

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Jannick Florin Theobald, M.Sc.

aus: Taipei/Taiwan

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2018

TITEL

**Entwicklung von mikrofluidischen Multi-Organ-Zellchipsystemen für die *in vitro*
Metabolisierung und Bestimmung der Toxizität von Substanzen**

Gutachter

Prof. Dr. Stefan Wölfel

Prof. Dr. Steven Dooley

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Stefan Wölfl für die Möglichkeit zur Anfertigung, der Betreuung, der zahlreichen Hilfestellungen und mannigfaltigen Ideen zu meiner Arbeit bedanken. Das von Ihm geschaffene Umfeld und das entgegen gebrachte Vertrauen haben mir den Weg zu dieser Promotionsschrift geebnet.

Prof. Dr. Steven Dooley, meinem zweiten Doktorvater und TAC- Mitglied gilt mein besonderer Dank für die aufgebrachte Zeit, die konstruktive Kritik an den entwickelten Systemen und der Bereitstellung zahlreicher Materialien.

Bei PD. Dr. Katja Breitkopf-Heinlein möchte ich mich herzlich für die Teilnahme an meinen TAC-Meetings und die aufgebrachte Zeit, die wissenschaftliche Unterstützung, die zeitnahe Korrektur von Publikationen, die Durchsicht dieser Abhandlung und die Akzeptanz von HepG2 Zellen bedanken.

Bei Dr. Xinlai Cheng möchte ich mich für die Einführung in das Feld der “small molecules” und die zahlreichen wertvollen Ideen zur Verbesserung meiner Publikationen bedanken.

Bei Dr. Frau Suzan Can möchte ich mich für die freudige Zeit im Labor und die Planung und Durchführung der zahlreichen gemeinsamen Praktika bedanken.

Ich möchte mich bei Yasamin Dabiri für die großartige Zeit im Labor, sowohl unter der Woche als auch an den zahlreichen Wochenenden, die gemeinsamen Ausflüge und den wissenschaftlichen Austausch bedanken. Ich hoffe unsere beiden Namen werden in naher Zukunft gemeinsam auf einer Publikation erscheinen.

Mohamed abu el Maaty oder einfacher gesagt, Vitamin D₃. Ich möchte mich für Korrektur der ein bis zwei Seiten während meiner Doktorarbeit bedanken (wiederkehrend auf wöchentlicher Basis). Für den wissenschaftlichen Austausch, die Realisierung des Vitamin D₃-on chip Projektes und der Planung und gemeinsamen Betreuung der Studentenpraktika, möchte ich mich bedanken. Neben dem wissenschaftlichen Alltag möchte ich für die gemeinsamen Reisen und Abenden bedanken und wünsche Dir viel Erfolg bei Deiner wissenschaftlichen Karriere.

Ali Ghanem, Co-Author und Freund. Ich möchte mich vor allem für Deine Unterstützung während meinen ersten Tagen in der Arbeitsgruppe bedanken. Außerdem danke ich Dir für deine Offenheit, welche nicht zuletzt Deiner mediterranen Herkunft geschuldet ist. Ich wünsche Dir für die letzten Wochen Deiner Doktorarbeit nur das Beste.

Bei Fadi Almouhanna, Rodrigo Gama Brambila und Biljana Blagojevic möchte ich mich für die gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken, Ihr seid großartige Kollegen.

Patrick Wallisch, Nico Kusterer, Romina Augustin: Ich möchte mich bei Euch drei für die großartige Arbeit im Labor bedanken, mit so qualifizierten Studenten ist es eine Freude Abschlussarbeiten zu betreuen.

Ich möchte mich bei allem aktuellen und ehemaligen Auszubildenden der AG Wölfl für ihre Hilfe im Arbeitsalltag und der Instandhaltung des Labors bedanken.

Bei allen Projektmitgliedern des SysTox-Chips und des iPS-Profilers bedanke ich mich herzlich für die die Kooperation und gegenseitige Hilfe bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Saskia Schmitteckert nicht nur für die zahlreichen Aufgaben und Arbeitsschritte, welche sie für mich übernommen hat, die Dokumentation und Niederschrift der Experimente, sondern auch für ihren guten Musikgeschmack der uns zahlreiche lustige Stunden im Labor ermöglicht hat.

Bei Dr. Amin Banaeiyan, meinem wissenschaftlichen Wegbegleiter, Co-Firmengründer und guten Freund möchte ich mich für die Möglichkeit der internationalen Kooperation, der gemeinsamen Arbeit an unserem hexagonalen Leberläppchen-System unseren Burger-Fiaskos und zahlreichen Siegen in Rocket League bedanken. Wie Luke Lee sagte – We finished strong.

Bei Dr. Larisa Florea und Dr. Bartosz Ziolkowski möchte ich mich für großartige Zeit in Dublin und für meine ersten wissenschaftlichen Arbeitsstunden bedanken im Labor bedanken, die mir die Freude und Begeisterung für das Feld eröffnet haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Susanne und Gerhard Theobald für die grenzenlose Unterstützung und Liebe durch meine universitäre Ausbildung und wissenschaftliche Laufbahn aus tiefstem Herzen bedanken. Ohne Euch wäre die vorliegende Arbeit nie zustande gekommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
Einleitung	1
1.1 Arzneimittelentwicklung und Toxizitätsbestimmung	2
1.2 Anatomie und Physiologie der Leber	3
1.2.1 Cytochrom P450 Enzyme	5
1.3 Leberzellkultur Modelle zur Toxizitätstestung	7
1.3.1 Testung von Hepatotoxizität in 2D Zellkultursystemen	9
1.3.2 Testung von Hepatotoxizität in 3D Zellkultursystemen	10
1.4 Mikrofluidik	10
1.4.1 Fluidodynamik in der Mikrofluidik	11
1.5 Organ-on-Chip Systeme	15
1.5.1 Der Aufbau von OOC	16
1.5.2 Vergleich von Organ-on-Chip Systeme mit konventionellen Modellen	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
Material und Methoden	21
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Mikrofluidische Materialien	22
2.1.3 Chemikalien	23
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.6 Kommerzielle Kits und fertige Lösungen	25
2.1.7 Zelllinien	26
2.1.8 Zellkultur Medien und Supplemente	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Mikrofluidischer Aufbau	27
2.2.2 Fluoreszenzbasierter Test zum Nachweis der CYP450 Aktivität – Der VividDye Test	36
2.2.3 Zellkultur	38
2.2.4 RNA Isolation aus Zellen	39
2.2.5 cDNA Synthese aus RNA	40
2.2.6 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR)	40
2.2.7 Proteinextraktion aus den Zellen	43
2.2.8 Bradford Test	43
2.2.9 Immunoblot	44
2.2.10 Bestimmung der Zytotoxizität auf Zellen	44

2.2.11 Immunofluoreszenzfärbung auf Einzelzellniveau	46
2.2.12 Zellfunktionalitätstestung	47
2.2.13 Durchflusszytometrie (FACS).....	49
2.2.14 HPLC LC-MS.....	49
Ergebnisse	51
3.1 Charakterisierung der mikrofluidischen Plattformen und Strömungssimulationen	52
3.2 Zellaussaat und Separierung der Zelltypen innerhalb der Chipsysteme.....	55
3.3 Vergleich statischer und mikrofluidischer Zellkultur.....	57
3.3.1 Vergleich der Funktionalität und metabolischen Aktivität der Zellen zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur.	58
3.3.2 Vergleich der Genexpression der Zellen zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur.	61
3.4 Bestimmung der CYP-Aktivität als wesentlicher Faktor der Funktionalität von Hepatozyten unter Verwendung von VividDye Substraten.....	65
3.4.1 Kinetische Messungen der CYP-Aktivität mittels Verstoffwechslung der VividDye Substrate nach Wirkstoffbehandlung	73
3.4.2 Einflusses des zellulären Umfelds, 2D-, 3D-Kultivierung und Co-Kultur auf metabolische Aktivität von Hepatozyten <i>in vitro</i>	81
3.4.3 Verlauf der CYP-Aktivität während der zellulären Differenzierung	82
3.4.3 Erfassung der CYP-Aktivität in einzelnen Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie.....	85
3.5 Nephrotoxizität nach Metabolisierung in der Leber in einem mikrofluidischen Leber-Nieren-Chip	89
3.5.1 Darstellung von Wirkstoff-Wirkstoff Interaktionen in einer mikrofluidischen Leber-Nieren-System	93
3.6 Konsekutiver Metabolismus von Vitamin D ₃ in einem Leber-Nieren-Chip	100
3.7 Darstellung der Wirkstoffresorption auf einem membran-basierten Colon-Leber-Chip.....	112
Diskussion	119
4.1 Eignung von mikrofluidischen Systemen als Toxizitätsmodelle	120
4.1.1 Eignung des VividDye Tests zur Visualisierung der Leberfunktionalität.....	121
4.1.2 Eignung zur Nachahmung der Komplexität in Organ-Organ-Interaktion.....	123
4.2 Vergleich der hier vorgestellten OOC Systeme mit alternativen Lösungen.....	124
4.3 Einfluss des Materials und des Aufbaus auf die Funktionalität mikrofluidischer Plattformen	129
4.4 Einfluss der verwendeten Zelltypen auf die Funktionalität mikrofluidischer Plattformen	132
4.5 Schlussbemerkungen und zukünftige Perspektive	135
Referenzen	137

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Mikrostruktur der Leber.	4
Abbildung 2 Turbulenter und laminarer Fluss..	12
Abbildung 3 Aufbau mikrofluidischer Chipsysteme.	18
Abbildung 4 Dimensionierung von 2D Zellkultur und mikrofluidischen Kanal.	19
Abbildung 5 Aufbau des Pumpsystems.	28
Abbildung 6 Software des Pumpsystems..	28
Abbildung 7 Aussaat in die Chipkammern.	34
Abbildung 8 U-Rohr Prinzip im mikrofluidischen System.	35
Abbildung 9 Struktur der Vividye-Substrate.	37
Abbildung 10 Modellierung der Fluidodynamik in CC N1 und CC N2.	53
Abbildung 11 Modellierung der Fluidodynamik in CC S1.	54
Abbildung 12 Zellmonolayer im Chipsystem.	55
Abbildung 13 Vergleich der Oberflächenbeschichtung im Chip.	56
Abbildung 14 Aussaatverfahren in CC S1.	57
Abbildung 15 Viabilität in den verschiedenen Chipdesigns.	58
Abbildung 16 Vergleich der Albuminexpression der Zellen.	59
Abbildung 17 Vergleich der Harnstoffsynthese der Zellen.	60
Abbildung 18 Vergleich der Albuminaufnahme der Zellen	61
Abbildung 19 Vergleich der mRNA-Expression verschiedener CYP-Isoenzyme zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur.....	62
Abbildung 20 Vergleich der mRNA-Expression zwischen statischer und mikrofluidischer Kultur.....	63
Abbildung 21 Übersichtgrafik über die Anwendungsbereiche des VividDye Test für Arzneistoff Behandlung und Zelldifferenzierung.....	65
Abbildung 22 VividDye Signal für Zellen und Zellysat.	66
Abbildung 23 Optimierung des Vividye Tests.	68
Abbildung 24 mRNA Expression verschiedener CYP450 in Hepatozyten.	71
Abbildung 25 mRNA- und Proteinexpression nach TCDD Behandlung.	72
Abbildung 26 VividDye Kinetik nach TCDD Behandlung.	73
Abbildung 27 VividDye Kinetik nach E804 Behandlung.	74
Abbildung 28 VividDye Kinetik nach Ko-Behandlung.	76
Abbildung 29 mRNA und Proteinexpression in HepG2 WT und HepG2 AhR ^{KD}	78
Abbildung 30 VividDye Kinetik HepG2 WT und HepG2 AhR ^{KD}	78
Abbildung 31 VividDye Induktion verschiedener Substanzen.	80
Abbildung 32 Einfluss der Kulturbedingungen auf das VividDye Signal.	82
Abbildung 33 Einfluss der Zelldifferenzierung auf das VividDye Signal.	83
Abbildung 34 Verlauf der HepaRG Differenzierung.	84
Abbildung 35 Kombination aus Mikrofluidik und VividDye Test.	85
Abbildung 36 Kombination Mikroskopie und VividDye Test.	86
Abbildung 37 Übersichtgrafik des Teilprojektes Metabolismus und Toxizität.	89
Abbildung 38 Stoffwechselweg von AFB1 und B α P.	90
Abbildung 39 Toxizität von AFB1 und B α P.	91
Abbildung 40 AFB1 Bioaktivierung statische Experimente.	92
Abbildung 41 Einfluss der Flussrichtung auf die Toxizität.	93
Abbildung 42 AFB1 Bioaktivierung fluidische Experimente.	94
Abbildung 43 AFB1 Bioaktivierung fluidische Experimente HepG2 WT und HepG2 C3A.	95
Abbildung 44 Genkarte AFB1 Behandlung.	97
Abbildung 45 AFB1 Toxizität auf Hek293 Zellen.	98
Abbildung 46 Übersichtgrafik des Teilprojektes konsekutiver Metabolismus.	101
Abbildung 47 Vergleich Hek293 und RPTEC. t.	101

Abbildung 48 Kalibration HPLC.	102
Abbildung 49 HPLC-LC/MS Daten.....	107
Abbildung 50 Grafische Erklärung der Behandlung	105
Abbildung 51 Vergleich der Genexpression verschiedener Behandlungen.	106
Abbildung 52 mRNA Expression von Differenzierungsmarkern in HL60.....	108
Abbildung 53 Einfluss der Nierenkammer auf die Expression der Differenzierungsmarker.	109
Abbildung 54 Proteinexpression von Differenzierungsmarkern in HL60 Zellen.	110
Abbildung 55 Übersichtsgrafik Teilprojekt Colon-Leber-Chips.	112
Abbildung 56 Diffusion über die Membran per Fluoreszenzintensitätsmessung.	113
Abbildung 57 HepaRG Morphologie Tag 5 auf CC N4	114
Abbildung 58 mRNA Expression verschiedener Zellkontaktmarkern.	115
Abbildung 59 BIONAS Daten der Caco-2 Zellen.	116
Abbildung 60 mRNA Expression von Zellkontaktmarker in statischer und fluidischer Kultur.	117
Abbildung 61 Darstellung der Ausbildung von Zellkontaktmarkern.	118

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
CC N	ChipShop Catridge Nummer
CC S	Chip Catridge Schweden
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
iPS	Induziert pluripotente Stammzelle
LD ₅₀	Letale Dosis
MTT	-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5 Diphenyltetrazoliumbromid
OOC	Organ-on-a-Chip
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
Re	Reynoldszahl
rpm	Umdrehungen pro Minute
SRB	Sulforhodamine B
TCDD	2,3,7,8, Tetrachlordibenzodioxin
η	Dynamische Viskosität
τ	Scherkraft
g	Gewichtskraft
Q	Volumenflussrate
h	Höhe
w	Breite
γ	Schergeschwindigkeit
ρ	Dichte

Einheitenverzeichnis

mm	Millimeter
μm	Mikrometer
nm	Nanometer
nM	Nanomol
μM	Mikromol
mM	Millimol
sek	Sekunde
h	Stunde
g	Gewichtskraft
Pa	Pascal
min	Minute
AU	Arbiträre Einheit

Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer Arzneistoffe ist ein langer und kostenintensiver Prozess. Verlässliche experimentelle Modelle zur präklinischen Testung während frühen Phasen der Arzneistoffentwicklung sind essenziell, um einem späteren Misserfolg vorzubeugen. Nichtsdestotrotz spiegeln die gegenwärtig verwendeten Modelle, namentlich konventionelle 2D Zellkultur und Tiermodelle, Prozesse im menschlichen Körper teilweise falsch wider und führen mitunter zu einem späteren Abbruch der Arzneistoffentwicklung. Die Hauptgründe hierfür sind die falsche Darstellung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik. Für Zellkulturmodelle liegt dies an der geänderten genetischen Expression und fehlenden Stoffwechselwegen, für Tiermodelle an dem nicht humanen genetischen Hintergrund und der schnelleren Verstoffwechslung von Substanzen.

Eine Klasse von *in vitro* Modellen, die diese Nachteile überwinden könnte sind sogenannte Organ-on-a-Chip Plattformen. Organ-on-a-Chip verbinden Mikroingenieurwissenschaften und Zellkultur, um physiologisch relevante Zellkulturmodelle zu erschaffen. Neben der Nachahmung einzelner Gewebetypen bieten Organ-on-a-Chip Modelle die vielversprechende Möglichkeit die Interaktion verschiedener Gewebearten zu imitieren.

In der vorliegenden Thesis beschreibe ich die Entwicklung, Evaluierung und Etablierung von Organ-on-a-Chip Modellen zur Nachahmung physiologisch relevanter Umgebungen, Detoxifizierungsprozessen, Metabolismus und Resorption. Ich stelle die physiologischeren Bedingungen, die Organ-on-a-Chip im Vergleich zu konventioneller Zellkultur schaffen, auf Protein und genetischer Ebene dar.

Die Funktionalität von *in vitro* Modellen ist ein kritischer Parameter, hierbei ist insbesondere die Aktivität von metabolisierenden Enzymen essenziell. In einem initialen Projekt wurde die Entwicklung eines fluoreszenten CYP450 Test für Lebendzellkultur demonstriert. Der Test erlaubt die Änderungen der CYP450 Aktivität nach Behandlung mit Xenobiotika, der zellulären Differenzierung und dem Einfluss des zellulären Umfelds sowohl in Zellkultur als auch auf Einzelzellebene zu bestimmen.

In einem Leber-Nieren Modell wurde unter Verwendung der Umweltgifte Aflatoxin B1 und Benzoalaphapyrene gezeigt, dass Organ-on-a-Chip Modelle im Vergleich zu konventionellen 2D Zellkulturmodellen, Toxizität nachweisen können, die Bioaktivierung von Substanzen durch die Leber benötigen, um ihre toxische Wirkung zu entfalten. Durch die Ko-Behandlung mit etablierten CYP450 Induktoren und Inhibitoren, Rifampicin,

2,3,7,8 Tetrachlordibenzodioxin und Resveratrol verdeutliche ich außerdem die Möglichkeit Medikamenten-Medikamenten Interaktionen auf Organ-on-a-Chip Modellen nachzuweisen.

In einem zweiten Projekt habe ich mich auf die Möglichkeit den konsekutiven Metabolismus von Leber und Niere in Organ-on-a-Chip Modellen am Beispiel von Vitamin D3 nachzuahmen, fokussiert. Mittels analytischen und zellbasierten Methoden wurden das Eluat und die entstehenden Metaboliten analysiert. Dabei werden die verstärkten Effekte der entstehenden Metaboliten auf die Differenzierung von myeloischen Leukämie Zellen gezeigt.

In einem weiteren Projekt wurde die Verwendung eines membran-basierten mikrofluidischen Systems zur Resorption von Substanzen über die Darmwand und den Metabolismus dieser durch die Leber untersucht.

Insgesamt erläutere ich die Vorteile von Organ-on-a-Chip Modellen gegenüber statischer Zellkultur und deren Einsatzmöglichkeiten zur Testung von Toxizität und zur Nachahmung von Metabolismus.

Abstract

The development of new drugs is a long and costly process. Reliable experimental models for preclinical testing, especially at early stages of the drug development process are therefore essential to guard against drug failure at later stages. Nonetheless currently applied preclinical models, namely 2D cell culture and animal models, have limitation in reflecting physiological conditions of humans. The reasons are that they do not represent the pharmacokinetics and pharmacodynamics of humans, due to altered genetics, missing pathways or in case of animal models different genetic background. A class of *in vitro* systems which can tackle these drawbacks is the so called “organ-on-a-chip”. Organ-on-a-chip is the combination of micro engineering and cell culture to create physiologically relevant culture models. Besides the possibility to recapitulate single tissue features, organ-on-a-chip systems show promising abilities to mimic the interplay between different types of tissues. In this thesis, I describe my effort towards the development evaluation and establishment of organ-on-a-chip systems to mimic physiological relevant environments, toxicity, metabolism and absorption. I clearly show the advantages of these models over conventional 2D cell culture, regarding physiological expression of metabolising enzymes.

For *in vitro* models of the liver the reliability is strongly dependent on the enzymatic activity of metabolising enzymes. In an initial project I repurposed and optimized a fluorescent CYP450 assay for living hepatic cell culture. The assay proved to be capable of detecting alterations in CYP450 expression after drug-treatment, co-drug-treatment, cellular differentiation and the 3D cellular environment for cell populations and on a single cell level.

In an interconnected liver-kidney system using the environmental toxins aflatoxin B1 and benzoalaphapylene, I illustrate that organ-on-a-chip, in contrast to conventional 2D models, can detect the toxicity of bioactivated substances. It has further been demonstrated using established CYP450 inducers and inhibitors, rifampicin, 2,3,7,8 tetrachlordibenzodioxin and resveratrol that the developed system can be used to mimic drug-drug interactions.

In another project the possibility to mimic consecutive liver-kidney metabolism was investigated using vitamin D3. Using analytical and cellular based test systems I analysed the eluates and metabolites of the chip system. The bio activated eluate proved to cause an increased differentiation of acute myelogenous leukaemia cells compared to the parental molecule.

In a final project I investigated on the absorption of drugs in the colon and the metabolism of the liver using a membrane based microfluidic setup.

Overall, I depict the advantages of organ-on-chip models over conventional cell culture and present their application for toxicity studies and imitation of metabolism.

Einleitung

1.1 Arzneimittelentwicklung und Toxizitätsbestimmung

Arzneistoffe haben die medizinische Praxis und das alltägliche Leben im 20. und 21. Jahrhundert grundlegend revolutioniert. Ein Arzneistoff ist als der therapeutisch wirksame Bestandteil eines Arzneimittels oder Medikamentes definiert. Mit dem therapeutischen Effekt von Medikamenten geht mitunter die Gefahr einer schädlichen bis letalen Wirkung einher. Im Leitgedanken der Arzneimittelsicherheit, ist es unumgänglich, dass eine Substanz grundlegend auf ihre Effekte innerhalb des menschlichen Organismus getestet und ein Beleg des positiven Nutzen-Risiko-Verhältnisses erbracht wird. Dies geschieht während der Arzneimittelentwicklung, welche in präklinische Forschung und klinische Forschung unterteilt wird. Die präklinische Forschung testet die Effekte potenzieller Arzneimittel mittels Zellkultur und Tiermodellen, die klinische Forschung in Menschen und Patienten. Ein essenzieller Bestandteil der präklinischen Forschung ist die Toxizitätsbestimmung von Substanzen. Die Toxizitätsbestimmung definiert sich als die Feststellung der Schädlichkeit und Giftigkeit eines Stoffs auf den menschlichen Organismus. Ziel ist die Bestimmung spezieller toxikologischer Endpunkte, wie dem EC_{50} -Wert der die Dosis beschreibt, die bei 50% der Versuchspopulation einen positiven Effekt auslöst oder dem LD_{50} -Wert, der bei 50% der Versuchspopulation zum Tod führt. Man unterscheidet außerdem zwischen akuter und chronischer Toxizität. Die Erstgenannte beschreibt die schädigende Wirkung innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Verabreichung einer Einzeldosis, die Zweite die schädigende Wirkung bei wiederholter Verabreichung über einen längeren Zeitraum.

Der gesamte Prozess der Arzneimittelentwicklung ist zeit- und kostenintensiv, dies wird durch die folgenden Zahlen verdeutlicht. Die Neuentwicklung eines Arzneistoffes erstreckt sich über 12-15 Jahre und erreicht Kosten von bis zu 800 Millionen Euro [1]. Im letzten Jahrzehnt hat sich die Anzahl der neu zugelassen Wirkstoffe zwischen 16 und 31 mit einem konstant rückläufigen Trend gehalten und die Anzahl der genehmigten biologischen Lizenzanträge sechs nicht überschritten [2]. Außerdem wird im Durchschnitt nur Einer von Zehn potenziellen Arzneistoffen, die in präklinischen Tiermodellen positive Ergebnisse gezeigt haben, später für den Markt zugelassen [3]. Das Scheitern potenzieller Arzneistoffe liegt häufig in der fehlenden Wirksamkeit oder ist toxischen Nebenwirkungen geschuldet. Hierbei ist die Misserfolgsrate in Bereichen, in denen herkömmliche präklinische Modelle keine guten Vertreter des menschlichen Stoffwechsels sind, besonders hoch. Ein prominenter Auslöser der niedrigen Erfolgsrate ist die Leber, die das häufigste Ziel von tierexperimentellen Studien ist [4]. Oftmals

wird das gesamte Bild der hepatotoxischen Schädigung von Arzneistoffen erst während fortgeschrittenen klinischen Phasen ersichtlich, was zum kostenintensiven Abbruch der Arzneimittelentwicklung führen kann. Der vorangehende Absatz erklärt das allgemein gegenwärtige Interesse an der Entwicklung alternativer *in vitro* Modelle zur Nachahmung des menschlichen Stoffwechsels. Deren Entwicklung und Etablierung liegt dieser Thesis zugrunde.

1.2 Anatomie und Physiologie der Leber

Die Leber ist das größte Organ innerhalb des menschlichen Körpers, welche eine zentrale Rolle im Metabolismus von Substanzen und der Entgiftung des Bluts einnimmt. Sie fungiert sowohl als endokrine, zurück in den Blutkreislauf führende, als auch exokrine, über die Gallenkanälchen sekretierende, Drüse. Die Leber ist am Protein-, Steroid- und Fettstoffwechsel, sowie an der Eisen-, Vitamin- und Zuckerspeicherung des menschlichen Körpers beteiligt [5]. Ihre Nährstoff- und Sauerstoffversorgung erhält die Leber über zwei Quellen, die Pfortader und die Leberarterie; die Pfortader übernimmt hierbei ca. zwei Drittel der Blutversorgung. Das Blut verlässt die Leber über die Lebervenen [6].

Die klassische Struktureinheit der Leber ist das Leberläppchen, welches idealerweise einen hexagonalen Querschnitt aufweist (siehe Abbildung 1). Der Durchmesser der Leberläppchen liegt zwischen 1-2 mm, jeweils drei benachbarte Leberläppchen bilden ein Periportalfeld [7]. Die Zentralvene bildet die Mitte eines jeden Leberläppchens. An den Ecken der Leberläppchen ist die Glisson-Trias, welche aus dem interlobulären Gallengang, einem Ast der hepatischen Arterie und einem Ast der Portalvene besteht (siehe Abbildung 1) [7]. Von der portalen Außenseite zur zentralen Innenseite eines Leberläppchens ziehen sich die Lebersinusoide. Sinusoide sind kleine kapillar-artige Blutgefäße. Jedes Lebersinusiod besteht aus einer Barriere an fenestrierten Leberendothelzellen. Zwischen den Endothelien und dahinterliegenden Hepatozyten ist der ca. 10-15 μM breite Disse-Raum angeordnet, welcher Ito-Zellen, eine spezielle Art von Sternzellen beheimatet [7].

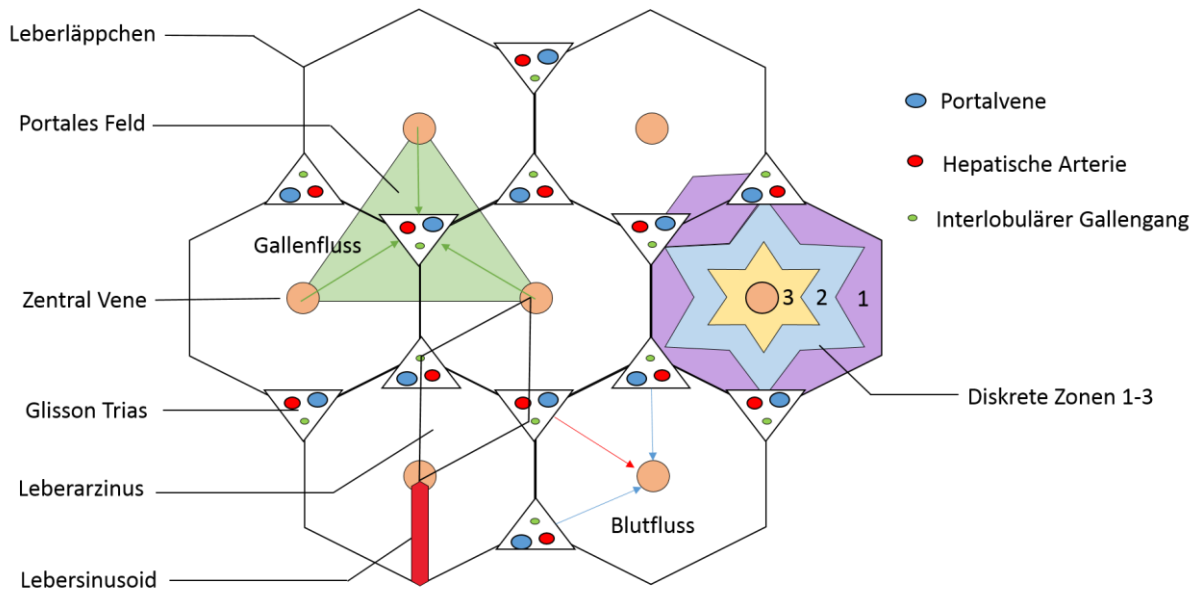


Abbildung 1 Mikrostruktur der Leber.

Die Mikrostruktur der Leber bilden hexagonale Leberläppchen. Im Zentrum des Leberläppchens liegt die Zentralvene (brauner Kreis). An den 6 Ecken der Leberläppchen die Glisson Trias mit Portalvene (blau) Hepatischer Arterie (rot) und Inerlobulären Gallengang (grün). Der Gallenfluss verläuft von der Zentralvene zur Glisson Trias (grüne Pfeile). Der Blutfluss von der Glisson Trias zur Zentralvene (rote und blaue Pfeile). Die Verbindung dreier Zentralvenen bilden ein portales Feld (grünes Dreieck). Darstellung der 3 diskreten Leberzonen. Lebersinusoid (roter Balken) verlaufen von der Außenseite der Leberläppchen zur zentral Vene. Die Verbindung zweier Zentralvenen und zweier Glisson Trias bilden ein Leberarzinus (schwarze Raute).

Die Mittelpunkte zweier Periportalfelder und zweier Zentralvenen bilden einen Leberarzinus, eine funktionelle Einheit des Lebergewebes, welche in Bezug auf die Durchblutung der Leber eine wichtige Rolle spielt. Der Leberarzinus ist in drei diskrete Zonen aufgeteilt: Zone I periportale Region, Zone II midlobuläre Region, Zone III perizentrale Region (siehe Abbildung 1). Innerhalb dieser Zonen variiert die Zellmatrixchemie, die Konzentration an gelösten Stoffen, die Sauerstoffkonzentration und die Genexpression der Zellen [8, 9]. Eine Übersicht der verschiedenen zonal variierenden Enzyme und Stoffwechselwege wurde von *Meijer et al* verfasst [10].

In Bezug auf die vorliegende Thesis wurden Mikrosysteme entwickelt und getestet, die sowohl eine sinusoidale Struktur nachahmen, als auch komplexere Modelle, die darauf abzielen die Struktur ganzer Leberläppchen zu imitieren.

Die verschiedenen Zelltypen innerhalb der Leber können in zwei Unterklassen eingeteilt werden: Parenchymzellen und nicht-parenchym Zellen. Die Fraktion der Parenchymzellen

besteht aus den Hepatozyten die fast 80% des Leber Volumens und 60% der gesamten Zellpopulation der Leber darstellen [11]. Die nicht-parenchym Fraktion umfasst die restlichen Leberzellen: Sinusoidale Leberendothelien, Kupffer Zellen, Sternzellen und Cholangiozyten.

1.2.1 Cytochrom P450 Enzyme

Der Begriff Cytochrome P450 (CYPs) erschien erstmals 1962 in der Literatur [12]. Der Name entstand durch die optische Absorption der kohlenmonoxid-gebundenen Form bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Aufklärung der Funktion als Oxidoreduktase im Jahre 1963 löste eine rasante Ausweitung der Forschung an dieser Gruppe von Hämoprotein aus [12]. Gegenwertig werden CYP-Enzyme als eine Superfamilie von Hämoproteinen, die die Phase-I-Biotransformation vieler endogener Substanzen und Xenobiotika katalysieren definiert. Obwohl CYPs ursprünglich in Tierlebermikrosomen entdeckt wurden [13, 14], sind einzelne Isoenzyme in allen eukaryotischen Organismen, Tieren, Pflanzen und Pilzen vorhanden. CYPs werden in verschiedenen Geweben, jedoch hauptsächlich im glatten endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten in Zone III des Leberazinus exprimiert [15]. Im Allgemeinen sind niedrigere Expressionsspiegel im Darm, den Nieren, der Lunge und im Gehirn zu finden [16].

Das besondere Interesse an CYPs ist ihrer Fähigkeit zur Arzneimittelbiotransformation und den resultierenden Arzneimittel Wechselwirkungen geschuldet. Insbesondere folgende sechs CYP450-Isoenzyme, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 sind im menschlichen Körper für den Großteil der Biotransformation verantwortlich [17]. Arzneimitteln sind entweder Substrat, Induktor oder Inhibitor einzelner CYP450 Enzyme, können jedoch unterschiedliche Effekte auf weitere CYP450 Enzyme haben. Die Wechselwirkung von Arzneimitteln mit individuellen CYPs ist oftmals konzentrationsabhängig. Die Enzyminduktion ist der Prozess, bei dem die Exposition gegenüber bestimmten Substraten (z. B. Arzneimitteln, Umweltschadstoffen) zu einer Induktion der CYP-Aktivität und einer Beschleunigung der Biotransformation führt. Die meisten Medikamente können aufgrund des schnellen Metabolismus eine verringerte Wirksamkeit zeigen. Arzneimittel mit biologisch aktiven Metaboliten können jedoch durch die Enzyminduktion eine erhöhte Arzneimittelwirkung und oder Toxizität aufweisen. Enzyminhibition tritt auf, wenn zwei unterschiedliche Arzneimittel, die den Metabolismus über das gleiche CYP-Isoenzym teilen, um die Enzymrezeptorstelle konkurrieren. Der stärkere Inhibitor bindet an das aktive Zentrum, was zu einem verringerten Metabolismus des

konkurrierenden Arzneimittels führt. Infolgedessen können ein erhöhter Serumspiegel der nicht metabolisierten Substanz und ein größeres Toxizitätspotenzial entstehen. Für Arzneimittel, deren pharmakologische Aktivität eine Biotransformation aus einer Arzneimittelform erfordert, kann die Hemmung zu einer verminderten Wirksamkeit führen.

Testung der CYP-Aktivität *in vitro*

Eine entscheidende Rolle in der Entwicklung neuer Arzneistoffe, ist die Bestimmung der Interaktionen mit CYP-Enzymen. Dies dient der frühzeitigen Erkennung von Medikamenten-Medikamenten Interaktionen und der damit einhergehenden negativen Effekte auf den menschlichen Körper. Etablierte *in vitro* Methoden zur Bestimmung der CYP-Arzneimittel Interaktion, verwenden üblicherweise Zelllysate oder Lebermikrosomen in Kombination mit Detektionsverfahren wie radioaktiv-markierten Substraten, fluoreszenz- und lumineszenz-basierten Tests oder HPLC-Techniken.

In Bezug auf die vorliegende Thesis wird der Bereich der Testverfahren auf fluoreszenz-basierte Verfahren eingeschränkt. *Burke et al* verwendeten als Erster, die O-Dealkylierung von Alkoxyresorufinen um die Induktion der CYP-Enzyme durch ein fluoreszentes Signal zu untersuchen [18]. Seitdem wurden verschiedene Alkylderivate von Resorufin, Fluorescein, 7-Hydroxycumarinen und 6-Hydroxychinolinen als Substrate untersucht, und einige zur Verwendung in P450-vermittelten Arzneimittelwechselwirkungsstudien kommerzialisiert [19-22]. Der Großteil der Testung der CYP-Arzneistoffinteraktion wird in Lebermikrosomen durchgeführt, welche trotz ihres Nutzens für die Bestimmung der Arzneistoffinteraktion mit einzelnen CYP-Isoenzymen einige Nachteile aufweisen. Lebermikrosomen sind meist von einem einzelnen Donor isoliert und repräsentieren nicht die Heterogenität der CYP-Aktivität verschiedener Personen. Eine Möglichkeit diesen Nachteil zu überkommen, ist die Verwendung gemischter Lebermikrosomen mehrerer Donoren. Trotzdem ist allen Zelllysate- und -mikrosom-basierten Ansätzen gemein, dass sie nur den tatsächlichen metabolischen Umsatz analysieren, jedoch andere Effekte, die lebenden Zellen und Organen inhärent sind, ausschließen [23]. Diese Nachteile zeigen auf, dass Verfahren zur Bestimmung der CYP-Aktivität in lebenden Zellen für *in vitro* Lebersysteme vonnöten sind. Die hier vorliegende Arbeit beschreibt ein alternatives Verfahren, welches es erlaubt die CYP-Aktivität in lebenden Zellen nachzuweisen. Hierfür wurden die kommerziell verfügbaren VividDye Substrate, (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland), die zumeist eine Coumarinstruktur

enthalten und nach enzymatischer Umsetzung fluoreszente Farbstoffe bilden. verwendet. Anstelle der etablierten Methode diese in Kombination mit BACCULOSOMEN®, einer bestimmten Art von Lebermikrosomen zu verwenden, wurde ihr Anwendungsbereich auf die Zellkultur ausgeweitet. Die Entwicklung, die genaue Durchführung und die verschiedenen Einsatzgebiete des Testsverfahrens wurde unter [24] publiziert und werden im weiteren Verlauf der Thesis detailliert beschrieben.

1.3 Leberzellkultur Modelle zur Toxizitätstestung

Aufgrund der einzigartigen metabolischen Aktivität und der Interaktion zum Magen-Darm-Trakt, ist die Leber ein wichtiges Ziel der Toxizität von Arzneistoffen, Xenobiotika und oxidativem Stress [25]. Unerkannte Hepatotoxizität gehört zu den Hauptursachen für das Scheitern von potenziellen Arzneimitteln während klinischer Studien [26]. Dies liegt zum Teil, wie bereits beschrieben, an der idiosynkratischen Natur der Toxizität bei Menschen und zum anderen an der unterschiedlichen Physiologie zwischen Mensch und präklinischen Tiermodellen. Diese repräsentieren oftmals die Pharmakodynamik, die beschreibt, wie ein Arzneimittel auf den menschlichen Organismus wirkt und die Pharmakokinetik, die die Gesamtheit der Prozesse beschreibt, die ein Arzneistoff im menschlichen Organismus durchläuft, inkorrekt und irreführend. Daher folgt eine niedrige Verlässlichkeit der Vorhersage von nachteiligen Effekten durch Arzneimittel auf den Menschen.

Sobald Hepatozyten *ex vivo* kultiviert werden nimmt die Expression von CYP Enzymen ab, was in einer signifikanten Diskrepanz in der Arzneimittelbiotransformation resultiert [27, 28]. Die zentrale Rolle der Leber innerhalb des Metabolismus und der Entgiftung des Körpers, ihre Anfälligkeit für Arzneimitteltoxizität in Kombination mit der *ex vivo* Dedifferenzierung von Hepatozyten und dem Verlust ihrer CYP-Aktivität, erklären das gegenwertige Interesse an physiologisch relevanten *in vitro* Lebermodellen.

Zu den etablierten Lebermodellen gehören Leberschnitte, intakte Hepatozyten, Lebermikrosomen, und aufgereinigte Leberenzyme. Beschränkt man die Modelle auf zellbasierte Systeme werden oftmals primäre Maus oder Ratten Hepatozyten verwendet. Dies liegt vor allem an den geringen Kosten, der guten Zugänglichkeit und der Möglichkeit die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse mit Modelltieren zu vergleichen [29]. Schwierigkeiten treten jedoch auf, falls man versucht die toxischen Effekte auf den Menschen zu extrapolieren. Frisch

isolierte primäre humane Hepatozyten, spiegeln die im Menschen zu erwartenden Reaktionen am besten wider. Jedoch ist der Zugang zu primären Material oftmals limitiert. Eine wichtige Alternative zu primären Zellen stellen Zelllinien dar. Als humane hepatozyten-ähnliche Zelllinien werden oftmals HepG2, optimierte HepG2 Zellen mit einer höheren Expression an CYP3A, namentlich C3A, Huh7, Fa2N-4, und HepaRG Zellen verwendet. Im Folgenden wird Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten Leberzelllinien genommen.

HepG2 ist das am häufigsten verwendeten Lebermodell. HepG2 Zellen wurden einem 14-jährigen Jungen mit einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom entnommen. Sie sind adhärente, epithelähnliche Zellen, wenn sie als Monoschichten und in kleinen Aggregaten kultiviert werden, können aber auch in 3D Sphäroiden wachsen. HepG2-Zellen sekretieren eine Reihe von typischen hepatischen Plasmaproteinen, wie Transferrin, Fibrinogen, α -2-Makroglobulin, Plasminogen und Albumin. Sie exprimieren entsprechende Phase I und Phase II Enzyme, um die Biotransformation vieler, aber nicht aller xenobiotischer Substanzen durchzuführen [30]. Da HepG2 einfach zugänglich und zu kultivieren sind, werden sie häufig in verschiedenen toxikogenomischen Studien verwendet. Im Vergleich zu primären Hepatozyten weisen HepG2 auf Transkriptom-Ebene wesentliche Unterschiede in der basalen Genexpression auf [31]. Zum Beispiel ist die Expression metabolisch relevanter CYPs (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 und CYP3A4) wesentlich niedriger als in primären Hepatozyten [32]. In Einzelfällen ist die Expression in HepG2 bis zu 50-fach niedriger. Infolgedessen begründet sich, dass HepG2 gegenüber vieler xenobiotischer Substanzen eine geringere Sensitivität aufweisen. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass die Funktionalität stark von den verwendeten Zellkulturbedingungen und der Zellkulturdauer abhängt, auf diesen Punkt wird explizit im Verlauf der Thesis Bezug genommen [33].

Eine weitere Zelllinie, welche innerhalb der letzten fünf Jahre zunehmende Anwendung gefunden hat, sind HepaRG-Zellen. Diese stammen aus einem hepatozellulären Karzinom, differenzieren jedoch in zwei verschiedene Zellpopulationen, wenn sie in Monolayern kultiviert werden [34]. Ein Zelltyp, der bevorzugt durch Dimethylsulfoxid induziert werden kann, ähnelt den Hepatozyten, während die zweite Population den Cholangiozyten ähnlich ist. Im Vergleich zu anderen Zelllinien, wie zum Beispiel HepG2, exprimieren differenzierte HepaRG-Zellen verschiedene metabolisch relevante CYPs (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 und CYP3A4) wesentlich höher.

Bisher entwickelte Leberzellkultur Modelle verwenden entweder reine parenchymale Zellkulturen (Hepatozyten) oder eine Kombination aus Hepatozyten und nicht-

parenchymalen Zellen (Leber Endothelzellen, Sternzellen, und Cholangiozyten), wobei die Co-Kultursysteme als physiologisch relevantere Modelle gelten. Neben den verwendeten Zelltypen kann man *in vitro* Zellkultur Systeme zur Testung von Hepatotoxizität in grob drei Unterklassen aufteilen: statische 2D Modelle, statische 3D Modelle, mikrofluidische dynamische Modelle.

Im Folgenden wird kurz der Stand der Technik der ersten zwei Kategorien beleuchtet. Mikrofluidische dynamische Modelle werden auf “Organ-on-Chip“ Systeme beschränkt und im späteren Verlauf beschrieben.

1.3.1 Testung von Hepatotoxizität in 2D Zellkultursystemen

Seit der Entdeckung zu Beginn des 20ten Jahrhundert durch Alexis Carel [35] hat sich die statische Zellkultur nur geringfügig verändert und obwohl 2D Kulturmodelle kostengünstige Daten über die Arzneistofftoxizität liefern können, repräsentieren diese kaum die komplexe Physiologie des Menschen.

In 2D Einzelschichten (Monolayers) verlieren primäre Hepatozyten innerhalb von 24-72 Stunden nach der Aussaat ihre hepatozyten-spezifische Funktion und die Expression von wichtigen Biotransformationsenzymen und CYPs [27, 28]. Hierdurch sind Hepatozyten Monolayer im Vergleich zur nativen Leber oftmals weniger empfindlich gegenüber xenobiotischer Substanzen, was zu einer signifikanten Unterschätzung der Toxizität führt. Trotz dieser Ungenauigkeit werden 2D Monolayer Kulturen oftmals für “Hoch-Durchsatz“ Toxizitätsstudien eingesetzt.

Eine Alternative zu den einfachen 2D Monolayer-Systemen stellen sogenannten Kollagen Sandwich-Modellen dar [36]. Hierbei wird der Boden des Zellkultursystems zunächst mit Kollagen beschichtet, die Zellen werden auf diesem ausgesät und anschließend mit Kollagen überdeckt. Somit erhalten die Zellen ein künstliches extrazelluläres Gerüst, was zu einer physiologischen Annäherung der Expression verschiedener Transporter [37, 38], CYPs [39, 40] und der Empfindlichkeit gegenüber Chemikalien und Arzneistoffen führt. Trotz der Vorteile von Kollagen Sandwich-Modellen repräsentieren diese nicht die heterotypischen Wechselwirkungen zwischen Zellen die in der Leber auftreten.

Die Ko-Kultur von Hepatozyten mit anderen nicht parenchymalen Zellen ermöglicht die heterotypische Zell-Zell Interaktion. Unabhängig davon, dass 2D Ko-Kultur Systeme, 3D Systemen oder mikrofluidischen dynamischen “Organ-on-Chip“ Modellen in ihrem physiologischen Nutzen unterlegen sind, bieten Sie die Möglichkeit einen Phänotyp ähnlich dem von differenzierten Hepatozyten über mehrere Wochen aufrechtzuerhalten.

1.3.2 Testung von Hepatotoxizität in 3D Zellkultursystemen

Im Vergleich zu 2D Systemen, erlauben 3D Lebermodelle einen differenzierten Hepatozyten Phänotyp mit physiologischer CYP-Expression aufrechtzuerhalten. 3D Modelle emulieren *in vivo* Eigenschaften der Leber, wie die Aufrechterhaltung von Zell-Zell Kontakt (Tight Junctions), die Ausbildung von Gallenkanälchen und die Präsenz eines extrazellulären Gerüsts [30, 41]. 3D Modelle umfassen unter anderem: Leberschnitte und Sphäroide. Leberschnitte bestehen aus primärem Lebermaterial welches in einer Dicke von 100-250 µm geschnitten wird [42]. Aufgrund von Einschränkungen in der Sauerstoff- und Nährstoffdiffusion können diese jedoch maximal 72h kultiviert werden.

Sphäroide sind kleine Zellaggregate, in denen sich die Zellen in ihrer 3D Ausrichtung selbst organisieren. Grundlage für Sphäroide ist, dass der verwendete Zelltyp 3D-Strukturen ausbilden kann. Sphäroide können durch die Aussaat auf nicht-adhäsiven Oberflächen und rotierenden Kulturen oder durch Techniken wie hängende Zelltröpfchen "hanging-droplet" gebildet werden [43]. Sphäroide zeichnen sich durch eine hohe Relevanz für die Testung von Hepatotoxizität aus und sind die am häufigsten verwendeten 3D-Lebermodelle. Im Gegensatz zu Leberschnitten bleiben Biotransformationsenzyme und CYPs für bis zu fünf Wochen in physiologisch relevanten Mengen erhalten [44, 45]. Ein Großteil der bisherigen 2D und 3D Systeme zur Testung von Hepatotoxizität haben eine entscheidende Limitierung gemeinsam, es handelt sich um statische Modelle, denen die dynamische Komponente, welche im Körper durch den Blutfluss dargestellt wird fehlt. Die Mikrofluidik und Perfusionskulturen bieten die Möglichkeit diese Komponente einzubringen.

1.4 Mikrofluidik

Die Mikrofluidik kann sowohl als Wissenschaft als auch als technisches Instrument angesehen werden. Im zuerst genannten Falle ist es die Wissenschaft der Strömungen von kleinen Volumen (10^{-9} - 10^{-18} L) an Flüssigkeiten oder Gase in Kanälen im Mikrometer Bereich. Im zweiten Falle wird die Mikrofluidik als Instrument zur Bildung eines Förderstroms für Substanzen genutzt. Das Interesse am Verständnis der Eigenschaften von Fluiden, die auf

kleinstem Raum beschränkt sind, ist schon über 2000 Jahre alt was die frühen Studien von Hippokrates, Gallen und Theophilus zeigen [46].

Die ersten mikrofluidischen Systeme der Neuzeit entstanden unter Einsatz von Mikrofertigung in den 1960er Jahren, namentlich Tintenstrahldrucker, die von IBM hergestellt und Chromatografie Systeme die an der Stanford University entwickelt wurden. Der raschen Weiterentwicklung im 20ten Jahrhundert liegen laut *George Whiteside* vier Motivatoren zugrunde: Molekulare Analyse, Biodefense, molekulare Biologie und Mikroelektronik [47]. Des Weiteren hat die Nutzung verschiedener Materialien und Mikroherstellungsverfahren die Einsatzgebiete der Mikrofluidik erheblich erweitert. Früh entwickelte Systeme verwendeten Materialien wie Silizium und Glas, heutzutage sind hauptsächlich polymer- und kunststoffbasierte Materialien im Einsatz. Zwei besonders wichtige Beiträge innerhalb der Entwicklung von mikrofluidischen Systemen waren die Soft Lithographie in Polydimethylsiloxan (PDMS) zur Herstellung von Prototypen und die Entwicklung eines einfachen Verfahrens zur Herstellung von Ventilen, Mischern und Pumpen. Einsatzgebiete von mikrofluidischen Systemen sind heutzutage unter anderem die klinische und veterinär medizinische Diagnostik, Einzelzell-Analytik, Verabreichung von Medikamenten, chemische Synthesen, analytische Instrumente und zellbasierte Systeme.

In der vorliegenden Thesis liegt der Fokus auf dem Einsatz der Mikrofluidik in zellbasierten Systemen.

1.4.1 Fluidodynamik in der Mikrofluidik

Grundlegende fluiddynamische Prinzipien beschreiben das Verhalten von Strömungen innerhalb mikrofluidischer Systeme. Der Strömungsbereich innerhalb von Strukturen im Mikrometerbereich ist normalerweise laminar. Im Gegensatz zum turbulenten und unvorhersehbaren Bereich in Makrosystemen, begünstigt der laminare Bereich kontrollierte und vorhersehbare Trajektorien.

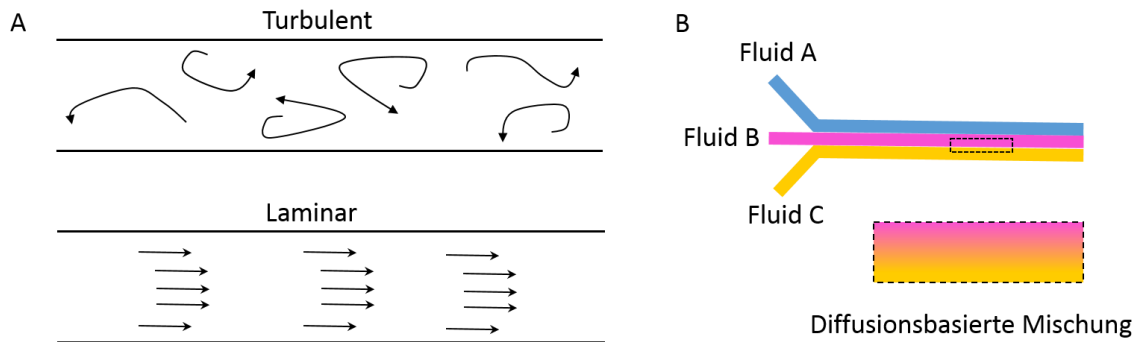


Abbildung 2 *Turbulenter und laminarer Fluss.*

A: Illustration turbulente und Laminare Traktorien innerhalb eines Kanals. B Drei parallel verlaufende Fluide innerhalb eines mikrofluidischen Kanals, die Durchmischung der Fluide erfolgt über Diffusion.

In Makrosystemen dominieren Trägheitskräfte, wohingegen die Dominanz der Kapillar- und Viskositätskräfte innerhalb der Mikrofluidik, die gezielte Kontrolle von Flüssigkeiten im Umgang mit biologischen und zellbasierten Proben ermöglicht.

Verschiedene Werke zum Thema Fluidodynamik haben die Flusseigenschaften innerhalb von Mikrosystemen basierend auf dem Massen-, dem Impuls- und dem Energieerhaltungssatz charakterisiert [48-50]. In Bezug auf die vorliegende Arbeit wird vereinfacht von nicht kompressiblen, isotropischen, linear-viskosen newtonschen Fluiden ausgegangen, welche durch die Navier-Stokes-Gleichung beschrieben werden können. Die Navier-Stokes Gleichung stellt den Zusammenhang zwischen den Trägheits- und Viskositätskräften in Bezug auf die Flussgeschwindigkeit (u) und den Druck (p) dar.

$$\rho \left(\frac{\delta u}{\delta t} + \vec{u} \cdot \nabla \cdot \vec{u} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{u} + \rho g \quad \text{Formel 1.1}$$

Unter Einbezug der Dichte (ρ) und der dynamischen Viskosität (η) kann somit mittels Formel 1.1 die Flussgeschwindigkeit eines Fluides zu einem bestimmten Zeitpunkt berechnet werden. Hierbei beschreibt ρg die Volumenkraftdichte und ∇ den Nabla-Operator. Als Vereinfachung können im laminaren Flussbereich der Trägheitsterm $\rho \left(\frac{\delta u}{\delta t} + \vec{u} \cdot \nabla \cdot \vec{u} \right)$ und die Volumenkraftdichte ρg vernachlässigt werden, geht man weiter davon aus, dass $\frac{\delta u}{\delta t} = 0$ ist ergibt sich die vereinfachte Form:

$$-\nabla\rho = \eta\nabla^2\vec{u} \quad \text{Formel 1.2}$$

Die Navier-Stokes Gleichung kann somit zur Berechnung der Fluidodynamik innerhalb von mikrofluidischen Systemen verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gleichung zur Berechnung der Fluidsimulation verwendet.

Die Reynoldszahl, welche das Verhältnis von Trägheits- und Zähigkeitskräften beschreibt (siehe Formel 1.3), dient als Kennzahl für den geometrischen Aufbau von mikrofluidischen Kammern. Wobei ρ die Dichte des Fluids, u die Flussgeschwindigkeit, d die charakteristische Länge und η die dynamische Viskosität darstellt. Definitionsgemäß spricht man bei Reynoldszahlen $Re < 2300$ von laminaren Strömungen, $Re = 2315$ von der kritischen Reynoldszahl, welche den Übergang vom laminaren in den turbulenten Bereich beschreibt, und $Re > 10000$ von turbulenten Strömungen. Für zellbasierte mikrofluidische Systeme ist ein möglichst kleiner Wert von ($Re < 1$) vorteilhaft, um laminaren Fluss innerhalb der Kammern zu gewährleisten.

$$Re = \frac{\rho \cdot u \cdot d}{\eta} \quad \text{Formel 1.3}$$

Neben der Reynoldszahl ist die Scherrate τ ein wichtiger Faktor in zellbasierten mikrofluidischen Systemen. Bei newtonschen Fluiden liegt ein linearer Zusammenhang zwischen der Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ und der Scherrate τ vor, welche durch Formel 1.4 beschrieben wird. Die Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ beschreibt hierbei die räumliche Veränderung der Flussgeschwindigkeit, η die dynamische Viskosität.

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Formel 1.4}$$

Die meisten mikrofluidischen Kanäle weisen einen rechteckigen Querschnitt auf, somit kann die Scherrate mittels Formel 1.5 berechnet werden [51].

$$\tau = \frac{6\eta Q}{wh^2} \quad \text{Formel 1.5}$$

Hier stellt η die dynamische Viskosität, Q die Volumenflussrate, w die Breite des Kanals und h die Höhe des Kanals dar. Um einen zellulären Phänotyp zu erhalten, welcher physiologische Eigenschaften aufweist, sollte die Scherrate zwischen 0.05 -1.5 Pa liegen [52]. Der optimale Wert ist vom jeweiligen Zelltyp und dessen spezifischer Funktion im menschlichen Körper abhängig.

In Kombination mit der Zellkultur bietet die Mikrofluidik diverse Vorteile. Eine Übersicht der grundlegenden Anforderungen an Zellkultursysteme und die Vorteile, die die Verwendung von Mikrofluidik im Vergleich zu statischen Systemen aufweist, sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Fähigkeit, den Flüssigkeitsstrom unter Verwendung von Membranventilen exakt zu steuern, ermöglicht eine präzise chemische und physikalische Kontrolle der zellulären Mikroumgebung. Die abgegebenen Dosen können in kleinsten Volumina (Nanoliter bis Femtoliter) gemessen und abgegeben werden, was eine signifikante Verbesserung der Genauigkeit und der Kosten im Vergleich zu der herkömmlichen Pipette darstellt, die Mikroliter bestenfalls messen kann. Dies führt außerdem zu einer Verminderung der entstehenden Kosten teurer Arzneistoffe. Mikrofluidische Zellkultursysteme ermöglichen eine präzise Kontrolle über die Zellzahl und -dichte in einem bestimmten Bereich oder Volumen und können die Anordnung von Zellen in komplexen Geometrien, ihre Überwachung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung und ihre individuelle Wiedergewinnung während oder nach Experimenten ermöglichen.

Tabelle 1 Auflistung der Anforderungen an die Zellkultur im Vergleich zwischen konventioneller 2D Kultur und mikrofluidischen OOC.

Anforderung	Konventionelle 2D Kultur	Mikrofluidische OOC
Kontrolle über Temperatur und Gas	Große Volumen verlangsamten die Diffusion	Kleine Volumen erlauben die dynamische Kontrolle
Addition von Nährstoffen und Entnahme von Metaboliten	Selten, händischer Austausch	Messbar und Kontinuierlich
Arzneimittel Behandlungen	Händisch möglich	Konti- und Diskontinuierlich
Parallelisierung	Nicht möglich	Hohes Potenzial
Automatisierung	Sperrige Pipettierroboter	Kompaktes Format
Einzelzellbehandlung	Händisch, Inakkurat	Hochdurchsatz, Akkurat

1.5 Organ-on-Chip Systeme

Eine Klasse von *in vitro* Testsystemen, welche im letzten Jahrzehnt für hohe Zukunftserwartungen gesorgt hat, sind sogenannte Organ-on-Chip Systeme (OOC). Diese neuartigen Systeme stellen die Kombination von Mikrofluidik und Zellbiologie dar. Es handelt sich um mittels Mikro-Herstellungsverfahren erzeugte Zellkulturplattformen, in denen Zellen kultiviert und über mikrofluidische Kanäle versorgt werden. Diese Mikroherstellungsverfahren wurden initial für die Elektronikindustrie entwickelt, wodurch sich das Synonym "Chip" erklärt.

Die transparenten Eigenschaften der OOC erlauben die kontinuierliche Überwachung der Zellen mittels Mikroskopie, ihre kompakte Größe, welche zumeist Objektträger oder Mikrotiterplatten entspricht, erlaubt die Integration in eine Vielzahl von labortypische Standardverfahren.

OOC replizieren vier wichtige Aspekte intakter Organe: Die 3D-Mikrostruktur, die sowohl durch die Mikrostruktur der Plattform als auch durch die räumliche Verteilung der Zellen definiert wird; eine funktionelle Gewebe-Gewebe-Interaktionen, eine komplexe organspezifische mechanische und biochemische Umgebung und einen Blutfluss ähnlichen Stimulus [53]. Die mikrofluidische Strömung der OOC Systeme gestattet die kontinuierliche oder diskontinuierliche Versorgung mit nährstoffreichem Medium, den Abtransport von Metaboliten und toxischen Produkten, sowie die raumzeitliche Kontrolle über die Arzneistoffzugabe. OOC Systeme erlauben wie oben beschrieben die Herstellung von chemischen Gradienten, und ahmen den physischen und mechanischen Stimulus auf Zellen nach, welcher im menschlichen Körper durch den Blutfluss entsteht. Chemische Gradienten und mechanische Kräfte sind bestimmende Faktoren für die Differenzierung und die Funktion von Zellen in verschiedenen Organen, wie zum Beispiel der Leber oder der Niere. Diverse Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass OOC Systeme es ermöglichen, Gewebe-Gewebe Interaktionen [53], die Barriere Funktionen, den Arzneimittelmetabolismus und Toxizität und den Transport von Metaboliten zu weiteren Organen nachzuahmen. Tabelle 2 bietet eine Übersicht über einige Anwendungsbereiche von OOC Plattformen.

Tabelle 2 Übersicht verschiedener Anwendungsbereiche von OOC Plattformen.

Biologischer Prozess/ Merkmal	Referenz
Arzneimitteltoxizität	[54-62]
Medikamenten Entwicklung	[62-65]
Krankheitsmodelle	[66-69]
Gewebe-Gewebe Interaktion	[70-74]
Barriere Funktionen	[75-81]
Organ-Organ-Interaktion	[75, 82-89]

Innerhalb dieser Thesis konnten drei Anwendungsbereiche von OOC Plattformen demonstriert werden: der konsekutive Metabolismus von Vitamin D₃ durch Leber und Niere und der Effekt des Metaboliten auf das Immunsystem; die nephrotoxische Wirkung von Substanzen, welche zuvor durch die Leber bioaktiviert wurden; die Resorption von Arzneistoffen durch die Darmwand und den folgenden Metabolismus durch die Leber.

Neben der Physiologie gesunder Organe bieten OOC auch die Möglichkeit Krankheitsmodelle nachzustellen. Dies ist vor allem interessant in Kombination mit iPSC. iPSC, welche unterschiedliche, hepatische- [90], pankreatische [91], neuronale [92, 93], und kardiovaskuläre [94-97] genetische Krankheiten nachahmen wurden bereits entwickelt und einige in OOC Plattformen integriert.

Neuste Studien haben den Begriff des "Human-on-chip" oder "Body-on-Chip" geprägt, um die Komplexität und Relevanz von Mehr-Komponenten-OOC-Systeme zu beschreiben, der Begriff "Patient-on-Chip" entstand bei der Kombination von OOC und iPSCs Die Möglichkeit komplexe Gewebe-Gewebe Interaktionen, Toxizitätstestung, Metabolismus und genetische Krankheitsbilder nachzuahmen erklären die hohen Erwartungen in OOC für die zukünftige Medikamentenentwicklung.

1.5.1 Der Aufbau von OOC

Die Gestaltung der Zellkammern auf einem OOC ist von dem jeweiligen Einsatzgebiet und der definierten Fragestellung abhängig. Hierbei gibt es keine universale Einigung zur Größe und zur Anordnung der Kammern. Grundlegende Überlegungen zum Aufbau eines OOC wurden von *Wiskwo et al.* diskutiert [52, 98]. Beim Aufbau von OOC Plattformen werden grob membranbasierte und diffusionsbasierte Systeme unterschieden.

Membranbasierte OOC-Systeme

Um die Absorptions- und Filtrationseigenschaften von verschiedenen Organen zu modellieren, werden membranbasierte OOC-Systeme verwendet. Hierbei wird eine poröse Membran zwischen zwei Mikrokanälen angeordnet (siehe Abbildung 3). In solchen Systemen werden in der Regel zwei Arten von Zellen auf den gegenüberliegenden Seiten der Membran kultiviert. Oftmals werden hierbei Epithelzellen verwendet, um eine basolateral und apikale Region zu erzeugen, wie sie in der Speicheldrüse, der Gallenblase, dem Magen, der Bauchspeicheldrüse oder dem Colon zu finden sind. Die Perfusion von Kulturmedium ist zumeist auf beiden Seiten der Membran möglich. Um die absorptiven Eigenschaften einer Zellbarriere nachzuahmen, wird eine Substanz zum Beispiel nur auf der Oberseite der Membran hinzugegeben, wobei deren Effekt auf die Zellen an der Unterseite der Membran getestet wird. In der Literatur wurden unter anderem Niere [99-101], Blut-Hirn-Schranke [78, 102], Lunge [62, 74] und Colon [70, 103, 104] mit membranbasierten Chips rekonstruiert.

Ein membranbasierter Aufbau wurde von mir in der vorliegenden Arbeit zur Nachahmung einer Colon-Leber Interaktion verwendet. Auf das Chipdesign, die experimentellen Fragestellungen und die verwendeten Zelltypen wird später eingegangen.

Diffusionsbasierte OOC-Systeme

Drüsenartige Organe mit Sekretorischen- oder Speicherfunktionen, wie zum Beispiel die Leber, können durch diffusionsbasierte OOC-Systeme nachgebildet werden (siehe Abbildung 3). Hierbei ist die Zellkulturkammer durch eine Diffusionsbarriere von den umliegenden fluidischen Transportkanälen getrennt. Die Diffusionsbarriere kann sowohl durch eine Gruppe an Mikrosäulen [105, 106] oder Mikrokanälen [107], als auch durch eine Art Damm gebildet werden. Dieser Aufbau ähnelt *in vivo* Merkmalen von Drüsen, da innerhalb der Zellkulturkammern kein direkter Fluidstrom vorhanden ist, und das Kulturmedium nur mittels Diffusion zu den Zellen gelangen kann. Ein solcher Ansatz eignet sich für Zellen, welche entweder sehr empfindlich gegenüber Scherung sind oder auch im menschlichen Körper durch eine Barriere abgeschirmt werden. Ein entscheidender Vorteil von diffusionsbasierten im Vergleich zu membranbasierten Systemen besteht darin, dass die Zellen innerhalb der Kammern in mehreren Lagen oder 3D Strukturen kultiviert werden können. Dies bietet bei parenchymalen Zellen wie zum Beispiel Hepatozyten entscheidende Vorteile für Funktionalität und Ausbildung von Gallenkanälchen.

OOC Plattformen, die sowohl Mikrosäulen als auch Damm Diffusionsbarrieren nutzen wurden von mir innerhalb der praktischen Arbeit dieser Thesis entwickelt und genutzt.

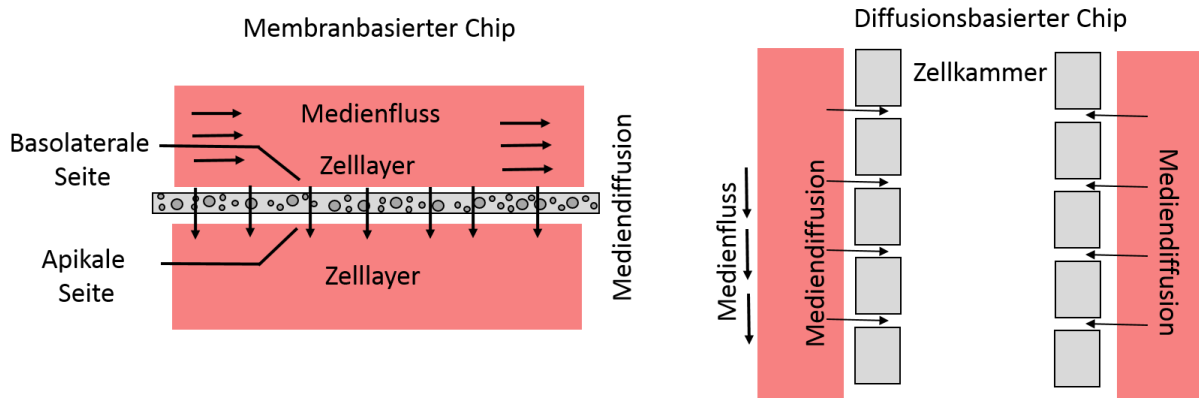


Abbildung 3 Aufbau mikrofluidischer Chipsysteme.

Schematische Darstellung eines membranbasierten und diffusionsbasierten Chips. Ein Membranbasierter Chip besteht aus zwei übereinanderliegenden Zellkultur Kammern, die durch eine Membran getrennt sind. Ein diffusionsbasierter Chip besteht aus einer Zellkammer die durch Diffusionsblöcke oder Diffusionsbarrieren vom umliegenden Mediumstrom abgetrennt ist.

1.5.2 Vergleich von Organ-on-Chip Systeme mit konventionellen Modellen

Als Hauptanwendungsbereich von OOC Modellen wird die Arzneistoff- und Toxizitätstestung innerhalb von präklinischen Studien postuliert. Die Motivation hierfür ist dadurch begründet, dass konventionelle Systeme, Zellkultursystemen Tiermodelle, gegenüber OOC Systeme diverse Nachteile aufweisen [53, 108]. Sobald Zellen in artifiziellen 2D Monolayern kultiviert werden, fehlen ihnen mechanische und chemische Reize die durch Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt entstehen. Genauer gesagt, fehlt Ihnen die 3D Struktur, welche für einen physiologisch relevanten Phänotyp der Zellen entscheidend ist. Dies führt zu einer Änderung der Genexpression und einem künstlichen Phänotyp. Zusätzlich sorgen die großen Volumina an Medium für eine Verdünnung der sekretierten endokrinen Faktoren und Zytokinen (siehe Abbildung 4). In Bezug auf komplexere Systeme, ermöglichen 2D Kulturmethoden nur teilweise die Interaktion zwischen Gewebe und Gewebe oder zwischen verschiedenen Organen nachzuahmen.

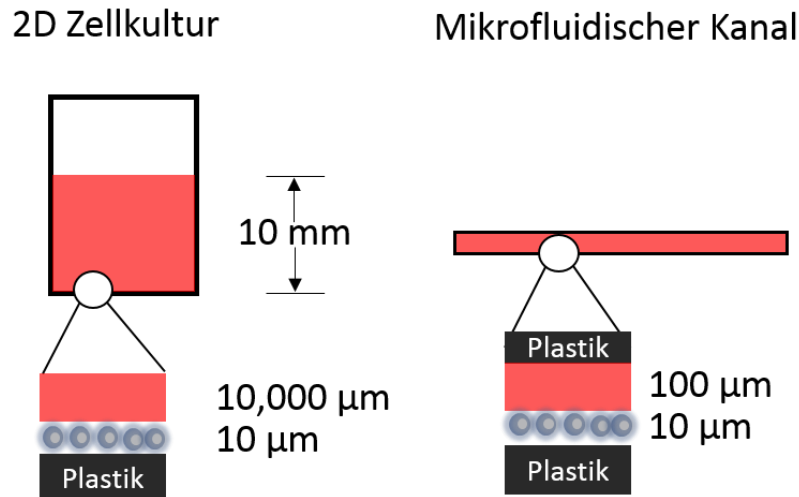


Abbildung 4 Dimensionierung von 2D Zellkultur und mikrofluidischen Kanal.
 Vergleich der Medienhöhe über den kultivierten Zellen in 2D Zellkultur und im mikrofluidischen Kanal.

Tierversuche im Allgemeinen sind im Vergleich zu OOC Systemen, teuer, kompliziert und zeitaufwendig. Auch wenn Tierversuche in bestimmten Bereichen unerlässlich sind, korrelieren diese in anderen Bereichen nicht mit den Ergebnissen die im menschlichen Körper zu erwarten sind. Tiermodelle lassen menschliche Krankheiten nicht richtig nachahmen, insbesondere wenn die Physiologie und Pharmakokinetik nicht übereinstimmen. In Folge dessen spiegeln die Ergebnisse aus Tierversuchen oftmals nicht die Reaktion auf Medikamente im Menschen wider. Da die Zirkulationszeit und der Blutfluss allometrisch mit der Körpergröße skalieren, verteilen kleinere Tiere Medikamente schneller auf das Zielorgan und eliminieren daher die Medikamente in kürzerer Zeit [109]. Obwohl es einige biochemische Ähnlichkeiten im Arzneimittelmetabolismus zwischen verschiedenen Spezies gibt, hat jede Spezies ihre eigenen einzigartigen Eigenschaften. Dies drückt sich vor allem in den signifikanten Unterschieden an der Menge von exprimierten CYPs aus. OOC im Gegensatz erlauben die Integration humaner Zelllinien oder humaner induziert pluripotenter Stammzellen (humaner iPSC), wodurch die zwischen verschiedenen Spezies auftretende Differenz im Genom umgangen werden kann.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das grundsätzliche Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung verbesserter Systeme zur Erfassung von Wirkstofftoxizität.

Im Rahmen dieser Zielsetzung war es nötig ein mikrofluidisches Zellkultivierungssystemen zu entwickeln und zu etablieren, welches die gleichzeitige Kultivierung verschiedener organ-spezifischer Zelltypen und die kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Nährstoffen gewährleistet. Des Weiteren musste die Geometrie der Zellkammern innerhalb der mikrofluidischen Plattformen angepasst werden, um den individuellen Bedürfnissen der kultivierten Zellen zu entsprechen. In diesem Rahmen entstanden in Zusammenarbeit mit Mikrofluidik ChipShop, Jena vier Chipdesigns. Verschiedene Zellkulturtechniken die in der 2D und 3D Zellkultur etabliert sind, mussten für die Kultur der Zellen innerhalb der mikrofluidischen Kammern entwickelt und optimiert werden. Innerhalb der entwickelten OOC-Plattformen wurden Zellen sowohl in 2D Monolayer, Kollagen Sandwich-Modellen als auch 3D-artigen Multilayer kultiviert.

Um die Funktionalität der kultivierten Zellen zu gewährleisten, entwickelte ich ein fluoreszenzbasiertes Testverfahren, welches es erlaubt die metabolische Aktivität innerhalb von lebenden Hepatozyten zu testen. Nach der Etablierung des Pumpsystems und der Entwicklung optimierter Plattformen sollte das System anschließend verwendet werden, um die physiologische Interaktion zwischen Leber- und Nierenzellen zu testen. Hierbei sollte nach der Bioaktivierung von Substanzen durch die Leber, entweder die Toxizität auf die Niere oder der konsekutive Metabolismus durch die Niere untersucht werden.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analytische Waage	Kern Abs, Berlin, Deutschland
Autoklav VX-95	Systemec, Puchheim, Deutschland
BIONAS 2500	Bionas, Rostock, Deutschland
Elektrophoresezelle	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
FACS Guavana	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop	KEYENCE, Neu Isenburg Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Herafreeze Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Hämozytometer	Marienfeld, Lauda, Deutschland
Incucyte System	Essen BioScience, London, UK
Immunoblot Transfergerät	Serva, Heidelberg, Deutschland
Inverses Mikroskop	Nikon Eclipse, Düsseldorf Deutschland
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kryo-Einfriergerät	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Multidrop System	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt Deutschland
Multikanalpipetten	Eppendorf, Wesseling Deutschland
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt Deutschland
pH-Meter	HANNA Instruments, Woonsocket, USA
Pipettierroboter	INTEGRA Bioscience, Biebertal, Deutschland
Pipette Boy	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
RotaVab	Büchi, Essen, Deutschland
Thermo-Schüttler	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Sterilbank	Ibs Tecnomara, Fernwald, Deutschland
TECAN Platten Reader	TECAN, Mänedorf, Schweiz
TECAN Platten Reader	TECAN, Mänedorf, Schweiz
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenofen	LabNet, Ried im Innkreis, Deutschland
Vakuumpumpe	INTEGRA Bioscience, Biebertal Deutschland
Vortex Genie 2 G-560E	Scientific Industrie, Bohemia, USA
Wasserbad	GFL, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5804R	Eppendorf, Wesseling Deutschland

2.1.2 Mikrofluidische Materialien

1 ml Microsyringe HT	ILS, Stützerbach, Deutschland
5 ml Microsyringe HT	ILS, Stützerbach, Deutschland
Flangless Fittings 1/16''	IDEX, Middlebore USA

Male Mini Luer fluid Connector	Microfluidic Deutschland	ChipShop,	Jena,
Male Mini Luer Plug – Low volumne displacer	Microfluidic Deutschland	ChipShop,	Jena,
Male Mini Luer Plugs	Microfluidic Deutschland	ChipShop,	Jena,
Mikrofluidische Plattform Lager Box	Microfluidic Deutschland	ChipShop,	Jena,
Mini Luer to Luer adapter	Microfluidic Deutschland	ChipShop,	Jena,
Mini Luer to pipette adapter	Microfluidic Deutschland	ChipShop,	Jena,
neMESYS Niederdruck Spritzenpumpen 290N	Cetoni GmbH, Korbussen, Deutschland		
neMESYS Basismodul BASE 120	Cetoni GmbH, Korbussen, Deutschland		
PEEK Schläuche 1/16'' OD 1/32'' ID	Elveflow, Paris, Frankreich		
Silikon Schläuche 0,5 x 1x 2,5 mm	Elveflow, Paris, Frankreich		

2.1.3 Chemikalien

1,3-Diphenyl-1,3-propanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Bromoethylaminhydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acetaminophen	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acetazolamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aflatoxin B1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Allopurinol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
APS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Zentralbereich Uni Heidelberg, Deutschland
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Coffein	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Curcumin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SybrGreen	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Schwefelsäure (96%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70%	Zentralbereich Uni Heidelberg, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrocortison 21-hemisuccinat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natrium Salz	
Indigo	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isoniazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Zentralbereich Uni HD
Kollagen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR, Radnor, USA
Miconazol	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Omeprazol	LKT Laboratories, Saind Paul, USA
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylbutazon	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rifampicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rotiphorese Acrylamid Mix	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SRB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Qiagen, Venlo, Niederlande
Tryptamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween	VWR, Radnor, USA
Urea	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
B-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrocortisone-Hemisuccinate	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen (T25, T75, T125)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Rundboden Mikrotiterplatten (96er)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Steril Filter (0,33 µM)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Parafilm	Plastic Packaging, Chicago, USA
PVDF Membran	Milipore, Eschborn, Deutschland
Handschuhe (Latex)	
Handschuhe (Nitril)	
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen (1 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Spritzen (50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Serologische Pipetten	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	TPP, Darmstadt, Deutschland
Zellsiebe (40 µm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
µ-slide 8 WLeII	Ibidi, Planegg, Deutschland

2.1.6 Kommerzielle Kits und fertige Lösungen

Albumin Elisa	Bethyl-Labatories, Montgomery, USA
Urea Detektionskit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.7 Zelllinien

HepG2	ATCC, Manassas, USA	
Hek293	ATCC, Manassas, USA	
HepaRG	HepaRG, Paris, Frankreich	
LSEC	-	
Caco-2	ATCC, Manassas, USA	
HL60	ATCC, Manassas, USA	
RPTEC	ATCC, Manassas, USA	
LX-2	ATCC, Manassas, USA	
Upcyte Hepatozyten	Upcyte technologies,	Hamburg, Deutschland

2.1.8 Zellkultur Medien und Supplemente

Williams E Medium	Thermo Fisher Scientific,	Darmstadt, Deutschland
DMEM, high Glucose, GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific,	Darmstadt, Deutschland
DMEM, high Glucose, no phenol red	Thermo Fisher Scientific,	Darmstadt, Deutschland
10x DMEM	BioConcept, Allschwil,	Schweiz
RPMI Medium 1640 GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific,	Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific,	Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific,	Darmstadt, Deutschland
Puromycin Dihydrochloride	Thermo Fisher Scientific,	Darmstadt, Deutschland
Upcyte Hepatocyte Medium	Upcyte technologies,	Hamburg, Deutschland
Upcyte LSCEC Culture Medium	Upcyte technologies,	Hamburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrofluidischer Aufbau

Das verwendete mikrofluidische System, welches von mir während der praktischen Arbeit zu dieser Thesis aufgebaut, entwickelt und für verschiedene Applikationen verwendet wurde, bestand aus einem Basismodul und sechs Niederdruck Spritzenpumpen Modulen der Firma Cetoni. Das integrierte 3-2-Wege Y-förmige Ventil (siehe Abbildung 5) ermöglicht die spritzen- und schlauchwechselfreie Medienaufnahme und Medienabgabe. Die Verwendung der beiden 2-Wege des Y-Ventils wurde konstant gehalten, der linke Weg diente zur Medienaufnahme, der rechte Weg zur Medienabgabe. Mittels einem 1/16“ Flangless Fitting wurden die PEEK Schläuche (Elveflow, Paris, Frankreich) mit dem Ventil verbunden. Für die Medienaufnahme habe ich eine Schlauchlänge von 35 cm, für die Medienabgabe eine Schlauchlänge von 120 cm gewählt, womit sich ein Totvolumen von 107 μL beziehungsweise 368 μL ergab. Zur Verbindung der Schläuche wurde ein Male Mini Luer fluid Connector (microfluidic ChipShop, Jena, Germany) verwendet, um diesen mit dem PEEK Schlauch zu verbinden wurde ein kurzes Stück Silikonschlauch (Elveflow, Paris, Frankreich) jeweils beidseitig mit PEEK Schlauch und Adapter verklebt (siehe Abbildung 5). Jedes Pumpenmodul wurde mit einer Glaspräzisionspritze (ILS, Stützerbach Deutschland) ausgestattet. Glas wurde als Material Edelstahlspritzen vorgezogen, um eventuelle Kontaminationen frühzeitig zu erkennen. Zur Steuerung der Pumpen wurde die von Cetoni bereitgestellte Software neMESYS User Interface verwendet (siehe Abbildung 6). Die Software erlaubt die individuelle Ansteuerung der einzelnen Spritzenmodule, Übersicht über das aktuelle Spritzenvolumen, die Regelung der Flussgeschwindigkeit und die Verwendung verschiedener Flussprofile.

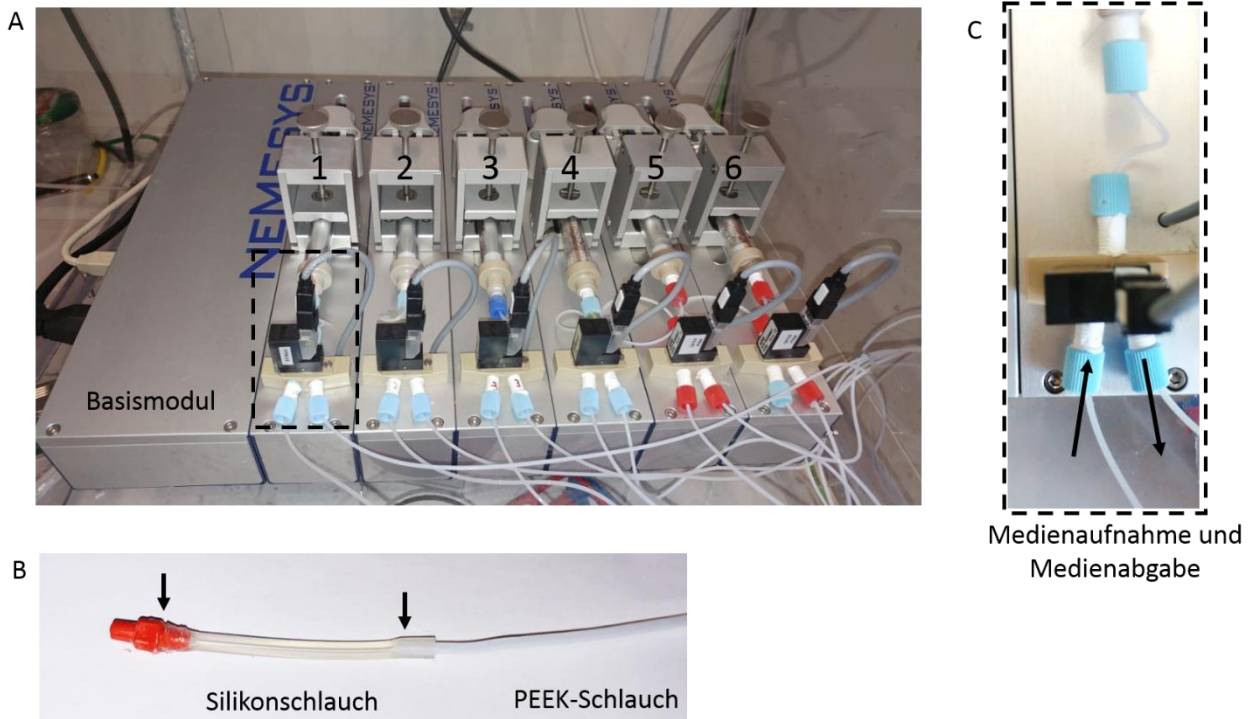


Abbildung 5 Aufbau des Pumpsystems.

Übersicht über den mikrofluidischen Pumpaufbau. A: Die Mikrofluidische Pumpe bestehend aus dem Basismodul, welches in direkter Verbindung mit einem Computer und dem Steuerprogramm steht und sechs Pumpenmodule, welche individuell angesteuert werden können. B: Die Schlauchverbindung zwischen PEEK-Schlauch und Miniluer Adapter durch einen Silikonschlauch, die Pfeile markieren die verklebten Stellen. C: Detaillierte Ansicht des Y Ventils, Pfeile zeigen die designierten Wege der Medienaufnahme und Medienabgabe.

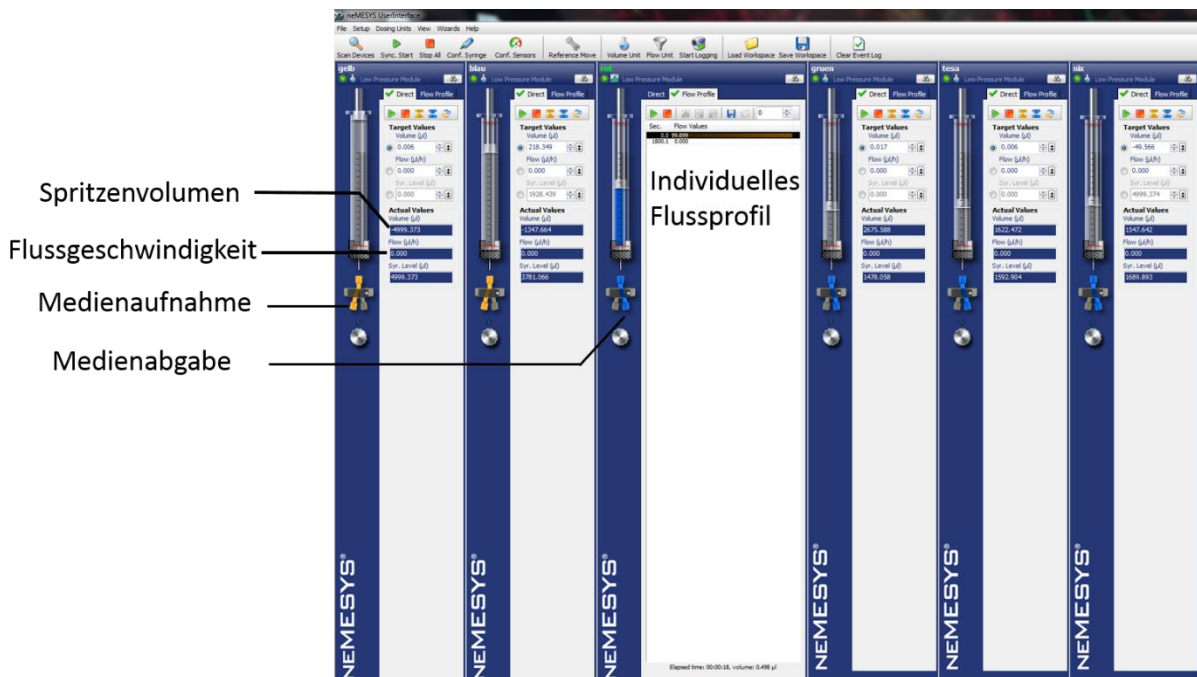


Abbildung 6 Software des Pumpsystems.

Nemesis Software der Firma Cetoni. Die Software dient der individuellen Ansteuerung der

Pumpen, die Grafik zeigt die verwendeten sechs individuellen Pumpen mit verschiedenen Flussgeschwindigkeiten und Volumina. Pumpe drei zeigt die Einstellungen für ein diskontinuierliches Flussprofil.

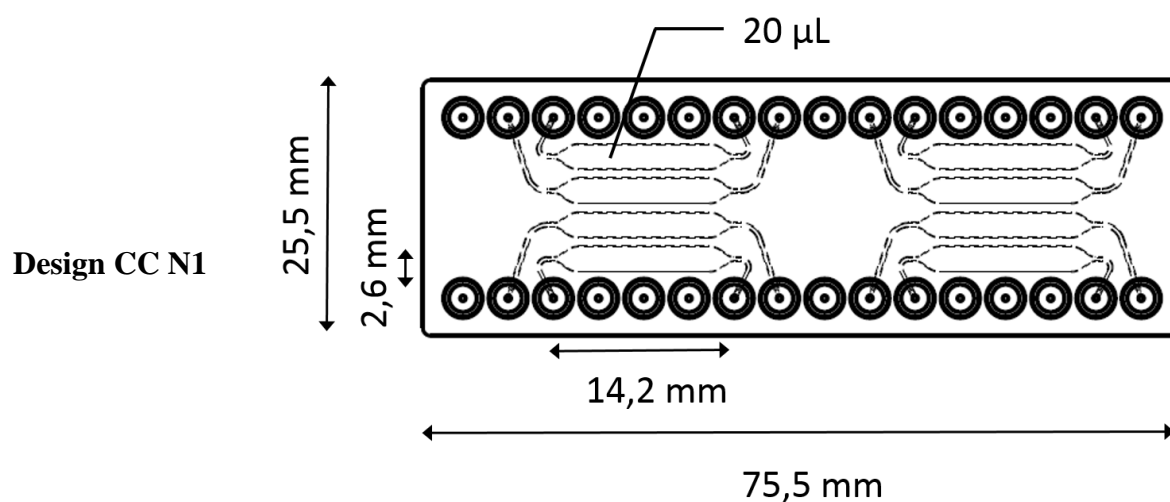
Chipdesign

Im Verlauf der Thesis wurden verschiedene Chipdesigns entwickelt, optimiert und verwirklicht (siehe Tabelle 3).

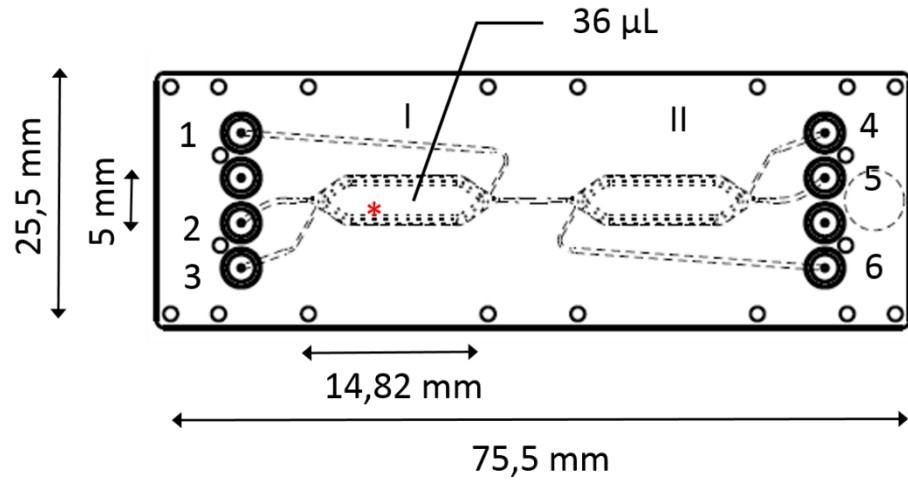
Tabelle 3 Auflistung der verwendeten mikrofluidischen Plattformen.

Name	Abkürzung	Anwendung
ChipShop qTLR-getrennt_131127 8 Fluidiknummer 478	Design CC N1	Initiale Studien VividDye-Projekt
ChipShop Systox Catridge_I Fluidiknummer 338	Design CC N2	Aflatoxin-Projekt Vitamin D ₃ Projekt
ChipShop Systox Catridge Fluidiknummer 710	Design CC N2b	-
ChipShop Systox Catridge Fluidiknummer 737	Design CC N3	Leber-Nieren Reporter
ChipShop MOTiF Design Fluidiknummer 653	Design CC N4	Leber-Colon-Projekt
VVLSLL-on-chip	Design S 1	Projekt 3D Leberläppchen

Tabelle 4 Grafische Darstellung der verschiedenen Chipdesigns.

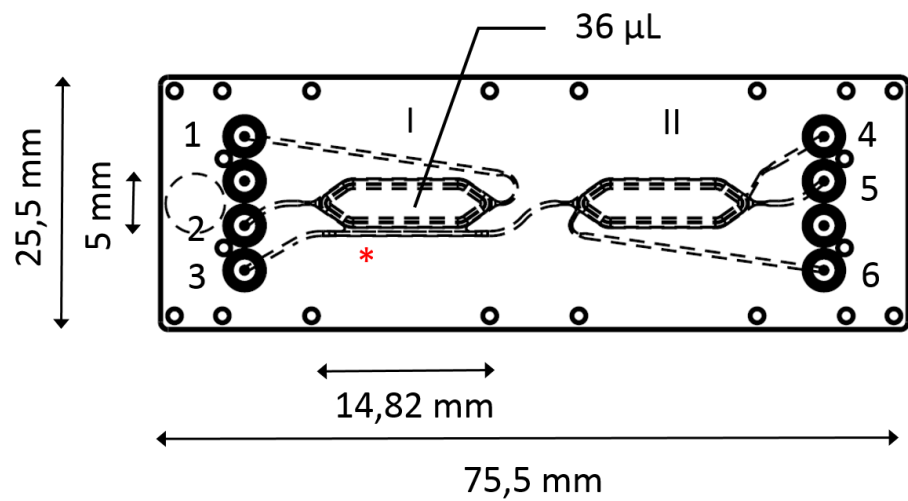


Design CC N2



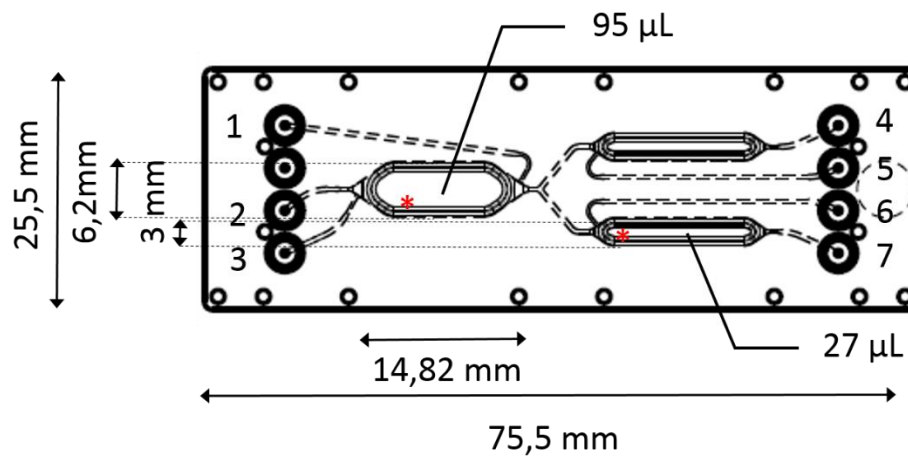
* Diffusionsdamm

Design CC N2b

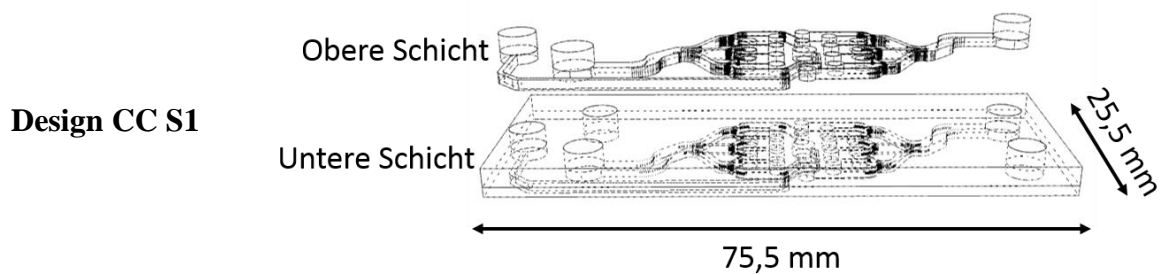
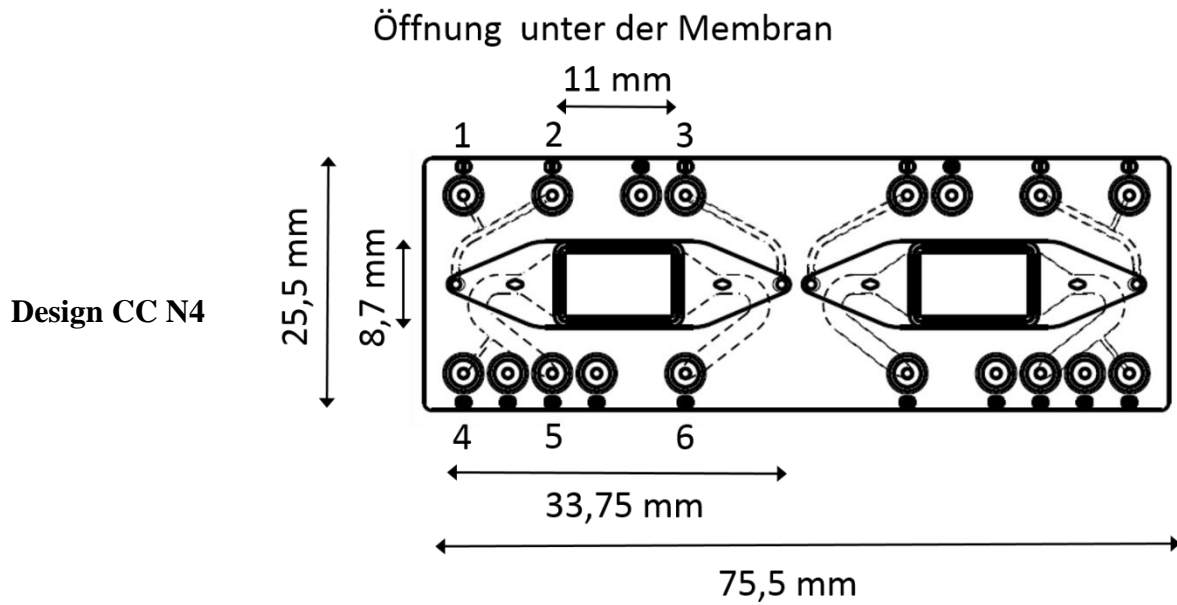


* Fluidischer Beipass

Design CC N3



* Diffusionsdamm



Design CC N1

Initial wurde von microfluidic Chipshop ein 8-Kammer System (Design CC N1) mit jeweils einem Ein- und Ausgang bereitgestellt. Die Zellen konnten beidseitig in die Kammer gesät werden. Das Design zeichnete sich durch eine einfache Handhabung und die Möglichkeit der Parallelisierung aus. Während der experimentellen Durchführung wurden die Nachteile des Systems ersichtlich, namentlich die Anfälligkeit zur Ausbildung von Luftblasen in dynamischer Kultur.

Design CC N2

Da Zellen in der Leber keinen direkten Scherstress erfahren, sondern durch die endotheliale Barriere geschützt sind, wurde Design CC N1 angepasst. Hierfür wurde ein Diffusionsdamm mit einer Höhe von 200 μM an Rand der Zellkulturfläche integriert. Neben dem Schutz der

Zellen vor direktem Scherstress diente dieser Damm als Luftblasenfalle. Um die Interaktion zweier Organe nachzuahmen wurden zunächst zwei baugleiche Kammern zentral miteinander verbunden.

Design CC N2b

Leber- und Nierenzellen sind im Körper verschiedenen fluidischen Konditionen ausgesetzt. CC N2b sollte die unterschiedlichen mechanischen Einflüsse auf die Zellen nachahmen und wurde als Weiterentwicklung des CC N2 Design erstellt. Die zwei Kammern wurden in Leber- und Nierenkammer unterteilt. Wie in Design CC N2 wurde der Diffusionsdamm integriert. Ein fluidischer Beipass sollte eine diffusionsbasierte Medienversorgung der linken Kammer (Leberkammer) ermöglichen. Die rechte Kammer (Nierenkammer) sollte eine direktere Scherung erfahren. Die Integration eines "Phase-Guides" führte nicht zur gewollten diffusionsbasierten Medienversorgung der Leberzellkammer, sondern zu einer unkontrollierten fluidischen Verteilung. Somit konnte der kontrollierte Austausch der Metaboliten nicht garantiert werden, wodurch das System nicht den gestellten Anforderungen entsprach. Das Chipdesign wurde nach initialer Testung verworfen.

Design CC N3

Design CC N3 stellt einen alternativen Ansatz zur Verwirklichung unterschiedlicher mechanischer Einflüsse auf Zellen dar. In diesem Design wurde die Geometrie der mikrofluidischen Zellkammer so verändert, dass ein unterschiedlich schneller Fluidfluss und somit ein unterschiedlich hoher Scherstress entsteht. Für das Volumen der Leberkammer wurden 97 μL , für das der Nierenkammer 27 μL gewählt, wodurch ein ca. 2-fach höherer Fluidfluss in der Nierenkammer entstand. Das Design enthält außerdem zwei individuelle Nierenkammern, was die Kultivierung unterschiedlicher Zellen erlaubt.

Design CC N4

Wie in der Einleitung beschrieben unterscheidet man OOC welche Diffusionsbarrieren und Membranen verwendet. Design CC N4 stellt eine membran-basierte Plattform dar. Die Kammer kann als zwei verschiedene Ebenen angesehen werden, welche durch eine poröse Membran getrennt sind. Dieses Design ermöglicht die Kultur verschiedener Zelltypen auf

gegenüberliegenden Seiten der Membran. Im Zuge dieser Thesis wurden Colonzellen auf der Membran und Leberzellen unter der Membran kultiviert. Ein unterschiedlich schneller Medienfluss konnte auf beiden Seiten der Membran angelegt werden, um den physiologischen Bedingungen zu entsprechen.

Design S 1

Der genaue Aufbau, die Fertigung und die Testung von Design S 1 ist unter [107] zu finden. Design S 1 ist ein zweilagiges System, in dem Zellen über die obere Ebene ins System gesät und in der unteren Ebene kultiviert werden können. Das Design besteht aus 18 hexagonalen Strukturen, welche in Größe und Form humane Leberläppchen nachahmen. Zentral in jeder hexagonalen Struktur befindet sich eine Öffnung, die die untere und obere Ebene verbindet. Diese Öffnung hatte zwei Funktionen: Säen der Zellen und spätere Medienentnahme, ähnlich wie es in der Leber über die Zentralvene geschieht. An den Seiten jeder hexagonalen Struktur befindet sich eine doppelte blockbasierte Diffusionsbarriere, die die Zellen von der Scherung des Medienflusses in den umliegenden Fluidkanälen schützt.

Mikrofluidische Zellkultur

Die mikrofluidische Zellkultur weist im Vergleich zu konventionellen 2D Zellkultur einige Herausforderungen auf. Vor allem die Aussaat von Zellen erweist sich als schwierig, was der geschlossenen Natur der Plattformen geschuldet ist.

Vor der Aussaat der Zellen wurden Design CC N1- CC N3 mit einer dünnen Kollagenschicht beschichtet. Hierfür wurde 0,2% Kollagen R Lösung im Verhältnis 1:3 mit PBS gemischt und in Chips pipettiert. Um eine blasenfreie Beschichtung zu gewährleisten, ist es wichtig die Pipettenspitze orthogonal zum Eingang der mikrofluidischen Plattform zu halten. Die beschichteten Plattformen wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, was zur Ausbildung einer dünnen polymerisierten Schicht an Kollagen führte, anschließend wurde die restliche Mischung abpipettiert und die Plattformen mit PBS gewaschen. Design CC N4 konnte aufgrund der porösen Membran nicht mit Kollagen beschichtet werden.

Das Verfahren, welches zur Zellaussaat verwendet wurde war vom jeweiligen Chipdesign abhängig. Im Falle von CCN2 CNN 2b und CCN 3 wurden die Zellen einzeln in die unterschiedlichen Zellkammern gesät, was auch die Kultur verschiedener Zelltypen auf einem Chip ermöglichte (siehe Abbildung 7). Um beispielweise die linke Kammer auf Chip Design CC N2 zu säen, wurden Adapter 3,4,5 und 6 mit Male Mini Luer Plug – Low volume displacer

(microfluidic ChipShop, Jena, Deutschland) verschlossen und die Zellsuspension über Adapter 1 gesät (siehe Tabelle 4). Analog wurden um die rechte Kammer zu säen Adapter 1-4 verschlossen. Im Falle von CC N3 wurde für die linke Kammer das oben beschriebene Verfahren verwendet, die beiden rechten Kammern wurden über Adapter 5 und 6 befüllt. Um die Ausbildung von Luftblasen in Design CC N4 zu verhindern, war es essenziell zuerst die untere Kammer des Chips zu befüllen. Hierfür wurden Adapter 1-4 verschlossen und die Zellen über Adapter 5 gesät für die obere Kammer wurden Adapter 1 + 4-6 verschlossen und über Kanal 2 gesät. Um einen konfluenten Monolayer an Zellen zu erhalten, wurden 2000 Zellen/ μL in die Zellkammer der Plattform gesät. Anschließend wurden die Chips für 4 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das Medium innerhalb der Plattformen vorsichtig durch frisches Medium ersetzt.

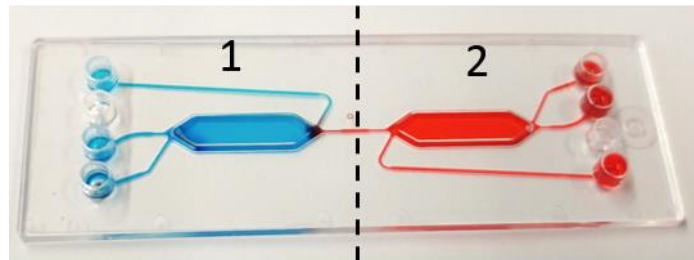


Abbildung 7 Aussaat in die Chipkammern.

Darstellung der individuellen Aussaat der Einzelkammer mit blauer und roter Lebensmittelfarbe.

Nach dem Medienwechsel wurden die mikrofluidischen Chips für 12 Stunden in statischer Kultur gehalten. Um eine ausreichende Medienversorgung der Zellen zu ermöglichen wurde das U-Rohr-Prinzip verwendet (siehe Abbildung 8). Hierfür wurden zwei 1 ml Spritzen in einer Höhe von 500 μl geschnitten und mittels Miniluer to Luer Adaptern mit dem Chip verbunden. Einer der beiden Spritzenadapter wurde mit 400 μl gefüllt, durch den Kräfteausgleich wurde ein langsamer Strom von einer zu anderen Seite erreicht.

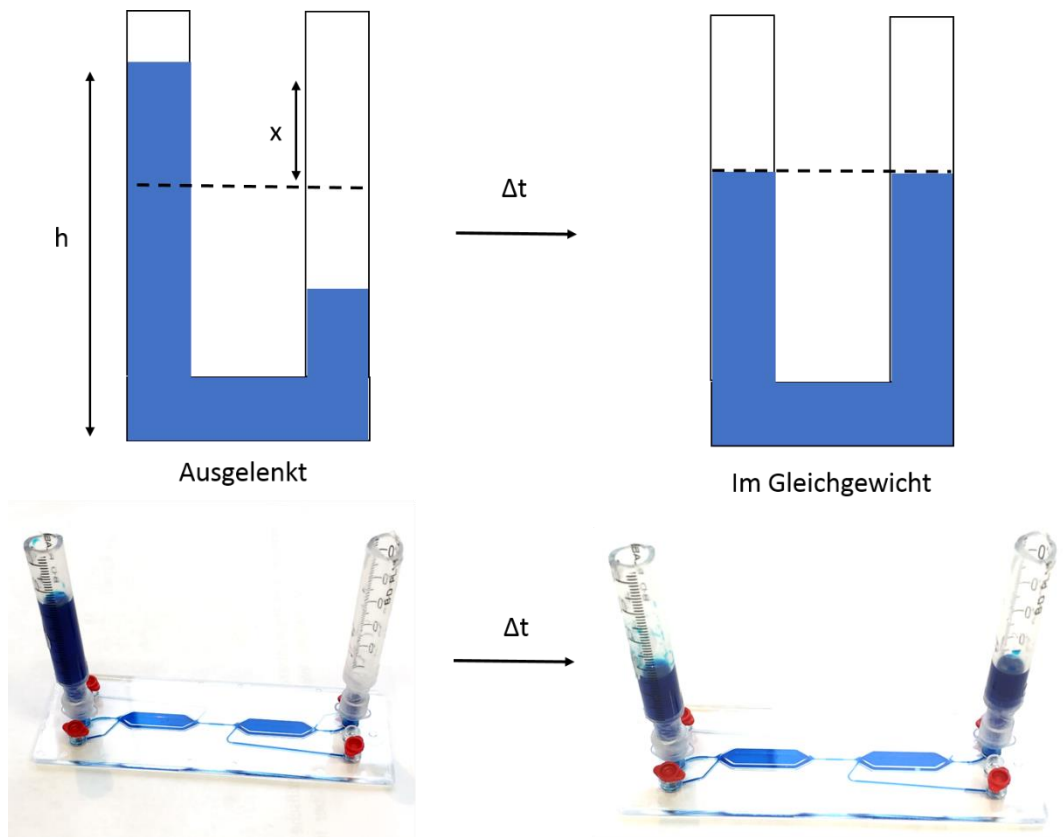


Abbildung 8 U-Rohr Prinzip im mikrofluidischen System.

Grafische Darstellung des Kräftegleichgewichts innerhalb eines U-Rohrs, welcher dem mikrofluidischen Chipaufbau entspricht. Ausgelenkt weist der Aufbau einen Höhenunterschied x auf, der für einen Fluidstrom sorgt, der das Kräftegleichgewicht herstellt. Zur besseren Sichtbarkeit wurde blaue Lebensmittelfarbe statt Zellkulturmedium verwendet. Diese wurde in eine der beiden Spritzenadapter (rechts) pipettiert, links zeigt denselben Chip nachdem sich das Kräftegleichgewicht eingestellt hat, die Medium Füllhöhe h in beiden Spritzenadaptern ist identisch.

Um die Chips an die mikrofluidische Pumpe anzuschließen wurden einer der beiden Spritzenadapter entfernt. Der Schlauch wurde mittels "wet fitting" mit dem Chip verbunden und der Fluidfluss gestartet. Initial wurde ein hoher Fluidfluss von $500 \mu\text{l/h}$ für 1-2 Minuten angelegt um den Fluidfluss in den Chip zu garantieren. Die Flussgeschwindigkeit und das Flussprofil wurden je nach verwendetem Zelltyp, Chipdesign und der Fragestellung angepasst. Im Allgemeinen wurde ein konstanter Medienfluss zwischen $5\text{-}35 \mu\text{l/h}$ und ein diskontinuierlicher Fluss mit $100\text{-}200 \mu\text{l/h}$ angelegt. Im diskontinuierlichen Fall wurden Fluss- und Ruhezeiten individuell angepasst.

2.2.2 Fluoreszenzbasierter Test zum Nachweis der CYP450 Aktivität – Der VividDye Test

Wie in der Einleitung beschrieben ist der Nachweis von CYP-Arzneistoffen-Interaktion ein wichtiger Bestandteil der Medikamentenentwicklung. Hierfür wurde ein neuartiger Test mithilfe von VividDye-Substraten entwickelt [24]. Der Test wurde von mir für die Evaluierung der CYP-Aktivität in lebenden Zellen entwickelt, etabliert und unter verschiedenen Zellkulturbedingungen getestet. Er dient der Bestimmung der CYP-Aktivität nach Zugabe von xenobiotischen Substanzen, der mikroskopischen Analyse der CYP-Aktivität auf Einzelzelllevel und zur kontinuierlichen Überprüfung während Zelldifferenzierung und Zelldedifferenzierung. Zur Etablierung des Tests wurden vier verschiedene VividDye-Substrate getestet, namentlich BOMCC, EOMCC, BOMR und OOMR. VividDye-Substrate werden nach metabolischer Spaltung fluoreszent, wobei bei BOMCC und EOMCC 7-Hydroxycumarin (blau fluoreszierend) und bei BOMR und OOMR Resorufin (rot fluoreszierend) als Abspaltungsprodukt entsteht (siehe Abbildung 9). Alle verwendeten VividDye Substrate wurden in Acetonitril rekonstituiert, im Fall von OOMR wurde das Substrat zunächst 4 Minuten bei 50°C inkubiert. Die gelösten VividDye Substrate wurden bei -20°C gelagert.

Da verschiedene VividDye-Substrate nach Abspaltung unterschiedliche Fluoreszenz aufweisen wurden im Mikrotiterplatten Lesegerät zwei verschiedene Filterset Einstellungen genutzt (siehe Tabelle 5):

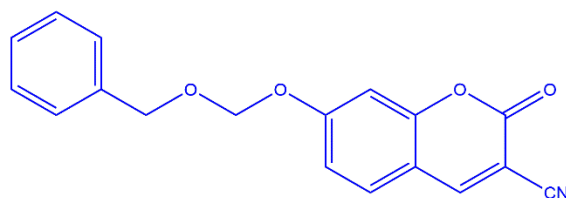
Tabelle 5 Verwendete Wellenlängen für Extinktion und Emission im Mikrotiterplatten Lesegerät für die VividDye Abspaltungsgruppen.

	Rot		Blau	
Extinktion Emission	Absorptions- maximum (nm)	Bandbreite (nm)	Absorptions- maximum (nm)	Bandbreite (nm)
Extinktion	550	12	415	20
Emission	590	12	460	20

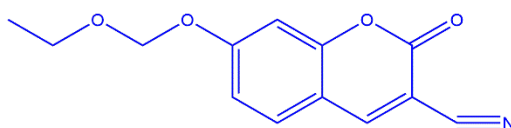
Für die Nutzung der VividDye Substrate in Kombination mit einem Fluoreszenzmikroskop mussten die verwendeten Wellenlängen, der kommerziell erwerblichen Filtern und dichroitischen Spiegeln angepasst werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Verwendeter Filteraufbau im fluoreszenten Mikroskop zur Analyse der VividDye Abspaltungsgruppen.

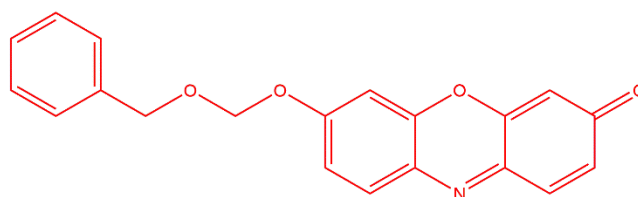
	Rot	Blau
Anregungsfilter	530/30x nm	420/20x nm
Dichroitische Spiegel	556 nm	435 nm
Emissionfilter	590/33x nm	460/36x nm



Vivid BOMCC substrate



Vivid EOMCC substrate



Vivid BOMR substrate

Abbildung 9 Struktur der Vividdye-Substrate.

Struktur der VividDye Substrate BOMCC, EOMCC und BOMR. Die Farben zeigen die Fluoreszenzfarbe nach Spaltung.

Zur Testung des Effekts der Wirkung von xenobiotischen Substanzen auf die CYPs wurden Kinetik Messungen mithilfe eines Mikroplattenreaders durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst in konfluenten Monolayern $3.5 \cdot 10^4$ Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfchen für 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen Wirkstoffen behandelt, deren Effekt auf die CYP-Enzyme nachgewiesen werden sollte für 24 Stunden inkubiert. Das Medium wurde verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch eine Lösung von $1 \mu\text{M}$ VividDye-Substrat in Zellkulturmedium ersetzt. Die Messung des kinetischen Verlaufs wurde direkt nach Zugabe der VividDye-Lösung gestartet und mittels Mikrotiterplatten Lesegerät verfolgt. Das Mikrotiterplatten Lesegerät wurde auf 37°C vorgeheizt, alle drei Minuten fand die Messung eines kinetischen Zyklus statt. Für jeden Test wurden zwei negativ Kontrollen:

unbehandelte Zellen ohne VividDye-Substrat und Zellen ohne Arzneistoffbehandlung mit VividDye Substrat, sowie eine positiv Kontrolle: Zellen die mit 20 nM TCDD behandelt verwendet.

Zur Testung des Einflusses der verwendeten Zellkulturbedingungen auf die CYP-Aktivität wurden Zellen in 2D Monolayer, im Kollagensandwich und in einer Co-Kultur aus Hepatozyten und Leberendothelien in Mikrotiterplatten mit 24 Nöpfchen kultiviert. Zur Bestimmung der CYP-Aktivität wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und 1 μ M VividDye Substrat in Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach 2 Stunden wurde der Zellkulturüberstand in eine Mikrotiterplatte mit 96 Nöpfchen pipettiert und mittels Mikroplattenlesegerät vermessen. Im Vergleich zu der oben beschriebenen Methode handelt es sich hierbei um eine Endpunktmessung.

Zur Integration des VividDye-Tests in das mikrofluidische System wurden Zellen, wie oben beschrieben auf den Chips kultiviert. Zur Durchführung des Testes wurde dem Zellkulturmedium 1 μ M VividDye-Substrat zugefügt und mithilfe des Pumpsystems für 2 Stunden durch die Chips gepumpt. Wie oben beschrieben wurde die Fluoreszenz im Eluat mittels Mikrotiterplattenlesegeräts bestimmt.

2.2.3 Zellkultur

Verschiedene parenchymale Leberhepatozyten HepG2, HepaRG und upcyte Hepatozyten, sowie nicht-parenchymale Leberendothelien (HLEC) und Lebersternzellen (LX-2) wurden verwendet. Zur Nachahmung der Niere wurden Hek293 und RPTEC, zur Nachahmung des Colons Caco-2 Zellen benutzt. Die Auflistung der Distributoren der Zelllinien ist in Tabelle 2.1.7 zu finden. Die adhärenen Zelllinien HepG2, Hek293, LX2, HLEC, RPTEC wurden in DMEM Glutamax ergänzt mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert. HL60 Zellen wurden in Suspension in RPMI 1640 Glutamax, mit 10% FCS und 1% PS. HepaRG Zellen wurden in ihrem Proliferationsmedium bestehend aus Williams E Medium, supplementiert mit 10% FCS, 1%PS, 2mM L-Glutamin, 5 μ g/ml Insulin, 50 μ M Hydrocortisone-Hemisuccinate kultiviert. Zur Differenzierung der HepaRG Zellen wurde dem Proliferationsmedium 1,5 % (V/V) DMSO hinzugefügt. Für die upcyte Hepatozyten wurde das spezielle vom Hersteller bereitgestellte Medium verwendet. Alle Zelllinien wurden bei 37°C in angefeuchteter Luft mit einem CO₂ Anteil von 5%(V/V) kultiviert. Die Subkultivierung der Zellen wurde entsprechend der Verdopplungszeit und je nach Konfluenz der Zellen durchgeführt.

Kryokonservierung der Zellen

Um eine konstante Passagenzahl der Zellen über den gesamten experimentellen Zeitraum zu gewährleisten, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen kryokonserviert. Hierfür wurde eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml verwendet. Das Kryokonservierungsmedium bestand aus dem Standard Kulturmedium der Zellen plus zusätzlichen 10% (V/V) DMSO. Die Zellen wurden in ein Kryo-Einfriergerät überführt und bei -80°C gelagert.

Auftauen kryokonservierter Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryo-Röhrchen bei 37°C langsam erwärmt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in 10 ml Zellkulturmedium überführt und für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet resuspendiert. Die Viabilität und Zellzahl wurde mittels Hämozytometer bestimmt und die Zellen wurden entsprechend ausgesät.

2.2.4 RNA Isolation aus Zellen

Zur Isolierung der RNA aus lebenden Zellen wurde die Trizolmethode verwendet. Im Folgenden wird die verwendete Methode für konventionelle Zellkultur auf 6 Näpfen Platten und die angepasste Methode für die Isolation von RNA aus Chipplattformen beschrieben.

Statische Zellkultur Methode

Das Kulturmedium wurde von den Zellen abgesaugt und diese wurden mit 2 mL PBS gewaschen. PBS wurde abgesaugt, 150 μL Trizol (Qiagen, Venlo, Niederlande) auf die Zellen pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mithilfe einer Pipettenspitze vom Plattenboden vollständig abgelöst und die gesamte Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppi überführt. 40 μL Chloroform wurden dem Eppi hinzugegeben und das Gemisch wurde für 15 Sekunden gevortext. Die Suspension wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatten sich 3 Phasen gebildet, die obere wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein frisches Eppi überführt. 100 μl Isopropanol wurde dazu pipettiert, vorsichtig invertiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 12000 g bei 4°C

zentrifugiert. Der Flüssige Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet weiterverwendet. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen und nach jedem Waschschrift 5 Minuten bei 7000g bei 4°C zentrifugiert. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde Ethanol verworfen und das Pellet für 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µL RNase-freien Wasser gelöst und mit dem Nanodropsystem vermessen.

Mikrofluidische Plattform Methode

Die Chipplattformen wurden mehrmalig mit PBS gewaschen anschließend wurde das 1,5-fache Kammervolumen an Trizol in den Chip pipettiert und für 3 Minuten inkubiert (längere Inkubationszeiten hatten die Zersetzung des Chips zur Folge). Hierbei wurden jeweils nur ein Einlass und ein Auslass geöffnet die restlichen Adapter wurden verschlossen. Wie unter **Mikrofluidische Zellkultur** beschrieben war es somit auch möglich die Zellen nur aus einer individuellen Kammer zu lösen. Durch mehrmaliges resuspendieren des Trizol in der Kammer wurden die Zellen abgelöst, die Zellsuspension wurde in ein Eppi überführt. Anschließend wurde die Kammer nochmal mit Trizol gespült. Die nächsten Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 µL RNase-freien Wasser gelöst und mit dem Nanodropsystem vermessen.

2.2.5 cDNA Synthese aus RNA

cDNA wurde mithilfe des PhotoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) synthetisiert. Hierfür wurden 1000 ng RNA in einem Volumen von 5 µl verwendet und mit 2 µl d(T)₂₃ und 1 µl Random Hexamer Primer gemischt. Die Probe wurde für 5 Minuten bei 65°C denaturiert, abzentrifugiert und direkt auf Eis gestellt. 10 µL ProtoScript II Reaction Mix(2x) und 2 µL ProtoScript II Enzyme Mix(10x). Die 20 µl Gesamtvolumen wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde die Probe für 5 Minuten bei 80°C inkubiert. Die Lösung wurde 1:10 in RNase freien Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.6 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR)

Zur Durchführung der qPCR wurden ein Primer-Mix und ein Master-Mix erstellt. Für den Primer-Mix wurden 10 µl forward Primer und 10 µl reverse Primer (Konzentration 100 pmol/µL) mit 180 µl RNasefreien Wasser gemischt. Der Master Mix Bestand 2,5 µl SYBR

Green, 0,5 μ l RNase freiem Wasser und einem 1 μ l Primer-Mix. 1 μ L verdünnte cDNA und 4 μ l Master-Mix wurden in jedes Nöpfchen der qPCR-Platte pipettiert und die Platte wurde für 1 Minute bei 2000 rpm zentrifugiert. Zur Durchführung der qPCR wurde ein qTower (AnalyticJena, Jena, Deutschland) benutzt. Folgendes Programm wurde verwendet:

	Schritt	°C	Zeit
45x	1	95	5 Minuten
	2	95	10 Sekunden
	3	60	10 Sekunden
	4	72	20 Sekunden

Eine Liste aller verwendeten Primer und der zugehörigen Gene ist in Tabelle 7 zu finden.

Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten RT-qPCR Primer mit Gen Name, Forward und Reverse Primer

Gen Name	Forward Primer	Reverse Primer
hABCC2	AGAGCTGGCCCTTGTACTCA	AGGGACAGGAACCAGGAGTT
hAFP	AGACATCCTCAGCTTGCTGT	AATGCTTGGCTCTCCTGGAT
hAhR	CTGCCTTTCCACAAGATGT	AGTTATCCTGGCCTCCGTTT
hAhRR	AGCGGAGATGAAAATGAGGA	AGTTCCGATTTCGCACAGACT
hAIP	TGCTCAACTACTGCCAGTGC	GCTTGAAGTAGGCCTTGACG
hAIPL1	GGAGGCCTCTTCCAAGTACC	CAGGCACTGGCAGTAGTTGA
hALB	TATGCCCCGGAACCTCTTTT	TGGCACACTTGAGTCTCTGT
hANGPTL4	CACAGCCTGCAGACACAACCT	AAACTGGCTTTGCAGATGCT
hAREG	AAGCGTGAACCATTTTCTGG	AGCCAGGTATTTGTGGTTCG
hARNT	CTAGTGGCCATTGGCAGATT	CAATGTTGTGTCGGGAGATG
hARNT2	ATCATCTGCACCAACACCAA	GGGGACCTGGGATAAGTCAT
hARNTL	AATAGGCCGAATGATTGCTG	TCTTCTTGCCTCCTGGAGAA
hARNTL2	AATGGGGGAGCTAGAGGCTA	CATTGTCACATAGGGCATCG
hATF3	TCGGAGAAGCTGGAAAGTGT	TCTGGAGTCCCTCCATTCTG
hBCHE	AAGCTGGCCTGTCTTCAAAA	CCACTCCCATTCTGCTTCAT
hCCNA2	CATGGACCTTACCAGACCT	CTCTGGTGGGTTGAGGAGAG
hCD11b	TTCCAGAACCAGCGCTCACA	TGAGTTTTCCGGAAGATGGG
hCD14	CCCTCAATCTGTCGTTTCGCT	ATCCCGTCCAGTGTCAAGT
hCDK1	GGTCAAGTGGTAGCCATGAAA	TCCTGCATAAGCACATCCTG
hCK18	GAAGGAGACCATGCAAAGCC	CCCTCAGGTCCTCGATGATC
hCLD-2	GCTTCTACTGAGAGGTCTG	TTCTTACACATACCCTG
hCLD-3	TGCTGTTTCTTCTCGCCGCC	CTTAGACGTAGTCCTTGCGG
hCLU	GGATGCCCTAAATGAGACCA	TCAGGCAGGGCTTACACTCT
hCYP1A1	CTTCCGACACTCTTCTTCG	GGTTGATCTGCCACTGGTTT
hCYP1A2	TCCAGAAGGAGCTGGACACT	AAGGAGGAGTGTGGAAGGT
hCYP1B1	AACCGCAACTTACGCAACTT	GAGGATAAAGGCGTCCATCA
hCYP24A1	TGGGGCTGGGAGTAATACTGA	GAACGCAATTTTCATGGGAGGC
hCYP27B1	CCCATCTCCACCTTGGTTT	TGGATGTTCCCACTACAGACA
hCYP2C9	CCACATGCCCTACACAGATG	TGCCCTTGGGAATGAGATAG
hCYP2D6	TGATGAGAACCTGCGCATAG	CCCTATCACGTCGTGATCT
hCYP2E1	CCTACATGGATGCTGTGGTG	TGGGGATGAGGTATCCTCTG
hCYP2R1	TCTTCGCGCTAGGGGTC	ATGAGGCTGCCAGGGAATAGA
hCYP3A4	ACCGTGACCCAAAGTACTGG	GTTTCTGGGTCCAATTCCAA
hEFEMP1	GAACAGCCTCAGCAGGAAAC	CGCCGGATGACAAAGTTATT
hFoxA2	CTACTCCTCCGTGAGCAACA	GACGACATGTTTCATGGAGCC

hGDF15	CTCCAGATTCCGAGAGTTGC	AGAGATACGCAGGTGCAGGT
hHAVCR1	TCACATCCATGTGCTGGAAT	CGTGTGTCCTTCCGATAGGT
hHERPUD1	CAAAGGAAAAACGGCATGTT	CCCTTTGCCTTAAACCATCA
hHMOX1	ATGACACCAAGGACCAGAGC	GTGTAAGGACCCATCGGAGA
hKIAA0101	ACAGAAAAGTGGTGGCTGCT	TGATCAGGTTGCAAAGGACA
hLAMC2	GGCTGGTCTTACTGGAGCAG	CATCAGCCAGAATCCCATCT
hLARP6	CTCTGACAGCAGCGTCACTC	GCCATGAAATCCTCTGGTGT
hLCN2	CAAGGAGCTGACTTCGGAAC	TACTGTTGCGATTGGGACA
hMAFF	TCTGTGGATCCCCTATCCAG	TCTGTGGATCCCCTATCCAG
hNQO1	GCACTGATCGTACTGGCTCA	TAGAGGTCCGACTCCACCAC
hOCLN	TCAGGGAATATCCACCTATCACTTCAG	CATCAGCAGCAGCCATGTACTCTTCAC
hPVALB	CCCCTGTGGCCCTCTAATG	CTGGAAAGCCAATGCCTGA
hSERPINA5	AACGCTGAGGAAGTGGCTTA	GACAGATCAGCATGGGAGGT
hSPP1	ACACATATGATGGCCGAGGT	CTTGAGCGCTAGTCAGAACC
hSRPX2	TACCACTGTGATGGCGGTTA	TATCGGTTGGAAGGATCAGG
hSRXN1	CATCGATGTCCTCTGGATCA	CTGCAAGTCTGGTGTGGATG
hTIMP1	TGACATCCGGTTCGTCTACA	TGCAGTTTTCCAGCAATGAG
hTMEM138	TCCCTTCATGTCTGGGTCAT	CGCCTAGTCTTACGGCTGTC
hTNFRSF12A	GACCGCACAGCGACTTCT	GTCTCCTCTATGGGGGTGGT
hTOP2A	AATCTCAGAGCTTCCCGTCA	TGCCTCTGCCAGTTTTTCTT
hUBE2C	GCATCAGAACCAGCTCAACA	GTTTCTGGCATTGGAGAAA
hZFAND2A	GGGGAAGCATTGTTTCAGAAA	TGGGATGGGGGTATTACAGA
hZO-1	CGGTCCTCTGAGCCTGTAAG	GGATCTACATGCGACGACAA

2.2.7 Proteinextraktion aus den Zellen

Nach entsprechender Behandlung der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Platte 3-mal mit eiskalten PBS gewaschen. Die Platte wurde auf Eis gestellt und 100 µl/Näpfchen Lysepuffer wurde direkt auf die Zellen gegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Lysepuffer bestand aus Harnstoff 6 M, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,5%, NaF 5 mM, Leupeptin 10 µg/ml, Pepstatin 10 µg/ml, PMSF 100 µM, Aprotinin 3 µg/ml, Na₄P₂O₇ 2,5 mM, Na₃VO₄ 1 mM in D-PBS (pH 7,2–7,4). Nach der Inkubation wurden nicht gelöste Zellen mit einer Pipettenspitze vom Plattenboden gelöst. Das Zelllysate wurde in 1,5 ml Eppis überführt und für 40 Minuten bei 4°C und 14000g zentrifugiert. DNA-Reste wurden abpipettiert und der Gesamtproteingehalt in den Zelllysaten wurde mittels Bradford-Test bestimmt. Das Zelllysate wurde bei -20°C gelagert.

2.2.8 Bradford Test

Der Bradford Test diente der Standardisierung der verwendeten Proteinmenge. Hierfür wurde 200 µL Probematerial mit 2 µL Bradford-Reagenz in einer Mikrotiterplatte mit 96 Näpfchen gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur im dunklen inkubiert. Anschließend wurde die

Absorption der Platte bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten Lesegerät vermessen. Eine BSA-Verdünnungsreihe diente zur Berechnung der Konzentrationen.

2.2.9 Immunoblot

Die Proteinextrakte wurden mit dem 5-fach-Gel-Ladepuffer 5:1 verdünnt und 5 Minuten lang bei 95°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Zur Auftrennung der Proteine wurde das Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Verfahren (SDS-PAGE) benutzt. Dazu wurde mithilfe des BioRad-Gelelektrophorese-Systems nach dem Protokoll des Herstellers 8 oder 10%tige Polyacrylamid-Gele (je nach Molekulargewicht der Zielproteine), bestehend aus Sammel- und Trenngel, hergestellt. Die Gelelektrophorese-Kammer mit dem Gel wurde mit dem SDS-PAGE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden in die Sammelgel-Taschen pipettiert und bei einer konstanten Spannung von 120 V 1,5 Stunden lang elektrophoretisch aufgetrennt. Als Protein Ladder zur Bestimmung der Proteingröße, diente PageRuler™ Prestained. Nach Abschluss der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF-Membran) mittels Semi-Dry-Transfervverfahren übertragen.

Hierfür wurden zunächst 6 Blottingpapierblätter auf die Größe der Membran zugeschnitten. Zur Überführung wurde ein "Sandwich" benutzt, 3 in Kathodenpuffer getränkte Blätter, eine PDVF-Membran, das Polyacrylamidgel und 3 in Anodenpuffer getränkte Blätter wurden hierfür gestapelt. Die Übertragung der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0,02 mA/cm² eine Stunde lang. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und anschließend für eine Stunde im Immunoblot-Blocking-Puffer bei Raumtemperatur und bei leichtem Schütteln geblockt. Die Membranen wurden in ein 50 ml Falcon überführt. Zur Detektion der Zielproteine wurden die Primärantikörper 1:1000 in Immunoblot-Blocking-Puffer verdünnt und für 12 Stunden bei 4°C unter konstanter Rotation inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal fünf Minuten mit TBS-Tween gewaschen und eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Zweitantikörper wurde 1:10000 in Blocking-Puffer verdünnt. Zur Detektion wurde ECL-Lösung auf die Membran pipettiert und die Chemolumineszenz-Signale mittels LAS 3000 Imaging System detektiert.

2.2.10 Bestimmung der Zytotoxizität auf Zellen

Die zytotoxische Wirkung der Testsubstanzen auf die verwendeten Zellen wurde mittels Sulforhodamin Test (SRB-Test), MTT-Test und Lebend/Tod-Färbung bestimmt. Der SRB-Test

dient zur Bestimmung der Zellreproduktion über die Gesamtproteinmenge, der MTT-Test testet die Zellfunktion über die mitochondriale Funktion, die Lebend/Tot-Färbung zeigt den Anteil der toten Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die gewählte Zelldichte starken Einfluss auf die ermittelte toxische Wirkung der Substanz hat und somit über den Verlauf der Arbeit konstant gehalten werden sollte.

SRB-Test

Für den SRB Test wurden verschiedene Zelllinien (HepG2, Hek293, HepaRG, Caco-2) in einer Mikrotiterplatte mit 96 Nöpfchen und einer Zelldichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen/ Nöpfchen ausgesät und für 24 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium, welches eine Verdünnungsreihe der zugesetzten Testsubstanz enthielt, ersetzt. Die Platten wurden je nach Fragestellung für 24,48 oder 72 h unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit $100 \mu\text{L}$ / Nöpfchen eiskalte 10 % (Gew/V) Trichloressigsäure fixiert und die Mikrotiterplatte wurde für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Das Zellkultur-Trichloressigsäure Gemisch wurde verworfen und die Platten wurden sorgfältig mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde ein Trocknungsschritt bei 65°C für 30 Minuten durchgeführt. $100 \mu\text{L}$ der Sulforhodamin Lösung wurden hinzugegeben und die Mikrotiterplatten wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Als nächster Schritt wurden die Platten mit verdünnter Essigsäure gewaschen und bei 65°C für 30 Minuten getrocknet. Der protein-gebundene SRB-Farbstoff wurde mittels 10 nM Tris-Base in Lösung gebracht. Die Platten wurden für 10 Minuten unter ständigem Schütteln bei 500 g inkubiert, die Absorption wurde bei 535 nm mittels Mikroplattenlesers gemessen. Dem Durchschnitt der erhaltenen Werte der nicht behandelten Zellen wurde als Referenzwert eine Viabilität von 100% zugeteilt. Die Viabilitätswerte der Verdünnungsreihe wurden durch Division erhalten. Die sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurve und die Berechnung der IC_{50} -Werte wurden mittels GraphPad PRISM ermittelt.

MTT-Test

Für den MTT Test wurden verschiedene Zelllinien (HepG2, Hek293, HepaRG, Caco-2) in einer Mikrotiterplatte mit 96 Nöpfchen und einer Zelldichte von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ Nöpfchen ausgesät und für 24 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium, welches eine Verdünnungsreihe der Testsubstanz enthielt ersetzt. Die Platten wurden je nach Fragestellung für 24,48 oder 72 h unter

Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde abermals verworfen, im Anschluss wurden die Zellen mit 200 µL einer MTT-Lösung, welche 0,5 mg MTT/mL enthielt, für zwei Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die MTT-Lösung durch DMSO ersetzt und für 10 Minuten unter ständigem Schütteln bei 500g inkubiert, um die Formazankristalle zu lösen. Die Absorption wurde bei 570 nm mithilfe eines Mikroplattenlesers gemessen. Die Berechnung der IC₅₀-Werte wurde analog zum SRB-Test durchgeführt.

Lebend/Tot-Färbung

Die Lebend-Tot Färbung wurde mithilfe Propidiumiodide (PI) und Hoechst Farbstoff durchgeführt. Eine Lösung von 5 µM Propidiumiodide und 5 µM Hoechst Farbstoff wurde in PBS hergestellt und 20 Minuten mit den Zellen inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen. Die Anzahl der toten Zellen und die Gesamtzellzahl wurden mittels Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Zur Auswertung der Bilder wurde die Software ImageJ benutzt, der Anteil der lebendigen Zellen wurde mittels Formel 2.1 berechnet

$$\text{Lebendzellzahl [\%]} = \frac{N \text{ der Pi} - \text{pos. Zellen pro Bild}}{N \text{ der Hoechst} - \text{pos. Zellen pro Bild}} \cdot 100 \quad \text{Formel 1.5}$$

2.2.11 Immunfluoreszenzfärbung auf Einzelzellniveau

Die immunfluoreszente Färbung der Zellen wurde für die statische Zellkultur auf speziellen µ-Slides der Firma ibidi, für die mikrofluidische Zellkultur auf den entsprechenden Chips durchgeführt. Vor der Fixierung der Zellen wurde das Zellkulturmedium verworfen und der Überstand und eventuell tote Zellen durch gründliches Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden mittels 4%- PFA für 20 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht mit Blocking-Puffer inkubiert. Der primäre Antikörper wurde 1:500 im Blocking-Puffer verdünnt und für 24 Stunden mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 Stunden mit dem fluoreszenz-markierten Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abermals mit PBS gewaschen. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Keyence Bz-X600 Mikroskop durchgeführt.

2.2.12 Zellfunktionalitätstestung

Eine hohe Zellfunktionalität, die physiologischen Eigenschaften entspricht, ist für *in vitro* Systeme essenziell. Statische Zellkultur und dynamische mikrofluidischen Plattformen wurden auf, in der Literatur etablierte, Marker, namentlich die Sekretion von Albumin, die Synthese von Harnstoff und die Aufnahme von Albumin getestet.

Albumin-ELISA

Die Albuminsekretion von Hepatozyten als leberspezifischer Indikator ihrer Funktionalität, wurde durch einen enzymgekoppelten Immunsorbent Test (ELISA) (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) gemessen. Hierfür wurde der Überstand aus statischer Zellkultur und das Eluat aus der dynamischer mikrofluidischer Kultur im 24 stündigen Intervall gezogen und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Zur Durchführung des Tests wurden die Überstände aufgetaut und nach Vorgaben des Herstellerprotokolls vorbereitet. Der Test wurde in Flachboden-Mikrotiterplatten 96 Nöpfchen durchgeführt. Um eine Absorption im linearen Bereich des Tests zu gewährleisten wurde eine Verdünnungsreihe der zu testenden Proben erstellt und mit der Absorption der mit gelieferten Standards verglichen. Die Albumin Konzentrationsbestimmung wurde Schritt für Schritt wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Die Absorption der Proben wurde bei 450 nm mittels eines Mikroplattenlesers gemessen.

Urea Synthese Test

Die Harnstoffproduktion und -sekretion von Hepatozyten wurde unter Verwendung eines Harnstoff-Testkits (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) analysiert. Der Überstand und das Eluat wurde alle 24h gezogen und bis zur Durchführung des Tests bei -20°C gelagert. Die Proben wurden mit dem mitgelieferten Puffer verdünnt, um dem linearen Bereich des Assays zu entsprechen. Der Test wurde in Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfchen durchgeführt. Den Anweisungen des Herstellers wurde schrittweise gefolgt, die Absorption wurde bei 570 nm mittels eines Mikroplattenlesers gemessen.

FITC-Albumin Aufnahme Test

Eine charakteristische Aufgabe der Niere ist die Aufnahme und Filtration des Blutplasmas. Um diese Aufgabe in statischen und dynamischen Modellen zu vergleichen wurde Albumin-Fluoreszein-Isothiocyanat-Konjugat (FITC-Albumin) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) erworben. Das zuvor von *Ferrell et al.* [99] publizierte Protokoll wurde auf das Chipsystem angepasst und optimiert. Hierfür wurden die Zellen in Abwesenheit von FCS für 24h kultiviert. Im Anschluss wurde eine Population der Zellen unter statischen Bedingungen die Zweite unter mikrofluidischen Fließbedingungen für 48 Stunden kultiviert. Darauf folgend wurde 50 µg/ml FITC-Albumin dem Zellkulturmedium hinzugegeben und 3 Stunden mit den

Zellen inkubiert. Als Auswertungsgrundlage diente die durch ImageJ berechnete durchschnittliche Fluoreszenzintensität der aufgenommenen Bilder.

2.2.13 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS-Messungen wurden mit einem Guava easyCyte Flow Cytometer (Merk, Darmstadt, Deutschland) und Rundboden-Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfchen durchgeführt.

Lebend/Tot Bestimmung

Zellen wurden in eine Mikrotiterplatte mit 24 Nöpfchen gesät und mit entsprechenden Wirkstoffen behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen typisiert und gesammelt, hierbei wurde auch der Anteil der nicht adhärenen Zellen, welche im Medium in Suspension waren gesammelt, um die am stärksten geschädigten bzw. toten Zellen zu berücksichtigen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 3µg/ml PI- Farbstoff für 5 Minuten im Dunklen inkubiert. Der Anteil der PI-positiven Zellen wurde mit der gesamten Zellzahl verrechnet, um den prozentualen Anteil der toten Zellen zu erhalten.

Antikörper basierte Analyse

Zellen wurden in eine Mikrotiterplatte mit 24 Nöpfchen gesät und mit entsprechenden Wirkstoffen behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 4% PFA Lösung fixiert. Die Zellen wurden mit primäre Antikörper (1:500 verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal durch Zentrifugation bei 200g und 5 Minuten Inkubation mit PBS gewaschen. Fluoreszenz-markierte Antikörper wurden 1:2000 verdünnt und mit den Zellen für 1 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal durch Zentrifugation und PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen / ml verdünnt.

2.2.14 HPLC LC-MS

Probenvorbereitung

Die Proben für die HPLC/LS-MS Bestimmung wurden aus dem Überstand der Zellkultur und aus lebenden Zellen extrahiert. Zur Probenvorbereitung wurde eine Proteinfällung mit Ethanol

(pH 2,2) durchgeführt und die Proben für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden mittels Zentrifugation bei 12.000 g für 30 min von den gelösten Substanzen getrennt. Im nächsten Schritt wurde eine Zweiphasentrennung mit Ethylacetat verwendet. Wobei der Anteil an Ethylacetat jeweils bei einem Drittel des Gesamtvolumens gehalten wurde. Die zwei Phasen wurden durch kräftiges Schütteln vermischt, nachdem sich das Phasengleichgewicht eingestellt hatte, wurde die Ethylacetatphase abpipettiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Ethylacetat wurde unter Verwendung eines Rotavap (Büchi, Deutschland) verdampft, die Rückstände in Methanol rekonstituiert, direkt in ein Eppi überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert

Messung

Eine zuvor optimierte Messung wurde zur Durchführung angepasst. Die LC-MS / MS-Analyse wurde an einem Finnigan LCQ-Duo Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer ESI-Quelle (ThermoQuest), gekoppelt an ein Finnigan Surveyor HPLC-System (MS-Pumpe plus, Autosampler und PDA-Detektor plus) mit einem EC 150 / 3 Nucleodur und einer 100-3 C18ec-Säule durchgeführt (Macherey-Nagel). Für die Trennung der Substanzen wurde ein Gradient von Wasser und Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure verwendet. Dieser Anteil an Acetonitril wurde von 50% auf 100% innerhalb von 15 Minuten, danach isokratisch mit 100% ACN für 15 Minuten und einer Reduktion auf 50% Acetonitril in 15 Minuten wieder gefahren. Die chromatographische Trennung wurde mit einer Säulentemperatur von 40°C, einer Flussrate von 0,5 ml / min und einem Injektionsvolumen von etwa 20 µl betrieben. Alle Proben wurden im positiven (ESI +) Modus gemessen. Die MS wurde mit einer Kapillarspannung von 10 V, einer Quelltemperatur von 240°C und hochreinem Stickstoff als Hülle und Hilfsgas bei einer Flussrate von 80 bzw. 40 betrieben. Die Ionen wurden in einem Massenbereich von 50-2000 m/z nachgewiesen. Eine Kollisionsenergie von 35 % wurde im MS/MS zur Fragmentierung verwendet. Datenakquisitionen und -analysen wurden mithilfe der Software Xcalibur™ 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt

Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der mikrofluidischen Plattformen und Strömungssimulationen

Bevor Zellen in einer mikrofluidischen Plattform kultiviert werden können, ist es essenziell die Plattform in Bezug auf ihre Strömungseigenschaften zu charakterisieren. Zur Simulation der Strömungen innerhalb der Mikrokanäle wurde die Simulationssoftware COMSOL Multiphysics (COMSOL Inc., Burlington, MA, USA) verwendet. Hierfür wurde jeweils eine einzelne mikrofluidische Kammer in der CAD-Software AutoCAD 2015 gezeichnet und in COMSOL importiert. Die Charakterisierung wurde für die Designs CC N1, CC N2 und Design S1 durchgeführt. Ich habe das "feine", physikalisch gesteuerte Gitter für die Finite-Elemente-Simulation ausgewählt. Die newtonsche inkompressible laminare Strömung wurde mit einer Strömungsrate von 100 $\mu\text{L/h}$ für Design CC N1 und CC N2 und einer Strömungsrate von 60 $\mu\text{L/h}$ für Design S1 und Grenzbedingungen ohne Schlupf an den Kanalwänden ausgewählt. Der Druck des Auslasses der mikrofluidischen Kammer wurde auf 0 Pa eingestellt. Das fluidische Verhalten der Strömung im laminaren Bereich wurde unter der Annahme einer konstanten Fluidichte und Massenerhaltung simuliert und durch die Navier-Stokes-Gleichung geregelt.

Abbildung 10 A zeigt das errechnete Strömungsprofil für Design CC N1. Die hohe Flussrate am Einlass und Auslass der Kammer ist der Geometrie des Designs geschuldet. Im Zellkulturbereich wurde eine konstante niedrige Flussgeschwindigkeit berechnet.

Für CC N2 wurde ein 3D Modell erstellt, um den Einfluss der Diffusionsbarriere besser analysieren zu können. Betrachtet man sowohl die Scherrate als auch den Fluidfluss sind innerhalb der Kammern niedrigere Werte zu beobachten. Da in diesem Bereich die Zellen kultiviert werden sollten, wurde die Scherrate an einem 25 μM kreisrunden Objekt berechnet, welches eine Zelle nachahmen sollte.

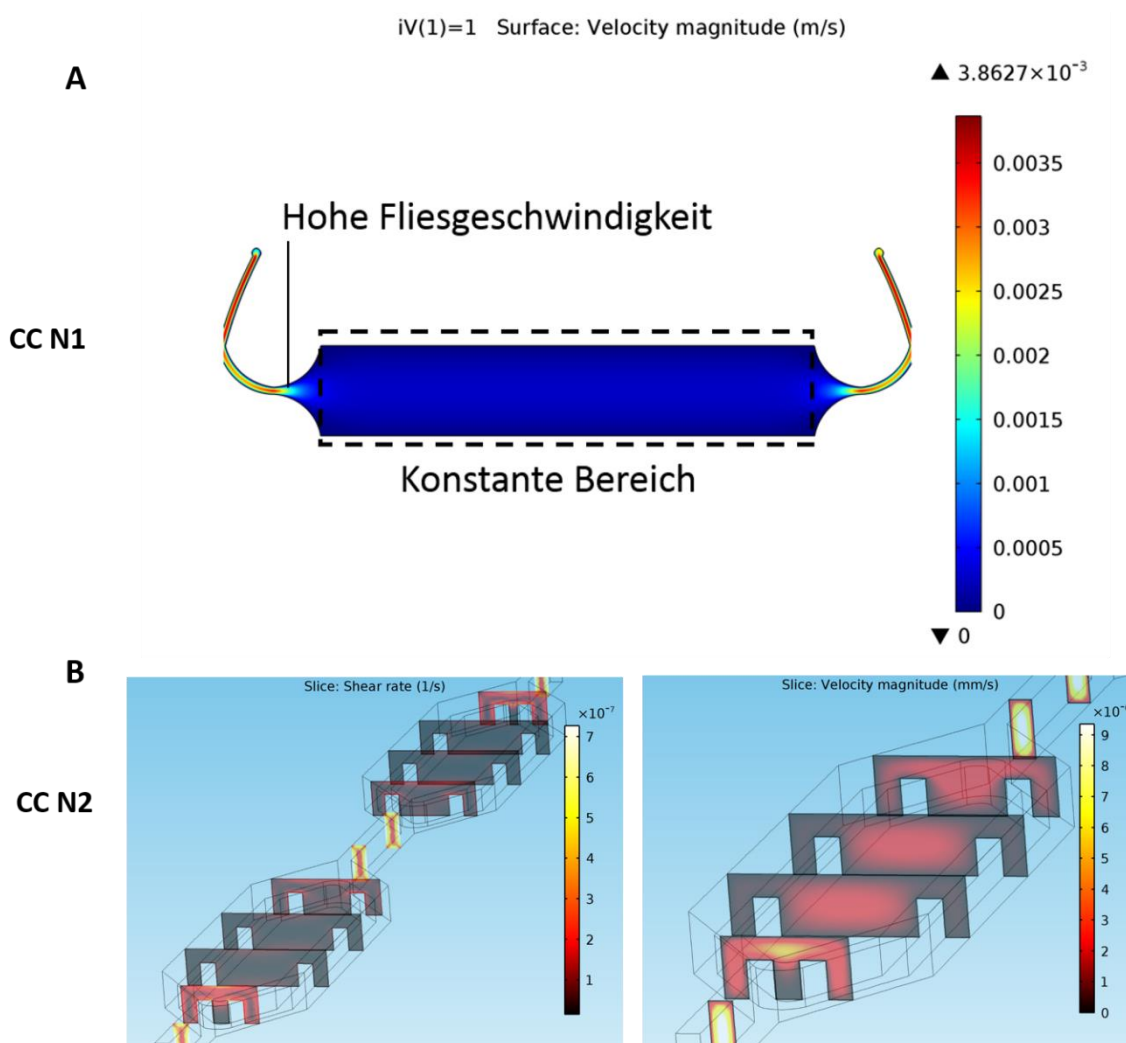


Abbildung 10 Modellierung der Fluidodynamik in CC N1 und CC N2.

A Flussgeschwindigkeit über die Geometrie des CC N1 mit dem zentralen Zellkulturbereich mit konstanter Flussgeschwindigkeit. B Scherrate und Flussgeschwindigkeit in CC N2, Darstellung des Effekts der Diffusionsbarriere. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [86].

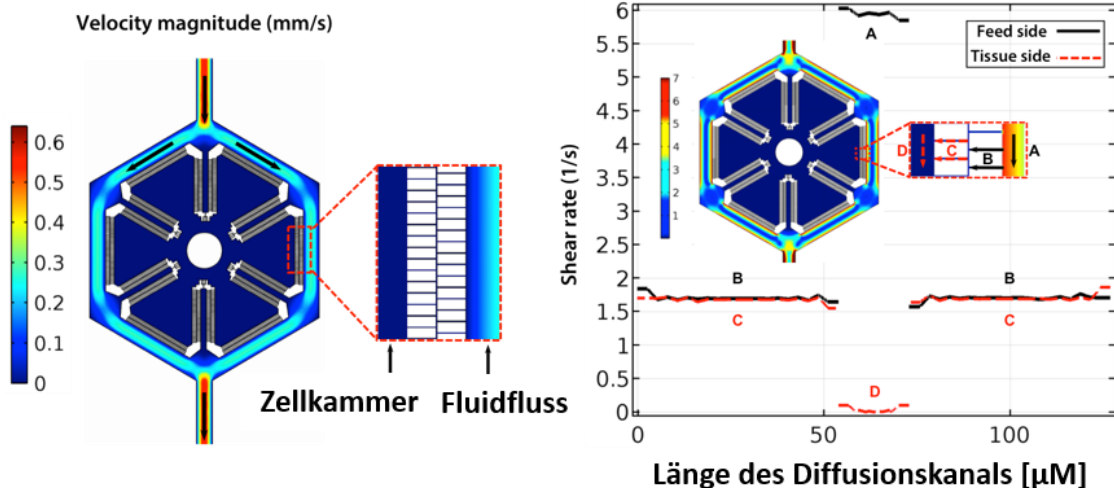


Abbildung 11 Modellierung der Fluidodynamik in CC S1.

Flussgeschwindigkeit über die Geometrie des CC S1 mit Zellkulturbereich und umliegendem Fluidfluss, Scherrate über die Länge der Diffusionskanäle bei konstanter Flussgeschwindigkeit, wobei a den Bereich außerhalb b den Bereich in der ersten, c den Bereich in der zweiten Blockreihe und d den Innenbereich markiert. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [107].

Über die ermittelte Scherrate kann durch Multiplikation mit der Viskosität die Scherkraft berechnet werden, die auf die Zellen wirkt. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über in der Literatur publizierte Werte. Die berechneten Werte für die verwendeten Flussprofile ergaben einen Wert von 0.156 Pa in CC N1, 0.05 Pa in CC N2 und 0.04 Pa in CC S1. Hierbei ist der Effekt der Diffusionsbarriere, welche die vor höheren Scherraten schützt deutlich zu erkennen. Diese berechneten Werte innerhalb der Systeme, liegen im unteren Bereich der publizierten Scherraten (siehe Tabelle 8). Die Flussraten wurden entsprechend niedrig gewählt, um eine längere Verweilzeit und einen möglichen Metabolismus von Substanzen innerhalb des Kulturmediums zu erlauben. Da es sich um ein offenes System handelt, wurde das Medium nur einmal über die Zellen geströmt und nicht wie in anderen Systemen mehrfach zirkuliert.

Tabelle 8 Übersicht über verschiedene publizierte Scherkräfte auf Leber und Nierenzellen.

Leber	Niere
0.5 Pa [110]	0.02 Pa [111]
0.033 Pa [112]	0.01 Pa [113]
0.5 Pa [114]	0.1 Pa [100]
0.01-0.02 Pa [115]	0.1 Pa [116]
	0.04 Pa [117]

3.2 Zellaussaat und Separierung der Zelltypen innerhalb der Chipsysteme

Zur Etablierung der Zellaussaat innerhalb der mikrofluidischen Kammer wurden verschiedene Parameter wie die Zellzahl, das Volumen und die Oberflächenbeschichtung der Kammern optimiert.

Zellzahl

Für CC N1- CC N3 wurde eine konfluente Monolayer an Zellen in den Chip gesät. Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass die Zellen je nach Zelltyp zwischen 2-6 Stunden benötigen, um adhärent zu werden und weitere 24 Stunden in statischer Kultur verbleiben, bevor sie an die mikrofluidische Pumpe angeschlossen werden. Initial wurden Konzentrationen von 500, 1000, 2000, 3000 und 5000 Zellen/ μ L getestet, wobei HepG2 Zellen als Model dienten. 3000 Zellen/ μ L resultierte eine konfluente Einzelschicht an Zellen und wurde für alle weiteren Experimente verwendet (siehe Abbildung 12).

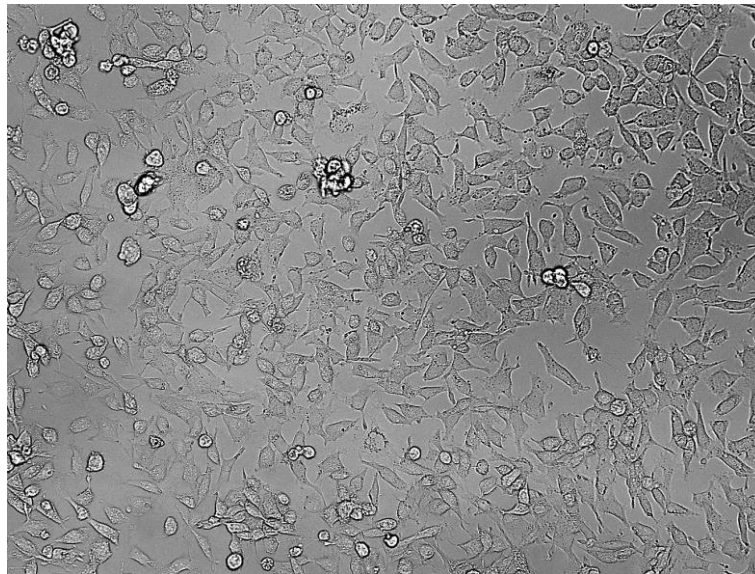


Abbildung 12 Zellmonolayer im Chipsystem.

Darstellung der konfluenten Einzelschicht an Zellen vier Stunden nach Zellaussaat in der mikrofluidischen Kammer. Die Abbildung wurde mit einer 20x Vergrößerung im Hellfeld aufgenommen.

Um die blasenfreie Aussaat der Zellen zu gewährleisten, wurde das 1,5-1,7-fachen Kammervolumen verwendet. Das Verfahren zum Aussäen der Zellen wurde wie im Material und Methodenteil **2.2.1.2** beschrieben in einer optimierten Form durchgeführt, die es erlaubt Zellen individuell in die Einzelkammern zu säen, dieses Verfahren wurde bei CC N2- CCN3 verwendet. Für die Beschichtung der Kammern wurde 0.2% Kollagen verwendet. Initial wurde

die 0.2% Kollagenlösung unverdünnt in die Kammern pipettiert und diese für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, was jedoch zu einem Verblocken der Ein- und Auslasskanäle führte. Eine 1:3 Verdünnung mit PBS und eine Inkubation für 60 Minuten bei 37°C sorgten für die Ausbildung einer dünnen Kollagenschicht und ermöglichte die überschüssige Menge abzupipettieren. Diese Kollagenschicht war besonders für die Kultur der Zellen unter kontinuierlichem Scherstress wichtig (siehe Abbildung 13).

Für den membran-basierten Aufbau bei CC N4 wurden die Zellen auf der Oberseite der Membran und am unteren Boden des Chips ausgesät. Verschiedene andere Gruppen haben ähnliche membran-basierte Plattformen entwickelt wobei die Zellen sowohl auf auch unterhalb der Membran angesiedelt wurden [70, 103, 118].

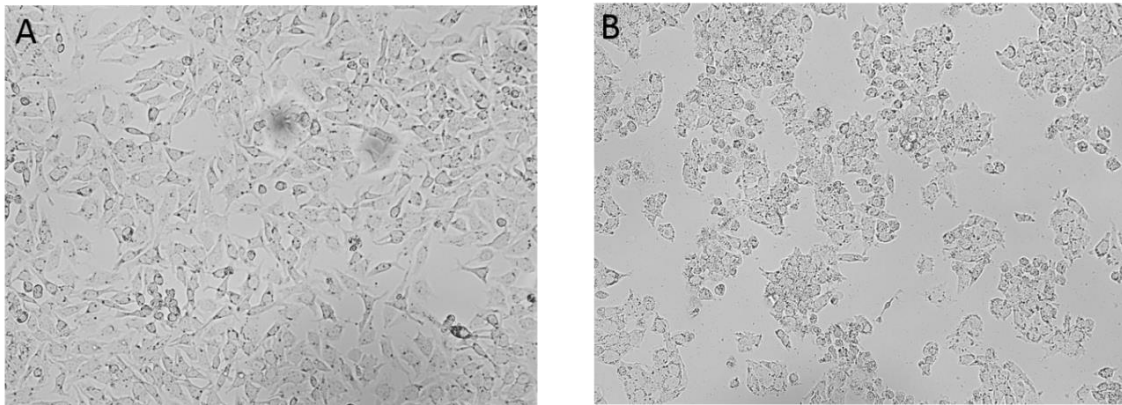


Abbildung 13 Vergleich der Oberflächenbeschichtung im Chip.

Vergleich der Zellmorphologie in Kollagen beschichteten (A) und unbeschichteten (B) mikrofluidischen Zellkulturkammern. Die Abbildung wurde mit einer 20x Vergrößerung im Hellfeld aufgenommen.

Für CC S1 wurde ein spezielles Verfahren zur Aussaat verwendet, die Zellen wurden über die obere (rote) Schicht in die hexagonalen Zellkammern gesät (siehe Abbildung 14). Hierfür wurde ein Zellpellet 1:1 mit Zellkulturmedium gemischt. CC S1 wurde für eine Stunde unter Vakuum inkubiert, wodurch die Zellen beim Aussäen in die Kammern gesaugt wurden. Wie in Abbildung 14 wurden die Zellen zentral in die einen Leberläppchen gesät. Der mikrofluidische

Fluss in den umliegenden Kanälen wurde 30 Minuten nach der Aussaat der Zellen über den Zentralen Einlass des Systems gestartet.

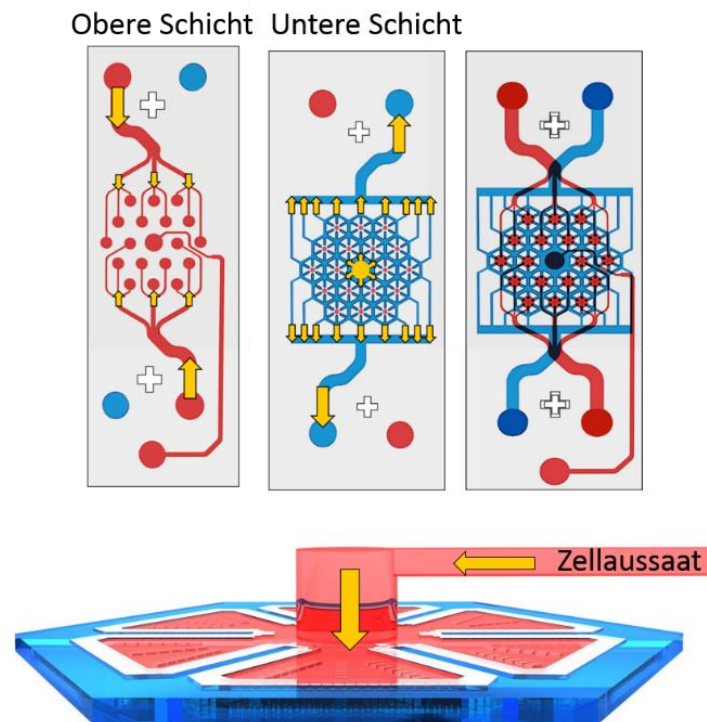


Abbildung 14 Aussaatverfahren in CC S1.

Darstellung des zwei Lagen Aufbau von CC S1. Die obere rote Lage diente der Zellaussaat, die untere blaue Lage der radialen Medienversorgung. Ober links zeigt die übereinander ausgerichteten Lagen. Unten zeigt ein 3D Bild die Zellaussaat aus der oberen roten Kammer in die untere Zelle. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [107].

3.3 Vergleich statischer und mikrofluidischer Zellkultur

Initial wurde die Viabilität der Zellen innerhalb der mikrofluidischen Systeme durch Lebend/Tot-Färbung evaluiert. Hierfür wurden die Zellen für mehrere Tage auf den Chips unter kontinuierlichem Fluidfluss kultiviert. Abbildung 15 A zeigt die Viabilität der Zellen auf den verschiedenen Plattformen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kultur der Zellen auf CC N1 aufgrund des einfachen Aufbaus der Kammer und der fehlenden Diffusionsbarriere in einer niedrigeren Viabilität resultiert. Ein schwerwiegendes Problem an diesem Design stellte außerdem die Ausbildung von Luftblasen dar, die lokal für einen kompletten Rückgang der Zell Viabilität sorgten. Die generierten Ergebnisse bestätigen, dass Zellen innerhalb der verschiedenen Designs CC N2 bis CC N4 auch über einen längeren Zeitraum kultiviert werden

können. Abbildung 15 B zeigt exemplarische Aufnahmen der Lebend/Tot-Färbung in Design CC N1 und Design CC N2. Für CC S1 gestaltete sich die Lebend/Tot-Färbung aufgrund des 3D Wachstums der Zellen als schwierig, die Farbstoffe penetrierten nur die äußersten Zellen.

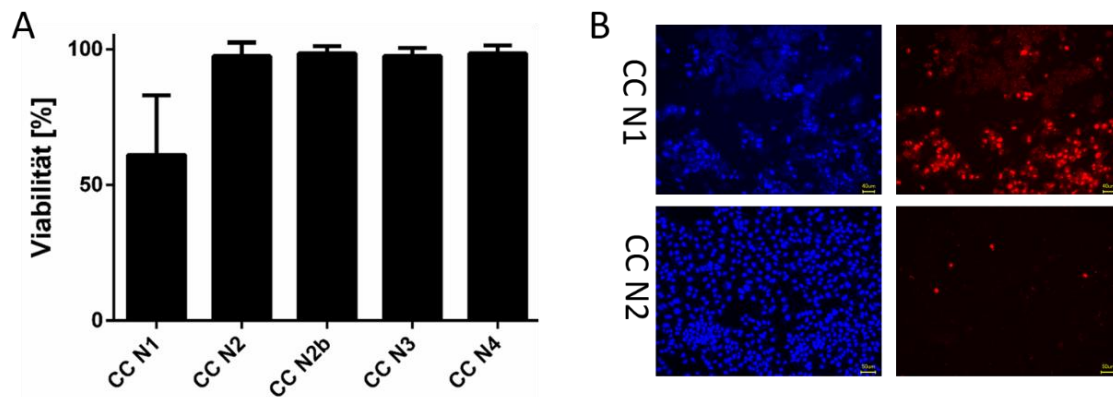


Abbildung 15 Viabilität in den verschiedenen Chipdesigns.

A: Vergleich der prozentualen Viabilität auf den unterschiedlichen Chipplattformen an Tag 5 der mikrofluidischen Kultur. Die prozentualen Ergebnisse wurden als Verhältnis der Gesamtzellzahl zur Totzellzahl berechnet. Die Zellzahl wurde mittels ImageJ unter Verwendung eines Partikelzähl Plugins ermittelt. B Beispielhafte Darstellung zweier DAPI/PI Färbungen auf CC N1 und CC N2. Für jede Plattform wurden $n > 12$ Bilder in 3 unabhängigen Abläufen untersucht.

3.3.1 Vergleich der Funktionalität und metabolischen Aktivität der Zellen zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur.

Nachdem das Verfahren zur Aussaat der Zellen etabliert wurde und die Zellen auch nach mehreren Tagen in fluidischer Kultur eine hohe Viabilität gezeigt hatten, habe ich mikrofluidische und statische Zellkultur in Bezug auf verschiedene Faktoren, welche für die Funktionalität von *in vitro* Systemen essenziell sind, verglichen. Hierfür wurde, die Sekretion von Albumin, die Synthese von Harnstoff, die Aufnahme von Albumin und die Expression von CYPs in beiden Systemen gemessen und verglichen.

Albumin wurde im Überstand der Zellkultur und im Eluat der Chips gemessen. Im ersten Schritt wurde die Expression die Albumin Expression von HepG2 Zellen, welche im mikrofluidischen Chipssystem und unter Standard 2D Zellkultur kultiviert wurden verglichen (siehe Abbildung 15A). Um einen Einfluss des Chips, wie zum Beispiel das Material oder die Sauerstoffversorgung auszuschließen habe ich außerdem ein zweites Experiment durchgeführt in dem HepG2 Zellen in zwei Gruppen von Chips kultiviert wurden. Die erste Gruppe wurde durch einen kontinuierlichen Pumpfluss versorgt, die zweite Gruppe statisch gehalten mit Medienwechsel alle 12 Stunden, die Volumina wurden dem Pumpfluss über 24 Stunden angepasst (siehe Abbildung 15B). CC N2 wurde für dieses Experiment verwendet. Ähnliche

Ergebnisse konnten außerdem mit CC S1 und der Verwendung von iPSC Hepatozyten generiert werden (siehe Abbildung 16C).

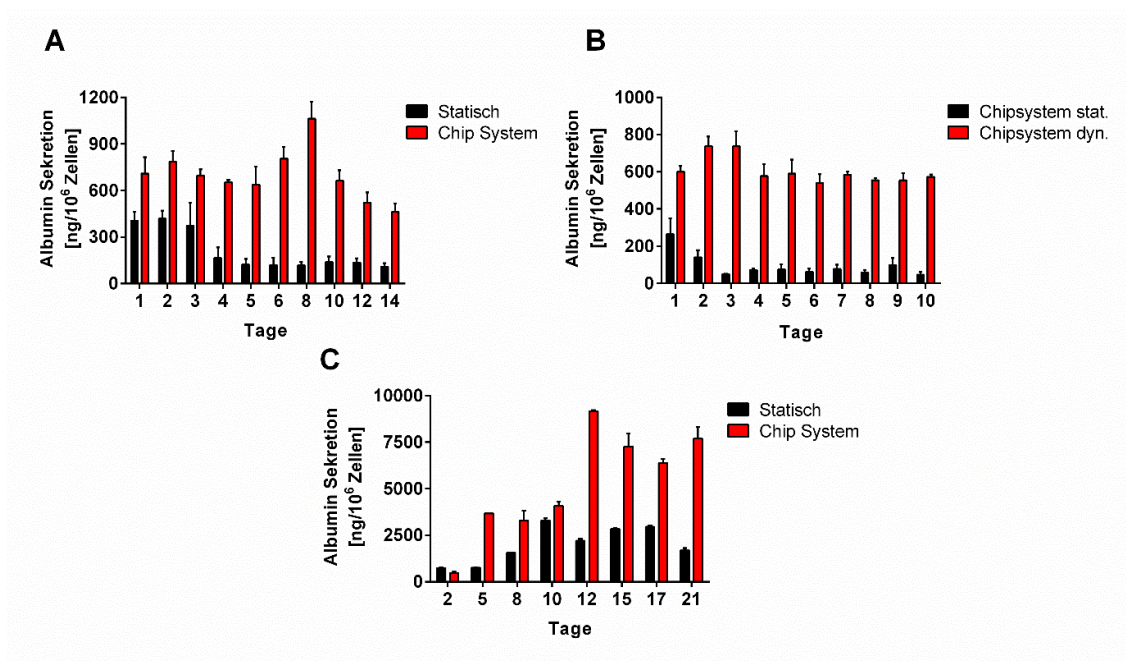


Abbildung 16 Vergleich der Albuminexpression der Zellen.

A Albumin Sekretion von HepG2 Zellen in statischer 2D Zellkultur und im mikrofluidischen Chipsystem für einen Zeitraum von 14 Tagen. B Vergleich der Albumin Sekretion von HepG2 Zellen auf dem statisch betriebenen Chip System und dem dynamisch betriebenen Chipsystem. Abbildungsteile A und B wurden auf CC N2 durchgeführt. C Vergleich der Albumin Sekretion von iPSC Hepatozyten im statischen und mikrofluidischen System über einen Zeitraum von 21 Tagen. Abbildungsteil C wurde in CC S1 generiert. Für alle Datenpunkte wurden $n > 3$ Chips bzw. Mikrotiternäpfchen verwendet, welche als technische Triplikate vermessen wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar.

Betrachtet man die Ergebnisse der Albumin Sekretion der HepG2 Zellen, ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen in statischer Kultur nach einer initialen Hochphase der Albumin Sekretion innerhalb der ersten 72 Stunden, diese herunterfahren. Ähnliche Beobachtungen wurden von verschiedenen Gruppen beschrieben [119, 120]. HepG2 die im fluidischen Chip System kultiviert werden, behalten konstante Level an Albumin Sekretion über die gesamte Kultivierungsdauer. Da Zellen, die unter statischen Bedingungen auf dem Chipsystem kultiviert wurden, ebenfalls ihre Albumin Sekretion verlieren, ist es augenscheinlich, dass der fluidischen Fluss und die einhergehende Scherrate einen direkten Einfluss auf die Albumin Sekretion haben. Dieser Effekt konnte sowohl in HepG2 als auch in iPSC Hepatozyten beobachtet werden.

Ein weiterer spezifischer Marker für die Funktionalität von Hepatozyten ist die Harnstoffsynthese. Analog zur Albumin Sekretion wurde die im Überstand und im Eluat

bestimmt. Abbildung 17 zeigt den Vergleich der Harnstoff Synthese für HepG2 Zellen in CC N2 (A) und iPSC Hepatozyten in CC S1 (B) zwischen statischen Mikrotiterplatten und fluidischem Chip System. Ähnlich wie bei der Albumin Sekretion ist bei den HepG2 in statischer Kultur zu erkennen, dass die Zellen nach drei Tagen einen signifikanten Rückgang in der Harnstoffsynthese aufweisen. Die fluidischen Systeme im Vergleich verzeichnen einen leichten Anstieg der Harnstoffsynthese. Für die Kultur der iPSC Hepatozyten (B) zeigte das Chipsystem ebenfalls eine höhere Harnstoffsynthese, welche an Tag 5-10 am stärksten ausgeprägt war.

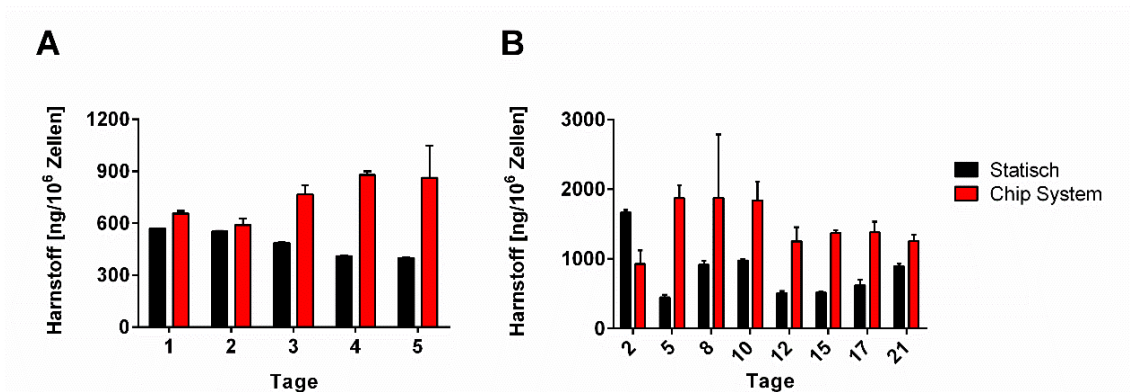


Abbildung 17 Vergleich der Harnstoffsynthese der Zellen.

A Vergleich der Harnstoffsynthese von HepG2 Zellen im statischen und mikrofluidischen System auf CC N2. B Vergleich der Harnstoffsynthese von iPSC Zellen auf CC S1. Für alle Datenpunkte wurden $n > 3$ Chips bzw. Mikrotiternäpfchen verwendet, welche als technische Triplikate vermessen wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar.

Neben Leberzellen wurden auch Nierenzellen in den mikrofluidischen Systemen kultiviert. Da Nierenzellen in allen späteren Anwendungen Metaboliten aus der Leberkammer aufnehmen oder verstoffwechseln sollten, wurde deren Absorption und Aufnahme Fähigkeiten in statischer und fluidischer Kultur getestet. Hierfür wurde FITC-Albumin verwendet, welches von den Zellen aufgenommen wird und mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse für Hek293 Zellen (A) und RPTEC Zellen (B). Für beide Nierenzelllinien wurde eine signifikant höhere FITC-Albumin Aufnahme im Chip System bestimmt, ähnliche Ergebnisse sind in der Literatur zu finden [99]. RPTEC Zellen weisen im Vergleich zu Hek293 Zellen eine stärkere Antwort auf den Einfluss der Scherrate auf, was dadurch begründet sein kann, dass es sich bei Hek293 Zellen um embryonale Vorläuferzellen handelt.

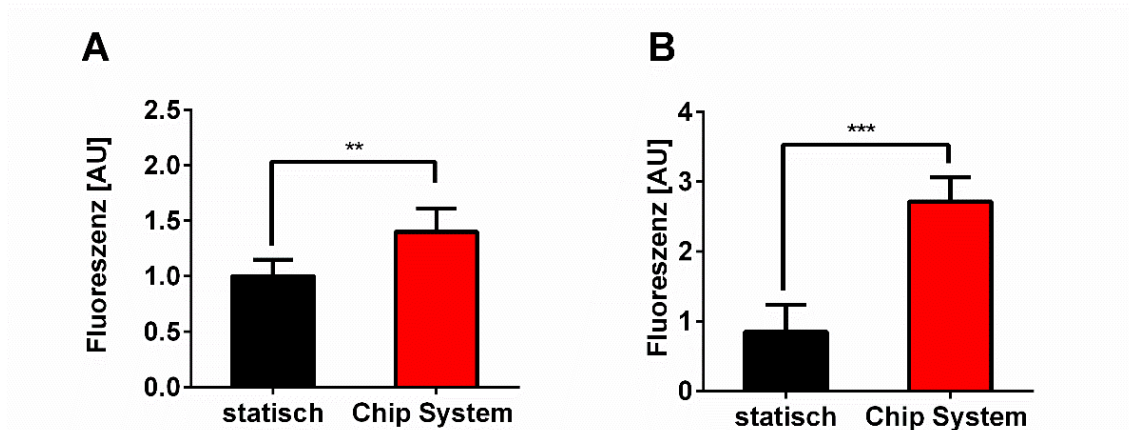


Abbildung 18 Vergleich der Albuminaufnahme der Zellen.

Vergleich der Albumin Aufnahme in statischer und mikrofluidischer Kultur für Hek293 Zellen (A) und RPTEC Zellen (B). Die Abbildung zeigt die relative Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ bestimmt. Der durchschnittliche Fluoreszenz der statisch kultivierten Zellen wurde als 1 gesetzt. Für alle Datenpunkte wurden $n=3$ Chips mit 15 Bilder pro Zellkulturkammer aufgenommen. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar.

3.3.2 Vergleich der Genexpression der Zellen zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur.

CYP-Enzyme sind, wie in der Einleitung beschrieben essenziell für den Metabolismus von Xenobiotika. Da viele CYPs *ex vivo* ihre spezifische Aktivität verlieren, wurde untersucht, ob die Zellen durch den Fluidstrom zu stimulieren sind und der mRNA-Spiegel der CYPs somit induziert wird. Die basale Cyp-Expression wurde auf mRNA-Ebene zwischen statischer und fluidischer Zellkultur verglichen. Hierfür wurden die Zellen für 5 Tage unter statischen und fluidischen Bedingungen kultiviert und die CYP-Expression analysiert. Für alle analysierten CYP-Enzyme habe ich unter fluidischen Bedingungen eine verstärkte Expression ermittelt (siehe Abbildung 19 A). Bei der Betrachtung der Daten ist zu beachten, dass initial Aktin als Referenzgen verwendet wurde, was jedoch um 3-4 Zyklen in der qPCR zwischen statischer und fluidischer Behandlung schwankte. Vinculin und RPL30 zeigten geringere Schwankungen und wurden als Referenzgene verwendet. Die große Standardabweichung einzelner CYP-Enzyme, wie CYP3A4 ist auf die stark unterschiedliche Expression verschiedener Plattformen zurückzuführen. Trotz der Verwendung desselben Chipdesigns und desselben Fluidstroms wurden auf unterschiedlichen Plattformen bis zu 8-fach höhere Expressionen desselben CYPs detektiert. Die unterschiedlich starke Induzierbarkeit verschiedener CYP-Isoenzyme könnte auch auf die unterschiedlichen basalen Level der CYP-Enzyme zurückgeführt werden.

Außerdem wurde der Unterschied verschiedener Scherprofile auf die Zellen getestet. Hierfür wurde CC S1 verwendet, da dieses Design im Vergleich zu allen anderen einen großen fluidischen Widerstand aufweist. Dieser Widerstand konnte in Verbindung mit dem U-Rohrprinzips zur Versorgung der Zellen mit Medium genutzt werden. Hierbei ergab sich ein Scherprofil welches zu Anfang eine hohe, dann kontinuierlich absinkende Scherung aufweist. Mithilfe des Pumpsystems wurde ein diskontinuierliches Scherprofil erzeugt, bei dem auf 30 Minuten Scherung 30 Minuten kein Fluss folgte. Betrachtet man den Einfluss der beiden Flussprofile auf die CYPs (Abbildung 19 B+C), ist zu erkennen, dass Chips die durch die Pumpe mit Medium versorgt werden eine höhere Expression aufweisen.

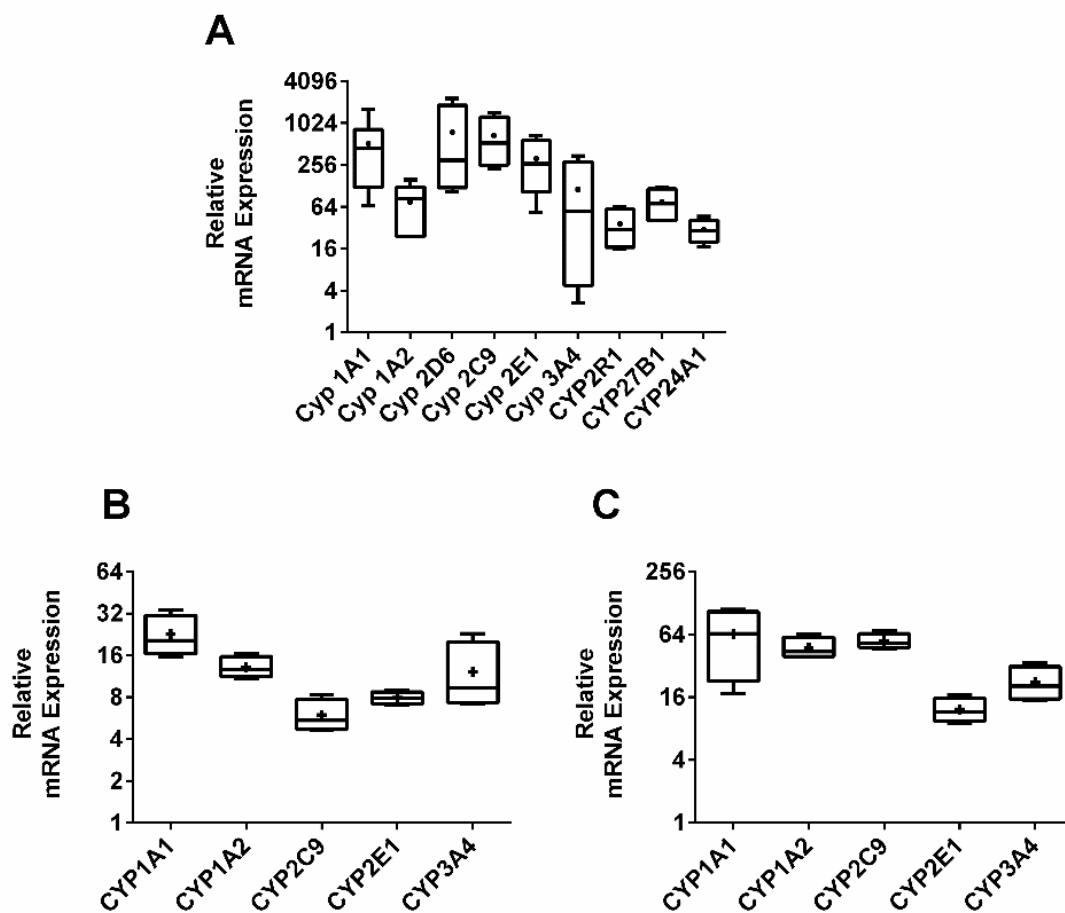


Abbildung 19 Vergleich der mRNA-Expression verschiedener CYP-Isoenzyme zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur.

A HepG2 Zellen nach 5 Tagen unter diskontinuierlichem Fluss (5 Min hoher Fluss und 55 Minuten kein Fluss). *B* HepG2 in CC S 1 nach 5 Tagen mit U-Rohr Chip betrieben. *C* HepG2 in CC S 1 nach 5 Tagen mit Pumpe betrieben (Zyklen von 30 Minuten Scherung 30 Minuten statisch). Die Relative mRNA Expression wurde auf Zellen in statischer Kultur bezogen. Alle Datenpunkte wurden mit $n=5$ Chips bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des 5% und 95% Quantils dar.

Neben den Leberzellen wurde auch der Einfluss der Scherung auf die Nierenzellen untersucht. Hierbei wurde ebenfalls der Einfluss auf die Expression verschiedener CYP-Enzyme untersucht. Ähnlich wie bei den Leberzellen wurde eine erhöhte Expression bei Zellen die fluidischer Scherung ausgesetzt waren detektiert (siehe Abbildung 20).

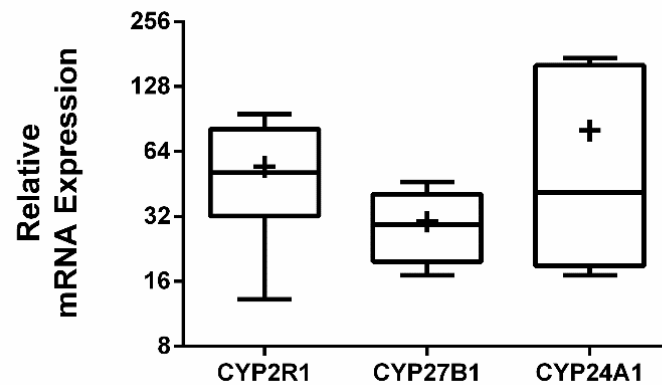


Abbildung 20 Vergleich der mRNA-Expression zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur

Vergleich der mRNA-Expression verschiedener CYP-Isoenzyme zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur für RPTEC Zellen. Die Relative mRNA Expression wurde auf Zellen in statischer Kultur bezogen. Alle Datenpunkte wurden $n=5$ Chips bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des 5% und 95% Quantils dar.

Der Einfluss der Scherung auf die mRNA-Expression von Zellen wurde bereits von verschiedenen Gruppen publiziert. *Baudoin et al* haben gezeigt, dass primäre murine Hepatozyten in fluidischer Kultur eine höhere CYP-Aktivität aufweisen, als die Vergleichsgruppe in statischer Kultur [121]. Das explizit die Expression von CYP3A4 starken Schwankungen durch den Fluidfluss ausgesetzt ist, wurde zuvor von *Prot et al.* demonstriert [122]. Die höhere CYP-Expression durch Scherung wurde für Nierenzellen innerhalb eines mikrofluidischen Chips im Vergleich zu statischer Kultur von *Snouber et al.* [123] nachgewiesen. Insgesamt gibt es in der Literatur für 1250 Gene Berichte für deren Anfälligkeit gegenüber fluidischer Scherung. Insgesamt ist der Einfluss fluidischer Scherung auf die Genexpression für über 1250 Gene bekannt.

Zusammenfassend habe ich in Abbildung 15 bis Abbildung 19 gezeigt, dass Zellen in mikrofluidischen Kammer mit hoher Viabilität kultiviert werden können und dass die mikrofluidische Strömung es ermöglicht den Phänotyp so zu manipulieren, dass Zellen ihren Ebenbildern im menschlichen Körper ähnlicher sind.

3.4 Bestimmung der CYP-Aktivität als wesentlicher Faktor der Funktionalität von Hepatozyten unter Verwendung von VividDye Substraten

Neben der hohen Viabilität und der verbesserten Expression leberspezifischer Marker und CYP-Enzyme, ist die Kontrolle der metabolischen Aktivität von *in vitro* Lebermodellen eine wichtige Voraussetzung, um deren Funktionalität in der Arzneistofftestung und für Arzneimittelwechselwirkungsstudien zu gewährleisten. Wie in der Einleitung beschrieben haben bereits etablierte Methoden, welche Zellysate oder Zellmikrosomen verwenden [22, 124, 125], um die Antwort von metabolisierenden CYP-Enzymen auf die Zugabe von Wirkstoffen zu analysieren, den Nachteil, dass sie kein ganzheitliches Bild der zellulären Antwort detektieren können. Der VividDye Test stellt ein von mir entwickeltes Protokoll zur Bestimmung der CYP-Aktivitäten in lebenden Zellen dar. Wie in Abbildung 21 skizziert, erlaubt der Test die Beobachtung der CYP-Aktivität, der spezifischen Änderung durch Substanzbehandlung und die Veränderung während der Differenzierung oder Dedifferenzierung von Hepatozyten in lebenden Zellen.

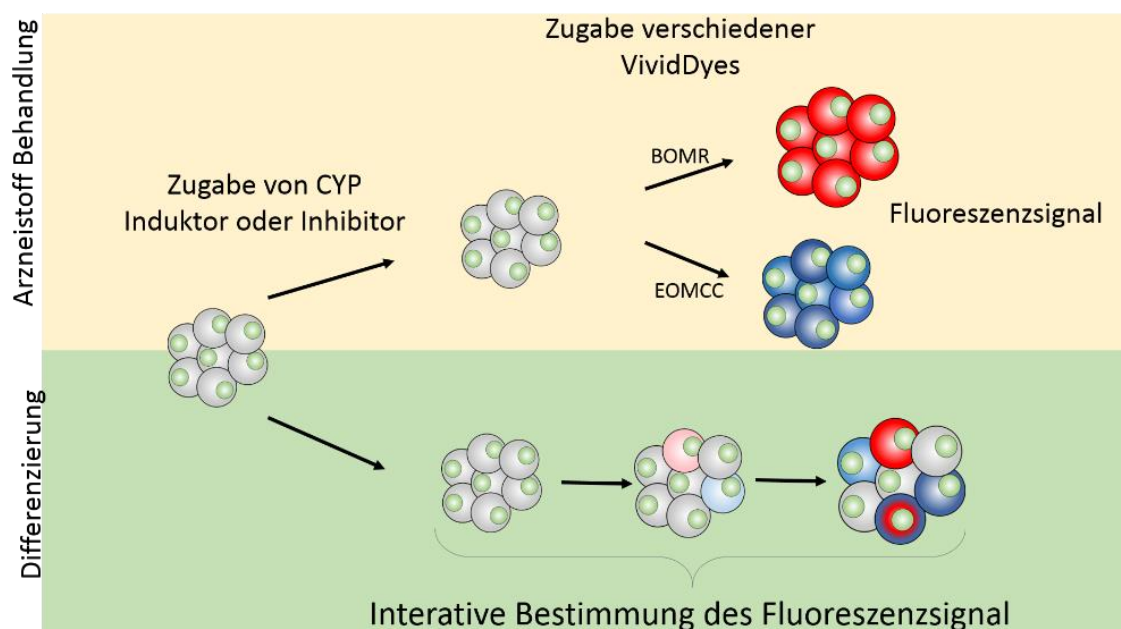


Abbildung 21 Übersichtgrafik über die Anwendungsbereiche des VividDye Test für Arzneistoff Behandlung und Zelldifferenzierung.

Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

Da VividDye Substrate laut Hersteller in Kombination mit BACCULOSOMEN® verwendet werden sollte, wurden zunächst Experimente angefertigt, um die Kombination mit Lebendzellkultur nachzuweisen. In den folgenden Abbildungen wird die Verstoffwechslung des VividDye Substrats und der einhergehende Anstieg der Fluoreszenz als Signal/Abs $\lambda_{580\text{nm}}$ dargestellt. Initial wurden lebendige Zellen und Zelllysate von HepG2 (A) und primären murinen Hepatozyten (B) mit 3 μM VividDye Substrat BOMCC inkubiert (siehe Abbildung 22).

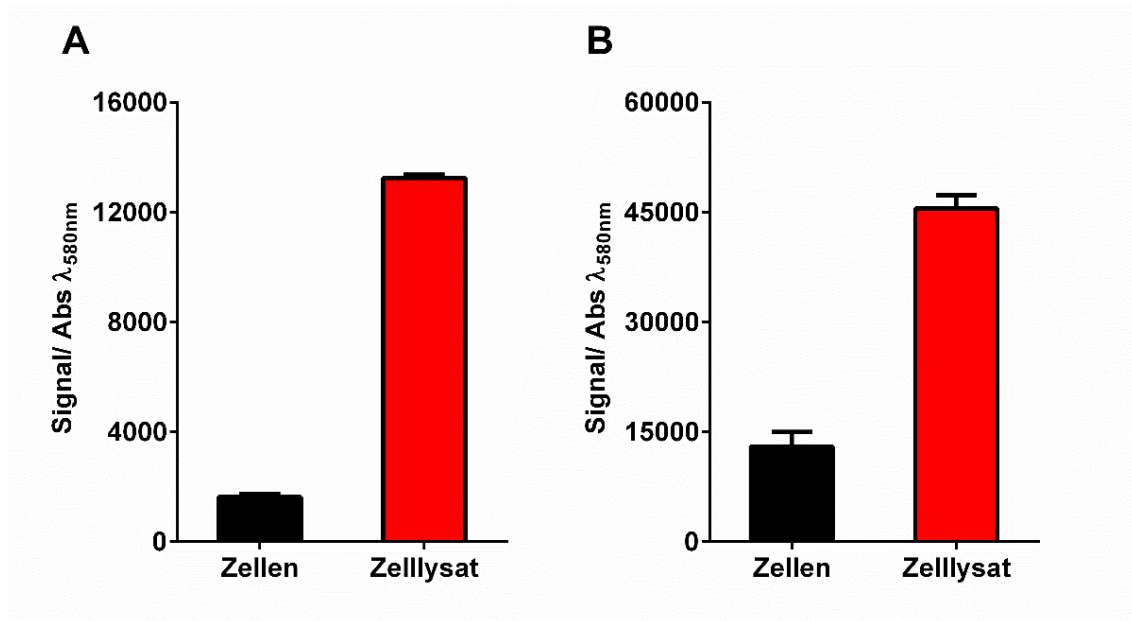


Abbildung 22 VividDye Signal für Zellen und Zelllysate.

Vergleich des VividDye Signals in lebender Zellkultur und im Zelllysate nach 2 Stunden Inkubation mit BOMCC Substrat für HepG2 Zellen A und primäre murine Hepatozyten B.

Um das Testverfahren zu verbessern, optimierte ich eine breite Palette von experimentellen Parametern, wie der Bestimmung der optimalen VividDye-Substratkonzentration, der Zellzahl, des Volumens des Mediums und der Inkubationszeit. Initial wurde der Einfluss der Zellzahl getestet, wobei Medium mit VividDye und unbehandelte Zellen als Negativkontrolle dienten (siehe Abbildung 23A). Die Zellzahl hatte einen deutlichen Einfluss auf die Verstoffwechslung des VividDye wobei kein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Fluoreszenzsignal erkannt wurde, VividDye- und unbehandelte Zellen wiesen nur eine geringe Fluoreszenz auf. In den späteren Experimenten wurde die Zellzahl erhöht und je nach verwendeten Zelltyp zwischen $2,5 \times 10^4$ $3,5 \times 10^4$ gehalten.

Der Einfluss der VividDye Konzentration von VividDye BOMCC-Substrat wurde von 1 μM bis 100 μM getestet (siehe Abbildung 23**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**B). Der Einfluss der Konzentration ist dadurch zu erkennen, dass höhere Konzentrationen zu einem stärkeren Signal führten. Keine der untersuchten Konzentration wies eine erkennbare Toxizität auf. Da bereits eine Konzentration von 1 μM VividDye in einem Vielfachen Signal im Vergleich zu nicht behandelten Zellen resultierte, wurde für alle weiteren Experimente eine Konzentration von 1 μM verwendet. Um nachzuweisen, dass der VividDye von den Zellen und nicht durch extrazelluläre Faktoren metabolisiert wurde, wurde der VividDye mit dem Überstand von Hepatozyten gemischt und vermessen (Abbildung 23C). Hierbei war kein Anstieg im Signal zu erkennen.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Volumens innerhalb der Nöpfchen der Mikrotiterplatten getestet, hierfür wurden 100, 150 und 200 μL getestet (siehe Abbildung 23D). Mit einem höheren Volumen ging ein geringer initialer Anstieg des Signals einher, was auf die höhere Menge an VividDye Substrat bei gleicher Zellzahl und der Verteilung des metabolisierten Substrats innerhalb eines größeren Volumens zurückzuführen ist.

Im weiteren Verlauf der Messung ist zu erkennen, dass die Nöpfchen die mit 100 μL befüllt waren ein abnehmendes Signal und eine zunehmende Standardabweichung aufweisen, dieser Effekt ist der Verdampfung des Mediums geschuldet. Die gestrichelte Linie markiert den 4 Stunden Zeitpunkt, in allen weiteren Experimenten wurde die Messzeit der kinetischen Zyklen bei 4 Stunden gehalten. Außerdem habe ich nachgewiesen, dass die VividDye Substrate sowohl in den lebenden Zellen als auch im Überstand nachgewiesen werden kann, wobei die ermittelte Verschiebung der Verhältnisse darauf hinweist, dass der VividDye zunächst in die Zellen diffundiert, dort verstoffwechselt wird und danach aus den Zellen rausdiffundiert (siehe Tabelle 9). Im Überstand konnte der VividDye für mehr als 20 Stunden nachgewiesen werden.

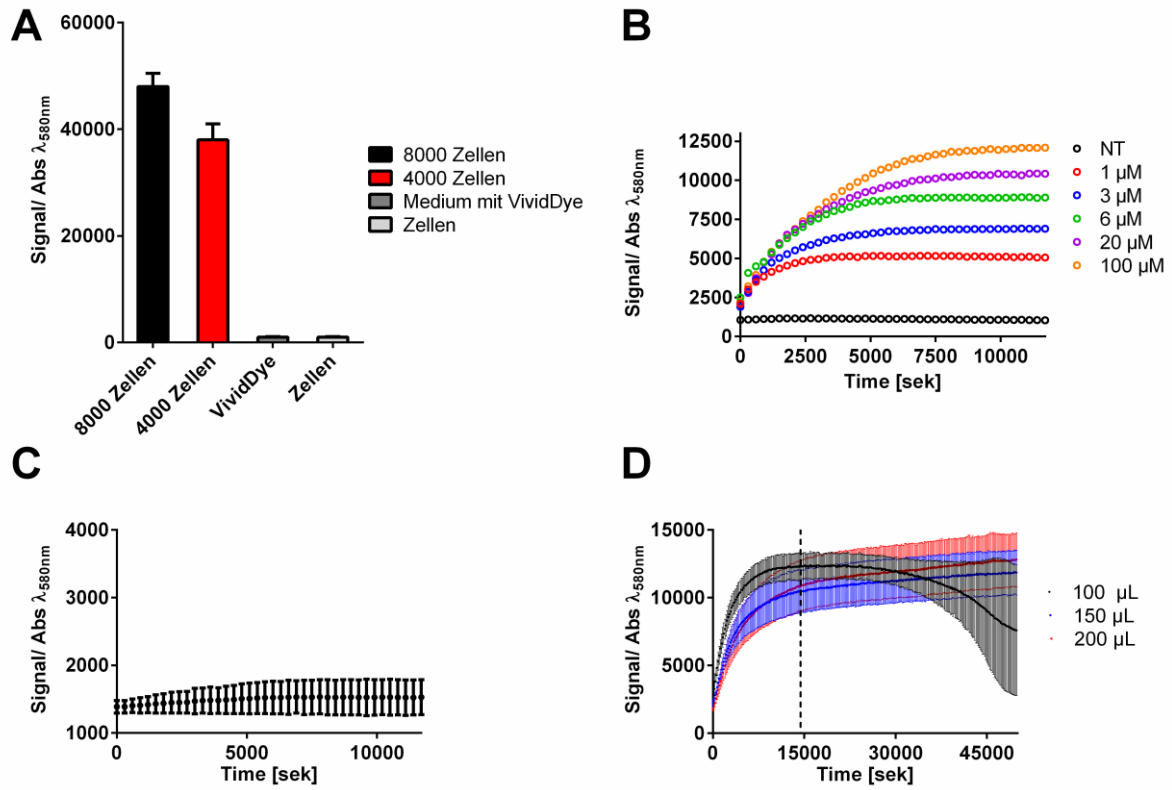


Abbildung 23 Optimierung des VividDye Tests.

Initiale Testung verschiedener Parameter zur Etablierung des VividDye Tests. A Einfluss der Zellzahl, B Einfluss der VividDye Konzentration, C Bestimmung des Hintergrundsignals D Einfluss des Probevolumens.

Tabelle 9 Verhältnis des VividDye Fluoreszenzsignals zwischen Zellen mit Überstand und reinem Überstand

Zeit [min]	Verhältnis Überstand- zu Zell+Überstand-Signal
10	$78 \pm 1,3$
20	$80 \pm 6,2$
40	$76 \pm 10,1$
50	$98 \pm 2,1$
60	$96 \pm 2,3$
90	$98 \pm 7,2$

Als nächsten Schritt habe ich den VividDye-Test auf verschiedene CYP-exprimierende und nicht exprimierende Zelllinien getestet. Da die basale Expression vieler CYP-Enzyme gering ist, wurde TCDD als Induktor verwendet. In der Literatur wird TCDD als Ligand des Aryl-Hydrogen-Rezeptor mit Induktion der assoziierten CYP, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 in Verbindung gebracht [126, 127]. Diese Dokumentation konnte von mir mittels qPCR und Westernblot bestätigt werden (siehe Abbildung 25). Hierbei zeigte E804 eine viel schnellere Induktion und führte schon nach einer Stunde zu einem Anstieg der CYP-Expressionslevel. Des Weiteren wurden leicht unterschiedliche Induktionen zwischen den verschiedenen CYP-Isoenzymen beobachtet, wobei TCDD die stärkste Induktion auf CYP1A1 und E804 die stärkste Induktion auf CYP1B1 zeigte. Der Vergleich der Proteinexpression nach 24h Behandlung führte sowohl für TCDD als auch E804 zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zu unbehandelten Zellen, zwischen den Behandlungen wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet.

Eine Übersicht über die verschiedenen Zelllinien und den resultierenden Signalen ist in Tabelle 10 dargestellt. Die Werte wurden als Vielfaches von nicht behandelten Zellen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass primäre murine Hepatozyten die höchste basale CYP-Expression mit 38.36 ± 3.66 - Vielfachen der unbehandelten Zellen aufweisen. iHep Zellen und HepaRG Zellen wurden sowohl an Tag 3 als auch an Tag 30 bzw. 20 getestet. Hierbei ist zu erkennen, dass an Tag 3 deutlich niedrigere Werte erreicht wurden, was auf einen undifferenzierten Phänotyp mit niedriger CYP-Expression hinweist. Für alle Zelllinien wurde eine höhere Aktivität nach der Induktion mit TCDD beobachtet.

Ergebnisse

HLEC (humane Leber Endothelien) Zellen, dienten als negativ Kontrolle, die basale und die induzierte Aktivität weisen keinen signifikanten Unterschied auf, was dafürspricht, dass diese Zellen keine CYP-Aktivität aufweisen. Betrachtet man die Induktion durch TCDD fällt auf das HepG2 und HepaRG Zellen an Tag 30 die stärkste Induktion im Vergleich zur basalen Expression aufweisen, im Vergleich dazu haben pmH nur die ca. 3-fache Induktion im Vergleich zur basalen Aktivität erhalten.

Um die in Tabelle 10 dargestellten Ergebnisse weiter zu bestätigen und einen zweiten Vergleichsparameter zu generieren wurde eine umfassende qPCR-Analyse der CYP-Expression angefertigt. Die dargestellten Werte entsprechen ΔC_t -Werten als Referenzgen wurde Aktin verwendet. Wie erwartet weisen pmH die höchste Expression an CYP-Enzymen auf, gefolgt von iHep, upcyte Hepatocyten, HepaRG und HepG2 Zellen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit Tabelle 10, ergibt sich für die Werte der basalen Expression im VividDye-Test dieselbe Reihenfolge.

Tabelle 10 Bestimmung der basalen und induzierten CYP-Aktivität verschiedenen Zelllinien mittels VividDye Test.

Zelllinien	Basal	20 nM TCDD Induktion
HepG2	8.65 ± 0.80	94.30 ± 15.1
iHep Tag 3	3.02 ± 0.19	8.39 ± 1.40
iHep Tag 30	10.98 ± 0.46	24.83 ± 4.24
HepaRG Tag 3	2.04 ± 0.25	8.14 ± 2.22
HepaRG Tag 20	7.27 ± 0.55	100.15 ± 3.92
Upcyte Hepatocytes	9.92 ± 0.52	82.05 ± 2.09
pmH	38.23 ± 3.66	101.75 ± 4.22
HLEC	1.94 ± 0.23	2.16 ± 0.13

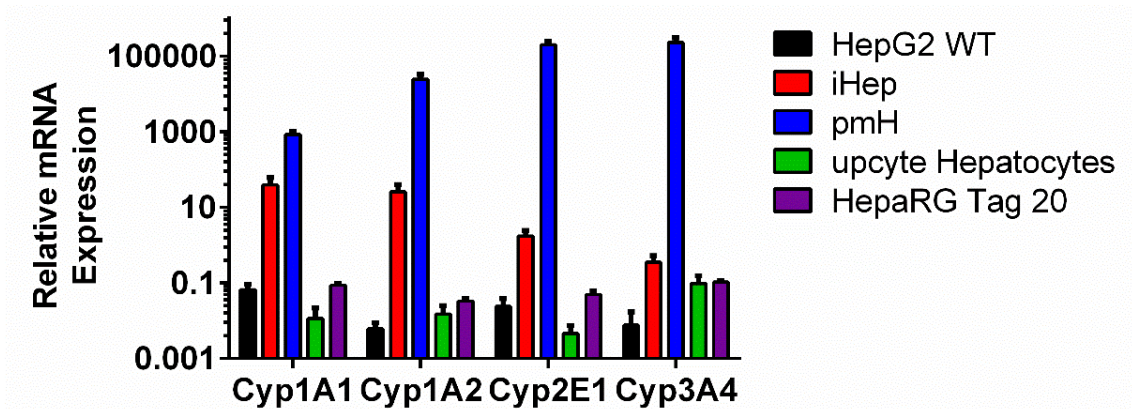


Abbildung 24 mRNA Expression verschiedener CYP450 in Hepatozyten.

Übersicht der mRNA Expression verschiedener CYP-Isoenzyme in unterschiedlichen Hepatozyten und hepatozyten ähnlichen Zelllinien. Die Werte sind als delta CT dargestellt, als Referenzgen wurde Actin verwendet. Zur Bestimmung der Individuellen Datenpunkte wurden n=3 Experimente verwendet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

Da der VividDye Test mit allen untersuchten Zelltypen positive Ergebnisse für sowohl die basale als auch die induzierte CYP-Aktivität geliefert hat, wurden zur Testung weiterer Anwendungsmöglichkeiten HepG2 Zellen verwendet. Im Fokus der experimentellen Reihe stand die Ausweitung der verwendeten Induktoren und Inhibitoren sowie Fragestellung, ob der VividDye-Test konzentrationsabhängige Induktionen spezifisch nachweisen kann.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse, die durch die Behandlung mit TCDD erzielt wurden, wurde E804 verwendet, eine Substanz die aufgrund ihrer Struktur ein potenzieller AhR –Ligand ist und auch als solcher identifiziert wurde [128]. Zunächst wurde wie bei TCDD HepG2 Zellen mit E804 behandelt und eine qPCR und ein Westernblot durchgeführt (siehe Abbildung 25). HepG2 Zellen wurden für 24 Stunden mit 5 nM, 10 nM und 20 nM TCDD (siehe Abbildung 26) sowie 500 nM, 1µM, 2µM, 5 µM E804 (siehe Abbildung 27) behandelt. Als VividDye Substrate wurden BOMCC, EOMCC, BOMR und OOMR verwendet.

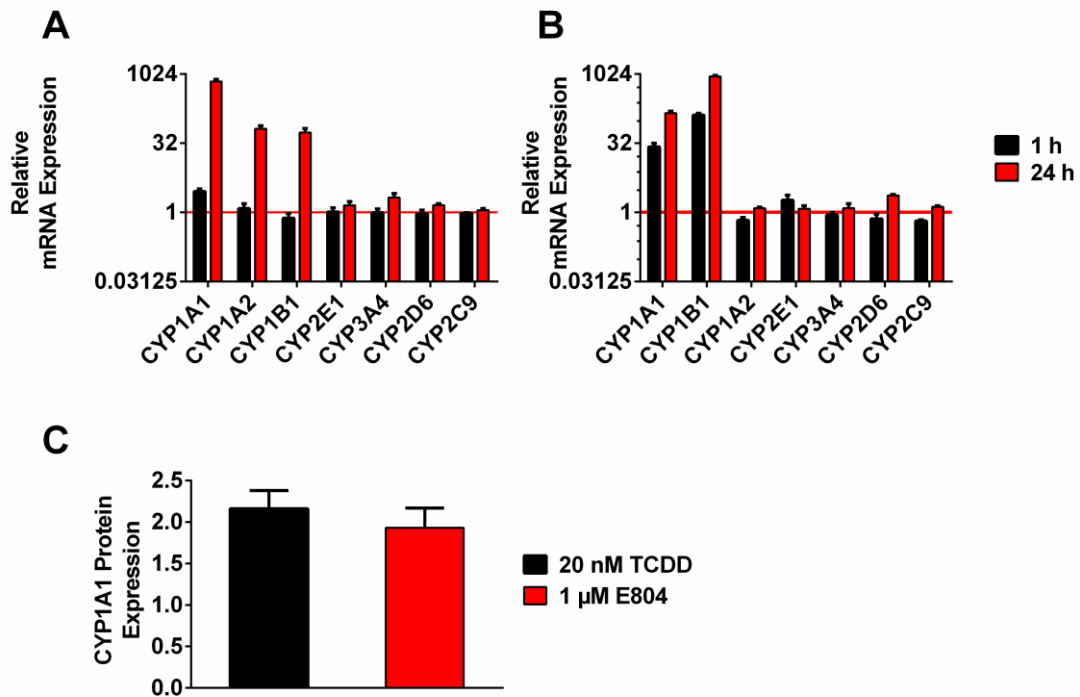


Abbildung 25 mRNA- und Proteinexpression nach TCDD Behandlung.

Relative mRNA Expression von HepG2 Zellen nach Behandlung mit 20 nM TCDD (A) und 1 μ M E804 (B) für 1h (schwarz) und 24 h (rot). C Vergleich der Proteinexpression von CYP1A1 im Verhältnis zu unbehandelten Zellen. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus n=3 Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.4.1 Kinetische Messungen der CYP-Aktivität mittels Verstoffwechslung der VividDye Substrate nach Wirkstoffbehandlung

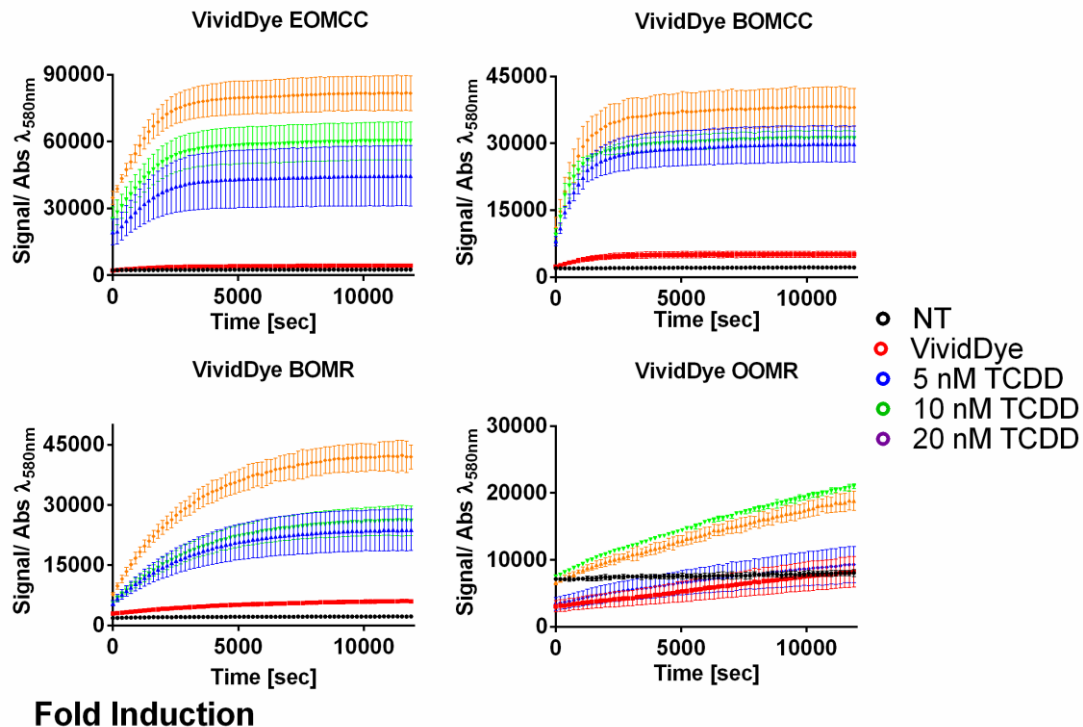


Abbildung 26 VividDye Kinetik nach TCDD Behandlung.

Übersicht über den kinetischen Verlauf des Fluoreszenzsignals für EOMCC, BOMCC, BOMR und OOMR VividDye Substrat über die Zeit mit kinetischen Zyklen von 3 Minuten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an TCDD (5,10,20 nM). Die Werte wurden in 96 Well Format mit HepG2 Zellen im Mikrotiterplattenlesegerät ermittelt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus n=5 Näpchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die unten beigefügte Tabelle zeigt die vielfache Induktion der Behandlung im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem VividDye Substrat behandelt wurden. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

Für BOMCC, EOMCC und BOMR konnte ein Zusammenhang der TCDD Konzentration und des erhaltenen Signals ermittelt werden. Beim OOMR Substrat wurde keine Verstoffwechslung erkannt. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheinen BOMCC, EOMCC und BOMR auch von CYPs metabolisiert zu werden, welche mit dem AhR in Verbindung stehen,

Ergebnisse

namentlich 1A1, 1A2, 1B1. Eine Induktion von 2B6, 2C9, 2C19, 2E1, 3A4 welche laut Herstellerangaben BOMCC und BOMR verstoffwechseln, durch TCDD wurde nicht erkannt (siehe Abbildung 25). Die Tatsache, dass EOMCC die stärkste Induktion aufweist, könnte damit zusammenhängen, dass laut Hersteller EOMCC von CYP1A2 verstoffwechselt wird, welches durch die Behandlung mit TCDD induziert wurde.

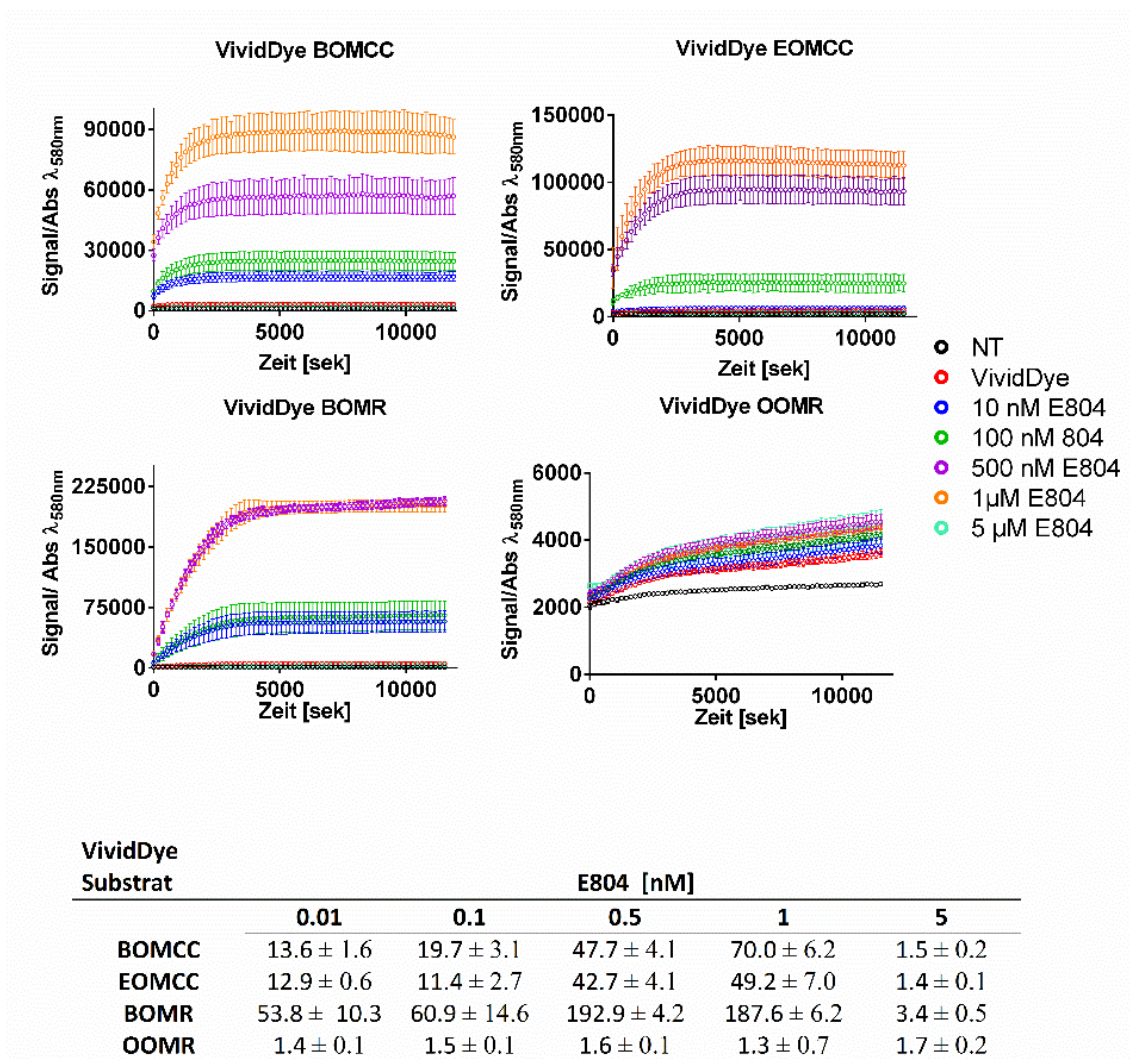


Abbildung 27 VividDye Kinetik nach E804 Behandlung.

Übersicht über den kinetischen Verlauf des Fluoreszenzsignals für EOMCC, BOMCC, BOMR und OOMR VividDye Substrat über die Zeit mit kinetischen Zyklen von 3 Minuten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an E804 (10, nM 100 nM, 500 nM, 1 μM und 5 μM). Die Werte wurden in 96 Well Format mit HepG2 Zellen im Mikrotiterplattenlesegerät ermittelt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus n=5 Näpchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Es ist zu beachten, dass die Behandlung mit 5 μM zum Zelltod führte. Die unten beigefügte Tabelle zeigt die vielfache Induktion der Behandlung im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem VividDye Substrat behandelt wurden. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

Für E804, ergibt sich ein ähnliches Bild wie für TCDD, EOMCC, BOMCC und BOMR zeigten eine konzentrationsabhängige Antwort. Bei OOMR blieb die Verstoffwechslung aus. Hierbei ist zu beachten, dass E804 in der hundertfachen Konzentration im Vergleich zu TCDD behandelt wurde. Die Behandlung mit 5 μ M E804 tötete die gesamte Zellpopulation ab, wodurch keine Induktion mehr erkannt werden konnte.

Betrachtet man die Induktion der Signale der verschiedenen VividDye-Substrate, fällt auf, dass BOMR bei der Behandlung mit E804 die höchste Induktion erfuhr. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die qPCR der E804 Behandlung, ist zu erkennen, dass erstens die Behandlung mit E804 bereits nach einer Stunde zu einer Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 führte und dass die Induktion von CYP1A2 ausblieb. Eine Induktion von CYP3A4, welches laut Hersteller das BOMR Substrate spaltet, wurde nicht erkannt.

Da sowohl auf Behandlung mit TCDD als auch mit E804 eine Induktion des Signals folgte, wurde versucht den Zusammenhang der VividDye-Verstoffwechslung mit dem AhR weiter zu untersuchen. Hierfür wurde eine Ko-Behandlung mit Resveratrol einem kompetitiven Inhibitor des AhR und eine HepG2 AhR^{KD} Zelllinie untersucht. Die Behandlung mit weiteren Substanzen, die mit der Induktion weiterer CYPs in Verdingung stehen wurde als späterer Schritt durchgeführt.

Zunächst wurde der Effekt der Resveratrol Behandlung auf die Expression von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 untersucht. Außerdem wurde die toxische Wirkung von Resveratrol mittels SRB-Test untersucht, wobei kein toxischer Effekt beobachtet werden konnte.

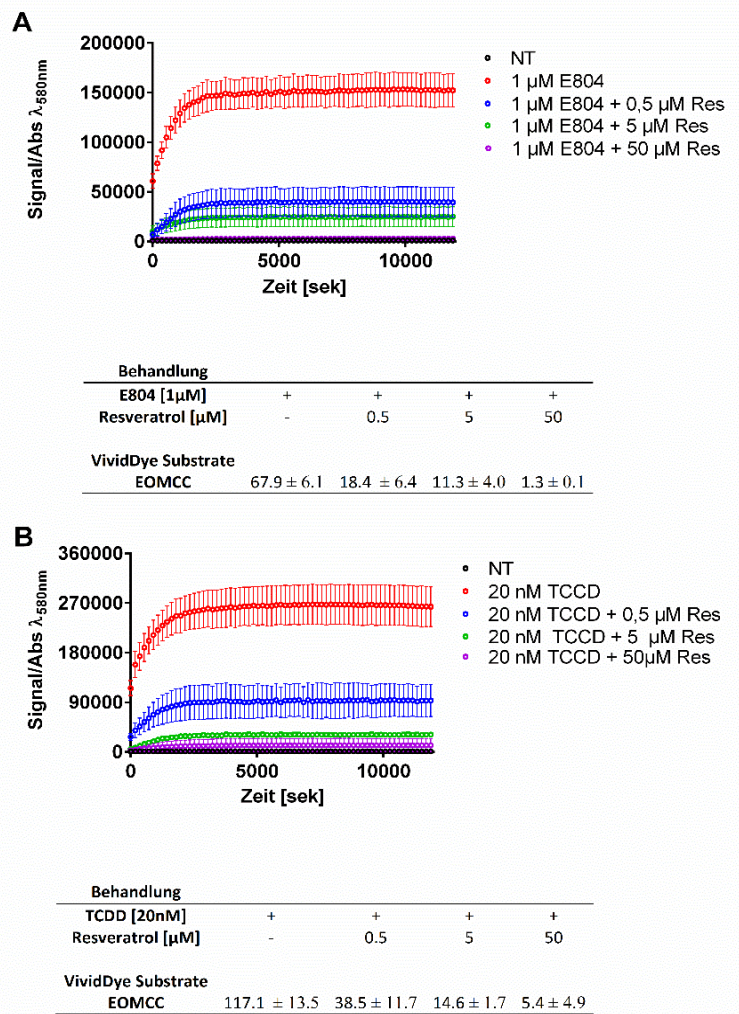


Abbildung 28 VividDye Kinetik nach Ko-Behandlung.

Ko-Behandlung von CYP Induktor und Inhibitor. Darstellung des Fluoreszenzsignals über die Zeit mit kinetischen Zyklen von 3 Minuten. A HepG2 Zellen die mit 1 μM E804 und Kombination aus E804 und Resveratrol behandelt wurden. B HepG2 Zellen die mit 20 nM TCDD und Kombination aus E804 und Resveratrol behandelt wurden. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus $n=5$ Näpchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die unten beigefügte Tabelle zeigt die vielfache Induktion der Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

Für den VividDye Test wurden HepG2 mit TCDD, E804 und verschiedenen Kombinationen aus Resveratrol und den zwei zuvor genannten Substanzen behandelt (siehe Abbildung 28). Die Ergebnisse zeigen, dass ein konzentrationsabhängiger Rückgang des Signals mit steigender Resveratrol Konzentration sowohl für E804 als auch TCDD erkannt werden konnte. Die Co-Behandlung mit 50 μM führte im Fall von E804 zu einem kompletten Rückgang des Signals. Die Beobachtung, dass TCDD in Verbindung mit EOMCC zu einem stärkeren Signal als E804 führte konnte bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der VividDye es ermöglicht auch die Effekte komplexerer Ko-Behandlung auf die CYP-Aktivität zu analysieren. Außerdem

wurde der Zusammenhang der VividDye-Verstoffwechslung mit dem AhR bestätigt. Der Effekt von Resveratrol wurde außerdem an murinen iHep Zellen getestet. Hierbei konnte allerdings kein Rückgang des VividDye Signals mit steigender Resveratrol Konzentration beobachtet werden (siehe Tabelle 11). Die 20 nM TCDD Behandlung erreicht 8,4-fache Werte, ähnliche Werte wurden auch in Tabelle 10 bestimmt. Diese Beobachtung erscheint verwunderlich, da Resveratrol als Antagonist zu TCDD auch in Maushepatozyten charakterisiert wurde [129, 130].

Tabelle 11 TCDD Resveratrol Ko-Behandlung mit murinen iHep Zellen. Die Werte stellen das Vielfache von Zellen die nur mit dem VividDye behandelt wurden dar.

Behandlung	Vielfaches
20 nM TCDD	8,40 ± 1,33
20 nM TCDD + 0,5 µM Resveratrol	8,32 ± 0,16
20 nM TCDD + 5 µM Resveratrol	8,67 ± 0,38
20 nM TCDD + 50 µM Resveratrol	7,67 ± 1,15

Als Nächstes habe ich HepG2 WT mit HepG2 AhR^{KD} verglichen. Meiner Vermutung nach sollte HepG2 AhR^{KD} ein geringeres VividDye Test Signal liefern als der Wildtyp. Zunächst wurde mittels qPCR und Westernblot das AhR Level verglichen, wobei auf mRNA-Ebene ein Rückgang auf $0,36 \pm 0,05$, auf Proteinebene ein Rückgang auf $0,6 \pm 0,11$ ermittelt wurde (siehe Abbildung 29). Danach wurden beide Zelllinien unbehandelt und mit 10 TCDD behandelt auf ihre CYP-Aktivität getestet, hierfür wurden BOMCC, EOMCC und BOMR Substrat verwendet (siehe Abbildung 30). Betrachtet man die Ergebnisse, ist zu erkennen, dass die Signale im VividDye Test für unbehandelte Zellen deckungsgleich sind, was für eine gleich hohe basale Expression der CYP-Enzyme spricht. Für die Induktion mit 10 nM TCDD hingegen wurde bei allen drei VividDye Substraten eine höhere Induktion im Wildtyp beobachtet. Vergleicht man das Verhältnis der Induktionslevel ergibt für alle drei Farbstoffe ergibt sich $0,61 \pm 0,1$ was ungefähr dem ermittelten Rückgang auf der AhR Expression auf der Proteinebene entspricht.

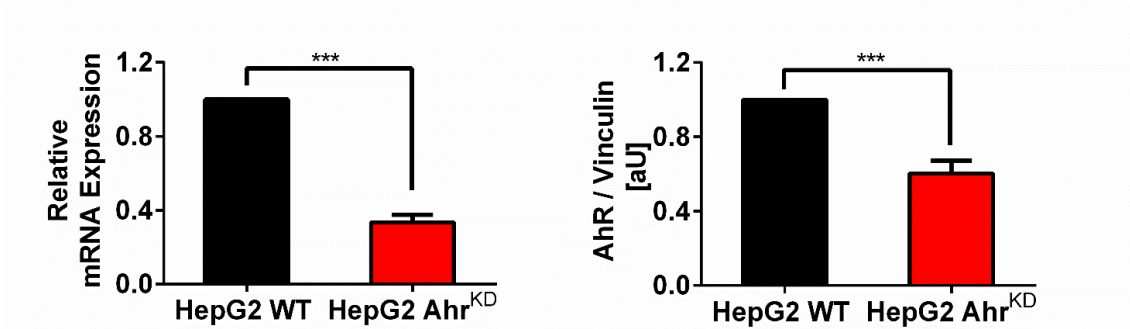


Abbildung 29 mRNA und Proteinexpression in HepG2 WT und HepG2 AhR^{KD}.

Vergleich der mRNA Expression A und der Protein Expression B von HepG2 WT und HepG2 AhR^{KD} Zellen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die statistische Signifikanz wurde mittel t-Test berechnet, wobei p-Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen.

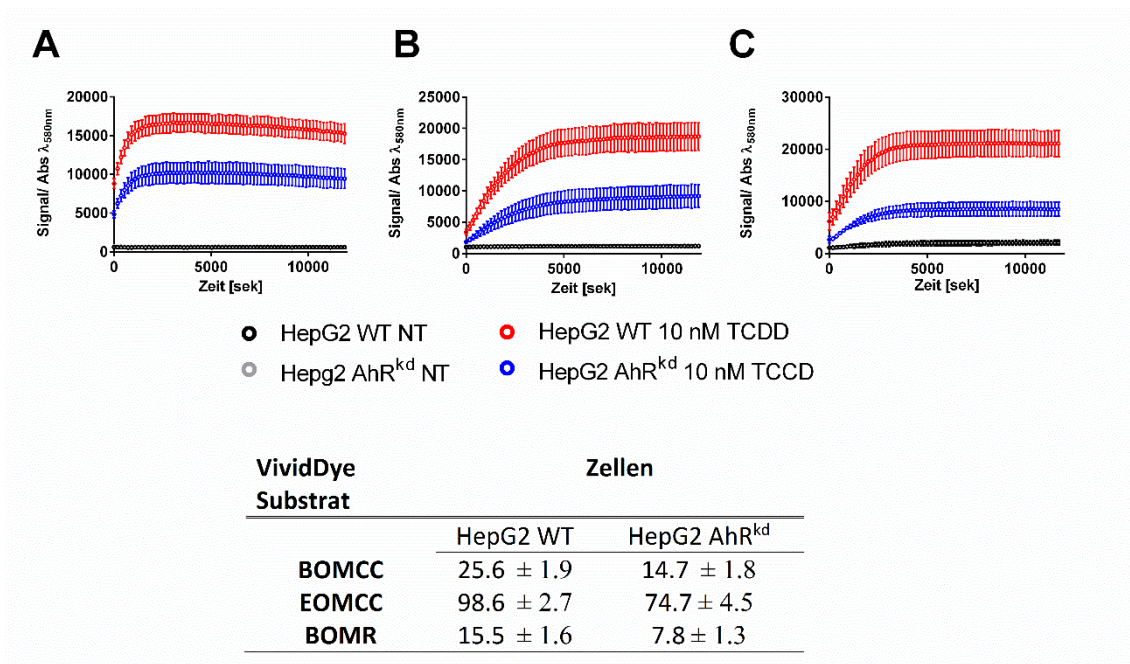


Abbildung 30 VividDye Kinetik HepG2 WT und HepG2 AhR^{KD}.

Übersicht über den Verlauf des Fluoreszenzsignals für BOMCC (A) und BOMR (B) und EOMCC (C) Substrat über die Zeit mit kinetischen Zyklen von 3 Minuten für unbehandelte und mit 20 nM TCDD behandelte HepG2 WT und HepG2 AhR^{KD}. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die unten beigefügte Tabelle zeigt die vielfache Induktion der Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

Wie in Abbildung 26 bis Abbildung 30 zu erkennen ist, wurde ein Zusammenhang des AhR und der Induktion assoziierter CYPs mit dem VividDye Metabolismus nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass der VividDye auch den zellulären genetischen Hintergrund berücksichtigen kann.

Verschiedene VividDye Substrate weisen laut Hersteller verschiedene CYP-Enzyme

nachweisen (siehe Tabelle 12). Hierbei wurde versucht mit spezifischen Kombinationen aus Substrate und Induktoren den Effekt auf einzelne CYP-Isoenzyme nachzuweisen. Die Liste der getesteten Substanzen wurde auf in der Literatur etablierte Induktoren von CYP-Isoenzymen ausgeweitet und jeweils mit den drei VividDye Substraten kombiniert. Abbildung 31 die ermittelten Induktionen, wobei diese mit Zellen, die nur mit dem VividDye behandelt wurden verglichen worden sind.

Tabelle 12 Übersicht der VividDye Substrate und der laut Hersteller angegebenen Isoenzyme, die diese verstoffwechseln.

VividDye-Substrate	CYP Isoenzyme
BOMCC	2B6, 2C19, 3A4
EOMCC	1A2, 2C9, 2E1
BOMR	3A4
OOMR	2C9

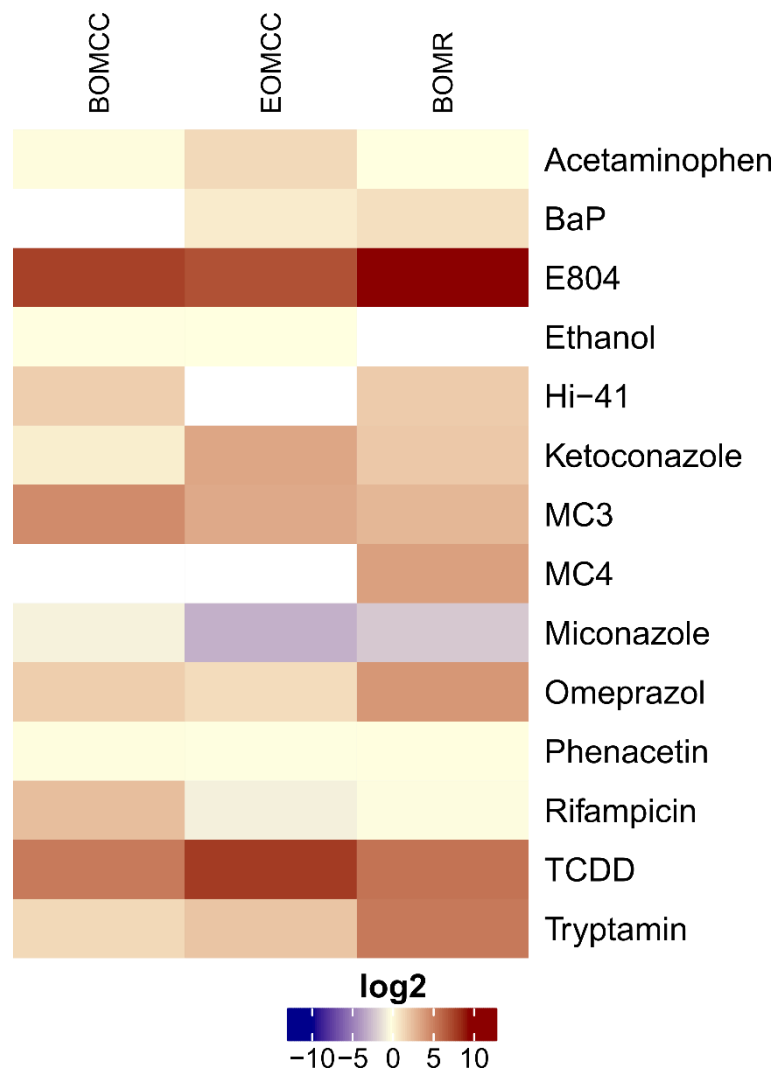


Abbildung 31 VividDye Induktion verschiedener Substanzen.

Darstellung der Induktion des VividDye Signals für BOMCC-, EOMCC- und BOMR-Substrat nach der Behandlung mit verschiedenen Substanzen. Die Messwerte sind als Vielfaches auf einer log₂-Skala von Zellen, die nur mit VividDye behandelt wurden dargestellt. Weiße Vierecke stellen fehlende Messwerte dar.

Neben TCDD und E804 wurde für MC3, MC4 und Omeprazol eine Induktion des VividDye Signals festgestellt. Trotz der Ausweitung der verwendeten Substanzen konnte jedoch keine direkte Zuordnung der VividDye Substrate und CYP-Isoenzyme getroffen werden, dieser Punkt wird in der Diskussion aufgegriffen und genauer diskutiert. Neben der Wirkstoffbehandlung wird die Expression von CYP-Enzymen durch das extrazelluläre Umfeld der Zellen und der Differenzierung der Hepatozyten bestimmt.

Im Fall des Erstgenanntem haben verschiedene Publikationen den Effekt von Oberflächenbeschichtungen, der 2D vs. 3D Zellkultur und der Ko-Kultur von Hepatozyten mit nicht parenchymalen Zellen verglichen und beschrieben [41].

3.4.2 Einflusses des zellulären Umfelds, 2D-, 3D-Kultivierung und Co-Kultur auf metabolische Aktivität von Hepatozyten *in vitro*

Da die Optimierung der Zellkulturbedingungen für Hepatozyten ein sehr komplexes Feld ist, habe ich drei stark vereinfachte Kulturbedingungen verwendet. Ziel war es zu beweisen, dass der VividDye Test auch die Einflüsse der Kulturbedingungen nachweisen kann. Hierfür wurden HepG2 und upcyte Hepatozyten in 2D Monolayer, Ko-Kultur und in Sandwich-Kulturen kultiviert und nach 5 Tagen mit dem VividDye behandelt. Wie in den vorherigen Experimenten wurde eine Gruppe der Zellen zur Induktion der CYP-Aktivität mit 20 nM TCDD behandelt, die andere Gruppe blieb unbehandelt und spiegelte die basale CYP-Aktivität wieder. VividDye Signal wurde in Bezug auf die 2D Kultur mit den beiden anderen Kulturbedingungen verglichen, wobei sowohl für das basale als auch für das induzierte Signal ein signifikanter Unterschied ermittelt wurde. Das basale Level war sowohl für HepG2 Zellen (Abbildung 32 A) als auch für upcyte Hepatozyten (Abbildung 32 B) in der Ko-Kultur am höchsten, für die mit TCDD behandelte Gruppe wies die Sandwich-Kultur die höchste Induktion auf. Die Verstoffwechslung wurde im Überstand nachgewiesen, die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Die unter der Grafik dargestellte Tabelle zeigt das ermittelte Signal als Vielfaches des Signals von Medium mit VividDye Substrat. Vergleicht man die für die 2D Kultur ermittelten Ergebnisse mit Abbildung 7 fällt auf, dass HepG2 Zellen sowohl basal als auch induziert ein signifikant geringeres Signal aufweisen. Dies ist meiner Meinung nach sowohl auf die unterschiedlichen Bedingungen zurückzuführen (Signalmessung im Nöpfchen mit Zellen im Vergleich zum Nachweis im Überstand) und die 5 tägige Kultur mit dem einhergehenden Rückgang der CYP-Expression. Im Gegensatz dazu weisen die upcyte Hepatozyten leicht höhere Werte auf, was ebenfalls auf die unterschiedlichen Messbedingungen zurückzuführen ist.

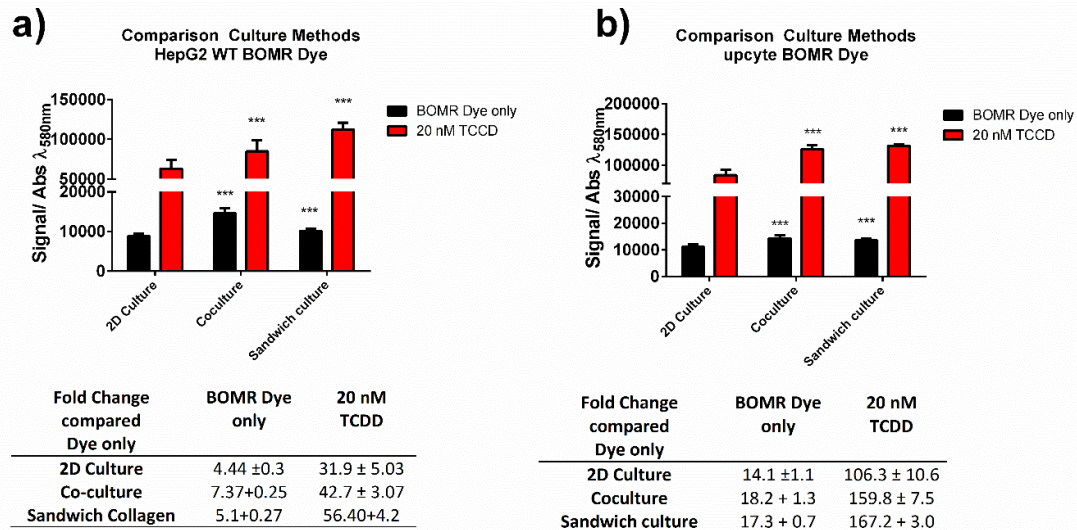


Abbildung 32 Einfluss der Kulturbedingungen auf das VividDye Signal.

Vergleich des Fluoreszenzsignals unter verschiedenen Kulturbedingungen für HepG2 Zellen (A) und upcyte Hepatozyten (B). Die Schwarzen Balken stellen Zellen die nur mit BOMR Dye, die roten Balken Zellen die mit 20 nM TCDD vorbehandelt wurden dar. Das Fluoreszenzsignal wurde 2 Stunden nach Zugabe des VividDye Substrats im Überstand durchgeführt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert aus $n=4$ Experimenten dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die statistische Signifikanz wurde mittel t -Test berechnet, wobei p -Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 * ** und *** entsprechen. Die unten beigefügte Tabelle zeigt die vielfache Induktion der Behandlung im Vergleich zum Zellkulturmedium mit VividDye. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

3.4.3 Verlauf der CYP-Aktivität während der zellulären Differenzierung

Um den Einfluss der Differenzierung von Hepatozyten nachzuweisen, wurden HepaRG Zellen verwendet, da diese über einen Zeitraum von 25 Tagen von Vorläuferzellen zu zwei Populationen, Hepatozyten und Cholangiozyten differenzieren [34]. HepaRG Zellen wurden in zwei Gruppen, nicht induziert und TCDD induziert, für 21 Tage mit VividDye behandelt (siehe Abbildung 33A). Außerdem wurde die Expression verschiedenen CYP-Isoenzyme mittels qPCR bestimmt (siehe Abbildung 33B). Als weiterer Indikator der Differenzierung wurde die Albumin Sekretion und Harnstoff Synthese über den Differenzierungszeitraum bestimmt (siehe Abbildung 33C).

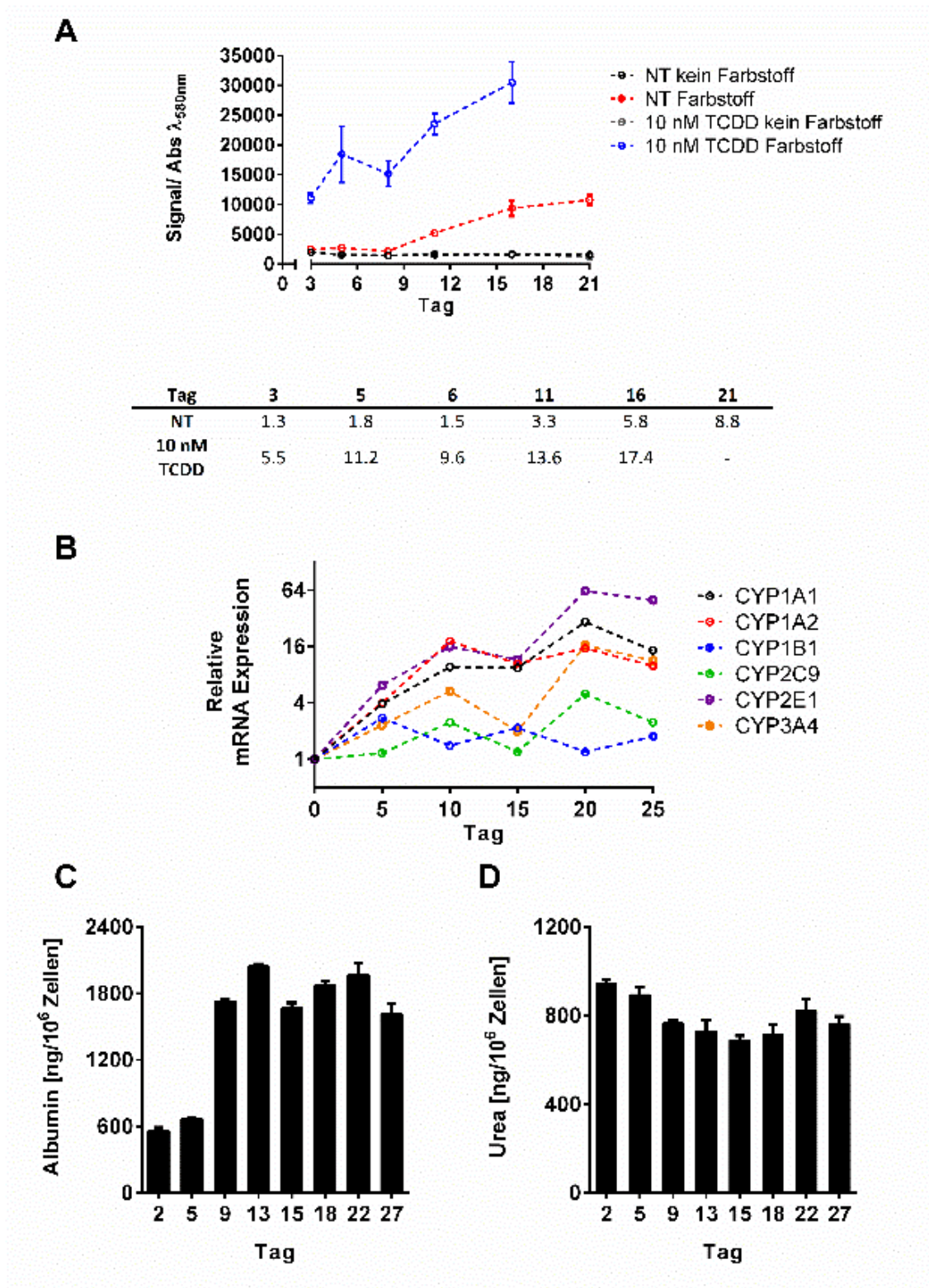


Abbildung 33 Einfluss der Zelldifferenzierung auf das VividDye Signal.

A Verlauf des Fluoreszenzsignals über 21 Tage Differenzierungszeitraum von HepaRG Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt und mit 10 nM TCDD induziert untersucht. Fluoreszenzsignal wurde 2 Stunden nach Zugabe des VividDye Substrats im Überstand durchgeführt. Als negativ Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit VividDye behandelt wurden (schwarz und grau). Jeder Messwert stellt den Mittelwert aus $n=4$ Experimenten dar. B Zeitlicher Verlauf der relativen mRNA-Expression verschiedener CYP-Isoenzyme. Jeder Messwert stellt den Mittelwert aus $n=3$ Experimenten dar. C Zeitlicher Verlauf der Albumin Expression während der Differenzierung von

Ergebnisse

HepaRG Zellen. D Zeitlicher Verlauf der Harnstoff Synthese während der Differenzierung von HepaRG Zellen. Jeder Messwert stellt den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

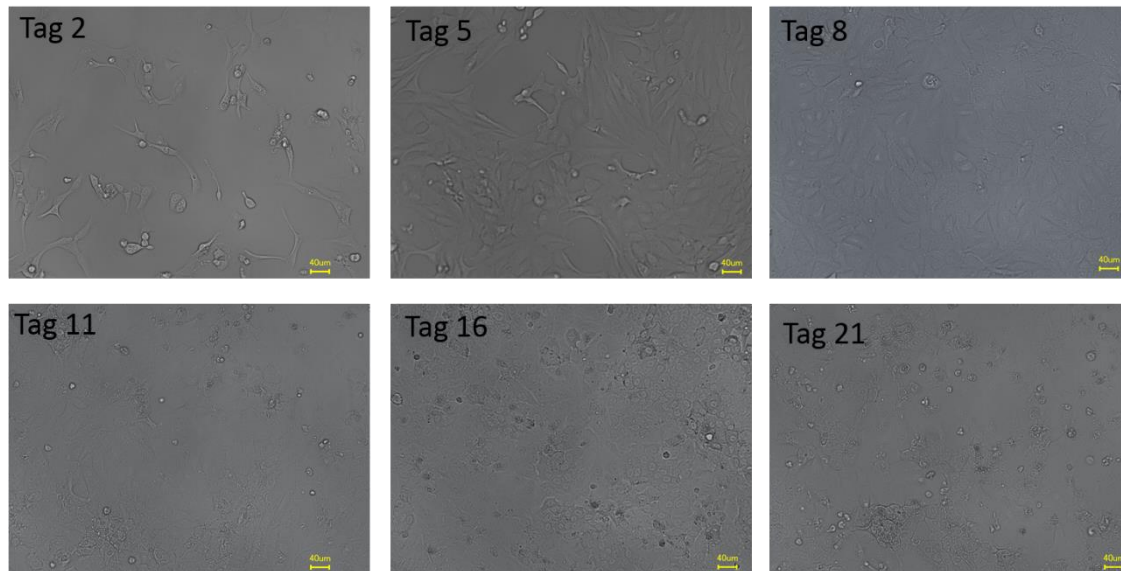


Abbildung 34 Verlauf der HepaRG Differenzierung.

Hellfeldaufnahmen von HepaRG Zellen in statischer Mikrotiterplattenkultur über den Differenzierungszeitraum von 21. Die Änderung der Zellen zu einer pflastersteinartigen Morphologie deutet die Differenzierung in Hepatozyten an.

Betrachtet man die Ergebnisse ist zu erkennen, dass der VividDye Test es auch ermöglicht die Differenzierung von Zellen zu verfolgen. Zellen, die nicht mit dem VividDye behandelt wurden und als Negativkontrolle dienten, zeigten über den gesamten Differenzierungszeitraum kein Anstieg des Signals.

Im Falle der mit TCDD induzierten Zellen ist bereits an Tag 3 ein 5,5-faches Signal zu erkennen, welches bis Tag 16 kontinuierlich ansteigt, an Tag 21 konnten bedauerlicherweise keine Daten generiert werden, da die Zellen eine zu niedrige Viabilität aufgewiesen haben. Für die unbehandelten Zellen wurde erst ab Tag 11 ein höheres Signal beobachtet. Betrachtet man im Vergleich hierzu die qPCR Daten ist zu erkennen, dass auch hier zwischen Tag 5 und 10 ein starker Anstieg aller untersuchten CYP-Isoenzyme zu erkennen ist. Ein ähnlicher Anstieg wurde für die Albumin Sekretion zwischen Tag 5 und Tag 9 beobachtet. Betrachtet man die Änderung der Morphologie der Zellen ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen an Tag 9 beginnen sich in Richtung von Hepatozyten zu differenzieren (siehe Abbildung 34). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der VividDye Test auch als Nachweis der Differenzierung von Hepatozyten einsetzbar ist, wobei eine direkte Zuordnung auf individuelle

CYP und deren Expressionslevel nicht möglich ist.

Der VividDye Test wurde außerdem auf das mikrofluidische Chipsystem ausgeweitet. Hierfür habe ich das Substrat, welches nachgewiesener Weise für über 24h stabil in Lösung bleibt, dem Zellkulturmedium beigefügt und wie im Material und Methodenteil beschrieben durch die Chips gepumpt. Im mikrofluidischen Aufbau haben mich zwei Fragestellungen besonders interessiert, die einmalige Induktion der Zellen und der Rückgang der CYP-Aktivität über die Zeit und die iterative Induktion. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der beiden Versuche. A zeigt den Rückgang der CYP-Aktivität, nach initialer Induktion mit 20 nM TCDD, das Signal erreichte 33 Stunden nach der Behandlung einen ähnlich niedrigen Wert wie unbehandelte Zellen. In Experiment wurde der VividDye Test vor der Behandlung mit TCDD (pre) und 4 Stunden nach der Behandlung mit TCDD (post) an zwei konsekutiven Tagen durchgeführt. Ein deutlicher Rückgang der CYP-Aktivität ist an Tag 2 pre zu erkennen, nach der Behandlung Tag 2 post wurde ein vergleichbar hohes Signal wie an Tag 1 post beobachtet. Diese Experimente zeigen, dass der VividDye ohne große Umstände mit dem mikrofluidischen System und OOC Systemen kombinierbar ist.

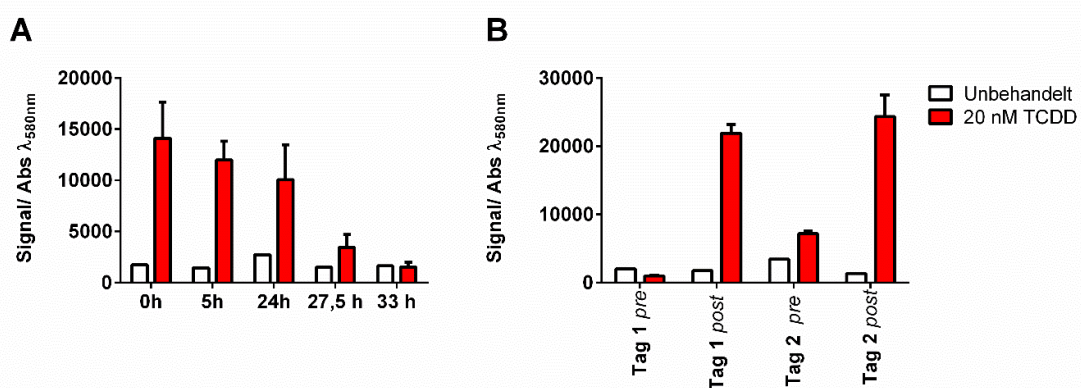


Abbildung 35 Kombination aus Mikrofluidik und VividDye Test.

Ergebnisse für VividDye auf den mikrofluidischen Plattformen. A Einmalige Behandlung mit TCDD und Messung des Fluoreszenzlevels über 33 Stunden. B Messungen Pre und Post TCDD Behandlung an zwei konsekutiven Tagen. Jeder Messwert stellt den Mittelwert aus $n=3$ Experimenten dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

3.4.3 Erfassung der CYP-Aktivität in einzelnen Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie

Als letzten Schritt wurde versucht ein alternatives Detektionssystem für den VividDye Test zu etablieren. Mikrotiterplattenlesegeräte erlauben keinen Rückschluss auf die CYP-Aktivität einzelner Zellen. In diesem Zusammenhang habe ich versucht einen mikroskopischen Aufbau zu etablieren, der es erlaubt die Verstoffwechslung der VividDye Substrate in Einzelzellen

Ergebnisse

nachzuweisen. Initial wurden primäre murine Hepatozyten verwendet, um den mikroskopischen Aufbau zu etablieren, allerdings wiesen diese mit dem veränderten Filteraufbau (siehe Tabelle 6) eine hohe Eigenfluoreszenz auf, wodurch Zellen mit und ohne VividDye Behandlung nicht unterschieden werden konnten. Die hohe Eigenfluoreszenz der Zellen ist auf Bestandteile der Gallenflüssigkeit wie Billirubin und Xanthine Derivate zurückzuführen [131].

HepaRG Zellen im Vergleich zeigten keine Eigenfluoreszenz und wurden verwendet. HepaRG Zellen wurden über 20 Tage differenziert, für 4 Stunden mit TCDD behandelt, mit VividDye (EOMCC und BOMR Substrat) inkubiert und mikroskopisch analysiert. Bilder wurden über einen Zeitraum von 20 Minuten aufgenommen (siehe Abbildung 36 A). Der Anstieg des fluoreszenten Signal wurde mittels ImageJ bestimmt Abbildung 36 B, zeigt den Verlauf als Vielfaches des initialen Wertes $t=0$. Vergleicht man die Steigung der Signale mit Abbildung 26 und Abbildung 27 ist zu erkennen, dass in beiden Experimenten das BOMR Substrat langsamer als das EOMCC Substrat verstoffwechselt wird, was auf die Beteiligung unterschiedlicher CYP-Isoenzyme hinweist.

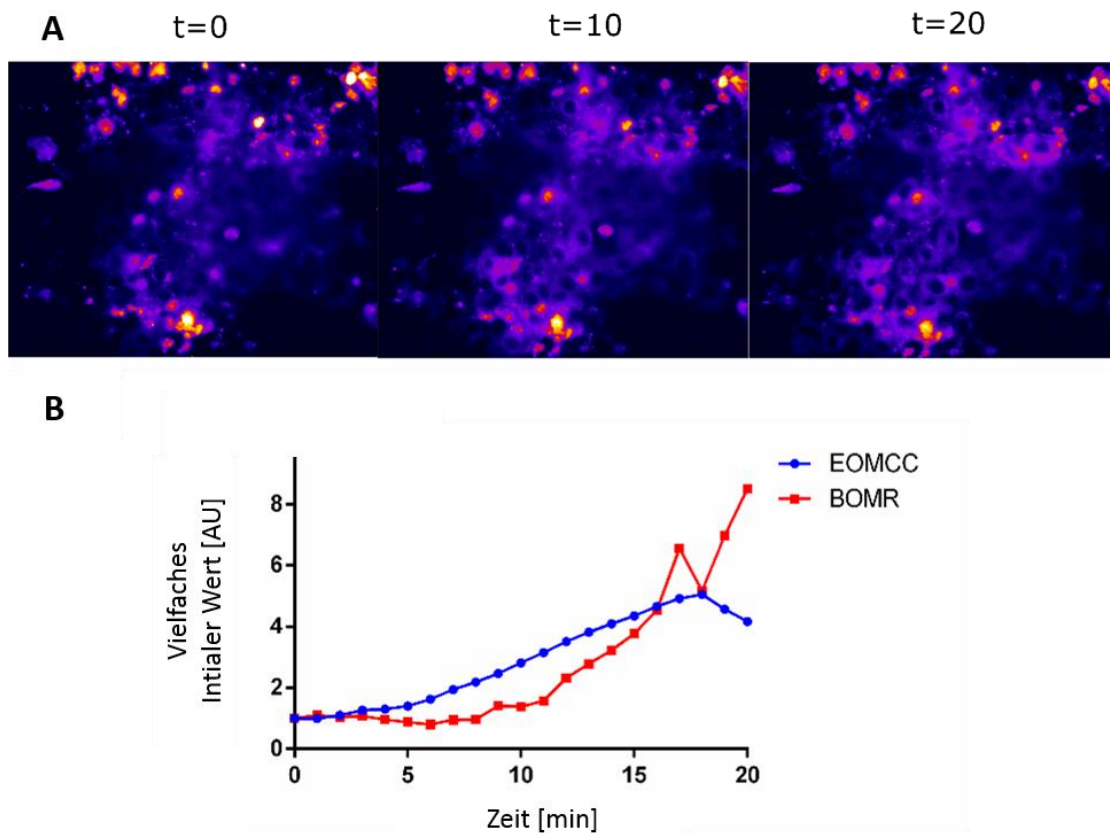


Abbildung 36 Kombination Mikroskopie und VividDye Test.

A Mikroskopische Aufnahmen von HepaRG Zellen bei 20 x Vergrößerung nach $t= 0,5,20$ Minuten. Das Signal entspricht der Fluoreszenz die durch den Metabolismus des VividDyes entsteht B

Darstellung des Anstiegs der Fluoreszenz über die Zeit, t_0 wurde 1 gesetzt. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [24].

Die Zuverlässigkeit des VividDye Test wurde durch den Z-Test bestimmt (siehe Formel 3.5). Hierbei stellt σ die Standardabweichung dar und μ den Mittelwert des Signals s und des Hintergrunds b . Generell gilt ein Test ab einem Wert von über 0.5 als zuverlässig. Die ermittelten Ergebnisse für die VividDye Substrate BOMCC, EOMCC und BOMR sind in Tabelle 13 dargestellt.

$$Z' = \frac{3\sigma_s + 3\sigma_b}{(\sqrt{\mu_s - \mu_b})^2} \quad \text{Formel 3.1}$$

Tabelle 13 Z-Werte für die VividDye Substrate

VividDye	Z'-value
<i>EOMCC</i>	<i>0,81</i>
<i>BOMCC</i>	<i>0,72</i>
<i>BOMR</i>	<i>0,87</i>

Zusammenfassend habe ich: Ein fluoreszenz-basiertes Testverfahren auf die Nutzung mit lebenden Zellen ausgeweitet und optimiert; Verschiedene Induktoren und Inhibitoren auf dem System getestet; Den Zusammenhang des VividDye-Metabolismus mit dem AhR Rezeptor nachgewiesen; Gezeigt, dass das System den Einfluss der Kulturbedingungen evaluieren kann; Dargestellt, dass der Test erlaubt zelluläre Differenzierung zu testen.

3.5 Nephrotoxizität nach Metabolisierung in der Leber in einem mikrofluidischen Leber-Nieren-Chip

Die Hepatotoxizität und die Nephrotoxizität sind entscheidende Faktoren in der Arzneistoffentwicklung und zwei Hauptgründe für den Marktrückzug bereits vermarkteter Medikamente. Dafür wurde in Kooperation ein mikrofluidischer Chip, der aus zwei miteinander verbundenen Kammern für menschliche Leber- bzw. Nierenzellen besteht, entwickelt. Dieses Design sollte die Testung primärer und sekundärer Toxizität am Beispiel der Hepatotoxizität und der leberassoziierten Nephrotoxizität untersuchen lassen (siehe Abbildung 37).

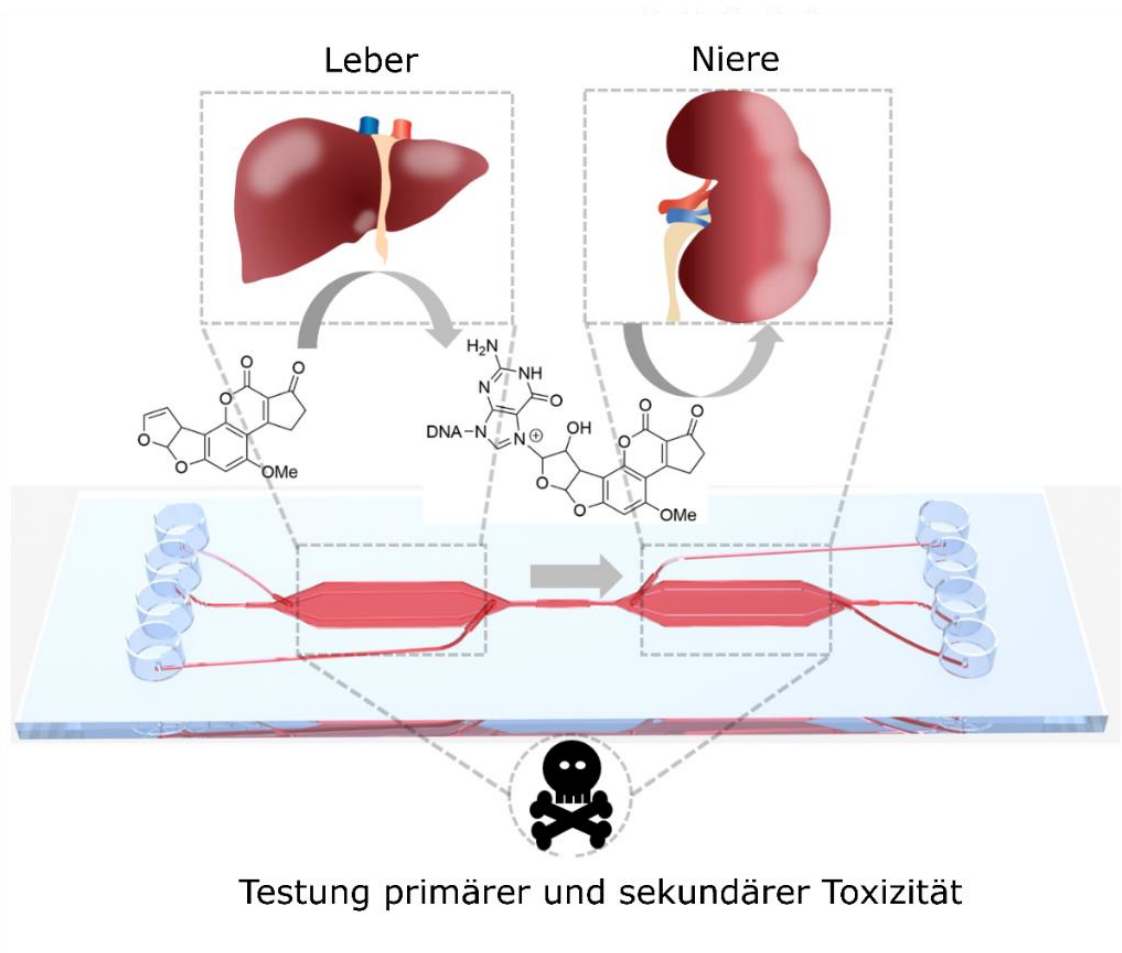


Abbildung 37 Übersichtgrafik des Teilprojektes *Metabolismus und Toxizität*. *Metabolismus und Bioaktivierung von Substanzen und deren konsekutive toxische Wirkung auf Nierenzellen in einem mikrofluidischen System. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [86].*

Die Bioaktivierung von Substanzen durch die Leber und die einhergehende toxische Wirkung der bioaktivierten Substanzen auf die Niere wurden am Beispiel von Aflatoxin B1 (AFB1) und Benzoalphanthrylen (BaP) durchgeführt. Beide Substanzen sind Umweltgifte, wobei Aflatoxin B1 das Gift eines Schimmelpilzes ist und BaP bei unvollständiger Verbrennung, wie sie beim Rauchen auftritt, entsteht. Beide Substanzen werden über die Leber bioaktiviert und Formen toxische Epoxide (siehe Abbildung 38). Es ist allgemein bekannt, dass hohe Konzentrationen dieser Toxine zu einer letalen akuten Toxizität führen können, während niedrige Konzentrationen mit chronischen toxischen Wirkungen und Krebs in Verbindung stehen [132-134]. Primäre Toxizität wird hauptsächlich in der Leber gefunden, während das zirkulierende metabolisierte Epoxid entferntes Gewebe schädigen kann [135]. Diese Eigenschaft macht die beiden Substanzen zu einem idealen Beispiel, um leberassoziierte Toxizität mithilfe eines OOC zu rekapitulieren.

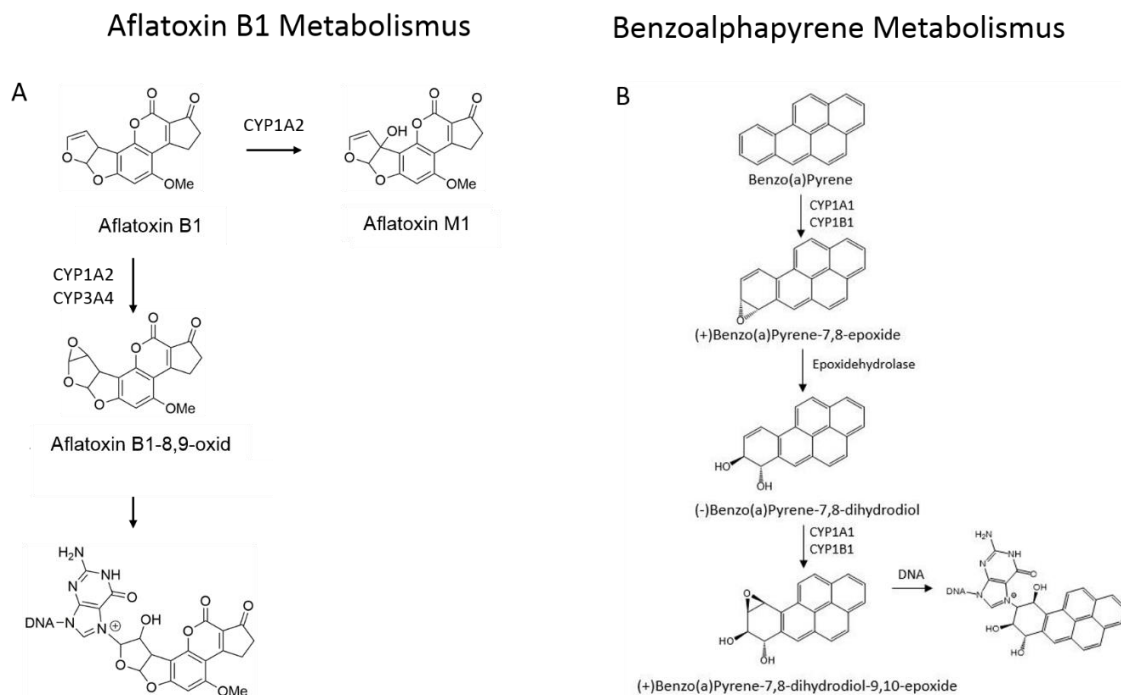


Abbildung 38 Stoffwechselweg von AFB1 und BaP.

A Aflatoxin B1 Metabolismus über CYP1A2 und CYP3A4. B Metabolismus von BaP über CYP1A1 und CYP1B1.

Initial habe ich die toxische Wirkung der beiden Substanzen auf HepG2 und Hek293 Zellen in statischer Zellkultur in Mikrotiterplatten durch einen SRB Test bestimmt. Für beide Zelllinien wurde eine höhere toxische Wirkung der Substanzen auf die Leberzellen festgestellt, was mit

der Literatur, dass Leber Zellen die Substanzen zu ihrer toxischen Epoxidform metabolisieren übereinstimmt (siehe Abbildung 39).

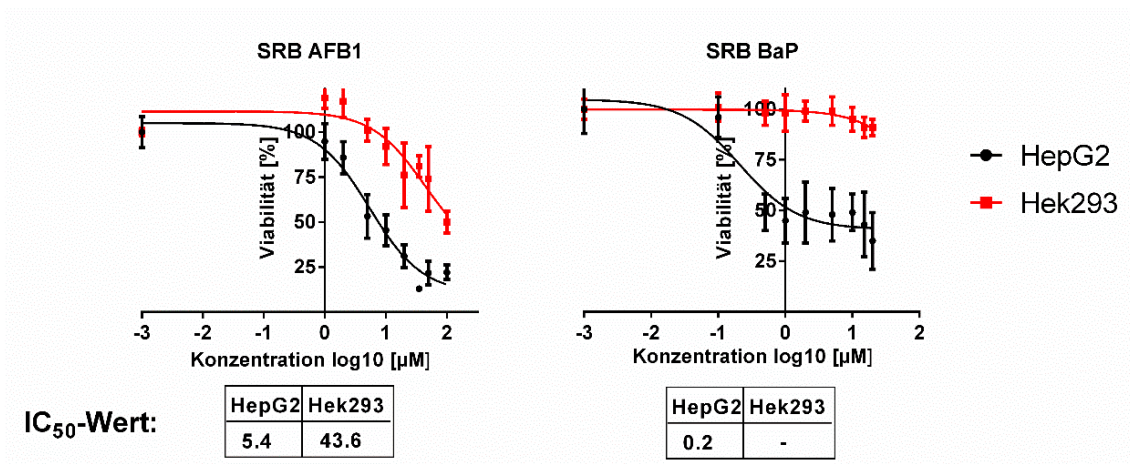


Abbildung 39 Toxizität von AFB1 und BaP.

SRB Daten zur toxischen Wirkung von AFB1 und BaP auf HepG2 und Hek293 Zellen. Der IC₅₀-Wert wurde für die jeweilige Behandlung und Zelllinie durch ein 3-Parameter fit in Graphpad Prism bestimmt.

Eine entscheidende Rolle in der Entwicklung neuer Arzneistoffe spielt die Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktion. Wie in der Einleitung beschrieben können CYP auf bestimmte Wirkstoffe reagieren, was zu ihrer Induktion oder Inhibition führen kann, und somit zu einem geänderten Metabolismus weiterer Substanzen. Da AFB1 hauptsächlich von CYP1A2 und CYP3A4 metabolisiert wird, wurde Rifampicin, ein potenter Induktor von CYP3A4, zur Analyse des Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktion ausgewählt. Im Falle von BaP sind hauptsächlich CYP1A1 und CYP1B1 für den Metabolismus verantwortlich, hier wurde TCDD als Induktor und Resveratrol als Inhibitor gewählt. In nächsten Schritt wurden HepG2 Zellen und Hek293 Zellen unter statischen Bedingungen direkt mit verschiedenen Konzentrationen von AFB1 5 µM, 22,5 µM und mit Kombinationen von 22,5 µM AFB1 und 25 µM Rifampicin behandelt. Außerdem wurden die Zellen mit dem Überstand der jeweils anderen Zelllinie behandelt, um auch in statischer Kultur einen möglichen Metabolismus und eine einhergehende höhere toxische Wirkung nachweisen zu können. Um den Anteil der toten oder stark beschädigten Zellen zu analysieren wurde eine PI-Färbung in Kombination mit einer FACS Analyse durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 40 zu finden.

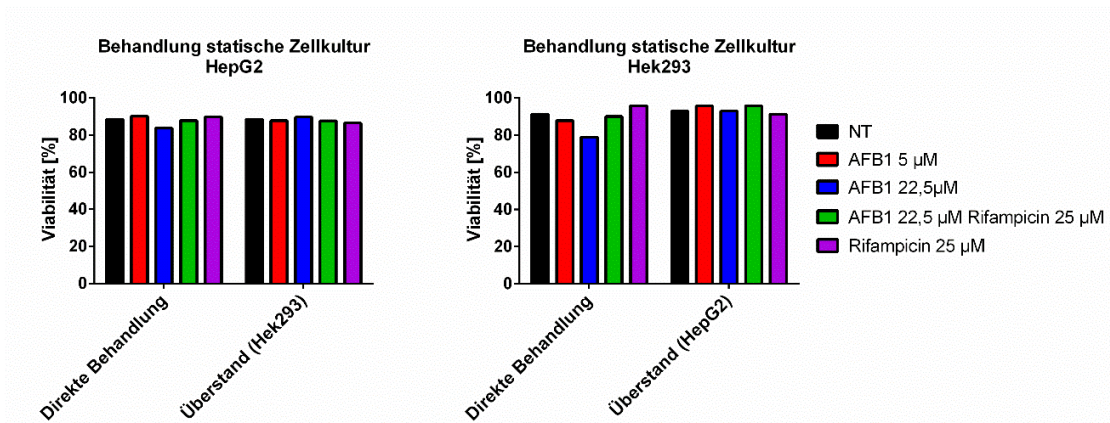


Abbildung 40 AFB1 Bioaktivierung statische Experimente.

FACS Ergebnisse der Viabilität für HepG2 und Hek293 Zellen. Die Zellen wurden jeweils direkt behandelt und mit dem Überstand der anderen Zelllinie nach 24 Stunden Exposition. Die Ergebnisse wurden in statischer Kultur in 6 Well Platten generiert. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [86].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass entgegen der Vermutung, dass HepG2 Zellen AFB1 metabolisieren und somit das toxischere Epoxid bilden, der Überstand von HepG2 Zellen keine signifikant höhere Toxizität auf Hek293 zeigte. Dies wurde dem ungünstigen statischen Aufbau des Versuches zugeordnet und sollte durch den Einsatz von OOC Modellen gelöst werden.

Um meine These über die Vorteile des Einsatzes von OOC Modellen zur Nachahmung der Bioaktivierung von Substanzen durch die Leber zu beweisen wurde zunächst der Einfluss der Flussrichtung innerhalb des Chipsystems untersucht. Theoretisch sollte AFB1 im Vergleich zum AFB1-Epoxid, welches die Bioaktivierung durch die Leber benötigt, eine geringere Toxizität auf die Nierenzellen aufweisen. Im Falle der HepG2 Zellen sollte die Flussrichtung keinen Einfluss haben, da diese entsprechende CYP-Enzyme besitzen, um AFB1 zu bioaktivieren.

In der Tat konnte diese Vermutung bestätigt werden. Für die Flussrichtung Leber-Nieren (HepG2 in Hek293) wurde eine signifikant höhere Toxizität auf die Nierenzellen beobachtet, als für die Flussrichtung Niere-Leber (Hek293 in HepG2) (siehe Abbildung 41). Außerdem hatte die Flussrichtung keinen Einfluss auf die toxische Wirkung auf Leberzellen.

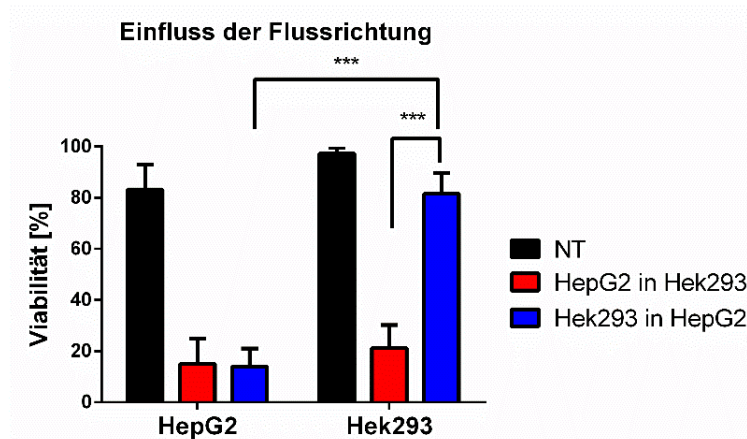


Abbildung 41 Einfluss der Flussrichtung auf die Toxizität.

Bestimmung des Einflusses der Flussrichtung auf die Toxizität von AFB1. Flussrichtung Leber-Niere (HepG2 in Hek293) und Flussrichtung Niere- Leber (Hek293 in HepG2) wurden analysiert. In beiden Fällen wurde 22,5 μM AFB1 verwendet, reines Zellkulturmedium (NZ) diente als Negativkontrolle. Die Viabilität wurde für beide Zelltypen mittels Leben/Tot-Färbung bestimmt. Messwert stellt den Mittelwert aus $n=3$ Experimenten dar, wobei in jedem Experiment $n>10$ Bilder pro Chipkammer aufgenommen wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mittel t-Test berechnet, wobei p -Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [86].

Es ist zu erwähnen, dass die durch den SRB Test bestimmte IC50-Konzentration von 5 μM AFB1 auf 22,5 μM erhöht werden musste, um eine hohe toxische Wirkung zu erhalten. Die Notwendigkeit einer höheren Konzentration ist meiner Meinung nach zwei Faktoren geschuldet: Dem unterschiedlichen Aufbau der Experimente, statisch und dynamisch, und dem unterschiedlichen Detektionsverfahren, der Absorption des SRB-Farbstoffes als Indikator der Gesamtproteinmenge und dem PI-Farbstoff als Indikator apoptotischer Zellen.

3.5.1 Darstellung von Wirkstoff-Wirkstoff Interaktionen in einer mikrofluidischen Leber-Nieren-System

Als Nächstes habe ich versucht, auch die Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktion in dem mikrofluidischen Modell nachzuahmen. Betrachtet man die Ergebnisse fällt auf, dass sowohl die Behandlung mit AFB1 und als auch der Kombination aus AFB1 und Rifampicin in beiden Zelllinien zu einer signifikant niedrigeren Viabilität geführt hat. Die Ko-Behandlung mit Rifampicin (5 μM und 25 μM) sorgte bei HepG2 für eine signifikant höhere Toxizität. Für die Hek293 Zellen dagegen, resultierte die Ko-Behandlung mit 25 μM Rifampicin in einem Anstieg und die Ko-Behandlung mit 5 μM Rifampicin in einem kompletten Rückgang der Viabilität, im Vergleich zur Behandlung mit reinem AFB1. Die Behandlung mit reinem Rifampicin zeigte

keine toxische Wirkung (siehe Abbildung 42 A).

Der signifikante Unterschied der Nephrotoxizität der beiden Rifampicin Konzentrationen, lässt sich durch zwei Faktoren erklären. Die hohe Rifampicin Konzentration in Kombination mit AFB1 sorgt dafür, dass alle Leberzellen direkt sterben und AFB1 nicht mehr metabolisieren, wodurch die Nierenzellen keinem AFB1-Epoxid mehr ausgesetzt sind und überleben. Rifampicin konkurriert wohlmöglich mit AFB1 um die CYP3A4 Bindungsstellen wodurch der Metabolismus von AFB1 vermindert wird und die Nierenzellen geschützt werden.

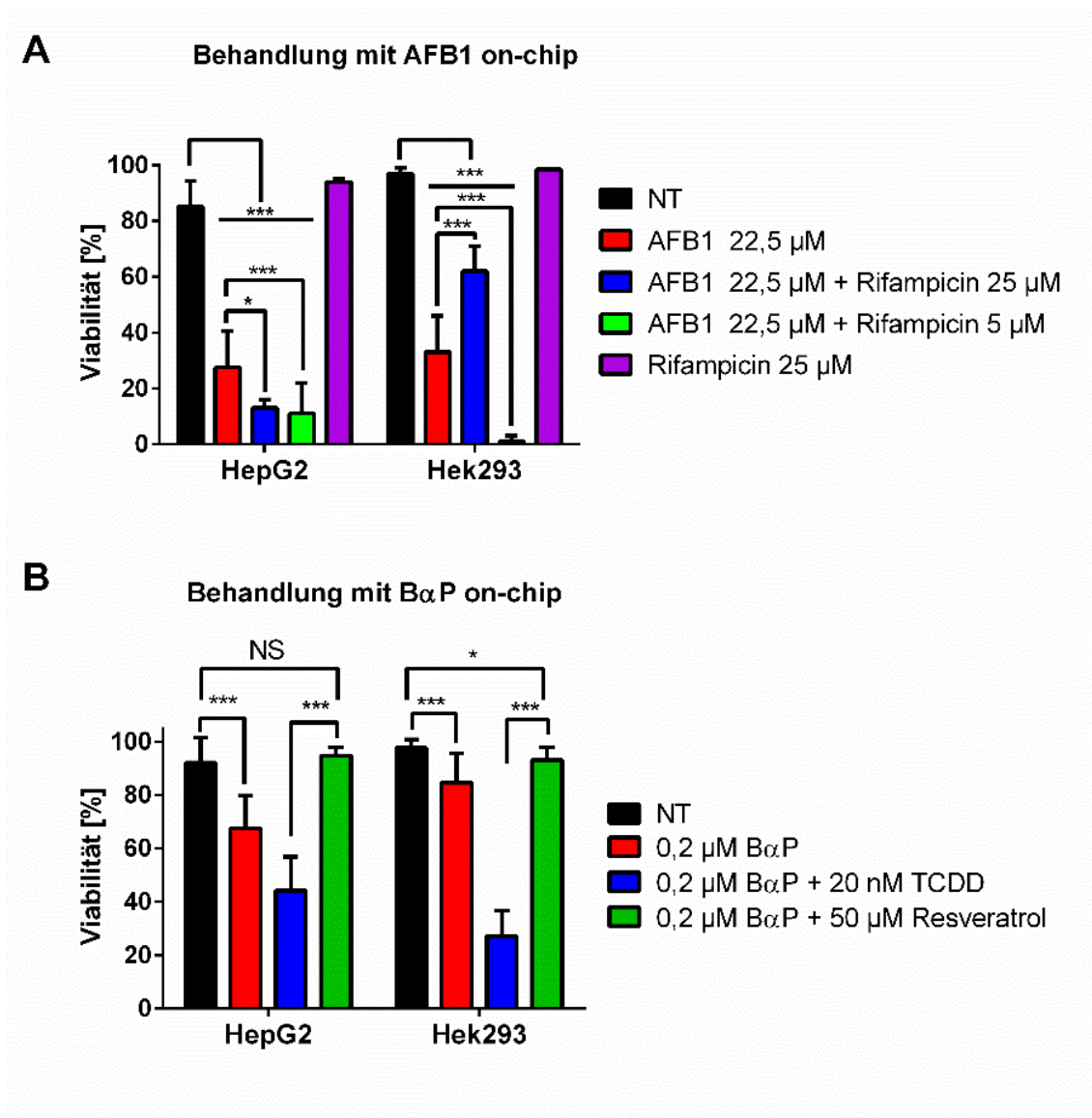


Abbildung 42 AFB1 Bioaktivierung fluidische Experimente.

Einfluss der Ko-Behandlung in Leber-Nieren Flussrichtung. A AFB1 und Rifampicin. B BaP und TCDD sowie BaP und Resveratrol. Reines Zellkulturmedium (NT) diente als Negativkontrolle. Die Viabilität wurde für beide Zelltypen mittels Leben/Tot-Färbung bestimmt. Messwert stellt den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, wobei in jedem Experiment n>10 Bilder pro

Chipkammer aufgenommen wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mittel t-Test berechnet, wobei p-Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen. NS steht wie einen nicht signifikanten Unterschied. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [86].

Aufgrund der generierten Ergebnisse in der Ko-Behandlung mit Rifampicin, wurde im nächsten Schritt ein Subklon von HepG2 untersucht der sich durch eine höhere Expression an CYP3A-Enzymen auszeichnet. Dieser Subklon wurde als HepG2 C3A bezeichnet. Zunächst wurde die mRNA-Expression von CYP3A4 und CYP3A5 (siehe Abbildung 43C) und die Proteinexpression von CYP3A4 (siehe Abbildung 43A) zwischen HepG2 WT und HepG2 C3A verglichen. Danach wurde der oben beschriebene mikrofluidische Versuch mit zwei Gruppen von Chips durchgeführt, in der einen Gruppe wurden HepG2 WT in der anderen Gruppe HepG2 C3A verwendet (siehe Abbildung 43A).

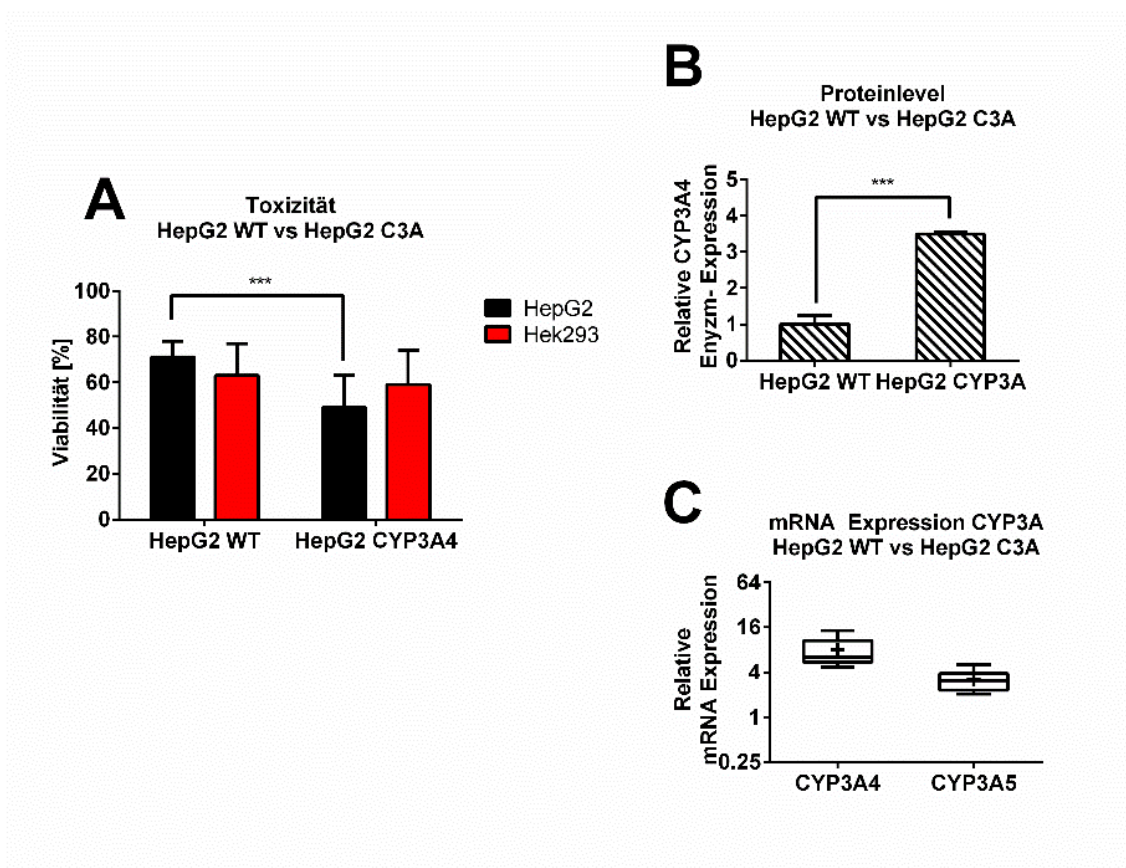


Abbildung 43 AFB1 Bioaktivierung fluidische Experimente HepG2 WT und HepG2 C3A. A Behandlung von HepG2 WT und HepG2 C3A mit 22,5 µM AFB1 in Flussrichtung Leber-Niere. Die Viabilität wurde für beide Zelltypen mittels Leben/Tot-Färbung bestimmt. Messwert stellt den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, wobei in jedem Experiment n>10 Bilder pro Chipkammer aufgenommen wurden. B Detektion der Protein Expression von CYP3A4 in HepG2 und HepG2 C3A mittel Westernblot. Messwert stellt den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar. C Vergleich der mRNA Expression von CYP3A4 und CYP3A5 zwischen HepG2 WT und HepG2 C3A. . Die Relative mRNA Expression wurde auf HepG2 WT bezogen. Alle Datenpunkte wurden

*mit n=5 Experimenten bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des 5% und 95% Quantils dar. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet, wobei p-Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen.*

Abbildung 43 zeigt, dass sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene HepG2 C3A eine stärkere Expression der CYP-Enzyme aufweist. Betrachtet man das auf den Chip durchgeführte Experiment, ist eine höhere Toxizität von AFB1 auf die HepG2 C3A Zellen zu erkennen, ein stärkerer Effekt auf die Nierenzellen wurde nicht beobachtet. Ähnlich wie bei der Ko-Behandlung mit Rifampicin, kann das Ausbleiben einer höheren Toxizität auf die Nierenzellen mit dem höheren Zelltod der Leberzellen und der fehlenden Bioaktivierung einhergehen: Um die toxische Wirkung des AFB1 noch detaillierter zu untersuchen wurde eine zeit- und konzentrationsabhängige Analyse der Genexpression von HepG2 und Hek293 in statischer Mikrotiterplattenkultur angefertigt (siehe Abbildung 44). Hierfür wurde eine Auswahl von 24 Genen verwendet, welche in Verbindung mit Toxizität und Zellschädigung stehen. Die Genexpression wurde nach 2,6,24,48 und 72 Stunden analysiert, 5µM und 15µM AFB1 wurden verwendet.

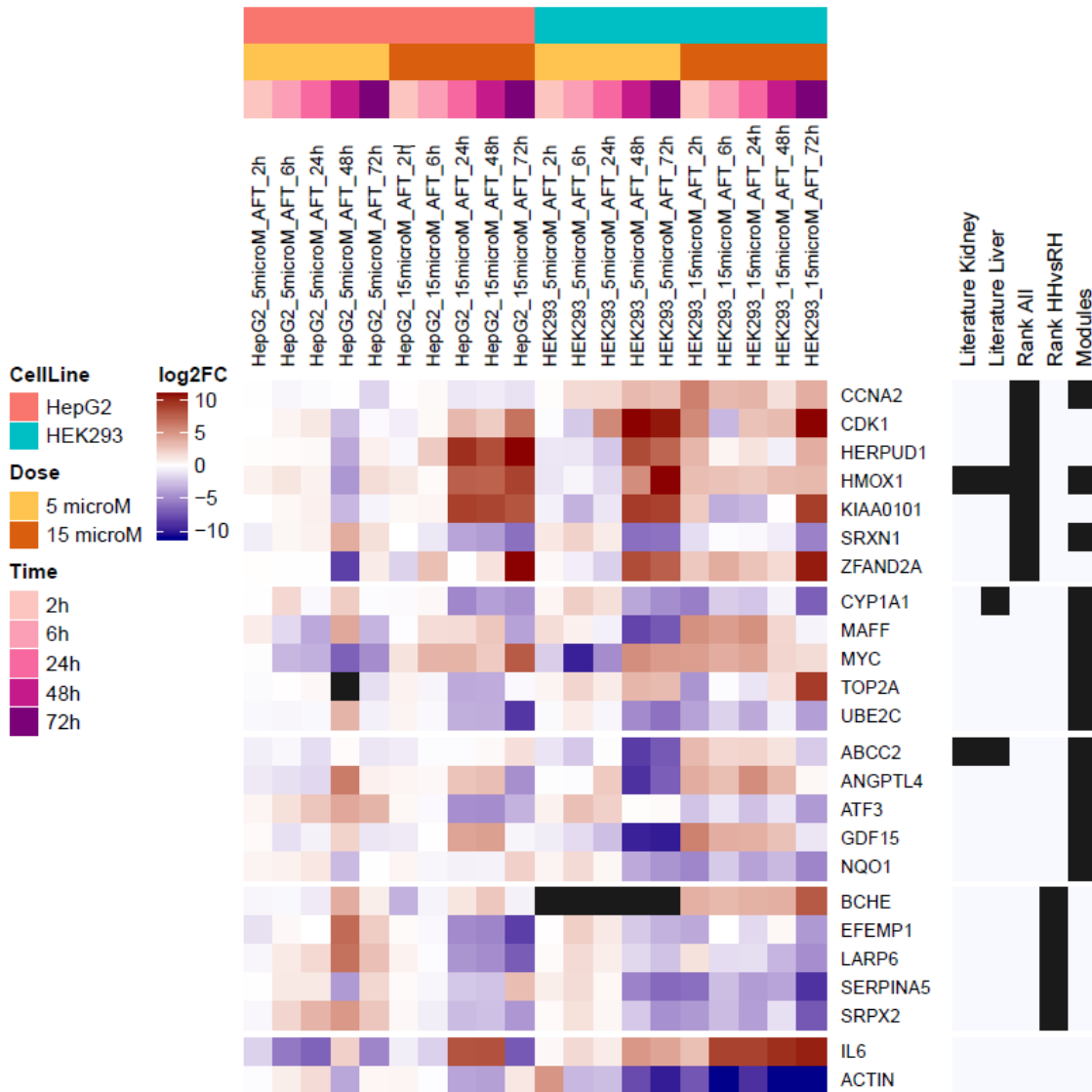


Abbildung 44 Genkarte AFB1 Behandlung.

Genkarte von HepG2 und Hek293 Zellen die an verschiedenen Zeitpunkten mit 5 μM und 15 μM AFB1 behandelt wurden. Die Genkarte zeigt die Genexpression der Zellen in Bezug auf unbehandelte Zellen als log2-Skala. Schwarze Vierecke stellen fehlende Daten dar. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [86].

Bedauerlicherweise wurde ein starker Einfluss der AFB1 Behandlung auf die Aktin Expression in Hek293 beobachtet, welches als Referenzgen verwendet wurde. Davon abgesehen wurden für die höhere Dosis an AFB1 für 24-72 Stunden eine starke Hochregulierung von CDK1 HERPUDI, HMOX1 und KIAA0101 beobachtet, ähnliche Beobachtung wurde in Hek293 Zellen für die geringere Konzentration an AFB1 gemacht. Außerdem wurde ein Rückgang der Expression ATF3, SRPX2, LARP6, SERPINA5 und EFEMP1 ermittelt, der vor allem bei den längeren Behandlungen deutlich wurde.

Im nächsten Schritt wurde die schädigende Wirkung von AFB1 und AFB1 Epoxid auf Hek293 Zellen unter mikrofluidischen Bedingungen untersucht. Neben der in Abbildung 42 B

dargestellten Leben/Tot-Färbung wurde außerdem der Effekt auf die Spaltung von PARP und eine Reihe selektierter Anti-Apoptose und proliferativen Genen (IL6, CDK1, CCNA2, ATF3, MYC und SRPX2) analysiert (siehe Abbildung 45).

Unter optimierten Bedingungen wurde PARP-Spaltung durch Immunfärbung in unbehandelten und mit AFB1 behandelten Zellen nachgewiesen. Die Zellen, die mit AFB1 behandelt wurden zeigen eine signifikant höhere PARP-Fluoreszenz. Vergleicht man die Echtzeit-qPCR Ergebnisse der statischen und mikrofluidischen Kultur sind ähnliche Tendenzen zu erkennen.

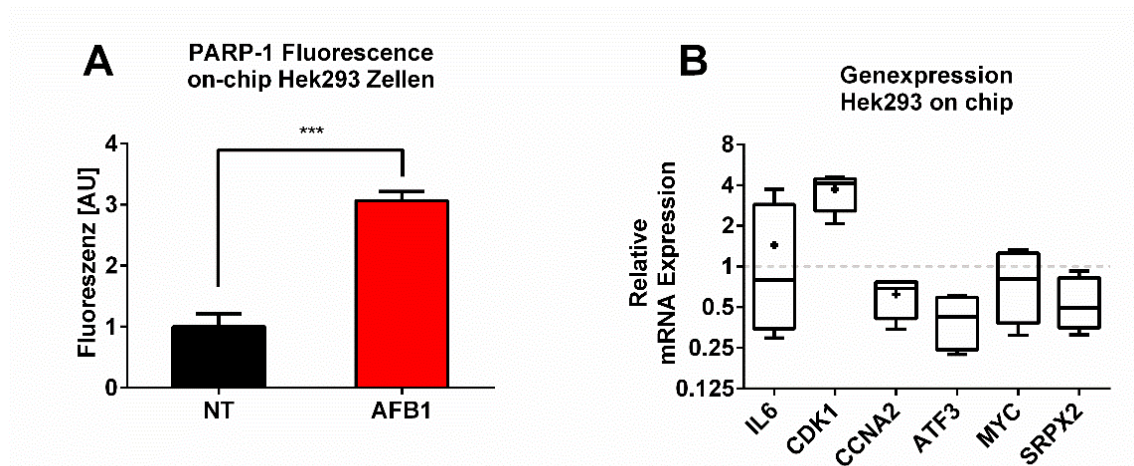


Abbildung 45 AFB1 Toxizität auf Hek293 Zellen.

A Vergleich des Fluoreszenzsignals an PARP-1 von Hek293 Zellen die mit reinem Zellkulturmedium (NT) und mit 22,5 μM AFB1 behandelt wurden. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ bestimmt, jeder Messwert stellt den Mittelwert aus $n=3$ Experimenten dar, wobei in jedem Experiment $n>10$ Bilder aufgenommen wurden. Die statistische Signifikanz wurde mittel t -Test berechnet, wobei p -Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen. B Vergleich der mRNA Expression ausgewählter toxilogischer Marker in Hek293 Zellen. Unbehandelte Zellen wurden als Referenz verwendet. Alle Datenpunkte wurden $n=5$ Chips bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des 5% und 95% Quantils dar. Die Grafik wurde abgeändert übernommen aus [86].

Für die Behandlung mit BaP wurden die erwarteten Ergebnisse beobachtet. Die Behandlung mit 0,2 μM BaP sorgte für eine signifikant niedrigere Viabilität beider Zelllinien im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Die Ko-Behandlung mit TCDD verstärkte den toxischen Effekt, die Ko-Behandlung mit Resveratrol senkte den Effekt (siehe Abbildung 42 B).

Zusammenfassend habe ich:

Erstens, nachgewiesen, dass das fluidische System toxische Effekte rekapitulieren kann, die in statischen Bedingungen nicht erkennbar sind. Zweitens, die Abhängig der toxischen Wirkung von der Flussrichtung und den einhergehenden Metabolismus gezeigt.

Drittens, die kombinatorische Wirkung zweier Substanzen, wie sie bei Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen der Fall ist, auf dem mikrofluidischen System nachgestellt.

3.6 Konsekutiver Metabolismus von Vitamin D₃ in einem Leber-Nieren-Chip

Vitamin-D-Mangel ist eine globale Pandemie, von der weltweit etwa eine Milliarde Menschen betroffen sind. Dieses Phänomen hat weitreichende Implikationen, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass ein Mangel an diesem Vitamin die Prädisposition für eine Vielzahl von chronischen Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs ist. Der menschliche Körper kann 7-Dehydrocholesterol produzieren, welches durch UV-Licht in der Haut zu Provitamin D₃ und weiter zu Vitamin D₃ umgewandelt wird. Für die Biosynthese seiner aktiven Form durchläuft Vitamin D₃ (Vit. D₃) zwei Hydroxylierungsschritte, wobei der erste in der Leber stattfindet und 25-Hydroxyvitamin Vitamin D₃ ergibt (25(OH)D₃), der in den Nieren und 1,25 Dihydroxyvitamin Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) (auch bekannt als Calcitriol) produziert. Calcitriol ist dafür bekannt, dass es zu einer starken Änderung der Genexpression verschiedener Zielzellen führen kann. In Krebszellen beispielsweise reguliert die Behandlung mit Calcitriol die Expression von Genen, die an Zellzyklusregulation, apoptotischer Signalgebung, Differenzierung und Nährstoffmetabolismus beteiligt sind, was seine Rolle als potenzielles Chemotherapeutikum verdeutlicht. Eine entscheidende Einschränkung hierbei ist jedoch die Notwendigkeit einer supraphysiologischen Dosis, welche zu Hyperkalzämie führen können, was die klinische Brauchbarkeit vermindert. Nicht-kalzämische Vitamin-D-Analoga wie Maxacalcitol und Paricalcitol können diese Limitierung umgehen. Individuelle Personen weisen jedoch genetische Polymorphismen, welche den Transport und den Stoffwechsel von Vitamin D₃ beeinflussen. Die Ermittlung korrekter subjektspezifischer Dosen an Vitamin D₃-Analoga, um den erwünschten zirkulierenden 25(OH)D₃ Spiegel zu erreichen ist mitunter schwierig.

Dieses Problem war die Grundlage, einen mikrofluidischen Leber-Nieren-Chip zu entwickeln und den konsekutiven Metabolismus von Vit D₃ zu untersuchen. Eine grafische Zusammenfassung über Projekt ist in Abbildung 46 zu sehen.

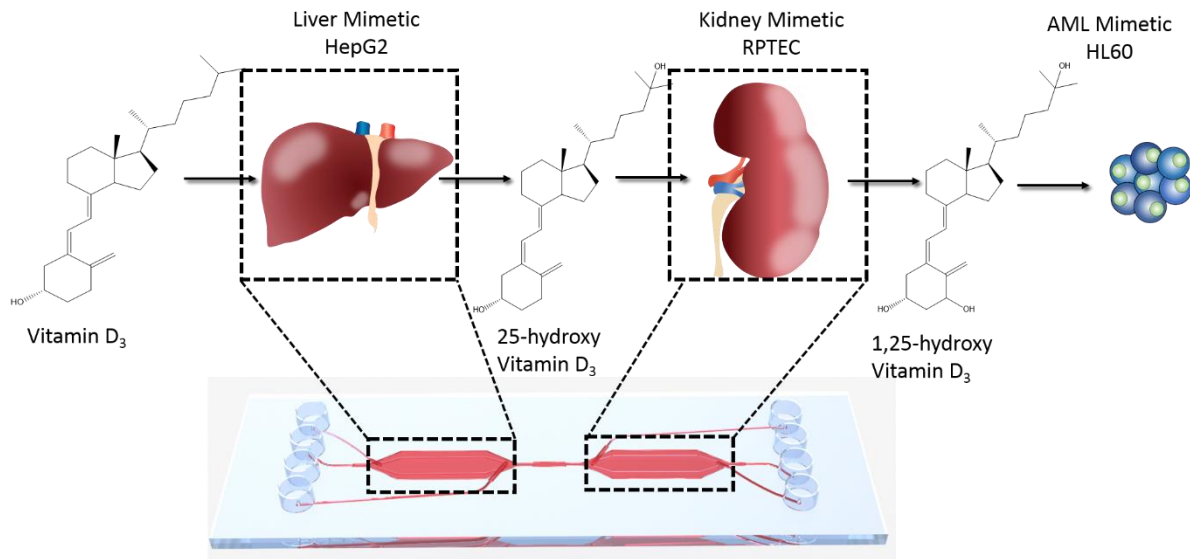


Abbildung 46 Übersichtgrafik des Teilprojektes konsekutiver Metabolismus.

Übersicht über den konsekutiven Metabolismus von Vitamin D₃ durch die Leber und die Niere, sowie die Behandlung von Leukämiezellen (HL60) durch die bioaktivierte Form 1,25 Dihydroxy-Vitamin D₃.

Der Aufbau des hier beschriebenen Systems ähnelt dem Aufbau des Leber-Nieren Chips zur Bestimmung der leberassoziierten Nephrotoxizität (siehe 3.4). Zunächst wurden auch in diesem Ansatz Hek293 Zellen zur Nachahmung der Niere genutzt. Die Analyse der genspezifischen Antwort der Hek293 auf die Behandlung mit Vit. D₃, 25(OH)D₃ und 1,25(OH)2D₃ zeigte nur eine geringe Veränderung. Die alternativ verwendeten RPTEC Zellen zeigten eine deutlich ausgeprägtere Antwort spezifischerer CYP-Enzyme (siehe Abbildung 47).

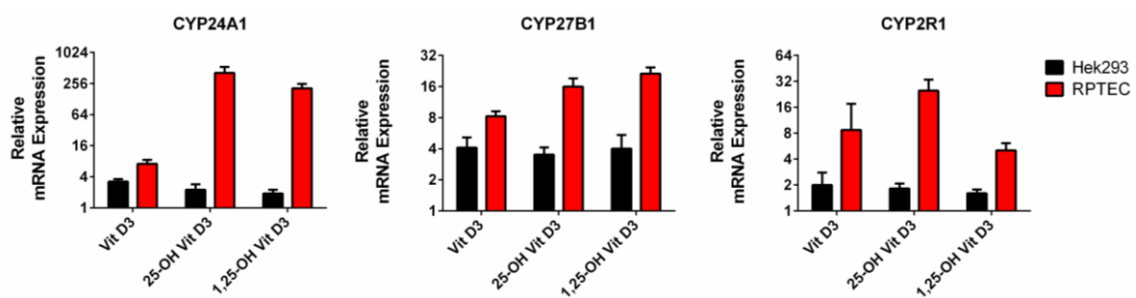


Abbildung 47 Vergleich Hek293 und RPTEC.

Vergleich der mRNA Expression CYP24A1, CYP27B1 und CYP2R1 in Hek293 und RPTEC Zellen. Die Zellen wurden mit 20 μ M Vit D₃, 2 μ M 25-OH D₃ und 20nM 1,25-OH 2 D₃ behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Referenz verwendet. Alle Datenpunkte wurden n=3 Experimenten bestimmt.

Um meine These zu beweisen, dass der verwendete Leber-Nieren-OOC die Möglichkeit bietet den konsekutiven Metabolismus von Vit D₃ über 25(OH)D₃ zu 1,25(OH)2D₃ nachzuahmen,

Ergebnisse

wurde versucht die Metaboliten im Eluat des Chips nachzuweisen. Hierfür wurde eine HPLC/MS durchgeführt.

Initial wurden die kommerziell erwerblichen Substanzen in Methanol gelöst und deren Retentionszeit und deren molekularer Zerfall wurde analysiert (siehe Abbildung 49 B, 1-4). Diese Ergebnisse dienten der Bestimmung der Metaboliten im Eluat. Der Nachweis der Metaboliten wurde in zwei Schritten untersucht: Erstens wurde ein Chip mit HepG2 Zellen gesät, mit 20µM Vit D3 und einer Flussrate von 20 µL/h behandelt und das Eluat gesammelt und analysiert (siehe Abbildung 49 E) ; Zweitens wurde ein Chip nur mit RPTEC Zellen gesät und mit dem Eluat aus dem HepG2-Chip behandelt, auch hier wurde das Eluat gesammelt und analysiert (siehe Abbildung 49 F). Reines Zellkulturmedium (siehe Abbildung 49 C) und das Eluat aus einem mit Zellkulturmedium behandelten Chip (siehe Abbildung 49 D) dienten als negativ Kontrollen. Die Proben wurden wie im Material und Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Wie erwartet konnten, weder im puren Medium noch im Medium, welches durch den Leber-Nieren-Chip geflossen ist Vit. D3 oder einer der Metabolite detektiert werden. Ein Peak, der 25(OH)D3 entspricht wurde im Eluat, aus der Leberkammer detektiert. Derselbe Peak wurde auch im Eluat aus der Nierenkammer detektiert, ein Peak für 1,25(OH)2D3 konnte jedoch nicht detektiert werden. Vit. D3 konnte ebenfalls in keinem der Eluate detektiert werden. Dies ist der kurzen Halbwertszeit oder technischen Einschränkungen, wie zum Beispiel der technischen Nachweisgrenze der chromatographischen Methode oder der geringen Extraktionsausbeute geschuldet. GleichermäÙen wird auch im menschlichen Körper 25(OH)D3 zur Detektion des Vit. D3 Spiegels verwendet, was ebenfalls der kurzen Halbwertszeit von Vit. D3 und 1,25(OH)2D3 geschuldet ist. Die verwendeten Konzentrationen für 25(OH)D3 wurden aus der PeakfläÙe der HPLC Daten errechnet, hierfür wurde von den verschiedenen Substanzen eine Kalibrationsreihe angefertigt (siehe Abbildung 48).

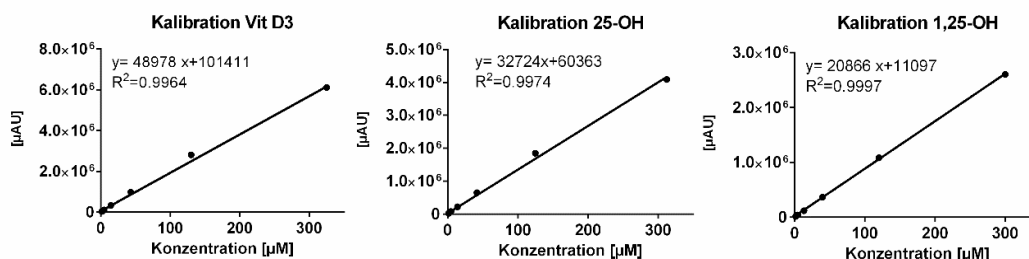


Abbildung 48 Kalibration HPLC.

Kalibrationskurven der PeakfläÙen der HPLC im Konzentration von 1µM 300µM Vit D3 25-OH D3 und 1,25 OH2 D3.

Unter Verwendung der Steigungsformel wurde die Konzentration von 25(OH)D₃ im Eluat auf 1,4 µM berechnet. Diese Konzentration entsprach ungefähr den verwendeten 2 µM 25(OH)D₃-Standard mit welchem die Zellen in den anderen Experimenten behandelt wurden.

Ergebnisse

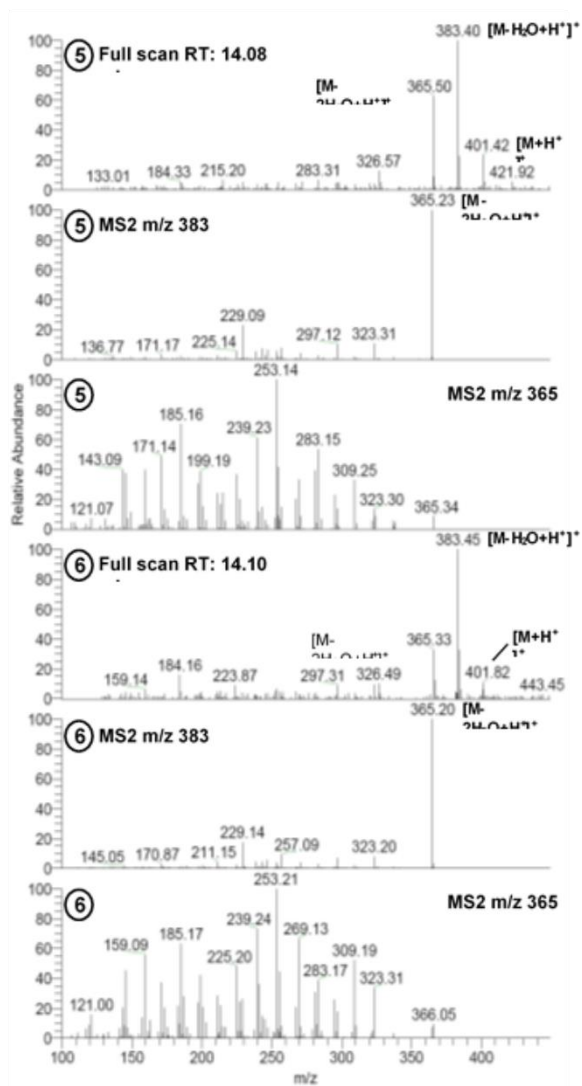
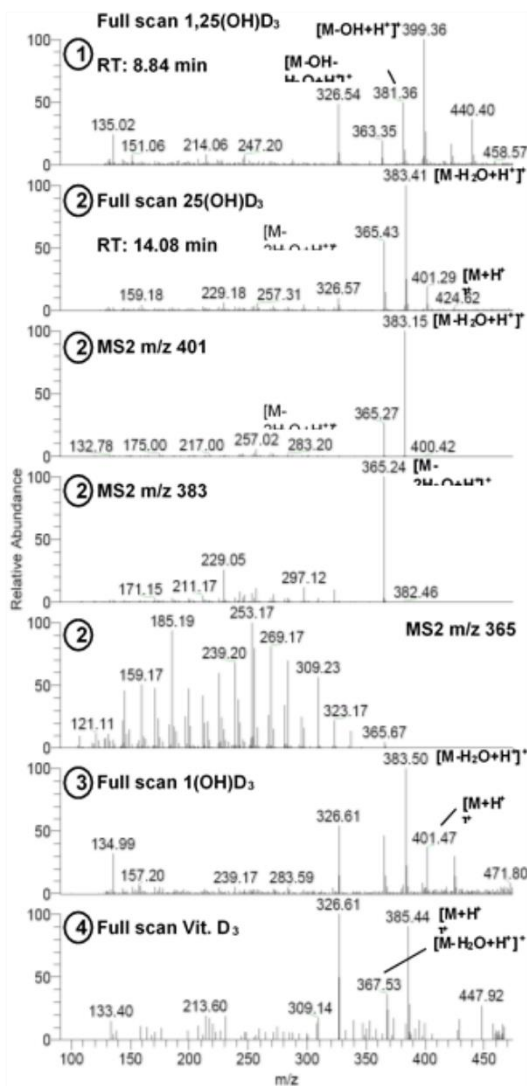
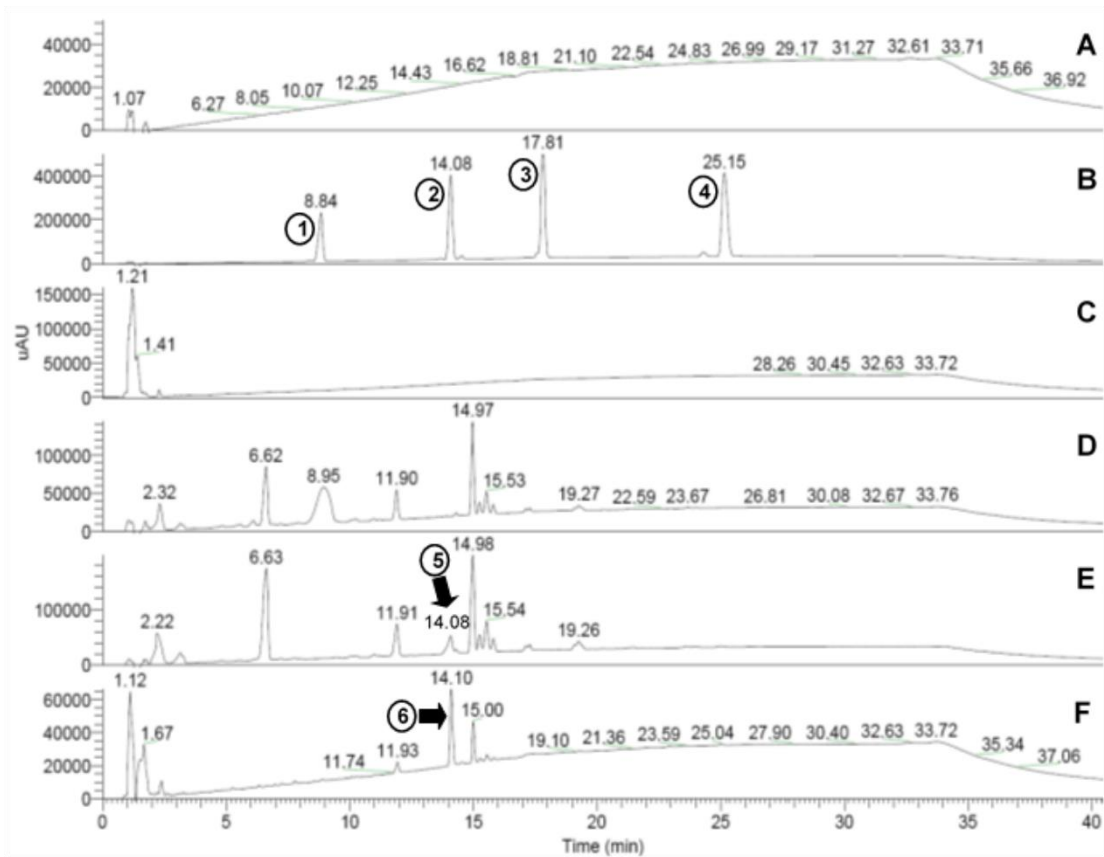
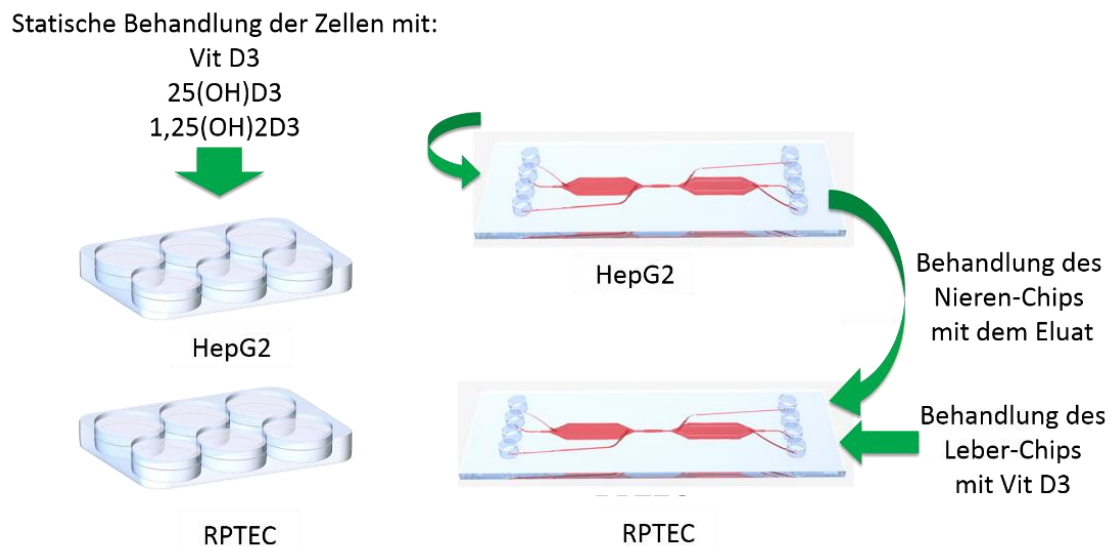


Abbildung 49 HPLC-LC/MS Daten

Nachweis der Metabolisierung von $25(OH)D_3$ nach der Addition von $20 \mu M$ Vitamin D_3 im Eluat des mikrofluidischen Systems mittels LC-MS/MS. Obere Hälfte A-F: PDA Chromatograms; A: MeOH Negative Kontrolle; B: Standards $1,25(OH)D_3$ (1), $25(OH)D_3$ (2), $1(OH)D_3$ (3), and Vit. D_3 (4); C: Reines Zellkulturmedium; D: Eluat ohne Vit. D_3 ; E: Eluate HepG2 Chips, Behandlung mit $20 \mu M$ Vitamin D_3 ; F: Eluate RPTEC Chips Behandlung mit dem Eluat eines HepG2 Chips, der mit $20 \mu M$ Vitamin D_3 behandelt wurde. Untere Hälfte 1-4: Scans aller Standards (bezogen auf das PDA aus B) und Fragmentierung der Ionen. Untere Hälfte rechts 5-6: Nachweis des $25(OH)D_3$ in den Eluaten E (5) und F (6) Volle Scans und Fragmentierung der Ionen. RT: Retention time.

Im nächsten Schritt wurde eine detaillierte Analyse der spezifischen Genantwort für drei ausgewählte CYP-Enzyme, die in Verbindung mit dem Vit. D_3 Metabolismus stehen, namentlich CYP2R1, CYP27B1, CYP24A1 in HepG2 und RPTEC durchgeführt. Hierfür wurden die HepG2 Zellen in statischer Kultur mit Vit. D_3 , $25(OH)D_3$, $1,25(OH)2D_3$ und innerhalb des mikrofluidischen Systems mit Vit. D_3 behandelt. RPTEC Zellen wurden analog in statischer Kultur mit Vit. D_3 , $25(OH)D_3$, $1,25(OH)2D_3$ und innerhalb des mikrofluidischen Systems sowohl mit Vit. D_3 als auch dem Eluat eines HepG2 Chips behandelt (siehe Abbildung 50).

**Abbildung 50 Grafische Erklärung der Behandlung.**

Darstellung der Behandlung der HepG2 und RPTEC Zellen unter statischen und fluidischen Bedingungen. Der RPTEC Chip wurde mit Zellkulturmedium mit $20 \mu M$ Vit D_3 (Chip System Vit D_3) und mit dem Eluat eines HepG2 Chips (Chip System Eluat) behandelt.

Ziel dieses Versuchs war es die kombinatorische Wirkung aus fluidischen Stimulus auf die Zellen und der Behandlung durch die verschiedenen Moleküle zu analysieren. Als

Negativkontrolle der statischen Behandlungen diente eine unbehandelte statische Kultur, für das Chipssystem ein unbehandelter mikrofluidischer Chip. Zum Vergleich der einzelnen Behandlungen wurde ein zwei Parameter t-test durchgeführt, die in der Abbildung dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf das jeweils unbehandelte System.

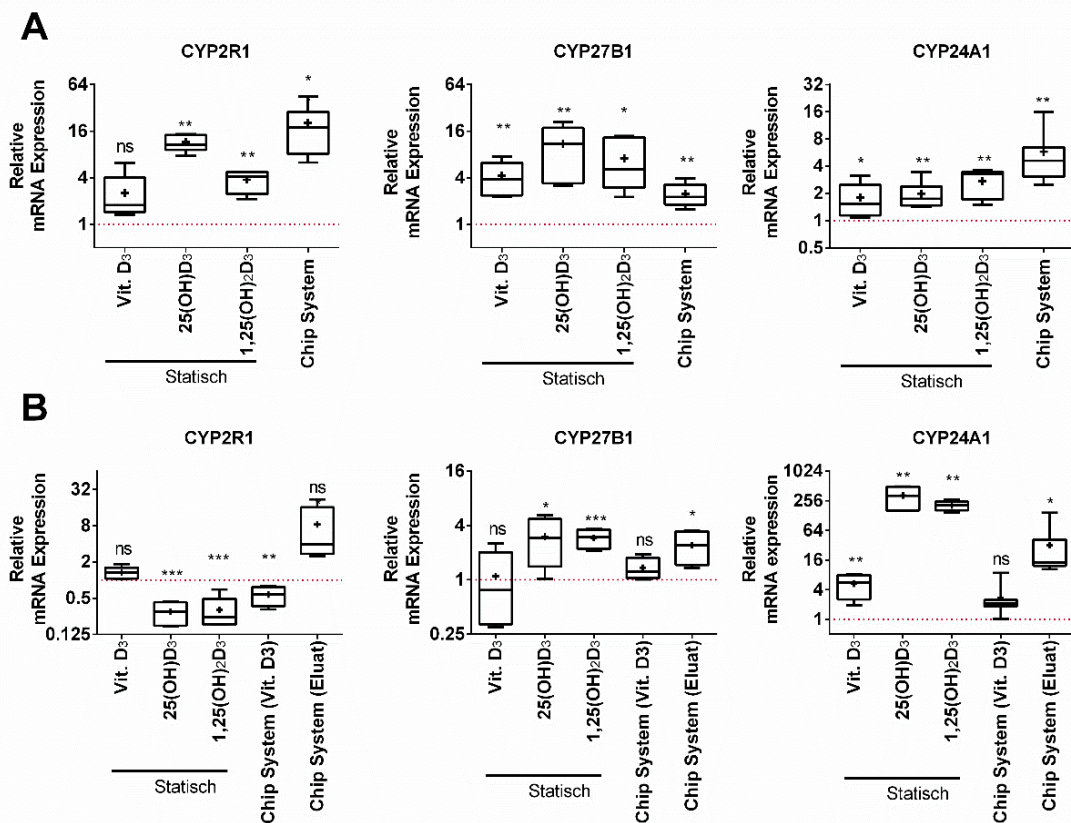


Abbildung 51 Vergleich der Genexpression verschiedener Behandlungen.

Vergleich der mRNA-Expression verschiedener CYP-Isoenzyme zwischen nach der Induktion durch verschiedene Behandlung für HepG2 (A) und RPTEC (B). Abbildung 50 dient der Erklärung der Behandlung. Die Zellen wurden mit 20 μ M Vit D3, 2 μ M 25-OH D3, 20nM 1,25-OH 2 D3 auf dem Chipssystem mit 20 μ M Vit D3 und im Falle der RPTEC mit dem Eluat aus dem HepG2 Chip. Die Relative mRNA Expression wurde auf unbehandelte Zellen bezogen (für die statischen Behandlungen auf ein statisches System, für die Chips auf ein Chipssystem). Alle Datenpunkte wurden n=5 Chips bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des 5% und 95% Quantils dar. Die statistische Signifikanz wurde mittel t-Test berechnet, wobei p-Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen.

Betrachtet man die Ergebnisse für die HepG2 Zellen fallen unterschiedliche Effekte auf (siehe Abbildung 51 A). Für CYP2R1 ist zu erkennen, dass die statische Vit D3 Behandlung nicht zu einer signifikant höheren Genexpression geführt hat, alle anderen Behandlungen hingegen zeigten einen signifikanten Anstieg. Im Falle von CYP27B1 wurde unabhängig von der verwendeten Kulturmethode oder der Behandlung ein signifikanter Anstieg ermittelt. Die

Behandlungen untereinander wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Auch für CYP24A1 wurde ein induziertes mRNA-Level unabhängig von der Kulturbedingung festgestellt. Die Behandlungen mit 25(OH)D3 und 1,25(OH)2D3 unter statischen Bedingungen zeigten eine ähnlich hohe Induktion wie die Vit D3 Behandlung im Chip. Vergleicht man die statische Vit D3 mit der Behandlung im Chip System, fällt eine signifikant höhere Induktion auf.

Für die RPTEC Zellen konnte eine genspezifische Antwort auf die unterschiedlichen Kultivierungs- und Behandlungsmethoden beobachtet werden (siehe Abbildung 51 B). Für 2R1 führten die Behandlung mit 25(OH)D3, 1,25(OH)2D3 und Vit D3 im Chip System zu einem Rückgang des mRNA-Spiegels. Die statische Behandlung mit Vit D3 und die Behandlung mit dem Eluat im Chip System zu einer Induktion, die jedoch nicht signifikant war. Für CYP27B1 zeigte die Behandlung mit Vit D3 unabhängig von der Kultivierungsmethode keine Signifikanz, die Behandlung mit 25(OH)D3, 1,25(OH)2D3 und dem Eluat eine signifikante Hochregulierung. Alle statischen Behandlungen führten bei CYP24A1 zu einer höheren Genexpression, wobei 25(OH)D3, 1,25(OH)2D3 für einen stärkeren Anstieg als Vit D3 sorgten. Die Behandlung mit Vit D3 im Chipsystem zeigte keine Signifikanz, die Behandlung mit dem Chip Eluat hingegen führte zu einem signifikanten Anstieg. Betrachtet man diese Ergebnisse fallen zwei bedeutsame Punkte auf: Für HepG2 Zellen zeigt die Behandlung mit Vit D3 unter fluidischen Bedingungen, im Vergleich zu statischen Bedingungen für alle CYP-Enzyme eine stärkere Hochregulierung der Genexpression. Für RPTEC Zellen ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit Vit D3 und dem Eluat im Chip System zu erkennen. Geht man davon aus, dass wie durch die LC/MS nachgewiesen, das Eluat 25(OH)D3 Vitamin enthält ist besonders der Effekt auf CYP2R1 hervorzuheben. Unter statischen Kulturbedingungen sorgte die Behandlung mit 25(OH)D3 für einen Rückgang der Genexpression, im Chip System für einen Anstieg des mRNA-Spiegels.

Zu den Antitumorwirkungen von 1,25 (OH) 2D3 gehört die Fähigkeit die Differenzierung bei verschiedenen Tumorarten wie Prostata-, Brust- und myeloische Leukämiezellen zu induzieren [136]. Daher versuchte ich, wie in Abbildung 46 dargestellt, eine Differenzierung in HL60 Zellen durch die Behandlung mit dem Eluat des Leber-Nieren-Chips zu induzieren. HL60 Zellen wurden zuvor in der Literatur verwendet und zeigten nach der Behandlung mit 1,25(OH)2D3 eine Differenzierung in Richtung von Monozyten [137]. Hierfür wurde das System mit 20 µM Vit. D3 und einer Flussrate von 20 µL/h behandelt. Das eluierte Medium wurde gesammelt und 24 Stunden lang zur Behandlung von HL-60-Zellen verwendet, danach wurde mittels Echtzeit qPCR die mRNA-Expressionslevel verschiedener

Ergebnisse

Differenzierungsmarker, einschließlich CD11b, CD14, Osteopontin und Parvalbumin analysiert (siehe Abbildung 52).

CD11b, auch als Integrin α -M bekannt, ist ein Adhensionsmarker der vor allem in dendritischen Zellen exprimiert wird [138], CD14 gilt als typischer Oberflächenmarker von Monozyten [139]. Osteopontin ist in Makrophagen zu finden die Induktion durch 1,25(OH)2D3 ist bekannt. Parvalbumin ist ebenfalls mit der Differenzierung von HL60 Zellen assoziiert [140].

Als Referenzen diente die Behandlung der HL60 Zellen mit 20 μ M Vit D3, 2 μ M 25(OH)D3 und 100nM 1,25(OH)2D3. Eine relative mRNA Expression von 1 entspricht der Expression von Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden. Zum Vergleich der einzelnen Behandlungen wurde ein zwei Parameter t-test durchgeführt, die Signifikanz zwischen den verschiedenen Behandlungen wurde im Vergleich zur Behandlung mit dem Chip Eluat berechnet.

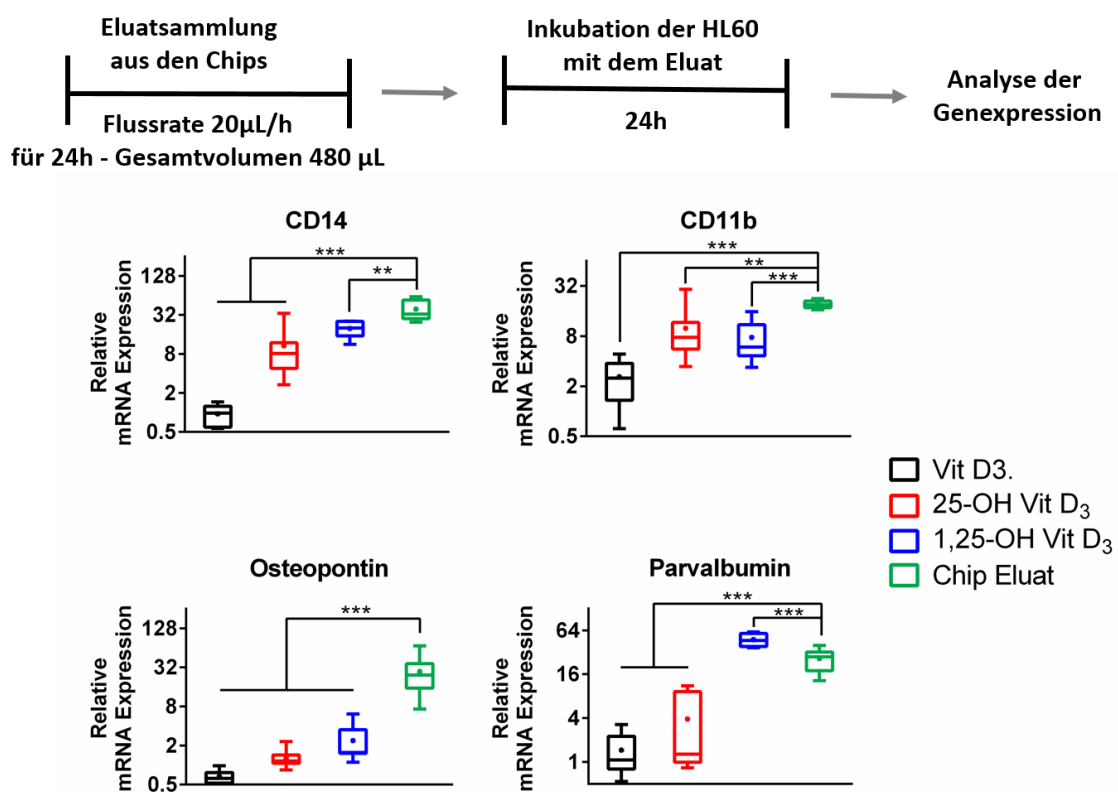


Abbildung 52 mRNA Expression von Differenzierungsmarkern in HL60.

Der obere Teil der Grafik dient dem Verständnis des durchgeführten Experiments. Der untere Teil stellt den Vergleich der mRNA Expression von CD14, CD11b, Osteopontin und Parvalbumin für HL60 Zellen nach Behandlung mit 20 μ M Vit D3, 2 μ M 25-OH D3, 20nM 1,25-OH 2 D3 und dem Eluat aus einen Leber-Nieren Chip dar. Relative mRNA Expression wurde auf unbehandelte Zellen bezogen. Alle Datenpunkte wurden $n > 5$ Experimenten bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des

5% und 95% Quantils dar. Die statistische Signifikanz wurde mittel *t*-Test berechnet, wobei *p*-Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Behandlung mit dem Chip Eluat eine verstärkte mRNA Expression für alle analysierten Differenzierungsmarker im Vergleich zu Zellen, die mit Medium behandelt wurden zur Folge hatte. Außerdem zeigen Zellen die mit dem Eluat behandelt wurden höhere Expressionslevel, als Zellen die mit Vit D3 behandelt wurden, was die Effekte des Metabolismus von Vit D3 verdeutlicht. Im Vergleich zur Behandlung mit 25(OH)D3 und 1,25(OH)2D3 zeigte Behandlung mit dem Eluat teilweise eine ähnliche und teilweise eine höhere Induktion. Für CD14 und CD11b wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen mit 25(OH)D3 und 1,25(OH)2D3 erkannt. Für Parvalbumin hingegen wurde nur bei der Behandlung mit 1,25(OH)2D3 eine starke Induktion ermittelt. Die Tatsache, dass auch das Chipeluat eine ähnlich hohe Induktion der Parvalbumin Expression auslöste spricht dafür, dass sich im Chipeluat neben dem mittels LC/MS detektierten 25(OH)D3 noch weitere Bestandteile und wohlmöglich auch 1,25(OH)2D3 befinden.

Um die Notwendigkeit des Zwei-Komponenten-Systems zu demonstrieren, führten wir ein weiteres Experiment durch, in dem die HL60 Zellen sowohl mit dem Überstand aus einem reinen Leber-Chip als auch dem Überstand aus einem Leber-Nieren-Chip behandelt habe (siehe Abbildung 53).

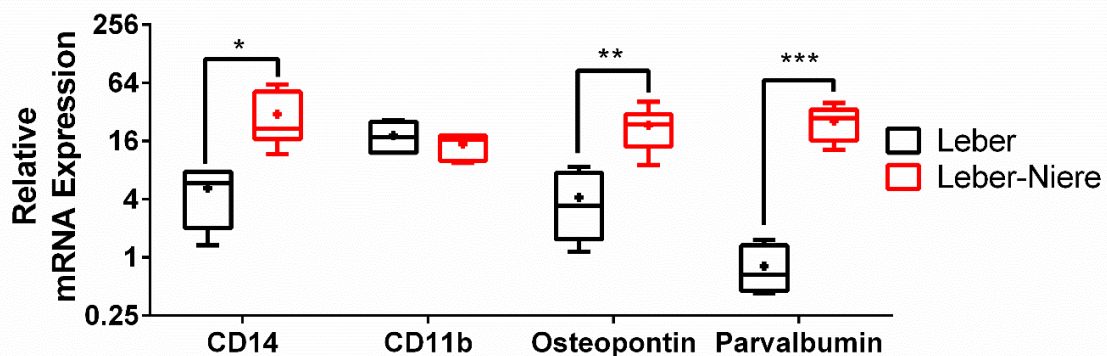


Abbildung 53 Einfluss der Nierenkammer auf die Expression der Differenzierungsmarker. Vergleich der mRNA Expression von CD14, CD11b, Osteopontin und Parvalbumin für HL60 Zellen nach Behandlung mit dem Eluat aus einem Leber-Chip (HepG2-HepG2) und aus einem Leber-Nieren Chip (HepG2-RPTEC). Datenpunkten wurden $n > 5$ Experimenten bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des 5% und 95% Quantils dar. Die statistische Signifikanz wurde mittel *t*-Test berechnet, wobei *p*-Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen.

Abbildung 21 zeigt den stärkeren Effekt auf die mRNA Expression der Differenzierungsmarker eines Leber-Nieren-Chips im Vergleich zu einem reinen Leber Chip. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch wenn 1,25(OH)₂D₃ nicht durch die LC/MS Analyse nachgewiesen werden konnte, die Nierenzellen einen zweiten metabolischen Schritt durchführen.

Im nächsten Schritt wollte wir die beobachtete Regulation auch auf Proteinebene bestätigen, wobei hierfür die Oberflächenmarker CD11b und CD14 verwendet wurden. Zum Nachweis der beiden Oberflächenmarker wurde eine FACS Analyse durchgeführt. Wie für die Analyse der Genexpression wurde das Eluat aus den Chips gesammelt und die HL60 Zellen 24 Stunden mit dem Eluat inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Zellen die mit Zellkulturmedium (NT) und Zellen die mit dem Eluat eines Chips (NT Chip), der nur mit Zellkulturmedium behandelt wurde, inkubiert wurden.

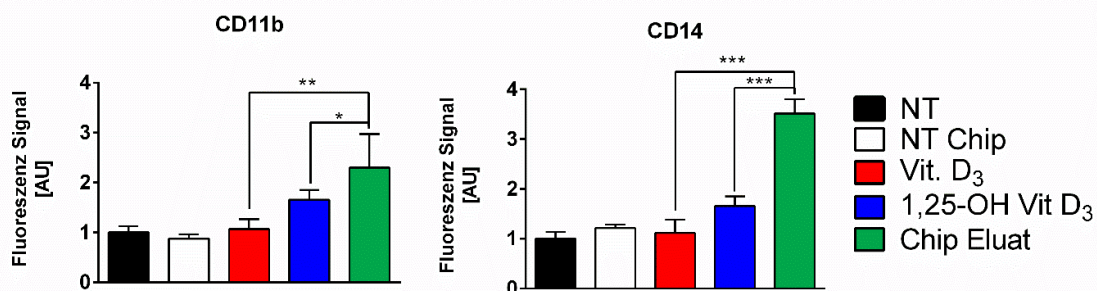


Abbildung 54 Proteinexpression von Differenzierungsmarkern in HL60 Zellen.

Vergleich der Expression von CD11b und CD14 nach diversen Behandlungen durch FACS Analyse. HL60 Zellen wurden für 24 Stunden mit Zellkulturmedium (NT) dem Eluat eines nicht behandelten Chipsystems (NT Chip) 20 μ M Vit D₃, 2 nM 1,25-OH D₃ und dem Eluat eines Leber-Nieren Chip behandelt. Datenpunkten wurden n=2 Experimenten bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mittel t-Test berechnet, wobei p-Werte von 0,05, 0,01 und 0,001 *, ** und *** entsprechen.

Abbildung 54 zeigt die Effekte der verschiedenen Behandlungen auf die Proteinexpression der Differenzierungsmarker in HL60 Zellen. Hierbei fällt auf, dass sowohl NT als auch NT Chip zu keinen signifikanten Unterschieden in der Proteinexpression von CD11b und CD14 geführt haben. Sowohl die Behandlung mit Vit D₃ als auch die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ haben zu einen Anstieg des Proteinlevels im Vergleich zu NT Zellen geführt. Die Behandlung mit dem Chip Eluat zeigte sowohl für CD11b als auch für CD14 einen signifikant höheren Effekt auf die Proteinexpression als irgendeine der anderen Behandlungen.

Betrachtet man Abbildung 52 und Abbildung 54 fällt auf, dass sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene das Chip Eluat die stärksten Effekte zeigt. Dies ist auf zwei Faktoren zurückzuführen. Erstens: In der LC-MS Analyse sind weitere Peaks zu erkennen, die der Masse

eines einfach hydroxylierten Vitamin D3 entsprechen, was das mögliche Vorhandensein von mehreren Vitamin-Metaboliten im Eluat vermuten lässt. Diese Metaboliten könnten einen kombinatorischen Effekt auf die HL60 Zellen ausüben und somit zu einer höheren Expression führen. Zweitens exprimieren die Leberzellen kontinuierlich Albumin, welches ebenfalls im Eluat anwesend ist und als eine Art Bindeprotein dient und somit für eine bessere Aufnahme sorgen könnte. Diese Überlegung ist durch die frühere Beobachtung von *Safanadi et al.* bestärkt die geringe Effekte auf die Differenzierung von HL60 Zellen in FCS-freien Medium beobachtet haben [141].

Die Tatsache, dass 1,25(OH)₂D₃ nicht durch LC/MS-MS Analyse nachgewiesen werden konnte, jedoch HL-60 scheinbar einen unterschiedlichen Effekt auf die Medienzusammensetzung und die Vit D₃ Metaboliten nachweisen können, zeigt das Potenzial von Zellen als Reporter. Auf die Möglichkeit zelluläre Reporter in OOC Systeme zu integrieren und deren Vorteile wird explizit in der Diskussion eingegangen.

Zusammenfassend habe ich: Erstens, die Eluate aus einem Leber-Niere Chip mittels LC/MS analysiert und die Verstoffwechslung von Vit D₃ zu 25(OH)D₃ nachgewiesen. Zweitens, die Induktion von spezifischen CYPs durch die Behandlung mit Standardsubstanzen und dem Chip Eluat untersucht. Drittens, die Differenzierung von akuten myeloischen Leukämiezellen durch das Chip Eluat dargestellt. Insgesamt zeigen Daten, dass der beschriebene mikrofluidische Chip eine Nachahmung des Vitamins D₃-Metabolismus *in vitro* ermöglicht.

3.7 Darstellung der Wirkstoffresorption auf einem membran-basierten Colon-Leber-Chip

Nach der oralen Aufnahme von Medikamenten werden diese im Magen-Darm-Trakt resorbiert und in der Leber metabolisiert. Dieser First-Pass-Effekt spielt eine entscheidende Rolle für die Bioverfügbarkeit von Medikamenten. Der First-Pass-Effekt ist ein komplexer Prozess in dem Transport und Metabolismus gleichzeitig an unterschiedlichen Stellen stattfinden, was es schwierig macht diesen mit herkömmlichen 2D Zellkulturmodellen zu reproduzieren. OOC und vor allem membranbasierte OOC Systeme bieten die Möglichkeit diese Dynamik nachzuahmen. Abbildung 55 zeigt den von mir verwendeten Aufbau eines Colon-Leber-Chips.

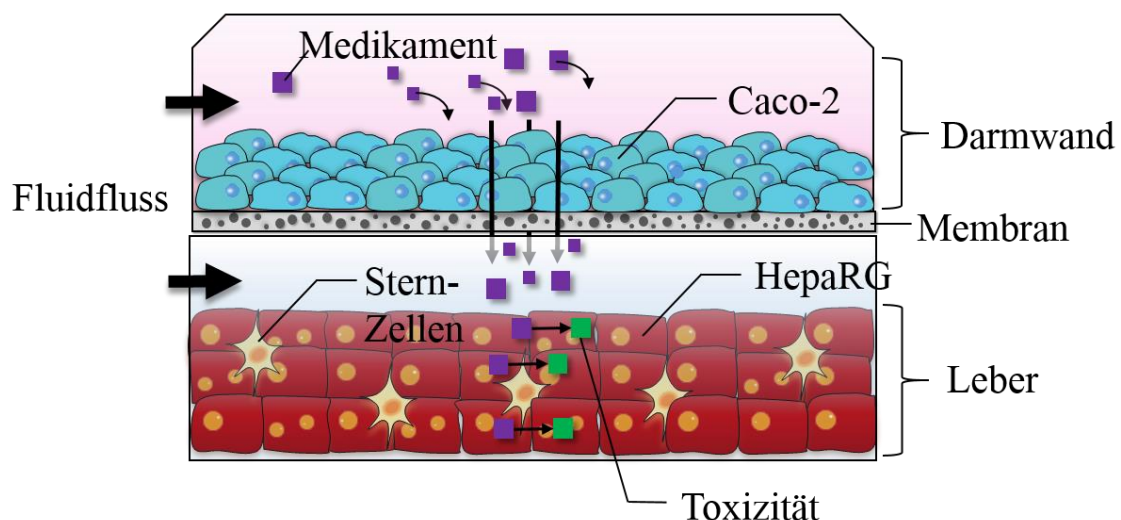


Abbildung 55 Übersichtsgrafik Teilprojekt Colon-Leber-Chips.

Darstellung eines membran-basierten Colon-Leber-Chips mit Resorption eines Medikaments über die Darmwand und konsekutiven Metabolismus in den Leberzellen.

Wie in Abbildung 15 dargestellt zeichnete sich auch der membran-basierte Aufbau von CC N4 durch eine hohe Viabilität der Zellen auch nach mehreren Tagen in der Kultur aus. Die Zellen innerhalb des Systems konnten sowohl oberhalb als auch unterhalb der Membran mit Medium versorgt werden, hierbei konnten auch unterschiedliche Strömungen angelegt werden. Je nach Fluidführung innerhalb des Chips musste die Flussgeschwindigkeit angepasst werden, um eine ausreichende Versorgung der Zellen zu gewährleisten. Der Fragestellung geschuldet, die Resorption über die Darmwand nachzuahmen, wurde der Medienfluss an der Oberseite der Membran angelegt. Hierbei wurden nur ein Auslass an der Unterseite der Membran geöffnet, wodurch das Medium durch die Membran fließen musste (siehe Chipdesign)

Initial sollte die Permeabilität der Membran mit und ohne Zellen getestet werden, um zu gewährleisten, dass Medikamente die deckenseitig in den Chip eingebracht wurden nicht direkt zu den untenliegenden Zellen strömen ohne durch die obere Zellschicht zu diffundieren. Hierfür wurden die Caco-2 Zellen auf der Membran kultiviert, um eine konfluente Schicht zu bilden, wie in der Literatur berichtet wurde nach 5 Tagen eine dichte konfluente Schicht beobachtet [142, 143].

Fluoreszenter Farbstoff wurde in die obere Kammer gegeben und die Fluoreszenzintensität in der unteren Kammer gegen die Zeit gemessen. Die Intensität in der oberen Kammer wurde als 100%-Referenzwert gesetzt, die Fluoreszenz von PBS als 0%-Wert.

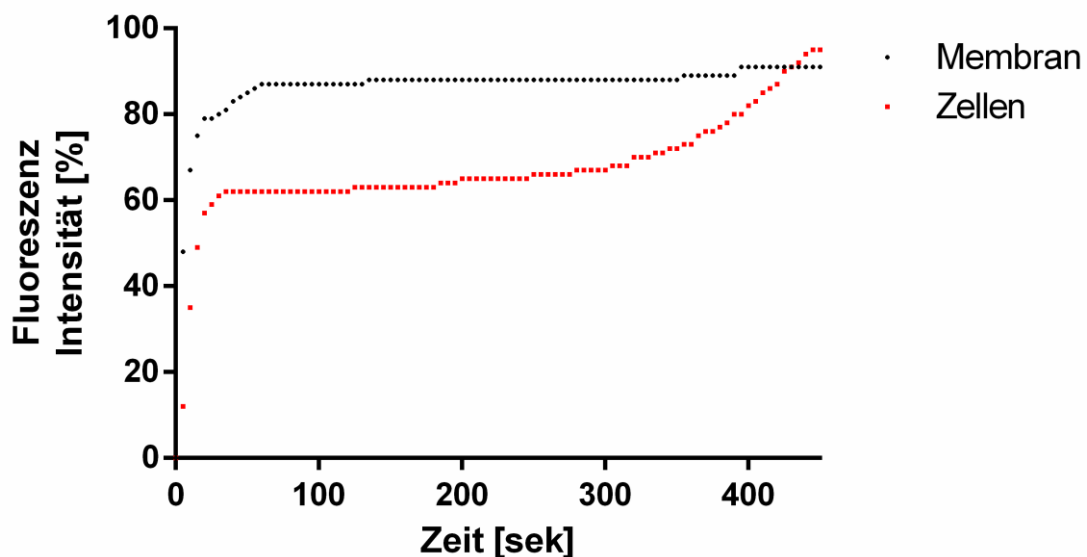


Abbildung 56 Diffusion über die Membran per Fluoreszenzintensitätsmessung. Die Daten sind als Prozentwerte dargestellt wobei 0 einer Kammer ohne fluoreszenten Farbstoff und 100% einer Kammer voll mit Farbstoff entspricht.

Betrachtet man Abbildung 56 ist zu erkennen, dass die Diffusion aus der oberen in die untere Kammer problemlos funktioniert und dass auch große Proteine wie Albumin durch die Poren der Membran diffundieren können. Außerdem ist es augenscheinlich, dass die Zellen einen zusätzlichen Widerstand aufbringen, wodurch die Diffusion verlangsamt wird. Der initiale Sprung der Fluoreszenz auf 60% auch im Falle der mit Zellen beschichteten Membran ist gegebenenfalls auf Aufhängung der Membran zurückzuführen, dass diese an ihren Seiten einen Spalt aufweist, durch den das Medium direkt strömen kann. Alternativ könnte der Druck auf die Membran durch die Addition mittels Spritze in die obere Kammer so hoch sein, dass der Farbstoff direkt durch die Poren gedrückt wird.

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse wurde die Medienversorgung der Zellen so angepasst,

dass das Medium über der Membran mit einem zyklischen Flussprofil in den Chip gepumpt wurde. Hierbei wurde sowohl über als auch unter der Membran ein Ausgang für den Fluidfluss geöffnet. Während den Phasen, in denen nicht gepumpt wurde sollte das Medium durch die Membran in die untere Kammer diffundieren. Der alternative Ansatz die oberen Ausgänge des Chips zu blocken und aktiv über die Membran zu pumpen wurde verworfen, dass dieser zu starken Druck auf die Membran ausübte und der Effekt der Zellbarriere verloren ging.

In CC N1 bis CC N3 konnte die Differenzierung der HepaRG Zellen im mikrofluidischen System nicht realisiert werden, die könnte zum einem am Scherstress den die Zellen innerhalb des Systems erhalten liegen zum anderen an der Sauerstofflimitierung innerhalb des Systems. Betrachtet man die HepaRG Zellen, welche auf CC N4 kultiviert wurden fällt auf, dass diese nach 5 Tagen in Kultur die typische Pflastersteinartige Morphologie aufzeigten.

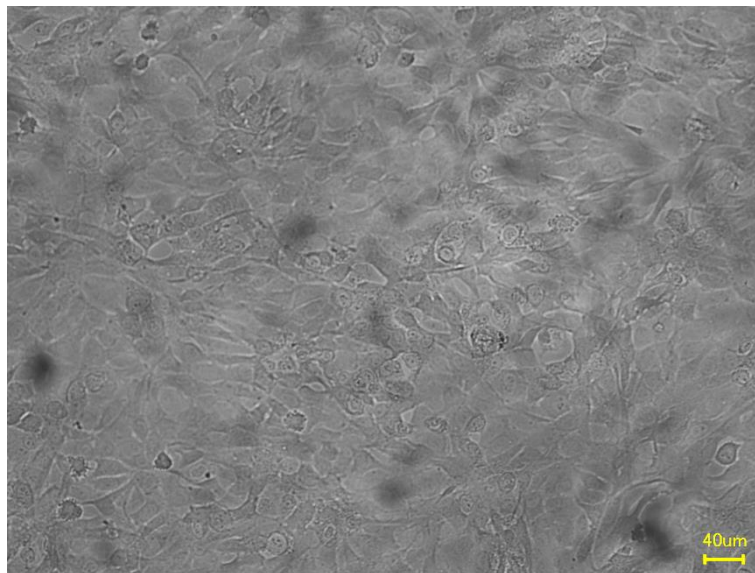


Abbildung 57 HepaRG Morphologie Tag 5 auf CC N4

HepaRG Zellen wurden unterhalb der Membran kultiviert und über der Membran mit Medium versorgt.

Vergleicht man die Morphologie der HepaRG in CC N4 mit den Bildern der Kultur der HepaRG auf Wellplatten (siehe Abbildung 34) fällt eine ähnliche pflastersteinartige Morphologie auf. Diese Morphologie der Zellen konnte auf CC N1-CC N3 nicht beobachtet werden.

Die Ausbildung einer konfluenten epithelialen Barriere der Caco-2 Zellen wurde mittels qPCR über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Hierfür wurden vier bekannte Zell-Zell-Kontakt und Tightjunction Proteine, Occludin, ZO-1 Claudin 2 und Claudin 3 analysiert. Abbildung 58

zeigt die ermittelten Ergebnisse. Betrachtet man die Genexpression der Caco-2 Zellen über den Zeitraum von 7 Tagen ist ein signifikanter Anstieg aller vier Zellkontaktmarker zu erkennen. Die höhere Expression von ZO-1 spricht für eine starke Ausbildung von Tightjunctions und Signaltransduktion. Ähnliche Beobachtung über starke Ausbildung von Tightjunction in der Kultur von Caco-2 Zellen wurde von *Anderson et al.* beobachtet [144]. Ebenfalls wurde ein Anstieg der Expression von Occludin, welche laut Literatur auch stark ansteigend sollte, beobachtet. Besonders auffallend ist der starke Anstieg von Claudin 2 und Claudin 3 beginnend an Tag 5.

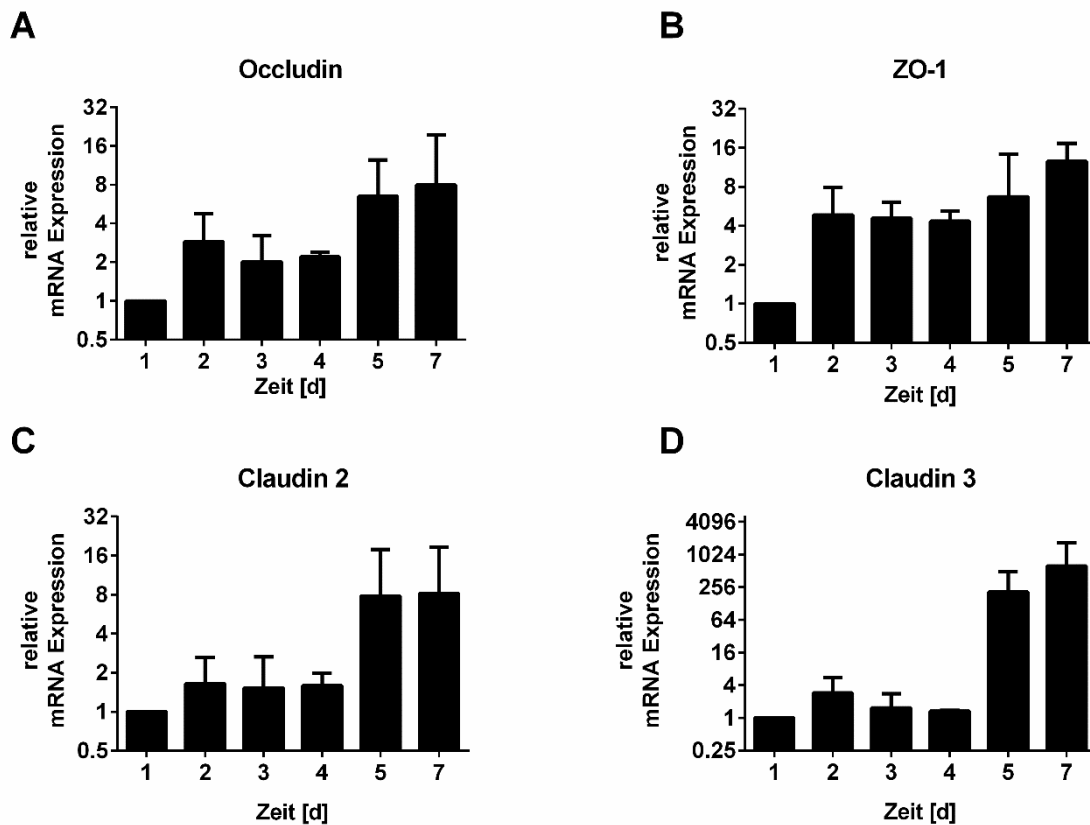


Abbildung 58 mRNA Expression verschiedener Zellkontaktmarkern.

Vergleich der mRNA-Expression verschiedener Zellkontaktenzyme über einen Zeitraum von 7 Tagen in statischer Zellkultur für Caco-2 Zellen. Die Relative mRNA Expression wurde auf Zellen an Tag 0 in Kultur bezogen. Alle Datenpunkte wurden n=3 Mikrotiternäpfchen bestimmt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse

Der Einfluss des Zell-Zellkontaktes und der Zellzahl wurde des Weiteren mittels SBR Test bestimmt hierfür wurden Caco-2 Zellen nach der Aussaat an Tag 1 und an Tag 5 für 48 Stunden mit Methotrexat behandelt. Die ermittelten IC₅₀-Werte sind in Tabelle 14 dargestellt

Tabelle 14 Bestimmung der IC₅₀ Werte nach Behandlung mit Methotrexat für Caco-2 Zellen, die an Tag 1 und Tag 5 nach der Aussaat für 48 Stunden behandelt wurden.

	IC ₅₀
Tag 1	14,6 µM
Tag 5	-

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Behandlung mit Methotrexat auf Caco-2 Zellen die 5 Tagen in Kultur waren keine Effekte mehr zeigt. Zusätzlich wurde die Impedanz der Caco-2 Zellen über die Zeit bestimmt, hierfür wurden Zellen unbehandelt und mit Methotrexat behandelt. Zur Bestimmung der Impedanz wurde das Bionas-System verwendet.

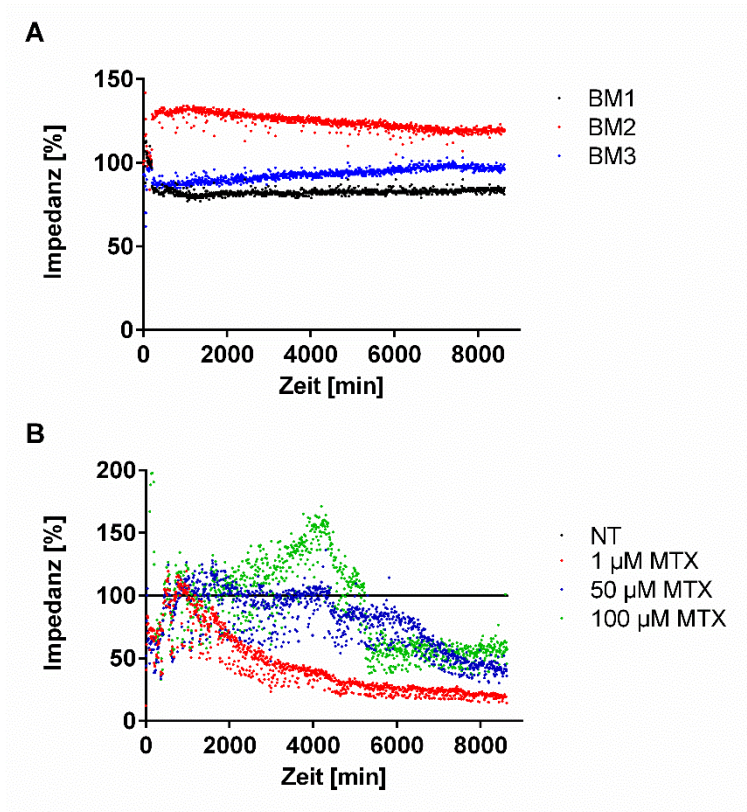


Abbildung 59 BIONAS Daten der Caco-2 Zellen.

Messung der Impedanz von Caco-2 Zellen unbehandelt (A) und nach Behandlung mit Methotrexat (B). Die Messung in A wurde auf den Durchschnittswert der 3 Module normalisiert in B dienten unbehandelte Zellen als Referenz.

Abbildung 59 zeigt die Messung der Impedanz von Caco-2 Zellen innerhalb des Bionas-Systems. Für unbehandelte Zellen wurde ein Anstieg der Impedanz auf $180\% \pm 28\%$ im Vergleich zum initialen Messwert errechnet, was für die Ausbildung einer dichten Zellschicht spricht. Betrachtet man die in B dargestellten Ergebnisse ist für alle drei Methotrexat Behandlungen ein Rückgang der Impedanz zu verzeichnen, wobei die niedrigste Konzentration den rapidesten Effekt zeigte.

Laut Literatur bilden Caco-2 Zellen nach mehreren Tagen unter fluidischen Fluss 3D artige Gebilde, welche Darmzotten ähneln. Bei mikroskopischer Betrachtung wurden diese Gebilde nachgewiesen, da die Caco-2 jedoch auf der Membran kultiviert wurden bleibt die Analyse dieser Beobachtung schwierig. Stattdessen wurde die Ausbildung der konfluenten Zellschicht unter statischen und fluidischen Bedingungen mittels qPCR untersucht. Hierbei wurden die ebenfalls die vier Marker Occludin, ZO-1 Claudin-2 und Claudin-3 untersucht.

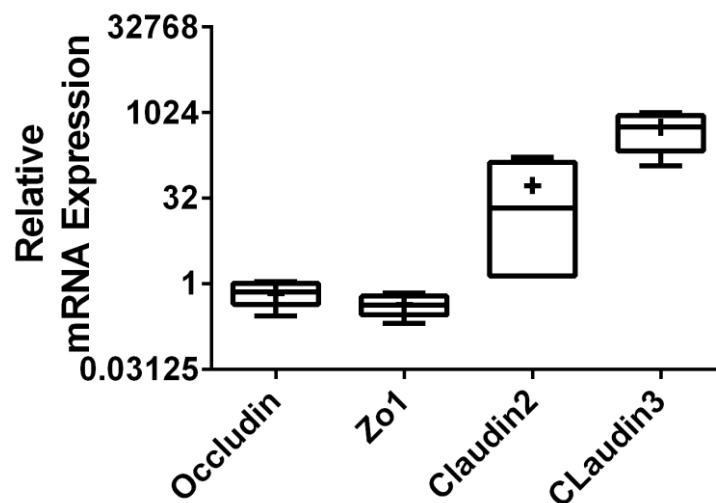


Abbildung 60 mRNA Expression von Zellkontaktmarker in statischer und fluidischer Kultur. Vergleich der mRNA-Expression verschiedener Zellkontaktenzyme zwischen statischer und mikrofluidischer Zellkultur für Caco-2 Zellen. Die Relative mRNA Expression wurde auf Zellen in statischer Kultur bezogen. Alle Datenpunkte wurden $n=6$ Chips bestimmt. Das + in den Boxplot stellt den Mittelwert dar, die zentrale Linie den Median. Fehlerbalken stellen die Whisker des 5% und 95% Quantils dar.

Betrachtet man die Ergebnisse fällt auf, dass die Expression von Claudin 2 und Claudin 3 zwischen fluidischen und statischer Zellkultur stark ansteigt. Hingegen blieb die Expression Occludin und ZO-1 unverändert, was in der Literatur beobachteten Ergebnissen zumindest teilweise widerspricht [70, 103].

Als Nachweis der starken Zell-Zellverbindung der Caco-2 Zellen wurde neben der Analyse der Genexpression auch eine immunhistochemische Färbung auf Occludin 2 durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach 5 Tagen unter fluidischen Fluss fixiert und gefärbt.

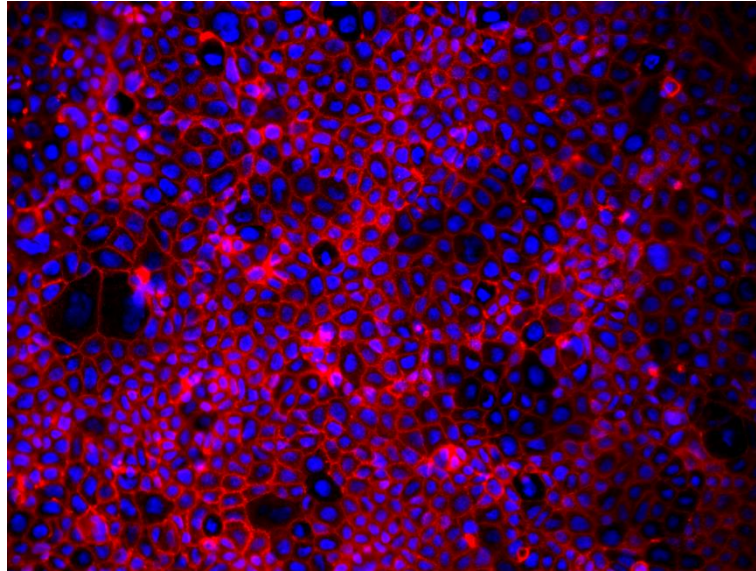


Abbildung 61 Darstellung der Ausbildung von Zellkontaktmarkern.

Immunhistochemische Färbung von Caco-2 Zellen nach 5 Tagen in fluidischer Kultur zur Darstellung des starken Zell-Zell-Kontraktes. Die Färbung wurde gegen Occludin (rot) und den Zellkern (blau)

Zusammenfassend wurde die Ko-Kultur von Caco-2 HepaRG Zellen auf einem membranbasierten mikrofluidischen System realisiert und die Differenzierung der HepaRG Zellen nachgewiesen. Der verstärkte Widerstand der epithelialen Caco-2 Barriere innerhalb des Systems wurde nachgewiesen und die Resorption von Substanzen über die Caco-2 Zellen zu den HepaRG Zellen nachstellen. Im Vergleich zu CC N1- CC N3 wurde auch die Differenzierung der HepaRG Zellen im System nachgewiesen.

Diskussion

4.1 Eignung von mikrofluidischen Systemen als Toxizitätsmodelle

Im letzten Jahrzehnt wurden entscheidende Fortschritte in der Entwicklung physiologisch relevanter *in vitro* Modelle erzielt, welche versuchen die Nachteile etablierter Modelle zu überkommen. Dies liegt zum einen im Fortschritt der Mikroherstellungsverfahren, um Zellplattformen herzustellen, die eine physiologische Umgebung für die Zellen schaffen, zum anderen am Fortschritt in mikrobiologischen und zellbiologischen Bereich. Ein weiterer Faktor der die Entwicklung vorantreibt ist der ethische Gedanke zur Minderung von Tierversuchen und der bereits erwähnte genetische Unterschied zwischen Tiermodell und Mensch.

In den frühen Schritten der Medikamentenentwicklung, in denen viele Verbindungen getestet werden und die Menge an zu testenden Substanzen limitierend ist, sollten statische Plattformen einen hohen Durchsatz generieren und Daten schnell innerhalb von 24-48 Stunden liefern. Um Kosten zu reduzieren, können hepatische Zelllinien für eine anfängliche Bewertung der Arzneimitteltoxizität genutzt werden. Sobald potenzielle Kandidatenverbindung die nächste Stufe der Arzneistoffentwicklung durchlaufen, müssen ihre Auswirkungen auf Gewebetypen auf der mechanistischen Ebene in einem physiologischeren Kontext untersucht werden. Während hepatische Zelllinien günstige und reichlich vorhandene Zellquellen für Hochdurchsatzsysteme bereitstellen, sind sie nicht dazu geeignet, komplexe physiologische Ergebnisse modellieren, was den Einsatz von primären Zellen und Ko-Kultursystemen vorteilhaft macht. Verschiedene Forschungsarbeiten haben die Vorteile des Einsatz von Ko-Kultursystemen und deren potenzielle Integration in die Arzneimittelentwicklung bewiesen [30, 145, 146].

Im Vergleich zu statischen Modellen ermöglicht die Perfusion von Kulturen einen kontinuierlichen Nährstoffaustausch, eine bessere Sauerstoffversorgung und physiologische Scherbelastung. Für Leberkultursysteme reichen die ersten Berichte über die Erhaltung primärer Leberzellen in perfundierter Kultur vier Jahrzehnte zurück [147]. Die Perfusionskultur verbessert die Lebensfähigkeit die Lebensdauer und die metabolische Funktionalität kultivierter Hepatozyten [148-150]. Zellen in fluidischer Perfusionskultur weisen eine höhere Sensitivität gegen Hormone [151] und Wachstumsfaktoren [152] auf. Außerdem bleibt eine nah-physiologische CYP Aktivität erhalten [153], ähnliche Beobachtungen wurden in dieser Thesis gemacht (siehe Abbildung 19).

Eine Klasse von *in vitro* Testsystemen, welche im letzten Jahrzehnt für hohe Zukunftserwartungen gesorgt hat, sind OOC. Zunächst sollte erwähnt werden, dass es nicht das Ziel von OOC ist ein ganzes lebendes Organ nachzubauen, sondern vielmehr eine funktionelle

Untereinheit auf Gewebe- und Organebene zu rekapitulieren. Mit Blick auf die Leberfunktionalität steht die Metabolisierung durch CYP450 Enzyme im Vordergrund.

4.1.1 Eignung des VividDye Tests zur Visualisierung der Leberfunktionalität

Arzneistoffbedingte Leberschädigung ist eine der Hauptursachen für das Scheitern von Arzneimitteln während klinischen Studien. Aufgrund der genetischen Unterschiede zwischen Menschen und Tiermodellen ist die verlässliche Vorhersage von toxischen Wirkungen von Substanzen im Menschen oftmals schwierig. Dies ist unter anderem der unterschiedlichen katalytischen Aktivität und Expression metabolisierender Enzyme geschuldet. Eine der Hauptklassen an metabolisierenden Enzymen sind CYPs, die eng mit dem Metabolismus und der Eliminierung von Medikamenten verbunden sind. Verschiedene CYP-Isoenzyme weisen unterschiedlich starke Diskrepanzen zwischen Mensch und Tier auf. Beispielsweise zeigt CYP2E1 keine großen Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies, wohingegen CYP1A1, 2C, 2D und 3A starke Unterschiede aufweisen [154]. Hinzu kommt, dass CYPs oftmals Ziel für Medikamenten-Medikamenten Interaktionen sind und diese zwischen Spezies unterschiedlich ausfallen können, mit teils gesundheitsschädlichen Folgen für den Menschen.

Vor allem in frühen Stadien der Arzneimittelentwicklung ist es von Interesse die Cytochromaktivität als Reaktion auf Arzneimittelbehandlung zu überwachen [155]. Hierfür werden Fluoreszenz-, Lumineszenz- und chromatografische Verfahren verwendet. Chromatografische Verfahren haben den Nachteil, dass sie nicht mit Lebendzellkultur kombinierbar sind und keine kontinuierliche Beobachtung der Zellen erlauben, hierfür sind lumineszenz- und fluoreszenz-basierte Verfahren vorteilhaft. Diverse lumineszenz-basierte Verfahren wurden in der Literatur in Kombination mit Lebendzellkultur publiziert [156-158]. Lumineszenz-basierte Verfahren haben oftmals eine höhere Sensitivität und eine breitere Induzierbarkeit, erlauben jedoch nicht die Beobachtung per Mikroskop und den Rückschluss auf Einzelzellen. Der von mir entwickelte und optimierte VividDye Test erlaubt sowohl die Integration in Hochdurchsatzverfahren als auch den Test auf Einzelzellebene (siehe Abbildung 36). Verschiedene andere Publikationen haben die Kombination von VividDye Substraten und Zelllysaten oder BACCULOSOMEN® nachgewiesen [22, 124, 159], jedoch nicht die direkte Kombination mit Zellen.

Die Anwendung in 2D Modellen und Multilayer Modellen, sowie die Analyse der Effekte von Arzneistoffbehandlung und Differenzierung konnte mittels VividDye Test nachgewiesen werden (siehe Abbildung 26-Abbildung 32). Ich konnte zeigen, dass nur CYP exprimierend

Zelllinien den VividDye verstoffwechseln können und somit eine zelluläre Differenzierung mit ansteigendem CYP-Level verfolgt werden kann (siehe Tabelle 10). Vor allem die Anwendung zur Verfolgung der zellulären Differenzierung (siehe Abbildung 33) hat entscheidende Vorteile gegenüber anderen Methoden wie qPCR und Westernblot oder auch HPLC-Analyse Verfahren. qPCR und Westernblot Verfahren benötigen die Lyse der Zellen und dienen nur als einmalige Endpunktbestimmungen. HPLC-Verfahren benötigen die Zugabe von Substraten und dienen oftmals nur der Aktivitätsbestimmung einzelner CYP-Isoenzyme, wodurch eine Mischung verschiedener Stoffe verwendet werden muss um das gesamte Spektrum der CYP-Isoenzyme zu testen [159].

Vergleicht man Abbildung 28 und Tabelle 11 fällt auf, dass die Ko-Behandlung von TCDD und Resveratrol im Falle der HepG2 Zellen zu einem starken Rückgang des VividDye Signals führte, dieselbe Behandlung zeigte bei iHep Zellen keinen Effekt. Da der Effekt von Resveratrol in der Literatur auch auf murine Hepatozyten beschrieben ist und mit einer Inhibition von CYP1A1 in Verbindung gebracht wird verbleibt diese Beobachtung ungeklärt.

Einer der kritischen Punkte des VividDye Test ist die Tatsache, dass verschiedenen VividDye Substrate und Arzneistoffbehandlungen keine klare Zuordnung individueller CYP-Enzyme auf den Metabolismus einzelner VividDye Substrate erlauben. Die klare Zuordnung für einzelne CYP-Isoenzyme, wie sie für BACCULOSOMEN® möglich ist, könnte der Tatsache geschuldet sein, dass BACCULOSOMEN® nur ein einzelnes Isoenzyme in großer Menge aufweisen. Im zellulären System hingegen wurde die Expression mehrerer CYPs induziert und die VividDye-Substrate binden in verschiedenen Bindungstaschen einzelner CYP-Isoenzyme, wodurch keine klare Zuordnung möglich ist.

Für die BOMCC EOMCC und BOMR-Substrate wurde eine erhöhte Verstoffwechslung nach Behandlung mit TCDD und E804 beobachtet (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27). TCDD und E804 sind AhR-Liganden und induzieren die Expression von CYP1A1, 1A2 und 1B1, eine Induktion weiteren CYP-Isoenzyme wurde nicht festgestellt (siehe Abbildung 25). Aufgrund dieser Daten vermute ich, dass alle drei VividDye Substrate von AhR-assozierten CYP-Isoenzymen verstoffwechselt werden. Zusätzlich spricht die strukturelle Ähnlichkeit der Substrate mit TCDD für Verstoffwechslung über diese CYPs.

Die Induktion aller VividDye Substrate durch MC3 Behandlung spricht ebenfalls für diese Vermutung, da MC3 aufgrund seiner planaren Struktur und Ähnlichkeit zu TCDD ebenfalls ein AhR-Ligand ist. Der verstärkte Metabolismus des BOMR-Substrats nach Behandlung mit Omeprazol spricht für Verstoffwechslung durch CYP3A4, da Omeprazol als CYP3A4 Induktor bekannt ist [160, 161]. Diese Beobachtung würde auch mit den Herstellerangaben,

dass BOMR durch CYP3A4 verstoffwechselt wird, übereinstimmen, jedoch ist auch die Induktion der AhR assoziierten CYP1A und CYP1B1 durch Omeprazol bekannt, wobei andere Studien die CYP1A2 Inhibition berichtet haben [162]. Die verstärkte Verstoffwechslung von EOMCC nach Induktion durch Acetaminophen würde ebenfalls für eine Selektivität der VividDye Substrate sprechen da Acetaminophen als Induktor von CYP2E1 in der Literatur bekannt ist und dieses EOMCC verstoffwechselt [163, 164]. Ein gegenläufiger Effekt wurde jedoch für die Behandlung mit Rifampicin ermittelt, zwar wurde eine verstärkte Verstoffwechslung von BOMCC beobachtet, die Verstoffwechslung von BOMR, welches ebenfalls von CYP3A4 metabolisiert werden sollte blieb jedoch aus.

Die diversen Effekte verschiedener Substanzen auf die Expression einzelner CYP-Isoenzyme und die Beobachtung das VividDye Substrate durch verschiedene CYP-Isoenzyme verstoffwechselt werden können erlauben keine klare Zuordnung. Aufgrund meiner generierten Ergebnisse denke ich, dass die Herstellerangaben der CYP-Spezifität einzelner VividDye Substrate nicht auf das hier verwendete zellbasierte System ausgeweitet werden können.

Dennoch zeigt der VividDye Test ein breites Anwendungsspektrum mit hoher Zuverlässigkeit (Tabelle 13). Ich postuliere, dass der hier entwickelte VividDye Test sich vor allem für die Integration *in vitro* Lebersystemen und mikrofluidische OOC eignet und hier die Möglichkeit einer schnellen und kontinuierlichen Auskunft über die CYP-Aktivität ermöglicht. Ein konkreteres Beispiel wäre die Anwendung zum Vergleich individueller Leberkammern vor deren Integration in komplexere mikrofluidische Systeme.

4.1.2 Eignung zur Nachahmung der Komplexität in Organ-Organ-Interaktion

In Abhängigkeit der Fragestellung sind in den letzten Jahren verschiedene *in vitro* Modelle entwickelt worden, wobei sich deren Komplexität nach der Fragestellung richtet. In diesem Zusammenhang wurden OOC Systeme von *Edington et al.* aus der Arbeitsgruppe von Linda Griffith [165] auch als microphysiologische Systeme bezeichnet, um der Illusion ein ganzes Organ nachzuahmen vorzubeugen.

Verschiedene frühe Studien haben sich auf hierbei die Rekapitulation einzelner Gewebestrukturen auf fokussiert, wobei verschiedenen Plattformen die zum Beispiel Leber [59, 105, 166] oder Nieren [99, 113] Gewebe nachahmen entstanden sind. Ein früher Bericht über den Metabolismus von Hepatozyten in mikrofluidischen Bioreaktoren ist beispielsweise die Arbeit von *Koebe et al.* [167]. Ohne Zweifel waren diese Studien fundamental für die Weiterentwicklung komplexerer Systeme.

Jedoch ist einer der Hauptvorteile von OOC der Austausch von Metaboliten zwischen verschiedenen Organstrukturen. Eine Übersicht verschiedener OOC Modelle, die die Organ-Organ-Interaktion untersucht haben ist, in Tabelle 2 zu finden.

Auf einem Leber-Colon Carcinom Model mit HepG2 und HCT-116 Zellen wurde der Metabolismus von Tegafur zu 5-Fluorouracil innerhalb der Leberkammer und der Rückgang der Viabilität der HCT-116 Zellen nachgewiesen, wobei die Behandlung der HCT-116 Zellen mit Tegafur in statischer Mikrotiterplattenkultur keinen Rückgang der Viabilität zeigte [55]. Eine weitere Studie die metabolismus-induzierte Toxizität nachweist ist von *Ma et al.* [59]. In einer Leber-Leber Modell wurden in der Bioaktivierung von Acetaminophen durch Lebermikrosomen und die Toxizität auf HepG2 Zellen untersucht. *Chang et al.* haben in ihrem Leber-Nieren System die Toxizität von Aristolsäure auf Nierengewebe untersucht. *Snouber et al.* haben die Nephrotoxizität von Ifosamide nach Bioaktivierung durch die Leber getestet [87]. Eine Kombination von Arzneimitteln kann hilfreich sein, wenn ein einzelnes Arzneimittel eine Krankheit nicht wirksam behandelt oder dieses Arzneimittel in so hohen Dosen verabreicht werden muss, dass es adverse Nebenwirkungen verursacht. *Tatosian and Shuler* haben eine solche Arzneimittel Kombination auf einem OOC die nachgestellt [54]. Unter Verwendung von HepG2 und MEG-01 Zellen wurde die kombinatorische Wirkung von Doxorubicin mit Cyclosporine und Nicardipine auf dem System nachgestellt. Interessanterweise wurde hierbei ein synergischer Effekt der drei Substanzen auf dem OOC erkannt, wohingegen die Ergebnisse aus der statischen Kultur einen additiven Effekt vermuten lassen.

All diese Studien zeigen die Möglichkeit Bioaktivierung und konsekutiven Toxizität auf Zielgewebe in OOC Modellen nachzuweisen. Zusätzlich deuten diese Studien daraufhin, dass solche toxischen Effekte oftmals nicht in statischer Zellkultur nachgewiesen werden können, was die Nutzung von OOC Plattformen erklärt.

4.2 Vergleich der hier vorgestellten OOC Systeme mit alternativen Lösungen

Innerhalb dieser Thesis entwickelten Systeme werden im Folgenden mit alternativen Publizierten Systemen verglichen. Der Fokus wird auf die oben beschriebenen Systeme gelegt, die den Arzneimittelmetabolismus in der Leber und deren Wirksamkeit und /oder Toxizität in anderen Organen untersuchen. Die Bioaktivierung von Substanzen und der Transport zu anderen Gewebetypen wurde in zwei der hier berichteten Teilprojekte untersucht, (Erstens:

Leberassoziierte Nephrotoxizität in einem Leber-Nieren-Chip; Zweitens: Konsekutiver Metabolismus in einem Leber-Nieren-Chip. Innerhalb des “Leberassoziierte Nephrotoxizität in einem Leber-Nieren-Chip“ Projektes wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wie sie in der Literatur beschrieben werden, erst nach der Bioaktivierung durch die Leber konnte eine Toxizität auf das Zielgewebe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 41). Meine Ergebnisse zeigen die Flussrichtungsabhängig Toxizität der Substanzen, was die Bioaktivierung durch die Leber und die Funktionalität des Systems nachweist (siehe Abbildung 41). Ich denke, dass dieses Ergebnis trotz der Einfachheit des Aufbaus eine der essenziellen Erkenntnisse dieser Thesis war, da sowohl die Funktionalität des mikrofluidischen System für den Transport von Substanzen als auch die metabolische Aktivität der verwendeten Zelllinien in Abhängigkeit der CYP-Expression nachgewiesen werden konnte. Ein weiterer Punkt, der deckungsgleich mit der Literatur ist, ist die Tatsache, dass die Toxizität nicht in statischer Zellkultur nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 40). Genauer gesagt ist der mikrofluidische Fluss dem händischen Überführen von Medium überlegen, wodurch der Vorteil des verwendeten Systems nachgewiesen werden konnte. Die Möglichkeit Arzneistoffkombinationen auf einen OOC zu testen wurde ebenfalls auf dem System untersucht, wobei der Fokus in der Induktion oder Inhibition von CYP-Enzymen lag (siehe Abbildung 42). Hierbei habe ich für die Ko-Behandlung von AFB1 und Rifampicin stark konzentrationsabhängig Unterschiede beobachtet.

Im Vergleich zu dem Aufbau, den ich gewählt habe (siehe Abbildung 37), in dem zwei Kammern auf einem Chip miteinander verbunden sind haben *Chang et al.* zwei individuelle Plattformen mittels Schläuchen miteinander verbunden [168]. Dieser Aufbau bietet sowohl Vor- als auch Nachteile. Durch die Nutzung zusätzlicher Schläuche und Verbindungsstücke steigt die Gefahr Luftblasen ins System einzubringen, außerdem sorgen die Verbindungsschläuche für ein größeres Totvolumen und eine längere Verweilzeit der Metaboliten in den Schläuchen bevor sie das Zielgewebe erreichen. Diese kann bei Substanzen mit kurzer Halbwertszeit von Nachteil sein. Vorteile bietet dieser Aufbau dadurch, dass zunächst beide Chips individuell behandelt werden können und die Funktionalität beider Kammern gewährleistet werden kann. Die Vorteile mikrofluidische Plattformen erst zu einem späteren Zeitpunkt zu verbinden wurden *Loskill et al.* diskutiert [169]. Im Vergleich zu dem von mir gewählten Aufbau wurde von *Snouber et al.* ein membranbasierter Chipaufbau verwendet.

Die generierten Ergebnisse und der Vergleich mit anderen publizierten Studien zeigen, dass das präsentierte Modell zur Testung der leberassoziierten Nephrotoxizität von hoher Relevanz ist

und sich durch seine einfache Handhabung auszeichnet. Ich denke das dieses und ähnliche Modelle vor allem in früher Phasen der Medikamentenentwicklung ihren Einsatz finden werden. Trotz der Nutzung von Krebszelllinien kann das Model zur Bewertung der leberassoziierten Nephrotoxizität dienen. Der Einsatz verschiedener Zelllinien wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert.

Eine Limitation des Modells ist die Tatsache, dass es sich innerhalb der Leberkammer um eine Monokultur aus Hepatozyten handelt und somit die Effekte von nicht parenchymalen Zellen nicht wiedergespiegelt werden. Außerdem erlaubt der Aufbau des Systems keine Zonierung, wie sie innerhalb der Leber zu finden ist.

Ein weiterer kritischer Punkt des Systems ist die Tatsache, dass das System Leben/Tot-Färbung zur Identifizierung der Toxizität verwendet hat. Die ist für die verwendeten Substanzen AFB1 und B α P durchaus sinnvoll, da sie sich durch eine hohe Toxizität auszeichnen (siehe Abbildung 39). Für therapeutische relevantere und weniger toxische Substanzen, die zur chronischen Nierenschädigung führen wäre jedoch ein anderes Signal zur Bestimmung der Toxizität sinnvoll. Hierfür empfiehlt sich die Nutzung von Reporterzelllinien, die beispielweise fluoreszente und Luciferase getagte-Reporter Gene aufweisen [170]. Hierbei erweist sich jedoch die Detektion des Signals in kontinuierlicher Art und Weise als problematisch, was den Einsatz der Reporterzelllinien erschwert.

Neben dem Einsatz von OOC Modellen zur Toxizitätstestung bietet sich die Möglichkeit diese in Metabolismus Studien zu nutzen. In Bezug auf die Verwendung von OOC Modellen ergibt sich durch die Nachahmung des Metabolismus ein weiteres Anwendungsfeld neben der Integration in die Arzneistoffentwicklung als präklinisches Modell, die Integration zur Testung bereits etablierten Arzneimittel und Medikamente und die Testung von personenspezifischen Metabolismus. Diesen Anwendungsbereich haben wir innerhalb des Projektes zum konsekutiven Metabolismus in einem Leber-Nieren-Chip-Projekt nachgewiesen. In einem einfachen Modell wurde versucht den Metabolismus von Vit. D3 zu 1,25OH D3 nachzuweisen.

Dieses Modell ist von großem Interesse, da gegenwertige Tiermodelle, Einzel-Nucleotid Polymorphismen, die zu einem veränderter Vit D3 Antwort führen, nicht nachstellen können [171, 172]. Die Relevanz dieses Modells und das wissenschaftliche Interesse an mikrofluidischen Plattformen im Bereich der die Vit. D3 Forschung zeigen die kürzlich publizierten Arbeiten von *Weber et al.* und *Peter et al.* [173, 174]. *Weber et al.* haben in einem

mikrofluidischen proximalen Tubulus Modell den Metabolismus von 25OH D3 zu 1,25OH D3 nachgestellt. *Peter et al.* präsentieren eine lab-on-a-chip Plattform zur Messung von 25OH D3 Leveln. Vor allem in Kombination mit Zellen die Einzel-Nucleotid Polymorphismen in Vit. D3-metabolisierenden Genen aufweisen, kann ein solches Modell zur Aufklärung der Effekte von neuartigen hypokalzämischen Vitamin D Rezeptor Aktivatoren dienen.

Innerhalb dieses Projektes wurden die Zelllinien HepG2, RPTEC, welche eine hohe Induzierbarkeit von Metabolismus assoziierter CYP-Enzymen zeigten genutzt, was deren Verwendung als zur Modellierung des Vit. D3 Metabolismus stärkte.

Hierbei wurde ebenfalls CC N2 verwendet, welches sich durch die einfache Nutzung auszeichnete, die Flussgeschwindigkeit wurde angepasst und konstant gehalten. Ziel war es hierbei die kurze Halbwertszeit der Metaboliten zu kontern. Trotz dieser Überlegung konnte nur 25OHD3 innerhalb der LC/MS-MS Analyse nachgewiesen werden. Betrachtet man jedoch den *in vivo* Nachweis von Vit. D3, fällt auf, dass auch hier nur 25OHD3 bestimmt werden kann, was den kurzen Halbwertszeiten der anderen Metaboliten geschuldet ist. Obwohl die LC/MS-MS Analyse nur den Metabolismus zu 25OHD3 nachweisen konnte, was zunächst den Nutzen der Nierenkammer anzweifeln lässt, zeigte die FACS Analyse und die mRNA Daten, die Notwendigkeit beider Zellkultur Kammern (siehe Abbildung 53 und Abbildung 54). Eine deutliche Differenzierung der HL60 Zellen durch das Eluat des Chipsystems wurde sowohl im Vergleich zu der Behandlung mit Vitamin D3 als auch zu der Behandlung mit den Metaboliten erkannt, was ebenfalls für die Funktionalität des Systems spricht. Bei der Wahl der verwendeten Konzentration wurde darauf geachtet physiologischen Bedingungen zu entsprechen.

Eine entscheidende Verbesserung des Systems stellt die Integration von Zelllinien mit Einzel-Nucleotid Polymorphismen oder die Integration von patientenspezifischen iPS-Zelllinien dar. Ein optimierter Geräteaufbau, würde der Analyse von 1,25(OH) D3 dienen.

Neben der Bioaktivierung von Substanzen durch die Leber spielt der sogenannte First-Pass-Effekt eine entscheidende Rolle für die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen und ist somit ein wichtiger zu untersuchender Parameter in der Arzneistoffentwicklung. Im absorptiven Eigenschaften eines Colon-Leber-Chip-Projektes habe ich versucht ein Modell zu entwickeln, welches den die Resorption von Substanzen über die Darmwand nachstellt. Innerhalb der Literatur haben verschiedene andere Gruppen ähnliche Modelle erarbeitet. *Kim et al.* und *Chi et al.* haben auf Ihrem Darm-on-a-chip Modell den Einfluss mechanischer Scherung und des

Fluidflusses auf die Ausbildung der Darmwand und die Zottelbildung der Caco-2 Zellen diskutiert [70, 103, 175]. Der positive Einfluss des Fluidflusses auf den transepithelialen Widerstand wurde in allen Studien beobachtet. Wie in den zuvor beschriebenen Modellen wurde auch von mir eine höhere Expression an Zell-Zell-Kontakt Marker bei den Caco-2 Zellen in fluidischer Kultur beobachtet [70, 103]. In einem weiteren System haben *Imura et al.* die Darmresorption und den Lebermetabolismus verschiedener Substanzen getestet [176]. Ähnlich wie in dem von mir gewählten Aufbau wurden die Zellen oberhalb der Membran ausgesät und die Substanzen oberhalb der Membran hinzugegeben, als Unterscheid wurden die HepG2 Zellen auf kleinen Träger Partikeln kultiviert. *Pocock et al.* haben ein mikrofluidisches System zur Nachahmung der Darmwand entwickelt, um die absorptiven Eigenschaften neusynthetisierter lipophiler Substanzen und deren Bioverfügbarkeit zu testen [104].

Im Vergleich zu Leber und Nieren Modellen herrscht Auswahl der Zellen zur Nachahmung der Darmwand Einigkeit, in allen Modellen wurden Caco-2 Zellen verwendet, nur *Maschmeyer et al.* berichten über die Verwendung von primären humanen Zellen [177]. Wobei hierbei kein höherer transepithelialer Widerstand beobachtet wurde.

Das hier vorgestellte Modell diente vor allem der Charakterisierung des Chips und der Ausarbeitung geeigneter Fluidflussgeschwindigkeit zur Kultur von Zellen ober- und unterhalb der Membran. Einer der größten Unterschiede in membranbasierten OOC-Systemen stellt die Anordnung der Zellen dar. Diese können entweder oberhalb der Membran oder auf der Unterseite der Membran kultiviert werden. Aus der unterschiedlichen Anordnung ergibt sich eine andersartige Scherung auf die Zellen. Von mir wurden Darmepithelien (Caco-2 Zellen) oberhalb der Membran kultiviert, die Hepatozyten und Sternzellen (HepaRG, HSC) auf dem Boden der unteren Chipkammer (siehe Abbildung 55). Betrachtet man den Aufbau der Darmwand wäre auch eine Aussaat der Zellen auf der Unterseite der Membran denkbar gewesen, um die Ausbildung von Darmzotten zu fördern. Jedoch haben verschiedene Berichte gezeigt, dass Caco-2 Zellen 3D zottenähnliche Strukturen unter Fluidfluss ausbilden. Außerdem war die Anordnung der Zellen auf der Unterseite der Membran nicht möglich, da auf der Bodenseite des Chips (unterhalb der Membran) auf die Hepatozyten und Sternzellen kultiviert wurden. Vor allem die Ausbildung der gewebeartigen Caco-2 Barriere konnte innerhalb der Studie nachgewiesen werden. Mit längerer Kulturdauer und höherer Konfluenz wurde ein signifikanter Anstieg der Resistenz gegenüber von Arzneimittel erkannt. Die Funktionalität des Chipdesigns und die Kokultur von Caco-2 und HepaRG Zellen über mehrere Tage sowie die Resorption von Xenobiotika oberhalb der Membran und der Transport zu den Zellen unterhalb der Membran wurde beobachtet.

Bei der Nutzung der Plattformen CC N1 CC N4 lag der Fokus in der Nachahmung von Toxizität und Metabolismus. Hierbei wurde ein möglichst minimalistischer Ansatz verfolgt was die Einfachheit der Systeme garantiert. Im Vergleich hierzu stellte die Entwicklung von CC S1 ein sehr fortgeschrittenes System dar, bei dem der Fokus auf der Rekonstruktion der Hexagonalen Leberläppchen Struktur und des Blutflusses innerhalb der Leber lag. Da der Fokus dieses Projektes zunächst in der Rekonstruktion der Mikrostruktur der Leber lag, wurde eine toxikologische Fragestellung zunächst in den Hintergrund gerückt. Die Besonderheit liegt in der Fluidführung, welche sich radial im System ausbreitet. Die Zellen sind mit den umliegenden Fluidkanälen durch sehr kleine Mikrokanäle verbunden. Diese Mikrokanäle ermöglichen die Versorgung der Zellen mittels Diffusion, wobei sie nur einen geringen Scherstress auf die Zellen garantieren. CC S1 erlaubt die radiale Skalierung und sowohl die gemischte als auch die räumlich getrennte Co-Kultur von Hepatozyten und nicht parenchymalen Zellen. Eine ähnliche Herangehensweise wurde von *Ho et al.* verfolgt, die mittels speziellen Zellplattierungsverfahren eine Leberläppchenstruktur rekonstruiert haben [178]. Der Vergleich der entwickelten Systeme zeigt deutlich, dass bei der Entwicklung von organ-on-a-chip Modellen unterschiedliche Herangehensweisen und Fragestellung starken Einfluss auf den Aufbau und die Komplexität der Systeme haben.

4.3 Einfluss des Materials und des Aufbaus auf die Funktionalität mikrofluidischer Plattformen

CC S1 wurde in Kooperation mit Kollegen an der Universität Göteborg entwickelt, da es sich um ein mittels Weichlitographie hergestelltes Modell handelt, wurde PDMS zur Realisierung des Systems verwendet.

Die mikrofluidischen Plattformen CC N1 – CC N4 die hauptsächlich während dieser Thesis verwendet wurden, wurden von microfluidic ChipShop Jena bereitgestellt. Da es sich um Plattformen handelt, welche mittels Hochdurchsatz-Heißpräge-Verfahren hergestellt werden ist die Auswahl der Materialien auf Hartplastik beschränkt. Als Materialien wurden PMMA und COP verwendet. Im Vergleich zu PDMS, welches zumeist in universitären Forschungslaboren eingesetzt werden zeigen diese Materialien sowohl Vorteile als auch Nachteile auf. PDMS weist eine hohe Sauerstoffpermeabilität auf, was die ausreichende Versorgung der kultivierten Zellen garantiert. Im Körper herrschen je nach Gewebetyp Sauerstoffkonzentrationen von 0,5-

13% vor [179-181], wodurch sich die Frage ergibt ob eine hohe Sauerstoffpermeabilität zur Nachahmung physiologischer Bedingungen wünschenswert ist. In Bezug auf diese praktischen Arbeiten zu dieser Thesis ist diese Eigenschaft für die Differenzierung der HepaRG Zellen auf dem Chipsystem erforderlich, da diese in den verwendeten Designs CC N1 – CC N3 nicht differenzierten. Für andere, Zelltypen die auf den Chips kultiviert wurden, wie zum Beispiel die Neuron-ähnlichen Zellen, wurde eine bessere Differenzierung erkannt. PDMS zeigt jedoch auch eine hohe Absorption gegenüber kleiner Moleküle, was eine Änderung der Wirkstoffkonzentration gelöster Substanzen zur Folge hat [182], was vor die Bestimmung von Metaboliten mittels chromatografischer Techniken nachteilhaft ist.

Ein alternatives Weichplastik wurde von *Jellali et al.* verwendet [88]. In ihrer Publikation berichten Sie über Verwendung von Perfluoropolyether Biochips für die Kultur von Leber- und Nierenzellen. Perfluoropolyether ist wie PDMS mit Softlithographie-Verfahren kombinierbar, weißt aber geringe absorptive Eigenschaften.

Ein weiterer Punkt der durch die Nutzung von Hartplastik Plattformen vermieden werden konnte ist das Undichtheitsproblem. Dieses tritt an den Bindungsstellen zwischen PDMS und Glas auf und musste in der Entwicklung der CC SN1 Plattform berücksichtigt und optimiert werden.

Neben der Auswahl der Materialien zum Aufbau von OOC Plattformen stellt deren Design einen kritischen Parameter dar. Zunächst sind der Aufbau und die Komplexität von der jeweiligen Fragestellung abhängig. Davon abgesehen, gibt es jedoch unterschiedliche Herangehensweisen zur Dimensionierung einer mikrofluidischen Kammer und keine allgemeine Einigung zwischen verschiedenen Forschungsgruppen. Diese Fragestellung wird insbesondere bei komplexeren multi-organ Plattformen relevant, da jede Kammer nach Masse, Größe, Volumen oder Oberfläche des zu repräsentierenden Organs ausgelegt werden kann [52, 98]. *Wiskwo et al.* beleuchten in diesem Zusammenhang zwei Herangehensweisen an die Dimensionierung von mikrofluidischen Kammern, das Prinzip der allometrischen Skalierung und das Prinzip der funktionalen Skalierung. Allometrische Skalierung hat insbesondere im Bereich der pharmakokinetischen Modellierung und Übertragung auf den Menschen Anwendung gefunden. Der Vorteil dieser Skalierungsmethode liegt in den zahlreichen Studien und Referenzwerten, der Nachteil darin, dass sich Größen für kleinere Organe ergeben, die nur wenigen dutzend Zellen entsprechen würden. Ein weiterer Parameter der in Falle der allometrischen Skalierung kritisch zu betrachten ist die Fluidfluss des zirkulierenden Mediums. Kleinere Tiere haben in der Regel eine höhere Herzrate und eine schnellere Blutzirkulation falls ein OOC Model von der Größe eines Menschen auf die Mikrogröße skaliert wird, würden

schnellere Zirkulationsraten entstehen.

Eine alternative Herangehensweise stellt die funktionelle Skalierung dar. Hierbei liegt der Fokus darin, individuelle mikrofluidische Kammer zu erstellen, die spezifische Organfunktion beibehalten. Ein Nachteil dieser Herangehensweise könnte die zu starke Vereinfachung der OOC Modelle sein, wodurch sich die Interpretation der Ergebnisse für den menschlichen Organismus schwierig gestaltet.

In Bezug auf diese Thesis habe ich die funktionelle Skalierung als Herangehensweise gewählt, wobei darauf abgezielt wurde Untereinheiten zu generieren, die zum Beispiel nur eine sehr spezifische Aufgabe wie die Verstoffwechslung von Substanzen übernehmen. In CC N2 wurde für die Leber und Nierenkammer sogar dieselbe Größe gewählt. Dies lag in der Fragestellung, der Bioaktivierung von Substanzen und der folgenden Toxizität auf sekundäres Gewebe begründet. Für CC N3 wurde die Größe der Nierenkammer halbiert, diese Überlegung war sowohl dadurch begründet, die Scherung innerhalb der Nierenkammer zu erhöhen, sowie eine Zellzahl in den verschiedenen Kammern zu erhalten, welche den physiologischen Größenverhältnissen entspricht.

Ein entscheidender Faktor bei OOC Plattformen ist die Frage, ob das Medium innerhalb der Plattformen rezirkulieren soll. Die hier verwendeten Plattformen stellen eine einfache Lösung dar, das Medium rezirkuliert nicht. Durch diese Tatsache begründet erklärt sich auch die geringe verwendete Flussrate, das Medium verweilt ca. 4 Stunden im Chip was den Metabolismus von im Medium befindlichen Substanzen erlaubt. In rezirkulierenden Systemen wird hingegen oftmals ein Vielfaches des Kammervolumens mehrfach über die Zellen geströmt. Diese Systeme verwenden auch viel schnellere Flussgeschwindigkeiten, da die Metaboliten im Gesamtvolumen akkumulieren können. Eine der Komplikationen bei der Verwendung von rezirkulierenden ist die Fluidverteilung, da ein gewisser Anteil des Gesamtvolumens durch neues Medium ersetzt werden sollte, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Die Verwendung zu großer Gesamtvolumina ist nachteilhaft, da dies zu einer starken Verdünnung der Metaboliten führt. In Bezug auf diese Arbeit denke ich, dass bei Zweikammersystemen, wie sie verwendet wurden, die Rezirkulation des Mediums nicht zwingend nötig ist und durch geringe Flussraten ersetzt werden kann. Bei komplexeren Mehrkammersystemen hingegen ist die Rezirkulation durchaus sinnvoll.

4.4 Einfluss der verwendeten Zelltypen auf die Funktionalität mikrofluidischer Plattformen

Einen entscheidenden Faktor auf die Funktionalität von *in vitro* Systemen, einschließlich OOC, stellt der Typ der kultivierten Zellen dar. Prinzipiell stehen mehrere Zelltypen wie primäre Zellen, immortalisierte Zelllinien und pluripotente Stammzellen zu Verfügung. Primäre Zellen repräsentieren die *in vivo* Zustände am engsten und sind das physiologisch relevanteste Modell, zeigen jedoch Nachteile in ihrer limitierten Lebensdauer, Dedifferenzierung und begrenzten Passagenzahl *ex vivo* [28, 183, 184]. Ihre Donor-abhängige Variation macht primäre humane Zellen zu einer schwer reproduzierbaren Quelle. Primärzellen aus Nagetieren, sind einfacher zugänglich und erlauben den direkten Vergleich mit lebenden Modellen, allerdings verlieren sie wie ihre menschlichen Gegenstücke schnell ihren Differenzierungsgrad und erlauben oftmals aufgrund von Interspeziesunterschieden keinen Rückschluss auf den Menschen. Die Verwendung von immortalisierten Zelllinien löst einige der Probleme von Primärzellen, indem eine konstante Chargenvariation bereitgestellt wird. Zelllinien sind robust, leicht zu kultivieren und können einer genetischen Manipulation unterzogen werden, was die Aufklärung von intrazelluläre Rezeptoren und genetische Wege, sowie ihre Verwendung als Reporterzelllinien erlaubt. Jedoch spiegeln Zelllinien im Vergleich zu primären Zellen oftmals die *in vivo* Situation verändert oder vereinfacht wider. Als Folge der Langzeitkultur der Zellen entstehen genetische und phänotypische Veränderungen in. Immortalisierte Zelllinien werden für gewöhnlich in Monoschicht kultiviert und haben nicht die 3D Zell-Zell-Wechselwirkungen, die *in vitro* gefunden werden, was zu einer weiteren Änderung des Phänotyps führt. Außerdem handelt es sich bei Zelllinien oftmals um Krebszelllinien, die aus dem Tumorgewebe erkrankter Patienten stammen und veränderte Genexpression im Vergleich zu gesunden Zellen aufweisen.

Innerhalb dieser Thesis wurden sowohl primäre murine Hepatozyten, welche als Goldstandard für die Toxizitätstestung dienen als auch die Krebszelllinie HepG2 innerhalb der mikrofluidischen Kammern kultiviert. Verschiedene Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass primäre Hepatozyten unter kontinuierlichen Fluidfluss ihre phänotypischen Eigenschaften länger aufrechterhalten können als in 2D Zellkultur [105, 112, 185]. Ähnliche Beobachtungen konnten innerhalb dieser Thesis für die Morphologie und die Albuminsekretion erhoben

werden. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit und der einfacheren Kultur wurden jedoch Zelllinien der Vorrang gegeben.

HepG2 weisen in Bezug auf die Expression von leberspezifischen Marker große Unterschiede zu primären Hepatozyten auf [32, 186, 187]. Vor allem die Expression einzelner CYP-Enzyme in HepG2 ist stark abweichend. Beispielweise ist der Unterschied in der mRNA Expression von CYP1A1 und CYP1A2 relativ gering, wohingegen die Expression von CYP2E1 und CYP3A4 deutlich niedriger sind [87, 188]. Diese Beobachtung konnte auch in den praktischen Arbeiten zu dieser Thesis nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24). Allerdings zeigen vor allem neuere Studien, dass die mRNA Expression und Funktionalität von HepG2 Zellen stark von ihren Kulturbedingungen abhängt, beispielweise haben *Luckert et al.* nachgewiesen, dass HepG2 Zellen in Langzeitkultur deutlich höhere Expressionslevel an CYP-Enzymen aufweisen als in Standard 2D-Zellkultur. Hinzu kommt, dass ich nachweisen konnte, dass der fluidische Fluss die mRNA Expression verschiedener CYP-Isoenzyme induziert (siehe Abbildung 19). Betrachtet man verschiedene Studien sind HepG2 insbesondere in fluidischen Anwendungen ein etabliertes Modell [75, 118, 122, 189, 190], was nicht zuletzt ihrer ausreichenden Funktionalität in vielen Anwendungen geschuldet ist. Dies zeigt, dass HepG2 Zellen trotz einiger Kritik ein relevantes Modell zur Nachahmung von Metabolismus und Hepatotoxizität sind.

In Bezug auf diese Thesis wurden HepG2 Zellen verwendet, da diese entsprechende CYP-Enzyme, welche für den Metabolismus der verwendeten Substanzen verantwortlich sind aufweisen. Außerdem haben HepG2 den Vorteil, dass sie keine Differenzierung bzw. Dedifferenzierung unterliegen und somit zum einen schnell nutzbares System sind, zum anderen auch nach mehreren Tagen in Kultur noch konstante Ergebnisse liefern können. Hinzu kommt, dass wie oben erwähnt, HepaRG Zellen auf CC N1- CC N3 nicht differenzierten, sodass deren Nutzung nicht infrage kam. Als Modell für die Nieren Zellen wurden im Leberassoziierte Nephrotoxizität in einem Leber-Nieren-Chip- Projekt Hek293 Zellen verwendet. Hek293 gilt als befriedigendes Nierenzell-Modell, das verschiedene Marker der Nephrotoxizität aufweist [135, 191-193]. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Hek293 Zellen als Ziel sekundärer Toxizität dienen sollten und keine Nierenspezifischen Aufgaben übernehmen mussten. Für das Konsekutiver Metabolismus in einem Leber-Nieren-Chip Projekt wurden Hek293 Zellen durch RPTEC Zellen ersetzt, da in diesem Projekt ein nierenspezifischer Metabolismus benötigt wurde und RPTEC deutlich mehr CYP-Enzyme aufwiesen (siehe Abbildung 47).

Die Integration von iPS-basierten Zellen würde die physiologische Relevanz der Modelle erhöhen und die Möglichkeit geben Krankheitsbilder oder den genetischen Hintergrund einzelner Personen auf den Chipsystemen nachzuahmen. In Bezug auf die in dieser Thesis verwendeten Systeme, würde der Wechsel von Zelllinien auf andere Modelle auch verschiedene Probleme mit sich ziehen. Sobald nicht voll ausdifferenzierte Zellen, sowohl Zelllinien wie HepaRG oder iPSC Vorläufer Zellen, in ein Chipsystem eingebracht werden sollen, steigt die Komplexität des Designs. Oftmals benötigen diese Zellen individuelle Medien und mehrere Tage bis Sie ihren voll differenzierten Phänotyp erreicht haben. einzelnes Medium zur Versorgung der verschiedenen Zellkulturkammern genutzt werden kann.

Für die hier verwendeten Systeme empfiehlt sich meiner Meinung nach die Integration von Reporter-Zelllinien. Diese Zellen könnten, wie oben erwähnt zusätzliche Informationen neben der Lebend/Tot-Färbung liefern, ohne die Komplexität des Systems zu erhöhen.

Somit wird es deutlich, dass sich die Wahl des Zelltyps und der Zelllinie nach der spezifischen Fragestellung richten sollte und nicht zusätzliche Komplexität in das System einbringen sollte.

4.5 Schlussbemerkungen und zukünftige Perspektive

Die hier verwendeten Systeme zeichnen sich, trotz ihrer hohen Funktionalität, vor allem durch ihre einfache Handhabung aus, welche zum einen der Nutzung von Zelllinien zum anderen dem Design der Plattformen geschuldet ist. Insgesamt wurde in allen Teilprojekten den Vorteil von OOC Plattformen gegenüber statischen Zellkulturmodellen nachgewiesen. Als nächsten Schritt sehe ich die Integration von toxikologischen Reporter Zelllinien und die Kombination eines drei Organsystem mit Colon-Leber-Niere in einem mikrofluidischen Aufbau, der einen membranbasierter und einen diffusionsbasierten Ansatz kombiniert.

Zusätzlich ist die Integration verschiedener Sensorsysteme zur kontinuierlichen Überwachung des Glukose- und Sauerstoffverbrauchs, des pH-Wertes und der zellulären Impedanz nützlich, um ein ganzheitliches Bild der Effekte nach Arzneistoffbehandlung zu erhalten.

Ich erwarte, dass diese und ähnliche Systeme in frühen Stadien der Medikamentenentwicklung zuverlässigere Ergebnisse und sogar neue Erkenntnisse die konventionelle 2D Kultur nicht erkennen, liefern können.

In toto zeigt die Entwicklung innerhalb der letzten 10 Jahre, dass OOC Modelle die präklinische Forschung revolutionieren und zu einer Minderung der Tierversuche beitragen können. Neben dem Einsatz in der präklinischen Forschung liefert die Integration von iPS Zellen in OOC Modelle den Einsatz in der personalisierten Medizin. Hierdurch dienen OOC nicht nur als präklinische *in vitro* Modelle, sondern können auch als “Bedsid-Test“ eingesetzt werden, um eine optimale Behandlung und Wirkstoffkombination für individuelle Patienten zu gewährleisten.

Diese Entwicklung, welche in der Literatur auch als “Patient-on-a-Chip“ betitelt wird weißt jedoch eine Reihe von Hindernissen auf, die zuvor an andere Stelle diskutiert wurden [194, 195]. Weitere Optimierungen sind sowohl auf der biologischen Seite und dem Bereich der iPS-Technologie [196, 197], sowie auf der mikroingenieurswissenschaftlichen [52, 98]. Seite erforderlich, um solche “Patient-on-a-Chip“ Plattformen zu generieren. Nur mithilfe einer multidisziplinären Herangehensweise und der engen Kooperation beider Seiten wird die Entwicklung von Patient-on-a-Chip Plattformen möglich sein.

Referenzen

1. Adams, C.P. and V.V. Brantner, *Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars?* Health Aff, 2006. **25**(2): p. 420-8.
2. Hughes, B., *2009 FDA drug approvals*. Nature Reviews drug discovery, 2010. **9**(2): p. 89-92.
3. Overington, J.P., B. Al-Lazikani, and A.L. Hopkins, *How many drug targets are there?* Nature Reviews drug discovery, 2006. **5**(12): p. 993-996.
4. Ballet, F., *Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions*. Journal of hepatology, 1997. **26**: p. 26-36.
5. Fasel, J.H., et al., *Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice*. 2007.
6. Becker, V., *Der Blutkreislauf in der Leber*. Schweiz, med. Wschr, 1955. **85**: p. 801.
7. Kühnel, W., *Taschenatlas Histologie*. 2014: Georg Thieme Verlag.
8. Jungermann, K., *Metabolic zonation of liver parenchyma: significance for the regulation of glycogen metabolism, gluconeogenesis, and glycolysis*. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 1987. **3**(1): p. 269-293.
9. Lindros, K.O., *Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver*. General Pharmacology: The Vascular System, 1997. **28**(2): p. 191-196.
10. Meijer, A.J., W.H. Lamers, and R. Chamuleau, *Nitrogen metabolism and ornithine cycle function*. Physiological Reviews, 1990. **70**(3): p. 701-748.
11. Gates, G.A., et al., *The cell population of human liver*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1961. **57**(2): p. 182-184.
12. Omura, T., *Forty years of cytochrome P450*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **266**(3): p. 690-698.
13. Axelrod, J., *The enzymatic demethylation of ephedrine*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1955. **114**(4): p. 430-438.
14. Brodie, B.B., et al., *Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes*. Science (New York, NY), 1955. **121**(3147): p. 603.
15. Guengerich, F., *Characterization of human cytochrome P450 enzymes*. The FASEB Journal, 1992. **6**(2): p. 745-748.
16. Nishimura, M., et al., *Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR*. Yakugaku zasshi, 2003. **123**(5): p. 369-375.
17. Rendic, S., *Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data*. Drug metabolism reviews, 2002. **34**(1-2): p. 83-448.
18. Burke, M.D., et al., *Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver*. Biochemical pharmacology, 1994. **48**(5): p. 923-936.
19. Clarke, S., *7-Alkoxy coumarins as cytochrome P 450 CYP2D6 isoenzyme substrates and their pharmacological use*. PCT International Application WO, 1999. **99**(58710): p. 18.
20. Stresser, D.M., et al., *Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates*. Drug Metabolism and Disposition, 2000. **28**(12): p. 1440-1448.
21. Bapiro, T.E., et al., *Application of higher throughput screening (HTS) inhibition assays to evaluate the interaction of antiparasitic drugs with cytochrome P450s*. Drug Metabolism and Disposition, 2001. **29**(1): p. 30-35.
22. Marks, B.D., et al., *A high throughput screening assay to screen for CYP2E1 metabolism and inhibition using a fluorogenic Vivid® P450 substrate*. Assay and Drug Development Technologies, 2002. **1**(1): p. 73-81.
23. Kelly, J.H. and N.L. Sussman, *A fluorescent cell-based assay for cytochrome P-450 isozyme 1A2 induction and inhibition*. Journal of biomolecular screening, 2000. **5**(4): p. 249-253.

24. Theobald, J., et al., *Monitoring cytochrome P450 activity in living hepatocytes by chromogenic substrates in response to drug treatment or during cell maturation*. Archives of toxicology, 2017: p. 1-17.
25. Jaeschke, H., et al., *Mechanisms of hepatotoxicity*. Toxicological Sciences, 2002. **65**(2): p. 166-176.
26. Kaplowitz, N., *Idiosyncratic drug hepatotoxicity*. nature reviews drug discovery, 2005. **4**(6): p. 489-499.
27. Begue, J.M., et al., *Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type*. Hepatology, 1984. **4**(5): p. 839-842.
28. LeCluyse, E.L., *Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **13**(4): p. 343-368.
29. Liu, Y., et al., *Animal models of chronic liver diseases*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2013. **304**(5): p. G449-G468.
30. LeCluyse, E.L., et al., *Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing*. Critical reviews in toxicology, 2012. **42**(6): p. 501-548.
31. Harris, A.J., S.L. Dial, and D.A. Casciano, *Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2004. **549**(1): p. 79-99.
32. Westerink, W.M. and W.G. Schoonen, *Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells*. Toxicology in Vitro, 2007. **21**(8): p. 1581-1591.
33. Luckert, C., et al., *Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells*. Archives of toxicology, 2017. **91**(1): p. 393-406.
34. Guillouzo, A., et al., *The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics*. Chemo-Biological Interactions, 2007. **168**(1): p. 66-73.
35. Carrel, A., *Pure Cultures of Cell*. JEM, 1912: p. 3.
36. Dunn, J.C., et al., *Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration*. The FASEB Journal, 1989. **3**(2): p. 174-7.
37. Liu, X., et al., *Partial maintenance of taurocholate uptake by adult rat hepatocytes cultured in a collagen sandwich configuration*. Pharmaceutical Research, 1998. **15**(10): p. 1533-1539.
38. Swift, B., N.D. Pfeifer, and K.L. Brouwer, *Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity*. Drug metabolism reviews, 2010. **42**(3): p. 446-471.
39. Jemnitz, K., et al., *Interspecies differences in acetaminophen sensitivity of human, rat, and mouse primary hepatocytes*. Toxicology in Vitro, 2008. **22**(4): p. 961-967.
40. Schug, M., et al., *Primary rat hepatocytes as in vitro system for gene expression studies: comparison of sandwich, Matrigel and 2D cultures*. Archives of toxicology, 2008. **82**(12): p. 923-931.
41. Godoy, P., et al., *Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME*. Archives of toxicology, 2013. **87**(8): p. 1315-1530.
42. Parrish, A.R., A.J. Gandolfi, and K. Brendel, *Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology*. Life sciences, 1995. **57**(21): p. 1887-1901.
43. Kelm, J.M., et al., *Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **83**(2): p. 173-180.

44. Kim, J.H., et al., *Enhanced metabolizing activity of human ES cell-derived hepatocytes using a 3D culture system with repeated exposures to xenobiotics*. Toxicological Sciences, 2015. **147**(1): p. 190-206.
45. Bell, C.C., et al., *Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 25187.
46. Castillo-León, J. and W.E. Svendsen, *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems: A Practical Guide*. 2014: Springer.
47. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
48. Tritton, D., *Physical Fluid Dynamics (Oxford Science Publications, Oxford)*. 2] Kraichnan, RH, 1967.
49. Batchelor, G., K. 1967 *An Introduction to Fluid Dynamics*. 1970, Cambridge University Press.
50. Mackowiak, J., *Fluiddynamik von Füllkörpern und Packungen: Grundlagen der Kolonnenauslegung*. 2013: Springer-Verlag.
51. Bronzino, J.D., *Biomedical engineering handbook*. Vol. 2. 1999: CRC press.
52. Wikswo, J.P., et al., *Scaling and systems biology for integrating multiple organs-on-a-chip*. Lab on a Chip, 2013. **13**(18): p. 3496-3511.
53. Esch, E.W., A. Bahinski, and D. Huh, *Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(4): p. 248-260.
54. Tatosian, D.A. and M.L. Shuler, *A novel system for evaluation of drug mixtures for potential efficacy in treating multidrug resistant cancers*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **103**(1): p. 187-198.
55. Sung, J.H. and M.L. Shuler, *A micro cell culture analog (μ CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs*. Lab on a Chip, 2009. **9**(10): p. 1385-1394.
56. Sung, J.H., C. Kam, and M.L. Shuler, *A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip*. Lab on a Chip, 2010. **10**(4): p. 446-455.
57. Trietsch, S.J., et al., *Microfluidic titer plate for stratified 3D cell culture*. Lab on a Chip, 2013. **13**(18): p. 3548-3554.
58. Testai, E., *The Drug-Metabolizing Enzymatic System and the Experimental Tools used for In Vitro Toxicology for Metabolic Studies*. Cell Biology and Toxicology, 2001. **17**(4-5): p. 271-285.
59. Ma, B., et al., *Characterization of drug metabolites and cytotoxicity assay simultaneously using an integrated microfluidic device*. Lab Chip, 2009. **9**(2): p. 232-8.
60. Prot, J.M., et al., *Integrated Proteomic and Transcriptomic Investigation of the Acetaminophen Toxicity in Liver Microfluidic Biochip*. PLoS ONE, 2011. **6**(8): p. e21268.
61. Prot, J.-M., et al., *A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **408**(1): p. 67-75.
62. Huh, D., et al., *A Human Disease Model of Drug Toxicity-Induced Pulmonary Edema in a Lung-on-a-Chip Microdevice*. Science Translational Medicine, 2012. **4**(159): p. 159ra147.
63. Agarwal, A., et al., *Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies*. Lab on a Chip, 2013. **13**(18): p. 3599-3608.
64. Tavana, H., et al., *Epithelium damage and protection during reopening of occluded airways in a physiologic microfluidic pulmonary airway model*. Biomedical Microdevices, 2011. **13**(4): p. 731-742.
65. Grosberg, A., et al., *Muscle on a chip: in vitro contractility assays for smooth and striated muscle*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2012. **65**(3): p. 126-135.
66. Vidi, P.-A., et al., *Disease-on-a-chip: mimicry of tumor growth in mammary ducts*. Lab on a Chip, 2014. **14**(1): p. 172-177.
67. Gori, M., et al., *Investigating Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Liver-on-a-Chip Microfluidic Device*. PLoS ONE, 2016. **11**(7): p. e0159729.

68. Ploss, A., et al., *Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(7): p. 3141-3145.
69. March, S., et al., *A microscale human liver platform that supports the hepatic stages of Plasmodium falciparum and vivax*. Cell host & microbe, 2013. **14**(1): p. 104-115.
70. Kim, H.J., et al., *Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow*. Lab on a Chip, 2012. **12**(12): p. 2165-2174.
71. Aref, A.R., et al., *Screening therapeutic EMT blocking agents in a three-dimensional microenvironment*. Integrative Biology, 2013. **5**(2): p. 381-389.
72. Riccalton-Banks, L., et al., *Long-term culture of functional liver tissue: three-dimensional coculture of primary hepatocytes and stellate cells*. Tissue engineering, 2003. **9**(3): p. 401-410.
73. Douville, N.J., et al., *Fabrication of Two-Layered Channel System with Embedded Electrodes to Measure Resistance Across Epithelial and Endothelial Barriers*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(6): p. 2505-2511.
74. Huh, D., et al., *Reconstituting organ-level lung functions on a chip*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1662-1668.
75. Kimura, H., et al., *An On-Chip Small Intestine–Liver Model for Pharmacokinetic Studies*. Journal of laboratory automation, 2015. **20**(3): p. 265-273.
76. Kimura, H., et al., *An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models*. Lab on a Chip, 2008. **8**(5): p. 741-746.
77. Cucullo, L., et al., *The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology*. BMC Neuroscience, 2011. **12**(1): p. 40.
78. Cucullo, L., et al., *A dynamic in vitro BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010.
79. Chen, M.B., et al., *A 3D microfluidic platform incorporating methacrylated gelatin hydrogels to study physiological cardiovascular cell-cell interactions*. Lab on a Chip, 2013. **13**(13): p. 2591-2598.
80. van der Meer, A.D., et al., *Three-dimensional co-cultures of human endothelial cells and embryonic stem cell-derived pericytes inside a microfluidic device*. Lab on a Chip, 2013. **13**(18): p. 3562-3568.
81. Imura, Y., E. Yoshimura, and K. Sato, *Microcirculation system with a dialysis part for bioassays evaluating anticancer activity and retention*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(3): p. 1683-1688.
82. Wagner, I., et al., *A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture*. Lab on a Chip, 2013. **13**(18): p. 3538-3547.
83. Esch, M.B., et al., *Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury*. Lab on a Chip, 2014. **14**(16): p. 3081-3092.
84. Materne, E.-M., et al., *The Multi-organ Chip-A Microfluidic Platform for Long-term Multi-tissue Coculture*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2015(98): p. e52526-e52526.
85. Miller, P.G. and M.L. Shuler, *Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system*. Biotechnology and bioengineering, 2016.
86. Theobald, J., et al., *Liver-kidney-on-chip to study toxicity of drug metabolites*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2017.
87. Choucha-Snouber, L., et al., *Investigation of ifosfamide nephrotoxicity induced in a liver–kidney co-culture biochip*. Biotechnology and Bioengineering, 2013. **110**(2): p. 597-608.
88. Jellali, R., et al., *Liver and kidney cells cultures in a new perfluoropolyether biochip*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016. **229**(Supplement C): p. 396-407.
89. Kim, Y., et al., *Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(3): p. 1078-1083.
90. Irudayam, J.I., et al., *Modeling Liver Diseases Using Induced Pluripotent Stem Cell (Ipsc)-Derived Hepatocytes*. Journal of Stem Cell Research & Therapy, 2014. **2014**.

91. Grskovic, M., *Induced pluripotent stem cells opportunities for disease modelling and drug discovery*. Nature, 2011: p. 915-929
92. Yagi, T., et al., *Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells*. Human molecular genetics, 2011. **20**(23): p. 4530-4539.
93. Marchetto, M.C., et al., *Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: progress and promises*. Human molecular genetics, 2011. **20**(R2): p. R109-R115.
94. Moretti, A., et al., *Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(15): p. 1397-1409.
95. Freund, C. and C.L. Mummery, *Prospects for Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Cardiac Cell Therapy and as Disease Models*. Journal of Cellular Biochemistry, 2009. **107**(4): p. 592-599.
96. Iglesias-Garcia, O., B. Pelacho, and F. Prosper, *Induced pluripotent stem cells as a new strategy for cardiac regeneration and disease modeling*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2013. **62**: p. 43-50.
97. Itzhaki, I., et al., *Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **471**(7337): p. 225-9.
98. Wikswow, J.P., et al., *Engineering Challenges for Instrumenting and Controlling Integrated Organ-on-Chip Systems*. IEEE transactions on bio-medical engineering, 2013. **60**(3): p. 682-690.
99. Ferrell, N., et al., *Albumin handling by renal tubular epithelial cells in a microfluidic bioreactor*. Biotechnology and Bioengineering, 2012. **109**(3): p. 797-803.
100. Jang, K.-J. and K.-Y. Suh, *A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells*. Lab on a Chip, 2010. **10**(1): p. 36-42.
101. Schophuizen, C.M.S., et al., *Development of a living membrane comprising a functional human renal proximal tubule cell monolayer on polyethersulfone polymeric membrane*. Acta Biomaterialia, 2015. **14**(Supplement C): p. 22-32.
102. Griep, L., et al., *BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function*. Biomedical Microdevices, 2013. **15**(1): p. 145-150.
103. Kim, H.J. and D.E. Ingber, *Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation*. Integrative Biology, 2013. **5**(9): p. 1130-1140.
104. Pocock, K., et al., *Intestine-on-a-Chip Microfluidic Model for Efficient in Vitro Screening of Oral Chemotherapeutic Uptake*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2017. **3**(6): p. 951-959.
105. Lee, P.J., P.J. Hung, and L.P. Lee, *An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture*. Biotechnology and Bioengineering, 2007. **97**(5): p. 1340-1346.
106. Toh, Y.-C., et al., *A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing*. Lab on a Chip, 2009. **9**(14): p. 2026-2035.
107. Banaeiyan, A., et al., *Design and fabrication of a scalable liver-lobule-on-a-chip microphysiological platform*. Biofabrication, 2017. **9**(1): p. 015014.
108. Bhatia, S.N. and D.E. Ingber, *Microfluidic organs-on-chips*. Nature biotechnology 2014.
109. Sharma V, M.J., *To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation*. Br J Pharmacol, 2009: p. 907-21.
110. Dash, A., et al., *Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2009. **5**(10): p. 1159-1174.
111. Jang, K.-J., et al., *Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment*. Integrative Biology, 2013. **5**(9): p. 1119-1129.
112. Kane, B.J., et al., *Liver-specific functional studies in a microfluidic array of primary mammalian hepatocytes*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(13): p. 4291-4298.
113. Miravète, M., et al., *Renal tubular fluid shear stress promotes endothelial cell activation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **407**(4): p. 813-817.
114. Tanaka, Y., et al., *Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system*. Measurement Science and Technology, 2006. **17**(12): p. 3167.

115. Powers, M.J., et al., *A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture*. Biotechnology and Bioengineering, 2002. **78**(3): p. 257-269.
116. Flores, D., et al., *Fluid Shear Stress Induces Renal Epithelial Gene Expression through Polycystin-2-Dependent Trafficking of Extracellular Regulated Kinase*. Nephron. Physiology, 2011. **117**(4): p. p27-p36.
117. Duan, Y., et al., *Shear-induced reorganization of renal proximal tubule cell actin cytoskeleton and apical junctional complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(32): p. 11418-11423.
118. Choe, A., et al., *Microfluidic Gut-liver chip for reproducing the first pass metabolism*. Biomedical Microdevices, 2017. **19**(1): p. 4.
119. Bhatia, S., et al., *Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1998. **9**(11): p. 1137-1160.
120. Guguen-Guillouzo, C., et al., *Changes in some chromatin and cytoplasmic enzymes of perinatal rat hepatocytes during culture*. In vitro, 1980. **16**(1): p. 1-10.
121. Baudoin, R., et al., *Investigation of expression and activity levels of primary rat hepatocyte detoxication genes under various flow rates and cell densities in microfluidic biochips*. Biotechnology Progress, 2014. **30**(2): p. 401-410.
122. Prot, J.M., et al., *Improvement of HepG2/C3a cell functions in a microfluidic biochip*. Biotechnology and Bioengineering, 2011. **108**(7): p. 1704-1715.
123. Snouber, L.C., et al., *Analysis of transcriptomic and proteomic profiles demonstrates improved Madin–Darby canine kidney cell function in a renal microfluidic biochip*. Biotechnology Progress, 2012. **28**(2): p. 474-484.
124. Marks, B.D., et al., *High-throughput screening assays for the assessment of CYP2C9* 1, CYP2C9* 2, and CYP2C9* 3 metabolism using fluorogenic Vivid® substrates*. Journal of biomolecular screening, 2004. **9**(5): p. 439-449.
125. Trubetskoj, O.V., J.R. Gibson, and B.D. Marks, *Highly miniaturized formats for in vitro drug metabolism assays using Vivid® fluorescent substrates and recombinant human cytochrome P450 enzymes*. Journal of biomolecular screening, 2005. **10**(1): p. 56-66.
126. Ma, Q., *Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm transcription, receptor regulation, and expanding biological roles*. Current drug metabolism, 2001. **2**(2): p. 149-164.
127. Hankinson, O., *The aryl hydrocarbon receptor complex*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1995. **35**(1): p. 307-340.
128. Göttel, M., et al., *Estrogen receptor α and aryl hydrocarbon receptor cross-talk in a transfected hepatoma cell line (HepG2) exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicology Reports, 2014. **1**: p. 1029-1036.
129. Fukuda, I., et al., *Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and its antagonists, flavonoids*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **359**(3): p. 822-827.
130. Griffiths, A.L. and J.C. Schroeder, *EFFECTS OF RESVERATROL ON AHR ACTIVITY IN CELLS TREATED WITH BENZO [A] PYRENE OR INDIGO*. Georgia Journal of Science, 2017. **75**(1): p. 44.
131. Murray, J.W., et al., *Heterogeneous accumulation of fluorescent bile acids in primary rat hepatocytes does not correlate with their homogenous expression of ntcp*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2011. **301**(1): p. G60-G68.
132. Ledda, C., et al., *Non-infective occupational risk factors for hepatocellular carcinoma: A review*. Molecular Medicine Reports, 2017. **15**(2): p. 511-533.
133. Yagi, H., O. Hernandez, and D. Jerina, *Synthesis of (+)-7. beta., 8. alpha.-dihydroxy-9. beta., 10. beta.-epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [a] pyrene, a potential metabolite of the carcinogen benzo [a] pyrene with stereochemistry related to the antileukemic triptolides*. Journal of the American Chemical Society, 1975. **97**(23): p. 6881-6883.
134. Boström, C.-E., et al., *Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air*. Environmental health perspectives, 2002. **110**(Suppl 3): p. 451.

135. Gooch, J.L., et al., *Cyclosporine A alters expression of renal microRNAs: New insights into calcineurin inhibitor nephrotoxicity*. PLoS ONE, 2017. **12**(4): p. e0175242.
136. Feldman, D., et al., *The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression*. Nature reviews cancer, 2014. **14**(5): p. 342-357.
137. Ostrem, V.K., et al., *Induction of monocytic differentiation of HL-60 cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D analogs*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(29): p. 14164-14171.
138. Iwasaki, A., *The importance of CD11b+ dendritic cells in CD4+ T cell activation in vivo: with help from interleukin 1*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **198**(2): p. 185-190.
139. Jonas, L., et al., *Electron microscopic study of receptor mediated endocytosis of a monoclonal antibody (RoMo-1) against the surface marker CD 14 of human monocytes*. Acta histochemica. Supplementband, 1990. **39**: p. 339-344.
140. Veigl, M.L., et al., *Induction of myeloid differentiation of HL-60 cells with naphthalene sulfonamide calmodulin antagonists*. Cancer research, 1986. **46**(5): p. 2300-2305.
141. Safadi, F.F., et al., *Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein*. The Journal of clinical investigation, 1999. **103**(2): p. 239-251.
142. Gargam, N., et al., *Experimental system to detect a labeled cell monolayer in a microfluidic environment*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2015. **42**(4): p. 1100-1105.
143. Huang, C., et al., *Microfluidic chip for monitoring Ca 2+ transport through a confluent layer of intestinal cells*. RSC Advances, 2014. **4**(95): p. 52887-52891.
144. Anderson, J.M., et al., *ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells*. The Journal of cell biology, 1989. **109**(3): p. 1047-1056.
145. Nguyen, T.V., et al., *Establishment of a Hepatocyte-Kupffer Cell Coculture Model for Assessment of Proinflammatory Cytokine Effects on Metabolizing Enzymes and Drug Transporters*. Drug Metabolism and Disposition, 2015. **43**(5): p. 774-785.
146. Kostadinova, R., et al., *A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013. **268**(1): p. 1-16.
147. Gebhardt, R. and D. Mecke, *Perifused monolayer cultures of rat hepatocytes as an improved in vitro system for studies on ureogenesis*. Experimental cell research, 1979. **124**(2): p. 349-359.
148. Dich, J. and N. Grunnet, *A perfusion system for cultured hepatocytes*. Analytical Biochemistry, 1992. **206**(1): p. 68-72.
149. De Bartolo, L. and A. Bader, *Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver*. Annals of transplantation, 2001. **6**(3): p. 40-47.
150. Takeshita, K., W.C. Bowen, and G.K. Michalopoulos, *Three-dimensional culture of hepatocytes in a continuously flowing medium*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 1998. **34**(6): p. 482-485.
151. GEBHARDT, R. and D. MECKE, *The role of growth hormone, dexamethasone and triiodothyronine in the regulation of glutamine synthetase in primary cultures of rat hepatocytes*. The FEBS Journal, 1979. **100**(2): p. 519-525.
152. Gebhardt, R. and S. Fischer, *Enhanced sensitivity of perifused primary rat hepatocytes to mitogens and growth modulation by carcinogens*. Toxicology in Vitro, 1995. **9**(4): p. 445-451.
153. Gebhardt, R., et al., *New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures*. Drug metabolism reviews, 2003. **35**(2-3): p. 145-213.
154. Martignoni, M., G.M.M. Groothuis, and R. de Kanter, *Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2006. **2**(6): p. 875-894.
155. Wrighton, S.A., et al., *In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development*. Drug metabolism reviews, 1993. **25**(4): p. 453-484.
156. Cali, J.J., et al., *Luminogenic cytochrome P450 assays*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2006. **2**(4): p. 629-645.

157. Cali, J.J., et al., *Luminescence-based methods and probes for measuring cytochrome P450 activity*. 2010, Google Patents.
158. Yueh, M.-F., M. Kawahara, and J. Raucy, *High volume bioassays to assess CYP3A4-mediated drug interactions: induction and inhibition in a single cell line*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2005. **33**(1): p. 38-48.
159. Youdim, K.A., et al., *Induction of cytochrome P450: assessment in an immortalized human hepatocyte cell line (Fa2N4) using a novel higher throughput cocktail assay*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007. **35**(2): p. 275-282.
160. Roymans, D., et al., *Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes*. *Biochemical pharmacology*, 2004. **67**(3): p. 427-437.
161. Lu, C. and A.P. Li, *Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague–Dawley rat, minipig, and beagle dog*. *Chemico-Biological Interactions*, 2001. **134**(3): p. 271-281.
162. Rost, K., et al., *Omeprazole weakly inhibits CYP1A2 activity in man*. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 1999. **37**(11): p. 567-574.
163. ITO, Y., et al., *Dietary Steatotic Liver Attenuates Acetaminophen Hepatotoxicity in Mice*. *Microcirculation*, 2006. **13**(1): p. 19-27.
164. Kim, S.N., et al., *Induction of Hepatic CYP2E1 by a Subtoxic Dose of Acetaminophen in Rats: Increase in Dichloromethane Metabolism and Carboxyhemoglobin Elevation*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007. **35**(10): p. 1754-1758.
165. Edington, C.D., et al., *Interconnected Microphysiological Systems for Quantitative Biology and Pharmacology Studies*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 4530.
166. Chao, P., et al., *Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primary human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human*. *Biochemical pharmacology*, 2009. **78**(6): p. 625-632.
167. Koebe, H.G., et al., *In vitro toxicology in hepatocyte bioreactors-extracellular acidification rate (EAR) in a target cell line indicates hepato-activated transformation of substrates*. *Toxicology*, 2000. **154**(1-3): p. 31-44.
168. Chang, S.-Y., et al., *Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity*. *JCI insight*, 2017. **2**(22).
169. Loskill, P., et al., *μOrgano: A Lego®-like plug & play system for modular multi-organ-chips*. *PLoS ONE*, 2015. **10**(10): p. e0139587.
170. Naylor, L.H., *Reporter gene technology: the future looks bright*. *Biochemical pharmacology*, 1999. **58**(5): p. 749-757.
171. Wang, T.J., et al., *Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study*. *The Lancet*, 2010. **376**(9736): p. 180-188.
172. Ahn, J., et al., *Genome-wide association study of circulating vitamin D levels*. *Human Molecular Genetics*, 2010. **19**(13): p. 2739-2745.
173. Weber, E.J., et al., *Development of a microphysiological model of human kidney proximal tubule function*. *Kidney international*, 2016. **90**(3): p. 627-637.
174. Peter, H., et al., *Lab-on-a-Chip Device for Rapid Measurement of Vitamin D Levels*, in *Investigations of Early Nutrition Effects on Long-Term Health*. 2018, Springer. p. 477-486.
175. Chi, M., et al., *A microfluidic cell culture device (μFCCD) to culture epithelial cells with physiological and morphological properties that mimic those of the human intestine*. *Biomedical Microdevices*, 2015. **17**(3): p. 58.
176. Imura, Y., K. Sato, and E. Yoshimura, *Micro Total Bioassay System for Ingested Substances: Assessment of Intestinal Absorption, Hepatic Metabolism, and Bioactivity*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(24): p. 9983-9988.
177. Maschmeyer, I., et al., *A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents*. *Lab on a Chip*, 2015.

178. Ho, C.-T., et al., *Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue*. Lab on a Chip, 2013. **13**(18): p. 3578-3587.
179. Barnikol, W.K. and H. Pötzschke, *A novel, non-invasive diagnostic clinical procedure for the determination of an oxygenation status of chronic lower leg ulcers using peri-ulceral transcutaneous oxygen partial pressure measurements: results of its application in chronic venous insufficiency (CVI)*. GMS German Medical Science, 2012. **10**.
180. Ivanovic, Z., *Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm*. Journal of cellular physiology, 2009. **219**(2): p. 271-275.
181. D'Ippolito, G., et al., *Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells*. Bone, 2006. **39**(3): p. 513-522.
182. Toepke, M.W. and D.J. Beebe, *PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications*. Lab on a Chip, 2006. **6**(12): p. 1484-1486.
183. Tong, J.Z., O. Bernard, and F. Alvarez, *Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media*. Experimental cell research, 1990. **189**(1): p. 87-92.
184. Mark Adams, R., et al., *Effective cryopreservation and long-term storage of primary human hepatocytes with recovery of viability, differentiation, and replicative potential*. Cell Transplantation, 1995. **4**(6): p. 579-586.
185. Goral, V.N., et al., *Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants*. Lab on a Chip, 2010. **10**(24): p. 3380-3386.
186. Choi, J.M., et al., *HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics*. Archives of pharmacal research, 2015. **38**(5): p. 691-704.
187. Anthérieu, S., et al., *Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells*. Drug Metabolism and Disposition, 2010. **38**(3): p. 516-525.
188. Gerets, H., et al., *Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins*. Cell Biology and Toxicology, 2012. **28**(2): p. 69-87.
189. Baudoin, R., et al., *Behavior of HepG2/C3A cell cultures in a microfluidic bioreactor*. Biochemical Engineering Journal, 2011. **53**(2): p. 172-181.
190. Matsuzawa, A., M. Matsusaki, and M. Akashi, *Construction of three-dimensional liver tissue models by cell accumulation technique and maintaining their metabolic functions for long-term culture without medium change*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015. **103**(4): p. 1554-1564.
191. Qi, X., et al., *Ochratoxin A transport by the human breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance protein 2 (MRP2), and organic anion-transporting polypeptides 1A2, 1B1 and 2B1*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2017. **329**: p. 18-25.
192. Hao, Y., et al., *Differential protein expression in metallothionein protection from depleted uranium-induced nephrotoxicity*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 38942.
193. Scholpa, N.E., et al., *Nephrotoxicity of epigenetic inhibitors used for the treatment of cancer*. Chemico-Biological Interactions, 2016. **258**: p. 21-29.
194. Williamson, A., et al., *The future of the patient-specific Body-on-a-chip*. Lab on a Chip, 2013. **13**(18): p. 3471-3480.
195. Esch, M.B., T.L. King, and M.L. Shuler, *The Role of Body-on-a-Chip Devices in Drug and Toxicity Studies*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2011. **13**(1): p. 55-72.
196. Bilic, J. and J.C.I. Belmonte, *Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart?* STEM CELLS, 2012. **30**(1): p. 33-41.
197. Brock, A., et al., *Cellular Reprogramming: A New Technology Frontier in Pharmaceutical Research*. Pharmaceutical Research, 2012. **29**(1): p. 35-52.

Eidesstattliche Erklärung

Jannick Theobald

23.04.1990

Taipei, Taiwan

Hiermit versichere ich an Eides statt, - dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst, andere als die in ihr angegebene Literatur nicht benutzt und dass ich alle ganz oder annähernd übernommenen Textstellen sowie verwendete Grafiken, Tabellen und Auswertungsprogramme kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, dass die vorgelegte elektronische mit der schriftlichen Version der Dissertation übereinstimmt und die Abhandlung in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.