



INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| 2. EINLEITUNG | 3 |
| 2.1 Alternativmethoden zum Tierversuch..... | 3 |
| 2.2 Biologische Barrieren | 5 |
| 2.2.1 Blut-Hirn-Schranke | 6 |
| 2.2.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke..... | 6 |
| 2.2.1.2 Hirnendothel..... | 7 |
| 2.2.1.3 Astrozyten..... | 9 |
| 2.2.1.4 Perizyten | 9 |
| 2.2.1.5 Efflux-Pumpen | 10 |
| 2.2.1.6 Scherkräfte..... | 12 |
| 2.2.1.7 <i>In vitro</i> Rekonstruktion der BBB..... | 13 |
| 2.2.2 Darm | 14 |
| 2.2.3 Leber | 16 |
| 2.2.3.1 Stammzellen der Leber | 17 |
| 3. ZIEL DER ARBEIT | 17 |
| 4. ERGEBNISSE..... | 18 |
| 4.1 Aufbau des μ3DVasc Biorektors..... | 18 |
| 4.2 SMART-Technologie | 19 |
| 4.3 Herstellung des μ3DVasc Bioreaktors | 20 |
| 4.4 Biologische Validierung des endothelialen Zelllayers | 23 |
| 4.4.1 Langzeitkultivierung | 23 |
| 4.4.2 Konfluenztest..... | 23 |
| 4.4.3 Proliferationstest | 25 |
| 4.4.4 Funktionstests | 29 |
| 4.4.4.1 Transmigration von Blutzellen | 29 |
| 4.4.4.2 Permeabilitätsmessungen | 32 |
| 4.4.5 Versorgung des unteren Kompartiments | 44 |
| 4.5 Blut-Hirn-Schranke | 46 |
| 4.5.1 Bestimmung geeigneter Nährmedien | 46 |
| 4.5.1.1 Konditioniertes Nährmedium | 46 |
| 4.5.1.2 Wachstumskurven | 47 |
| 4.5.2 Kokultur aus Endothelzellen und Perizyten..... | 49 |
| 4.5.3 Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten | 50 |
| 4.5.3.1 Kokultur aus Perizyten und Astrozyten in 2D | 50 |



| | | |
|------------|---|------------|
| 4.5.3.2 | Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor..... | 51 |
| 4.5.4 | Nachweis zellspezifischer Marker | 53 |
| 4.5.5 | Proliferationstest..... | 56 |
| 4.5.6 | Test der metabolischen Zellaktivität | 59 |
| 4.5.7 | Lebend/tot-Nachweis..... | 61 |
| 4.5.8 | Untersuchung der Hypoxie..... | 62 |
| 4.5.9 | Etablierung mikrovaskulärer Endothelzellen | 66 |
| 4.5.10 | P-gp Transport Assay | 69 |
| 4.6 | Darm..... | 72 |
| 4.6.1 | Nachweis der Schleimbildung | 73 |
| 4.6.2 | Nachweis von Tight Junctions | 74 |
| 4.6.3 | Nachweis der Zotten-ähnlichen Strukturen | 75 |
| 4.7 | Leber..... | 76 |
| 4.7.1 | Isolation von fetalen, murinen Leber-Vorläuferzellen | 77 |
| 4.7.2 | Ausdifferenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen | 77 |
| 4.7.3 | Generierung von HPPL-Zellen | 82 |
| 4.7.4 | Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen | 83 |
| 4.7.5 | Ausdifferenzierung zu Cholangiozyten..... | 84 |
| 4.7.6 | Ausdifferenzierung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor | 87 |
| 4.7.7 | Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten | 88 |
| 5. | DISKUSSION | 90 |
| 6. | MATERIAL UND METHODEN | 102 |
| 6.1 | Material | 102 |
| 6.2 | Methoden | 112 |
| 6.2.1 | Herstellung von $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren | 112 |
| 6.2.2 | Zellkultivierung..... | 113 |
| 6.2.2.1 | Beschichtung der Kultivierungsmaterialien..... | 113 |
| 6.2.2.2 | Passagieren der Zellen..... | 113 |
| 6.2.3 | Handhabung des mikrofluidischen $\mu 3DVasc$ Bioreaktors | 114 |
| 6.2.3.1 | Beschichtung des PC-Mikrokanals..... | 114 |
| 6.2.3.2 | Beschichtung des unteren Kompartiments | 114 |
| 6.2.3.3 | Einbringen der Endothelzellen in den PC-Mikrokanal..... | 115 |
| 6.2.3.4 | Einbringen der Zellen in das untere Kompartiment | 116 |
| 6.2.4 | Visualisierung von Zellen..... | 116 |
| 6.2.4.1 | Vitale Zellen | 116 |
| 6.2.4.2 | Fixierte Zellen | 117 |
| 6.2.5 | EdU Nachweis..... | 117 |
| 6.2.6 | Adhäsion und Migration von Blutzellen | 118 |
| 6.2.7 | Permeabilitätsassay | 118 |
| 6.2.7.1 | Standardkurven | 118 |
| 6.2.7.2 | Widerstandseinheiten | 118 |
| 6.2.7.3 | Permeabilitätsassay in Transwell-Systemen..... | 119 |



| | | |
|------------|---|------------|
| 6.2.7.4 | Einfluss der Beschichtung | 119 |
| 6.2.7.5 | Permeabilitätsassay im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor | 119 |
| 6.2.8 | Versorgung des unteren Kompartiments | 120 |
| 6.2.9 | Etablierung der Kokultur aus Perizyten und Astrozyten..... | 120 |
| 6.2.10 | Präparation des Astrozyten-konditionierten Mediums | 120 |
| 6.2.10.1 | Untersuchung der Expression von Tight Junctions | 120 |
| 6.2.10.2 | Wachstumskurven | 121 |
| 6.2.11 | XTT Nachweis | 121 |
| 6.2.12 | Lebend/tot-Nachweis..... | 121 |
| 6.2.13 | Nachweis der Hypoxie..... | 122 |
| 6.2.14 | P-gp Transport Assay..... | 122 |
| 6.2.15 | REM | 122 |
| 6.2.16 | Isolierung der fetalen, murinen Leberzellen | 122 |
| 6.2.16.1 | Isolierung der DLK ⁺ Hepatoblasten | 124 |
| 6.2.16.2 | Generierung von HPPL-Zellen aus DLK ⁺ Hepatoblasten..... | 124 |
| 6.2.16.3 | Ausdifferenzierung von DLK ⁺ Hepatoblasten zu HLC | 124 |
| 6.2.16.4 | Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu HLC..... | 126 |
| 6.2.16.5 | Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Cholangiozyten | 127 |
| 6.2.16.6 | Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten | 128 |
| 6.2.17 | Statistische Auswertung..... | 129 |
| 7. | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 130 |
| 8. | LITERATUR | 134 |
| 9. | ANHANG | 145 |
| 10. | LEBENS LAUF | 157 |
| 11. | DANKSAGUNG | 161 |