huh7-Zellen nicht durch einen möglichen nekrotischen Kern oder zusätzliche Fettsäuren im Medium in ihrem Wachstum gestört werden. Bei einer Zugabe von 800  $\mu\text{M}$  OPLA ist nach 7 Tagen eine Differenz von 38  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrolle (2 % HS) zu ermitteln, was auf einen positiven Einfluss der ungesättigten Fettsäuren in den Huh7-Zellen hindeutet. Jedoch ist dieser Unterschied in den behandelten Sphäroiden nicht eindeutig auf deren Proliferationsverhalten zurückzuführen. Eine weitere Erklärung für das größere Volumen der behandelten Sphäroide könnte in Zusammenhang mit der Einlagerung der verabreichten Fettsäuren stehen. Loneker *et al.* konnte in einer Studie mit der einfachungesättigten Fettsäure, der Ölsäure das Zellvolumenwachstum im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bereits nachweisen.<sup>[220]</sup> Auch ist ein Unterschied in der Dichte der Sphäroide in Abbildung 77 zu erkennen. Wird an Tag 7 die Kontrolle mit den beiden OPLA behandelten Sphäroiden verglichen, so wird von den behandelten Sphäroiden gleichmäßig das Licht absorbiert. Die beiden Kontrollen mit 10 % FCS und

2% HS absorbieren hingegen nur im Kern der Sphäroide verstärkt das einstrahlende Licht. Dieses Verhalten deutet auf eine Fetteinlagerung in Form von Lipidtropfen im Zytosol der Huh7-Zellen in Zusammenhang mit einer OPLA-Behandlung hin. Gunn *et al.* haben in ihrer Untersuchung von OPLA auf planar kultivierten Huh7-Zellen im Vergleich zu primären Hepatozyten bereits eine erhöhte Einlagerung von TAG in Lipidtropfen nachweisen können.<sup>[113]</sup> Damit dieses Verhalten auch eindeutig in den behandelten Huh7-Sphäroiden nachgewiesen werden konnte, wurden die Lipidtropfen mit BODYPI™ markiert. Das hydrophobe Molekül gelangt schnell in das Innere von Lipidtropfen und markiert diese zuverlässig.<sup>[221]</sup> Die Huh7-Sphäroide wurden wie zuvor beschreiben hergestellt und mit OPLA behandelt. An Tag 7 erfolgte die Fixierung der Zellen mit anschließender Markierung der Lipidtropfen durch BODIPY™ und einer Zellkernmarkierung mit Hoechst33342. In Abbildung 79 A) sind die Aufnahmen der Sphäroide abgebildet. In Grün ist die Fluoreszenz von BODIPY™ und in Blau die der Zellkerne dargestellt. Die Intensität des BODIPY™-Signals im 800 µM OPLA behandelten Sphäroid ist im Vergleich zu den Kontrollen verstärkt. Dieses Ergebnis wird durch eine quantitative Analyse der Intensitäten bestätigt. In Abbildung 79 B) ist die BODIPY™-Intensität, welche auf die Hoechst33342-Fluoreszenz der unterschiedlichen Sphäroide normiert wurde, abgebildet. Die relativierte BODIPY™-Intensität beträgt in der unbehandelten Kontrolle (HS) 72 %. Dagegen weisen die 200 µM OPLA-Sphäroide eine Intensität von 84 % auf. Bei einer 800 µM OPLA-Behandlung wurde eine Intensität von 88 % erreicht. Damit konnte quantitativ nachgewiesen werden, dass die Huh7-Zellen mehr TAG in Form von Lipidtropfen speichern, wenn sie eine fetthaltige Nährlösung wie OPLA erhalten. Dabei ist die Aufnahme und Speicherung in den Huh7-Zellen an die Konzentration der frei verfügbaren Fettsäuren gekuppelt. Werden mehr freie Fettsäuren angeboten so werden mehr Lipidtropfen gebildet. Diese Befunde konnten bereits von Gunn *et al.* bestätigt werden.

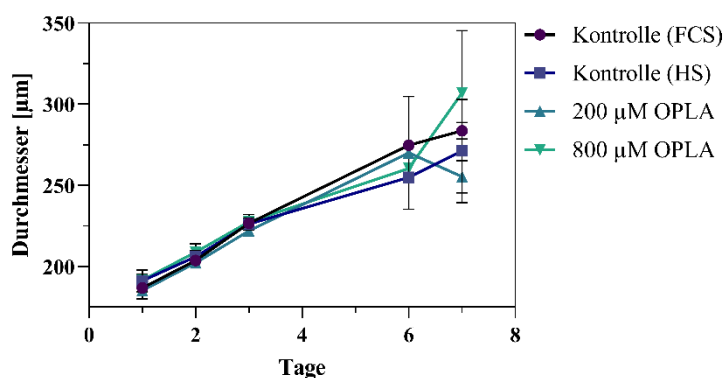


Abbildung 78: Huh7-Sphäroid-Wachstumskurven in Abhängigkeit von unterschiedlich supplementierten Zellmedien mit Fettsäuren. Es wurden aus  $0,2 \cdot 10^4$  Zellen/Well in einer nicht adhäsiven 96-Well-Platte innerhalb von 48 h Huh7-Sphäroide hergestellt. Anschließend wurden diese für insgesamt 7 Tage mit 200 µM und 800 µM OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$  Linolensäure) im Verhältnis 50:35:14:1 und mit 2 % humanem Serum (HS) behandelt. Als Kontrolle wurden Zellkulturmedien eingesetzt, welche nur mit 2 % HS oder 10 % fötalem Kälberserum (FCS) versetzt waren. An Behandlungstag 1, 2, 3, 6 und 7 wurde das Sphäroid-Wachstum lichtmikroskopisch evaluiert. Durch die empirische Ermittlung des Sphäroid-Durchmessers mit *ImageJ* wurde deren zeitaufgelöstes Wachstum quantifiziert. Mittelwert und deren Standardabweichung erfolgten aus  $n=3$ .

Sie konnten nachweisen, dass Huh7-Zellen in 800  $\mu\text{M}$  OPLA die 2-fache Konzentration an intrazellulärem TAG aufweisen gegenüber einer Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  OPLA.<sup>[113]</sup> Die Quantifizierung der BODIPY<sup>TM</sup>-Markierung in Abbildung 79 B) konnte lediglich einen Unterschied von 4 % zwischen der 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  OPLA-Behandlung aufzeigen. Eine genaue Bestimmung der TAG-Konzentration in den Huh7-Zellen könnte genauere Aufschlüsse über den Unterschied der Lipidtropfen in den Sphäroiden liefern. Die Evaluierung der Huh7-Sphäroide beinhaltete zudem noch eine Analyse der Viabilität der Zellen im Sphäroid. Wie schon zuvor beschrieben, können Zellen in Sphäroide durch dessen Größe in ihrer Viabilität beeinträchtigt werden.<sup>[218,219]</sup>

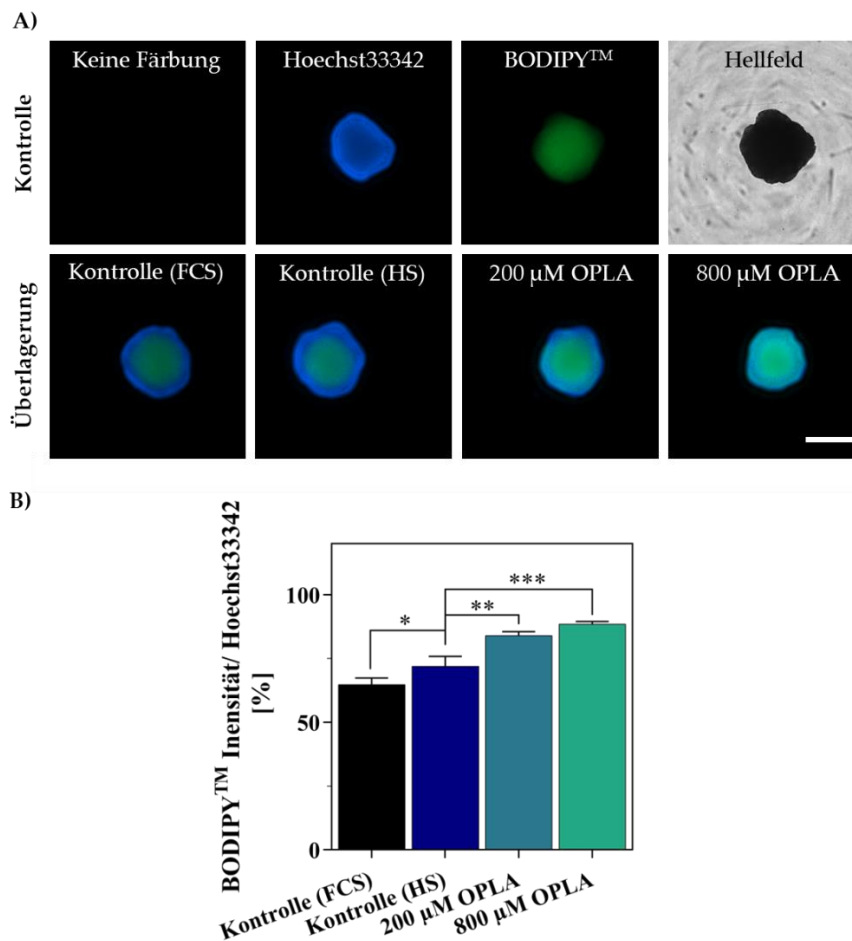


Abbildung 79: Lipidtropfen-Markierung mit BODIPY<sup>TM</sup> in Huh7-Sphäroiden. Die Huh7-Sphäroide wurden auf einer nicht adhäsiven, runden 96-Well-Platte hergestellt. Es wurden  $0,2 \cdot 10^4$  Zellen/Well ausgesät und nach 48 h der Zellaggregation mit der Behandlung begonnen. Es wurde eine 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  Mischung aus OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure) im Verhältnis von 50:35:14:1 mit 2 % humanem Serum (HS) eingesetzt. Als Kontrolle diente das Medium ohne OPLA, entweder mit 2 % HS oder 10 % fötalem Kälberserum (FCS). A) An Behandlungstag 7 wurden die Sphäroide fixiert und anschließend die DNA im Zellkern mit Hoechst33342 und die Lipidtropfen mit BODIPY<sup>TM</sup> durch eine lichtmikroskopische Aufnahme untersucht. B) Quantifizierung des BODIPY<sup>TM</sup>-Signal aus A) normalisiert auf die Intensität der Zellkerne. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle (HS) wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Grün: BODIPY<sup>TM</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 503 \text{ nm}$ ). Cytation1 Imaging Reader von BioTek, Maßstab beträgt 500  $\mu\text{m}$ .

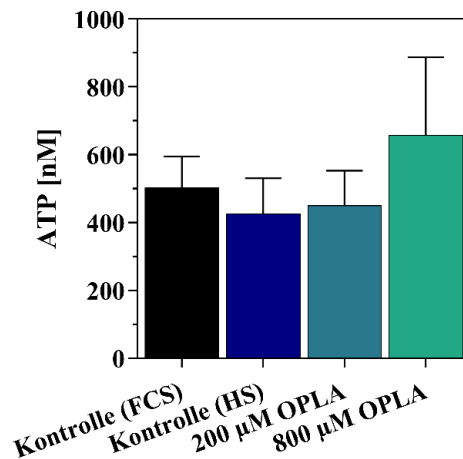


Abbildung 80: Viabilität der Huh7 Sphäroide. Die Huh7-Sphäroide wurden auf einer nicht adhäsiven, runden 96-Well-Platte hergestellt. Dafür wurden  $0,2 \cdot 10^4$  Zellen/Well ausgesät und nach 48 h der Zellaggregation wurde mit der Behandlung begonnen. Es wurde eine 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  Mischung aus OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure) im Verhältnis 50:35:14:1 mit 2 % humanem Serum (HS) eingesetzt. Als Kontrolle diente das Medium ohne OPLA, entweder mit 2 % HS oder 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Nach einer 7-tägigen Behandlung folgte die Quantifizierung der Viabilität der Huh7-Sphäroide durch den *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Die Mittelwerte und deren Standardabweichung erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Die Herstellung und Behandlung der Huh7-Sphäroide erfolgte identisch zu den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten. Nach der 7-tägigen OPLA-Behandlung wurde die Viabilität indirekt über die ATP-Konzentration der Zellen quantifiziert. In Abbildung 80 ist die ATP-Konzentration der unbehandelten Kontroll-Sphäroide gegenüber den mit 200  $\mu\text{M}$  oder 800  $\mu\text{M}$  OPLA behandelten Huh7-Sphäroiden dargestellt. Die Behandlung mit 800  $\mu\text{M}$  führt zu einer ATP-Konzentration von 658,4 nM. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (HS) ist dies eine Steigerung um 232,1 nM ATP. Wird hingegen 200  $\mu\text{M}$  OPLA eingesetzt, liegt die Steigerung bei 16,1 nM ATP. Zudem konnte noch ein Einfluss der verschiedenen Seren in den Kontrollen festgestellt werden. 10 % FCS im Zellmedium führte zu einer ATP-Konzentration von 503,6 nM, das HS hingegen nur zu 426,2 nM ATP. Wodurch FCS gegenüber HS zu einer erhöhten ATP-Produktion und somit einer verbesserten Zellviabilität führt. Dieses Lebermodell fokussiert sich auf dessen Anwendung im Bereich der Krankheitsrekonstruktion von NAFLD und der damit im Zusammenhang stehendem Leberfettmetabolismus. Die Verwendung von HS gegenüber FCS in der Kultivierung von Huh7-Zellen verbessert bewiesenermaßen deren Fettmetabolismus. Gunn *et al.* konnten belegen, dass HS deren Fettsäureoxidation und Insulinsensitivität steigert.<sup>[208]</sup> Infolgedessen wird trotz einer minimal reduzierten Viabilität eine Kultivierung der Huh7-Zellen in HS vorgezogen. Die gesteigerte Viabilität in Zusammenhang mit einer übernatürlichen Fettsäurezufuhr in Form von 800  $\mu\text{M}$  OPLA wurde in einer Huh7-2D-Zellkultur von Nagarajan *et al.* nicht bestätigt.<sup>[206]</sup> Durch die unterschiedlich verwendeten Kultivierungsmethoden kann dieses Ergebnis nicht direkt auf die in Abbildung 80 dargestellten Resultate bezogen werden, zudem sich die Viabilität der mit Fettsäuren behandelten Sphäroide nicht signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Die Evaluation der Huh7-Sphäroide zeigte, dass deren 3D-Kultivierung möglich ist. Zudem

reagieren sie auf äußere Einflüsse, wie eine erhöhte Fettsäurenkonzentration, indem sie vermehrt Lipidtropfen bilden. Zugleich werden sie nicht in ihrem linearen Wachstum durch OPLA beeinflusst und deren Viabilität wird ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die Resultate stellen die Huh7-Sphäroide als eine mögliche, alternative Kultivierungsform gegenüber der 2D-Zellkultivierung dar, was im folgenden Abschnitt noch weiter erörtert wird.

### Huh7 Kultivierung im statischen vasQchip

Für eine lebersinusoidale Rekonstruktion wurden die Huh7-Zellen nun auch im umgebenden Kompartiment des vasQchip platziert.<sup>[206,208,222]</sup> Zunächst wurde sichergestellt, dass die Huh7-Zellen auf der 1  $\mu\text{m}$  porösen Polycarbonatmembran adhären und proliferieren. Dafür wurden unterschiedliche Zellzahlen im umgebenden Kompartiment des vasQchips eingebracht und nach einer 7-tägigen Kultivierungszeit durch fluoreszente Markierung der Zellkerne visualisiert. In Abbildung 81 ist das Ergebnis der Huh7-Zellschicht im umgebenden Kompartiment des vasQchips dargestellt. Die DNA in den Zellkernen wurde dabei mit CyQUANT™ markiert, wodurch eine Lokalisation der Huh7 erfolgen konnte. Dabei wurden die Besiedelung der Chips mit unterschiedlichen Zellzahlen ( $4 \cdot 10^4$ ,  $20 \cdot 10^4$  und  $40 \cdot 10^4$  Huh7) verglichen. Die Hellfeldaufnahme zeigt den Mikrokanal und das umgebende Kompartiment, in welchem die Huh7 kultiviert und visualisiert wurden. Wie in Abbildung 81 zu erkennen, nimmt die Anzahl der Zellkerne mit steigender Zellzahl ab. Dieses Verhalten kann mit den begrenzten Nährstoffressourcen im umgebenden Kompartiment erklärt werden. Dies ist auf 500  $\mu\text{l}$  limitiert und im Vergleich zu einer 2D-Zellkultur um 97  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  geringer, wenn von einem 2 ml Volumen in einer 6-Well-Platte ausgegangen wird. Damit die Konfluenz der Huh7-Zellschicht nach einer Inkubationszeit von 48 h gewährleistet werden kann, wurde im folgenden Abschnitt mit einer Zellzahl von  $20 \cdot 10^4$  Huh7 gearbeitet. Im Hinblick auf die zukünftige Anwendung der Huh7 im fluidischen vasQchip ist die Konfluenz der Zellschicht bedeutend, damit das Lebermodell bis zum Anschluss an die Mikrofluidik vollständig einsatzbereit ist.

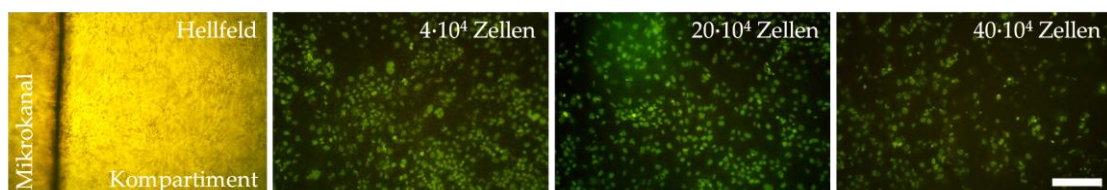


Abbildung 81: Bestimmung der Besiedelungszellzahl von Huh7 Zellen im umgebenden Kompartiment des vasQchips. Es wurden jeweils  $4 \cdot 10^4$ ,  $20 \cdot 10^4$  und  $40 \cdot 10^4$  Huh7 in das umgebende Kompartiment des vasQchips eingebracht. Nach Verschluss aller Zugänge wurde der vasQchip für 24 h um  $180^\circ$  gedreht kultiviert. Anschließend folgte eine Kultivierung für insgesamt 7 Tage, bei dem das Medium alle 2 bis 3 Tage gewechselt wurde. Für die Visualisierung der Zellen wurde die DNA in den Zellkernen mit CyQUANT™ grün markiert. Anschließend wurde die Zellschicht im umgebenden Kompartiment mit dem inversen Lichtmikroskop visualisiert.

Grün: CyQUANT™ ( $\lambda_{\text{ex}} = 508 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 527 \text{ nm}$ ). Inverses Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100. Maßstab= 100  $\mu\text{m}$ .

## **Der Effekt von Nährstoffzusätzen auf den Lipidmetabolismus in unterschiedlichen Kultivierungsmethoden von Huh7**

Das von Nagarajan *et al.* entwickelte Zellmedium, welches mit Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure im Verhältnis von 50:35:14:1 supplementiert ist, soll nun auf unterschiedliche Kultivierungsmethoden von Huh7-Zellen vergleichend analysiert werden.<sup>[206]</sup> Die Huh7-Zellen wurden dafür in herkömmlicher 2D-Zellkulturform in einer 6-Well oder in einer 96-Well-Platte kultiviert. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, deren Verhalten in Sphäroid-Form, einer 3D-Kultivierungsform sowie in dem statischen *Organ-on-a-Chip* vergleichend zu analysieren. Die jeweiligen Kultivierungsformen wurden wie zuvor beschrieben, aufgebaut und zeitgleich für 7 Tage mit 200  $\mu$ M oder 800  $\mu$ M OPLA behandelt. Die Analyse des Mediums erfolgte am Behandlungstag 7. Hier wurde ein konditioniertes Medium getestet, das vorher 24 h auf den Zellen inkubierte. Für die Bestimmung der intrazellulären Fettsäurenkomposition wurden die Zellen lysiert, deren Proteingehalt bestimmt und anschließend eine Lipidextraktion durchgeführt. Die Analyse der Lipidextrakte erfolgte durch Gaschromatographie mit angeschlossener Massenspektrometrie.

Im Medium kann unter anderem eine Aussage über die Fettsäureaufnahme sowie die Sekretion von TAG, welches an VLDL und 3-Hydroxybuttersäure (3-OHB) gebunden ist, getroffen werden. Da die Homöostase der Fettsäuren über deren Aufnahme- und Abgabe reguliert wird, war hierbei eine Veränderung zu vermuten. Zudem kann die Fettsäuren-Oxidation durch die 3-OHB-Konzentration im Medium nachverfolgt werden.<sup>[110,208]</sup> In Abbildung 82 A) ist die Aufnahme der freien Fettsäuren (NEFA) gegenüber der im Medium zugefügten Fettsäuren (OPLA) angegeben. In Huh7-Sphäroiden konnte keine Resorption der NEFA detektiert werden. In den anderen Ansätzen wurden über 52 % aller NEFA, unabhängig der Kultivierungsmethode und Behandlung, aufgenommen. Bei einer Behandlung mit 200  $\mu$ M OPLA liegt die durchschnittliche Aufnahme mit 84 % am höchsten, wohingegen bei einer Zugabe von 800  $\mu$ M OPLA nur 62,3 % aufgenommen werden. Nagarajan *et al.* konnten eine Aufnahme von über 80 % unabhängig von 200  $\mu$ M oder 800  $\mu$ M OPLA nachweisen. Sie beschränkten sich jedoch auf die planare 2D-Kultivierungsform der Huh7-Zellen.<sup>[206]</sup> Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung im 6-Well weist vergleichbare Werte mit einer 90 % NEFA-Aufnahme in 200  $\mu$ M OPLA und 73 % in 800  $\mu$ M OPLA auf. In den Sphäroiden konnte aus unbekanntem Gründen keine Aufnahme detektiert werden. Im Anschluss wurde der Fettsäuresekretion über den TAG-Gehalt im Medium analysiert. Wie sich die TAG-Sekretion gegenüber unterschiedlichen Kultivierungsformen nach einer OPLA-Behandlung verhalten wird in Abbildung 82 B) dargestellt. Die auf den Proteingehalt normierte TAG-Sekretion ermöglicht einen Vergleich zwischen den 2D- und 3D-Kultivierungsformen. Die Abgabe von Fettsäuren in Form von TAG nimmt in allen Kultivierungsansätzen mit zunehmendem beigefügtem Fettgehalt im Zellkulturmedium zu. So steigt die Sekretion von TAG in den im vasQchip kultivierten Zellen von 125 nmol/mg Protein in der Kontrolle auf 177 nmol/mg Protein in 800  $\mu$ M OPLA am stärksten. Die 2D-Kultivierungsformen im 6- und 96-Well sekretieren ohne zusätzliche Fettsäuren ca. 30 nmol/mg Protein TAG in das Medium. Bei einer Behandlung mit 800  $\mu$ M OPLA steigert sich die Sekretion im 6-Well auf

37 nmol/mg Protein und im 96-Well auf 73 nmol/mg Protein. Die Huh7-Zellen gleichen mit der TAG-Sekretion die in Abbildung 82 A) nachgewiesene Fettsäureaufnahme aus. In einer gesunden menschlichen Leber werden nur < 5,5 % TAG gespeichert. Durch den Import und direkte Sekretion wird dieses Gleichgewicht gehalten wodurch eine NAFLD verhindert wird.<sup>[223,224]</sup> Somit ist das Verhalten der Huh7-Zellen eine natürliche Reaktion auf eine erhöhte Fettsäurenährlösung. Zu den in Abbildung 82 B) präsentierten Daten konnten Nagarajan *et al.* in 2D kultivierten Huh7 ein ähnliches Verhalten nachweisen. Eine unbehandelte Kontrolle wies eine TAG-Sekretion von ca. 20 nmol/mg Protein auf, wohingegen die Behandlung mit 800  $\mu$ M OPLA diese auf über 30 nmol/mg Protein erhöhte.<sup>[206]</sup> Die erhöhte Aktivität in der Sekretion der 3D kultivierten Huh7-Zellen kann auf eine verbesserte Kultivierungsform der Zellen hindeuten. Eine natürlichere Organisation der Zellen unterstützt deren metabolisches Verhalten, wodurch eine bessere Replikation der *in vivo*-Bedingungen gewährleistet ist. Diese Verhaltensweise kann auch in Hinblick auf die  $\beta$ -Oxidation bestätigt werden. In Abbildung 82 C) wird das Ergebnis der 3-OHB-Analyse des Zellkulturmediums der unterschiedlich kultivierten und behandelten Huh7 gezeigt. Fettsäuren können entweder vollständig oxidiert oder als Energiespeicher in Ketone wie 3-OHB zwischengelagert werden.<sup>[108,113]</sup> Die Analyse von 3-OHB im Medium kann somit Auskunft über die Abbauege von Fettsäuren in der Leber liefern. Je höher der Fettsäurenanteil im Zellkulturmedium ist, desto mehr nimmt in allen Kultivierungsformen die 3-OHB-Konzentration im Medium ab (wie in Abbildung 82 C). Dabei liegt dessen Konzentration in den unbehandelten 3D kultivierten Huh7-Sphäroiden bei 8,59  $\mu$ mol/mg Protein 3-OHB und sinkt auf je 7,5  $\mu$ mol/mg Protein und 4,79  $\mu$ mol/mg Protein 3-OHB in 200  $\mu$ M und 800  $\mu$ M OPLA. Die 2D-kultivierten Huh7-Zellen weisen hingegen 3-OHB-Konzentrationen von 1,69  $\mu$ mol/mg Protein 3-OHB im 6-Well und 29  $\mu$ mol/mg Protein 3-OHB im 96-Well im unbehandelten Ansatz auf. Gunn *et al.* konnten nachweisen, dass die Huh7-Zellschicht im HS ca. 1,9  $\mu$ mol/mg Protein 3-OHB aufweist.<sup>[208]</sup> Somit kann die planare Kultivierung von Huh7 und deren  $\beta$ -Oxidation erfolgreich mit bekannten Parametern verifiziert werden. Jedoch entspricht die Abnahme der  $\beta$ -Oxidation in Präsenz einer erhöhten Fettsäurenkonzentration nicht den Erwartungen.<sup>[112]</sup> Das Fettsäuregleichgewicht könnte unterstützend durch den Abbau von TAG in Acetyl-CoA wieder ausgeglichen werden. Der fehlende Nachweis einer steigenden  $\beta$ -Oxidation in Abbildung 82 C) könnte unter anderem durch die verzögerte Akkumulation von Ketonkörpern im Zellmedium erklärt werden. Eine verlängerte Inkubation des Zellmediums auf den Zellen vor dessen Analyse könnte darüber genaueren Aufschluss geben. Im Anschluss an die Messung der sekretierten Fettsäuren wurde die intrazelluläre Konzentration der von Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure bestimmt (Abbildung 83). Dabei wurden die unterschiedlichen Kultivierungsmethoden in 2D- und 3D-Zellkultur im Zusammenhang mit einer natürlichen (200  $\mu$ M OPLA-Konzentration) oder erhöhten, pathogenen 800  $\mu$ M OPLA-Konzentration verglichen. Die Palmitinsäure in Abhängigkeit aller gemessener TAG liegt in allen Varianten zwischen 25 mol% und 33 mol% (Abbildung 83 A). Die Ölsäure ist in allen Kultivierungsformen zwischen 30 mol% und 57 mol% in den Huh7 nachweisbar (Abbildung 83 B) zu, wobei deren intrazelluläres Verhältnis zu anderen Fettsäuren nicht durch die Zugabe einer höheren

OPLA-Supplementierung beeinflusst wird. Die Linolsäure (Abbildung 83 C) weist ein ähnliches Verhalten auf. Die nachgewiesene intrazelluläre Konzentration der Linolsäure liegt zwischen 6 mol% und 12 mol%. Lediglich die  $\alpha$ -Linolensäure konnte nur unregelmäßig in den unterschiedlichen Kultivierungsformen detektiert werden (Abbildung 83 D). So konnten unter anderem nur in der Kontrolle im 6-Well eine Konzentration von 0,4 mol% nachgewiesen werden. Die natürlich vorkommende geringe intrazelluläre Konzentration der  $\alpha$ -Linolensäure könnte eine Ursache sein, weshalb sie mithilfe der Gaschromatographie nicht mehr zuverlässig nachweisbar ist. Für deren Analyse sollte somit auf ein anderes Nachweisverfahren wie beispielsweise der radioaktiven *Tracer* zurückgegriffen werden.<sup>[214]</sup> Gunn *et al.* haben für planar kultivierte Huh7-Zellen in 2 % HS ähnliche Fettsäurekompositionen ermitteln können. 27 mol% Palmitinsäure ist vergleichbar mit den in Abbildung 83 A) verifizierten 30 mol%.

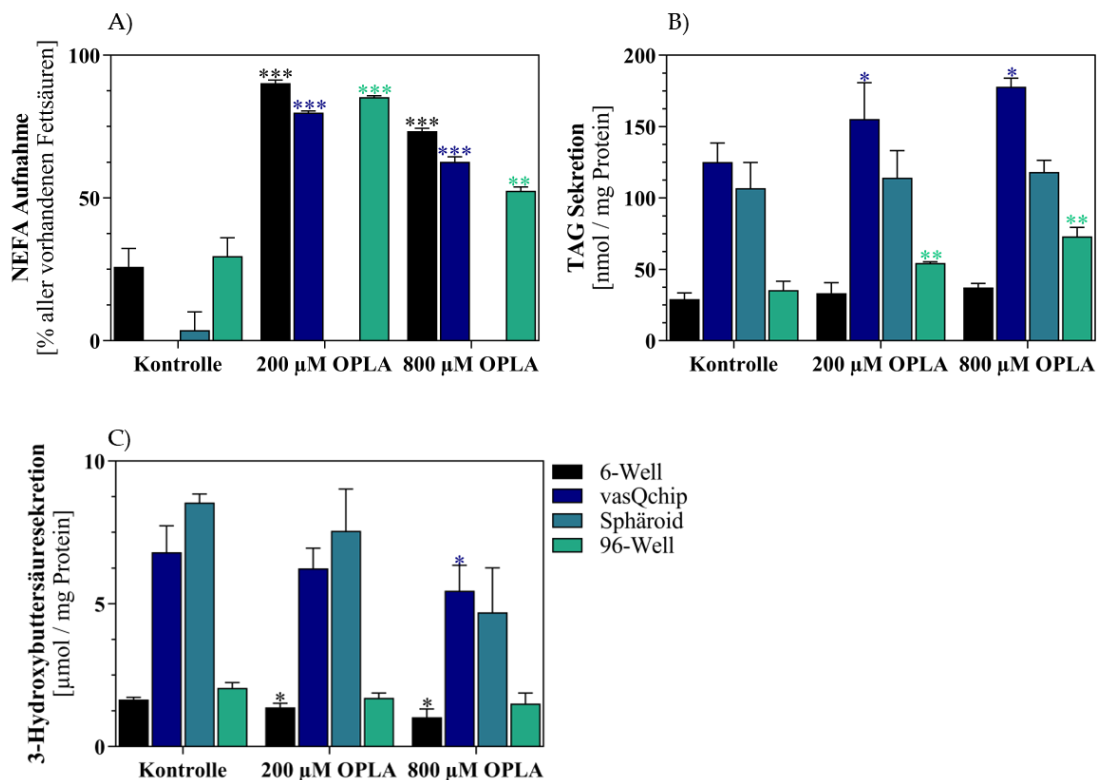


Abbildung 82: Zellkulturmedienzusammensetzung und dessen Effekt auf den Fettmetabolismus in verschiedenen Modellen der Leber. Huh7-Zellen wurden in den vier unterschiedlichen Kultivierungsformen (6-Well, statischer vasQchip, Sphäroid und 96-Well) für 7 Tage mit 200 µM oder 800 µM OPLA behandelt. Es wurde eine Fettsäuremischung aus OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure) im Verhältnis von 50:35:14:1 mit 2 % humanem Serum (HS) eingesetzt. Als Kontrolle diente das Medium ohne OPLA mit 2 % HS. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. An Tag 7 erfolgte die Analyse des Mediums, welches für insgesamt 24 h konditioniert wurde. Graph A) zeigt die Aufnahme von freien Fettsäuren (NEFA) relativ zur eingesetzten Fettsäuremenge, (B) stellt die Abgabe ins Zellkulturmedium von Triacylglycerol (TAG) und in C) die von 3-Hydroxybuttersäure dar. In B) und C) wurden die Konzentrationen bezogen auf die vorhandene Proteinmenge im Experiment.

Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\*p < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen, welche mithilfe des Student's t-Test ermittelt wurden.



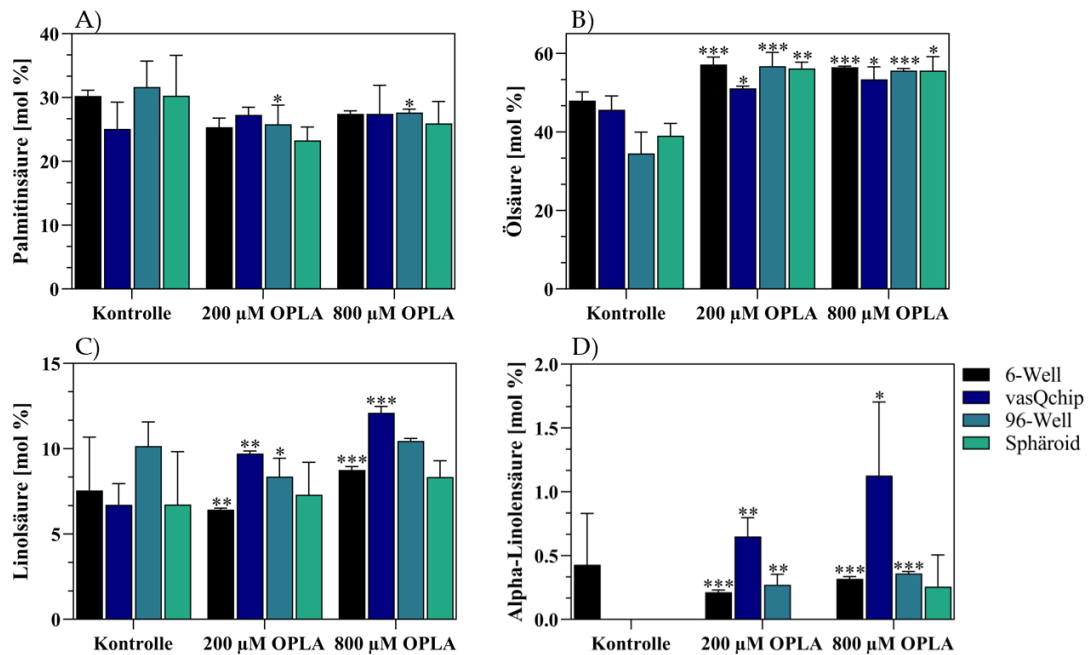


Abbildung 83: Intrazelluläre Analyse von Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure in unterschiedlich kultivierten und behandelten Huh7-Zellen. Die Behandlung mit 200  $\mu$ M oder 800  $\mu$ M OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure, 50:35:14:1) erfolgte für 7 Tage mit einem Medienwechsel von 2-3 Tagen. Die Fettsäurebestimmung wurde mithilfe der Gaschromatographie unter Verwendung eines Standards durchgeführt und auf die gemessene Gesamtfettsäurekonzentration normiert.

Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Die mehrfachungesättigten Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure-Vorkommen sind auch vergleichbar mit den von Gunn *et al.* gemessenen Werten (Linolsäure 2,3 mol%;  $\alpha$ -Linolensäure 0,19 mol%).<sup>[208]</sup> Lediglich die ermittelte Ölsäurenkomposition von 47 mol% ist von der Literatur mit einem Wert von 30,1 mol% abweichend.<sup>[208]</sup> Zusammenfassend ist aber festzuhalten, dass die unterschiedlichen Kultivierungsmethoden keinen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Fettsäurenkomposition von Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure oder  $\alpha$ -Linolensäure haben. Neue Fettsäuren werden in der DNL aus Acetyl-CoA in einer exergonen Reaktion synthetisiert. Malonyl-CoA, ein Zwischenprodukt der DNL wird durch weitere Katalyseschritte zu Palmitinsäure synthetisiert, welches der Grundbaustein für weitere Fettsäuren bildet.<sup>[107,225]</sup> Infolgedessen werden während der Nahrungsaufnahme 30 % der hepatischen Fettsäuren über DNL generiert und im fastenden Zustand lediglich 5%.<sup>[225]</sup> Dieses Verhalten ist im Zusammenhang mit der gesteigerten Glucosekonzentration während der Nahrungsaufnahme zu erklären, da Glucose ein essenzielles Substrat für die DNL ist. Eine Überregulierung der DNL trägt zu der hepatischen Steatose bei.<sup>[107]</sup> Deswegen ist es von Interesse diesen Stoffwechselweg in einem relevanten Lebermodell zu verfolgen und steuern zu können. In Abbildung 84 ist der prozentuale Anteil der neu synthetisierten Palmitinsäure durch die DNL, gegenüber der importierten Palmitinsäure dargestellt. Die Huh7-Zellen wurden für die Analyse der DNL in einer 2D-Zellkultur (6-Well oder 96-Well) oder in einer 3D-Zellkultur (Sphäroid

oder vasQchip) für 7 Tage mit 200  $\mu\text{M}$  OPLA oder mit 800  $\mu\text{M}$  OPLA behandelt. Durch die Verwendung von deuteriertem Wasser, konnten die neu synthetisierten Fettsäuren mithilfe des eingebauten Deuteriums in der DNL eindeutig markiert werden. Eine Analyse mithilfe der Massenspektrometrie ermöglicht die Untersuchung des Verhältnisses von neu hergestellter Palmitinsäure gegenüber eingeschleuster Palmitinsäure. In Abbildung 84 ist die DNL von Palmitinsäure in mol % gegenüber der OPLA-Behandlung aufgetragen. Bei einer Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  OPLA in der planaren 6-Well Kultivierungsform ist die DNL von Palmitinsäure mit 3,9 mol% am ausgeprägtesten. Die DNL nimmt mit zunehmender Fettsäurenkonzentration ab, so ist ein Rückgang auf 1,1 mol% DNL Palmitinsäure nach einer Behandlung mit 800  $\mu\text{M}$  OPLA in der 6-Well-Platte ermittelt worden. Auch die anderen Kultivierungsmethoden zeigten ein ähnliches Ergebnis. Die 3D-Kultivierung der Huh7 in Sphäroid-Form führt bei einer Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  OPLA lediglich zu einer Konzentration von 0,6 mol% DNL Palmitinsäure, während eine Behandlung mit 800  $\mu\text{M}$  OPLA diese auf 0,1 mol% reduziert wird. Nagarajan *et al.* konnten bereits diesen Rückgang bei einer erhöhten Fettsäurenmedienzusammensetzung nachweisen.<sup>[206]</sup> Abbildung 83 A) zeigt, dass die gesamte intrazelluläre Palmitinsäurekonzentration nicht durch ein erhöhtes fetthaltiges Medium beeinflusst wird. Daraus lässt sich schließen, dass die DNL während einer exogenen Zugabe von Palmitinsäure im Zellmedium, reduziert wird. Diese Reduktion ist eine energieeffiziente Anpassung an die veränderte Mikroumgebung der Zellen. Wilke *et al.* führten eine humane Studie durch, in welcher eine fettreiche mit einer fettarmen Ernährung und dessen Auswirkung auf die DNL analysiert wurde. Sie konnten auch einen Rückgang der DNL im Zusammenhang mit einer erhöhten Fettsäurenkonzentration in der Nahrung zeigen.<sup>[226]</sup> Durch die in dieser Arbeit bestätigten Literaturbefunde lässt auf ein adäquates Verhalten der Huh7-Zellen auf eine erhöhte Fettsäurenkonzentration schließen. Nicht nur die Fettsäuren selbst sondern auch Glucose als Kohlenstoff-Lieferant spielt eine zentrale Rolle im Fettmetabolismus der Leber. In der DNL ist Glucose die Hauptkohlenstoffquelle und dessen Serumkonzentration reguliert unter anderem die DNL-Aktivität.<sup>[227]</sup> Die NEFA-Freisetzung im Fettgewebe wird durch einen erhöhten Glucosegehalt inhibiert, wodurch indirekt die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien reguliert wird.<sup>[112]</sup> Deswegen kann die Aufnahme von Glucose in den Zellen Aufschluss über das metabolische Verhalten von Hepatozyten liefern. Die Aufnahme von Glucose aus dem Zellkulturmedium wurde in den unterschiedlich kultivierten Huh7-Zellen bestimmt und ist in Abbildung 85 A) dargestellt. Die Huh7 wurden für 7 Tage mit einer 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  OPLA Fettsäurendiät und einer Glucosekonzentration von 5,5 mM kultiviert. An Behandlungstag 7 wurde das für 24 h konditionierte Medium auf dessen Glucosegehalt analysiert. Abbildung 85 A) zeigt die Glucoseaufnahme aus dem Zellkulturmedium. Die Aufnahme bestand zwischen 70 % und 99 % der gesamten verabreichten Glucose im Zellkulturmedium. Dabei ist kein Unterschied zwischen der Glucoseaufnahme durch eine Behandlung mit OPLA festzustellen. In Analogie zu den Aufnahmeexperimenten von NEFA (Abbildung 82 A) konnte auch keine Aufnahme in den Huh7 Sphäroiden nachgewiesen werden.

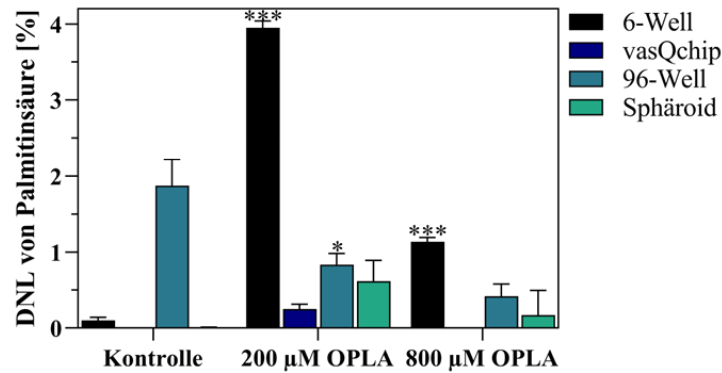


Abbildung 84: Intrazelluläre Palmitinsäureanalyse in unterschiedlich kultivierten Huh7. Die Huh7 wurden im 6-Well, im statischen vasQchip, als Sphäroid oder in der 96-Well-Platte kultiviert. Zudem wurden sie mit 200 µM und 800 µM OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolsäure, 50:35:14:1) und 10 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  für 7 Tage behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der intrazellulären Palmitinsäurekonzentration mithilfe von Gaschromatographie mit nachfolgender Massenspektrometrie. Dargestellt ist die prozentuale *de novo* Lipogenese (DNL) von Palmitinsäure im Vergleich zum gesamten gemessenen intrazellulären Palmitinsäurevorkommen.

Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

In Abbildung 85 B) ist die Lactasesekretion dargestellt, welche auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Ansätze normiert wurde. Die 3D-Huh7-Sphäroide und im statischen vasQchip weisen eine 4,8-fache bis 5,6-fach stärkere Sekretion gegenüber der 6-Well Kontrolle auf. Insgesamt ist in jeder Kultivierungsform eine sinkende Lactasesekretion zu beobachten. In der 96-Well-Platte sinkt die Sekretion von 20,9 µmol/mg Protein in der unbehandelten Kontrolle, auf 17,9 µmol/mg Protein bei einer Behandlung mit 200 µM OPLA und schließlich auf 13 µmol/mg Protein mit 800 µM OPLA. Dieser Trend konnte auch von Gunn *et al.* in planar kultivierten Huh7 beobachtet werden.<sup>[113]</sup> Eine Reduktion der Lactasesekretion weist auf eine Verschiebung der Glykolyse in Richtung einer aeroben Synthese von Pyruvat hin.<sup>[228]</sup> Pyruvat wiederum ist ein essenzielles Substrat in der DNL, wodurch diese beeinflusst werden kann.<sup>[109]</sup> Die Supplementierung des Zellmediums mit 200 µM und 800 µM OPLA führte zu metabolischen Huh7-Reaktionen, welche teilweise von Gunn *et al.* und Nagarajan *et al.* bereits bestätigt wurden. Die 3D-Kultivierung in Form von Sphäroiden und im statischen vasQchip sind in der Sekretion von TAG, 3-OHB und Lactat den der 2D kultivierten Huh7 überlegen. Die intrazellulären OPLA-Konzentrationen sind in allen Kultivierungsformen ähnlich und die DNL repräsentiert im 6-Well die physiologischen Bedingungen am besten. Erste Grundlagen für eine Erweiterung des Lebermodells mit Huh7 zur 3D-Rekonstruktion in einem natürlichen supplementierten Nährmedium wurden in dieser Arbeit erzielt. Die nächsten Schritte wären eine Verifizierung der durchgeführten Analysen, sowie die Verwendung des vasQchips unter fluidischen Bedingungen.

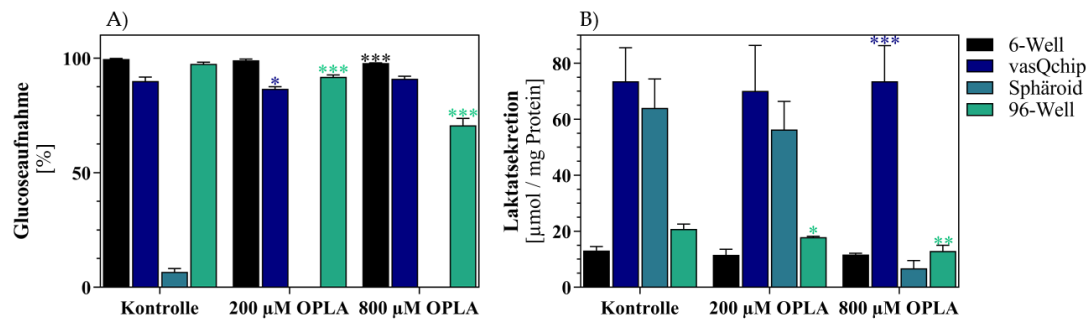


Abbildung 85: Messung der Glucoseaufnahme und Laktasesekretion in verschiedenen Lebermodellen. Huh7-Zellen wurden zum Vergleich im 6-Well, statischen vasQchip, Sphäroid oder in einem 96-Well für 7 Tage kultiviert. Die Behandlung mit unterschiedlichen Fettsäuren (200 µM oder 800 µM OPLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolensäure und  $\alpha$ -Linolensäure), 50:35:14:1), wurde jeden 2. bis 3. Tag erneuert. Anschließend erfolgte eine Analyse des 24 h konditionierten Mediums. In A) wurde die Glucoseaufnahme basierend auf der ursprünglich eingesetzten Konzentration bestimmt. B) zeigt die abgegebene Laktase in das Zellkulturmedium der unterschiedlich kultivierten Huh7.

Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

### 3.5.1.2 Verhalten von primären Leberzellen in einem supplementierten Nährmedium

Primäre Hepatozyten sind in der Leberforschung das repräsentativste Modell einer menschlichen Leber.<sup>[229]</sup> Durch die Verwendung der *Upcyte Technologies*<sup>TM</sup> Hepatozyten wurde im Vergleich zu Leberhepatomzellen, wie den Huh7, eine Alternative eingesetzt, die primären Hepatozyten sehr ähnlich sind.<sup>[147]</sup> Im folgenden Abschnitt wird deren Verhalten in einer Mediensupplementierung mit zusätzlichen Fettsäuren analysiert. Es wurde zunächst die Reaktion der Hepatozyten auf Palmitinsäure getestet. Daraufhin wurden physiologischere Bedingungen, mit einer Mischung aus unterschiedlichen Fettsäuren (OPLA und POLA) auf Hepatozyten und LSEC untersucht. In Kapitel 3.5.1.1 wurde bereits das von Nagarajan *et al.* etablierte OPLA und POLA-Zellmedium bezüglich einer natürlicheren Fettsäurenkonzentration mit möglicher Induktion einer hepatischen Steatose vorgestellt.<sup>[206]</sup> Die natürliche, gesunde Fettsäuresupplementierung in Form von OPLA und POLA, welche für eine Induktion von NAFLD eingesetzt werden kann, sind in Kapitel 4.1.5 aufgelistet. Die Anwendung dieser Zellmedien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Shilpa Nagarajan im Zeitraum vom 14.02.2023 bis 28.02.2023 am Institut für Funktionelle Grenzflächen des KITs durchgeführt.

#### Induzierte Lipidakkumulation in Hepatozyten

Palmitinsäure ist die am häufigsten vorkommende Fettsäure im menschlichen Körper.<sup>[230]</sup> Sie wird entweder über die Nahrung aufgenommen oder über DNL intrazellulär aus Pyruvat synthetisiert.<sup>[107]</sup> In der Leberforschung wird Palmitinsäure unter anderem in Studien zur hepatischen Steatose eingesetzt um die Lipidakkumulation in Hepatozyten zu induzieren.<sup>[231–233]</sup> Die verwendeten Hepatozyten im vasQchip sollen auf deren Fähigkeit der Fettakkumulation überprüft werden.

Dadurch kann ein Einsatz des etablierten Lebermodells im vasQchip aus Kapitel 3.3.2 im Bereich der hepatischen Steatose gewährleistet werden. Zunächst erfolgte die visuelle Überprüfung der Fettsäureeinlagerung in Hepatozyten durch Anwendung einer *Oil-Red-O* Färbung. Dieser fettlösliche Farbstoff markiert Lipide und eignet sich zur Visualisierung von Lipidtropfen in Zellen.<sup>[234]</sup> Die Hepatozyten wurden für 24 h und 48 h ohne Zusatz von Palmitinsäure und mit 0,4 mM Palmitinsäure und dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert. In Abbildung 86 ist die morphologische Veränderung durch die Behandlung einer *Oil-Red-O* Färbung dargestellt. Eine Behandlung durch 0,4 mM Palmitinsäure löst eine Lipidakkumulation in den Hepatozyten aus (Abbildung 86 E und F). Die Färbung der Lipidtropfen durch *Oil-Red-O* lässt erkennen, dass diese in den Kontrollen in Abbildung 86 A-D geringfügig gefärbte Lipidtropfen vorhanden sind wohingegen die behandelten Hepatozyten in Abbildung 86 E und F eindeutig eine Färbung aufweisen. Somit ist die Bildung der Lipidtropfen eindeutig auf die Behandlung mit Palmitinsäure zurückzuführen. Nach Brave *et al.* wurden physiologische Palmitinsäurenkonzentrationen eingesetzt, die zu einer hepatischen Steatose führen. Sie konnten einen ähnlichen Effekt der Lipideinlagerung in HepG2-Zellen nachweisen, zeitgleich wurde zudem eine erhöhte Apoptose der Hepatozyten nachgewiesen.<sup>[231]</sup> Weitere Studien bestätigen die lipotoxische Eigenschaft von Palmitinsäure.<sup>[232,233]</sup> Die Viabilität der Hepatozyten im Zusammenhang mit einer Palmitinsäuren-Behandlung wurde deswegen überprüft und ist in Abbildung 87 A) dargestellt. Die Viabilität der Hepatozyten, sowie LSEC wurden nach einer Palmitinsäurebehandlung (0,1 mM bis 0,5 mM) mit für 24 h, oder 48 h überprüft. In Abbildung 87 ist die Viabilität in Abhängigkeit zur Palmitinsäurenkonzentration aufgetragen. Die Viabilität der Hepatozyten ist erst bei einer Konzentration von 0,5 mM Palmitinsäure signifikant reduziert. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen sinkt die Viabilität auf 69 % nach 24 h bei einer Behandlung mit 0,5 mM Palmitinsäure (Abbildung 87 A). Zhu *et al.* konnten eine zeit- und dosisabhängige Toxizität von Palmitinsäure in HepG2 nachweisen. Sie reduzierten die Viabilität nach 24 h bei einer Konzentration von 0,2 mM Palmitinsäure signifikant.<sup>[232]</sup> LSEC sind die Leberzellen, welche als erstes auf die Lipotoxizität in NAFLD reagieren.<sup>[235]</sup> Im Hinblick auf die Induktion der hepatischen Steatose in Kokultur im vasQchip wird daher die Viabilität der LSEC im Zusammenhang mit einer Palmitinsäurenbehandlung analysiert. In Abbildung 87 B) ist deren Viabilität in einer zeit- und dosisabhängigen Beziehung dargestellt. Deren Zellviabilität sinkt kontinuierlich und liegt nach einer 48 -ständigen Inkubation bei einer Palmitinkonzentration von 0,5 mM bei 23 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Daraus ergibt sich bei einem Behandlungszeitraum von 48 h ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0,32 mM. Externe Lipide gelangen durch die LSEC-Schicht im Sinusoid zu den darunterliegenden Hepatozyten.<sup>[236]</sup> Somit stehen sie in direktem Kontakt mit den ankommenden Fettsäuren und reagieren dementsprechend spezifisch auf sie. Geng *et al.* konnten eine Toxizität von Palmitinsäure auf primär isolierte Hepatozyten nicht bestätigen, jedoch wurde lediglich ein Behandlungszeitraum von 3 h betrachtet und Rattenzellen eingesetzt.<sup>[235]</sup> Anhand dieser präsentierten Ergebnisse sollte bei einer Verwendung von Palmitinsäure für LSEC auf ein Konzentrationslimit von 0,32 mM beachtet werden um ein 50 %igen Viabilitätsverlust zu vermeiden.

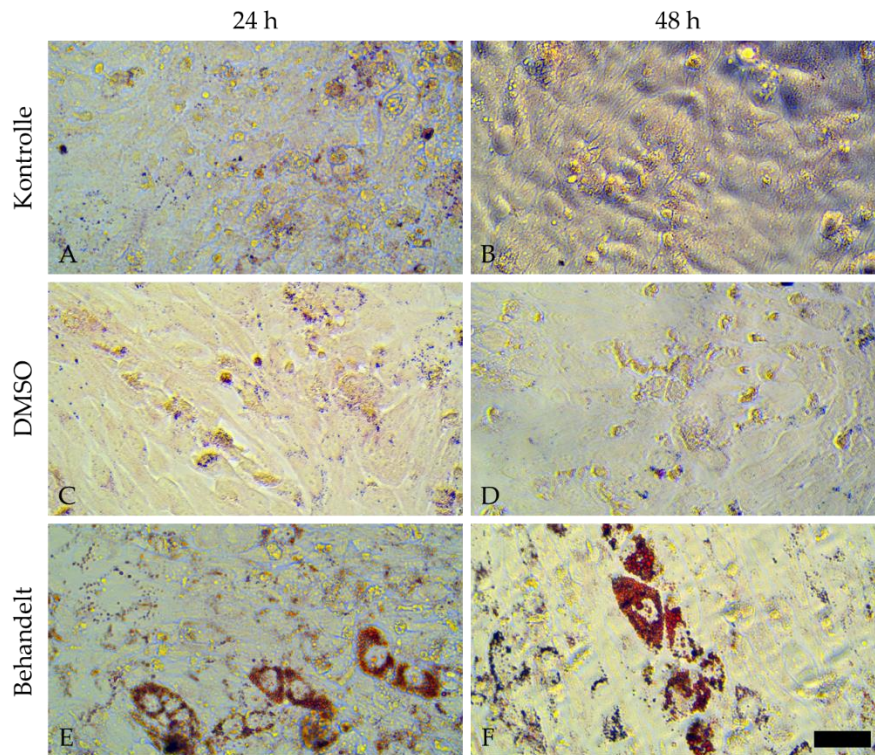


Abbildung 86: Palmitininduzierte Lipideinlagerung in Hepatozyten. Es wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> in einem  $\mu$ -Slide-8-Well ausgesät und für 3 Tage inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel mit 0,4 mM Palmitinsäure, dessen Lösungsmittel DMSO und einer unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung erfolgte für jeweils 24 h und 48 h und wurde durch eine *Oil-Red-O* Färbung der Lipidtröpfchen mithilfe eines Lichtmikroskop visualisiert. Mikroskop: Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, Maßstab = 50  $\mu$ m.

Die Verwendung einer einzigen Fettsäure für die Induktion einer hepatischen Steatose spiegelt die pathophysiologischen Bedingungen in der Leber nicht naturgetreu wieder. Es wird vermutet, dass NAFLD verstärkt durch gesättigte Fettsäuren wie die Palmitinsäure verursacht wird. Jedoch kommt Palmitinsäure immer in Kombination mit ungesättigten Fettsäuren wie der Ölsäure, der Linolsäure oder der  $\alpha$ -Linolensäure vor.<sup>[232,233]</sup> Die Viabilität der LSEC und Hepatozyten wurde deswegen in einer natürlicheren Mischung aus Fettsäuren analysiert. Dabei wurde das von Nagarajan *et al.* etablierte Verhältnis von OPLA für eine ausgewogene Ernährung gewählt und POLA für eine Induktion einer hepatischen Steatose.<sup>[206]</sup> Die Zellen wurden einer 3-tägigen Behandlung von 200  $\mu$ M bzw. 800  $\mu$ M OPLA oder POLA unterzogen. Anschließend wurde die Viabilität mithilfe eines *MTT-Assays* bestimmt (Abbildung 87 C). Die gemessene Fluoreszenz der behandelten Proben wurde auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Die Viabilität ist somit in Abhängigkeit zu den unterschiedlich behandelten Zellen aufgetragen. Keine der untersuchten Mediumkompositionen führt zu einer Reduktion der Zellviabilität. Die LSEC weisen eine konstante Viabilität von 100 % auf. Hingegen führt die Zugabe der Fettsäuren zu einer erhöhten Proliferation der Hepatozyten. Die gesteigerte Viabilität ist jedoch unabhängig bezüglich der unterschiedlichen Medienzusammensetzungen, was von Nagarajan *et al.* in planar kultivierten Huh7-Zellen bereits ermittelt wurde.<sup>[206]</sup> Die erhöhte Viabilität der Zellen durch eine Fettsäuremischung im Vergleich zur reinen Palmitinsäure kann dadurch

erklärt werden, dass Ölsäure und Linolsäure die Hepatozyten vor Palmitinsäure-induziertem oxidativem Stress und Inflammation schützt.<sup>[113,232]</sup> Durch diese Viabilitätsanalyse konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die im vasQchip verwendeten Hepatozyten und LSEC in einem hepatischen Steatose-Modell einsetzbar wären, da sie mit der Literatur vergleichbar auf externe Reize über die zusätzliche Zufuhr von Fettsäuren reagieren. Zudem konnte eine mögliche Toxizität auf die LSEC durch Palmitinsäure nicht verifiziert werden, wenn diese zusammen mit ungesättigten Fettsäuren kultiviert werden. Eine visuelle morphologische Änderung der Hepatozyten und LSEC durch die Behandlung von OPLA und POLA erfolgte mikroskopisch (Abbildung 88). Dafür wurden die Leberzellen für 3 Tage mit 200  $\mu\text{M}$  bzw. 800  $\mu\text{M}$  OPLA oder POLA behandelt.

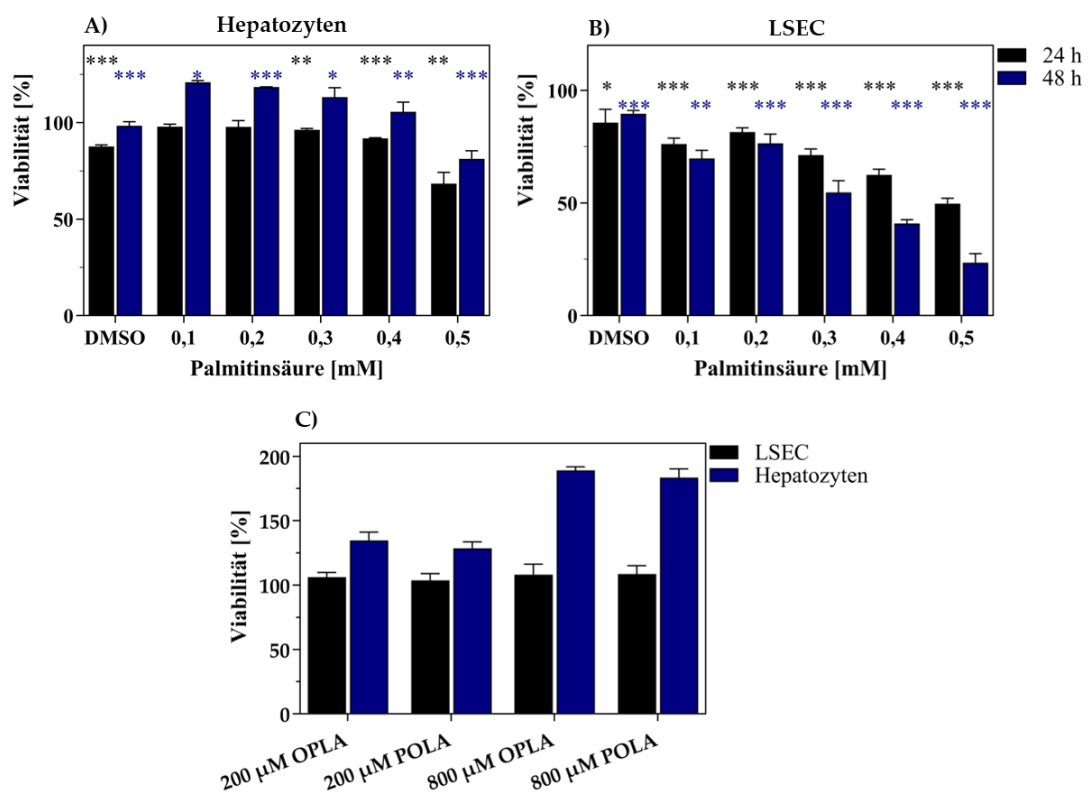


Abbildung 87: Viabilitätsanalyse von Hepatozyten und LSEC nach Behandlung mit verschiedenen Fettsäurekombinationen. Es wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/ $\text{cm}^2$  und  $1 \cdot 10^4$  LSEC/ $\text{cm}^2$  in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage inkubiert. Es folgte ein Medienwechsel mit Palmitinsäure, dessen Lösungsmittel DMSO, einer unbehandelten Kontrolle sowie 200  $\mu\text{M}$  bzw. 800  $\mu\text{M}$  OPLA und POLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure). Die Behandlung erfolgte in C) für 3 Tage und A) und B) für jeweils 24 h und 48 h. Die Viabilität der Zellen wurde durch ein *MTT-Assay* quantifiziert und auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle mit 100 % normiert. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus  $n=3$ . Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

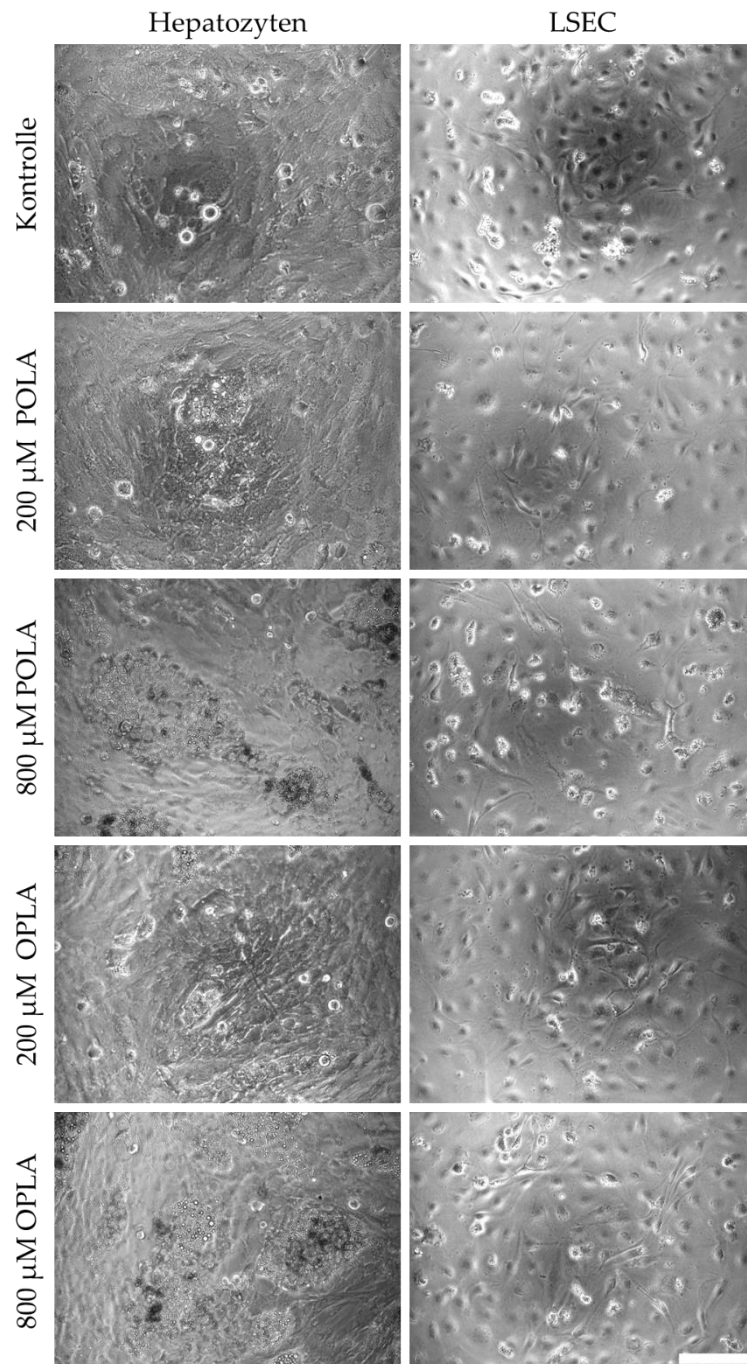


Abbildung 88: Kultivierung von LSEC und Hepatozyten im fettsäurehaltigen Medium für 3 Tage. Es wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> und  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage inkubiert. Es folgte ein Medienwechsel mit 200 µM oder 800 µM OPLA oder POLA (Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure). Die Behandlung erfolgte für 3 Tage und die Morphologie der Zellen wurde durch eine Aufnahme mithilfe eines Lichtmikroskop visualisiert. Mikroskop: Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, Maßstab = 50 µm.

Als Vergleich wurde eine unbehandelte Kontrolle analysiert. Die LSEC weisen keine in Abbildung 88 erkennbaren phänotypischen Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Geng *et al.* konnten keine Palmitin- und Ölsäure induzierten Lipidtropfenakkumulation in HUVEC sowie in primär isolierten Ratten-LSEC nachweisen.<sup>[235]</sup> Die Hepatozyten hingegen reagieren mit einer sichtbaren Lipidtropfenbildung. Diese sind besonders in den 800 µM OPLA und POLA zu



erkennen. Diese Erkenntnis korreliert mit den Befunden von Nagarajan *et al.* Sie konnten eine erhöhte intrazelluläre TAG-Konzentration mit 800  $\mu\text{M}$  OPLA/POLA gegenüber einer Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  dergleichen Fettsäuren nachweisen. Ein eindeutiger morphologischer Unterschied zwischen POLA und OPLA ist durch dieses Verfahren nicht ersichtlich. Eine Färbung der Lipidtröpfchen mit *Oil-Red-O* könnte darüber genaueren Aufschluss geben, war jedoch in diesem Zusammenhang durch zeitliche Einschränkungen nicht mehr möglich.

In diesen ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die im vasQchip verwendeten LSEC und Hepatozyten, grundlegenden Eigenschaften besitzen, welche für eine *in vitro* Rekonstruktion von NAFLD erforderlich sind.

Eine Analyse im fluidischen vasQchip muss noch durchgeführt werden. Der Einsatz des Lebermodells im vasQchip zur *in vitro* Rekonstruktionen der NAFLD ermöglicht deren Untersuchung bezüglich der Fettakkumulation und die damit involvierten biochemischen Prozesse.<sup>[229]</sup> Durch die Verwendung von vaskularisierten 3D-Lebermodellen könnten in einer Langzeitkultivierung die chronischen Effekte der NAFLD analysiert werden, was bisher in 2D-Zellkultur noch nicht möglich ist.<sup>[237]</sup> Somit ist eine Etablierung des NAFLD-Modells im vasQchip ein vielversprechendes Ziel.

### 3.5.2 Erweiterte Dreidimensionalität durch Verwendung eines artifiziellen Gewebes im umgebenden Kompartiment des vasQchips

Um die 3D Leberrekonstruktion im vasQchip weiter voranzutreiben, sollte im umgebenden Kompartiment auch eine 3D-Kultur aus Hepatozyten und Cholangiozyten zur Ausbildung der Gallengänge ermöglicht werden. Dazu müssen die Zellen dem Blutgefäß in einer 3D-Anordnung präsentiert werden, was durch das Einbringen der Zellen in einer Stützmatrix erfolgen. Dabei wird auf bioaktive Materialien gesetzt, die als Stützstruktur für eine räumliche 3D-Zellkultur geeignet sind.<sup>[14,15]</sup> Idealerweise sollten die Zellen die Stützmatrix durch eine ECM ersetzen und so eine gewebeähnliche Zellorganisation kreieren. Gelatine-basierte Hydrogele eignen sich auf Grund ihrer einfachen und vielseitigen Anwendung als Stützmaterialien<sup>[20,44]</sup> Durch eine Methacrylatfunktionalisierung der Gelatine kann das sogenannte GelMA (Gelatine-Metacrylamid), ein semi-synthetisches Hydrogel, quervernetzt werden. Durch photoinduzierte Polymerisation kann dessen viskoelastische Eigenschaft kontrolliert werden.<sup>[42,238]</sup> Durch dessen biologische Kompatibilität und gezielte Vernetzung fand es bereits vielseitig Anwendung im *Tissue Engineering*.<sup>[21,44,238]</sup> Muñoz *et al.* konnten jedoch nachweisen, dass die Zellviabilität in GelMA durch UV-Strahlung, Nebenreaktionen und Nebenprodukte in der photoinduzierten Quervernetzung des Hydrogels beeinträchtigt wird.<sup>[239]</sup> Eine Alternative zu GelMA ist die Norbornen-funktionalisierte Gelatine (GelNB). Die selektive Polymerisation der Norbornengruppen mit Thiolen in einer photoinduzierten Thiol-ene Reaktion reduziert die Radikal-induzierte Zelltoxizität und es wird eine Homopolymerisation desselben Gelatinemoleküls unterbunden, wodurch ein hochdefiniertes homogenes Netzwerk entsteht.<sup>[24]</sup> Basierend auf einer Photoclick-Reaktion führt die Kombination einer thiolierten Gelatine (GelS) mit dem

GelNB zu einer schnell aushärtenden, Crosslinker-freien Hydrogelherstellung.<sup>[22,240]</sup> Durch ein homogenes Netzwerk, reduzierte Photoinitiatorkonzentration und verbesserte Zellviabilität zeichnet sich das GelNB/GelS-Hydrogel gegenüber dem GelMA positiv ab.<sup>[22]</sup> Die geeignete Verwendung von GelMA oder GelNB/GelS für das Lebermodell im vasQchip wurde in Kapitel 3.5.2.1 untersucht. Das Hydrogel soll im umgebenden Kompartiment des vasQchips das Hepatozytengewebe unter dem Sinusoid rekonstruieren. Abbildung 89 den geplanten Aufbau des Hydrogels im umgebenden Kompartiment des vasQchips schematisch wieder. Diese 3D-Erweiterung des vasQchips bietet die Aussicht auf eine noch genauere natürliche Rekonstruktion des Sinusoids. Zudem könnte durch Verwendung von 3D-Biodruckmethoden das verwendete Hydrogel gezielt und in kontrollierter Form in das umgebende Kompartiment eingebracht werden, wodurch weitere Möglichkeiten der strukturellen Rekonstruktion erdenklich wären.<sup>[14]</sup>

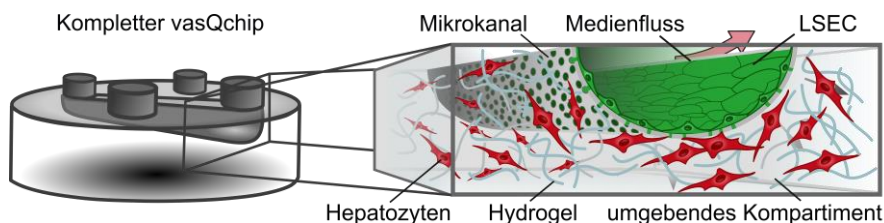
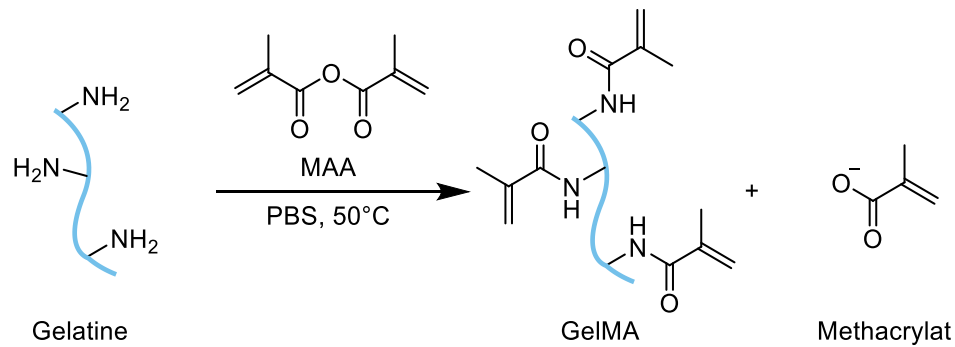


Abbildung 89: Schematische Darstellung der 3D-Umgebung im umgebenden Kompartiment des vasQchip durch den Einsatz von Hydrogelen als Stützmatrix für die räumliche Kultivierung der Hepatozyten. Der perforierte Mikrokanal wird von Lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC) ausgekleidet und mit einem Medienfluss durchströmt.

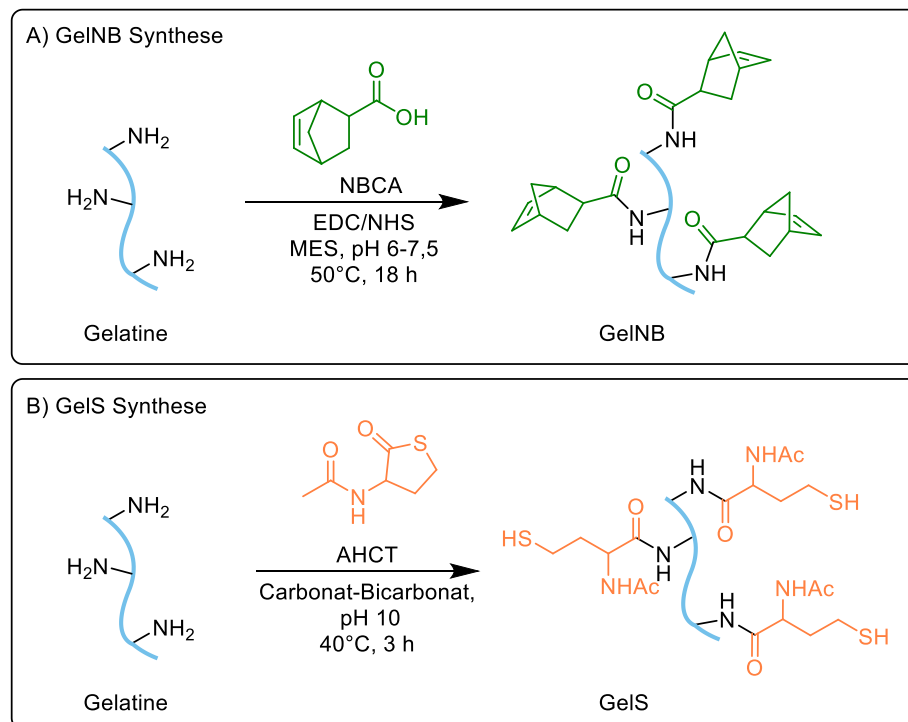
### 3.5.2.1 Voruntersuchungen für die Kultivierung der Hepatozyten im Hydrogel

GelMA, GelNB und GelS wurden von M. Sc. Alisa Grimm und M. Sc. Sonja Leopold (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Schepers) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Dabei erfolgte die in Schema 4 dargestellte GelMA-Synthese nach Van Den Bulcke *et al.*<sup>[42]</sup> Aminhaltige Aminosäuren der Gelatine, wie Lysin und Hydroxylysin reagieren mit Methacrylsäureanhydrid (MAA) in einer nucleophilen Acylsubstitution zu GelMA.<sup>[42,44,238]</sup> GelNB wurde unter lösungsmittelfreien Bedingungen nach Göckler *et al.* hergestellt.<sup>[22]</sup> Analog zu der GelMA-Synthese wurden die Lysinseitenketten der Gelatine funktionalisiert. Dafür wurden zunächst 5-Norbornen-2-Carboxylsäure (NBCA) mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Anschließend wurde Gelatine zu GelNB umgesetzt (Schema 5 A). Die GelS-Synthese erfolgte, wie zuvor von Van Vlierberghe *et al.* berichtet, nach der Schema 5 B) aufgeführten Reaktion.<sup>[40]</sup> Wobei der Thiolacton-Ring von *N*-Acetyl-DL-Homocystein Thiolacton (AHCT) bei einem pH-Wert von 10 durch die beiden nucleophil wirkenden funktionellen Gruppen geöffnet wird.<sup>[22]</sup>



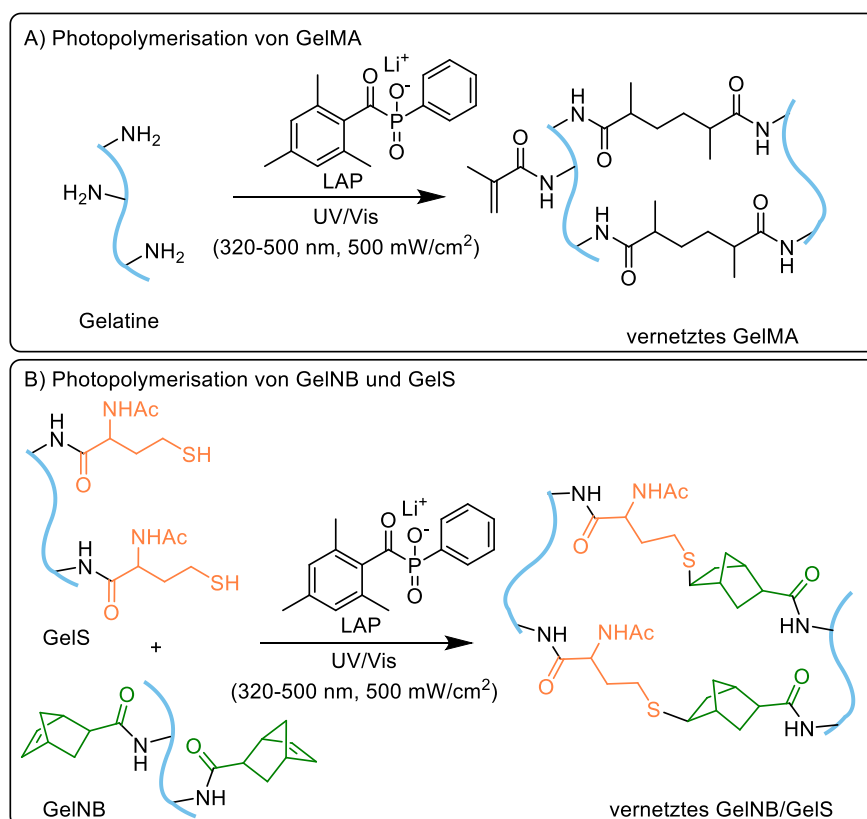
Schema 4: GelMA Synthese nach Van Den Bulcke *et al.*<sup>[42]</sup> Gelatine wird mithilfe von Methacrylsäureanhydrid (MAA) zu GelMA funktionalisiert.

Die synthetisierten Hydrogele wurden auf ihren Funktionalisierungsgrads charakterisiert. Die viskoelastische Eigenschaft der Hydrogele ist dabei abhängig vom Vernetzungsgrad des Hydrogels und steht somit im Zusammenhang mit den verfügbaren photoreaktiven Gruppen. Die freien photoreaktiven Gruppen können quantitativ im Vergleich zur Gelatine bestimmt werden, wodurch sich der Funktionalisierungsgrad definiert.<sup>[22]</sup> Die Hydrogele wurden anhand dessen in die Funktionalisierungsgrade *High* (97 %) und *Medium* (53 %) eingeteilt und analysiert.<sup>[22]</sup> Die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS erlangen ihre viskoelastischen Eigenschaften durch deren Vernetzung in einer Photopolymerisation. Die freien Vinylgruppen der Methacrylatgruppe in GelMA wurden nach Gabe eines Photoinitiators polymerisieren.<sup>[42]</sup> In GelNB/GelS wurde die Vernetzung durch eine Thiol-En Click-Reaktion zwischen dem Thiol von GelS und der Norbornengruppe des GelNB katalysiert.<sup>[22]</sup>



Schema 5: Wasserbasierte Synthese von GelNB und GelS. A) Gelatine wird mit 5-Norbornen-2-Carboxylsäure (NBCA) zu GelNB funktionalisiert. B) GelS wird aus Gelatine und N-Acetyl-DL-Homocysteine Thiolacton (AHCT) synthetisiert. Synthese nach Göckler *et al.*<sup>[22]</sup>

In Schema 6 ist die Vernetzung von GelMA und GelNB/GelS mithilfe des Photoinitiators Lithium Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) abgebildet. LAP ist durch seine biokompatiblen Eigenschaften ein weitverbreiteter Photoinitiator im *Tissue Engineering*.<sup>[22,44,241]</sup> Eine Absorption in einem Spektrum von 380 nm bis ins sichtbare Licht führt zu Radikalen, welche die Kettenpolymerisation von Hydrogelen unterstützen.<sup>[44]</sup> Freie Radikale können jedoch eine zytotoxische oder mutagene Wirkung aufweisen.<sup>[242]</sup> Aufgrund dessen wurde der Photoinitiator zunächst auf eine mögliche Zeit- und Dosis-korrelierende Toxizität gegenüber den Hepatozyten und LSEC untersucht. Die Hepatozyten und LSEC wurden nach einer 3-tägigen Inkubation mit 3 % bis 0,003 % LAP (w/v) für 10 min oder 72 h behandelt und anschließend auf deren Viabilität untersucht. In Abbildung 90 ist die Zellviabilität gegenüber der LAP-Konzentration aufgetragen. Abbildung 90 A) zeigt die Viabilität der Hepatozyten und LSEC nach einer 10-minütigen LAP-Behandlung. Der daraus resultierende IC<sub>50</sub>-Wert für Hepatozyten beträgt 1,9 %, wohingegen bei den LSEC ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1,5 % bestimmt werden konnte. Wird zum Vergleich die toxische Wirkung von LAP nach 72 h in Abbildung 90 B) betrachtet, so ergeben sich IC<sub>50</sub>-Werte von 1,3 % für Hepatozyten und 0,94 % für LSEC. In Analogie zu den LSEC konnten Göckler *et al.* einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,04 % nach einer Behandlungszeit von 24 h auf HUVEC ermitteln.<sup>[22]</sup> Im Vergleich dazu reagieren die Leberzellen nach einer 72-stündigen Inkubation weniger sensibel auf LAP, wobei der IC<sub>50</sub>-Wert der Hepatozyten bei 1,3 % nach 72 h liegt.



Schema 6: Photopolymerisation von GelMA (A) und GelNB und GelS (B) durch Lithium Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) und langwelliges UV-Licht im Bereich von 320 bis 500 nm und einer Bestrahlungsdichte von 500 mW/cm<sup>2</sup>

Durch die Viabilitätsanalyse von LAP auf die im vasQchip eingesetzten Leberzellen, kann eine maximale Konzentration von 0,94 % LAP empfohlen werden. Die Photopolymerisation von GelMA wird üblicherweise mit 0,3 % LAP (w/v) durchgeführt während für ein GelNB/Gels-Hydrogel 0,03 % LAP eingesetzt wird. So können beide Hydrogele bezüglich der LAP-Konzentration bedenkenlos eingesetzt werden. Eine toxische Wirkung durch die Bestrahlung mit UV-Licht wurde durch einen weiteren Viabilitätstest untersucht (Abbildung 90 C). Die Leberzellen wurden für 30 s mit UV-Licht im Bereich von 320 - 500 nm und einer Bestrahlungsdichte von 500 mW/cm<sup>2</sup> bestrahlt und anschließend deren Viabilität mithilfe des *MTT-Assays* quantifiziert. Die Bestrahlungsbedingungen wurden an die Photoinduktion von LAP angepasst. (Abbildung 90 C) zeigt die Viabilität unbehandelter Leberzellen in Abhängigkeit zur UV-Bestrahlung. Die Hepatozyten zeigen im Vergleich zur Kontrolle mit 94 % Viabilität keinen Effekt bezüglich einer UV-Behandlung auf. Im Vergleich dazu weisen LSEC eine erhöhte Proliferation im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle auf. Ein negativer Einfluss durch die UV-Bestrahlung für die Vernetzung der Hydrogele kann somit ausgeschlossen werden. Andere Quellen berichten von vergleichbaren Ergebnissen bezüglich der Zellviabilität durch UV-Bestrahlung.<sup>[22]</sup>

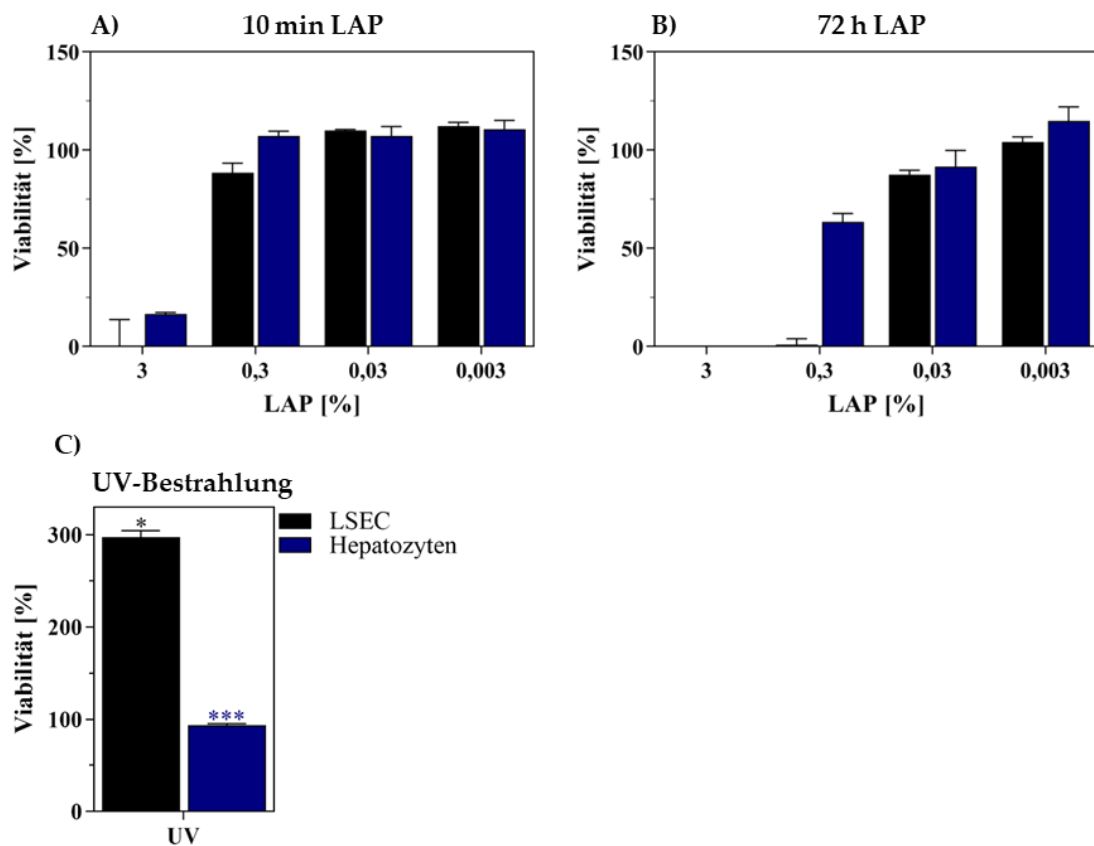


Abbildung 90: Viabilitätsbestimmung von LSEC und Hepatozyten nach Behandlung mit dem Photoinitiator LAP. Es wurden  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup> und  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurde mit 3 %, 0,3 %, 0,03 % und 0,003 % LAP (w/v) für 10 min (A) und 72 h (B) behandelt. C) zeigt die Viabilität der Leberzellen nach einer 30 s UV-Bestrahlung mit 320 - 500 nm und 500 mW/cm<sup>2</sup>. Die Quantifizierung der Viabilität erfolgte mithilfe des *MTT-Assays*. Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\*p < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen und mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Jedoch werden mögliche mutagene, nichtletale Schäden der DNA in diesem Fall nicht berücksichtigt, die aber bekanntermaßen bei diesen Wellenlängen auftreten könnten.<sup>[242]</sup> Aufgrund dessen wurde bei den Photopolymerisationen der Hydrogele auf eine geringe Bestrahlungszeit sowie auf eine niedrige LAP-Konzentration geachtet. Nach erfolgter Untersuchung des Photoinitiators und Einfluss auf die Viabilität der Hepatozyten wurde anschließend deren Wachstumsverhalten und Viabilität im Hydrogel untersucht. Hierfür wurden die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS in ihren Funktionalisierungsgraden *Medium* und *High* mit einer Konzentration von 4 % (w/v) analysiert. Es wurden  $50 \cdot 10^4$  Hepatozyten in 200  $\mu$ l Hydrogel in einer 48-Well-Platte eingesetzt. Für die Vernetzung von GelMA wurden 0,3 % LAP eingesetzt, wohingegen in GelNB/GelS eine LAP-Konzentration von 0,03 % ausreichend war. Beide Hydrogeltypen wurden durch eine Bestrahlung mit 500 mW/cm<sup>2</sup> für 30 s polymerisiert. Nach erfolgter Vernetzung der Hydrogele wurden diese mit dem Kokulturmedium überschichtet und kultiviert. Dabei erfolgte alle 2-3 Tage ein Medienaustausch. GelNB/GelS wurde an Tag 4 und Tag 8 durch eine Lebend-/Tod-Färbung mit Calcein-AM und PI analysiert. GelMA eingeschlossene Hepatozyten wurden an Tag 7 und 14 durch eine Lebend-/Tod-Färbung untersucht. Abbildung 91 zeigt die konfokalmikroskopischen Aufnahmen, in Form von 3D-Projektionen, der markierten nekrotischen Hepatozyten (rot) sowie der mit Calcein-AM markierten viablen Zellen (grün). Eine Tiefenfärbung gibt dabei Auskunft über die räumliche Verteilung der Hepatozyten im Hydrogel. Wird die Morphologie der Hepatozyten in GelMA nach einem Kultivierungszeitraum von 7 Tagen betrachtet, so ist in den Abbildung 91 G und J nur eine kugelige Morphologie erkennbar. Erst nach insgesamt 14 Tagen konnte in GelMA *High* eine Ausrichtung der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 91 K). Während GelMA in den unterschiedlichen Vernetzungsgraden neben einer erhöhten Toxizität keine, bis deutlich verzögerte Ausstreckung der Zellen zeigt, sind bereits nach 4 Tagen in den GelNB/GelS-Hydrogelen ausgestreckte Zellen vorhanden. Durch die Lebend-/Tod-Färbung lassen sich eindeutig die metabolisch aktiven Zellen im Vergleich zu den toten, nekrotischen Zellen identifizieren. Werden die Hepatozyten in GelMA *Medium* und *High* an Tag 3 verglichen, so waren in GelMA *Medium* 59 % und im GelMA *High* 50 % tote Zellen zu erkennen. Die zeitliche Analyse des Wachstumsverhalten der Hepatozyten in den unterschiedlichen Hydrogelen hat ergeben, dass GelNB/GelS eine schnellere Ausstreckung der Zellen hervorruft als in GelMA. Deren Verhalten ist GelMA um ca. 7 Tage verzögert nachzuweisen. Zudem konnte durch die Lebend-/Tod-Färbung eine erhöhte Reduktion der Viabilität in GelMA *Medium* ermittelt werden. Dieser Unterschied könnte durch die Abweichung in der LAP-Konzentration erklärt werden. Für die Polymerisation von GelNB/GelS wird 0,03 % LAP eingesetzt, wohingegen in GelMA die zehnfache Konzentration, 0,3 % verwendet wird.<sup>[22]</sup> Dieses Verhalten wird durch die Toxizitätsanalyse des Photoinitiators zudem in Abbildung 87 A) und B) bestätigt. Für die 3D-Kultivierung von Hepatozyten in einer Stützstruktur wird deswegen das GelNB/GelS *High* empfohlen. Für die in Kapitel 3.5.2.2 vorgestellte 3D-Erweiterung des umgebenden Kompartiments im vasQchip wurde somit ausschließlich GelNB/GelS verwendet.

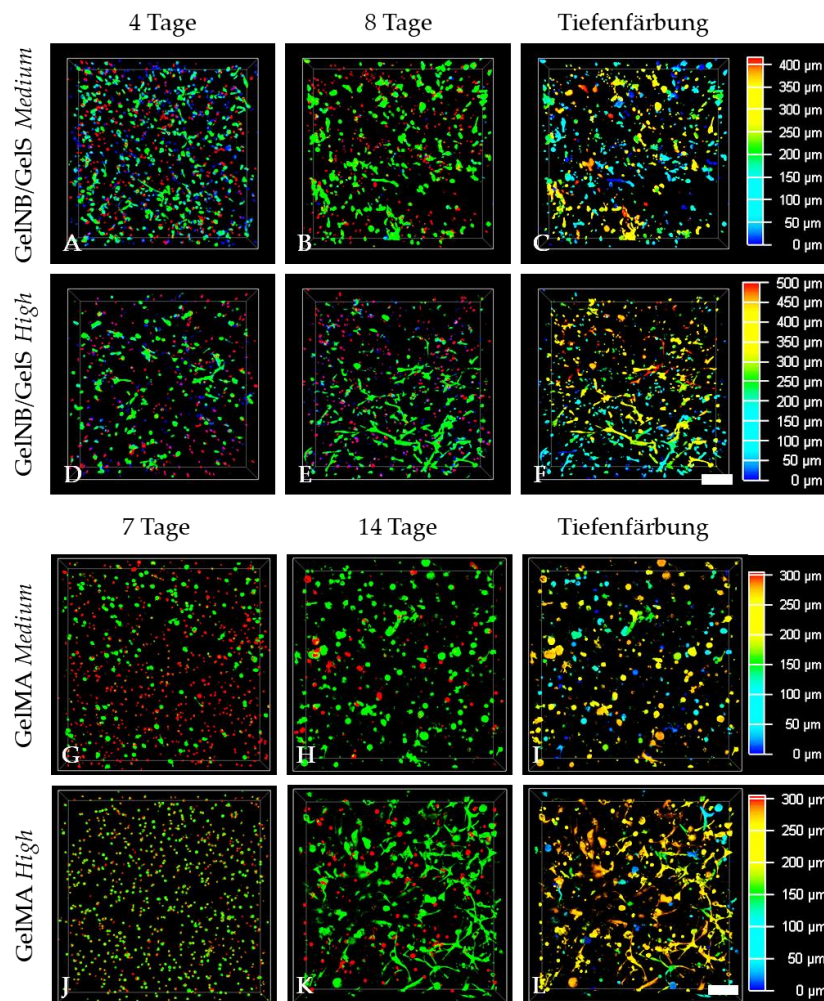


Abbildung 91: Lebend-/Tod-Färbung in Gelatine-basierten Hydrogelen.  $50 \cdot 10^4$  Hepatozyten/Well wurden in den unterschiedlichen Hydrogelen GelMA *Medium* und *High* und GelNB/GelS *Medium* und *High* eingebracht. Die Zellviabilität wurde durch eine Markierung der lebenden Zellen mit Calcein-AM bestimmt, während nekrotische Zellen mit Propidiumiodid (PI) markiert wurden. In GelNB/GelS wurde nach jeweils 4 und 8 Tagen eine Markierung und in GelMA nach 7 und 14 Tagen durchgeführt. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-Stack* Messungen durchgeführt, deren 3D-Projektionen abgebildet sind. Zur Veranschaulichung der räumlichen Struktur des Hydrogels wurden in C, F, I und L die Tiefenfärbungen dargestellt.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ) Rot: PI ( $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 636 \text{ nm}$ ), Grün: Calcein-AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ), Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, *z-Stack* Parameter:  $5 \mu\text{m}$  zwischen jeder Aufnahme, für 300 bis  $500 \mu\text{m}$ , Maßstab =  $200 \mu\text{m}$ .

GelNB/GelS bietet zudem den Vorteil einer homogenen Vernetzung und eine mögliche Anwendung im 3D-Biodruck.<sup>[22]</sup> Hydrogele finden in der Leberforschung bereits eine vielseitige Anwendung. Funktionalisierte Hydrogele mit beispielsweise Norbornen, oder Galactose werden dabei eingesetzt um die Funktionalität von Hepatozyten zu verlängern und zu erhalten.<sup>[243–245]</sup> Außerdem wird bereits an einer Spezialisierung der Stützmatrix für Lebermodelle geforscht. Dafür werden unter anderem dezellularisierte ECMs organischen Ursprungs verwendet, welche in Kombination mit GelMA für eine natürlichere bioaktive Umgebung für Hepatozyten sorgen.<sup>[246]</sup> Somit bietet die Kultivierung von Hepatozyten in Hydrogelen ein weitgefächertes Potential für zukünftige Anpassungen und Anwendungen, welche eine *in vitro* Rekonstruktion der Leber zunehmend verbessert.

### 3.5.2.2 Applikation des Hydrogels im vasQchip

Im Folgenden wird die Erweiterung des in Kapitel 3.3.2.1 etablierten Lebermodells durch ein artifizielles Gewebe im umgebenden Kompartiment untersucht. Dr. Vanessa Kappings (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schepers) hat unter anderem in ihrer Dissertation bereits erfolgreich GelMA im umgebenden Kompartiment eingesetzt um eine vaskularisierte Dermis näherungsweise zu rekonstruieren.<sup>[45]</sup> Für eine verbesserte Rekonstruktion des Sinusoids im vasQchip wurde das in Kapitel 3.5.2.1 ermittelte GelNB/GelS *High* eingesetzt. Zunächst wurden  $50 \cdot 10^4$  Hepatozyten in 200  $\mu\text{l}$  eines 4 %igen GelNB/GelS *High*-Hydrogel im umgebenden Kompartiment eingebracht. Die Vernetzung des Hydrogels erfolgte mithilfe von 0,03 % LAP (w/v), einer Bestrahlungsdichte mit  $500 \text{ mW/cm}^2$  und einer Wellenlänge von 375 nm für 30 s. Am darauffolgenden Tag wurde der Mikrokanal an die Mikrofluidikpumpe angeschlossen und bei einem Volumenstrom von  $50 \mu\text{l/min}$  für 6 Tage kultiviert. In Abbildung 92 A-D ist deren qualitative Auswertung mithilfe einer Lebend-/Tod-Färbung in einer *z-Stack* Projektion der konfokalmikroskopischen Aufnahmen abgebildet. Die horizontale Aufnahme in Abbildung 92 B) und deren Tiefenfärbung in C) zeigt eindeutig eine Aussparung des Mikrokanals im Hydrogel. Insgesamt ist eine homogene Zellverteilung mit überwiegend viablen, ausgerichteten Zellen zu sehen. Das Hydrogel ist jedoch nicht ausreichend hoch genug, um das komplette umgebende Kompartiment zu befüllen. Dies wird ersichtlich durch die geringe Zellzahl über der Wölbung des Mikrokanals in Abbildung 92 B). Deswegen wurde für die Kokultur mit LSEC im Mikrokanal mit einer rechteckigen Gussform (2,2 cm lang, 2 mm breit, 5 mm hoch) für das Hydrogel gearbeitet, welches eine Lokalisierung des Gels spezifisch um den Mikrokanal erzeugt. In Abbildung 92 F) - H) wird die Lebend-/Tod-Färbung der kokultivierten Hepatozyten im Hydrogel und LSEC im fluidischen Mikrokanal des vasQchips abgebildet. Dafür wurden wie zuvor  $50 \cdot 10^4$  Hepatozyten in 200  $\mu\text{l}$  eines 4 %igen GelNB/GelS *High*-Hydrogels im umgebenden Kompartiment eingebracht und vernetzt. Nach einer 3-tägigen statischen Inkubation wurden  $10 \cdot 10^4$  LSEC nach der etablierten Methode im Mikrokanal eingebracht und am folgenden Tag mit der Mikrofluidik verbunden. Nach einer fluidischen Kultivierung von 3 Tagen bei einem Volumenstrom von  $50 \mu\text{l/min}$  wurde anhand einer Lebend-/Tod-Färbung die Viabilität bzw. die Ausrichtung der Leberzellen analysiert. Die unterschiedlichen 3D-Projektionen der konfokalmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 92 F) – H) geben einen Überblick über die räumliche Verteilung und Viabilität der eingebetteten Hepatozyten im Hydrogel. Durch die Tiefenfärbung in I) – K) wurde die homogene dreidimensionale Verteilung der Zellen in der Stützmatrix bestätigt. Die zu 66 % viablen Hepatozyten im Hydrogel weisen eine zelluläre Ausrichtung auf. Die Verwendung einer rechteckigen Gussform erzielte den gewünschten Effekt eines höheren Hydrogels über dem Mikrokanal des vasQchips. So weist dieses nun eine Höhe von  $400 \mu\text{m}$  auf, wohingegen ohne Gussform nur eine Höhe von  $40 \mu\text{m}$  erreicht wurde. Die Lebend-/Tod-Färbung zeigt zudem die konfluente, viable Zellschicht der LSEC im Mikrokanal. Durch die vorläufige Etablierung des GelNB/GelS-Hydrogels im umgebenden Kompartiment des vasQchips, eröffnet eine Vielzahl an potenziellen Anwendungsmöglichkeiten.



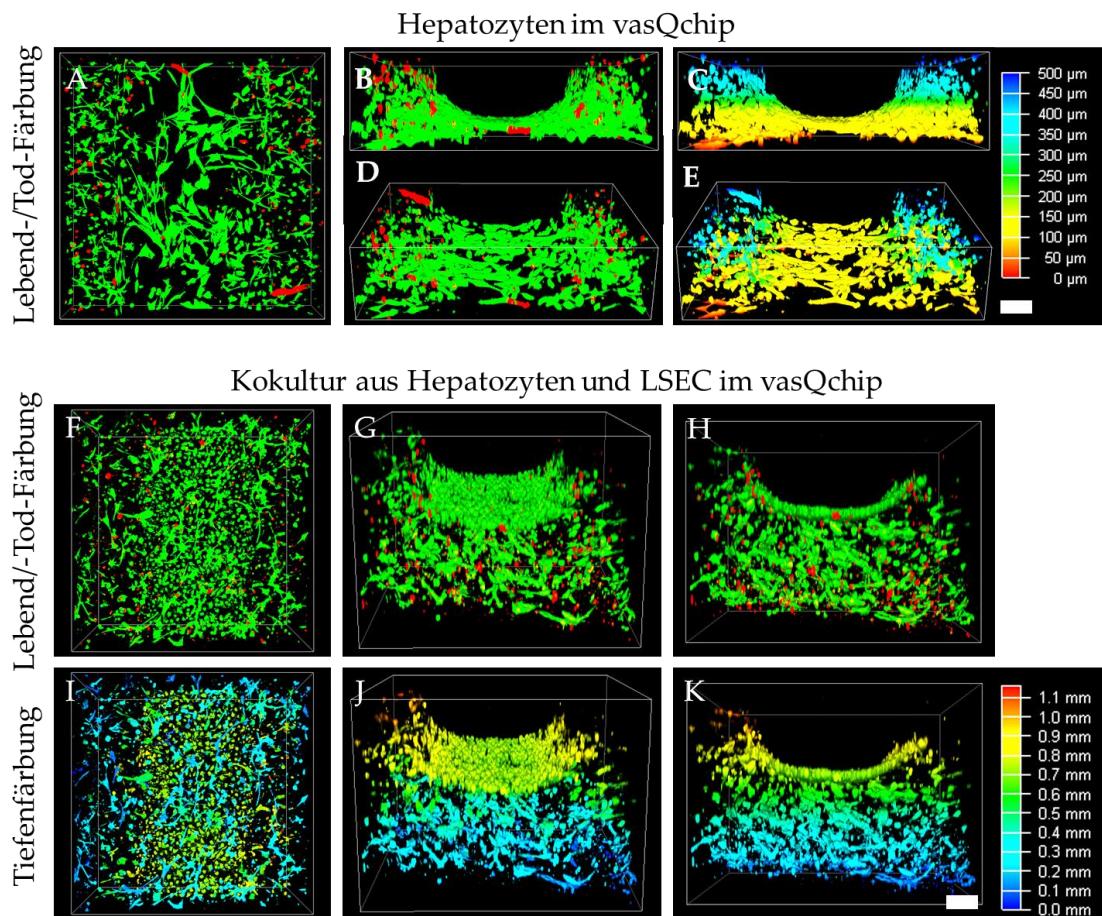


Abbildung 92: 3D-Erweiterung im umgebenden Kompartiment des vasQchips durch Anwendung des GelNB/GelS-Hydrogels.  $50 \cdot 10^4$  Hepatozyten wurden in  $200 \mu\text{l}$  GelNB/GelS *High* eingebettet und im umgebenden Kompartiment mithilfe von  $0,03\%$  LAP und einer Bestrahlung von  $30 \text{ s}$  bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  ausgehärtet. A) - E) wurden für 6 Tage an der Mikrofluidikpumpe bei einem Volumenstrom von  $50 \mu\text{l/min}$  kultiviert. In F) – K) wurden nach einer 3-tägigen statischen Inkubation des Hydrogels  $10 \cdot 10^4$  LSEC in den Mikrokanal eingebracht. Am darauffolgenden Tag wurde der Mikrokanal an die Mikrofluidikpumpe angeschlossen und für 3 Tage kultiviert. Die Viabilität der Zellen im vasQchip Lebersystem wurde mithilfe der Lebend-/Tod-Färbung durch Calcein-AM und Propidiumiodid (PI) analysiert. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-Stack*-Messungen durchgeführt und deren 3D-Projektionen in A), B), D) und F) -H) dargestellt. A), F) und I) zeigt die laterale Ansicht wohingegen C), H) und K) die horizontale Seitenansicht zeigt.

Rot: PI ( $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 636 \text{ nm}$ ), Grün: Calcein-AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ), Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, *z-Stack* Parameter:  $5 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Aufnahmen, für 300 bis  $500 \mu\text{m}$ , Maßstab =  $200 \mu\text{m}$

So könnte durch den Einsatz von 3D-Biodruckmethoden eine definierte Hydrogelstruktur erzeugt werden, die eine Schichtung mit unterschiedlichen Zellkompositionen in der Biotinte erlaubt. Göckler *et al.* konnten die Verwendung des GelNB/GelS-Hydrogels als Biotinte für den spezifischen 3D-Druck von gezielten Hydrogelformen mit integrierten Zellen bereits erfolgreich etablieren.<sup>[22]</sup> Durch die hohe Modularität der 3D-Biodruckmethode ist es möglich auf schnelle und einfache Weise neue Strukturen und Bioumgebungen entsprechend den Anforderungen zu erschaffen.<sup>[41]</sup> Das ist ein Vorteil gegenüber dem vasQchip, dessen Struktur nur durch weitaus mehr Aufwand verändert werden kann. Deswegen wäre es von großer Bedeutung, wenn auch die LSEC mit dem GelNB/GelS kompatibel sind. So könnte das

Hydrogel die räumliche Stützfunktion des Mikrokanals übernehmen und wäre entsprechend den Anwendungsbedingungen modular formbar. Erste positive Untersuchungen bezüglich der LSEC-Viabilität gegenüber LAP und der UV-Strahlung wurden bereits in Kapitel 3.5.2.1 unternommen. Zukünftig sollte noch ein konfluentes Wachstum der LSEC auf dem Hydrogel verifiziert werden. Mit dieser Arbeit sind jedoch erste vielversprechende Grundlagen für ein Hydrogel-basiertes Lebermodell etabliert worden. Eine verbesserte Zellfunktionalität und mechanische Eigenschaften werden bereits heute durch Multikomponentenhydrogele erzeugt.<sup>[247]</sup> Zukünftig könnte durch Kombinationen unterschiedlicher bioaktiver Komponenten im Hydrogel das Verhalten, die Viabilität und die Funktionalität von Zellen organspezifisch optimiert werden. Kizawa *et al.* haben bereits ein Verfahren entwickelt, welches nicht auf eine Stützmatrix angewiesen ist, aber dennoch einen positiven Einfluss auf die Zellfunktion von Leberzellen hat.<sup>[248]</sup> Durch Kombination dieser vielfältigen Ansätze für die 3D-Rekonstruktion der Leber können zukünftig artifizielle Lebermodelle hergestellt werden, welche die *in vivo* Bedingungen widerspiegeln, Tierversuche obsolet machen sowie zu einer effizienten Wirkstoffforschung führen.

### 3.5.3 Differenzierte Leberzellen – Die alternative, erneuerbare Leberzellenquelle aus Stammzellen

Die steigende Anzahl an Lebererkrankungen und eine erhöhte Nachfrage an orthotrophischen Lebertransplantationen, lässt die Leberforschung alternative Ansätze der Behandlung und Forschung einschlagen. Dazu zählt unter anderem die Verwendung von differenzierten Leberzellen aus humanen induzierten, pluripotenten Stammzellen (hiPSC).<sup>[249]</sup> Diese sind eine valide Alternative zu primärisolierten Leberzellen, welche begrenzt verfügbar sind und eine limitierte funktionelle Lebensspanne haben.<sup>[249,250]</sup> hiPSC zeichnen sich als vielseitige, hoch modulare potenzielle Alternative ab. Sie sind im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ethisch weniger fragwürdig, da sie aus unterschiedlichen bereits differenzierten Zelltypen rückprogrammiert werden.<sup>[249,251]</sup> Die Differenzierung von Hepatozyten, LSEC, Kupfferzellen und Stellatzellen wurden bereits erfolgreich nachgewiesen.<sup>[250,252–254]</sup> Wodurch die Grundlagen geschaffen sind, ein Lebermodell ausschließlich aus differenzierten Leberzellen zu erschaffen. Die hiPSC könnten auch im etablierten Lebermodell des vasQchips ihre Anwendung finden. Es könnten die funktionellen Eigenschaften der differenzierten Leberzellen im *Organ-on-a-Chip* Modell weiter den *in vivo*-Bedingungen angepasst werden. Infolgedessen wurde in dieser Arbeit die mögliche Verwendung differenzierter LSEC im vasQchip untersucht. Im folgenden Abschnitt wurde zunächst die Pluripotenz der hiPSC analysiert und diese anschließend in LSEC differenziert.

#### 3.5.3.1 Pluripotenznachweis der Stammzellen

Pluripotente Stammzellen können entweder aus embryonalen Stammzellen oder durch Induktion von bereits differenzierten Zellen gewonnen werden.<sup>[249]</sup> Die Induktion der differenzierten Zellen erfolgt über die somatische Reprogrammierung mit den vier Faktoren Oct3/4, SOX2, Klf-4 sowie c-myc und wurde erstmalig von Takahashi *et al.* publiziert.<sup>[251]</sup> Induzierte pluripotente Stammzellen können sich nahezu unbegrenzt teilen und sind für Differenzierungen in alle drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) einsetzbar, was die Voraussetzung ist, um fast jeden Zelltyp des menschlichen Körpers differenzieren zu können.<sup>[249]</sup> Die in dieser Arbeit verwendeten hiPSC, die sogenannte WTC11 hiPSC-Linie wurde aus menschlichen Fibroblasten rückprogrammiert.<sup>[255,256]</sup> Bevor sie einer Differenzierung unterzogen wurden, erfolgte ein Pluripotenznachweis durch Immunfluoreszenzmarkierung spezifischer Pluripotenz-Marker sowie eine fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie. Oct3/4 und Nanog sind Transkriptionsfaktoren, welche in Stammzellen stark exprimiert werden. Zusammen sind sie unter anderen für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in embryonischen Stammzellen verantwortlich.<sup>[249,255,257,258]</sup> Beide Marker werden sowohl für die Reprogrammierung von somatischen Zellen zu iPSCs als auch für den Differenzierungsverlauf von iPSCs zu somatischen Zellen eingesetzt.<sup>[251,256]</sup> In Abbildung 93 ist die qualitative Analyse der Pluripotenz von WTC11 durch eine Immunfluoreszenzmarkierung von Nanog und Oct3/4 (Maus Anti-human Nanog Primärantikörper/ Ziege Alexa Fluor®488 Anti-Mouse Sekundärantikörper; Kaninchen

Anti-human Oct-3/4 Primärantikörper/ Hühnchen Alexa Fluor®-647 Anti-Kaninchen Sekundärantikörper) nachgewiesen.  $3 \cdot 10^4$  WTC11/cm<sup>2</sup> wurden in einem  $\mu$ -Slide-8-Well für 3 Tage kultiviert und anschließend auf die Immunfluoreszenzmarkierung mithilfe einer Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen vorbereitet. In Abbildung 93 wird die Pluripotenz der hiPSC durch die Immunfluoreszenz von Oct3/4 und Nanog mikroskopisch nachgewiesen. Zudem wurde eine quantitative Analyse des Oct3/4 positiven WTC11-hiPSC Populationsanteils mithilfe der Durchflusszytometrie ermittelt, welche in Zusammenarbeit mit M. Sc. Juliana Pfeifer (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, Arbeitskreis Prof. Schepers) durchgeführt wurde. Es wurden fixierte, permeabilisierte und blockierte WTC11 mit Maus Anti-human Oct3/4-PE-Antikörper, oder dessen Isotypkontrolle (Maus PE konjugierter Anti-IgG1 Antikörper) konjugiert. Unbehandelte fixierte WTC11 dienten als Negativkontrolle. Anschließend wurde mithilfe der Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der Oct3/4 positiven Zellen quantifiziert. Eine Fluorophor-spezifische Anregung während der Durchflusszytometrie verursacht eine Fluoreszenz des Fluorophor, sowie Streulicht jeder Zelle, welches durch eine Photodiode erfasst und quantifiziert werden kann.<sup>[259]</sup> Durch das Verhältnis an Streuung und spezifischer Fluoreszenz kann die Zellpopulation bezüglich positiv markierter Zellen analysiert werden. Abbildung 94 zeigt die Anzahl der gemessenen Events ausgelöst durch durchfließende, angeregte WTC11 gegenüber der markierten WTC11 durch die Fluoreszenz von Anti-Oct3/4-PE. Die Isotypkontrolle wird zur Verifizierung der spezifischen Bindung von Anti-Oct3/4-PE eingesetzt. Anhand der in Abbildung 94 präsentierten Daten konnte ein 93,3 %iger Populationsanteil mit einer positiven Oct3/4-Markierung ermittelt werden. Dieses Ergebnis lässt auf ein 93,3 % Anteil an pluripotenten WTC11 in deren Population zurückschließen. Das Verhältnis von pluripotenten Stammzellen gegenüber zufällig differenzierten Zellen ist ausschlaggebend für eine erfolgreiche, spezifische Differenzierung der hiPSC.

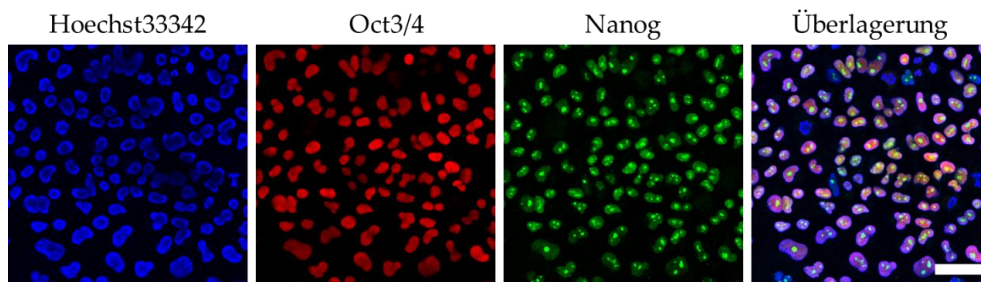


Abbildung 93: Immunfluoreszenz-Untersuchung der Pluripotenz der hiPSC-Linie WTC11.  $3 \cdot 10^4$  WTC11/cm<sup>2</sup> wurden in einem  $\mu$ -Slide-8-Well bis zur Konfluenz kultiviert, mit anschließender Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindestellen. Oct3/4 und Nanog wurden mithilfe einer Immunfluoreszenzmarkierung (Maus Anti-human Nanog Primärantikörper/ Ziege Alexa Fluor®488 Anti-Mouse Sekundärantikörper; Kaninchen Anti-human Oct-3/4 Primärantikörper/ Hühnchen Alexa Fluor®-647 Anti-Kaninchen Sekundärantikörper) und konfokalmikroskopisch visualisiert. Zudem wurde die DNA im Zellkern durch eine Hoechst33342-Markierung veranschaulicht.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 465$  nm), Rot: Oct3/4 ( $\lambda_{\text{ex}} = 658$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 675$  nm), Grün: Nanog ( $\lambda_{\text{ex}} = 499$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 520$  nm), Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, Maßstab = 50  $\mu$ m.

Bereits differenzierte Zellen werden nicht mehr in die gewünschten Zelltypen differenziert und vermindern so die Ausbeute in einer Differenzierung. In der Literatur werden Stammzellen mit einem Oct3/4 Anteil von ca. 90 % als pluripotent eingestuft.<sup>[260]</sup> 93,3 % nachgewiesene Pluripotenz durch Oct3/4 und eine einheitliche Immunfluoreszenzmarkierung in Abbildung 93 bieten somit eine hervorragende Ausgangsposition für die Differenzierung der LSEC, welche im folgenden Kapitel besprochen wird.

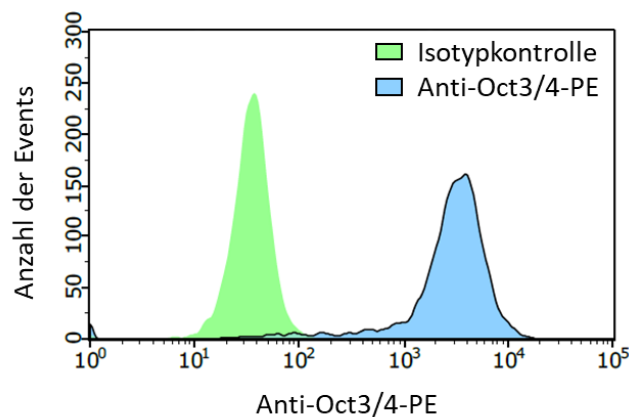


Abbildung 94: Pluripotenanzanalyse von WTC11 mithilfe der Durchflusszytometrie.  $3 \cdot 10^6$  WTC11 wurden fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden jeweils  $1 \cdot 10^6$  WTC11 mit entweder Oct3/4-PE oder der Isotypenkontrolle konjugiert, unbehandelte WTC11 dienten zur Kontrolle der Immunmarkierung. Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte die Anzahl der mit Oct3/4-PE positiv markierten hiPSC quantifiziert werden.

Durchflusszytometer: Guava® easyCyte™. Entstanden in Zusammenarbeit mit M. Sc. J. Pfeifer.

### 3.5.3.2 Differenzierung von LSEC aus hiPSC

Eine erfolgversprechendes Differenzierungsprotokoll orientiert sich an den embryonalen Entwicklungsstadien des Zelltyps.<sup>[261]</sup> Im Mausmodell wurde ein venöser Ursprung der Lebergefäße ermittelt.<sup>[262]</sup> Die Differenzierung von Arterien und Venen wird in der frühen Embryogenese durch die Bildung von Angioblasten aus dem Mesoderm unter dem Signalweeinfluss von Hedgehog, Notch und dem vaskular-endotheliale Wachstumfaktor (VEGF) festgelegt.<sup>[263,264]</sup> Diese grundlegenden Erkenntnisse hat Kouli *et al.* angewendet und eines der ersten Differenzierungsprotokolle für LSEC entwickelt. Innerhalb von 27 Tagen ist es möglich LSEC ähnliche Zellen aus hiPSC zu generieren.<sup>[250,265]</sup> In Abbildung 95 ist der schematische Ablauf der LSEC-Differenzierung dargestellt. Zugleich wurde die in dieser Arbeit durchgeführte Differenzierung anhand von Aufnahmen mit dem inversen Lichtmikroskop verfolgt und in Abbildung 95 dargestellt. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Zytokinen wurden die hiPSC in Stadium 1 in mesodermale Zellen differenziert. Dabei erfolgte zu Beginn der Differenzierung, ausgelöst durch eine zellabweisende Oberfläche, eine Kultivierung in einer dreidimensionalen Zellaggregatform. Deren mikroskopischen Aufnahme ist in Abbildung 95 A) dargestellt. Die mesodermalen Zellen wurden an Differenzierungstag 13 durch eine magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS®) selektiv nach CD34 positiven Zellen

sortiert. Diese Methode verwendet eine spezifische, antikörpervermittelte (FITC konjugierter Anti-human CD34 Primärantikörper/ MicroBeads gekuppelter Anti-FITC Sekundärantikörper) Markierung durch magnetische Mikropartikel. Durch ein angelegtes Magnetfeld werden markierte Zellen zurückgehalten, während unmarkierte Zellen ungehindert passieren.<sup>[266]</sup> Der morphologische Unterschied der selektierten Zellen und des Durchflusses wird in Abbildung 95 C und D ersichtlich. Die zwei selektierten Zellpopulationen der endothelialen Vorläuferzellen wurden in Stadium 3 zu LSEC-Vorläufer expandiert und in Stadium 4 final zu LSEC differenziert. In Stadium 5 liegen laut Kouji *et al.* ausdifferenzierte LSEC vor. Abbildung 95 H zeigt eine konfluente Zellschicht, welche im Vergleich mit kommerziell erworbenen LSEC (Abbildung 95 I) eine ähnliche Morphologie aufweisen. Für eine explizite Analyse des Differenzierungsvorganges wurde diese mithilfe einer Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 verfolgt. CD31 ist ein Zelladhäsionsprotein welches als Endothelzell-Marker verwendet wird und in LSEC verstärkt im Cytoplasma auftritt.<sup>[90]</sup> In Abbildung 96 erfolgte eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 im Verlauf der LSEC-Differenzierung, welche in Abbildung 95 bereits erwähnt wurde. Parallel dazu wurden die Zellkerne und das Aktizytoskelett wie bereits beschrieben mit Hoechst33342 und Phalloidin-TRITC markiert, um die gesamte Zellpopulation in den jeweiligen Differenzierungsstadien zu identifizieren. So wird in Abbildung 96 A-D des Stadiums 2 erkennbar, dass nur vereinzelt Zellen positiv mit CD31 markiert wurden. Durch eine MACS®-Sortierung der CD34<sup>+</sup> Zellen in Abbildung 96 K) und der negativ selektierten Population in Abbildung 96 G) ein Unterschied bezüglich der Konfluenz der Zellen, sowie der CD31-Markierung deutlich. Die Selektierung der Zellen bezüglich CD34 führte somit eindeutig zu einer Anreicherung CD31-exprimierender Zellen. Die laut Kouji *et al.* so gewonnenen endothelialen Vorläuferzellen können so in den ersten Stadien nachgewiesen werden.<sup>[250]</sup> Werden die positiv selektierten Vorläuferzellen zu LSEC weiter differenziert, zeigen die Abbildung 96 M-T einen Fortbestand der homogenen CD31-Markierung, sowie eine konfluente Zellschicht.

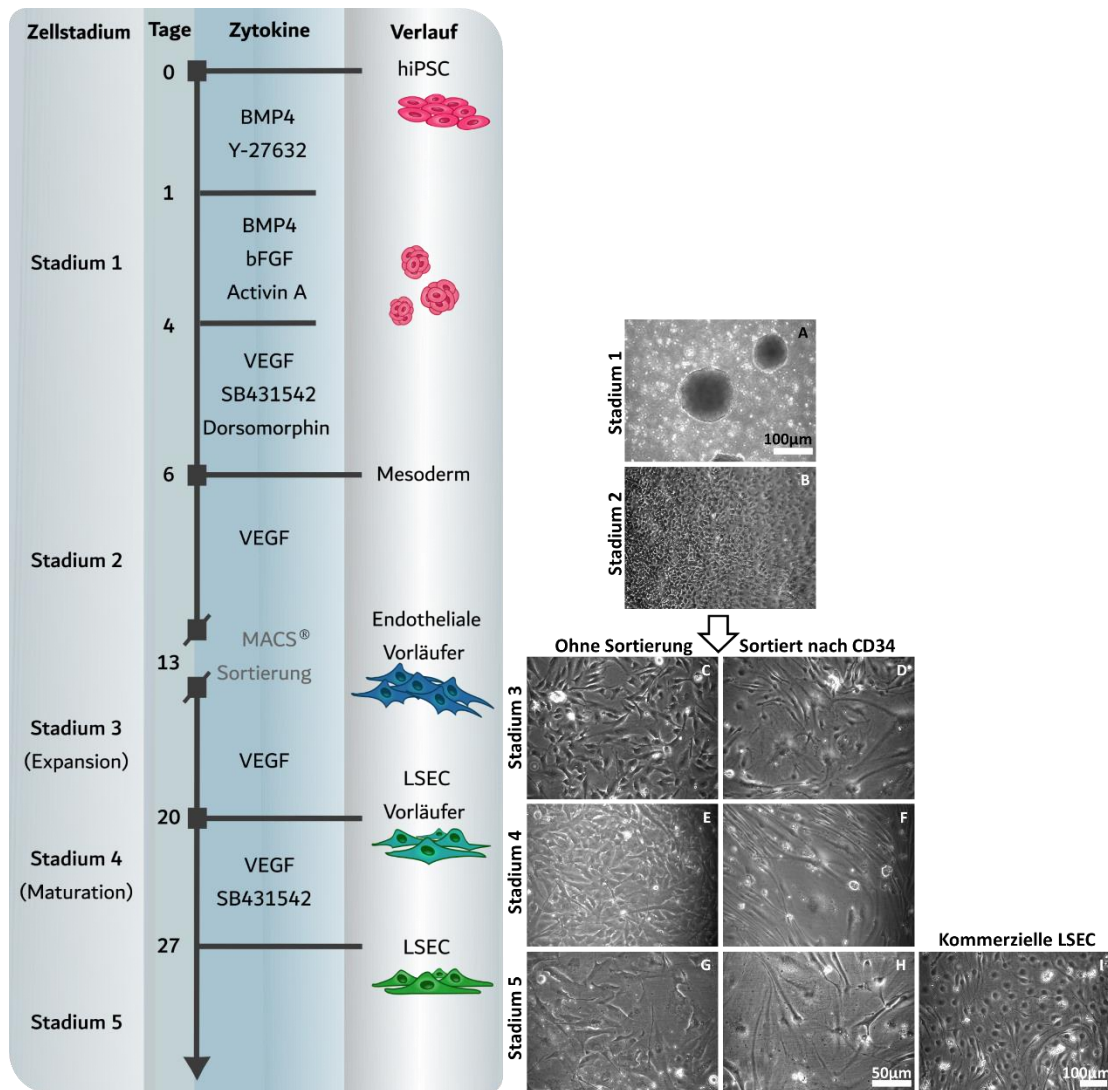


Abbildung 95: Schematische Darstellung der LSEC-Differenzierung nach Kouji *et al.* Innerhalb von 27 Tagen können anhand dieses Protokolls aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) LSEC differenziert werden. Dabei erfolgt zunächst eine mesodermale Differenzierung, die durch eine CD34-spezifisch magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS®) endotheliale Vorläuferzellen gewonnen werden. Durch eine 7-tägige Expansion der Zellen werden im finalen Schritt die LSEC-Vorläufer zu gereiften LSEC differenziert. In Abbildung A-H wurde die LSEC-Differenzierung aus der hiPSC-Linie WTC11 verfolgt und mit kommerziellen LSEC verglichen (Abbildung I).

Mikroskop: Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, Maßstab = 100 µm (A + I) und 50 µm (B - H).  
Abbildung nach Kouji *et al.*<sup>[250]</sup>

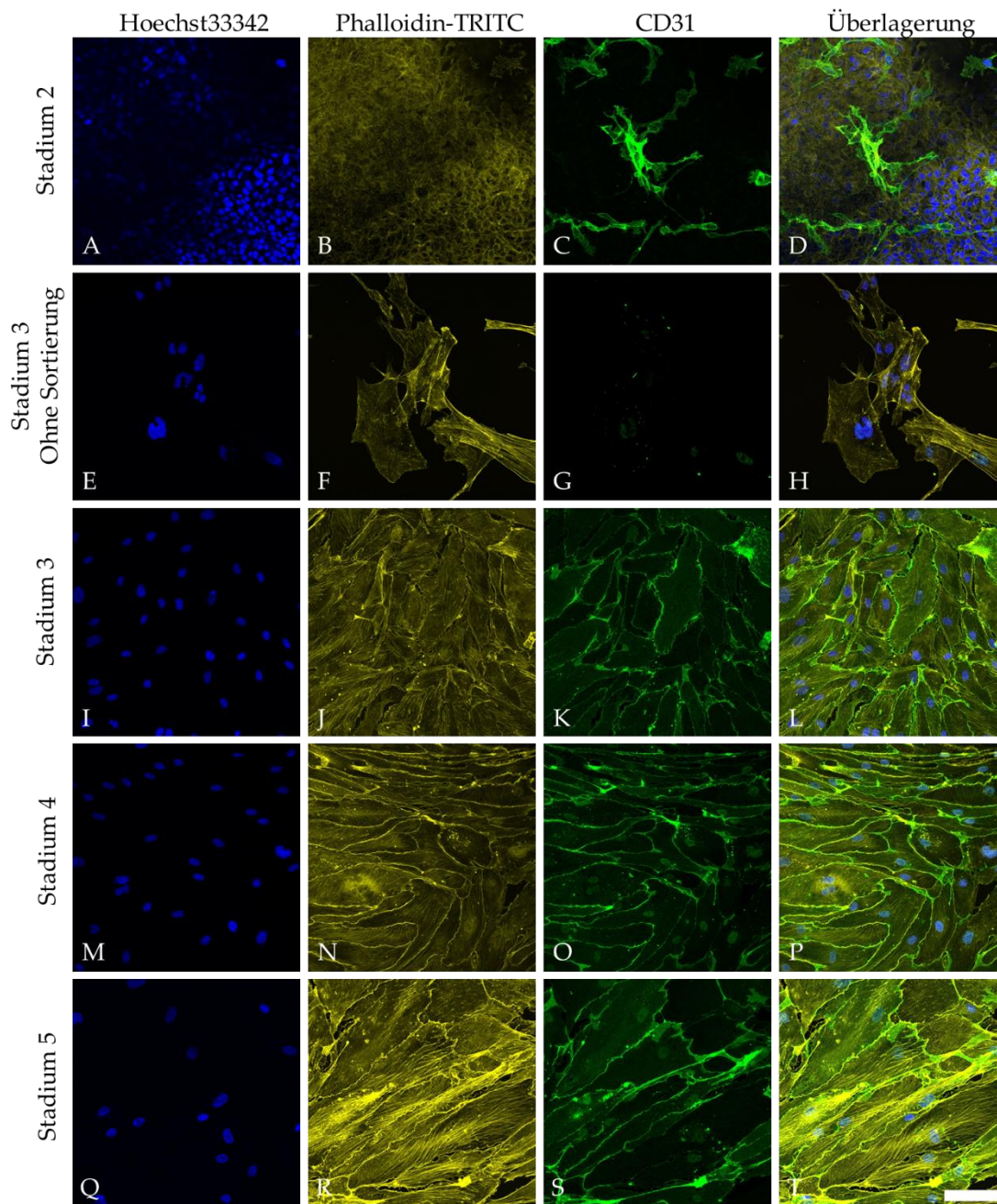


Abbildung 96: Immunfluoreszenzmarkierung der Differenzierung von LSEC aus human induzierten pluripotenten Stammzellen nach Kouji *et al.*<sup>[250]</sup> WTC11 wurden in Stadium 1 zu mesodermalen Zellen differenziert, welche im Stadium 2 in einem inhomogenen Gemisch mit endothelialen Vorläuferzellen vorliegt. Mithilfe der MACS®-Sortierung von CD34 wurden die endothelialen Vorläuferzellen spezifisch selektiert (Abbildung I-J). Die nichtselektierte Zellpopulation wurde zum Vergleich in Abbildung E-H dargestellt. Die Vorläuferzellen wurden in Stadium 4 zu LSEC-Vorläuferzellen differenziert, welche in Stadium 5 (Abbildung Q-L) final zu maturierten LSEC differenziert wurden. Der Verlauf der Differenzierung wurde durch die Immunfluoreszenzmarkierung von CD31 (FITC gekuppelter Maus-Anti-human CD31-Primärantikörper/ Alexa Fluor®-488 Ziege-Anti-Maus Sekundärantikörper), sowie der histochemischen Markierung der DNA mit Hoechst und des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-TRITC durch mikroskopische Aufnahmen visualisiert.

Blau: Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ), Gelb: Phalloidin-TRITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}573 \text{ nm}$ ), Grün: CD31 ( $\lambda_{\text{ex}} = 499 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) Konfokalmikroskop = Leica STELLARIS 5, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ .



Eine weitaus explizitere Analyse der Differenzierung kann durch das Expressionsverhalten spezifischer LSEC- und Stammzellmarker erfolgen. Am Ende der jeweiligen Stadien wurde die mRNA-Expression der Endothelzellmarker CD31 sowie VE-Cadherin und die LSEC-spezifischen LYVE-1 und CD206 analysiert. Die Expression wurde auf deren mRNA-Expression in LSEC der Firma *Upcyte Technologies* normiert (Abbildung 97 A). Die mRNA-Expression von CD31 steigerte sich um das 2,47-fache bis zum 4. Stadium, in dem laut Kouï *et al.* ausdifferenzierte LSEC vorliegen sollten. VE-Cadherin hingegen erreichte eine maximale Expression nach der MACS<sup>®</sup>-Sortierung in Stadium 3 (0,9-fache Expression) und sank in Stadium 4 wieder auf 0,1. Der LSEC-spezifische Marker LYVE-1 nahm im Laufe der Differenzierung bis zu einer maximalen 1,01-fachen mRNA-Expression in Stadium 4 zu. CD206 wurde lediglich in Stadium 3 mit einer 0,09-fachen Expression ermittelt. Wurde in Stadium 3 die relative Expression zwischen den unsortierten und durch MACS<sup>®</sup> sortierten auf endotheliale Vorläuferzellen selektierte Zellpopulationen verglichen, so wurde ein deutlicher Anstieg von CD31 (29,75-fach), VE-Cadherin (7,67-fach), LYVE-1 (0,09) und CD209 (0,09-fach) ermittelt. Somit kann von einer erfolgreichen Sortierung von Endothelzellen ausgegangen werden. Auch Kouï *et al.* konnte eine deutliche Erhöhung der CD31 und VE-Cadherin Expression durch die Selektion der Zellen vermerken. Außerdem ermittelten sie eine Steigerung der LSEC-spezifischen Marker LYVE-1 und Stabilin-2 (STAB2) in den gereiften LSEC am Ende des 4. Stadiums. Das Verhalten von LYVE-1 ist, wie in Abbildung 97 A) zu entnehmen, vergleichbar mit den publizierten Daten. Jedoch entspricht der Abfall der Expression von VE-Cadherin von Stadium 3 auf Stadium 4 nicht der publizierten Daten.<sup>[250,265]</sup> Eine mögliche Erklärung dieser Unterschiede in der Expression ist die Verwendung von unterschiedlichen hiPSC. Ein Phänomen welches Kouï *et al.* durch LSEC-Differenzierungen mit unterschiedlichen hiPSC bereits nachweisen konnte.<sup>[250]</sup> Mit der erfolgten Expressionsanalyse waren somit erste Erfolge einer LSEC-Differenzierung nachweisbar. Eine weitere Verifizierung mit zusätzlichen LSEC-spezifischen Markern wie STAB2 und einem mesodermalen Marker wie Mesoderm-posterior-1-Homolog (MESP1) würde die Charakterisierung noch untermauern. Die Pluripotenz der Zellen, während der LSEC-Differenzierung wurde über die Expression von Nanog und Oct3/4 im Vergleich zu undifferenzierten WTC11 verfolgt. Deren zeitliche relative Expression im Verlauf der Differenzierung ist in Abbildung 97 B) zu erkennen. Bereits in Stadium 2 ist die Expression von Nanog um das 0,27-fache gegenüber nicht differenzierten hiPSC gesunken. Oct3/4 folgt diesem Trend mit einem 0,22-fachen Rückgang und ist ab Stadium 3 nicht mehr detektierbar, wohingegen bei Nanog noch eine relative Expression in Stadium 3 von 0,01-fach nachgewiesen wurde. Der Verlauf der Oct3/4-Expression konnte auch von Kouï *et al.* durch eine RT-qPCR nachgewiesen werden, wohingegen sie die Expression von Nanog nicht ermittelten.<sup>[250]</sup> Der Rückgang der Pluripotenzmarker Nanog und Oct3/4 wird auch in der embryonalen Entwicklung beobachtet. Bei einer Differenzierung der embryonalen Stammzellen wird die Expression von Nanog und Oct3/4 sofort verringert.<sup>[267]</sup> Somit entspricht das nachgewiesene Verhalten in Abbildung 97 B) dem natürlichen Verlauf einer Differenzierung.

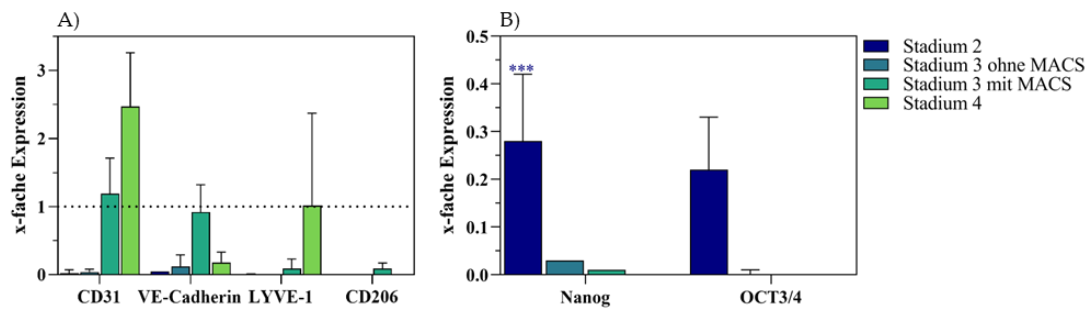


Abbildung 97: mRNA-Expressionsanalyse der LSEC-Differenzierung aus humanen induzierten Stammzellen. Die Differenzierung wurde mit WTC11 nach Vorschrift von Kouï *et al.* durchgeführt.<sup>[250]</sup> Nach Beendigung der jeweiligen Stadien wurden die Zellen lysiert und auf deren mRNA-Expression bezüglich (A) CD31, VE-Cadherin, LYVE-1 und CD206 und in (B) auf Nanog und OCT3/4 mithilfe einer RT-qPCR untersucht. Die Auswertung der RT-qPCR wurde mithilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt, die Proben wurden in A) auf kommerzielle LSEC und in B) auf die undifferenzierten hiPSC normiert (=1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die Mittelwerte und deren Standardabweichungen erfolgten in beiden Experimenten aus n=3. Werte mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle wurden mit \*p < 0,005, \*\*p < 0,01 und \*\*\*p < 0,001 versehen, welche mithilfe des Student's t-Test ermittelt wurden.

Der Rückgang der Pluripotenz in den differenzierten LSEC ist ein weiteres Indiz einer erfolgreichen Herstellung von LSEC aus einer erneuerbaren Quelle. Danoy *et al.* konnte in einer Analyse des Transkriptoms, der nach Kouï *et al.* differenzierten LSEC zeigen, dass die gereiften LSEC verglichen mit primären LSEC aus der Leber eine potentielle Alternative darstellen.<sup>[268]</sup> Die gewählte Differenzierungsmethode analysiert laut Gage *et al.* den möglichen arteriellen und venösen Ursprung während der Differenzierung nicht, weswegen sie eine alternative Differenzierung von LSEC vorschlagen die diesen Signalweg berücksichtigt.<sup>[261]</sup> Für zukünftige Anwendungen aus hiPSC differenzierten LSEC sollten noch weitere Analysen unternommen werden, um den Reifegrad der differenzierten LSEC zu ermitteln. Ebenfalls werden heutzutage bereits aus hiPSC differenzierte Hepatozyten in Leberkrankheitsmodellen eingesetzt, welche neben den LSECs aus hiPSC die patientenspezifische Anwendung den verschiedenen pathogenen Lebermodellen im vasQchip begünstigen.<sup>[268]</sup> Diese Arbeit lieferte die Grundlagen für die Kultivierung und die Adaption an Blutfluss, Stützmatrix, Beschichtungen und Kultivierungsbedingungen, worauf in Zukunft aufgebaut werden kann.<sup>[249]</sup>

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Abkürzung	Hersteller
Hepatomzelllinie	Huh7	Zur Verfügung gestellt von Dr. Camilla Pramfalk (Karolinska Institutet)
Human hepatocellular carcinoma cell line, humane Leberkrebszelllinie	HepG2	/
Humane Hepatozyten (Donor: 653-03, Lot: 653-0320180219.1)	/	Upcyte Technologies GmbH
Lebersinusoidale Endothelzellen	LSEC	Upcyte Technologies GmbH

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
<i>Zellkultur</i>		
0,1-10 µL Spitzen	VWR®International	613-0732
1,5 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf AG	211-2120
1,5 mL Reaktionsgefäß Bernstein	Eppendorf AG	211-2130
100-1250 µL Spitzen	VWR®International	391-3662
12 Well-Platten	Corning Inc.	392-0049
1-200 µL Spitzen	VWR®International	613-5001
15 mL Zentrifugenröhrchen	Corning Inc.	613-2104
1x8 Tube Strips PCR 0,2 mL	Brand	KH54.1
2 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf AG	525-0384
24 Well-Platten	Corning Inc.	734-2743
3,5 cm Petrischalen	VWR®International	391-3325
48 Well-Platten	VWR®International	734-2326
50 mL Zentrifugenröhrchen	Corning Inc.	391-3450
6 cm Petrischalen	VWR®International	391-3210
6 Well-Platten	Corning Inc.	700-1425
96 Well-Platten	Corning Inc.	391-3325
96 Well-Platten (Zellabweisende Oberfläche)	Greiner-Bio-One	650970
CryoFreeze Tube 1.8 ml Rundboden	Biozym	129-0584
Einwegkanüle (grün 21G 0,8x120)	Braun	612-0141

## Material und Methoden

Medienflasche Nalgene® steril, PETG, 250 µl	ThermoFisher Scientific GmbH	3917124
Neubauer-Zählkammer	VWR®International	631-0926
Pasteurpipetten 23 cm, Glas	VWR®International	613-1183
Reagenzgeservoir	VWR®International	817-1616
Serologische Pipetten 10 ml	VWR®International	612-3702
Serologische Pipetten 5 ml	VWR®International	514-0330
Spritzen 20 mL	Braun	720-2520
T25 Nunclon™ Sphera™ Flaschen	ThermoFisher Scientific GmbH	174951
Transwell® 0,4 µm PC	VWR®International	734-1568
Verschlussfolie PARAFILM®	Carl Roth® GmbH	H666.1
Zellkulturflächen (175 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc.	660175
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc.	391-3143
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc.	658175
µ-slide 8 well	ibidi GmbH GmbH	80826

### *vasQchip*

3M Transferklebeband	Adhäsive Formteile GmbH	9460PC
Deckgläschen ø 32 mm, #1,5	ThremoFisher	CB00320RAC20MNT0
Female Luer Lock Coupler	Ibidi GmbH	10823
Hose Clip	Ibidi GmbH	10821
iPore Track-etched membrane, 10 <sup>6</sup> Ionen/cm <sup>2</sup>	It4ip	000M50/610N000/R/3
Luer Connector Male	Ibidi GmbH	10824
Luer Lock Connector Female	ibidi GmbH	10825
Luer Plug Male	Ibidi GmbH	10822
Pattex Repair Extrem	Henkel	15350322
Tygon LMT-55 2 Stopper	VWR®International	070534-08i-ND
Tygon Schlauch 3350	VWR®International	070497-08F
vasQchip PC Spritzgussblock	Hoffner GmbH	Maßanfertigung

### *Synthesen*

Dialysesschläuche 12-14 kDa	Sigma Aldrich	D9527-100FT
Disposable Culture Tube 12x75mm	Fisherbrand®	14-961-26
Disposable Culture Tube s/c	Fisherbrand®	1495935AA
ISOLUTE® NH2 100 mg/ml	Biotage	470-0010-A
Kanüle Sterican, 21 G, 120 mm	B.Braun	4665643
PP-Reaktor 10 mL mit PE-Fritte	MultiSynThech GmbH	V001PE087
Vial, screw, 2 ml, cir, WrtOn,cert	Agilent Technologies	5182-0715

### 4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
<b>Synthesen</b>		
1,3-Di-Boc-2-(trifluormethylsulfonyl)guanidin	Thermo Fisher Scientific Inc.	10614945
1,4-Diaminobutan	TCI Chemicals Deutschland	D0289
Aceton	Fischer scientific	A/0606/17
ACN, Acetonitril ROTISOLV	Carl Roth® GmbH	HN44
Bromessigsäure	Sigma Aldrich	B56307
Chloroform	Fischer scientific	C/4966/17
Cyclohexan	Sigma Aldrich	227048
DCM, Dichlormethan	Thermo Fisher Scientific GmbH	UN1593
DIC, <i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid	TCI Chemicals Deutschland	D0254
DMF, Dimethylformamid	Carl Roth® GmbH	CP79
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth® GmbH	A994.2
EDC-HCl, (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid)	Carl Roth® GmbH	2156
Ethanol absolut	VWR®International	20.821.296
Ethylacetat	Fischer scientific	E/0906/17
Gelatine Typ A, Bloom 300	Sigma Aldrich	G2500
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure)	Carl Roth® GmbH	X872.1
HCl, Salzsäure	Sigma Aldrich	H1758
Hexan	Fischer scientific	H/0406/17
HOBt, 1-Hydroxybenztriazol	Sigma Aldrich	54802
Isopropanol	Carl Roth® GmbH	0733.1
LAP, Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat	TCI Chemicals	L0290
MAA, Methacrylsäureanhydrid	Sigma Aldrich	276685
Methanol	Fischer scientific	M/4056/17
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth® GmbH	0601.1
NaOH (Natriumhydroxid)	Carl Roth® GmbH	6771.2
NHS (N-Hydroxysuccinimid)	Sigma Aldrich	8.04518
RhodaminB	Sigma Aldrich	R6626-100G
<b>Zellkultur</b>		
[+] D-Glucose-Lösung (200 g/L)	Gibco® Life Technologies	A24940-01
CasBlock™	Invitrogen™	008120
Collagen I from rat tail	Enzo	ALX-522-435-0100

Deuterium Oxide	Chambridge Isotope Laboratories, Inc.	DLM-2259-1
DMEM (1x) + GlutaMAX™	Gibco® Life Technologies	21885-025
DMEM (1x) ohne Phenolrot	Gibco® Life Technologies	A14430-01
DMEM F12	Gibco® Life Technologies	11320074
DMEM, high Glucose, high Pyruvate	Gibco® Life Technologies	41966052
DNA Ladder 100 bp	New England Biolabs® GmbH	N3231S
dNTP Solution Mix	New England Biolabs® GmbH	N0447S
DPBS <sup>-/-</sup> (ohne Kalzium und Magnesium)	Gibco® Life Technologies	14190250
DPBS <sup>+/+</sup> (mit Kalzium und Magnesium)	Gibco® Life Technologies	14040141
EGM2-KIT	PromoCell	C-22111
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco® Life Technologies	10500064
Fibronectin Solution 1 mg/mL bovine 5 mL	PromoCell	C-43050
Hepatocyte High Performance Medium	Upcyte Technologies	MHE003
Hepatocyte/LSEC Co-Culture Media	Upcyte Technologies	MHE004
Human Fc Block	DB Biosciences	130-059-901
Ketoconazole	Sigma Aldrich	UC280-5MG
KnockOut™ DMEM	Gibco® Life Technologies	10829018
LSEC Culture Media	Upcyte Technologies	MLS003
Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, LDEV-free, 5 mL	Corning Inc.	354230
Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free, 5 mL	Corning Inc.	354277
MEM Non-essential Amino Acids (100x)	Gibco® Life Technologies	11140-035
mTeSR™ Plus Kit	Stemcell Technologies	100-0276
Natrium Pyruvat (100 mM)	Gibco® Life Technologies	11360-070
Palmitinsäure	Sigma Aldrich	P5585
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth® GmbH	0335.1
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) 100 mL	Gibco® Life Technologies	15140122
Random Primer	Promega	C1181
rh-activin-A	Peptrotech, Inc.	120-14P
rh-bFGF	Stemcell Technologies	Q-240899
rh-BMP-4	Stemcell Technologies	Q-240899
Rifampicin	Sigma Aldrich	R7382
RNase AWAY®	VWR®International	732-2271

SB431542 (TGF-Beta-Inhibitor)	Peptrotech, Inc.	3014193
TRIzol™ Reagenz	Invitrogen™	15596018
VEGF	Stemcell Technologies	78073
Y-27632 (Dihydrochloride)	Stemcell Technologies	72302
<i>Färbereagenzien/ Assays</i>		
BODIPY 493/503	Thermo Fisher Scientific Inc.	D3922
Calcein, AM	Invitrogen™	C3099
CellTiter 96(R) Non-Rad Cell Prolif Assay, 50X96well	Promega	G4100
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega	G7571
CellTracker™ Green CMFDA	Invitrogen™	C2925
CyQUANT® Direct Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes®	C35011
DC™ Protein Assay Kit II	Bio-Rad-Technologies	5000112
Ethidiumbromid	Carl Roth® GmbH	2218.3
Hoechst33342	Thermo Fisher Scientific Inc.	62249
LysoTracker Red DND-99	Invitrogen™	L7528
MitoTracker™ Green FM	Invitrogen™	M7514
Oil-O-Red	Sigma Aldrich	O0625-25G
Ovalbumin, Alexa Fluor™ 488 Conjugate	Thermo Fisher Scientific Inc.	O34781
P450-Glo™ CYP3A4 Assay	Promega	V9002
Phalloidin-TRITC	Sigma Aldrich	P1951-.1MG
PrestoBlue™	Invitrogen™	A13262
Propidiumiodid	Sigma Aldrich	25545-16-4
RX series GLUC/FRU	RANDOX	GF2635
RX series GLY	RANDOX	GY105
RX series LAC	RANDOX	LC3980
RX series NEFA	RANDOX	FA115
RX series RANBUT	RANDOX	RB1007
RX series UREA	RANDOX	UR3873
Universal Agarose	VWR®International	732-2789

## 4.1.4 Antikörper

Anwendung	Antikörper	Artikelnummer, Hersteller
<i>Primärantikörper</i>		
	Anti-Albumin produced in rabbit	A0433-2ml, SigmaAldrich
	Anti-CD31 produced in sheep	AF806, R&D Systems
	Anti-CD31-FITC produced in mouse	F8402, Sigma Aldrich® Merck KGaA
	Anti-CYP3A4 produced in Mouse	MA5-17064, Life Technologies
	Anti-Mannose receptor produced in rabbit	Ab64693, abcam
	Anti-Nanog produced in mouse	ab62734, abcam
	Anti-Oct-3/4 produced in rabbit	ab181557, abcam
<i>Sekundärantikörper</i>		
	Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit	A21206, Invitrogen™
	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse	A11001, Invitrogen™
	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rat	A11006, Invitrogen™
	Alexa Fluor® 568 Donkey Anti-Sheep	A21099, Invitrogen™
	Alexa Fluor® 647 Chicken Anti-Rabbit	A21443, Invitrogen™
<i>Antikörper für die Durchflusszytometrie</i>		
	Anti-Oct3/4-PE produced in mouse	560186, BD Biosciences
	PE Mouse Anti-IgG1, Isotypkontrolle	555749, BD Biosciences
<i>Antikörper für das MACS® Sorting</i>		
	FITC anti-human CD34 Antibody	343603, BioLegend
	Anti-FITC MicroBeads	130-048-701, Miltenyi Biotec

## 4.1.5 Zellkulturmedien

Zelltyp	Mediennamen	Zusammensetzung
Hepatozyten	Hepatozyten-Medium	500 ml Basalmedium 5 ml L-Glutamin 5 ml Supplement C 1 % P/S
Hepatozyten	Hepatozyten-Einfriermedium	50 % FCS 40 % Hepatozyten-Medium 10 % DMSO 1 % P/S
LSEC	LSEC-Medium	500 ml Basalmedium 50 ml FCS 50 µl Supplement A 50 µl Supplement B 1 % P/S



LSEC	LSEC-Einfriermedium	50 % FCS 40 % LSEC-Medium 10 % DMSO 1 % P/S
Kokultur (LSEC und Hepatozyten)	Kokulturmedium	500 ml Basalmedium 25 ml FCS 2,5 ml L-Glutamin 25 µl Supplement A 25 µl Supplement B 2,5 ml Supplement C 1 % P/S
LSEC	EGM2	500 ml EGM <sup>®</sup> 2 10 ml EGM <sup>®</sup> Zusätze 5 % FCS 1 % P/S
LSEC	LSEC : EGM2 (1:1)	100 ml LSEC-Medium 100 ml EGM2
LSEC	EGM2 mit Zusätzen	100 ml EG2 50 ng/ml VEGF 10 µM SB
HepG2	DMEM	500 ml DMEM 50 ml FCS 1 % P/S
Huh7	DMEM-GlutaMAX	500 ml DMEM (1x) + GlutaMAX <sup>™</sup> 10 % FCS 1 % Nicht essenziellen Aminosäuren 1 % P/S
Huh7/LSEC/ Hepatozyten	Basalmedium für OPLA/POLA-Behandlung	DMEM (1x) ohne Phenolrot 2 % HS 1 % P/S 1 % NEAA 1 % Gluta MAX <sup>™</sup> 1 % Natrium Pyruvate 0,1 nM Insulin 5,5 mM Glucose
Huh7/LSEC/ Hepatozyten	800 µM OPLA	400 µM Ölsäure 280 µM Palmitinsäure 112 µM Linolsäure 8 µM α-Linolensäure In Basalmedium
Huh7/LSEC/ Hepatozyten	200 µM OPLA	100 µM Ölsäure 70 µM Palmitinsäure 28 µM Linolsäure 2 µM α-Linolensäure

		In Basalmedium
LSEC/Hepatozyten	800 $\mu$ M POLA	360 $\mu$ M Ölsäure 325 $\mu$ M Palmitinsäure 80 $\mu$ M Linolsäure 8 $\mu$ M $\alpha$ -Linolensäure
LSEC/Hepatozyten	200 $\mu$ M POLA	In Basalmedium 80 $\mu$ M Ölsäure 81,25 $\mu$ M Palmitinsäure 20 $\mu$ M Linolsäure 2 $\mu$ M $\alpha$ -Linolensäure
WTC11	hiPSC Kultivierungsmedium	In Basalmedium 400 ml mTeSR™ Plus Basalmedium 100 ml mTeSR™ Plus 5x Zusatz 1 % P/S 10 $\mu$ M ROCK-Inhibitor

#### 4.1.6 Puffer

Name	Anwendung	Zusammensetzung
MES-Puffer	GelNB-Synthese	0,5 M 2-(N-Morpholino)- Ethansulfonsäure dH <sub>2</sub> O auffüllen pH 6 einstellen mit NaOH
FACS-Puffer	Durchflusszytometrie	2 % FCS 2 mM EDTA 1 % P/S DPBS <sup>-</sup> auffüllen
Lyse-Puffer	Lipidextraktion/Protein-Assay	150 mM NaCl 50 mM Tris (pH 8,0) 5 mM EDTA (pH 8,0) 1 % NP40
TAE-Puffer (50x)	Agarose-Gelelektrophorese	1 M Essigsäure 50 mM EDTA 2 M Tris Mit dH <sub>2</sub> O auffüllen (pH 8,5)

#### 4.1.7 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
GoTaq®G2 DNA-Polymerase	Promega	M7845
Reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Punktmutation)	Promega	M3683
RQ1 RNase-freie DNase	Promega	M6101
GoTaq qPCR Master Mix	Promega	A6001

StemPro™ Zelldissoziationsreagenz	Accutase™	Gibco® Technologies	Life A1110501
Trypsin-EDTA 0,25%		Gibco® Technologies	Life 25200056

### 4.1.8 Primer

Bezeichnung	Forward (5′- 3′)	Reverse (5′- 3′)
Albumin	AACCCAAACCTCCCCGATT	GGCAGGCAGCTTTATCAGCA
CD206	CGAGGAAGAGGTTCCGTTACCC	GCAATCCCGGTTCTCATGGC-
CD31	ATTGCAGTGGTTATCATCGGAGTG	CTCGTTGTTGGAGTTCAGAAGTGG
CYP3A4	GGACCCAGAAACTGCATTGGC	TCCACTTACGGTGCCATCCC
G6P	CTACGTGATGGTCACATCTACTCT	ATGCTGTGGATGTGGCTGAAA
GAPDH	GCAAGAGCACAAGAGGAAGAG	TCTACATGGCAACTGTGAGGA
LEVY-1	CTCTGAAGGGGTAGGCACGA	GCTGGTTCGCCTTTTTGCTCA
Nanog	GCAACCAGACCCAGAACATCC	CCAAGGCAGCTCCAAGTCAC
Oct3/4	AGAAGGGCAAGCGATCAAGC	AGGGACCGAGGAGTACAGTG
UGT1A1	ACTGCCTTACCAAAATCCAC	TCGATGGTCCGGTTCCAGTG
VE-Cadherin	AGGTGCTAACCCCTGCCAAC	GCCTCTCAATGGCGAACACG

### 4.1.9 Technische Geräte und Software

Einsatzgebiet	Gerätename	Hersteller
Zellkultur	CO <sub>2</sub> Inkubator C170	Binder GmbH
	Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 0,5-10 µl	Eppendorf AG
	Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 2-20 µl	Eppendorf AG
	Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 10-100 µl	Eppendorf AG
	Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 20-200 µl	Eppendorf AG
	Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 100- 1000 µl	Eppendorf AG
	Transferpipette	Brand
	Accu-jet Pro Pipette Controller	Brand
	Absaugsystem BVC 21 NT	VACUUBRAND GmbH + Co.KG
	Stickstofftank Biosafe MD Chronos 100	Messer Industriegase
	Esco®Class II Biosafety Cabinet	Infinity®
	Vortex-Schüttler	VWR®International
	vasQturn	AK Schepers

	EVOM3 Elektrode	inklusive	STX2-Plus	WPI
<b>Mikroskope</b>				
	Inverses Lichtmikroskop DMI1 LED	Leica		Leica Microsystems GmbH
	Konfokalmikroskop SPE DMI4000 B	Leica	TCS	Leica Microsystems GmbH
	Konfokalmikroskop STELLARIS5	Leica		Leica Microsystems GmbH
	Weitfeldmikroskop LED	Leica	DMIL	Leica Microsystems GmbH
<b>Sonstige Geräte</b>				
	5973N MSD			Agilent Technologies
	6890N Network GC System			Agilent Technologies
	AU480 Chemistry Analyzer			Beckman Coulter
	Autoklav Systec HX-200			SystecLab GmbH
	CFX Connect Real Time Detection System		PCR	Bio-Rad Laboratories GmbH
	Cytation1 Imaging reader			BioTek
	Feinwaage LAG214i			Molecular Devices LLC
	GelDoc Go Imaging System			Bio-Rad Laboratories GmbH
	Guava® easyCyte™ Flow Cytometry Systems			Luminex
	J6-MI Zentrifuge			Beckmann Coulter
	Kühlzentrifuge Microstar 17R			VWR®International
	Lyophilisator Christ Alpha 1-4			Christ GmbH
	Magnetrührer mit Heizplatte C7		VMS	VWR®International
	Massenspektrometer 4800 Proteomics Analyser mit Software Explorer V4.9 (Build 115)			Applied Biosystems
	Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop™ Lite			Thermo Fisher Scientific Inc.
	Mikrowelle			OK.
	Peristaltik Pumpensystem, Perisys S			CETONI GmbH
	pH/mV/ °C-Messgerät pH110			VWR®International
	Power Supply Gelelektrophorese Pressure+48			Bio-Rad Laboratories GmbH Biotage
	Punktstrahler Omnicure S2000			Excelitas Technologies
	SpectraMax ID3 Mikroplattenleser			Molecular Devices LLC
	Thermocycler peqSTAR			VWR®International
	Trockenschrank ED56			Binder GmbH
	UltrafeXtreme Massenspektrometer			Brucker
	Vibra Cell™ Sonicator			Sonics&Materials Inc.

---

	Wasserbad LSB Aqua Pro	GRANT
	Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG
<i>Software</i>		
	CETONI Elements Basic Software	CETONI peRISYS
	ChemDraw22.2.0	PerkinElmer
	Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH
	GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc
	ImageJ Fiji	eEliceiri/LOCI group
	Inkscape 1.2.2.	Inkscape Projects
	LasX3.5.7	Leica Microsystems GmbH
	Microsoft Office 365	Microsoft Corporation

---

---

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der allgemeinen Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung, der in dieser Dissertation verwendeten Zellen erfolgte adhärent in zellspezifischen Basalmedien unter kontrollierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigte Luftfeuchtigkeit). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, sofern nicht anders angedeutet. Nach Erreichen einer 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet und um eine Passage erhöht.

#### 4.2.1.1 Beschichtung der Zellkulturoberflächen

##### Primäre Leberzellen

Die Kultivierung der primären Hepatozyten und LSEC erfolgte auf einer Kollagen I-Beschichtung. Entsprechend den Herstellerangaben wurde für Hepatozyten 50 µg/ml und für LSEC 0,1 mg/ml Kollagen I in DPBS<sup>-</sup> (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) eingesetzt. Es wurde 0,1 ml/cm<sup>2</sup> der Proteinlösung auf die Kultivierungsoberfläche gegeben und für 1 h bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit DPBS<sup>-</sup> gewaschen und direkt mit einer Zellsuspension überschichtet.

##### Stammzellen

WTC11 wurden auf Matrigel<sup>®</sup> hESC-Beschichtung kultiviert. In KnockOut<sup>™</sup> DMEM wurde das auf Eis aufgetaute Matrigel<sup>®</sup> hESC 1:100 verdünnt und für 60 min bei RT in 6-Well-Platten eingesetzt, um diese zu beschichten. Nach Abnahme der Beschichtungslösung konnten die Stammzellen direkt in die 6-Well-Platte zu deren Kultivierung gegeben werden.

#### 4.2.1.2 Zellkultivierung

Wurde die gewünschte Zelldichte von 70-80 % erreicht wurden die Zellen passagiert, oder experimentell eingesetzt. Zunächst wurde dafür das Zellmedium abgenommen und die Zellschicht zweimal mit 100 µl/cm<sup>2</sup> DPBS<sup>-</sup> gewaschen. Das Ablösen der adhären Zellen von der Kultivierungsoberfläche erfolgte mit 0,25 % Trypsin/EDTA (50 µl/cm<sup>2</sup>, 5 min, 37 °C), wobei die enzymatische Reaktion von Trypsin mit 10 % FCS in DPBS<sup>-</sup> gestoppt wurde. Es folgte eine Bestimmung der Zellkonzentration mithilfe der Neubauer-Zählkammer und manuelles Zählen der Zellen. Durch Überführung des gewünschten Zellvolumens in ein Zentrifugenröhrchen konnten die Zellen durch Zentrifugation (680 rpm, 5 min, RT) pelletiert und anschließend weiterverwendet werden.

## Langzeitlagerung und Auftauen der Zellen

Die langfristige Zelllagerung erfolgte bei  $-196\text{ °C}$  über flüssigem Stickstoff in der Gasphase. Dafür wurden die adhärenen Zellen enzymatisch in Suspension gebracht, deren Konzentration bestimmt und entsprechend Tabelle 4 in deren spezifischen Einfriermedien in Kryoreagenzgefäße überführt. Auf das graduelle Einfrieren mithilfe des Nalgene® Mr.Frosty bis  $-80\text{ °C}$  folgte die Langzeitlagerung bei  $-196\text{ °C}$ . Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad ( $37\text{ °C}$ ) mit anschließender Resuspension in 5 ml Basalmedium. Nach dem Zentrifugationsschritt durch das Pelletieren der Zellen bei 680 rpm, für 5 min erfolgte die Zellaussat entsprechend der Herstelleranweisungen auf einer speziell beschichteten Kultivierungsoberfläche (Tabelle 4). Bei WTC11 wurden zusätzlich  $10\text{ }\mu\text{M}$  ROCK-Inhibitor nach dem Auftauen für 24 h hinzugefügt.

Tabelle 4: Parameter für das Einfrieren und Auftauen in dieser Arbeit verwendeter Zellen

Zelltyp	Zellzahl/Kryoreagenzgefäß	Zellen/cm <sup>2</sup>	Kollagen-I Beschichtung
Hepatozyten	$7,5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	0,1 mg/ml
LSEC	$2,5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	50 $\mu\text{g/ml}$
HepG2	$1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^4$	/
Huh7	$1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^4$	/
WTC11	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^4$	Matrigel® (hESC)

## Primäre Leberzellen

Die primären Leberzellen wurden nach dem Auftauen zur 80 %igen Konfluenz kultiviert und anschließend im Gegensatz zu den Leberkrebszelllinien Huh7 und HepG2 nicht weiter passagiert, sondern in Experimenten eingesetzt. Für jedes Experiment wurden, sofern nicht anders beschrieben, primäre Leberzellen aufgetaut, expandiert und danach eingesetzt.

## hiPSC (WTC11)

Die Passagierung der WTC11 in der 6-Well-Platte erfolgte nach einer Zellkonfluenz von 80 %, wobei zunächst einmal mit 2 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml StemPro™ Accutase™ (2 min,  $37\text{ °C}$ , 5 % CO<sub>2</sub>) enzymatisch abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml DPBS<sup>+/+</sup> aufgefüllt und deren Zellkonzentration mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, RT) konnten  $3 \cdot 10^5$  Zellen/6-Well für die Weiterkultivierung auf einer Matrigel®-Beschichtung bereitgestellt werden, oder für die LSEC-Differenzierung verwendet werden. Zusätzlich wurde dem Medium  $10\text{ }\mu\text{M}$  ROCK-Inhibitor beigefügt.

## LSEC-Differenzierung

Die LSEC-Differenzierung erfolgte ansatzweise nach Kouji *et al* und ist in 5 Stadien unterteilt.<sup>[250]</sup> Im ersten Stadium wurden die Stammzellen zu mesodermalen Zellen differenziert.  $4 \cdot 10^6$  abgelöste WTC11 wurden in 7 ml mTeSR-Medium versetzt mit  $10\text{ }\mu\text{M}$  ROCK-Inhibitor, 2 ng/ml BMP-4 und 1 % P/S resuspendiert und in einer

zellabweisenden Zellkulturflasche bis zum folgenden Tag kultiviert. Dort wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, wobei mTeSR mit folgenden Faktoren supplementiert wurde: 5 ng/ml Activin A, 5 ng/ml hrFGF, 30 ng/ml BMP-4 und 1 % P/S. Anschließend wurden die Zellaggregate zurück in die zellabweisende Flasche überführt und für 3 Tage kultiviert. Es folgte wieder ein Mediumwechsel mit mTeSR und 10 ng/ml VEGF, 5,4  $\mu$ M SB431542, 0,5  $\mu$ M Dorsomorphin-Dihydrochlorid und 1 % P/S. Nach einer 2-tägigen Kultivierungsdauer wurden 6-Well-Platten mit 0,1 % Gelatine (v/m) für 60 min bei RT beschichtet. Anschließend wurden die Zellaggregate aus Stadium 1 in 7 ml EGM2 mit 50 ng/ml VEGF aufgenommen und jeweils 1 ml in die beschichteten 6-Well-Platten gegeben. Stadium 2 wurde nach 7-tägiger Kultivierung, mit einem Mediumwechsel alle 2 Tage, beendet. Für Stadium 3 wurden 12-Well-Platten mit einer Fibronectin-Beschichtung vorbereitet. Diese wurde mit 20  $\mu$ g/ml Fibronectin für 1 h bei 37 °C beschichtet mit anschließendem Waschen durch DPBS<sup>-/-</sup>. Die Zellen aus Stadium 2 wurden mithilfe von Trypsin/EDTA standardmäßig abgelöst und mit 6 ml 10 %-igem FCS in DPBS<sup>-/-</sup> aufgenommen. Es folgte eine magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS<sup>®</sup>) bezüglich CD34 welche nach den Herstelleranweisungen wie folgt durchgeführt wurde. Die Zellsuspension wurde in 20 ml gekühlter 0,3 % BSA/DPBS<sup>-/-</sup>-Lösung aufgenommen und durch ein 70  $\mu$ m poröses Sieb gegeben. Infolgedessen wurde die Zellsuspension bei 340 g und RT zentrifugiert und nach Verwerfung des Überstandes in 200  $\mu$ l 0,3 % BSA/DPBS<sup>-/-</sup>-Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von 40  $\mu$ l FcR-Blockierer wurden die Zellen auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufteilung der Zellen auf 3 Zentrifugenröhrchen. 20  $\mu$ l der Zellsuspension wurde für die IgG-Kontrolle mit 4  $\mu$ l IgG versetzt. Zudem wurden weitere 20  $\mu$ l Zellsuspension als Negativ-Kontrolle unbehandelt belassen. Die restlichen 200  $\mu$ l Zellsuspension wurde mit 20  $\mu$ l FITC-anti-CD34-Antikörper versetzt. Alle 3 Ansätze wurden für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 2 ml 0,3 % BSA/DPBS<sup>-/-</sup>-Lösung bei 340 g für 3 min. Das entstandene Zellpellet wurde in 180  $\mu$ l (CD34-Antikörper) und 18  $\mu$ l (Kontrollen) AutoMACS-Running-Buffer resuspendiert. Zu den Kontrollen wurden 2  $\mu$ l und zu der Probe wurden 20  $\mu$ l Anti-FITC-Microbeads hinzugefügt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Waschschriff (2 ml 0,3 % BSA/DPBS<sup>-/-</sup>-Lösung, 340 g, 3 min zentrifugieren) mit anschließender Zellpelletresuspendierung in 500  $\mu$ l AutoMACS-Running-Buffer. Säulen (MS) wurden an das Magnetfeld angebracht und mit 500  $\mu$ l Rinsing-Buffer präpariert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen und durch Gravitationsfluss durch die Säule transportiert. 1,5 ml 0,3 % BSA/DPBS<sup>-/-</sup>-Lösung wurde verwendet, um die Säule zu spülen. Der Durchlauf wurde in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt, dabei sollte es sich um nicht markierte Zellen handeln, welche zur Kontrolle ausplattiert wurden. Die Säule wurde dann aus dem Magnetfeld genommen und auf ein Zentrifugenröhrchen gesetzt mit 1 ml 0,3 % BSA/DPBS<sup>-/-</sup>-Lösung aufgestockt und mithilfe mechanischen Drucks wurden die Zellen von der Säule eluiert. Es wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf die beschichtete 12-Well-Platte in EGM2 mit 50 ng/ml VEGF ausgesät und für 7 Tage mit einem Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage kultiviert. Für Stadium 4 wurden wieder Fibronectin beschichtete 12-Well-Platten vorbereitet und die enzymatisch abgelösten Zellen aus Stadium 3 wurden mit  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>



ausplattiert. Dabei wurde das LSEC-Kulturmedium verwendet, bestehend aus EGM2 mit 50 ng/ml VEGF und 10 $\mu$ M SB431542. Es folgte wiederum eine Kultivierung für 7 Tage mit einer Zellpassagierung unter Verwendung des LSEC-Kulturmediums wodurch Stadium 5 erreicht wurde. Laut Kouji *et al.* ist in diesem Stadium die Differenzierung abgeschlossen und die Zellen können weiterhin in LSEC-Kulturmedium kultiviert und passagiert werden.<sup>[250]</sup> Die Differenzierung wurde lichtmikroskopisch und durch Immunfluoreszenzmarkierung visualisiert und mithilfe RT-qPCR-Methoden am Ende der Stadien quantifiziert.

## 4.2.2 3D-Zellkultur

### 4.2.2.1 Sphäroid-Präparation

Sphäroide aus Hepatozyten wurden auf Agaroseplatten hergestellt. Eine 96-Well-Platte wurde mit 1,5 % Agarose beschichtet und für 20 min bei RT ausgehärtet. Anschließend wurde die benötigte Zellzahl für ein Sphäroid in 40  $\mu$ l Medium angesetzt und in die beschichtete 96-Well-Platte gegeben. Es folgte eine Kultivierung mit einer Medienzugabe von 10  $\mu$ l alle 2 bis 3 Tage. Nach 7-tägiger Kultivierung waren die Sphäroide einsatzbereit für deren Anwendung im vasQchip oder der Kokultur.

Sphäroide aus Huh7 wurden mithilfe zellabweisender 96-Well-Platten mit Rundboden gefertigt. Eine Zellzahl von 0,2 $\cdot$ 10<sup>4</sup> Zellen/Well wurde in 100  $\mu$ l Medium in die Wells gegeben und nach 48 h Kultivierung wurden die Sphäroide für Experimente eingesetzt.

### 4.2.2.2 Kokultur im Transwell®

Der Transwelleinsatz mit 0,4  $\mu$ m Porengröße, wenn nicht anders vermerkt, wurde in einer 24-Well-Platte platziert und die Oberflächen wurden mit 0,1 mg/ml Kollagen I für 30 min bei RT beschichtet. Sofern nicht anderweitig angemerkt, wurden die LSEC und Hepatozyten in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Hepatozyten wurden auf der apikalen Seite entweder im 24-Well oder auf der Unterseite des Transwelleinsatzes kultiviert. Es wurden 10 $\cdot$ 10<sup>4</sup> Hepatozyten/cm<sup>2</sup> eingesetzt und für die Besiedelung der Unterseite folgendermaßen vorgegangen. Der beschichtete Transwelleinsatz wurde in ein medienbefülltes 12-Well überführt und darin um 180° invertiert. Durch den entstandenen Unterdruck im Einsatz bleibt dieses befüllt, obwohl es auf dem Kopf stand, wodurch eine Medienversorgung durch die Membran gewährleistet wurde. 20  $\mu$ l der Hepatozytenzellsuspension wurde infolgedessen auf die eigentliche Unterseite des Transwells® aufgebracht und anschließend für 4 h inkubiert. Dabei wurde jede Stunde 20  $\mu$ l Medium dazu gegeben, um dem Verdunstungseffekt entgegenzuwirken. Anschließend wurde das besiedelte Transwell® in Ausgangsposition gedreht und zurück in die 24-Well-Platte überführt. Die LSEC wurden ausschließlich auf der Innenseite des Einsatzes mit 3,33 $\cdot$ 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> kultiviert. Die etablierte Kokultur konnte infolgedessen für TEER-Messungen oder Viabilitätstest eingesetzt werden.

### 4.2.2.3 vasQchip

#### Fertigung des vasQchip

Die Anwendung der SMART-Technologie ermöglicht die Herstellung des porösen, halbrunden Mikrokanal.<sup>[63]</sup> Die mit Schwerionen beschossene Polycarbonatfolie (50 µm Dicke,  $10^6$  Ionen/cm<sup>2</sup>) wurde durch Thermoformen (4 bar, 147 °C) in Form des halbrunden Mikrokanals gebracht. Die latente Ionenspuren in der Polycarbonatfolie wurden mithilfe von 5 M NaOH und 0,01 % Dowfax 2A1™ bei 70 °C geöffnet. Die Porengröße konnte durch den Ätzzeitraum definiert werden (1 µm Poren = 4 h, 3 µm Poren = 5 h, 5 µm = 5,5 h) und nach dreimaligem Waschen der Membran in demineralisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) und einer Trocknung bei RT war der Mikrokanal fertig für die Assemblierung des vasQchips. Kleberinge (500 µm Dicke, 24 mm Durchmesser) wurde verwendet, um den Kanal auf der Halterung zu fixieren und mithilfe eines größeren Kleberings (32 mm Durchmesser) und einem Deckglas wurde das umgebende Kompartiment des Mikrokanals versiegelt. Pattex wurde als zusätzliches Versiegelungsmaterial für das umgebende Kompartiment eingesetzt. Eine Sterilisation über Nacht mit UV-Licht ermöglicht den Gebrauch der gefertigten vasQchips in der Zellkultur. Das Verfahren wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

#### Handhabung des vasQchip

##### Beschichtung

Für die Beschichtung des Mikrokanals wurde 0,25 mg/ml Fibronectin in einem Volumen von 50 µl in den Kanal eingeführt, wohingegen im umgebenden Kompartiment 500 µl einer 0,25 mg/ml Kollagen I-Lösung verwendet wurden. Die 4 Anschlüsse des vasQchips wurden mit Luer Plugs verschlossen um ein Verdampfen der Beschichtungslösungen im Inkubator bei 37 °C zu verhindern. Am darauffolgenden Tag wurden die Beschichtungslösungen abgenommen und zweimal mit DPBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend wurden alle Kompartimente möglichst luftblasenfrei mit Kokulturmedium befüllt und bis zur Zellbesiedelung im Inkubator bei 37 °C gelagert.

##### Besiedelung

Es wurden  $40 \cdot 10^4$  Hepatozyten in 500 µl Kokulturmedium im umgebenden Kompartiment eingesetzt. Nach Verschluss aller Öffnungen wurde der vasQchip um 180° gedreht und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Inkubator über Nacht inkubiert. Danach erfolgte die Besiedelung des Mikrokanals mit  $10 \cdot 10^4$  LSEC in 20 µl Kokulturmedium. Dafür wurden zunächst die Luerplugs aus den Kanalöffnungen und Medium in den Anschlüssen entfernt. Die Zellsuspension wurde direkt in den Mikrokanal injiziert, woraufhin die Anschlüsse versiegelt wurden und eine 1 h Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> gesättigte Luftfeuchtigkeit) auf dem vasQturn folgte. Durch konstante Rotation bei 0,25 rpm um die Mikrokanalachse erfolgte ein konfluentes Adhären der Endothelzellen. Eine weitere statische Inkubation über Nacht garantierte das Anwachsen der LSEC im Mikrokanal.

### Mikrofluidische Kultivierung

Das Schlauch- und Reservoirsystem der Peristaltikpumpe wurde am Tag vor deren Verwendung mit 70 % EtOH sterilisiert, mit anschließender Neutralisierung durch 10 ml sterilem dH<sub>2</sub>O. Danach erfolgte das Äquilibrieren von 5 ml Kokulturmedium im Reservoir und Schlauchsystem bei einem Volumenstrom von 50 µl/min über Nacht. Das Mediumreservoir wurde dabei im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> gesättigte Luftfeuchtigkeit) positioniert. Am darauffolgenden Tag wurde zunächst das Medium im umgebenden Kompartiment des vasQchips gewechselt und wieder verschlossen, wohingegen die Öffnungen des Mikrokanals luftblasenfrei mit dem Schlauchsystem der Peristaltikpumpe verbunden wurde, wie es in Abbildung 25 dargestellt ist. Der Volumenstrom wurde entsprechend dem Programm in Tabelle 1 graduell auf 50 µl/min erhöht und anschließend bei dieser Fließgeschwindigkeit gehalten. Das Medium im umgebenden Kompartiment wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Eine Analyse der Zellen im vasQchip erfolgte durch deren konfokalmikroskopische Visualisierung mithilfe von Immunfluoreszenz, oder über Viabilitätstest und Enzymaktivitätenanalyse.

#### 4.2.2.4 Hydrogel

Die Funktionalisierung der freien Aminogruppen der Lysinseitenketten in der Gelatine dienen als Grundlage der Synthese verschiedener Gelatine-basierter Photopolymere. Die Synthese wurde von M. Sc. Alisa Grimm und M. Sc. Sonja Leopold (IFG, KIT) durchgeführt.

##### GelMA-Synthese

10 g Gelatine wurden bei 50 °C für 30 min in DPBS<sup>-</sup> gelöst und anschließend mit Methacrylsäureanhydrid, entsprechend des gewünschten Funktionalisierungsgrad nach Tabelle 5, tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 50 °C unter Rühren, wurde die Lösung mit 100 ml warmen DPBS<sup>-</sup> verdünnt und für weitere 10 min gerührt. Infolgedessen wurde die Lösung in ein Dialyseschlauch (Cellulose, 12-14 kDa) überführt und für 7 Tage bei 40 °C gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert, mit zweimal täglichem Wasserwechsel. Die Lösung wurde anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und bei -80 °C gelagert. Eine Lyophilisation für 2 Tage führte zu dem Produkt in Form eines weißen Feststoffes, welcher bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert wurde.

Tabelle 5: Funktionalisierungsgradbestimmung des GelMA in Abhängigkeit der Methacrylsäureanhydridmengen bezogen auf 1 g Gelatine. 1 Äquivalent entspricht 0,266 mmol/NH<sub>2</sub>-Gruppen pro 1 g Gelatine

Funktionalisierungsgrad	Äquivalente (MAA)	Stoffmenge (MAA) [mmol]	Volumen (MAA) [µl]
<i>Low</i>	1	0,266	39,5
<i>Medium</i>	8	2,128	316
<i>High</i>	20	5,32	790

### GelNB-Synthese

Die Synthese von GelNB wurde mit 5-Norbornen-2-carboxylsäure (NCBS), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-hydrochlorid (EDC-HCl) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) im Verhältnis 1:2:1 in 10 ml MES-Puffer (0,5 M, pH 6) gelöst. In Tabelle 6 sind die angewandten Mengen zu entnehmen. Anschließend erfolgte eine Erwärmung der Lösung auf 50 °C und bei konstanter Temperatur wurde diese für 15 min gerührt. Nach erfolgter Aktivierung wurde 1 g Gelatine hinzugegeben und ein pH von 7,5-7,8 mit NaOH eingestellt und anschließend bei 50 °C über Nacht gerührt. Das entstandene Produkt wurde durch Dialyse in ddH<sub>2</sub>O im Cellulosedialyseschlauch (Ausschlussgröße 12-14 kDa) für 7 Tage bei 40 °C und einem Wasserwechsel zweimal täglich gereinigt. Anschließend wurde die Lösung bei -80 °C gelagert und durch Lyophilisation (12 h, -108 °C) wurde GelNB als weißer Feststoff gewonnen und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 6: Für die GelNB-Synthese eingesetzten Mengen von NCBS, EDC-HCl und NHS bezogen auf 1 g Gelatine

Funktionalisierungsgrad	Äquivalente (NCBS)	Stoffmenge (NCBS) [mmol]	Volumen (NCBS) [ $\mu$ l]	Masse (EDC) [mg]	Masse (NHS) [mg]
<i>Low</i>	1	0,266	32,6	120	30,6
<i>Medium</i>	2	1,128	65,1	204	61,2
<i>High</i>	10	5,32	325,5	1019,8	306,1

### GelS-Synthese

In einem Schlenkkolben wurde 1 g Gelatine mit einer Spatelspitze Etyhlendiamintetraacetat (EDTA) für die Synthese von GelS vorgelegt. Eine sauerstofffreie Atmosphäre wurde durch dreimaliges Evakuieren des Kolbens und Verwendung von Stickstoff sichergestellt. 10 ml Natriumcarbonat-Puffer (0,1 M, pH 10, entgast) bestehend aus 40 % 0,1 M Natriumhydrogencarbonat und 60 % 0,1 M Natriumcarbonat wurden zu den Edukten hinzugefügt und bei 40 °C gerührt, bis die Gelatine vollständig gelöst war. N-Acetyl-DL-Homocystein Thiolacton (AHCT) wurde entsprechend der Tabelle 7 in Puffer gelöst und mithilfe einer Spritze und Kanüle in die Reaktionslösung gegeben. Anschließend wurde die Lösung weiterhin unter einer Stickstoffatmosphäre für 3 h bei 40 °C gerührt und infolgedessen mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die erhaltene Lösung wurde in ein Dialyseschlauch (Cellulose, Ausschussgröße 12-14 kDa) überführt und gegen entgastes ddH<sub>2</sub>O für 24 h unter Schutzgasatmosphäre bei 40 °C gereinigt. Dabei erfolgte alle 3 h ein Wasserwechsel, mit einer Spatelspitze EDTA bei den ersten beiden Wasserwechsel. Nach erfolgter Dialyse wurde das Produkt bei -80 °C gelagert und mit einer Lyophilisation zu einem weißen Feststoff fertiggestellt und unter Schutzgas bei -80 °C gelagert.

Tabelle 7: N-Acetyl-DL-Homocystein Thiolacton (AHCT) Verwendung in der GelS-Synthese

<b>Funktionalisierungsgrad</b>	<b>Äquivalente (AHCT)</b>	<b>Stoffmenge (AHCT) [mmol]</b>	<b>Masse (AHCT) [mg]</b>
<i>Low</i>	1	0,266	42,4
<i>Medium</i>	5	1,33	211,8

### GelMA-Hydrogel

GelMA wurde in DPBS<sup>-/-</sup> bei 40 °C gelöst, sodass eine 8 %ige GelMA-Lösung (w/v) entstand. Entsprechend Tabelle 8 wurde die GelMA-Lösung mit LAP und Zellsuspension verdünnt und in eine 48-Well-Platte transferiert. Durch eine photoinduzierte Vernetzung bei einer Intensität von 500 mW/cm<sup>2</sup> und einer Wellenlänge von 320-500 nm und 30 s wurde das Hydrogel generiert. Für die Versorgung der eingeschlossenen Hepatozyten wurde das Hydrogel mit 200 µl Kokulturmedium überschichtet und alle 2 bis 3 Tage ausgetauscht.

Tabelle 8: Mengenangaben für die Zusammensetzung eines GelMA-Hydrogels für 48-Well-Platte

<b>Komponenten</b>	<b>Endkonzentration [%]</b>	<b>Volumen [µl]</b>
GelMA (8 %)	4	100
LAP (5%)	0,3	12
Zellsuspension in Kokulturmedium [50·10 <sup>4</sup> Hepatozyten]		84

### GelNB/GelS-Hydrogel

Die Stammlösungen aus 4 % GelS *Low*, 8 % GelNB *Medium* und 8 % GelNB *High* (w/v) wurden mit sterilem DPBS<sup>-/-</sup> angesetzt und bei 40 °C im Wasserbad gelöst. Entsprechend der Tabelle 9 wurde die Komponenten des Hydrogels zusammengestellt. Die Vernetzung zu einem Hydrogel erfolgte im 48-Well oder im umgebenden Kompartiment des vasQchip mit Licht einer Wellenlänge von 320-500 nm und einer Bestrahlungsintensität von 500 mW/cm<sup>2</sup> für 30 s. Das Hydrogel wurde mit Kokulturmedium überschichtet, welches alle 2 bis 3 Tage ausgetauscht wurde.

Tabelle 9: Komponenten für die Herstellung von GelNB/GelS-Hydrogel mit eingeschlossenen Hepatozyten.

	<b>Komponenten</b>	<b>Endkonzentration [%]</b>	<b>Volumen [μl]</b>
<i>Medium</i>	GelS <i>Low</i> (4 %)	4	100
	GelNB <i>Medium</i> (8 %)	4	50
	LAP (5 %)	0,03	1,2
	Zellsuspension in Kokulturmedium [50·10 <sup>4</sup> Hepatozyten]		48,8
<i>High</i>	GelS <i>Low</i> (4 %)	4	100
	GelNB <i>High</i> (8 %)	4	50
	LAP (5 %)	0,03	1,2
	Zellsuspension in Kokulturmedium [50·10 <sup>4</sup> Hepatozyten]		48,8

## 4.2.3 Analysemethoden in der Zellkultur

### 4.2.3.1 Zelluläre Visualisierungen

#### Fixierung

Die Zellen wurden zweimal mit 200 μl/cm<sup>2</sup> DPBS<sup>+/+</sup> gewaschen und anschließend mit 200 μl/cm<sup>2</sup> einer 4 %igen PFA-Lösung überschichtet und für 10 min bei RT fixiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit DPBS<sup>+/+</sup> woraufhin die Zellen bei 4 °C gelagert wurden, oder direkt im Anschluss einer Permeabilisierung unterzogen wurden.

#### Permeabilisierung

Die Permeabilisierung erfolgte mithilfe von 200 μl/cm<sup>2</sup> 0,1 %igem Triton-X für 4 min bei RT. Infolgedessen wurden die Zellen zweimal mit 200 μl/cm<sup>2</sup> DPBS<sup>+/+</sup> gewaschen und anschließend bei 4 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

#### Markierung des Aktinzytoskelett

Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit 200 μl/cm<sup>2</sup> 100 nM Phalloidin-TRITC für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit DPBS<sup>+/+</sup>. Die Entfernung restlichen Farbstoffes ermöglichte die Visualisierung des Aktinzytoskelett mithilfe einer Anregung bei 540-545 nm, (λ<sub>em</sub> = 570-573 nm) und inverser Konfokalmikroskopie.

## Markierung der DNA im Zellkern

### Hoechst33342

Die Markierung der DNA im Zellkern kann in lebenden, sowie fixierten und permeabilisierten Zellen folgendermaßen durchgeführt werden. 2 µg/ml Hoechst33342 wurde in DPBS<sup>-/-</sup> angesetzt und in einem Volumen von 200 µl/cm<sup>2</sup> auf die Zellen für 5 min, bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> gegeben. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und waren einsatzbereit für eine Visualisierung mithilfe einer Anregung bei 355 nm ( $\lambda_{em} = 465$  nm) und mikroskopischer Detektion.

### CyQUANT®

Für eine permanente Markierung der DNA mit CyQUANT® wurde eine 2-fache Färbelösung nach den Anweisungen des Herstellers angefertigt. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit lebendigen Zellen durch eine 1:1 Mischung der Färbelösung mit dem vorhandenen Medium der Zellen nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte ohne Waschen durch eine Anregung bei 480 nm.

## MitoTracker™ Markierung der Mitochondrien

Mitochondrien wurden in der subzellularen Wirkungsortidentifikation der Peptide mithilfe des MitoTracker™ Green visualisiert. Die lebenden Zellen wurden mit 200 µl/cm<sup>2</sup> 125 nM MitoTracker™ Green in Zellkulturmedium für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gefärbt. Anschließend wurde mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mithilfe inverser fluoreszenzbasierter Konfokalmikroskopie ausgewertet ( $\lambda_{ex} = 490$  nm,  $\lambda_{em} = 519$  nm).

## CellTracker™ Markierung des Zytoplasmas

Für die Zellenachverfolgung im vasQchip wurde das Zytoplasma der Zellen mithilfe CellTracker™ Green gefärbt. Es wurde eine Färbelösung im Verhältnis 1:1000 von CellTracker™ Green (10 mM) und Kulturmedium hergestellt und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch Medium ersetzt und im Fall der HepG2-Sphäroide im Tumormodell von Kapitel 3.4.3 in das umgebende Kompartiment im Lebermodell im vasQchip transferiert. Die Auswertung der CellTracker™-Markierung erfolgte mithilfe inverser Konfokalmikroskopie ( $\lambda_{ex} = 492$  nm,  $\lambda_{em} = 517$  nm).

## Immunfluoreszenzmarkierung

Nach erfolgter Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden unspezifische Bindungsstellen mit CasBlock™ für 30 min bei RT blockiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und wiederum über Nacht mit dem Sekundärantikörper behandelt. Die eingesetzten Konzentrationen sind Tabelle 10 zu entnehmen, die verwendeten Volumina entsprachen 200 µl/cm<sup>2</sup>. Nach dem Behandlungsende wurde wiederum zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend

durch Anregung mit Wellenlängen entsprechend des verwendeten Fluorophors, erfolgte die Visualisierung der markierten Zellstrukturen.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper und deren eingesetzten Konzentrationen und Anregungs- und Emissionsmaxima.

Antikörper	Wirt	Konzentration	Anregung [nm]	Emission [nm]
<b>Primärantikörper</b>				
Anti-CD31	Schaf	5 µg/ml	/	/
Anti-CD31-FITC	Maus	1:100	488	500-550
Anti-Nanog	Maus	1:1000	/	/
Anti-Oct3/4	Kaninchen	1:250	/	/
Anti-C206	Kaninchen	1:2000	/	/
Anti-Albumin	Kaninchen	1:100	/	/
Anti-CYP3A4	Maus	1:1000	/	/
<b>Sekundärantikörper</b>				
Alexa Fluor®488 Anti-Kaninchen	Esel	1:500	488	500-550
Alexa Fluor®488 Anti-Maus	Ziege	1:1000	488	500-550
Alexa Fluor®488 Anti-Schaf	Esel	1:500	488	500-550
Alexa Fluor®647 Anti-Kaninchen	Huhn	1:500	635	650-700
FITC-Anti-Schaf	Esel	1:500	488	500-550

### Durchflusszytometrie

Die WTC11 wurden mithilfe von 0,1 ml/cm<sup>2</sup> Accutase™ abgelöst und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 1 ml 4 %igem PFA für 10 min bei RT. Anschließend wurde mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 3 min) und die Zellen in 1 ml 0,1 %igem Triton-X aufgenommen und für 4 min permeabilisiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit FACS-Puffer bei 1200 rpm für 5 min. Die Resuspension der Zellen wurde mit 100 µl/10<sup>6</sup> Zellen durchgeführt, zu welchen noch 2 µl/10<sup>6</sup> Zellen Fc-Block hinzugefügt und insgesamt für 30 min auf Eis inkubiert wurde. Die blockierten Zellen wurden gedrittelt und jeweils 10<sup>6</sup> Zellen mit 20 µl Antikörper, 20 µl Isotypenkontrolle oder ohne Zusatz versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer mit anschließender Resuspension in 200 µl/10<sup>6</sup> Zellen FACS-Puffer. Die gefärbten Zellen wurden bei 4 °C bis zur Weiterverwendung gelagert. Die Analyse der drei Proben (Antikörpermarkierung, Isotypkontrolle und Negativkontrolle) erfolgte in Zusammenarbeit mit M. Sc. Juliana Pfeifer mithilfe des Durchflusszytometers. (*Guava® easyCyte™ Flow Cytometry Systems*).



### 4.2.3.2 Viabilitätsanalysen

#### **PrestoBlue™ Assay**

Für die Analyse der Zellviabilität im Mikrokanal und dem umgebenden Kompartiment wurde das Lebermodell wie in Kapitel 4.2.2.3 erläutert, aufgebaut. An Tag 3 und 7 wurden die vasQchips von der Mikrofluidik entfernt und die Zellviabilität bestimmt. Dafür wurde das vorhandene Medium mit einer 1:10 Mischung aus *PrestoBlue*™-Reagenz und Kokulturmedium ersetzt und für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurde die Mischung aus *PrestoBlue*™-Reagenz und Medium ohne Zellen inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des konditionierten Mediums in eine 96-Well-Platte überführt und die Fluoreszenz mithilfe des Mikroplattenlesers (SpectraMax iD3) quantifiziert ( $\lambda_{em}$ : 560 nm,  $\lambda_{ex}$ : 600 nm). Die Messungen erfolgten in jeweils Triplikaten der jeweiligen Proben. Die verwendeten vasQchips wurden erneut mit Kokulturmedium befüllt und für deren Weiterkultivierung an die Mikrofluidik angeschlossen.

#### **MTT-Assay**

Für die Bestimmung der Toxizität eines Wirkstoffes wurde ein MTT-Assay durchgeführt.  $5 \cdot 10^4$  Hepatozyten/cm<sup>2</sup>,  $1 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> oder  $1 \cdot 10^4$  HepG2/cm<sup>2</sup> wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät, sofern nicht anders angemerkt. Nach einer 3-tägigen Kultivierungszeit wurde das Medium mit 100 µl des entsprechenden Wirkstoffes mit einer spezifischen Konzentration ausgetauscht. Der Behandlungszeitraum wurde individuell dem Experiment angepasst und erstreckte sich zwischen einigen Minuten bis hin zu mehreren Tagen. Als Kontrollen wurden eine unbehandelte Lebendkontrolle und eine Todkontrolle verwendet, welche durch Zugabe von 5 µl 20 %igem Triton X für 5 min bei RT am Ende der Behandlung erzeugt wurde. Es folgte eine Zugabe von 15 µl MTT-Reagenz zu allen Triplikaten mit einer Inkubation von 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung beendet und nach 24 h Inkubationszeit wiederum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, wurde die Absorption bei 595 nm mithilfe eines Mikroplattenlesers bei 595 nm (SpectraMax iD3) ermittelt. Durch Relativierung auf die Leben-/Todkontrolle erfolgte eine Quantifizierung der toxischen Wirkung der untersuchten Wirkstoffe.

#### **CellTiterGlo® Luminizenz Zellviabilität-Assay**

Die Quantifizierung des vorhandenen ATPs in einer Zellpopulation gibt Aufschluss über deren Viabilität. Der *CellTiterGlo*® Luminizenz Zellviabilität-Assay wurde entsprechend der Herstelleranweisung angewandt, beginnend mit 30-minütigem Äquilibrieren der Zell-Platte bei RT. Das *CellTiter-Glo*®-Reagenz wurde anschließend 1:1 mit dem vorhandenen Zellmedium auf Zellen hinzugegeben und eine Negativkontrolle wurde parallel, ohne Zellen mit frischem Medium angesetzt. Einer 2-minütigen Inkubation auf dem Schüttler folgte eine weitere 10-minütige Inkubation bei RT. Die Luminizenz wurde mithilfe des Plattenlesers (SpectraMax iD3, Integration 0,25 s<sup>-1</sup> s) gemessen.

ausgewertete. Für die Bestimmung der exakten ATP-Konzentration wurde eine ATP-Standardkurve angesetzt und analysiert (15000 nM - 937,5 nM).

### **Lebend-/Tod-Färbung**

Zur Darstellung der Zellviabilität im Hydrogel und vasQchip wurde eine Lebend-/Tod-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Färbereagenzlösung mit 4  $\mu$ M Calcein-AM und 20  $\mu$ g/ml Propidiumiodid in Kokulturmedium angesetzt. Insgesamt wurden 250  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> Färbelösung auf lebendigen Zellen eingesetzt und für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit Kokulturmedium überschichtet. Infolgedessen konnte die Auswertung am inversen Konfokalmikroskop erfolgen (PI  $\lambda_{\text{ex}} = 493$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 636$  nm; Calcein-AM  $\lambda_{\text{ex}} = 495$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 515$  nm).

### **Wachstumskurven**

#### **2D-Zellkultur**

0,5·10<sup>4</sup> Zellen wurden in Triplikaten in einer 96-Well-Platte in je 100  $\mu$ l der zu testenden Medien ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt und an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 wurde die Zellzahl in Triplikaten bestimmt. Ein Waschschriff mit DPBS<sup>-/-</sup>, gefolgt von 100  $\mu$ l Trypsin/EDTA führte zu einer enzymatische Zellablösung mithilfe einer Inkubation von 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

#### **Sphäroid**

0,2·10<sup>4</sup> Huh7/Well wurden in einer zellabweisenden Rundboden-96-Well-Platte für 48 h kultiviert. Infolgedessen wurde mit der OPLA-Behandlung unterschiedlicher Konzentrationen in Triplikaten gestartet und das Sphäroid-Wachstum mithilfe lichtmikroskopischer Aufnahmen an Tag 1, 2, 3, 6 und 7 verfolgt. Die Sphäroiddurchmesser wurden mit Image J vermessen, wobei 5 Geraden durch den Mittelpunkt jeden Sphäroids gemessen und gemittelt wurden.

### **4.2.3.3 Funktionalitätstests**

#### **Barriereintegritätsbestimmung mithilfe TEER-Messungen**

Die TEER-Messung erfolgte ausschließlich im Transwell®-System, welches wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben mit Zellen besiedelt wurde. Als Blank diente ein mit Kollagen I beschichtetes Transwell® entsprechend der Zellbeschichtung mit 1 ml Medium im umgebenden Kompartiment und 300  $\mu$ l im Transwelleinsatz. Vor der Messung wurde ein Mediumwechsel mit den gleichen Volumina, wie für den Blank durchgeführt und nach einer Äquilibration im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit von 3 h wurde die TEER-Messung mithilfe des EVOM3 (WPI) durchgeführt (*Mode units: OHMS, Range: 100.000, Well-Plattengröße: 24-Well, Open electrodes: Short*). Die Elektroden wurden zuvor mit 70 %igem Ethanol sterilisiert und mit sterilem dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die TEER-Messung erfolgte zwischen dem

Transwell®-Einsatz und dem darunterliegenden Kompartiment durch die Positionierung der Elektroden in den jeweiligen Flüssigkeiten der Kompartimente. Es wurden je Probe in Triplikaten gemessen und als Differenz zum Blank ausgegeben. Durch die Normierung auf die Barriereoberfläche wurde der TEER in  $\Omega/\text{cm}^2$  ermittelt. Nach Beendigung der Messung wurde die Elektrode in 70 % Ethanol sterilisiert und mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

#### **P450-Glo™ CYP3A4 Assay**

Die Bestimmung der CYP3A4-Aktivität in 2D-Zellkultur und im vasQchip erfolgte mithilfe des P450-Glo™ CYP3A4 Assay. Dieser wurde entsprechend den Herstellerhinweisen durchgeführt und folgendermaßen angepasst. Es wurde mit einem Mediumwechsel inklusive 3  $\mu\text{M}$  Luciferin-IPA und folgender Inkubation für 60 min bei 37 °C, und 5 % CO<sub>2</sub> begonnen. Anschließend wurde das vorhandene Medium mit einer gleichen Menge an Luciferin-Detektion-Reagenz versetzt. Infolgedessen wurden 50  $\mu\text{l}$  der Lösung in eine 96-Well-Platte überführt und direkt die Luminizenz mithilfe des Plattenlesers (SpectraMax iD3) detektiert.

#### **Scavenger-Funktion der LSEC mithilfe von Ovalbumin**

$1,5 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> wurden in  $\mu$ -Slides-8- Wells bis zur Konfluenz 7 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte eine Lebendfärbung mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ovalbumin Alexa Fluor™ 488 Konjugat für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Infolgedessen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 1,5 h. Zusätzlich wurden zu ausgewählten Proben 50 nM LysoTracker™ Red für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> hinzugefügt, bevor eine Auswertung der Fluoreszenz mithilfe inverser Konfokalmikroskopie beifolgender Anregung stattfand, LysoTracker™ Red ( $\lambda_{\text{ex}} = 577 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ), OVA-488 ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$ ). Zudem wurden mit OVA-488 behandelte Zellen für eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD206 entsprechend Kapitel 4.2.3.1 präpariert.

#### **Tubeformation-Assay**

Die  $\mu$ -Slide-8-Well wurden mit 50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  unverdünntem GFR-Matrigel für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> beschichtet. Anschließend wurden  $4,2 \cdot 10^4$  LSEC/cm<sup>2</sup> in 200  $\mu\text{l}$  LSEC-Medium auf der Beschichtung ausgesät. Das Zellverhalten wurde mithilfe inverser Lichtmikroskopie nach 4 h und 24 h und protokolliert.

#### 4.2.3.4 Lipidextraktion / Analyse

##### Proteinbestimmung (DC-Protein Assay)

Die Zellen jedes Ansatzes wurden in Lyse-Puffer aufgenommen und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Homogenisierung der Proben erfolgte mithilfe einer dreimaligen Wiederholung von 5 s Ultraschallbehandlung mit 3 s Kühlphase auf Eis. Die Proben werden anschließend auf Eis gelagert bis zu deren Verwendung im DC-Protein-Assay. Dafür wurde zunächst eine Standardkurve mit BSA (bovines Serumalbumin) mit Konzentrationen zwischen 2 mg/ml-0,1 mg/ml BSA in Lyse-Puffer angesetzt. Insgesamt wurden 5 µl der BSA-Proben in einer 96-Well-Platte in Duplikaten vorgelegt. Anschließend wurde 1 µl der homogenisierten Probe mit 4 µl Lyse-Puffer in der 96-Well-Platte verdünnt. Entsprechend der Herstelleranweisungen wurden 25 µl einer Mischung aus Reagenz A und S (50:1) zu allen Ansätzen und einer Lyse-Puffer-Kontrolle hinzugegeben. Infolgedessen wurden 200 µl Reagenz B zu allen Ansätzen gegeben, gemischt und für 15 min, lichtgeschützt bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die kolorimetrische Auswertung der Absorption am Photospektrometer bei 750 nm. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mithilfe der BSA-Standardkurve aus Duplikaten.

##### Lipidextraktion

Die Lipidextraktion erfolgte aus dem Zellysate und wurde nach Folch *et al.* durchgeführt.<sup>[269]</sup> Die Zellen wurden zuvor in Lyse-Puffer aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung homogenisiert (siehe Proteinbestimmung). 10 µl Interner-Standard (15:0 TAG 50,14 µg/20µl; 17:0 NEFA 47,89 µg/20 µl) wurden in Glasreagenzgefäßen mit dem Zellysate versetzt. Der Probenansatz wurde auf insgesamt 500 µl mit 0,9 % Saline aufgefüllt und eine Kontrolle mit ausschließlich Saline wurde zusätzlich angesetzt. Anschließend wurde 1 ml NaCl (1 M) hinzugefügt und auf dem Rotationsmischer für 15 min gemischt, mit einer darauffolgenden Zentrifugation bei 800 g für 10 min bei 14 °C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und verworfen, wohingegen die organische Phase in ein neues Glasgefäß überführt wurde. Im Wasserbad bei 50 °C, unter Stickstoff wurde die organische Phase komplett abgedampft und anschließend wurde die erhaltene Fettsäuremischung in 1 ml Chloroform durch Vortexen resuspendiert. Festphasenextraktion mithilfe Aminopropyl-Kieselsäure-Säulen ermöglicht die Separation von polaren und nichtpolaren Lipiden.<sup>[270]</sup> Dafür wurden die Säulen zunächst zweimal mit 1 ml Aceton und zweimal mit 1 ml Chloroform gewaschen. Danach wurden die Proben auf die Säulen aufgetragen und ohne weitere Hilfsmittel erfolgte deren Durchfluss mit Retention polaren Phospholipiden auf der Säule. Zwei weitere Waschschrte mit jeweils 1 ml Chloroform versicherte den Durchfluss von Triacylglycerole und Cholesterinester, welche in Glasgefäßen aufgefangen wurden. Die gesammelte nichtpolare Lipidprobe wurde unter Stickstoff bei 50 °C im Wasserbad vom Lösungsmittel getrennt und anschließend in 1 ml Hexan aufgenommen. Eine weitere Festphasenextraktion erlaubte die Trennung von Triacylglycerole und Cholesterinester. Dafür wurden neue Säulen

viermal mit jeweils 1 ml Hexan konditioniert und anschließend mit der Probe beladen. Der Cholesterinester wird ohne Retention durch die Säule geleitet wohingegen Triacylglycerole sich am Sorbent anreicherten. Zweimaliges Waschen mit jeweils 1 ml Hexan eliminierte restlichen Cholesterinester von der Säule. Der Durchfluss wurde verworfen und die Elution der Triacylglycerole, mithilfe von 2 ml einer Mischung aus Hexan, Chloroform und Ethylacetat (100:5:5) und Unterdruck eingeleitet. Die Lipidfraktion wurde anschließend unter Stickstoff im Wasserbad bei 50 °C vom Lösungsmittel getrennt und anschließend in 400 µl einer Mischung aus Butylhydroxytoluol und Toluol (1:10; w/v) resuspendiert. 800 µl einer 1,5 %igen Schwefelsäure in Methanol wurden für die Methylierung der Lipide zu den Proben hinzugefügt, gevortext und für 60 min im Wasserbad bei 80 °C inkubiert. Nach deren Abkühlung wurden 2 ml Neutralisationslösung (0,124 M KHCO<sub>3</sub>, 0,125 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in dH<sub>2</sub>O) und 2 ml Cyclohexan hinzugefügt und für 10 min auf dem Rotationsmischer gemischt. Die organische Phase wurde von der wässrigen Phase durch einen Zentrifugationsschritt bei 800 g für 10 min bei 14 °C getrennt und in ein neues Glasgefäß transferiert. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoff und 50 °C im Wasserbad entfernt und die Triacylglycerole wurden in 500 µl Chloroform (vasQchip oder 6-Well-Probe) oder in 120 µl Chloroform (Sphäroid und 96-Well-Probe) aufgenommen. Die resuspendierten Proben wurden in gaschromatographiespezifische Behältnisse überführt und mit 10 µl Externem-Standard (23:0 Methyl ester, 50,2 µg/20 µl) versehen, wodurch die Proben für deren Analyse mithilfe der Gaschromatographie eingesetzt werden konnten.

### **Gaschromatographie/ Massenspektrometrie**

Die isolierten Fettsäurenmethyl ester wurden mithilfe 31 bekannten Fettsäuren im Standard bezüglich ihrer Retentionszeit durch Gaschromatographie quantifiziert. Alle gemessenen Fettsäuren wurden zusammengefasst und jede Fettsäure wurde als Prozentsatz aller gemessener Fettsäuren dargestellt.

Intrazelluläre *de novo* Lipogenese (DNL) wurde anhand inkorporierten Deuteriums in Palmitinsäure von <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O aus dem Medium nachverfolgt. [<sup>2</sup>H]-Palmitat Anreicherung wurde mithilfe Gaschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie analysiert. Ionen mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis von 270 (M+0) und 271 (M+1) wurden identifiziert durch spezifisches Ionenmonitoring. Die DNL wurde bestimmt aus dem Verhältnis neu synthetisiertem [<sup>2</sup>H]-Palmitat gegenüber nicht markiertem Palmitat.

### **Biochemische Analyse des Zellmediums**

Glucose, Laktat, TAG, 3-OHB und NEFA-Konzentrationen wurden im gesammelten Medium der mit OPLA behandelten Zellen bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den AU480-Chemie-Analyser (Bekmann Coulter), wobei alle Untersuchungen entsprechend der Herstelleranweisungen durchgeführt wurden, mit den entsprechenden Standards und Kalibrierungsreagenzien. Die erhaltenen Konzentrationen wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

## **BODIPY Lipidmarkierung und Quantifizierung**

Die Lipidtropfen in den Huh7-Sphäroiden wurden mithilfe des lipophilen Farbstoffes BODIPY gefärbt. Zuvor wurden die Sphäroide zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend für 45 min mit 4 % PFA fixiert. Eine Färbelösung aus 5  $\mu$ M BODIPY und 10  $\mu$ M Hoechst33342 wurde in DPBS<sup>-/-</sup> angesetzt und 100  $\mu$ l für 60 min auf die Sphäroide gegeben. Anschließend erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit DPBS<sup>-/-</sup>. Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgte am *Cytation1-Imaging-Reader* (BioTek) mit 15 Aufnahmen im Abstand von 5  $\mu$ m wobei die detektierte Fluoreszenz von BODIPY ( $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 503 \text{ nm}$ ) auf die Intensität von Hoechst33342 normiert wurde.

## **Oil-Red-O-Lipidfärbung**

Für die *Oil-Red-O* Färbelösung wurde zunächst eine 0,5 % *Oil-Red-O*-Lösung (w/v) aus 0,5 g *Oil-Red-O* in 100 ml Isopropanol bei 60 °C hergestellt. Direkt vor dem Einsatz der Färbelösung auf fixierten Zellen wurde diese frisch 3:2 mit dH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 0,3 % verdünnt. Ungelöste Feststoffrückstände wurden mithilfe eines Filterpapiers aus der *Oil-Red-O*-Färbelösung entfernt und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Die Färbung der fixierten Zellen erfolgte durch Inkubation bei RT für 15 min mit anschließendem Waschen mit DPBS<sup>-/-</sup>. Die Auswertung der Färbung wurde am inversen Lichtmikroskop durchgeführt.

## **4.2.4 Mikrobiologische Methoden**

### **4.2.4.1 RNA-Isolation**

Die Zellen wurden von Mediumrückstände befreit und in 400  $\mu$ l TRIzol<sup>®</sup> aufgenommen und vollständig lysiert durch Homogenisierung mit der Pipette. In einem Reaktionsgefäß wurde die lysierte Probe für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 80  $\mu$ l Chloroform versehen. Durch 15 s intensiven Mischen und einer Zentrifugation bei 12000 g für 15 min, bei 4 °C erfolgte eine Separierung der wässrigen und organischen Phase. Die transparente, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 0,2 ml Isopropanol vermischt und bei RT für 10 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 500  $\mu$ l 75 %igem EtOH durch vortexen gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 7500 g und 4 °C für 5 min, wonach der Überstand verworfen wurde. Das RNA-Pellet wurde für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 40  $\mu$ l RNase-freiem Wasser resuspendiert indem es bei 60 °C für 15 min inkubiert wurde. Die RNA-Konzentration wurde anschließend mithilfe des Nanodrops bei einer Absorption von 260 nm bestimmt.

#### 4.2.4.2 DNA-Verdau

2 µg RNA wurden mit RNase-freiem Wasser und 2 µl DNase I (10x) Reaktionspuffer und 2 u DNase auf ein Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Proben bei 37 °C wurden 2 µl DNase-Stopp-Lösung hinzugegeben und zusätzlich für 10 min bei 65 °C erhitzt.

#### 4.2.4.3 Reverse Transkription

Die RNA wurde mithilfe der RT-PCR in cDNA transkribiert. Dafür wurden pro 1 µg RNA, 1 µl Random Primer (200 nmol) eingesetzt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Eine Mischung aus 3 µl nukleasefreiem Wasser, 4 µl M-MLV-Reverse Transkriptase Reaktionspuffer, 2 µl dNTPS (10mM) und 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase wurde pro 1 µg RNA hinzugefügt. Als DNA-Kontaminationskontrolle wurde eine Probe ohne Enzym angesetzt. Die Reaktion erfolgte zunächst bei 25 °C für 10 min worauf eine 60-minütige Inkubation bei 42 °C folgte. Zum Abschluss wurde die Reaktion für 10 min bei 70 °C inaktiviert und die erhaltene cDNA wurde mit 100 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.4.4 Kontroll-PCR

Die Reverse-Transkription der RNA in cDNA wurde durch eine PCR mithilfe des Haushaltsgen GAPDH überprüft. 3 µl cDNA wurden auf Eis mit 4 µl (5X)-Reaktions-Puffer, 0,5 µl dNTPs (10 mM), 1 µl *Forward* und *Reverse* GAPDH-Primer (10 pmol/µl) und 0,25 µl DNA-Polymerase gemischt und auf 20 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Thermocycler mit in Tabelle 11 aufgeführten Inkubationszeiten, bei entsprechender Temperatur.

Tabelle 11: Zeitabhängiges Protokoll für die thermischen Schritte der Kontroll-PCR

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur [ °C]
1	2 min	95
35	30 s	95
	30 s	60
	30 s	72
1	5 min	72

Die Verifizierung der cDNA-Synthese und zusammenhängend damit die Kontroll-PCR, erfolgte mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mithilfe eines 2 %igen Agarosegel mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer bei 100 V nach deren Größe aufgetrennt. Als Referenz diente ein 100 bp DNA-Marker. Die Auswertung der Amplifikation und Auftrennung der DNA erfolgte durch die Anregung des fluoreszierenden DNA-Farbstoff im UV-Bereich mithilfe des *GelDoc Go Imaging System* (Bio Rad Technologies).

#### 4.2.4.5 RT-qPCR

Für die RT-qPCR wurde pro Ansatz eine Reaktionsmischung von 10 µl *GoTaq<sup>®</sup>qPCR* Mastermix 1 µl Primer (*Forward* und *Reverse*, je 10 pmol/µl) 5 µl nukleasefreiem Wasser und 4 µl cDNA auf Eis zusammengestellt. Dabei wurde für jede Probe technische Triplikate in 96-Well-PCR-Platten angesetzt. Nach dem Versiegeln der Platte wurde für 2 min bei 180 g zentrifugiert und anschließend die RT-qPCR quantitativ durchgeführt, mithilfe des in Tabelle 12 dargestellten Programm im Bio Rad *CFX96 RT-PCR Detection* System. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet und auf das Referenzgen GAPDH normiert.

Tabelle 12: RT-qPCR-Programm der zeitabhängigen thermischen Inkubationen

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur [ °C]
1	2 min	95
	30 s	95
35	30 s	60
	30 s	72
1	5 min	72

#### 4.2.5 Peptoid-Synthese

##### Boc-Schätzung von Diaminobutan

Die freien Amingruppen von *N*-1,4-Diaminobutan wurde mithilfe von Boc-Schutzgruppen vor deren Einsatz in der Festphasensynthese geschützt. 400,2 mmol *N*-1,4-Diaminobutan wurde in 240 ml Tetrahydrofuran (THF) in einem Rundkolben vorgelegt. 60 mmol Di-*tert*-butyldicarbonat (*Boc*<sub>2</sub>O, 1 Äq., 13,1 g) in THF wurden über 4 h zugetropft und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde infolgedessen unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 ml kaltem Wasser gelöst. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und dreimal mit kaltem Wasser nachgewaschen. Die wässrige Phase wurde viermal mit 50 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die dabei entstandenen organischen Phasen wurden vereint und zweimal mit je 30 ml Wasser und einmal mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Es folgte ein Trocknungsschritt der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit anschließendem Abfiltrieren des Feststoffes. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt wodurch das Produkt als klare, viskose Flüssigkeit erhalten und anschließend bei 4 °C gelagert wurde. Die Synthese wurde entsprechend der Tabelle 13 von M. Sc. Julia Rieger durchgeführt.

Tabelle 13: Boc-Schätzung von *N*-1,4-Diaminobutan.

Edukt	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]
<i>N</i> -1,4-Diaminobutan	6,67	400,2	35,38
<i>Boc</i> <sub>2</sub> O	1,0	60	13,1



### Festphasensynthese der Peptide

Die Peptide wurden mithilfe der Festphasensynthese am Rink-Amid-Harz durchgeführt, wobei 10 ml PP Reaktoren mit PE Fritte als Reaktionsgefäße dienten. Zunächst wurden 100 mg Rink-Amid-Harz (Belegungsdichte 0,29 mmol/g) in die Reaktoren eingefüllt und mit 1 ml Dimethylformamid (DMF) über Nacht gequollen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe am Harz erfolgte mithilfe 1 ml 20 %iger Piperidinlösung in DMF und einer Inkubation von 5 min unter Schütteln und Verwerfung des Überstands. Nach zwei weiteren, Wiederholungen folgte ein dreimaliger Waschschrift mit jeweils 0,5 ml DMF. Die Acylierung der freien Amingruppen nach deren Entschützung wurde mithilfe einer frisch angesetzten 0,5 M Bromessigsäure-Lösung durchgeführt. Dazu wurden 120,9 mg Bromessigsäure (8,00 Äq., 0,87 mmol) in 1 ml DMF gelöst und mit DIC (8,00 Äq., 0,87 mmol, 110,1mg) versetzt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT, unter Schütteln welche mit dreimaligem Waschen mit 1,5 ml DMF beendet wurde. Die Kupplung der Monomere wurde entsprechend der Reihenfolge in Tabelle 3, durchgeführt. Es wurde 0,1 M des Monomers in 1 ml DMF für die jeweilige Kupplung entsprechend Tabelle 14 eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei RT unter Schütteln erfolgte ein dreimaliger DMF-Waschschrift. Für die Anbringung weitere Submonomere wurde wie bereits beschrieben, eine Acylierung mit anschließender Kupplung durchgeführt, bis eine Peptoidlänge bestehend aus 4 gekuppelten Aminen synthetisiert wurde.

Tabelle 14: Eingesetzte Amine in der Festphasensynthese von Peptoiden für eine 0,1 M Submonomerlösung

<b>Edukt</b>	<b>Äquivalente</b>	<b>Stoffmenge [mmol]</b>	<b>Molare Masse [g/mol]</b>
N-Boc-Diaminobutan	8,00	7,00	188,3
Propargylamin	8,00	7,00	55,08
Benzylamin	8,00	7,00	107,15
4-Chlorbenzylamin	8,00	7,00	141,6

Nach dem abschließenden Waschschrift wurde das Fluorophor RhodaminB an das Peptoid gekuppelt. Es wurden jeweils 3 Äquivalente HOBt, DIC und RhodaminB, entsprechend Tabelle 15 in 7 ml DMF gelöst und 1 ml in den Reaktor aufgezogen und über Nacht, unter Schütteln bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde mit DMF gewaschen, bis eine transparente Waschlösung erhalten wurde.

Tabelle 15: Kupplung des Fluorophors RhodaminB an ein Peptoid

<b>Edukt</b>	<b>Äquivalente</b>	<b>Stoffmenge [mmol]</b>	<b>Molare Masse [g/mol]</b>
Rink-Amid-Harz	1,00	0,29	
RhodaminB	3,00	0,635	479,02
HOBt	3,00	0,635	135,12
DIC	3,00	0,635	126,20

Infolgedessen wurde das Peptoid vom Harz abgespalten, wofür zunächst achtmal mit Dichlormethan (DCM) gewaschen wurde. Daraufhin wurden die Peptoide mit 3 ml 90 % TFA in DCM für 2 h bei RT vom Harz abgespalten. Die abgespaltenen Peptoide wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und mit Stickstoff bei RT abgedampft. Eine 40 mM Peptoidstammlösung wurde anschließend mit einer dH<sub>2</sub>O/EtOH-Mischung (1:1) angesetzt. Die Synthese der Peptoide wurde mithilfe MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestätigt und folgendermaßen dafür vorbereitet. Eine  $\alpha$ -Cyano-Zimtsäure gelöst in 50 % Acetonitril, 2 % TFA und 48 % Wasser (1:100 CHCA/Matrixlösung) wurde als Matrix für die MALDI-ToF eingesetzt. Eine Mischung aus 0,5  $\mu$ l Matrix und 0,5  $\mu$ l Peptoid wurden auf einer Standardprobenplatte aufgetragen und an der Luft kristallisiert. Die Messung wurde im positiven Modus mit dem Massenspektrometer (UltrafleXtreme, Bruker und 4800 Proteomics Analyser, Applied Biosystems) durchgeführt.

### 4.2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Anzahl an unabhängigen Stichproben wurde als n definiert. Die Anwendung statistischer Vergleiche der Mittelwerte erfolgte mithilfe GraphPad Prism unter Verwendung des Student' t-Tests. Statistisch signifikante Werte wurden mit p \* für  $p < 0,05$ , mit \*\* für  $p < 0,01$  und mit \*\*\* für  $p < 0,001$  gekennzeichnet.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

2D .....	Zweidimensional
3D .....	Dreidimensional
3-OHB .....	3 Hydroxybuttersäure
AHCT.....	<i>N</i> Acetyl DL Homocysteine Thiolacton <i>N</i> Acetyl DL Homocysteine Thiolacton
AMED .....	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicology
<b>Boc</b> .....	<i>Tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc2O.....	<i>Di-tert</i> -butyldicarbonat
BSA.....	<i>Bovines</i> Serumalbumin
Calcein-AM.....	Calcein-Acetoxy-methylester
CD206).....	Cluster of Differentiation 206 / Mannoserezeptor
CD31 .....	Cluster of Differentiation 31
CMFDA .....	5-Chloromethylfluorescein-Diacetat
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
COOH.....	Carbonsäure
CYP .....	Cytochrom P450
CYP3A4 .....	Cytochrom P450 3A4
CYP450.....	Cytochrom P450
DCM.....	Dichlormethan
dH <sub>2</sub> O .....	Demineralisiertes Wasser
DIC.....	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMF .....	Dimethylformamid, Dimethylformamid
DNL.....	<i>De novo</i> Lipogenese
DPBS .....	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ECM .....	Extrazellulärer Matrix, Extra Cellular Matrix
EDC 1 Ethyl 3 (3 dimethylaminopropyl) carbodiimid	1 Ethyl 3 (3 dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA .....	Ethylendiamintetraacetat
EGM2 .....	Endothelial-Cell-Growth-Media-2
EtOH .....	Ethanol
FCS .....	Fetales Kälberserum
FDA .....	Food and Drug Administration
Fmoc.....	Fluorenylmethoxycarbonyl
G6P .....	Glucose-6-Phosphatase
GelMA .....	Gelatine-Metacrylamid
GelNB.....	Norboren-funktionalisierte Gelatine
GelS .....	Thiolierte Gelatine
HCl.....	Hydrochlorid
hiPSC.....	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
HS.....	Humanserum
HUVEC.....	humane umbilikalen venösen endothelialen Zellen, <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IC <sub>50</sub> .....	Inhibitory Concentration bei 50%
KIT.....	Karlsruher Institut für Technologie

LAP	<i>Lithium Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat</i>
LSEC	<i>Lebersinusoidale Endothelzellen</i>
LYVE-1	<i>endotheliale Lymphgefäße Hyaluronrezeptor-1</i>
MAA	<i>Methacrylsäureanhydrid</i>
MACS	<i>Magnetisch aktivierte Zellsortierung</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assistierter Laser Dessorption Ionisierung Flugzeitanalyse</i>
MESP1	<i>Mesoderm posterior 1 Homolog</i>
MES-Puffer	<i>2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer</i>
MTT-Assay	<i>3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid Toxizität Test</i>
NAC	<i>N-Acetylcystein</i>
NAFLD	<i>Non Alcoholic Liver Disease, Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
NAPQI	<i>N-Acetyl-p-Benzoquinon Imin</i>
NBCA	<i>5-Norbornen-2-Carboxylsäure</i>
NEFA	<i>Nicht-esterifizierte Fettsäuren</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
OCDEM	<i>Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism</i>
OH	<i>Hydroxygruppe</i>
OPLA	<i>Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und <math>\alpha</math>-Linolensäure</i>
OVA	<i>Ovalbumin</i>
P/S	<i>Penicillin/Streptomycin</i> <i>PIPropidiumiodid</i>
RGD	<i>Arginin-Glysin-Asparaginsäure</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative Polymerasenkettenreaktion</i>
SH	<i>Thiol</i>
STAB2	<i>Stabilin-2</i>
TEER	<i>Transendothelialer elektrischer Widerstand</i>
TFA	<i>Trifluoressigsäure</i>
TG	<i>Triacylglycerol</i>
TGF	<i>Transforming-Growth-Factor</i>
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>
UGT1A1	<i>UDP-Glucuronosyltransferase 1A1</i>
VE-Cadherin	<i>vaskular endotheliales Cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLDL-TG	<i>very low-density lipoprotein-Triacylglycerol</i>

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] K. I. Kaitin, *Clinical pharmacology and therapeutics* **2010**, 87, 356.
- [2] S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, A. L. Schacht, *Nature reviews. Drug discovery* **2010**, 9, 203.
- [3] M. D. Rawlins, *Nature reviews. Drug discovery* **2004**, 3, 360.
- [4] A. D. Hingorani, V. Kuan, C. Finan, F. A. Kruger, A. Gaulton, S. Chopade, R. Sofat, R. J. MacAllister, J. P. Overington, H. Hemingway, S. Denaxas, D. Prieto, J. P. Casas, *Scientific reports* **2019**, 9, 18911.
- [5] S. R. Khetani, D. R. Berger, K. R. Ballinger, M. D. Davidson, C. Lin, B. R. Ware, *Journal of laboratory automation* **2015**, 20, 216.
- [6] G. Abboud, N. Kaplowitz, *Drug safety* **2007**, 30, 277.
- [7] J. P. Hughes, S. Rees, S. B. Kalindjian, K. L. Philpott, *British journal of pharmacology* **2011**, 162, 1239.
- [8] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, L. Yang, *Assay and drug development technologies* **2014**, 12, 207.
- [9] A. Akhtar, *Cambridge quarterly of healthcare ethics CQ the international journal of healthcare ethics committees* **2015**, 24, 407.
- [10] G. A. van Norman, *JACC. Basic to translational science* **2020**, 5, 387.
- [11] G. Vunjak-Novakovic, S. Bhatia, C. Chen, K. Hirschi, *Stem Cell Research & Therapy* **2013**, 4 Suppl 1, S8.
- [12] B. Corrado, V. de Gregorio, G. Imparato, C. Attanasio, F. Urciuolo, P. A. Netti, *Biotechnology and bioengineering* **2019**, 116, 1152.
- [13] C. H. Beckwitt, A. M. Clark, S. Wheeler, D. L. Taylor, D. B. Stolz, L. Griffith, A. Wells, *Experimental cell research* **2018**, 363, 15.
- [14] A. Khademhosseini, R. Langer, *Nature protocols* **2016**, 11, 1775.
- [15] L. G. Griffith, G. Naughton, *Science (New York, N.Y.)* **2002**, 295, 1009.
- [16] R. Mittal, F. W. Woo, C. S. Castro, M. A. Cohen, J. Karanxha, J. Mittal, T. Chhibber, V. M. Jhaveri, *Journal of cellular physiology* **2019**, 234, 8352.
- [17] A. Stewart, D. Denoyer, X. Gao, Y.-C. Toh, *Drug discovery today* **2023**, 28, 103496.
- [18] D. E. Ingber, *Nature reviews. Genetics* **2022**, 23, 467.
- [19] E. Y. Adashi, D. P. O'Mahony, I. G. Cohen, *The American journal of medicine* **2023**.
- [20] Ali Khademhosseini, Robert Langer, *Biomaterials* **2007**, 28, 5087.
- [21] S. Bupphathong, C. Quiroz, W. Huang, P.-F. Chung, H.-Y. Tao, C.-H. Lin, *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **2022**, 15.
- [22] T. Göckler, S. Haase, X. Kempter, R. Pfister, B. R. Maciel, A. Grimm, T. Molitor, N. Willenbacher, U. Schepers, *Advanced healthcare materials* **2021**, 10, e2100206.
- [23] N. Ashammakhi, A. GhavamiNejad, R. Tutar, A. Fricker, I. Roy, X. Chatzistavrou, E. Hoque Apu, K.-L. Nguyen, T. Ahsan, I. Pountos, E. J. Caterson, *Tissue engineering. Part B, Reviews* **2022**, 28, 633.
- [24] R. F. Pereira, P. J. Bártolo, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, 132, n/a-n/a.
- [25] M. Raasch, E. Fritsche, A. Kurtz, M. Bauer, A. S. Mosig, *Advanced drug delivery reviews* **2019**, 140, 51.

- [26] F. Colombo, G. Sampogna, G. Coccozza, S. Y. Guraya, A. Forgione, *Journal of microscopy and ultrastructure* **2017**, 5, 1.
- [27] V. Y. Soldatow, E. L. Lecluyse, L. G. Griffith, I. Rusyn, *Toxicology research* **2013**, 2, 23.
- [28] K. Duval, H. Grover, L.-H. Han, Y. Mou, A. F. Pegoraro, J. Fredberg, Z. Chen, *Physiology (Bethesda, Md.)* **2017**, 32, 266.
- [29] J. A. Burdick, G. Vunjak-Novakovic, *Tissue engineering. Part A* **2009**, 15, 205.
- [30] C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, *Journal of cell science* **2010**, 123, 4195.
- [31] P. Pingitore, K. Sasidharan, M. Ekstrand, S. Prill, D. Lindén, S. Romeo, *International journal of molecular sciences* **2019**, 20.
- [32] C. C. Bell, D. F. G. Hendriks, S. M. L. Moro, E. Ellis, J. Walsh, A. Renblom, L. Fredriksson Puigvert, A. C. A. Dankers, F. Jacobs, J. Snoeys, R. L. Sison-Young, R. E. Jenkins, Å. Nordling, S. Mkrtchian, B. K. Park, N. R. Kitteringham, C. E. P. Goldring, V. M. Lauschke, M. Ingelman-Sundberg, *Scientific reports* **2016**, 6, 25187.
- [33] S.-A. Lee, Y. Da No, E. Kang, J. Ju, D.-S. Kim, S.-H. Lee, *Lab on a chip* **2013**, 13, 3529.
- [34] G. Hamilton, *Cancer letters* **1998**, 131, 29.
- [35] J. Kopecek, *Biomaterials* **2007**, 28, 5185.
- [36] E. M. Ahmed, *Journal of advanced research* **2015**, 6, 105.
- [37] C.-C. Lin, A. Raza, H. Shih, *Biomaterials* **2011**, 32, 9685.
- [38] O. Jeon, C. Powell, L. D. Solorio, M. D. Krebs, E. Alsberg, *Journal of controlled release official journal of the Controlled Release Society* **2011**, 154, 258.
- [39] X. Zhao, Q. Lang, L. Yildirim, Z. Y. Lin, W. Cui, N. Annabi, K. W. Ng, M. R. Dokmeci, A. M. Ghaemmaghami, A. Khademhosseini, *Advanced healthcare materials* **2016**, 5, 108.
- [40] Sandra Van Vlierberghe, Etienne Schacht, Peter Dubruel, *European Polymer Journal* **2011**, 47, 1039.
- [41] S. V. Murphy, A. Atala, *Nature biotechnology* **2014**, 32, 773.
- [42] A. I. van den Bulcke, B. Bogdanov, N. de Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, *Biomacromolecules* **2000**, 1, 31.
- [43] M. Zhu, Y. Wang, G. Ferracci, J. Zheng, N.-J. Cho, B. H. Lee, *Scientific reports* **2019**, 9, 6863.
- [44] P. Jaipan, A. Nguyen, R. J. Narayan, *MRS Communications* **2017**, 7, 416.
- [45] V. Kappings, *Tumormodelle in vitro: Von 2D-Zellkulturen zum durchbluteten Organ-on-a-chip System*, Cuvillier Verlag, Göttingen **2018**.
- [46] L. Goers, P. Freemont, K. M. Polizzi, *Journal of the Royal Society, Interface* **2014**, 11.
- [47] S. Y. Chang, E. J. Weber, K. van Ness, D. L. Eaton, E. J. Kelly, *Clinical pharmacology and therapeutics* **2016**, 100, 464.
- [48] K. Ronaldson-Bouchard, G. Vunjak-Novakovic, *Cell stem cell* **2018**, 22, 310.
- [49] S. Rahmani Dabbagh, M. Rezapour Sarabi, M. T. Birtek, N. Mustafaoglu, Y. S. Zhang, S. Tasoglu, *Aggregate* **2023**, 4.
- [50] N. Pleschka, *In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheiten des Gehirns und der Retina auf einem Organ-on-a-chip System zur Modellierung degenerativer Erkrankungen*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) **2022**.

- [51] V. J. Kujala, F. S. Pasqualini, J. A. Goss, J. C. Nawroth, K. K. Parker, *Journal of materials chemistry. B* **2016**, 4, 3534.
- [52] K.-J. Jang, A. P. Mehr, G. A. Hamilton, L. A. McPartlin, S. Chung, K.-Y. Suh, D. E. Ingber, *Integrative biology quantitative biosciences from nano to macro* **2013**, 5, 1119.
- [53] K.-J. Jang, M. A. Otieno, J. Ronxhi, H.-K. Lim, L. Ewart, K. R. Kodella, D. B. Petropolis, G. Kulkarni, J. E. Rubins, D. Conegliano, J. Nawroth, D. Simic, W. Lam, M. Singer, E. Barale, B. Singh, M. Sonee, A. J. Streeter, C. Manthey, B. Jones, A. Srivastava, L. C. Andersson, D. Williams, H. Park, R. Barrile, J. Sliz, A. Herland, S. Haney, K. Karalis, D. E. Ingber, G. A. Hamilton, *Science translational medicine* **2019**, 11.
- [54] A. Ehrlich, S. Tsytkin-Kirschenschweig, K. Ioannidis, M. Ayyash, A. Riu, R. Note, G. Ouedraogo, J. Vanfleteren, M. Cohen, Y. Nahmias, *Lab on a chip* **2018**, 18, 2510.
- [55] R. Plebani, R. Potla, M. Soong, H. Bai, Z. Izadifar, A. Jiang, R. N. Travis, C. Belgur, A. Dinis, M. J. Cartwright, R. Prantil-Baun, P. Jolly, S. E. Gilpin, M. Romano, D. E. Ingber, *Journal of cystic fibrosis official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **2022**, 21, 606.
- [56] X. Gu, J. E. Manautou, *Expert reviews in molecular medicine* **2012**, 14, e4.
- [57] C. Xu, C. Y.-T. Li, A.-N. T. Kong, *Archives of pharmacal research* **2005**, 28, 249.
- [58] D. M. Grant, in *Journal of Inherited Metabolic Disease* (Eds.: R. A. Harkness, R. J. Pollitt, G. M. Addison), Springer Netherlands; Imprint; Springer. Dordrecht **1991**, p. 421.
- [59] E. Novik, T. J. Maguire, P. Chao, K. C. Cheng, M. L. Yarmush, *Biochemical Pharmacology* **2010**, 79, 1036.
- [60] A. Skardal, M. Devarasetty, S. Forsythe, A. Atala, S. Soker, *Biotechnology and bioengineering* **2016**, 113, 2020.
- [61] V. Kappings, C. Grün, D. Ivannikov, I. Hebeiss, S. Kattge, I. Wendland, B. E. Rapp, M. Hettel, O. Deutschmann, U. Schepers, *Adv. Mater. Technol.* **2018**, 3, 1700246.
- [62] T. Molitor, *In vitro Rekonstruktion der äußeren Blut-Retina-Schranke in Organ-on-chip Systemen mit Hilfe neuer Stammzell-Technologien*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) **2022**.
- [63] S. Giselbrecht, E. Gottwald, R. Truckenmueller, C. Trautmann, A. Welle, A. Guber, V. Saile, T. Gietzelt, K.-F. Weibezahn, *Journal of visualized experiments JoVE* **2008**.
- [64] I. Hebeiss, R. Truckenmüller, S. Giselbrecht, U. Schepers, *Lab on a chip* **2012**, 12, 829.
- [65] S. R. Z. Abdel-Misih, M. Bloomston, *The Surgical clinics of North America* **2010**, 90, 643.
- [66] D. E. Malarkey, K. Johnson, L. Ryan, G. Boorman, R. R. Maronpot, *Toxicologic pathology* **2005**, 33, 27.
- [67] R. J. Schulze, M. B. Schott, C. A. Casey, P. L. Tuma, M. A. McNiven, *The Journal of cell biology* **2019**, 218, 2096.
- [68] W. R. Jarnagin (Ed.), *Blumgart's surgery of the liver, biliary tract, and pancreas*, Elsevier, Philadelphia, PA **2017**.
- [69] W. Siegenthaler (Ed.), *Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen*, Thieme, Stuttgart, New York **2006**.

- [70] M. Gordillo, T. Evans, V. Gouon-Evans, *Development (Cambridge, England)* **2015**, 142, 2094.
- [71] C. Ding, Y. Li, F. Guo, Y. Jiang, W. Ying, D. Li, D. Yang, X. Xia, W. Liu, Y. Zhao, Y. He, X. Li, W. Sun, Q. Liu, L. Song, B. Zhen, P. Zhang, X. Qian, J. Qin, F. He, *Molecular & cellular proteomics MCP* **2016**, 15, 3190.
- [72] S. S. Bale, I. Golberg, R. Jindal, W. J. McCarty, M. Luitje, M. Hegde, A. Bhushan, O. B. Usta, M. L. Yarmush, *Tissue Engineering. Part C, Methods* **2015**, 21, 413.
- [73] I. N. Crispe, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* **2016**, 196, 17.
- [74] P. F. Lalor, W. K. Lai, S. M. Curbishley, S. Shetty, D. H. Adams, *World journal of gastroenterology* **2006**, 12, 5429.
- [75] L. D. DeLeve, A. C. Maretta-Mira, *Seminars in liver disease* **2017**, 37, 377.
- [76] E. M. Brunt, A. S. H. Gouw, S. G. Hubscher, D. G. Tiniakos, P. Bedossa, A. D. Burt, F. Callea, A. D. Clouston, H. P. Dienes, Z. D. Goodman, E. A. Roberts, T. Roskams, L. Terracciano, M. S. Torbenson, I. R. Wanless, *Histopathology* **2014**, 64, 907.
- [77] A. Geerts, *Semin Liver Dis* **2001**, 21, 311.
- [78] M. Bilzer, F. Roggel, A. L. Gerbes, *Liver international official journal of the International Association for the Study of the Liver* **2006**, 26, 1175.
- [79] F. Braet, E. Wisse, *Comparative hepatology* **2002**, 1, 1.
- [80] Y. B. A. Kang, S. Rawat, J. Cirillo, M. Bouchard, H. M. Noh, *Biofabrication* **2013**, 5, 45008.
- [81] K. K. Sørensen, J. Simon-Santamaria, R. S. McCuskey, B. Smedsrød, *Comprehensive Physiology* **2015**, 5, 1751.
- [82] J. Poisson, S. Lemoine, C. Boulanger, F. Durand, R. Moreau, D. Valla, P.-E. Rautou, *Journal of hepatology* **2017**, 66, 212.
- [83] S. March, E. E. Hui, G. H. Underhill, S. Khetani, S. N. Bhatia, *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2009**, 50, 920.
- [84] R. C. Benyon, J. P. Iredale, *Gut* **2000**, 46, 443.
- [85] C. Sanz-García, A. Fernández-Iglesias, J. Gracia-Sancho, L. A. Arráez-Aybar, Y. A. Nevzorova, F. J. Cubero, *Livers* **2021**, 1, 3.
- [86] B. E. Sumpio, J. T. Riley, A. Dardik, *The international journal of biochemistry & cell biology* **2002**, 34, 1508.
- [87] L. Liu, G.-P. Shi, *Cardiovascular research* **2012**, 94, 3.
- [88] E. S. Harris, W. J. Nelson, *Current opinion in cell biology* **2010**, 22, 651.
- [89] K. Szafranska, L. D. Kruse, C. F. Holte, P. McCourt, B. Zapotoczny, *Frontiers in physiology* **2021**, 12, 735573.
- [90] L. D. DeLeve, *The Journal of Clinical Investigation* **2013**, 123, 1861.
- [91] L. D. DeLeve, *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2015**, 61, 1740.
- [92] S. Burgdorf, V. Lukacs-Kornek, C. Kurts, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* **2006**, 176, 6770.
- [93] V. Arroyo, R. García-Martínez, X. Salvatella, *Journal of hepatology* **2014**, 61, 396.
- [94] J. Dong, C.-F. Mandenius, M. Lübberstedt, T. Urbaniak, A. K. N. Nüssler, D. Knobloch, J. C. Gerlach, K. Zeilinger, *Cytotechnology* **2008**, 57, 251.



- [95] R. Froissart, M. Piraud, A. M. Boudjemline, C. Vianey-Saban, F. Petit, A. Hubert-Buron, P. T. Eberschweiler, V. Gajdos, P. Labrune, *Orphanet journal of rare diseases* **2011**, *6*, 27.
- [96] D. H. Wasserman, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **2009**, *296*, E11-21.
- [97] Albert P. Li, Donald L. Kaminski, Asenath Rasmussen, *Toxicology* **1995**, *104*, 1.
- [98] R. L. Slaughter, D. J. Edwards, *The Annals of pharmacotherapy* **1995**, *29*, 619.
- [99] C. P. Martínez-Jiménez, R. Jover, M. T. Donato, J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón, *Current drug metabolism* **2007**, *8*, 185.
- [100] R. E. Hodges, D. M. Minich, *Journal of nutrition and metabolism* **2015**, *2015*, 760689.
- [101] S. K. Asrani, H. Devarbhavi, J. Eaton, P. S. Kamath, *Journal of hepatology* **2019**, *70*, 151.
- [102] S. N. Bhatia, G. H. Underhill, K. S. Zaret, I. J. Fox, *Science translational medicine* **2014**, *6*, 245sr2.
- [103] K. Rutter, T. Horvatits, A. Drolz, K. Roedl, S. Siedler, S. Kluge, V. Fuhrmann, *Wiener klinisches Magazin Beilage zur Wiener klinischen Wochenschrift* **2019**, *22*, 38.
- [104] M. Blachier, H. Leleu, M. Peck-Radosavljevic, D.-C. Valla, F. Roudot-Thoraval, *Journal of hepatology* **2013**, *58*, 593.
- [105] E. A. Tsochatzis, J. Bosch, A. K. Burroughs, *Lancet (London, England)* **2014**, *383*, 1749.
- [106] T. J. Athersuch, D. J. Antoine, A. R. Boobis, M. Coen, A. K. Daly, L. Possamai, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Toxicology research* **2018**, *7*, 347.
- [107] M. Alves-Bezerra, D. E. Cohen, *Comprehensive Physiology* **2017**, *8*, 1.
- [108] L. Hodson, K. N. Frayn, *Current opinion in lipidology* **2011**, *22*, 216.
- [109] L. Hodson, P. J. Gunn, *Nature reviews. Endocrinology* **2019**, *15*, 689.
- [110] S. M. Houten, R. J. A. Wanders, *Journal of inherited metabolic disease* **2010**, *33*, 469.
- [111] Norbert Stefan, Kenneth Cusi, *The Lancet Diabetes & Endocrinology* **2022**, *10*, 284.
- [112] S. A. Parry, L. Hodson, *Journal of investigative medicine the official publication of the American Federation for Clinical Research* **2017**, *65*, 1102.
- [113] P. J. Gunn, C. Pramfalk, V. Millar, T. Cornfield, M. Hutchinson, E. M. Johnson, S. R. Nagarajan, P. Troncoso-Rey, R. F. Mithen, K. E. Pinnick, M. H. Traka, C. J. Green, L. Hodson, *Physiological Reports* **2020**, *8*, e14482.
- [114] S. Hassan, S. Sebastian, S. Maharjan, A. Lesha, A.-M. Carpenter, X. Liu, X. Xie, C. Livermore, Y. S. Zhang, A. Zarrinpar, *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2020**, *71*, 733.
- [115] M. Gori, M. C. Simonelli, S. M. Giannitelli, L. Businaro, M. Trombetta, A. Rainer, *PloS one* **2016**, *11*, e0159729.
- [116] J. Deng, W. Wei, Z. Chen, B. Lin, W. Zhao, Y. Luo, X. Zhang, *Micromachines* **2019**, *10*.
- [117] V. Mönkemöller, H. Mao, W. Hübner, G. Dumitriu, P. Heimann, G. Levy, T. Huser, B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, C. I. Øie, *Scientific reports* **2018**, *8*, 14657.
- [118] T. Messelmani, L. Morisseau, Y. Sakai, C. Legallais, A. Le Goff, E. Leclerc, R. Jellali, *Lab on a chip* **2022**, *22*, 2423.

- [119] T. Kaden, A. Noerenberg, J. Boldt, C. Sagawe, T. Johannssen, K. Rennert, M. Raasch, T. Evenburg, *Toxicology* **2023**, *483*, 153374.
- [120] X. Ren, M. Zhao, B. Lash, M. M. Martino, Z. Julier, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2019**, *7*, 469.
- [121] A. Balaphas, J. Meyer, R. Perozzo, M. Zeisser-Labouebe, S. Berndt, A. Turzi, P. Fontana, L. Scapozza, C. Gonelle-Gispert, L. H. Bühler, *Cells* **2020**, *9*.
- [122] X. Rao, X. Huang, Z. Zhou, X. Lin, *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics* **2013**, *3*, 71.
- [123] B. Andria, A. Bracco, G. Cirino, Chamuleau, R. A. F. M., *Cell Med* **2010**, *1*, 55.
- [124] A. Adan, Y. Kiraz, Y. Baran, *Current pharmaceutical biotechnology* **2016**, *17*, 1213.
- [125] A. Baiocchini, C. Montaldo, A. Conigliaro, A. Grimaldi, V. Correani, F. Mura, F. Ciccossanti, N. Rotiroti, A. Brenna, M. Montalbano, G. D'Offizi, M. R. Capobianchi, R. Alessandro, M. Piacentini, M. E. Schininà, B. Maras, F. Del Nonno, M. Tripodi, C. Mancone, *PloS one* **2016**, *11*, e0151736.
- [126] M. Klaas, T. Kangur, J. Viil, K. Mäemets-Allas, A. Minajeva, K. Vadi, M. Antsov, N. Lapidus, M. Järvekülg, V. Jaks, *Scientific reports* **2016**, *6*, 27398.
- [127] H. Nyström, *Seminars in Cancer Biology* **2021**, *71*, 134.
- [128] Y. Han, B. Glueck, D. Shapiro, A. Miller, S. Roychowdhury, G. A. M. Cresci, *Nutrients* **2020**, *12*.
- [129] R. S. McCuskey, *Clinical hemorheology and microcirculation* **2006**, *34*, 5.
- [130] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, J. J. Hickman, *Journal of laboratory automation* **2015**, *20*, 107.
- [131] S. Roychowdhury, B. Glueck, Y. Han, M. A. Mohammad, G. A. M. Cresci, *Nutrients* **2019**, *11*.
- [132] X. Yang, Z. Wang, J. Kai, F. Wang, Y. Jia, S. Wang, S. Tan, X. Shen, A. Chen, J. Shao, F. Zhang, Z. Zhang, S. Zheng, *Cell proliferation* **2020**, *53*, e12762.
- [133] I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman, G. Benton, *Angiogenesis* **2009**, *12*, 267.
- [134] K. L. DeCicco-Skinner, G. H. Henry, C. Cataisson, T. Tabib, J. C. Gwilliam, N. J. Watson, E. M. Bullwinkle, L. Falkenburg, R. C. O'Neill, A. Morin, J. S. Wiest, *Journal of visualized experiments JoVE* **2014**.
- [135] I. Arnaoutova, H. K. Kleinman, *Nature protocols* **2010**, *5*, 628.
- [136] G. Xie, S. S. Choi, W.-K. Syn, G. A. Michelotti, M. Swiderska, G. Karaca, I. S. Chan, Y. Chen, A. M. Diehl, *Gut* **2013**, *62*, 299.
- [137] James A. Huntington, Penelope E. Stein, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *756*, 189.
- [138] G. M. Kindberg, S. Magnusson, T. Berg, B. Smedsrød, *The Biochemical journal* **1990**, *270*, 197.
- [139] S. Burgdorf, A. Kautz, V. Böhnert, P. A. Knolle, C. Kurts, *Science (New York, N.Y.)* **2007**, *316*, 612.
- [140] A. R. Goldberg, M. Ferguson, S. Pal, R. Cohen, D. J. Orlicky, R. L. McCullough, J. M. Rutkowski, M. A. Burchill, B. A. J. Tamburini, *Frontiers in physiology* **2022**, *13*, 1021038.
- [141] Y. Du, N. Li, H. Yang, C. Luo, Y. Gong, C. Tong, Y. Gao, S. Lü, M. Long, *Lab on a chip* **2017**, *17*, 782.

- [142] P. Kanabekova, A. Kadyrova, G. Kulsharova, *Micromachines* **2022**, *13*.
- [143] A. Ehrlich, D. Duche, G. Ouedraogo, Y. Nahmias, *Annual review of biomedical engineering* **2019**, *21*, 219.
- [144] J. Park, Y. Li, F. Berthiaume, M. Toner, M. L. Yarmush, A. W. Tilles, *Biotechnology and bioengineering* **2008**, *99*, 455.
- [145] X. Xie, S. Maharjan, C. Kelly, T. Liu, R. J. Lang, R. Alperin, S. Sebastian, D. Bonilla, S. Gandolfo, Y. Boukataya, S. M. Siadat, Y. S. Zhang, C. Livermore, *Adv. Mater. Technol.* **2022**, *7*.
- [146] K. Zeilinger, N. Freyer, G. Damm, D. Seehofer, F. Knöspel, *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **2016**, *241*, 1684.
- [147] A. Burkard, C. Dähn, S. Heinz, A. Zutavern, V. Sonntag-Buck, D. Maltman, S. Przyborski, N. J. Hewitt, J. Braspenning, *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **2012**, *42*, 939.
- [148] M. T. Donato, N. Jiménez, M. Pelechá, L. Tolosa, *Archives of toxicology* **2022**, *96*, 1021.
- [149] P. Dalsbecker, C. Beck Adiels, M. Goksör, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **2022**, *323*, G188-G204.
- [150] CYP3A4 P450-Glo® Assays with Luciferin-IPA: The Most Sensitive and Selective Bioluminescent CYP3A4 Assay **2009**.
- [151] A. Acikgöz, S. Giri, M.-G. Cho, A. Bader, *Biomolecules* **2013**, *3*, 242.
- [152] D. Benten, A. Follenzi, K. K. Bhargava, V. Kumaran, C. J. Palestro, S. Gupta, *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2005**, *42*, 140.
- [153] T. Zhou, W. Wang, Y. Aimaiti, X. Jin, Z. Chen, L. Chen, D. Li, *Cytotechnology* **2019**, *71*, 267.
- [154] L. H. Chong, H. Li, I. Wetzel, H. Cho, Y.-C. Toh, *Lab on a chip* **2018**, *18*, 3239.
- [155] H. M. U. Farooqi, B. Kang, M. A. U. Khalid, A. R. C. Salih, K. Hyun, S. H. Park, D. Huh, K. H. Choi, *Nano convergence* **2021**, *8*, 3.
- [156] C. Z. Li, H. Ogawa, S. S. Ng, X. Chen, E. Kishimoto, K. Sakabe, A. Fukami, Y.-C. Hu, C. N. Mayhew, J. Hellmann, A. Miethke, N. L. Tasnova, S. J. I. Blackford, Z. M. Tang, A. M. Syanda, L. Ma, F. Xiao, M. Sambrotta, O. Tavabie, F. Soares, O. Baker, D. Danovi, H. Hayashi, R. J. Thompson, S. T. Rashid, A. Asai, *JHEP reports innovation in hepatology* **2022**, *4*, 100446.
- [157] C. Géraud, K. Evdokimov, B. K. Straub, W. K. Peitsch, A. Demory, Y. Dörflinger, K. Schledzewski, A. Schmieder, P. Schemmer, H. G. Augustin, P. Schirmacher, S. Goerdts, *PloS one* **2012**, *7*, e34206.
- [158] M. Sato, N. Sasaki, M. Ato, S. Hirakawa, K. Sato, K. Sato, *PloS one* **2015**, *10*, e0137301.
- [159] A. Granitzny, J. Knebel, M. Müller, A. Braun, P. Steinberg, C. Dasenbrock, T. Hansen, *Toxicology reports* **2017**, *4*, 89.
- [160] Thermo Fisher Scientific (7 January 2019).
- [161] N. Lall, C. J. Henley-Smith, M. N. de Canha, C. B. Oosthuizen, D. Berrington, *International journal of microbiology* **2013**, *2013*, 420601.
- [162] B. Vinci, C. Duret, S. Klieber, S. Gerbal-Chaloin, A. Sa-Cunha, S. Laporte, B. Suc, P. Maurel, A. Ahluwalia, M. Daujat-Chavanieu, *Biotechnology journal* **2011**, *6*, 554.

- [163] H. Rashidi, S. Alhaque, D. Szkolnicka, O. Flint, D. C. Hay, *Archives of toxicology* **2016**, *90*, 1757.
- [164] J. Uggeri, R. Gatti, S. Belletti, R. Scandroglio, R. Corradini, B. M. Rotoli, G. Orlandini, *Histochemistry and cell biology* **2004**, *122*, 499.
- [165] C. Riccardi, I. Nicoletti, *Nature protocols* **2006**, *1*, 1458.
- [166] L. Prodanov, R. Jindal, S. S. Bale, M. Hegde, W. J. McCarty, I. Golberg, A. Bhushan, M. L. Yarmush, O. B. Usta, *Biotechnology and bioengineering* **2016**, *113*, 241.
- [167] L. Tolosa, M. J. Gómez-Lechón, S. López, C. Guzmán, J. V. Castell, M. T. Donato, R. Jover, *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology* **2016**, *152*, 214.
- [168] D. Szkolnicka, B. Lucendo-Villarin, J. K. Moore, K. J. Simpson, S. J. Forbes, D. C. Hay, *Stem cells translational medicine* **2016**, *5*, 764.
- [169] P. Moldéus, *Biochemical Pharmacology* **1978**, *27*, 2859.
- [170] W. W. Yew, C. C. Leung, *Respirology (Carlton, Vic.)* **2006**, *11*, 699.
- [171] Vidyasagar Ramappa, Guruprasad P. Aithal, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* **2013**, *3*, 37.
- [172] F. Yamashita, Y. Sasa, S. Yoshida, A. Hisaka, Y. Asai, H. Kitano, M. Hashida, H. Suzuki, *PloS one* **2013**, *8*, e70330.
- [173] A. Bertolini, A. Ferrari, A. Ottani, S. Guerzoni, R. Tacchi, S. Leone, *CNS drug reviews* **2006**, *12*, 250.
- [174] P. M. Harrison, R. Keays, G. P. Bray, G. J. Alexander, R. Williams, *Lancet (London, England)* **1990**, *335*, 1572.
- [175] X. Zhou, C. M. Cheung, J.-M. Yang, P. M. Y. Or, W. Y. W. Lee, J. H. K. Yeung, *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2015**, *67*, 980.
- [176] J. van Meerloo, G. J. L. Kaspers, J. Cloos, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *731*, 237.
- [177] A. Badmann, S. Langsch, A. Keogh, T. Brunner, T. Kaufmann, N. Corazza, *Cell death & disease* **2012**, *3*, e447.
- [178] Y. Ito, N. W. Bethea, E. R. Abril, R. S. McCuskey, *Microcirculation (New York, N.Y. 1994)* **2003**, *10*, 391.
- [179] A. J. Foster, B. Chouhan, S. L. Regan, H. Rollison, S. Amberntsson, L. C. Andersson, A. Srivastava, M. Darnell, J. Cairns, S. E. Lazic, K.-J. Jang, D. B. Petropolis, K. Kodella, J. E. Rubins, D. Williams, G. A. Hamilton, L. Ewart, P. Morgan, *Archives of toxicology* **2019**, *93*, 1021.
- [180] J. Deng, Y. Cong, X. Han, W. Wei, Y. Lu, T. Liu, W. Zhao, B. Lin, Y. Luo, X. Zhang, *Biomicrofluidics* **2020**, *14*, 64107.
- [181] J.-H. Kim, W. S. Nam, S. J. Kim, O. K. Kwon, E. J. Seung, J. J. Jo, R. Shresha, T. H. Lee, T. W. Jeon, S. H. Ki, H. S. Lee, S. Lee, *International journal of molecular sciences* **2017**, *18*.
- [182] V. P. Torchilin, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, *11*, S81-S91.
- [183] S. Majumdar, T. J. Siahaan, *Medicinal research reviews* **2012**, *32*, 637.
- [184] C. N. Herlan, A. Meschkov, U. Schepers, S. Bräse, *Frontiers in chemistry* **2021**, *9*, 696957.
- [185] D. Goodwin, P. Simerska, I. Toth, *Current medicinal chemistry* **2012**, *19*, 4451.

- [186] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 9367.
- [187] R. N. Zuckermann, *Biopolymers* **2011**, *96*, 545.
- [188] I. D. M. Wehl, *High-throughput screening and evaluation of combinatorial cell penetrating peptoid libraries to identify organelle- and organ-specific drug delivery molecules*, Cuvillier Verlag, Göttingen **2019**.
- [189] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [190] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646.
- [191] R. J. Boohaker, M. W. Lee, P. Vishnubhotla, J. M. Perez, A. R. Khaled, *Current medicinal chemistry* **2012**, *19*, 3794.
- [192] J. A. Schneider, T. W. Craven, A. C. Kasper, C. Yun, M. Haugbro, E. M. Briggs, V. Svetlov, E. Nudler, H. Knaut, R. Bonneau, M. J. Garabedian, K. Kirshenbaum, S. K. Logan, *Nature communications* **2018**, *9*, 4396.
- [193] M. M. Lee, J. M. French, M. D. Disney, *Molecular bioSystems* **2011**, *7*, 2441.
- [194] H. Y. Nam, J.-A. Hong, J. Choi, S. Shin, S. K. Cho, J. Seo, J. Lee, *Bioconjugate chemistry* **2018**, *29*, 1669.
- [195] S. B. L. Vollrath, D. Fürniss, U. Schepers, S. Bräse, *Organic & biomolecular chemistry* **2013**, *11*, 8197.
- [196] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *Journal of controlled release official journal of the Controlled Release Society* **2011**, *151*, 220.
- [197] G. E. Flaten, A. B. Dhanikula, K. Luthman, M. Brandl, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, *27*, 80.
- [198] S. Keiding, *Semin Liver Dis* **1995**, *15*, 268.
- [199] Z. Zhao, L. Zhu, H. Li, P. Cheng, J. Peng, Y. Yin, Y. Yang, C. Wang, Z. Hu, Y. Yang, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2017**, *13*.
- [200] K. Schumacher, Y.-M. Khong, S. Chang, J. Ni, W. Sun, H. Yu, *Tissue engineering* **2007**, *13*, 197.
- [201] S. Hong, J. M. Song, *Biomaterials science* **2021**, *9*, 5939.
- [202] C. Berrouet, N. Dorilas, K. A. Rejniak, N. Tuncer, *Bulletin of mathematical biology* **2020**, *82*, 68.
- [203] X. Liu, J. Fang, S. Huang, X. Wu, X. Xie, J. Wang, F. Liu, M. Zhang, Z. Peng, N. Hu, *Microsystems & nanoengineering* **2021**, *7*, 50.
- [204] J. M. Bernhard, D. R. Ostermann, D. S. Williams, J. K. Blanks, *Paleoceanography* **2006**, *21*.
- [205] Y. Wang, F. Cuzzucoli, A. Escobar, S. Lu, L. Liang, S. Wang, *Nanotechnology* **2018**, *29*, 332001.
- [206] S. R. Nagarajan, E. Cross, E. Johnson, F. Sanna, L. J. Daniels, D. W. Ray, L. Hodson, *Physiological Reports* **2022**, *10*, e15463.
- [207] Z. M. Younossi, D. Blissett, R. Blissett, L. Henry, M. Stepanova, Y. Younossi, A. Racila, S. Hunt, R. Beckerman, *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2016**, *64*, 1577.
- [208] P. J. Gunn, C. J. Green, C. Pramfalk, L. Hodson, *Physiological Reports* **2017**, *5*.

- [209] H. Yan, T. Li, Y. Wang, H. Li, J. Xu, X. Lu, *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **2019**, *46*, 1101.
- [210] M. J. Gómez-Lechón, M. T. Donato, A. Martínez-Romero, N. Jiménez, J. V. Castell, J.-E. O'Connor, *Chemico-biological interactions* **2007**, *165*, 106.
- [211] R. C. Su, A. Lad, J. D. Breidenbach, T. M. Blomquist, W. T. Gunning, P. Dube, A. L. Kleinhenz, D. Malhotra, S. T. Haller, D. J. Kennedy, *PloS one* **2019**, *14*, e0225604.
- [212] Jyoti Chhimwal, Abhishek Goel, Mahesh Sukapaka, Vikram Patial, Yogendra Padwad, *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2022**, *107*, 109062.
- [213] H. Yki-Järvinen, P. K. Luukkonen, L. Hodson, J. B. Moore, *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **2021**, *18*, 770.
- [214] Petra L.L. Goyens, Mary E. Spilker, Peter L. Zock, Martijn B. Katan, Ronald P. Mensink, *Journal of lipid research* **2005**, *46*, 1474.
- [215] J. Whelan, K. Fritsche, *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* **2013**, *4*, 311.
- [216] Fabian Seebacher, Anja Zeigerer, Nora Kory, Natalie Kraemer, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2020**, *108*, 72.
- [217] K. L. Diehl, J. Vorac, K. Hofmann, P. Meiser, I. Unterweger, L. Kuerschner, H. Weighardt, I. Förster, C. Thiele, *Cells* **2020**, *9*.
- [218] J. Folkman, M. Hochberg, *The Journal of experimental medicine* **1973**, *138*, 745.
- [219] P. Carmeliet, R. K. Jain, *Nature* **2000**, *407*, 249.
- [220] A. E. Loneker, F. Alisafaei, A. Kant, D. Li, P. A. Janmey, V. B. Shenoy, R. G. Wells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2023**, *120*, e2216811120.
- [221] L. L. Listenberger, A. M. Studer, D. A. Brown, N. E. Wolins, *Current protocols in cell biology* **2016**, *71*, 4.31.1-4.31.14.
- [222] L. Guo, S. Dial, L. Shi, W. Branham, J. Liu, J.-L. Fang, B. Green, H. Deng, J. Kaput, B. Ning, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2011**, *39*, 528.
- [223] C. J. Pirola, S. Sookoian, *Journal of lipid research* **2021**, *62*, 100073.
- [224] E. Cobbina, F. Akhlaghi, *Drug metabolism reviews* **2017**, *49*, 197.
- [225] D. G. Mashek, *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* **2013**, *4*, 697.
- [226] M. S. Wilke, M. A. French, Y. K. Goh, E. A. Ryan, P. J. Jones, M. T. Clandinin, *Diabetologia* **2009**, *52*, 1628.
- [227] F. W. B. Sanders, J. L. Griffin, *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **2016**, *91*, 452.
- [228] A. Vazquez, J. Liu, Y. Zhou, Z. N. Oltvai, *BMC systems biology* **2010**, *4*, 58.
- [229] María José Gómez-Lechón, María Teresa Donato, Alicia Martínez-Romero, Nuria Jiménez, José Vicente Castell, José-Enrique O'Connor, *Chemico-biological interactions* **2007**, *165*, 106.
- [230] G. Carta, E. Murru, S. Banni, C. Manca, *Frontiers in physiology* **2017**, *8*, 902.
- [231] S. Joshi-Barve, S. S. Barve, K. Amancherla, L. Gobejishvili, D. Hill, M. Cave, P. Hote, C. J. McClain, *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2007**, *46*, 823.
- [232] X. Zeng, M. Zhu, X. Liu, X. Chen, Y. Yuan, L. Li, J. Liu, Y. Lu, J. Cheng, Y. Chen, *Nutrition & metabolism* **2020**, *17*, 11.

- [233] Harmeet Malhi, Steven F. Bronk, Nathan W. Werneburg, Gregory J. Gores, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 12093.
- [234] N. A. Kraus, F. Ehebauer, B. Zapp, B. Rudolphi, B. J. Kraus, D. Kraus, *Adipocyte* **2016**, *5*, 351.
- [235] Yana Geng, Johanna C. Arroyave-Ospina, Manon Buist-Homan, José Plantinga, Peter Olinga, Dirk-Jan Reijngoud, Frederike G.I. Van Vilsteren, Hans Blokzijl, Jan A.A.M. Kamps, Han Moshage, *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2023**, *114*, 109255.
- [236] Ewelina Matuszyk, Ewa Sierka, Marko Rodewald, Hyeonsoo Bae, Tobias Meyer, Edyta Kus, Stefan Chlopicki, Michael Schmitt, Jürgen Popp, Malgorzata Baranska, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2020**, *1866*, 165763.
- [237] M. Pelechá, E. Villanueva-Bádenas, E. Timor-López, M. T. Donato, L. Tolosa, *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2021**, *11*.
- [238] Kan Yue, Grissel Trujillo-de Santiago, Mario Moisés Alvarez, Ali Tamayol, Nasim Annabi, Ali Khademhosseini, *Biomaterials* **2015**, *73*, 254.
- [239] Z. Muñoz, H. Shih, C.-C. Lin, *Biomaterials science* **2014**, *2*, 1063.
- [240] Liesbeth Tytgat, Lana Van Damme, Jasper Van Hoorick, Heidi Declercq, Hugo Thienpont, Heidi Ottevaere, Phillip Blondeel, Peter Dubruel, Sandra Van Vlierberghe, *Acta Biomaterialia* **2019**, *94*, 340.
- [241] L. A. Sawicki, A. M. Kloxin, *Biomaterials science* **2014**, *2*, 1612.
- [242] A. K. Nguyen, P. L. Goering, R. K. Elespuru, S. Sarkar Das, R. J. Narayan, *Polymers* **2020**, *12*.
- [243] T. Greene, T.-Y. Lin, O. M. Andrisani, C.-C. Lin, *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*.
- [244] T. T. Lau, L. Q. P. Lee, W. Leong, D.-A. Wang, *Biomedical materials (Bristol, England)* **2012**, *7*, 65003.
- [245] E. Gevaert, T. Billiet, H. Declercq, P. Dubruel, R. Cornelissen, *Macromolecular bioscience* **2014**, *14*, 419.
- [246] G. Wu, Di Wu, J. Lo, Y. Wang, J. Wu, S. Lu, H. Xu, X. Zhao, Y. He, J. Li, U. Demirci, S. Wang, *Biomaterials science* **2020**, *8*, 2814.
- [247] D. Kim, M. Kim, J. Lee, J. Jang, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2022**, *10*, 764682.
- [248] H. Kizawa, E. Nagao, M. Shimamura, G. Zhang, H. Torii, *Biochemistry and biophysics reports* **2017**, *10*, 186.
- [249] Z. Hannoun, C. Steichen, N. Dianat, A. Weber, A. Dubart-Kupperschmitt, *Journal of hepatology* **2016**, *65*, 182.
- [250] Y. Kouï, T. Kido, T. Ito, H. Oyama, S.-W. Chen, Y. Katou, K. Shirahige, A. Miyajima, *Stem cell reports* **2017**, *9*, 490.
- [251] Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, Shinya Yamanaka, *Cell* **2007**, *131*, 861.
- [252] C. Du, K. Narayanan, M. F. Leong, A. C. A. Wan, *Biomaterials* **2014**, *35*, 6006.
- [253] M. Coll, L. Perea, R. Boon, S. B. Leite, J. Vallverdú, I. Mannaerts, A. Smout, A. El Taghdouini, D. Blaya, D. Rodrigo-Torres, I. Graupera, B. Aguilar-Bravo, C.

- Chesne, M. Najimi, E. Sokal, J. J. Lozano, L. A. van Grunsven, C. M. Verfaillie, P. Sancho-Bru, *Cell stem cell* **2018**, *23*, 101-113.e7.
- [254] F. Tasnim, J. Xing, X. Huang, S. Mo, X. Wei, M.-H. Tan, H. Yu, *Biomaterials* **2019**, *192*, 377.
- [255] C. O. DuBose, J. R. Daum, C. L. Sansam, G. J. Gorbsky, *Genes* **2022**, *13*.
- [256] F. R. Kreitzer, N. Salomonis, A. Sheehan, M. Huang, J. S. Park, M. J. Spindler, P. Lizarraga, W. A. Weiss, P.-L. So, B. R. Conklin, *American Journal of Stem Cells* **2013**, *2*, 119.
- [257] Ian Chambers, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, Austin Smith, *Cell* **2003**, *113*, 643.
- [258] Y.-H. Loh, Q. Wu, J.-L. Chew, V. B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K.-Y. Wong, K. W. Sung, C. W. H. Lee, X.-D. Zhao, K.-P. Chiu, L. Lipovich, V. A. Kuznetsov, P. Robson, L. W. Stanton, C.-L. Wei, Y. Ruan, B. Lim, H.-H. Ng, *Nature genetics* **2006**, *38*, 431.
- [259] K. M. McKinnon, *Current protocols in immunology* **2018**, *120*, 5.1.1-5.1.11.
- [260] B. Bose, M. Nihad, S. S. P, *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology* **2023**.
- [261] B. K. Gage, J. C. Liu, B. T. Innes, S. A. MacParland, I. D. McGilvray, G. D. Bader, G. M. Keller, *Cell stem cell* **2020**, *27*, 254-269.e9.
- [262] G. Hen, J. Nicenboim, O. Mayseless, L. Asaf, M. Shin, G. Busolin, R. Hofi, G. Almog, N. Tiso, N. D. Lawson, K. Yaniv, *Development (Cambridge, England)* **2015**, *142*, 4266.
- [263] T. P. Zhong, S. Childs, J. P. Leu, M. C. Fishman, *Nature* **2001**, *414*, 216.
- [264] J. E. Fish, J. D. Wythe, *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists* **2015**, *244*, 391.
- [265] T. Kido, Y. Kouji, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2019**, *1905*, 131.
- [266] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, A. Radbruch, *Cytometry* **1990**, *11*, 231.
- [267] W. Zhao, X. Ji, F. Zhang, L. Li, L. Ma, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2012**, *17*, 6196.
- [268] M. Danoy, S. Poulain, Y. Kouji, Y. Tauran, B. Scheidecker, T. Kido, A. Miyajima, Y. Sakai, C. Plessy, E. Leclerc, *Molecular omics* **2020**, *16*, 138.
- [269] J. FOLCH, M. LEES, G. H. SLOANE STANLEY, *Journal of Biological Chemistry* **1957**, *226*, 497.
- [270] G. C. Burdge, P. Wright, A. E. Jones, S. A. Wootton, *The British journal of nutrition* **2000**, *84*, 781.



# Anhang

## Zu Kapitel 3.4.2.1

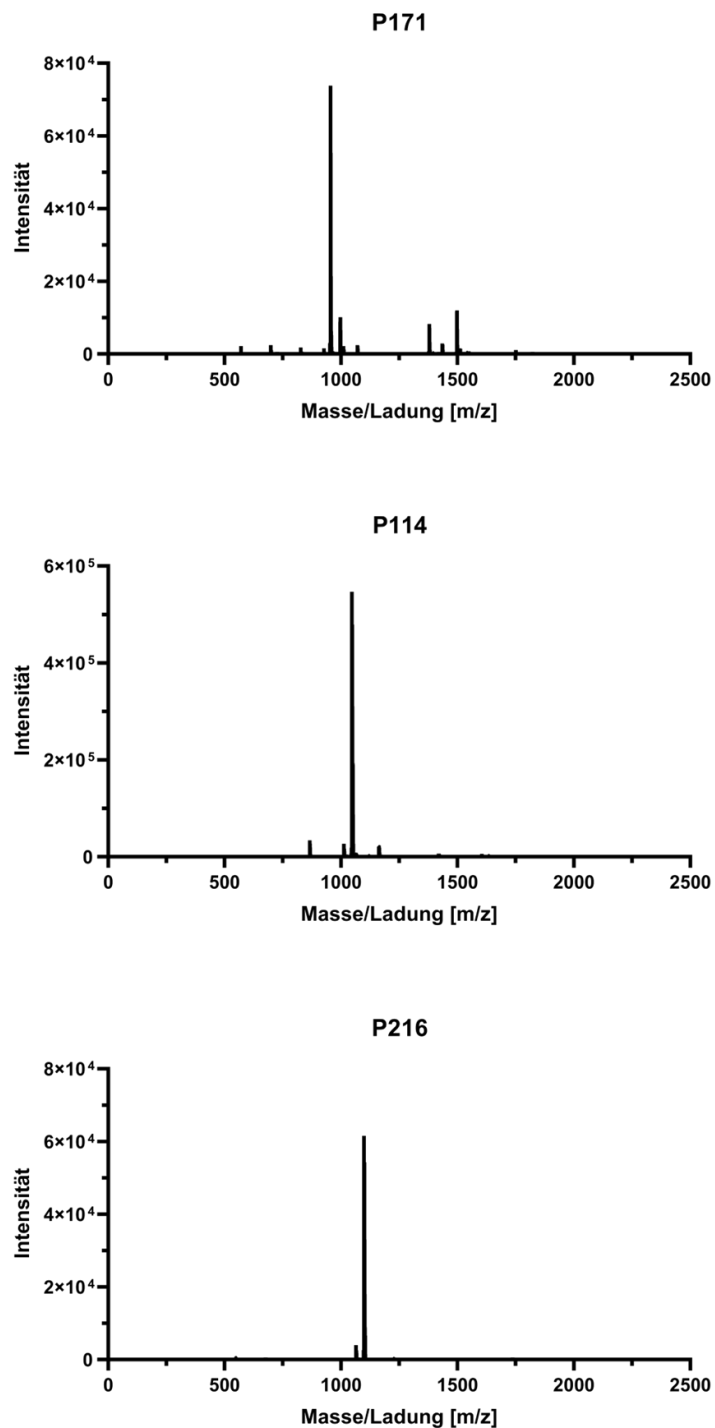


Abbildung 98: MALDI-ToF Spektren der synthetisierten Peptide P171, P114 und P216. Molekulargewichte der synthetisierten Peptide: 954,63 g/mol (P171), 1046,41 g/mol (P114) und 1098,44 g/mol (P216). Die mithilfe MALDI-ToF erfolgreich nachgewiesen werden konnten

