

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie Universitätsklinikum
Hamburg – Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Björn Nashan FACS, FRCSC, FEBS

Etablierung und Optimierung der statischen in vitro Hepatozytenkultur auf biodegradierbaren 3D PLLA Polymeren im 96–Well Format für Toxikologiestudien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Steffen Deichmann

aus Aachen

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. J. – M. Pollok

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. M. Koch

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. M. Dandri – Petersen

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Abkürzungsverzeichnis.....	4
2.	Arbeitshypothese.....	6
3.	Einleitung	7
3.1.	Die Leber	7
3.2.	First-Pass Effekt	7
3.3.	Geschichte der Hepatozytenkultur	8
3.4.	Toxikologiestudien an in vitro Hepatozytenkulturen.....	9
3.5.	Die 3D in vitro Hepatozytenkultur.....	10
3.6.	Biodegradierbare 3D Poly-L-Lactatsäure Matrix.....	11
4.	Material und Methoden	13
4.1.	Versuchstiere	13
4.2.	Biodgradierbare Poly-L-Lactatsäure Matrix.....	13
4.3.	Hydrophilierung der Poly-L-Lactat Matrizen.....	14
4.4.	Kollagenbeschichtung der 2D Zellkulturplatten	14
4.5.	Zellkulturmedium	15
4.6.	Stamm- und Perfusionslösung.....	15
4.7.	Hepatozytenisolation.....	18
4.7.1.	Die in situ Leberperfusion	18
4.7.2.	Zellisolation und Zellzahlbestimmung.....	19
4.8.	Besiedlung der Matrices.....	20
4.9.	3D Zellkultur	21
4.10.	2D Zellkultur	22
4.11.	Färbungen	23
4.11.1.	Hämtoxylin-Eosin Färbung (HE)	24
4.11.2.	Periodic-Acid-Schiff Färbung (PAS).....	24
4.12.	Immunfluoreszenz.....	25
4.13.	Überstandsmessungen.....	26
4.13.1.	Lactat Dehydrogenase (LDH)	26
4.13.2.	Rat Albumin Elisa	26
4.13.3.	WST-1 Umsatztest	27
4.14.	DNA Isolation.....	28
4.14.1.	DNA Eichkurve	29
4.15.	RNA Isolation.....	29
4.16.	Reverse Transkription in cDNA	30
4.17.	Real-Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR).....	32

5.	Ergebnis.....	34
5.1.	DNA Eichkurve	34
5.2.	<u>Teil A:</u> Charakterisierung der statischen 3D Kultur im 24-Well Format	
5.2.1	Versuch AI.....	35
5.2.1.1	Überstandsmessung.....	36
5.2.1.2.	Histologie	38
5.2.2.	Versuch AII.....	39
5.2.2.1.	Histologie	39
5.2.3.	Versuch AIII.....	40
5.2.3.1.	Überstandsmessung.....	41
5.2.3.2.	DNA	43
5.2.3.3.	Histologie	44
5.2.4.	Versuch AIV.....	45
5.2.4.1.	Überstandsmessung.....	45
5.2.4.2.	DNA	48
5.2.4.3.	RNA	49
5.2.4.4.	Histologie	50
5.3.	<u>Teil B:</u> Durchführung der statischen Hepatozytenkultur im 96-Well Format	
5.3.1.	Versuch BI/II.....	51
5.3.1.1.	Überstandsmessung.....	52
5.3.1.2.	DNA	55
5.3.1.3.	Histologie	56
5.3.1.4.	Immunfluoreszenz.....	58
5.3.1.5.	RNA	59
5.3.1.6.	Real-Time PCR.....	61
5.3.2.	Vergleich der 24- und 96-Wellkultur	62
5.3.2.1.	Albumin	62
5.3.2.2.	DNA	64
6.	Dissskussion.....	65
6.1.	3D Poly-L-Lactat Matrix	66
6.2.	Zell-Matrix Interaktion	67
6.3.	Besiedlungseffizienz	68
6.4.	96-Well Kultur.....	69
6.5.	Überstandsmessungen.....	70

6.6.	Histologie	74
6.7.	Immunfluoreszenz	75
6.8.	DNA	76
6.9.	RNA und Real-Time PCR	77
7.	Zusammenfassung	80
8.	Literaturverzeichnis	82
9.	Danksagung	90
10.	Lebenslauf	91
11.	Eidesstattliche Erklärung	93

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	-	Grad Celsius
µg	-	Mikrogramm
µl	-	Mikroliter
µm	-	Mikrometer
2D	-	Zweidimensional
3D	-	Dreidimensional
∞	-	unendlich
Abs	-	Absorption
ADMET	-	absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicology
Aqua dest	-	Aqua destillata
CaCl ₂	-	Calciumchlorid
cDNA	-	complementary Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	-	Kohlendioxid
Cyp	-	Cytochrome P450
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	-	Ethylene diamine Tetraacetic acid
EGF	-	Epidermal Growth Factor
EGTA	-	Ethylene Glycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraacetic acid
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	-	et alii
EZM	-	Extrazelluläre Matrix
FCS	-	fetal calf serum
FDA	-	U.S. Food and Drug Administration
g	-	Gramm
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	-	Stunde
HCl	-	Salzsäure
HEPES	-	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
Kat.	-	Kataloge Nummer
KCl	-	Kaliumchlorid
l	-	Liter
LDH	-	Lactat Dehydrogenase

MgCl ₂	-	Magnesiumchlorid
min	-	Minute
ml	-	Mililiter
mm	-	Milimeter
mM	-	Millimolar
mRNA	-	messenger RNA
NaCl	-	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ -	-	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
ng	-	Nanogramm
nm	-	Nanometer
NPZ	-	nichtparenchymatösen Zellen
PBS	-	phosphate buffered saline, pH 7,4
PLLA	-	Poly-L-Lactat Acid
rHGF	-	rec Hepatocyte Growth Factor
RNA	-	Ribonukleinsäure
rpm	-	rounds per minute
rtPCR	-	Real-Time Polymerase Chain Reaction
sec	-	Sekunde
TMB	-	Tetramethylbenzidine
TPO	-	Thrombopoietin
U	-	Units

2. Arbeitshypothese

Tissue Engineering zum Zwecke der in vitro Hepatozytenkultur ist weit verbreitet. Dabei werden Hepatozyten auf speziell hergestellten 3D Gerüsten (Polymere) kultiviert. Häufig werden zwei Ursprungsansätze als Ziele genannt. Ein Schwerpunkt beruht auf dem Gebiet der Zelltransplantation, ein anderer auf dem Gebiet der pharmazeutischen Forschung, welcher Gegenstand dieser Arbeit ist. Der Ansatz der Zelltransplantation verfolgt das Ziel, 3D Polymere als Träger für Hepatozyten zur in vivo Implantation im Rahmen eines Leberversagens nutzen zu können. In der pharmazeutischen Forschung sollen in vitro Hepatozytenkulturen als Tool für die Entwicklung neuer Medikamente verwendet werden können. Ziel ist es, dass neue Pharmazeutika direkt an primären Hepatozyten getestet werden können, wodurch es zur Einsparung von Tiermodellversuchen sowie klinischen Studien an humanen Probanden kommen kann. Aufgrund der dreidimensionalen Polymerstruktur sollen Hepatozyten verbesserte Zell-Zell und Zell-Matrixkontakte ausbauen, was eine verbesserte in vitro/in vivo Vergleichbarkeit gewährleisten kann. In verschiedenen Studien, auch unserer Arbeitsgruppe, konnte der Vorteil von 3D im Vergleich zu 2D kultivierten Hepatozytenkulturen gezeigt werden (Bierwolf J u. a. 2011; Guillouzo A & Guguen-Guillouzo C 2008; Justice BA u. a. 2009; Elliot NT & Yuan F 2011; Schutte M u. a. 2011). Die pharmazeutische Industrie unterliegt einem hohen wirtschaftlichen Druck, so dass im Rahmen der Entwicklung neuer Medikamente Hochdurchsatzassays von besonderem Interesse sind (Gebhardt R u. a. 2003; Hertzberg RP & Pope AJ 2000; Hewitt NJ u. a. 2007). Aus diesem Grund sehen wir einen Vorteil in der Verwendung der statischen Hepatozyten Kultur auf 3D Gerüsten im 96-Well Format in der pharmazeutischen Forschung. Um hierfür ein nutzbares Tool zu ermöglichen, formulierten wir folgende Arbeitshypothesen:

1. Charakterisierung und Modifizierung der statischen in vitro Hepatozytenkultur auf 3D PLLA Polymeren für die in vitro Hepatozytenkultur im 24-Well Format. Ziel der Charakterisierung ist es, einen Versuchsaufbau zu etablieren, der für Toxikologiestudien geeignet ist. Falls nötig, sind Polymer- und/oder Kulturoptimierungen vorzunehmen.
2. Der Versuchsaufbau ist im 96-Well Format anwendbar. Überstandsmessungen, DNA und Genanalysen sowie Histologie und Immunfluoreszenz sind durchführbar.

3. Einleitung

3.1. Die Leber

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels und die größte Drüse des Körpers bei Wirbeltieren. Ihre Aufgaben sind vielfältig und lebenswichtig. Ohne suffiziente Leberfunktion ist ein Überleben nicht möglich. Zu ihren Hauptaufgaben zählt die Produktion wichtiger Proteine wie Albumin und Gerinnungsfaktoren sowie die Verwertung und Speicherung wichtiger Nahrungsbestandteile wie Glykogen und Fett. Zudem ist sie für den Stoffwechsel unerlässlich. Die Galleproduktion und der damit einhergehende Abbau von Stoffwechselprodukten wie Blutbestandteile, Giftstoffe, Medikamente und Ammoniak sind nur ein Teil der komplexen Stoffwechselleistung der Leber. Die Vielfältigkeit der Leberfunktion macht deutlich, dass es bei Leberversagen aktuell keinen adäquaten Leberersatz gibt. Daher ist die orthotope Transplantation von Voll- oder Splitorganen postmortaler Spender das Mittel der Wahl zur kurativen Behandlung terminal chronischer Lebererkrankungen oder fulminanten Leberversagens (Vacantie JP 1988). Zusätzlich gibt es die Möglichkeit der Leberlebendspende von einem Angehörigen oder Nahestehenden, wobei jedoch die besseren Ergebnisse wie bei der Nierenlebendspende im Gegensatz zur postmortalen Organspende (Mehrabi A u. a. 2010) bei der Leber nicht erreicht werden konnten. Auch für die forschende Pharmaindustrie ist die Leber von herausragender Bedeutung. Aufgrund der komplexen Stoffwechselleistung sowie als Hauptverstoffwechselungsorgan für Medikamente ist die Leber im besonderen Fokus bei der Entwicklung neuer Medikamente.

3.2. First-Pass Effekt

Der First-Pass-Effekt oder der Effekt der ersten Passage beschreibt die Umwandlung eines Arzneistoffes während deren erster Passage durch die Leber oder den Darm. Vor allem bei oraler Medikation spielt der First-Pass Effekt eine wichtige Rolle. Es werden der intestinale von dem hepatischen First-Pass Effekt unterschieden. Der intestinale Effekt tritt vor allem beim Durchtritt der Substanz durch die Mucosa des Magens und Duodenums auf und spielt eine eher untergeordnete Rolle. Den Hauptanteil des First-Pass Effekts übernimmt die Leber, in die das Pharmakon nach intestinaler Resorption via Vena Porta gelangt. Dort unterliegt es nach Aufnahme in der Leber der ersten Metabolisierung (hepatischer First-Pass Effekt). Manche Pharmaka werden bereits bei der ersten Passage durch die Leber weitgehend aus dem

Blut entfernt, so dass nur noch eine geringe Bioverfügbarkeit vorhanden ist. Bei anderen Pharmaka wird gerade dieser Effekt genutzt, indem zunächst inaktive Substanzen durch den First-Pass Effekt zu aktiven Metaboliten umgewandelt werden.

Generell ist zu sagen, dass viele Arzneistoffe und deren Bioverfügbarkeit von der Leberfunktion abhängen. Das macht deutlich, dass bei der Entwicklung von Medikamenten gerade die Lebermetabolisierung eine zentrale Rolle spielt.

3.3. Geschichte der Hepatozytenkultur

Die Technik der High-Yield-Preparation von isolierten Hepatozyten durch Kollagenase Perfusion wurde erstmals 1969 von Berry and Friend (Berry MN & Friend DS 1969) publiziert. Die bis heute gültige zwei-Schritt-Verdautechnik wurde 1972 durch Seglen veröffentlicht (Seglen PO. 1972). Ein Jahr später beschrieb Bissell (Bissell DM u. a. 1973) die erste Monolayer Rattenhepatozytenkultur und 1982 wurde dann durch Guguen-Guillouzo et al (Guguen-Guillouzo C u. a. 1982) die erste High-Yield Preparation mit primärer Zellkultur von humanen Hepatozyten beschrieben. Während der letzten 40 Jahre wurde eine außergewöhnliche Zahl und Vielfalt an Studien mit isolierten Hepatozyten aus humanen und tierischen Lebern verschiedenster Spezies durchgeführt. Bei dem Versuch, Leberphänotyp und -funktion zu erhalten, wurden verschiedene Ansätze mit dem gemeinsamen Ziel der Erhaltung oder Schaffung einer in vivo ähnlichen Umgebung verwendet. Zu diesen Themengebieten sind eine Vielzahl von Publikationen veröffentlicht worden, wie z.B. von (Guillouzo A & Guguen-Guillouzo C 1986; Berry MN & Edwards AM 2000; Dash A u. a. 2009). In der Vergangenheit wurden vor allem 2D Monolayer Hepatozytenkulturen eingesetzt. Bei dieser Art der Zellkultur war nicht nur ein rascher Verlust leberzellspezifischer Funktionen zu beobachten (LeClusye EL u. a. 2005), auch die geringe Besiedlungseffizienz in den 2D Systemen und die innerhalb kürzester Zeit auftretenden morphologischen Veränderungen der Leberzellen verringerten die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die physiologische in vivo Situation (Hamilton GA u. a. 2001; Hewitt NJ u. a. 2007; Guguen-Guillouzo C & Guillouzo A 2010). Es wurde eine Vielzahl an Zellkultursystemen erprobt. In einer aktuellen Übersichtsarbeit von Dash et al (Dash A u. a. 2009) wurden heterotope Co-Kulturen mit NPZ, Kupfer- und Endothelzellen, 3D Zellkulturen sowie Flusskulturen in Bioreaktoren als die zur Zeit erfolgsversprechensten Zellkultursysteme genannt.

3.4. Toxikologiestudien an in vitro Hepatozytenkulturen

Zwei Hauptziele werden bei der in vitro Hepatozytenkultur regelmäßig formuliert. So stehen vor allem die Leberersatztherapie mittels Zelltransplantation sowie im Rahmen pharmazeutischer Entwicklung ADMET-Studien (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicology) im aktuellen Fokus der Forschung (Dash A u. a. 2009; Griffith LG & Swartz MA 2006). In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe haben wir uns intensiv mit dem Thema der Hepatozytenkultur im Rahmen der Leberersatztherapie beschäftigt (Lütgehetmann M 2005). In verschiedenen Arbeiten wurden die Vorteile einer dynamischen in vitro Hepatozytenkultur mittels Flussbioreaktor belegt. (Pollok JM u. a. 1998; Pollok JM 2003; Török E u. a. 2001; Török E u. a. 2002; Török E u. a. 2006). In dieser Arbeit haben wir unser Augenmerk auf die in vitro Hepatozytenkultur zum Zwecke der pharmazeutischen Entwicklung gerichtet, denn das Verständnis des Stoffwechsels und Transports von Arzneistoffen in der Leber ist von herausragender Wichtigkeit zur Beurteilung der Sicherheit und Bioverfügbarkeit in der Entwicklung neuer Pharmazeutika. Tierexperimentelle Forschung und klinische Studien an humanen Probanden sind notwendig, gelten jedoch als teuer und ethisch umstritten. Im Gegensatz zu Tierversuchen und klinischen Studien sind in vitro Zellkultursysteme für ADMET Studien als wichtige Alternative zu nennen. Sie zeichnen sich durch Kosteneffizienz, weniger Kontroversität und leichter Durchführbarkeit sowie besserer Reproduktion aus. Die zu testende Substanz kann über das Kulturmedium appliziert und der Effekt auf die Leberzellen mit histologischen und immunhistologischen Methoden untersucht werden. Weiterhin können quantitative Bestimmungen der Metabolite im Medium Aufschluss über die Abbaubarkeit von toxischen Substanzen und möglicherweise vorhandene arzneistoffinduzierte Hepatotoxizität geben. Inzwischen sind Experimente an in vitro Hepatozytenkulturen zur Standardmethode der Evaluierung von Metabolismus, Cytochrome P450 Induktionen und Stoffwechselinteraktionen geworden (Sahi J u. a. 2010; Hewitt NJ u. a. 2007). Die Verwendung primärer humaner Hepatozytenkulturen ist dabei zum Goldstandard geworden (LeClusye EL u. a. 2005). Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten und deren genetische Vielfaltigkeit haben sich jedoch frisch isolierte primäre Rattenhepatozyten zur in vitro Zellkultur durchgesetzt (Bierwolf J u. a. 2011; Aly HA & Domenech O 2009; Ellis JK u. a. 2010; Li Y u. a. 2009; Santos DM u. a. 2009; Shitara Y u. a. 2009). Der Vorteil der primären Rattenhepatozytenkultur liegt in der besseren Vergleichbarkeit, da hier genetisch identische Zelllinien beliebig häufig für verschiedene Experimente verwendet werden können. Aufgrund der hohen Ausbeute nach Zellisolation

können selbst mit einem Spendertier gleich mehrere Fragestellungen gleichzeitig untersucht werden. Dies spart neben Versuchstieren auch Kosten.

3.5. Die 3D in vitro Hepatozytenkultur

In vitro Hepatozytenkulturen in Suspensionen und als klassische 2D Monoschichten sind im Rahmen von Toxizitätsstudien weit verbreitet, denn Grenzen und Vorteile sind gut identifiziert (Guillouzo A 1998; Chesne C u. a. 1998; Allen JW u. a. 2001). Nachteilig sind geringe Besiedlungseffizienz und die innerhalb kürzester Zeit auftretenden morphologischen Veränderungen der Leberzellen. Das verringert die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die physiologische in vivo Situation (Hamilton GA u. a. 2001; Hewitt NJ u. a. 2007; Guguen-Guillouzo C & Guillouzo A 2010). Einer der ersten Optimierungsversuche waren die Sandwichkulturmodelle, bei denen Monolayer Hepatozytenschichten zwischen zwei Schichten einer Extrazellulärmatrix kultiviert wurden, die zumeist aus Kollagen, Laminin oder Fibronektin bestanden (Castell and Gomez-Lechon, 2009). Die Idee war, dass durch direkte Zell-Zell und Zell-Matrix-Wechselwirkungen die natürliche und chemische Umgebung der Zellen besser imitiert ist, so dass eine Förderung der Vitalität und Langzeitdifferenzierung des Phänotyps der Hepatozyten möglich ist. Dieses wurde durch verschiedene Publikationen belegt (Gross-Steinmeyer K u. a. 2005; Page JL u. a. 2007; Farkas D u. a. 2005; Liu X u. a. 1999; Dunn JC u. a. 1991; LeClusye EL u. a. 1994). Da Biotransformation von Arzneimitteln zu ausscheidungsfähigen Substanzen in der Leber aber nur in hochdifferenzierten Hepatozyten stattfindet und mit der Anwendung einer Matrix die langfristige hepatozelluläre Funktion unterstützt wird, könnten auch in diesem Bereich weiterentwickelte 3D Kulturmodelle erfolgreich zum Einsatz kommen. Die in den vergangenen Jahren in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimente mit 3D kultivierten Rattenhepatozyten weisen darauf hin, dass bei der Kultur auf biologisch abbaubaren Matrizen (Polymere) die morphologische und funktionelle Stabilität der Zellen besser gewährleistet ist (Pollok JM 2003; Pollok JM u. a. 1998; Török E u. a. 2001; Török E u. a. 2002; Török E u. a. 2006). Hepatozytenkulturen auf mittels Tissue Engineering erzeugten Polymerstrukturen sind daher neben ihrer Verwendung in der Transplantationsmedizin auch als in vitro Testsysteme für Arzneimittel und toxische Substanzen interessant. Aufgrund ökonomischen Drucks ist die Industrie auf robuste und effektive Testsysteme mit der Möglichkeit eines hohen Durchsatzes angewiesen. Hier sind vor allem 96-Well Systeme als zukunftssträchtig zu nennen (Gebhardt R u. a. 2003; Hertzberg RP & Pope AJ 2000; Hewitt NJ u. a. 2007). Die Anwendung dieser Kulturen ist in der pharmazeutischen Forschung momentan allerdings noch nicht ausreichend

etabliert. Ein Grund dafür könnte das Fehlen von zuverlässigen und aussagekräftigen Testsystemen sein. Zwar gibt es bisher eine große Anzahl an etablierten Testsystemen für 2D Kulturen, diese sind jedoch nicht direkt auf die neuen Herausforderungen der 3D Zellkultur im 96-Well Format anwendbar.

3.6. Biodegradierbare 3D Poly-L-Lactatsäure Matrix

Gewebe und Organsysteme sind in physiologischer Umgebung dreidimensional organisiert. Um funktionierendes und differenziertes Gewebe mittels Tissue Engineering zu erzeugen, muss also die physiologische in vivo Situation bestmöglich imitiert werden (Zhang R & Ma PX 2000). Die Verwendung von Matrizen spielt hier eine entscheidende Rolle, denn sie unterstützt Zellen beim Aussähen und Proliferieren des Gewebes in drei Dimensionen (Hubbell JA 1995; Thomson RC u. a. 1995; Ma PX & Zhang R 1999).

Es gibt ein paar grundlegende Anforderungen, die weit verbreitet und für die Gestaltung von Matrizen akzeptiert sind. Hohe Porosität und geeignete Porengröße sowie eine große Oberfläche sind essentiell (Ma PX & Zhang R 1999; Ma PX & Langer R 1999; Ishaug-Riley SL u. a. 1998). Daneben sind architektonische Merkmale wie Porenform, Porenwand Morphologie und Vernetzung zwischen den Poren wichtig, um eine verbesserte Zell-Adhäsion, Migration, Genexpression, Nährstofftransport und Differenzierung zu ermöglichen (Ma PX & Zhang R 1999; Ma PX u. a. 2001; Ishaug-Riley SL u. a. 1998). Daneben sollten Matrizen biokompatibel und gegebenenfalls biologisch abbaubar sein sowie keinerlei Zelltoxizität aufweisen. Bei dieser Vielzahl an Ansprüchen, die an Matrizen gestellt werden, ist es nicht verwunderlich, dass auch verschiedenste Arten der Materialien zur Herstellung verwendet werden. Generell können Matrizen in biologische und synthetische Trägermaterialien sowie in biodegradierbare und nichtbiodegradierbare Trägermaterialien eingeteilt werden (Reichmann E u. a. 2005; Ma PX & Langer R 1999). Eine Übersicht über die aktuell verwendeten Materialien gibt Tabelle 1. Aufgrund der positiven Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe mit biologisch abbaubaren PLLA Matrizen (Polymere) in der in vitro Hepatozytenkultur verwendeten wir erneut Polymere synthetischer Herkunft. Der Vorteil dieser Matrizen ist deren konstante Eigenschaft, die während des Herstellungsprozesses sehr präzise reguliert werden kann. Desweiteren ist PLLA aufgrund guter Biokompatibilität einer der weitverbreitetsten Materialien im Tissue Engineering. Zudem gehört diese Art der Polymere zu den wenig synthetischen Polymeren, die eine Zulassung der FDA (US Food and Drug Administration) für bestimmte menschlich klinische Anwendungen haben (Ma PX 2004). Als nachteilig sind allerdings die mögliche Freisetzung toxischer Stoffe beim

biologischen Abbau der synthetischen Bestandteile und der entstehende saure pH-Wert zu nennen. Zudem weisen synthetische Biomaterialien teilweise hydrophobe Charakteristika auf, die die Anhaftung der Zellen an die Matrixoberfläche stark beeinträchtigen können (Ma PX 2004).

Tabelle 1: Aktuell verwendete Materialien im Tissue Engineering. (entnommen aus (Bierwolf J 2011), modifiziert nach (Reichmann E u. a. 2005))

Biodegradierbar, biologisch	Biodegradierbar, synthetisch	Nicht biodegradierbar, biologisch	Nicht biodegradierbar, synthetisch
Kollagen I, IV	Poly-Milchsäure	Alginat	Silikon
Small intestinal submucosa	Poly-L-Milchsäure	Chitin	Teflon
Fibrin	Poly-D,L-Milchsäure	Chitosan	Latex
Albumin	Poly-Glycolsäure	Hydroxyapatit	Polyethylen
Fibronectin	Poly-Caprolacton		Dracon
Laminin	Poly-Dioxanon		
Matrigel	Tri-Methylencarbonat		
Amniotische Membranen	Poly-Orthoester		
	Poly-Aminosäuren		
	Poly-Maleinsäure		

4. Material und Methoden:

4.1. Versuchstiere:

Tierversuchsgenehmigung vom 25.07.2007 (Projektnummer: A6/384) ausgestellt durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg. Für alle Versuche verwendeten wir erwachsene, männliche Lewisratten mit einem Gewicht von ca. 250-400g. Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, nach deutschen Richtlinien der Tierhaltung, mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und einem 12 Stunden Tag/Nacht-Intervall gehalten. Die chirurgischen Eingriffe wurden in Isoflurannarkose durchgeführt. Die Tiere wurden intraoperativ mittels Durchtrennung der V. cave inferior getötet.

4.2. Biodegradierbare Poly-L-Lactatsäure Matrix

Unsere Matrizen wurden von Prof. Dr. Ma, Peter Department of Biomedical Engineering, University of Michigan, Ann Arbor, USA hergestellt (Ma PX & Choi JW 2001). Dazu wurde eine neuartige Technik verwendet, welche dreidimensionale well-controlled interconnected spherical macropores in biodegradierbaren Polymer Matrizen erzeugte (siehe Abbildung 1). Zur Etablierung und Optimierung von Kulturbedingungen und Testsystemen im 96 – Well Format wurden zunächst Versuche im 24–Well Format nötig. So waren die Polymergrößen variabel, da im Verlauf des Projektes unterschiedliche Versuchsaufbauten nötig waren. Die Polymeroberfläche wurde mit Gelatin durch die layer by layer self assembly Technik nach Liu X u. a. 2005 modifiziert. Die Porösität betrug $95 \pm 2\%$. Vereinfacht wurde das Polymer in unserer Studie **Solid Sugar** genannt.

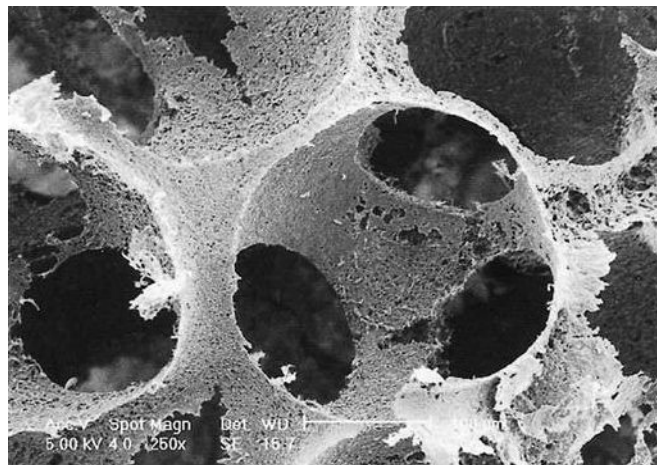


Abbildung 1: entnommen aus Ma PX & Choi JW 2001. Elektronenmikroskopische Aufnahme von PLLA Matrix. Aus Parffinkugeln hergestellte Poren und Porenverbindungen mit Porenmaß von ca. 250-350µm

4.2. Hydrophilierung der Poly-L-Lactat Matrizen

Um gute Zellkulturbedingungen für eine 3D Zellkultur mit unseren Matrizen zu schaffen, ist es nötig, dass die Polymere hydrophil sind. Hydrophile Polymere sinken im Zellkulturmedium zu Boden, so dass die Zellen im Polymer gleichmäßig von allen Seiten mit Medium versorgt werden können. Trotz Beschichtung kann es produktionsbedingt zu Lufteinschlüssen im Polymer kommen, welche eine ausreichende Hydrophilie verhindern. Um diese Lufteinschlüsse zu beheben, bedienen wir uns einer absteigenden Ethanolreihe im Vakuum. Es wird unter sterilen Bedingungen mit einer Sterilbench (Reine Werkbank, Haraeus Typ HS 12/2 1996, Ser.No. 96104144) gearbeitet. Es werden drei sterile Gefäße mit 100% Ethanol, 50% Ethanol und eins mit reinem Aqua dest. gefüllt. Die benötigte Anzahl an Polymeren wird nun in das 1. Gefäß (100% Ethanol) gelegt und dieses mit Alufolie verschlossen. In die Alufolie werden mehrere kanülengroße Löcher gestanzt. Anschließend wird das Gefäß unter einer Vakuumblocke platziert und der Sog auf 80-100 mbar gestellt. Die Polymere sollten so kurz wie möglich dem Vakuum ausgesetzt sein, damit es durch den Unterdruck nicht zu Strukturveränderungen innerhalb der Matrix kommt. Die Zeit der Vakuumbehandlung ist von Charge zu Charge unterschiedlich. Sobald sich am Polymer Luftblasen formen, sollte die Vakuumbehandlung gestoppt werden. Bei Erreichen des atmosphärischen Drucks sinken die Polymere in der Lösung zu Boden. Zum Auswaschen des Ethanols wird die obige Prozedur erst in 50% Ethanol, anschließend in Aqua dest. wiederholt.

4.4. Kollagenbeschichtung der 2D Zellkulturplatten

Um eine bessere Adhäsion der Hepatozyten am Boden der 24-Well Zellkulturplatten von Nunc (NuncloTM Surface, Roskilde/DK, Kat.: 142475) zu gewährleisten, werden diese vorher mit Kollagen (Collagen R, Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg/D Kat: 47256) beschichtet. Kollagen wird im Verhältnis 1:10 mit PBS (DPBS 1x, Gibco, invitrogen REF: 14190-094) verdünnt. Unter sterilen Bedingungen wird die Kollagenlösung in die Wells pipettiert, gerade soviel, dass der Boden der Wells komplett bedeckt ist. Nach 10min Inkubationszeit wird die Kollagenlösung aus den Wells aspiriert und die Platten steril verschlossen. Nun können die Platten falls nötig im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

4.5. Zellkulturmedium

Die Hepatozyten werden in einem hormonstimulierendem Medium (HMS) kultiviert.

450ml	Williams' Medium E (Gibco, Scotland/ UK, Kat.:22551-022)
50ml	Foetal Bovine Serum (Gibco, South America, invitrogen, Kat.: 10500-064)
5,5ml	N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin (Biochrom K6, Berlin/D Kat.: K0202)
11ml	HEPES-Puffer (Biochrom K6, Berlin/D, Kat.: L1613)
5,5ml	Natriumpyruvat (1 mM, Gibco, Scotland/UK, Kat.: 11360-039)
100µl	Insulin (4µg/ml, aus Rinderpankreas, Sigma, Steinheim/D, Kat.: I-5500)
50µl	Dexamethason (5nM, Seva, Heidelberg/D, Kat.: 18660)
100µl	EGF (10ng/ml, human, Invitrogen, Paisley/GB, Kat.: 1127679)
5,5ml	Pen Strep (Penicillin + Streptomycin, Biochrom, Berlin/D, Kat.: A2213)

Modifikation ab Versuch B I/II.1 und 2

10µg	TPO (Cells Systems; Kat.: CS-C 1134B)
10µg	rec Hepatocyte Growth Factor (human) (Bachem Bioscience Inc. Kat.: H-5596.00.10)

TPO und rHGF werden vorher jeweils in 1ml Aqua-dest aufgelöst und anschließend zum Medium hinzugegeben.

4.6. Stamm- und Perfusionslösungen

Die Hepatozyten werden mittels zwei-Schritt-Verdautechnik nach der durch Aiken et al. modifizierten Methode von Seglen PO isoliert (Aiken J u. a. 1990; Seglen PO 1976).

Erstellen der Stammlösung:

10x Leffert's Stammpuffer:

23,83g	Hepes (Sigma, Steinheim/D, Kat.:H-0891)
2,24g	KCl (Merck, Darmstadt/D, Kat.: 1.04936)
75,87g	NaCl (J.T. Backer, Denventer/ Holland, Kat.: 0278)
1,38g	NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (Merck, Darmstadt/D Kat.: 1.063646)
18,02g	alpha-D-Glucose (Sigma, Steinheim/D, Kat.: G – 7021)

Die Substanzen werden mit 1000ml Aqua dest. aufgefüllt, der pH wird mit 1N HCl (Merck, Darmstadt/D, Kat.: 1.09057.1000) auf 7,4 eingestellt und der Puffer steril filtriert (Bottle Top Filtersystem, 45mm neck size, 500ml, Corning, New York/ USA, Kat.: 430513).

EGTA Lösung:

Zu 100ml 10x Leffert's Stammpuffer werden 900ml Aqua dest. und 1,9g EGTA (Sigma, Steinheim/D, Kat.: E – 4378) gegeben. Die Lösung wird wiederum mit 1N HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt und steril (Bottle Top Filtersystem) filtriert.

CaCl₂ Lösung:

14g CaCl₂ (Merck, Darmstadt/D Kat.: 2386) werden in 500ml Aqua dest. gelöst und dann steril filtriert (Bottle Top Filtersystem).

Erstellen der Perfusionslösungen:

Lösung 1: Präperfusionslösung:

54ml 10x Leffert's Stammpuffer und 60ml 5mM EGTA werden mit Aqua dest. auf 600ml aufgefüllt. Der pH Wert wird im Anschluss mit 1N HCl auf 7,4 eingestellt.

Lösung 2: 1x Leffert's Puffer:

50ml 10x Leffert's Stammpuffer werden mit Aqua dest. auf 500ml verdünnt und der pH Wert wird anschließend mit 1N HCl auf 7,4 eingestellt.

Lösung 3: Kollagenase-Lösung:

50ml 10x Leffert's Stammpuffer und 5ml CaCl₂-Lösung werden mit Aqua dest. auf 500ml aufgefüllt, der pH-Wert mit 1N HCl auf 7,4 eingestellt. Im Anschluss werden 150mg Kollagenase (Collagenase from Clostridium histolyticum Typ 2, Sigma-Aldrich/D, Kat.: C6885-1G) kurz vor der Perfusion der Rattenleber hinzugefügt.

Die drei Lösungen werden durch ein Bottle-Top Filtersystem mit einer Porengröße von 0,2µm filtriert und dadurch sterilisiert.

Die Perfusionsapparatur besteht aus der Perfusionspumpe (Console Drive Masterflex® L/S, Cole-Parmer Chicago/USA Ser.No: 7518-10) einem herkömmlichen Heizaggregat mit Wasserbad, einem Ansaug- und Infusionsschlauch (Masterflex Cole-Parmer Instruments Co., Chicago/USA, Kat.-Nr.: 96400-16), einer Luftfalle und einer Venenverweilkanüle der Größe 17G (Vasofix® Safety, Braun Melsungen AG, Melsungen/D, REF: 4268156S) (siehe Abb.). Das Heizaggregat sorgt für eine Wassertemperatur von 37°C. Über den Ansaugschlauch werden die Perfusionslösungen in die Luftfalle gesogen. Diese sorgt für eine luftbläschenfreie Perfusion, damit es während der Zellisolation nicht zu Luftembolien kommt. Über die Perfusionspumpe wird ein konstanter Fluss von 25ml/min eingestellt. Über den Infusionsschlauch und die Venenverweilkanüle wird die Leber perfundiert.

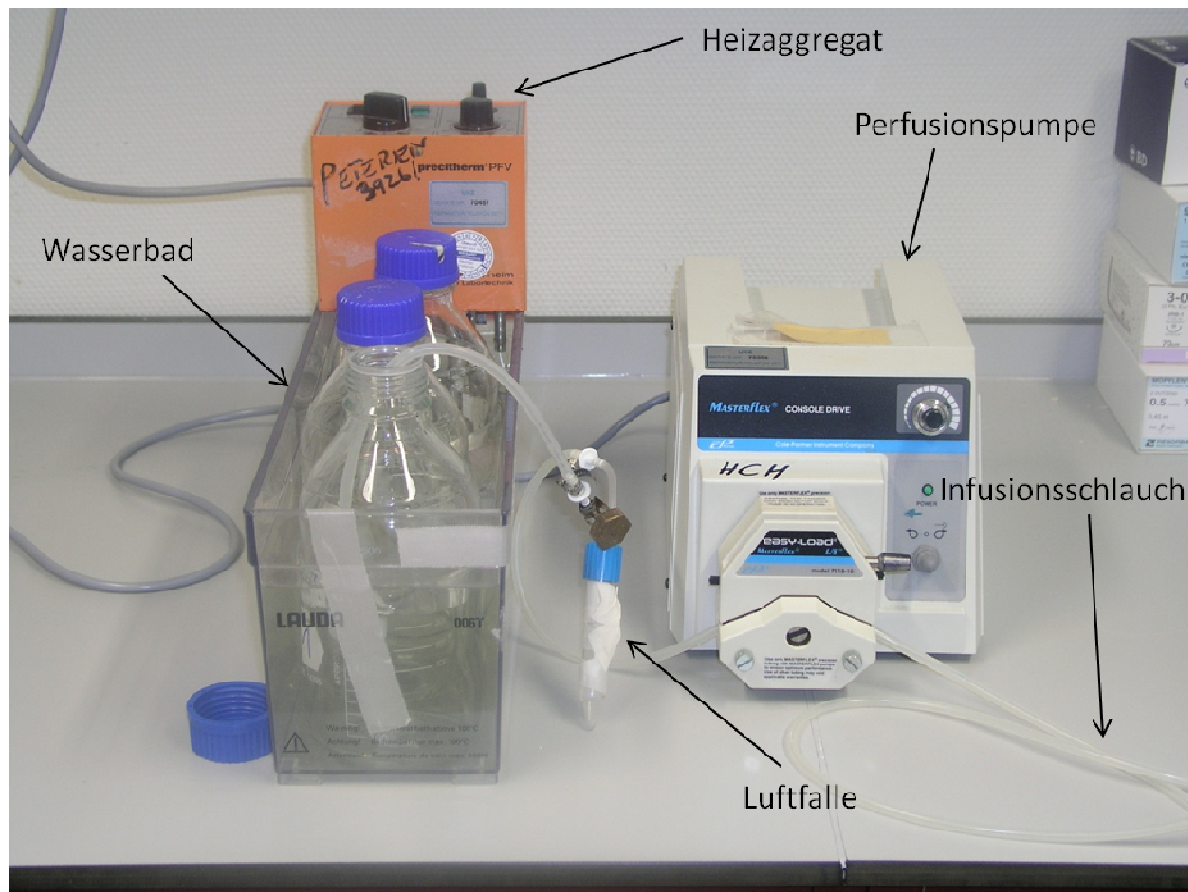


Abbildung 2: zeigt die zusammengebaute Perfusionsapparatur.

4.7. Hepatozytenisolation

4.7.1. Die in situ Leberperfusion

Zunächst werden die drei Perfusionslösungen in das Wasserbad gestellt und die Temperatur auf 37°C eingestellt. Das Schlauchsystem der Perfusionsapparatur wird mit 80% Ethanol (Th. Geyer GmbH u. Co KG, Renningen/D Kat.: 2273.2500) durchgespült und damit sterilisiert. Anschließend wird das Schlauchsystem zum Auswaschen des Ethanols sowie zur Kalibrierung der Flussgeschwindigkeit mit Aqua dest. gespült. Die Flussgeschwindigkeit beträgt 25ml/min. Das Tier wird mittels Isofluran (Forene; Abbott GmbH & Co KG Wiesbaden/D Kat.Nr.: 2594.00.00) in eine Inhalationsnarkose versetzt. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe vorhanden ist, wird das Tier gewogen, der Bauch glatt rasiert und anschließend desinfiziert (Cutasept®F, Bode Chemie GmbH, Hamburg/D REF 976602). Der Bauchraum wird mit einem V-förmigen Schnitt eröffnet, die Darmschlingen zur besseren Einsicht aus dem Bauchraum luxiert und das Lig. hepatoduodenale sowie die V. cava inferior dargestellt. Das Omentum minus wird mit einer gebogenen Pinzette (Dumont forzep large radius, curved shanks, FST, Heidelberg/ D, Kat.-Nr.: 11271-30) eröffnet, so dass man Einblick in die Bursa omentalis erhält und ein Ligaturfaden (Vicryl 3-0, Ethicon Hamburg/D, Kat.:V1205G) unterhalb des Ligamentum hepatoduodenale mit Austritt am Foramen omentale einlegen kann. Jetzt wird eine Bulldogklemme (Teufel, Liptingen/D, Kat.-Nr.: FB 331) so platziert, dass seine beiden Branchen das Ligamentum duodenale mit A. hepatica propria, V. portae und Ductus choledochus proximal am Leberhilus abklemmen (siehe Abbildung 3). Nachdem die V. portae durch Abklemmen stark angeschwollen ist, wird die gelegte Ligatur distal der Bulldogklemme verknotet. Anschließend wird mit einer Mikroschere (spring scissor, Curved Pan, FST, Heidelberg/D, Kat.-Nr.:15061-08) eine Inzision der V. portae vorgenommen. Unter Fluss wird nun die G17 Verweilkanüle eingeschoben. Zum Vorschieben der Kanüle innerhalb der V. portae ist es nötig, kurzzeitig beide Branchen der Bulldogklemme zu lösen, um sie dann zur Fixierung der Kanüle wieder zu schließen. Nun eröffnet man die infrahepatische V. cava inferior, um einen Abfluss für das Blut und die Perfusionslösung zu gewährleisten. Die Perfusionszeit der Leber beträgt 5min für die Perfusionslösung eins, 1min für Perfusionslösung 2, und 8-10 min für die Kollagenaselösung. Die optimale Zeit für die Kollagenaselösung ist erreicht, wenn die Leber intraoperativ eine fleckig helle Farbe erhält und durch leichten Druck mit einem Wattestäbchen auf die Leberkapsel sich diese blasenwerfend vom Parenchym löst. Anschließend wird die Leber freipräpariert und in 30ml Williams Medium E (Gibco,

Scotland/ UK, Kat.-Nr.: 22551-022) in einem 50ml Falcon – Röhrchen (BD Falcon™, Erembodegem/Belgium Kat.: 352070) auf Eis transportiert.

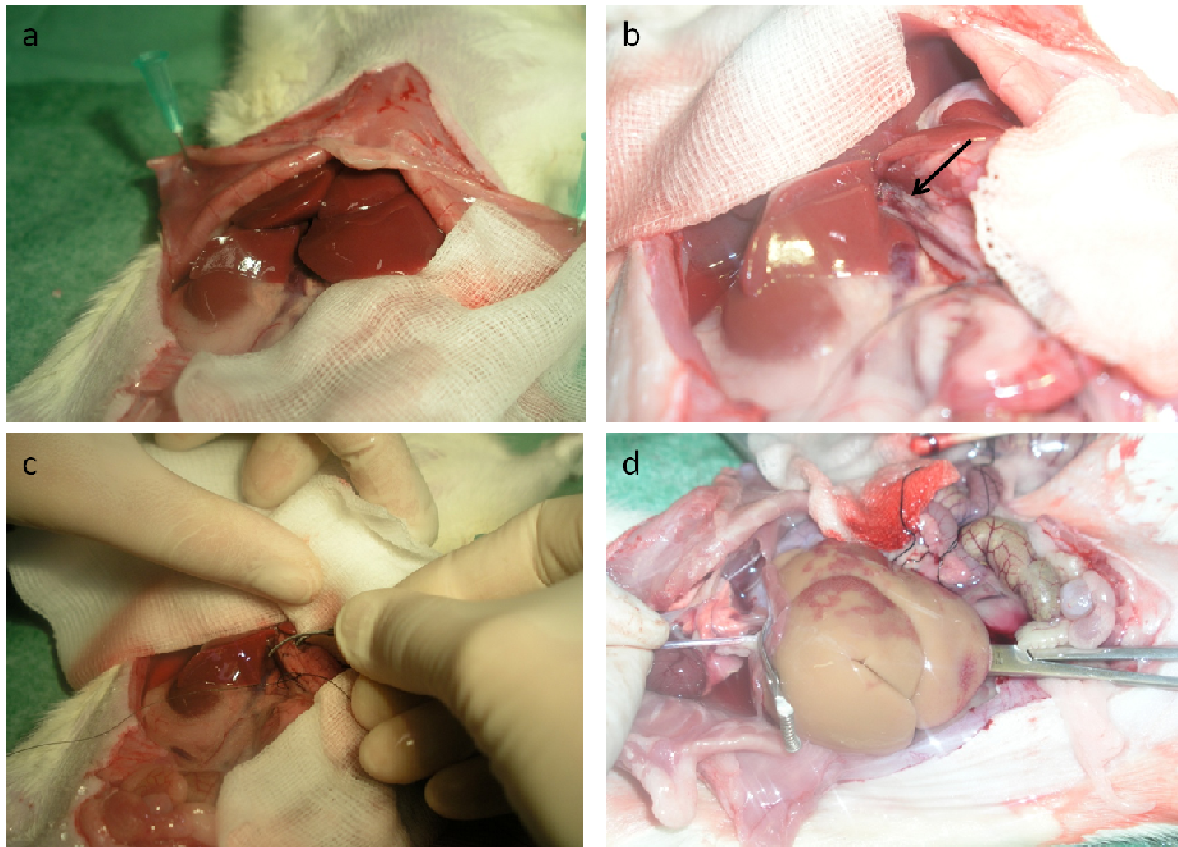


Abbildung 3a: Sternschnitz mit offenem Abdomen, Blick auf Leber, Darm zur Seite luxiert. **Abbildung 3b:** Leberlappen nach oben und zur Seite luxiert, Blick auf Vena Portae (Pfeil). **Abbildung 3c:** Operationssitus, Vena Portae distal mit Ligatur umschlungen, proximal Anlage der Bulldogklemme. **Abbildung 3d:** Blick auf Leber nach Durchlauf der 1. Perfusionslösung.

4.7.2. Zellisolation und Zellzahlbestimmung

Die so gewonnene verdaute Leber wird nun unter sterilen Bedingungen auf eine Petrischale (Nunclon™ Surface, Roskilde/Danmark Kat.: 150350) gegeben und auf Eis gelegt. Die Kapsel des Digestats wird stumpf mit einer Pinzette (Graefe forcep, serrated, FST, Heidelberg/D, Kat.-Nr.: 11050-10) eröffnet und die einzelnen Hepatozyten mittels sanftem schütteln herausisoliert. Die Leberkapsel wird anschließend verworfen. Die so entstandene Zellsuspension wird durch einen sterilen Filter aus Nylongewebe (Hydro-Bios, Kiel/ D, Kat.-Nr.: NY200 HC) mit einer Porengröße von 200µm gefiltert, um unverdaute Leberstücke sowie Kapselreste zu entfernen. Die Suspension wird in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und zweimal bei 4°C und 50g 5min lang zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf AG Hamburg/D Ser.No.: 5805XJ834645). Dadurch wird die Zellsuspension gewaschen und Hepatozyten und nicht parenchymatöse Zellen (NPZ) getrennt. Der Überstand

aus NPZ wird jeweils verworfen, das endgültige Sediment aus Hepatozyten wird mit Zellkulturmedium auf das dreifache Volumen des entstandenen Sediments resuspendiert und anschließend durch vorsichtiges Mischen in eine homogene Lösung gebracht.

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität wird eine 1:10 Verdünnung mit Trypan – Blau (Trypan Blue Stain 0,4%, Invitrogen Grand Island N.Y./USA Kat.: 15250-061) erstellt. Dazu werden 100µl Zellsuspension mit 800µl Kulturmedium verdünnt und mit 100µl 0,5%iger Trypan-Blau Lösung in einem 1,5ml Eppendorf-Röhrchen (Save-Lock Tubes 1,5ml, Eppendorf-Tubes, Eppendorf AG Hamburg/D, Kat.: 0030120.086) gemischt. Ein Tropfen dieser Lösung wird in der Neubauer – Zählkammer (Neubauer CE, Superior Marienfeld/D, Kat.: 0640110) unter dem Mikroskop ausgezählt. Bei einer Durchschnittsvitalität von über 80% und einer Mindestzellzahl von über E+08 werden die Hepatozyten zur Zellkultur verwendet. Zum Berechnen der Gesamtzellzahl in der Zellsuspension verwendet man folgende Formel:

$$\bar{Z} \times 10 \times 1000 \times V = n$$

$\bar{Z}$ - arithmetisches Mittel der Zellen nach Auszählung
 $10x$ - Verdünnung
 $1000x$ - Färbekammer
 V - Gesamtvolumen Zellsuspension
 n - Gesamtzellzahl

4.8. Besiedlung der Matrices

Zentrifugationsbesiedlung: Bei der Zentrifugationsbesiedlung nutzen wir die Zentrifugalkraft zur Besiedlung der Polymere mit Hepatozyten.

Die nach Hepatozytenisolation gewonnene Zellsuspension wird zusammen mit den Polymeren in 50ml Falcon-Röhrchen verbracht, anschließend werden die Falcon-Röhrchen bei 40g für 5min zentrifugiert. Die Polymere werden der Zellsuspension entnommen und in die Zellkulturplatten gelegt. Die einzelnen Wells werden mit dem benötigten Zellkulturmedium gefüllt und die Platten zur Kultur bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Pipettenbesiedlung: Bei der Pipettenbesiedlung werden definierte Zellzahlen auf das Polymer, das sich in der Zellkulturplatte befindet, mittels Pipette besiedelt. Es wird die Gesamtzahl der durch Zellisolation gewonnenen und gereinigten Hepatozyten in der Zellsuspension bestimmt (siehe Zellzahlbestimmung). Nun errechnet man das Volumen der Zellsuspension, das die benötigte Zellzahl enthält. Das Volumen der Zellsuspension, das die

definierte Zellzahl enthält, wird nun auf die benötigte Besiedlungssuspension (80µl pro Polymer) aufgefüllt. Das Polymer wird durch punktuelle Besiedlung an verschiedenen Orten besiedelt. Durch die Verteilung der Besiedlungspunkte soll eine hohe Besiedlungseffizienz erreicht werden. Die Wells werden mit den benötigten Zellkulturmedien gefüllt und die Platten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Formel zum Errechnen der definierten Zellmenge lautet wie folgt:

$$V \times A/n = X$$

V	- Gesamtvolumen Zellsuspension
A	- definierte Zellzahl pro Polymer
n	- Gesamtzellzahl
X	- Volumen, das definierte Zellzahl enthält

4.9. 3D Zellkultur

Die 3D Zellkultur wird in verschiedenen Wellformaten durchgeführt. Anfangs verwendeten wir 24-Well low Attachment Zellkulturplatten von Costar (Costar® 24 Well Clear Flat Bottom Ultra Low Attachment Multiple Well Plates, Corning N.Y./USA Kat.: 3473) Anschließend wechselten wir das Format und führten eine statische 3D Hepatozytenkultur in speziell ovalgeformten 96-Well Format durch (Millicell®96, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork/Ireland, Kat.: MACAC0RS5). Die Dauer der Zellkulturen ist versuchsabhängig. Das Volumen des Kulturmediums beträgt 520µl (abhängig vom Volumen Besiedlungssuspension) im 24 – Well Format und 350µl im 96-Well Format. Während der Kulturzeit wird täglich ein Mediumwechsel vollzogen. Das Volumen des Mediumwechsels beträgt 520µl in der 24-Well Kultur und 200µl in der 96-Well Kultur. Überstände werden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, um am Überstand LDH und Albumin zu messen. Um Überstandsmessungen durchzuführen, ist es nötig, dass die Überstände zellfrei sind, daher werden sie nach Entnahme bei 1500rpm 3min zentrifugiert, (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG Hamburg/D, Ser.No.: 540714634) der zellfreie Überstand entnommen und das Zellpellet verworfen. An bestimmten Zeitpunkten werden die Abbrüche der Kultur vorgenommen, um die Polymere für die Histologie sowie für DNA und RNA Analysen zu gewinnen.

Histologie: Um die Polymere für die Histologie verwenden zu können, müssen sie vorher in Tissue-Tek (Tissue-Tek® OCT™ Compound, Sakura Finetek Europe B.V./Netherlands, Kat.: SAK4583) zu Blöcken eingebettet werden. Dazu wird Trockeneis in einen Styroporbehälter gelegt. Eine Petrischale wird mit -20°C kaltem Isopropanol (2-Propanol J.T. Baker, Deventer/Holland, Kat.: 14-650-220) gefüllt und in den Styroporbehälter gestellt. Einwegplastikformen (Peel – A – Way®, 22x22x20 depp Disposable Embedding Molds [S-

22], Polysciences Inc, Warrington, PA/USA Kat: 18646A) werden mit Tissue-Tek gefüllt und das Polymer im Anschluss hineingelegt. Der Block wird in Isopropanol gestellt und auf Trockeneis gelagert. Sobald das Tissue-Tek zu einer festen Konsistenz gefroren ist, muss der Block bei -80°C gelagert werden.

DNA: Bevor wir die Messungen/Isolierung der DNA vornehmen, wird das Polymer der Kultur entnommen und bei -80°C konserviert. Zunächst wird der Überstand abgesaugt, dann wird das Polymer in ein Eppendorfröhrchen (Safe-Lock Tubes 1,5ml, Eppendorf Biopur®, Hamburg/D, Kat.: 0030121.589) gelegt. Falls das Polymer zu stark über die Kulturdauer degeneriert ist und daher leicht brüchig, kann man restliches Polymer und Zellen mit PBS aus den Wells absaugen. Die Eppendorfröhrchen werden bei 1500rpm für 3min zentrifugiert, der zellfreie Überstand abgesaugt und verworfen. Polymere und Zellen werden nun für kurze Zeit in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

RNA: Zur Messung der Transkriptionsrate ist es nötig RNA, zu isolieren. Bevor mit der RNA Isolierung begonnen werden kann, muss diese aus den Zellen sowie dem Polymer herausgelöst werden. Die Messung der Transkriptionsraten erfolgt zum selben Zeitpunkt wie die Bestimmung des DNA Gehaltes. An diesen Tagen werden die Polymere ebenfalls der Kultur entnommen, der Überstand wurde zuvor abgesaugt. Die Polymere werden in DNase/RNase freie Eppendorfröhrchen (Safe-Lock Tubes 1,5ml, Eppendorf Biopur®, Hamburg/D, Kat.: 0030121.589) gelegt, bei 1500rpm für 3min zentrifugiert und der zellfreie Überstand abgesaugt und verworfen. Zum Isolieren der RNA ist eine Zelllyse nötig, daher werden die Polymere in 350µl RLT-Puffer (siehe RNeasy Mini Kit) mit 3,5µl Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Steinheim/D, Kat.: M7154) gelagert. Um die komplette RNA zu gewinnen, wird mittels Stampfer per Hand das Polymer zerkleinert, anschließend wird das Eppendorfröhrchen noch 1min gevortext und dann bei -80°C gelagert.

4.10. 2D Zellkultur

Basis unserer 2D Kultur sind 24 Well Zellkulturplatten von Nunc. Diese wurden zuvor mit Kollagen beschichtet (siehe oben).

Besiedlung der Zellkulturplatten: Nachdem wir die Zellen in Suspension gereinigt und die genaue Zellzahl nach Isolierung errechnet haben, besiedeln wir unsere Zellkulturplatten mit den definierten Zellzahlen. Die errechnete Menge der Besiedlungssuspension wird auf 600µl aufgefüllt und durch vorsichtiges Schütteln im Eppendorfröhrchen homogenisiert. Dann wird die homogenisierte Suspension pro Well pipettiert und bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

Zellkulturbedingungen: Die Dauer der Zellkultur sowie die Entnahme der Überstände und Zeitpunkte der Abbrüche sind identisch mit denen der 3D Zellkultur. Die Kultur wird mit einem Gesamtvolumen von 600µl pro 24-Well durchgeführt, wobei der Mediumwechsel 520µl pro Well beträgt. Die Überstände werden ebenfalls zentrifugiert, um sie dadurch zellfrei zu bekommen. Da die Zellen adhärent mit der Zellkulturplatte verbunden sind und speziell gelöst werden müssen, ist keine aussagekräftige Histologie möglich, daher beschränken wir uns auf Überstandsmessungen sowie DNA und RNA Analysen.

DNA/RNA: Zur Messung und Isolierung der DNA sowie RNA ist es nötig, die Zellen vorher von der Kulturplatte zu lösen und zu konservieren. Zum Ablösen der Hepatozyten wird Trypsin-EDTA (Trypsin EDTA solution, Sigma-Aldrich Steinheim/D, Kat.: T3924) verwendet. Bevor es genutzt wird, muss es auf eine Temperatur von 37°C erwärmt werden. An den Abbruchtagen wird das Kulturmedium der definierten Wells abgesaugt und diese anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Da das FCS in unserem Kulturmedium Trypsin inhibiert, sollte das Waschen gründlich durchgeführt werden. Trypsin-EDTA wird in die Wells pipettiert, so dass der Boden leicht bedeckt ist und anschließend für 6min im Brutschrank inkubiert. Falls noch Restzellen adhärent zum Kulturboden sind, können diese durch leichtes Klopfen gelöst werden. Die Lösung aus Trypsin-EDTA samt Hepatozyten wird aus den Wells aspiriert, Restzellen können durch zusätzliches Spülen mit PBS gelöst werden und in stickstoffresistente RNase/DNase freie Eppendorfröhrchen pipettiert werden. Die Eppendorfröhrchen werden bei 1500rpm für 8min zentrifugiert und das Zellpellet mit Medium zur Inhibierung des Trypsins einmal gewaschen. Es folgt erneut eine Zentrifugation bei 1500rpm für 8min. Zum Herauslösen von Phenolrot wird das Zellpellet nun mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Eppendorfröhrchen mit dem Zellpellet zur DNA Isolierung wird für kurze Zeit in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor es bei -80°C konserviert wird. Zu den Zellpellets zur RNA Isolierung wird zwecks Lyse der Zellen zum Herauslösen der RNA 350µl RLT-Puffer (siehe RNeasy Mini Kit) mit 3,5µl Mercaptoethanol pipettiert. Es folgt 1min Vortexen und Lagerung bei -80°C.

4.11. Färbungen

Für die folgenden Färbungen und Fluoreszenzfärbungen werden die Schnitte wie folgt angefertigt:

Mit dem Kryotom (Microm HM550, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich/D Ser.: 29513) werden 18µm dicke Schnitte von den Polymeren angefertigt. Diese wurden vorher in

Tissue-Tek zu Blöcken (siehe oben) eingebettet und bei -80°C weggefroren. Die Schnitte werden anschließend bei -80°C gelagert. Vor Färbung müssen die Objektträger mindestens 30min luftgetrocknet werden.

4.11.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Im Aceton (Th. Geyer GmbH u. Co KG, Renningen/D, Kat.: 2659.5000) werden die Schnitte 2min fixiert, dann wird mit Aqua dest. kurz gespült. 4min Hämalaun (Mayers Hämatoxylin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D, REF: MHS32-12) sind für eine qualitative Zellkernfärbung nötig. Im Anschluss 10sec in 0,1% HCL spülen. Zum Bläuen des Hämalauns werden die Objektträger 10sec unter fließendes Leitungswasser gebracht, anschließend kurz in Aqua dest. gelegt. Die Gegenfärbung des Plasmas erfolgt für 10sec in Eosin (May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung, Merck Darmstadt/D, Kat.: 1014240500) Zum Herauslösen des Wassers erfolgt nun eine aufsteigende Alkoholreihe (80%, 96%, 100% Ethanol) für jeweils 10sec pro Gefäß. In Xylol (Th. Geyer GmbH u. Co KG, Renningen/D, Kat.: 326.2500) werden die Schnitte solange gelagert bis sie mit Entellan (Entellan® Merck KGaA Darmstadt/D Kat.: 1079610100) und Deckgläschen (Superior Marienfeld/D Kat.: 0101010) eingedeckelt werden.

4.11.2 Periodic-Acid-Schiff Färbung (PAS)

Die Schnitte werden zuvor in Aceton 2min fixiert, dann wird mit Aqua dest. kurz gespült. Dann folgt eine 10 minütige Inkubation in 0,8%ige Perjodsäure-Lösung (Merck, Darmstadt/D, Kat.: 524.0100), im Anschluß wird gründlich 2 x 3min in Aqua dest. gespült. Die Präparate für 3h bei 60°C in einer 5%igen Lösung von Dimedon (5.5-dimethylcyclohexan-1.3 dion) (Merck, Darmstadt/D, Kat.: 1.06013.0025) in absolutem Ethanol einstellen. Danach erneut in Aqua dest. 3 x 2min spülen. Die Präparate werden im Dunkeln für 30min in der Schiff'schen Reagenz (Merck, Darmstadt/D, Kat.: 1.09033.0500) inkubiert. Anschließend werden die Schnitte für 3 x 2min in Sulfidwasser (315ml Aqua dest., 15ml HCl, 1,5g Natriumdisulfid (Merck, Darmstadt/ D, Kat.-Nr.: 6528)) gestellt. Im Anschluß wird 20min unter fließendem Wasser gewässert, und kurz in Aqua dest gespült. Dann folgt die Gegenfärbung mit Hämatoxilin. Dafür werden die Präparate für 4min in Mayers Hämatoxilin gestellt, anschließend kurz in Aqua dest. differenziert und dann 10min unter fließendem Wasser gebläut. Erneut kurz im Aqua dest. spülen und dann die Präparate für je 2min in einer aufsteigende Alkoholreihe einstellen. Zum Schluss kommen die Präparate für 2 x 5min in Xylol und werden anschließend in Entellan eingebettet.

4.12. Immunfluoreszenz

Die Schnitte werden zuerst mindestens 20min nach dem Auftauen bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Im Anschluss erfolgt die Fixierung in -20°C kaltem Aceton. Zur Rehydrierung werden die Objektträger mit den Schnitten dreimal für 5min in PBS Puffer gewaschen. Dann erfolgt die Beschichtung mit den jeweiligen Primärantikörpern.

Primärantikörper: HNF-4α (C19, goat polyclonal IgG, sc-6556, Santa Cruz Biotechnology) **Verdünnung 1:200**

Connexin 32 (C20, goat polyclonal IgG, sc-7258, Santa Cruz Biotechnology) **Verdünnung 1:100**

ZO-1 (Rabbit anti-ZO-1 (Mid), polyclonal antibody, Invitrogen Corporation/Carlsbad Cat.Nr.: 40-2200) **Verdünnung 1:20**

CYP450 (Anti-Cytochrome p450 Polyclonal Antibody rabbit Ig, MBL International Corporation, Woburn/USA, Kat.: MBL-BV-3084-3)

Die Primärantikörper werden jeweils in PBS Puffer verdünnt. Anschließend werden ca. 200µl der Primärantikörper auf die jeweiligen Schnitte getropft, so dass der Schnitt komplett bedeckt ist. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 60min oder bei -4°C über Nacht. Im Anschluss erfolgt erneut dreimaliges Waschen mit PBS für 5min. Nun werden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper versehen.

Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (Alexa Fluor® 555, invitrogen, A21429) **Verdünnung 1:400**

donkey anti goat (Alexa Fluor® 555, invitrogen/Eugene Oregon/USA, A-21432) **Verdünnung 1:400**

Doppelfärbung: CK-18 (Mouse IgG, anti Cytokeratin 4,5,6,8,10,13,18 FITC, Acris GmbH/D, BM 555F) **Verdünnung 1:25**

Auch die Verdünnungen der Doppelfärbung sowie der Sekundärantikörper erfolgt mit PBS. Zur Durchführung der Doppelfärbungen werden die Sekundärantikörper, bevor sie auf den Objektträger gegeben werden, zusätzlich mit CK18-FITC verdünnt.

Nachdem die Schnitte mit beiden Antikörpern (Sekundär + Doppelfärbung) benetzt wurden, erfolgt erneut eine Inkubation in der feuchten Kammer für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgt erneutes Waschen in PBS wie oben beschrieben und im Anschluss werden die Objektträger mit Mounting Medium (Dako, Glostrup/DK, Kat.: S3023) für Fluoreszenzfärbung eingedeckt. Positiv sowie Negativkontrollen werden mitgefärbt.

4.13. Überstandsmessungen

Um den Verlauf der Zellletalität sowie der Stoffwechselaktivität beurteilen zu können, ist es notwendig, zu verschiedenen Zeitpunkten Messungen an zellfreien Überständen vorzunehmen.

4.13.1. Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Die Lactat-Dehydrogenase kommt in fast allen Zellen vor und ist für einen anaeroben Stoffwechsel unabdingbar. Da bei Zelluntergang auch die Zellmembranen beschädigt werden, wird das LDH ans Zellmedium abgegeben. Daher kann im Verlauf durch einen Anstieg der LDH im Überstand auf einen vermehrten Zelltod geschlossen werden. Zur Messung der LDH im Überstand benutzten wir LDH Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (LDH, Roche, Kat.Nr.: 04744926001). Zu jeder LDH Messung wurde ein Standard (L-LDH Roche, Mannheim/D, Kat.: 10107085001) mitgezogen. Die spezifische Aktivität des Standards beträgt 550U/mg (100mg/10ml).

Standard: Der Standard wird zuvor 1:10000 mit Medium verdünnt. Es wird eine absteigende Verdünnungsreihe 1:2 mit Medium erstellt. Anschließend werden von der LDH-Standardreihe 100µl pro Well in eine 96-Well Platte (NuncloTM Surface, Roskilde/DK, Kat.: 163320) pipettiert.

Proben: Die zellfreien Überstände werden mit Medium je nach Bedarf 1:10, 1:20 oder 1:30 verdünnt und ebenfalls 100µl pro Well in eine 96-Well Platte pipettiert. Die Konzentrationen der Proben liegen innerhalb der Standardreihe.

Procedere: Zu den Standards und den Proben werden 100µl pro Well Reaction mixture, die vorher nach Anleitung des LDH-Kits vorbereitet wurde, hinzugegeben. Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit von 10min werden 50µl Stop Solution zugefügt. Anschließend erfolgt die photometrische Messung (infinte M200, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim/D, REF: 30016056) bei 492nm. Bei jeder Messung wird ein Leerwert mit reinem Medium mitbestimmt. Jede Messung wird als Doppelbestimmung angefertigt.

4.13.2 Rat Albumin Elisa

Albumin ist ein polyfunktionales Protein, das eine wichtige Funktion im Erhalt der Homöostasis hat. Der Hauptbildungsort dieses Proteins ist die Leber. Daher nutzen wir die Messung des Albumins im zellfreien Überstand als Verlaufsparemeter der Stoffwechselaktivität der kultivierten Hepatozyten. Die Basis der Messung basiert auf einem doppelten Antikörper Sandwich ELISA. Hierzu nutzen wir den genannten Rat Albumin

ELISA Kit (Immunology Consultants Lab, Inc. Newberg OR/USA Kat.: E-25AL). Zu jeder Messung der Albuminkonzentration wird ein Standard mitgemessen. Die benötigten Konzentrate und Konjugate wurden nach Anleitung des Albumin Kits vorbereitet. Alle Proben und Standards werden auf Raumtemperatur aufgetaut.

Standard: Nachdem 1ml Aqua dest. zu dem mitgelieferten Rat Albumin Standard pipettiert wird, erhält dieser eine Konzentration von 132µg/ml (Vorsicht Chargenabhängig, Anleitung beachten). 2µl dieses Rat Albumin Kalibrators werden zu 658µl unseres Mediums pipettiert. Damit beträgt die Konzentration des ersten Standards 400ng/ml. Davon ausgehend wird eine Verdünnungsreihe 1:2 bis zur Endkonzentration von 6,25ng/ml fortgeführt. Anschließend werden 100µl pro Well in Doppelbestimmung in die Anti-Rat Albumin ELISA Micro Plate pipettiert. Ein Leerwert wird mitbestimmt.

Proben: Die zellfreien Überstände werden je nach vermuteter Albuminkonzentration 1:10 bis 1:100 mit Medium verdünnt. Anschließend werden 100µl pr Well in Doppelbestimmung in die Anti-Rat Albumin ELISA Micro Plate pipettiert.

Procedere: Die Anti-Rat Albumin ELISA Micro Plate wird bei Raumtemperatur für 30min inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt ein dreimaliges Waschen mit Wash Solution. 100µl des Enzym-Antikörper Konjugates werden pro Well zugefügt. Nach weiteren 30min Inkubationszeit wird die Platte erneut dreimal mit Wash Solution gewaschen. Zum Färben der Antikörperkomplexe werden 50µl pro Well TMB (tetramethylbenzidine) Substrat hinzugegeben. Nach genau 10min Inkubationszeit wird die Reaktion durch 100µl Stop Solution pro Well gestoppt. Gemessen wird die Absorption mit einem Photometer (infinte M200, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim/D, REF: 30016056) bei 450nm. Die Quantität des Albumins variiert direkt mit der Quantität der gebundenen Enzyme. Die gemessenen Konzentrationen der Standards können auf eine Standardkurve übertragen werden. Zu dieser Standardkurve können die Gesamtkonzentrationen unserer Proben interpoliert werden.

4.13.3 WST-1 Umsatztest

Bei dem WST-1 Test von Roche (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D Kat. Nr: 11644807001) handelt es sich um einen kolorimetrischen Vitalitätstest. Er beruht darauf, dass ein Tetrazoliumsalz durch zelluläre Enzyme (die Elektronentransportkette des mitochondrialen Succinat-Reduktase System) zu Formazan umgesetzt wird, was nur in vitalen Zellen geschieht. Durch erhöhte Anzahl lebender Zellen kommt es zu einer Zunahme der aktiven mitochondrialen Dehydrogenase bzw. zu einer

Zunahme der Menge an farbigem Formazan, welche innerhalb vorgegebener Grenzen direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen in Kultur ist.

Die gebrauchsfertige WST-1-Lösung wird im Verhältniss 1:10 zum Zellkulturmedium (siehe Anleitung) pro Well pipettiert. Eine negativ Kontrolle wird in jedem Versuch mit bestimmt. Im Anschluss wird die Zellkulturplatten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Null und 2 Stunden werden 200µl den Wells entnommen und per Doppelbestimmung (je 100µl) photometrisch gemessen. Die Bildung des roten Formazans kann durch Messung der Absorption bei 450nm und einer Referenzwellenlänge bei 690nm gegen einen Leerwert mittels eines ELISA-Readers (Microplate Reader, Dynatech Medical Products Guernsey/Channel Isles, Ser.: G395) bestimmt werden.

4.14. DNA Isolation

Zellzahlanalysen sind in der in vitro Zellkultur von besonderem Interesse. Erstens können Rückschlüsse auf die Besiedlungseffizienz getätigt werden, zweitens können anhand von vitalen Zellen pro Polymer pro Zeitpunkt Aussagen über den Zellkulturverlauf getroffen werden. Ein Problem, das sich bei der Bestimmung von Zellzahlen in 3D Kulturen bietet ist, dass diese aufgrund der Polymerstrukturen nicht exakt zählbar sind. Daher wurde zur genauen Bestimmung der Zellzahl die DNA-Konzentration gemessen und damit anhand einer DNA-Eichkurve Rückschlüsse auf die Zellzahl gezogen.

Zur Messung der Konzentration sowie zur Isolierung der DNA nutzen wir QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden/D, Kat: 51304). Um die gesamte DNA zu isolieren ist, eine suffiziente Zelllyse unabdingbar. Vor der Messung werden alle Proben auf Raumtemperatur getaut. Dann werden 180µl ATL Puffer sowie 20µl Proteinase K zu den zu messenden Proben pipettiert. Anschließend werden die Proben gevortext und über Nacht schüttelnd bei 56°C in einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg/D, No: 535509343) inkubiert. Nach Zelllyse werden die Proben kurz zentrifugiert, damit keine Rückstände am Deckel verbleiben. Es folgen nun die einzelnen Schritte zur DNA Isolation. 200µl AL Puffer pro Probe, anschließendes Vortexen mit Inkubation bei 70°C für 10min. Zur Vermeidung von Rückständen erneut kurz zentrifugieren. 200µl Ethanol (96-100%) pro Probe mit anschließendem Vortexen und kurzzeitiger Zentrifugation. Diese Mixture pipettiert man auf QIAamp Spin Columns, welche sich in 2ml Collection Tubes befinden. Zentrifugation bei 8000rpm für 1min. Collection Tubes verwerfen und die QIAamp Spin Columns in neue Collection Tubes setzen. 500µl AW1 Puffer auf die QIAamp Spin Column pipettieren und anschließend bei 8000rpm für 1min zentrifugieren, dann verwerfen der Collection Tubes und

neues Platzieren der QIAamp Spin Column in neuen Collection Tubes. 500µl AW2 Puffer hinzufügen und Zentrifugation bei full speed (14000rpm) für 3min, hinterher verwerfen der Collection Tubes. Die Schritte der AW1 und AW2 Puffer werden jeweils zweimal durchgeführt. Die QIAamp Spin Column, auf denen sich die DNA befindet, werden in 1,5ml DNase/RNase freie Eppendorfröhrchen (Safe-Lock Tubes 1,5ml, Eppendorf Biopur®, Eppendorf AG Hamburg/D, Order No: 0030121.589) platziert. Die DNA wird in Sigma Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim/D Kat.: W4502) gelöst, dazu werden 150µl Sigma Wasser auf die QIAamp Spin Column pipettiert und anschließend für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 8000rpm für 1min wird die in Sigma Wasser gelöste DNA im 1,5ml DNase/RNase frei Eppendorfröhrchen gesammelt. Um die gesamte DNA zu erhalten, wiederholen wir den obigen Schritt und pipettieren erneut 100µl Sigma Wasser auf die QIAamp Spin Column. Die QIAamp Spin Column werden verworfen und die isolierte DNA, gelöst in Aqua dest., kann mittels Nano Drop durch Absorbance Messung bei 260nm ermittelt werden.

4.14.1 DNA-Eichkurve

Zum Erstellen einer Eichkurve mit Zellsuspensionen bekannter Zellzahlen werden fünf Zellisolationen nach oben genanntem Schema durchgeführt. Die isolierten Zellen werden mittels Neubauer – Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt (siehe: Zellisolation und Zellzahlbestimmung). Bei einer Durchschnittsvitalität von über 80% und einer Mindestzellzahl von über 10^8 werden die Zellen zur Bestimmung der Eichkurve verwendet. Die DNA der Zellzahlen $1E+06$, $5E+05$, $2,5E+05$, $1,25E+05$, $6,25E+04$, $3,125E+04$, $1,5625E+04$ und $7,812E+04$ wird isoliert und in Doppelbestimmung gemessen. Die DNA-Konzentrationen von fünf Isolierungen wurden tabellarisch aufgetragen, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Eine Geradenformel wurde zur Berechnung der Zellzahlen errechnet.

4.15. RNA Isolation

Zur RNA Isolation nutzen wir das RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden/D, Kat.: 74104). Um RNA aus den Zellen zu lösen, ist eine Zelllyse nötig. Diese wurde durch vorheriges Vortexen und Zerstampfen des Polymers sowie Lagerung im RLT-Puffer mit Mercaptoethanol erreicht (siehe oben). Die Proben werden bei 56°C für 20min im Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg/D, No: 535509343) zum Auftauen gebracht. Die Eppendorfröhrchen der 3D Kultur bei 5000g für 5min zentrifugieren. Der Überstand

kommt in ein neues RNase freies Eppendorfröhrchen, das Polymer wird verworfen. Bei Isolierung der RNA aus der 2D Kultur kann direkt mit der Homogenisation begonnen werden. Die durch die Lyseprozedur entstandene Viskosität wird durch einen Homogenisationsschritt aufgehoben. Dafür wird das gesamte Volumen der Proben (ca. 350µl) auf den QIAshredder™ (QIAGEN GmbH, Hilden/D, Kat Nr.: 79654) pipettiert und anschließend bei full speed 2min zentrifugiert. 350µl 70%iges Ethanol in die Collection Tubes pipettieren und gut mischen. Nun erfolgt die Aufreinigung und Isolierung der RNA in mehreren Schritten. Die gesamte Lösung (ca. 700µl) auf ein RNeasy Spin Column pipettieren und 15s bei 10000rpm zentrifugieren. Der gesammelte Durchfluss im Collection Tube wird verworfen und 700µl RW1 Puffer auf die RNA enthaltenen RNeasy Spin Columns pipettiert. Erneutes Zentrifugieren bei 10000rpm für 15s. Der Durchfluss wird verworfen und 500µl RPE Puffer auf die RNeasy Spin Columns pipettiert. Erneutes Zentrifugieren bei 10000rpm für 15s und Verwerfen des Durchflusses sowie wiederholtes Pipettieren von 500µl des RPE Puffers auf die RNeasy Spin Columns mit Zentrifugation für 2min bei 10000rpm. Die RNA enthaltenden RNeasy Spin Columns kommen in ein neues 1,5ml umfassendes Collection Tube, die alten samt Durchfluss werden verworfen. Die gereinigte RNA auf den RNeasy Spin Columns wird in 30µl RNase free water gelöst. Dazu 30µl des RNase free waters auf die RNeasy Spin Columns pipettieren und anschließende Zentrifugation bei 10000rpm für 1min. Die RNeasy Spin Column können verworfen werden, die Messung der RNA im Collection Tube erfolgt am Nano Drop durch eine Absorbance Messung bei 260nm. Die gemessene RNA Menge wird in ng/µl angegeben, diese muss mit dem Gesamtvolumen unserer Lösung multipliziert werden, um die gesamte isolierte RNA Menge zu errechnen.

4.16. Reverse Transkription in cDNA

Zur Bestimmung quantitativer Genexpressionen nutzen wir rtPCR-Analysen (siehe unten). Mittels 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D, Kat: 11483188001) wird RNA durch reverse Transkription in Einzelstrang cDNA umgeschrieben, die dann als Template zur PCR genutzt werden kann. Um RNA suffizient in cDNA umschreiben zu können, ist eine Konzentration von ca. 400ng erforderlich. Das gesamte Reaktionsvolumen beträgt 20µl und setzt sich aus 11µl Master Mix, 0,8µl AMV Reverse Transkriptase sowie maximal 8,2µl Probenmenge zusammen. Falls die Konzentration der isolierten RNA den Sättigungswert überschreiten, kann die Menge an RNA durch Verdünnen mit RNase freiem Aqua dest. verringert werden. Falls die RNA

Konzentrationen zu gering sind, kann durch Konzentrierung versucht werden, den Schwellenwert dennoch zu erreichen.

Procedere: Die folgenden Komponenten werden auf Eis in ein steriles MicroAmp[®] Tube (Autoclaved Reaction Tube with Cap [0,2ml], Applied Biosystems, Foster City, CA/USA, Part No: N801-0612) pipettiert [Volumen/Probe].

Master Mix:

10x Reaction Buffer	2,0µl
25mM MgCl ₂	4,0µl
Deoxynucleotide Mix	2,0µl
Oligo – p(dt) ₁₅ Primer	2,0µl
RNase Inhibitor	1,0µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8µl
RNA Probe	variabel max. 8,2µl
RNase freies Aqua dest.	variabel
Total	20µl

Zum Amplifizieren werden die MicroAmp[®] Tubes in den Thermocycler (Biometra[®], biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen/D Serial No: 1809414) gestellt und folgende Programmierung gewählt:

25°C	10min	Primeranlagerung an RNA
42°C	60min	spezifische Temperatur Reverse Transkriptase
99°C	5min	Denaturierung
4°C	∞	Lagerung

Die cDNA kann bei -20°C über mehrere Wochen gelagert werden.

4.17. Real-Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR)

Zur Messung quantitativer cDNA nutzen wir QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit (QIAGEN GmbH Hilden/D, Kat.Nr.: 204243). Unsere Primer (RT₂ qPCR primer assays, SABiosciences) sind spezifisch für die Gene Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp3a2, Cyp2b2 und Albumin. Als Referenzgen nutzten wir GAPDH

Gen Name	Gen Symbol	Amplikonlänge	Refseq No.:
Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 2	Cyp2b2	158 bp	XM_001070953.1
Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 2	Cyp3a2	86 bp	NM_153312.2
Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Cyp1a1	196 bp	NM_012540.2
Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	Cyp1a2	111 bp	NM_012541.3
Albumin	Alb	128 bp	NM_134326.2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	172 bp	NM_017008.3

Reaktionslösung: Die Substanzen werden nach Anleitung gemischt. Das totale Reaktionsvolumen beträgt 50µl. Zuerst werden die benötigten Proben und Reagenzien von minus 20°C auf Raumtemperatur getaut. Dann wird die Reaktionslösung wie folgt pipettiert [µl/Probe]:

- 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix:	25µl
- Primer	5µl
- QuantiTect RT Mix:	0,5µl
- RNase – free water:	18,5µl
- Total:	49µl

Diese Volumina beziehen sich auf Probe pro Well und können optional mit dem Faktor der zu messenden Proben multipliziert und anschließend in einem DNase/RNase freien Eppendorfröhrchen (Safe-Lock Tubes 1,5ml, Eppendorf Biopur®, Eppendorf AG Hamburg/D, Order No: 0030121.589) vorbereitet werden. Die Reaktionslösung wird nach vorbereitetem 96-Well Schema in die 96-Well Platte (MicroAmp®, Fast optional 96-Well Reaction Plate with Barcode [0,1ml], Applied Biosystems, Woodlands/Singapore Part No: 4346906) pipettiert.

Proben: Pro Well werden 1µl der zu amplifizierenden cDNA hinzugegeben. Falls die Mengen an cDNA zu gering sind, können optional 2µl oder mehr verwendet werden. Um bei einem Gesamtvolumen von 50µl zu bleiben, muss die Menge des RNase-free waters um denselben Faktor reduziert werden.

Negativkontrollen: Bei jeder Messung werden Negativkontrollen mitbestimmt. Hierzu wird 1µl DNase/RNase freies Aqua dest. pro Well hinzugegeben.

Messung: Vor Beginn der Amplifizierung wird die Messplatte mit einer optisch klaren Klebefolie (Sarstedt Aktiengesellschaft u. Co, Nümbrecht/D, REF: 95.1994) bedeckt und kurz bei 1000rpm zentrifugiert. Die gemischten Substanzen werden in einem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California/USA, Part Nr.: 4376600) amplifiziert. Zur Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase wird initial ein Aktivierungsschritt mit 95°C für 15min eingestellt. Anschließend werden für 40 Cyclen folgende Amplifizierungseinstellungen gewählt:

Denaturierung:	15s	94°C
Primerhybridisierung:	30s	55°C
Elongation:	30s	72°C

Auswertung: Die Auswertung kann über die Step one Software eingesehen werden.

Die Auswertung der Expression der leberzellspezifischen Faktoren erfolgte mittels (delta) Δ CT Methode, wobei die Genexpression mit einem Referenzgen verglichen wird. Als stabiles Referenzgen verwendeten wir Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH).

5. Ergebnis:

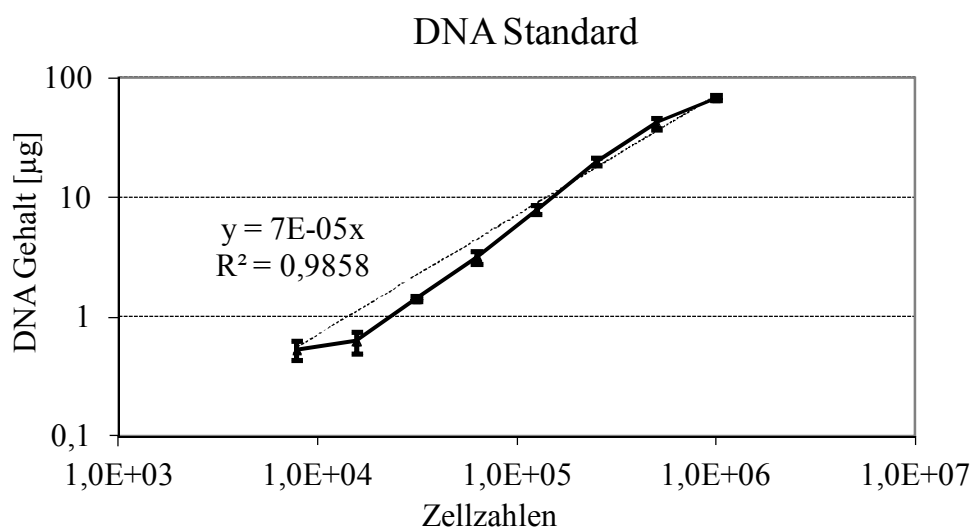
5.1. DNA Eichkurve:

Die DNA Konzentrationen definierter Zellzahlen wurden gemessen. Es wurden 5 Hepatozytenisolierungen vorgenommen (Probe 1-5). Bei einer Mindestvitalität von 80% und Zellzahlen ab E+08 wurden die DNA Konzentrationen gemessen. Angegeben sind die Werte aus den einzelnen Doppelbestimmungen der Isolierungen 1-5. Die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen wurden errechnet. Eine Geradenformel zum Errechnen der Zellzahlen anhand von DNA-Konzentrationen [μg] wurde erstellt.

Tabelle 2: DNA Messung 5 verschiedener Hepatozytenisolierungen

Zellzahl	DNA in μg						Standardabweichung
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Mittelwert	
1,000E+06	68,250	73,740	68,330	63,580	66,680	68,116	3,296
5,000E+05	40,800	49,150	36,150	39,150	45,390	42,128	4,611
2,500E+05	19,010	20,440	22,660	20,800	17,910	20,164	1,620
1,250E+05	7,510	8,830	8,480	8,000	6,850	7,934	0,701
6,250E+04	3,400	3,450	2,920	3,540	2,580	3,178	0,368
3,125E+04	1,430	1,530	1,400	1,380	1,330	1,414	0,067
1,563E+04	0,760	0,760	0,430	0,550	0,630	0,626	0,127
7,812E+03	0,630	0,560	0,420	0,650	0,420	0,536	0,099

Diagramm 1: Graphische Darstellung der DNA aus Tabelle 1 mit Konstruktion einer Eichgeraden



Die Geradenformel lautet:

$$\text{DNA } [\mu\text{g}] = 7,0\text{E-}05 \times \text{Zellzahlen}$$

5.2. TEIL A: Charakterisierung der statischen 3D Kultur im 24-Well Format

5.2.1. Versuch AI:

Ziel: Erste Charakterisierung der 3D Hepatozytenkultur im Vergleich zur 2D Hepatozytenkultur im 24-Well Format. Die Zellvitalität nach Isolation betrug 87,5% die gesamte Zellmenge der isolierten Hepatozyten betrug $2,37E+08$.

3D Kultur: Es wurden 9 Polymere verwendet (siehe Plattenlayout Abbildung AI.1). Die Kulturdauer wurde auf 84 Stunden angesetzt und wurde in 24-Well low attachment Platten durchgeführt. Der WST-Test wurde an den Zeitpunkten 0h, 12h, 36h, 60h und 84h bestimmt, der Albumintest an den Zeitpunkten 12h, 36h, 60h und 84h. Polymere zur Histologie (HE-Färbung) wurden an den Zeitpunkten 12h, 36h, 60h und 84h gewonnen. Durch Pipettenbesiedlung wurden $1,0E+05$ Hepatozyten pro Polymer in 80µl Zellsuspension pipettiert. Die Gesamtmenge des Zellkulturmediums betrug 600µl.

2D Kultur: $1,0E+05$ Hepatozyten wurden mittels Pipettenbesiedlung auf Kollagen beschichtete 24 Well Kulturplatten pipettiert. WST Versuche wurden zu den Zeitpunkten 12h, 36h, 60h bestimmt.

Plattenlayout

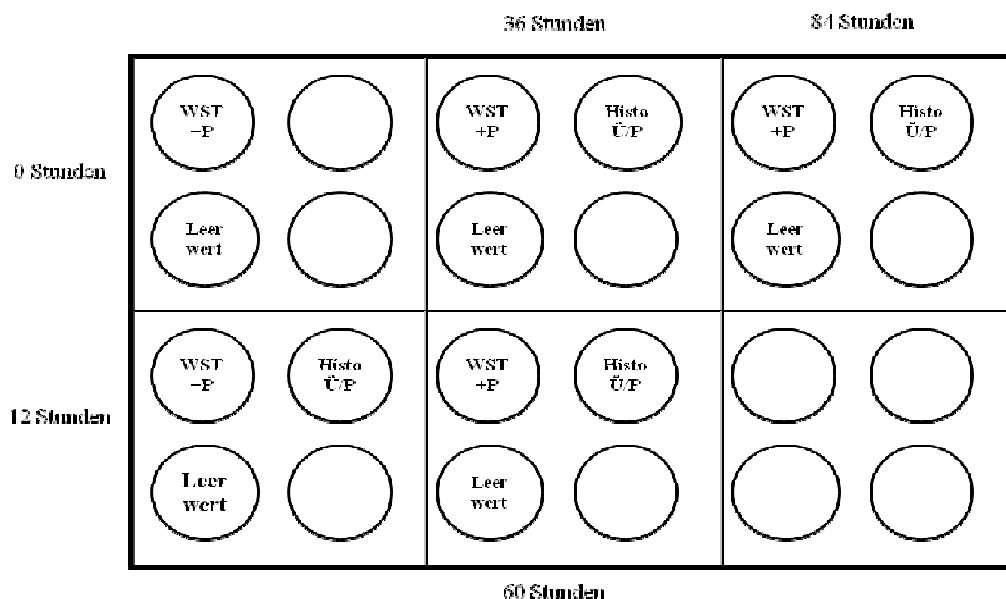


Abbildung AI.1: Plattenlayout AI, (Ü):Well aus dem Überstand entnommen wurde (P): Polymer. (WST): Well in dem der WST-1 Umsatztest durchgeführt wurde. (HISTO): Well aus dem das Polymer zur Histologie entnommen wurde. (LEERWERT): Dient als Leerwert des WST-1 Tests. Wells mit Polymer ohne Zellen.

5.2.1.1. Überstandsmessungen

Um Vitalität und Stoffwechselaktivität der Hepatozyten in 2D und 3D Zellkultur zu überprüfen, wurde zu den oben genannten Zeitpunkten der Überstand entnommen und mittels WST-1 Umsatz Test und ELISA Albumin Test der Vitalitätsverlauf sowie die Syntheseleistung der Hepatozyten kontrolliert. Im Folgenden sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen tabellarisch aufgetragen.

Tabelle AI.1. WST-1 Umsatz Solid Sugar AI und 1,0E+05 Zellen in 2D Kultur

Zeitpunkte [h]	Umsatz [Absorption bei 450nm]					
	Polymer AI			1,0E+05 Zellen AI		
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert
0	0,620	0,537	0,579			
12	0,371	0,379	0,375	0,509	0,447	0,478
36	0,174	0,192	0,183	0,185	0,181	0,183
60	0,268	0,295	0,282	0,133	0,146	0,140
84	0,087	0,116	0,102			

Diagramm AI.1: Graphische Darstellung WST-1 Umsatz, Polymer AI im Vergleich zur 2D Kultur (1,0E+05 Zellen).

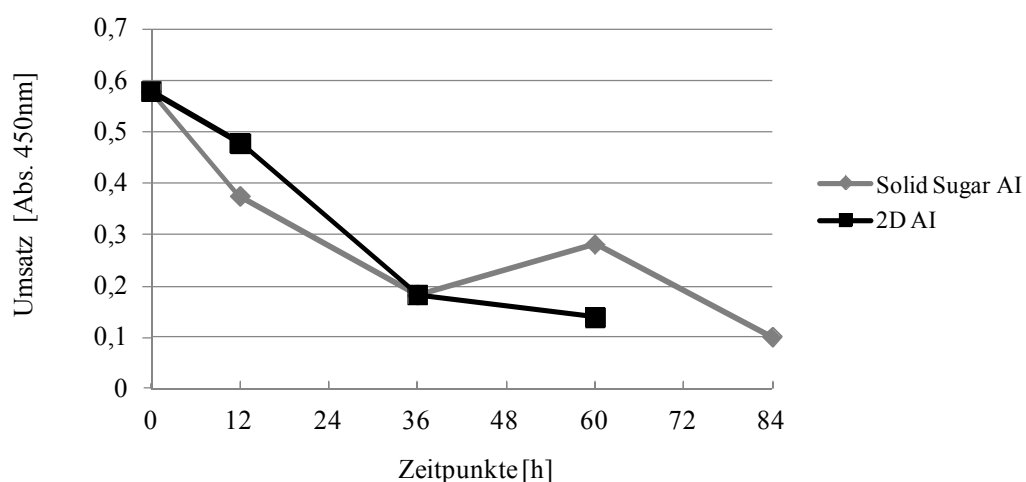
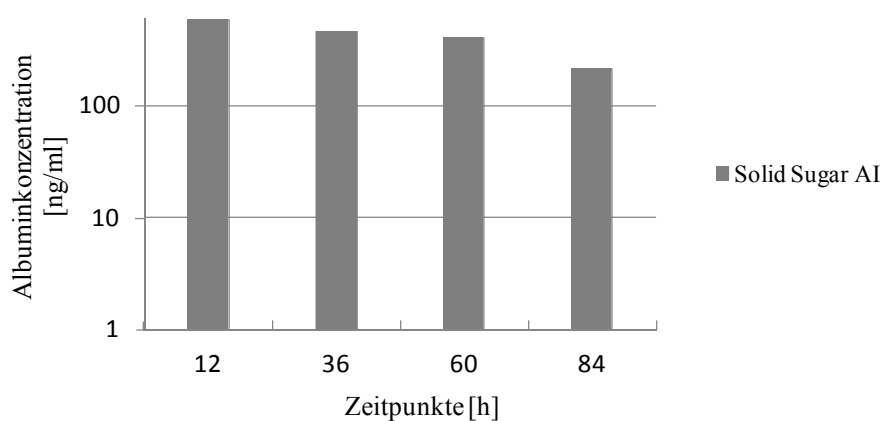


Tabelle AI.2. Messung der Albuminkonzentration im Überstand der 3D Kultur AI

Zeitpunkte [h]	Polymer AI			
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert	Konzentration [ng/ml]
12	1,016	0,859	0,938	584,037
36	0,933	0,902	0,918	465,157
60	0,993	0,890	0,942	401,744
84	0,950	0,979	0,965	214,896

Diagramm AI.2: Graphische Darstellung der Albuminproduktion in 3D Kultur



Die WST Messung zeigt bis zum Zeitpunkt 36h in 2D sowie 3D Kultur einen relativ identischen Verlauf. In der 3D Kultur sieht man vom Zeitpunkt 36h zum Zeitpunkt 60h eine WST Umsatzvermehrung, während der Umsatz der 2D Kultur stetig fällt (vgl. Diagramm AI.1). Die Albuminproduktion der 3D Kultur war über die Dauer von 84h stetig vorhanden. Die Albuminmenge sinkt vom Beginn der Kultur bis zum Ende um den Faktor 2,71 (vgl. Tabelle und Diagramm AI.2).

5.2.1.2. Histologie

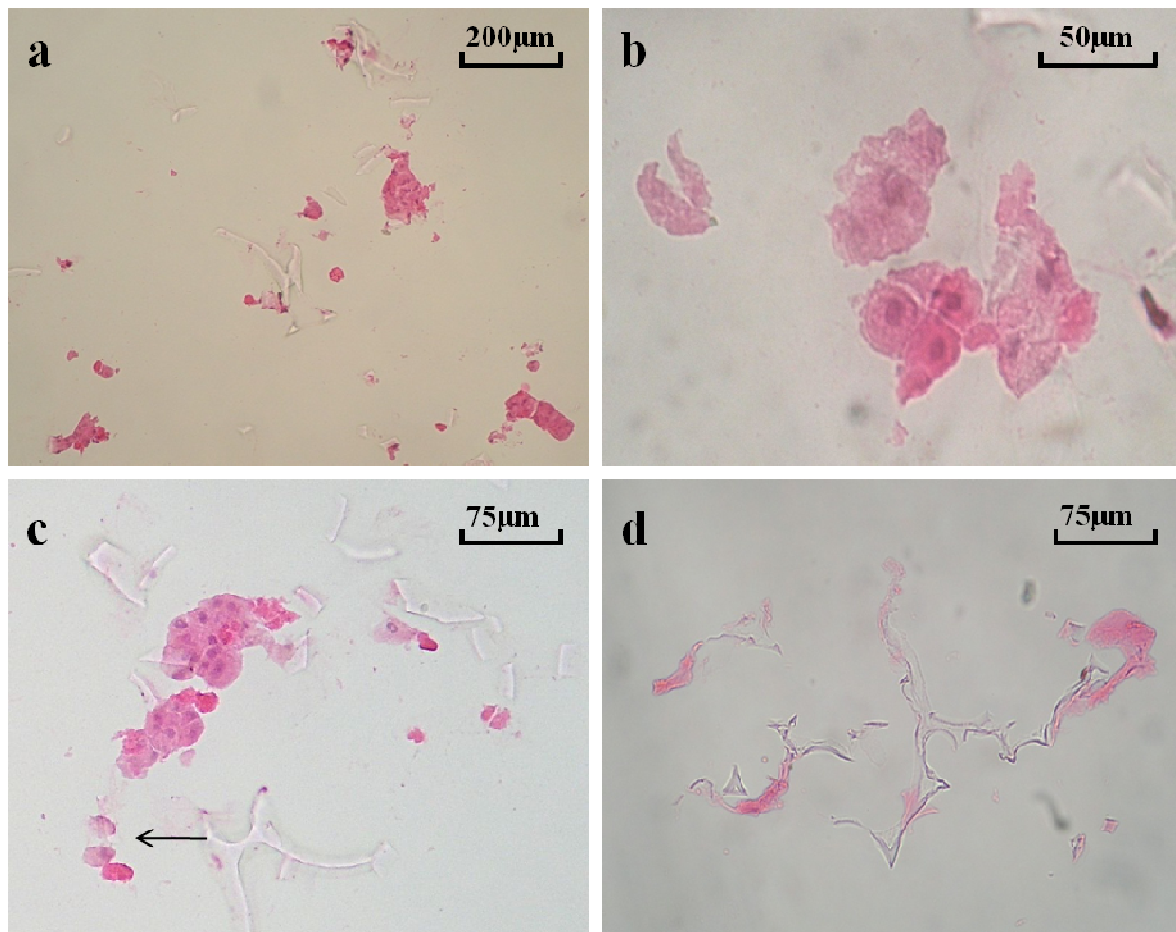


Abbildung AI.2: Kryoschnittpräparat der Solid Sugar Polymere AI, HE-Färbung, Schichtdicke 18µm. Vitale Zellkerne durch Hämalalaun violett gefärbt, Eosin färbt Zytoplasma pink **a)** 12h Zellkultur. Erkennbar sind vereinzelt versprengte Hepatozyten **b)** 12h Zellkultur. Vitale Zellen in kleiner Gruppenformierung **c)** 60h Zellkultur. Vitale Zellen im Gruppenverband, genauere Zellgrenzen sind nicht abzugrenzen **d)** 84h Zellkultur. leere Polymerstrukturen teils mit Eosin gefärbt.

Die Histologie zum Abbruchzeitpunkt 12h zeigt eine geringe Zellverteilung der Hepatozyten im Polymer (Abbildung AI.2.a). Nur Polymerbruchstücke sind erkennbar, die keine Aussage über die morphologische Verteilung der Hepatozyten im und am Polymer zulassen. Eine Tendenz der Zellen sich zu Zellverbänden zu formieren, ist erkennbar. Anfänglich zum Zeitpunkt 12h sind die Zellmembranen noch abzugrenzen (Abbildung AI.2.b.). Zum Zeitpunkt 60h zeigt sich ein heterogenes Bild aus Zellen, die miteinander Verschmolzen sind (Abbildung AI.2.c) und toten Zellen ohne Zellkern (Pfeil). Bei den verschmolzenen Zellen ist eine gesamte intakte Zellmembran zu erkennen, die einzelnen Zellgrenzen sind nicht auszumachen. Zellen ohne Hämalalaun Färbung liegen einzeln vor, deren Zellgrenzen sind klar abzugrenzen, es gibt keine Adhärenzen zu anderen Zellen oder Polymerstrukturen. Am Abbruchtag 84h ist eine leere Polymerstruktur zu erkennen. Es finden sich in der gesamten Histologie nur sehr vereinzelt Zellen.

5.2.2. Versuch AII

Ziel: Etablierung der Zentrifugationsmethode zur höheren Besiedlungseffizienz.

Da Zellverteilung und Zellzahlen in Polymeren in Vorversuchen (vgl. AI) sehr gering ausfielen, sollte die Besiedlungseffizienz modifiziert und damit erhöht werden. Es wurden 3 Polymere verwendet. Zur Hydrophilierung wurden die Polymere 30min in Aqua dest. im Vakuum behandelt. Die Polymere wurden mittels Zentrifugationsbesiedlung besiedelt. Zur Beurteilung der Vitalität und Verteilung der Zellen im Polymer nach Zentrifugation wurden HE-Färbungen angefertigt.

5.2.2.1. Histologie

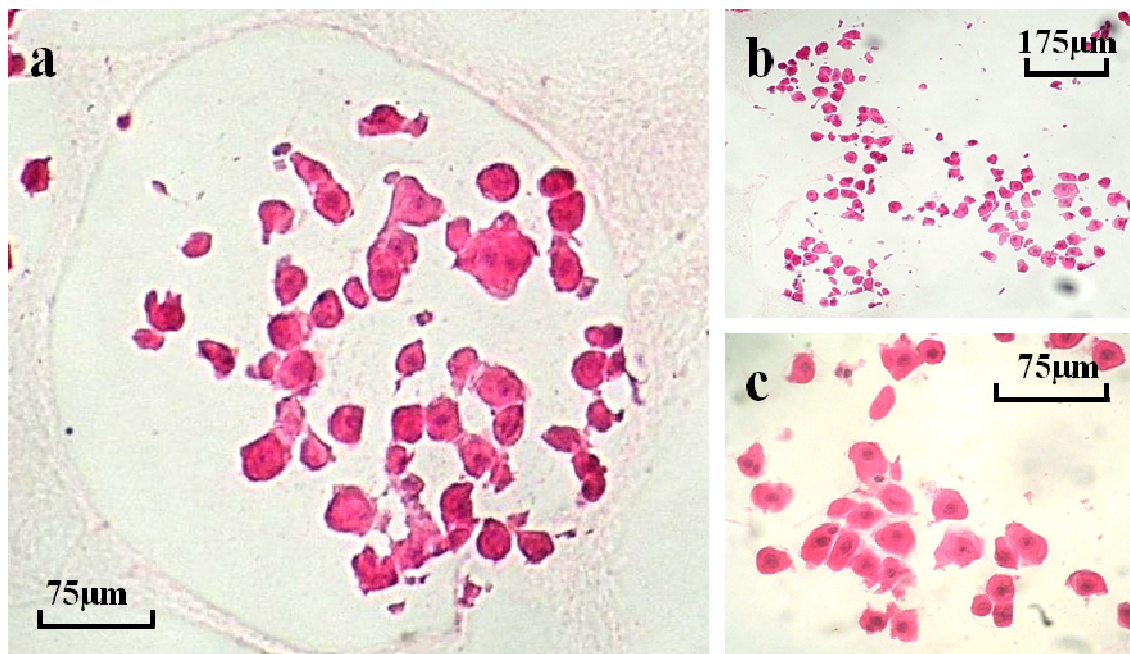


Abbildung AII.2: Kryoschnittpräparat der Solid Sugar Polymere nach Zentrifugationsbesiedlung, HE-Färbung, Schichtdicke 18µm **a)** Vitale Hepatozyten in Polymerpore. Die Zellkerne sind violett gefärbt. Polymerpore im Hintergrund leicht angefärbt. **b)** Zahlreiche Hepatozyten, die sich der Porenformation des Polymers anpassen. **c)** Hepatozyten im Polymer. Die Zellkerne sind gut zu erkennen, was für Vitalität der Hepatozyten spricht. Diploide Zellkerne kommen vor. Die Zellmembranen sind gut zueinander abgrenzbar.

In der Histologie erkennt man mit Hepatozyten gut gefüllte Polymerporen (Abbildung AII.2.a). Die Hepatozyten formieren sich zu einzelnen Gruppenverbänden innerhalb der Polymerporen. Interaktionen mit den Polymerstrukturen sind nicht zu erkennen. In der Vergrößerung kann man die Zellkerne mit Nukleoli erkennen, das Zytoplasma färbt sich eosinophil, die Zellmembranen scheinen intakt, was alles auf vitale Hepatozyten hinweist (Abbildung AII.2c).

5.2.3. Versuch AIII:

Ziel: Charakterisierung der 3D Kultur nach Hydrophilierung des Polymers und Zentrifugationsbesiedlung.

Es wurden 9 Polymere verwendet. Die Polymere wurden zur Hydrophilierung 30min im Vakuum in Aqua dest. behandelt. Der Versuch wurde für 132 Stunden ausgelegt. Die Zeitpunkte der Abbrüche für Histologie, DNA sowie WST-1 Test waren 12 Stunden, 60 Stunden und 132 Stunden. Überstände zur Albumin und LDH Messung wurden zu den Zeitpunkten [Stunden] 12, 36, 60, 84, 108 und 132 entnommen. Die Überstände wurden den Wells mit Kennzeichnung (Ü) entnommen. Die Zellvitalität nach Isolation betrug 66%. Die Polymere wurden mittels Zentrifugation besiedelt

Plattenlayout

12 Stunden		60 Stunden		132 Stunden	
WST +P	Histo Ü/P	WST +P	Histo Ü/P	WST +P	Histo Ü/P
Leer wert	DNA P	Leer wert	DNA P	Leer wert	DNA P

Abbildung AIII.1: Plattenlayout des Versuchs AIII. (Ü): Überstandsgewinnung. (P): Polymer. (WST): Well in dem der WST-1 Umsatztest durchgeführt wurde. (HISTO): Well aus dem das Polymer zur Histologie entnommen wurde. (LEERWERT): Dient als Leerwert des WST-1 Tests. Wells mit Polymer ohne Zellen. (DNA): Polymer zur DNA Isolierung

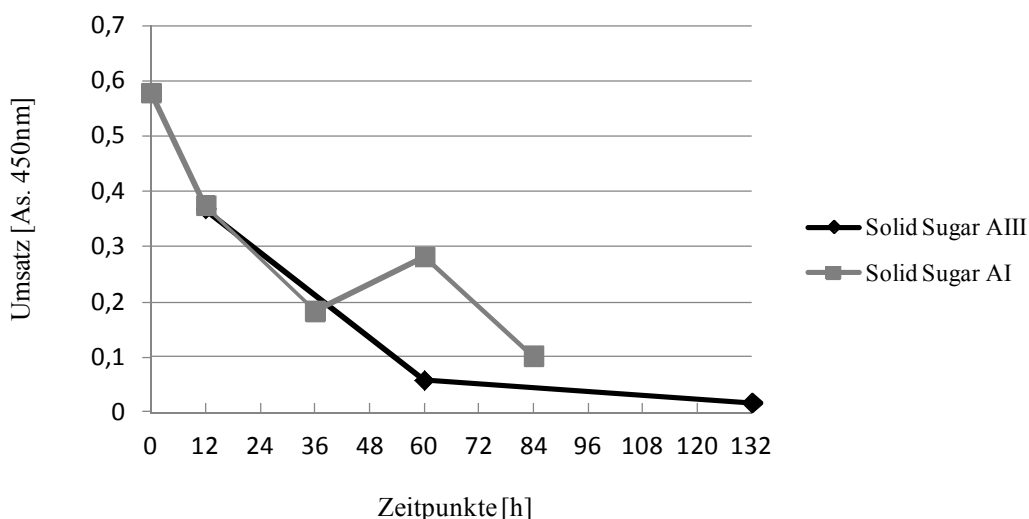
5.2.3.1. Überstandsmessungen

Um Vitalität und Stoffwechselaktivität der Hepatozyten zu überprüfen, wurden zu oben genannten Zeitpunkten Überstände entnommen und mittels WST-1 Umsatz Test und ELISA Albumin Test der Vitalitätsverlauf sowie die Syntheseleistung der Hepatozyten kontrolliert. Im Folgenden sind die gemittelten Messwerte tabellarisch aufgetragen.

Tabelle AIII.1. WST-1 Umsatz Solid Sugar AIII. Aufgetragen sind 4 Messwerte pro Well, und der daraus errechnete Mittelwert.

Zeitpunkte [h]	Umsatz [Absorption bei 450nm]				
	Polymer AIII				
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Mittelwert
12	0,337	0,347	0,413	0,376	0,368
60	0,052	0,058	0,058	0,063	0,058
132	0,014	0,014	0,019	0,021	0,017

Diagramm AIII.1: Graphische Darstellung WST-1 Umsatz Solid Sugar AI (vgl. Tabelle AI.1) und AIII im Vergleich.

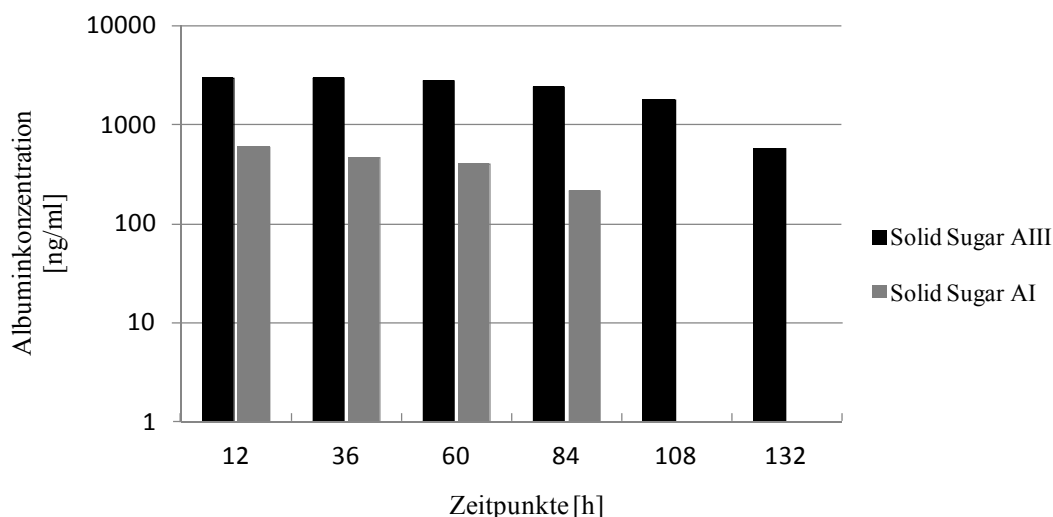


Der WST-1 Umsatz im Vergleich zu den Versuchen AI und AIII zeigt zum Zeitpunkt 12h identische Umsatzwerte (AI: 0,375 vs AIII: 0,36875). AIII zeigt im gesamten Verlauf der Zellkultur einen stetig abnehmenden Verlauf. Ein massiver Abfall zeigt sich zwischen den Zeitpunkten 12h (0,36825) und 60h (0,05775). Zum Zeitpunkt 132h sind bei AIII keine nennenswerten WST-1 Umsätze messbar (0,017).

Tabelle AIII.2. Messung Albuminkonzentration Solid Sugar AIII im Überstand. Konzentrationen bestimmt durch Interpolation der Standardkurve (siehe Methoden).

Zeitpunkte [h]	Polymer AIII			
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert	Konzentrationen [ng/ml]
12	1,454	1,449	1,452	2946,57
36	1,415	1,496	1,456	2902,02
60	1,394	1,419	1,407	2726,16
84	1,304	1,350	1,327	2383,07
108	1,156	1,127	1,142	1749,90
132	0,536	0,543	0,540	570,87

Diagramm AIII.2: Graphische Darstellung der Albuminproduktion. Vergleich Solid Sugar AI (Tabelle AI.2) mit AIII.



Bei beiden Versuchen (AI/AIII) ist über die gesamte Dauer der Zellkultur eine Albuminsynthese der Hepatozyten messbar. Zum Zeitpunkt 12h ist die Albuminkonzentration in AIII (2946,57 ng/ml) 5-fach höher als in AI (584,037 ng/ml). Im Verlauf der gesamten Kulturdauer in AIII, vom Zeitpunkt 12h (2946,57ng/ml) bis zum Zeitpunkt 132h (570,87ng/ml) sinkt die Albuminkonzentration um das 5-Fache, während im Verlauf in AI (12 Stunden bis 84 Stunden) sich die Albuminsynthese um den Faktor 2,7 verringert (12h: 584,037ng/ml -> 84h: 214,896ng/ml). Vergleicht man AI und AIII im selben Zeitfenster (12h bis 84h) beträgt der Faktor in AIII 1,2 und in AI 2,7.

$$F_{AI(84h)}: 2,7 > F_{AIII(84h)}: 1,2.$$

Zusammenfassend sind die absoluten Albuminkonzentrationen in AIII konstant höher als in AI. Im Zeitfenster 12h bis 84h ist der Quotient des Verlustes an Albumin in AI > AIII.

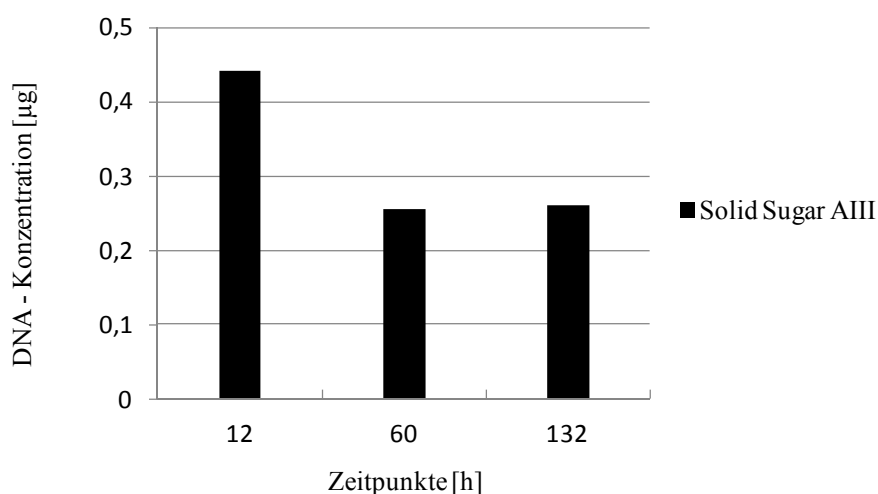
5.2.3.2. DNA

Um die Effizienz der Zentrifugationsbesiedlung sowie des Kulturverlaufs zu beurteilen, wurden die DNA Konzentrationen pro Polymer gemessen. Mittels DNA Eichkurve können die Zellzahlen im Polymer errechnet werden. Im Folgenden sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aufgetragen. Gesamtkonzentrationen und Zellzahlen pro Polymer wurden errechnet.

Tabelle AIII.3: DNA Konzentration [μg] pro Zeitpunkt im Solid Sugar AIII. Konzentrationen [$\text{ng}/\mu\text{l}$] eluiert in $250\mu\text{l}$ Aqua dest.

Zeitpunkte [h]	Konzentration [$\text{ng}/\mu\text{l}$]		
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert
12	1,780	1,750	1,765
60	1,000	1,040	1,020
132	1,030	1,060	1,045
	Konzentration Gesamt [μg]		
	12	0,441	
60	0,255		
132	0,261		

Diagramm AIII.3: Graphische Darstellung der DNA Konzentration [μg] pro Polymer pro Zeitpunkt [h]



Die DNA Konzentration im Versuch AIII sinkt vom Zeitpunkt 12h (0,441 μ g) zum Zeitpunkt 132h (0,261 μ g) um den Faktor 1,689. Die gemessenen DNA Konzentrationen entsprechen ungefähren Zellzahl von:

Zeitpunkt [h]	Zellzahl/Polymer
12	6300
60	3600
132	3700

5.2.3.3. Histologie

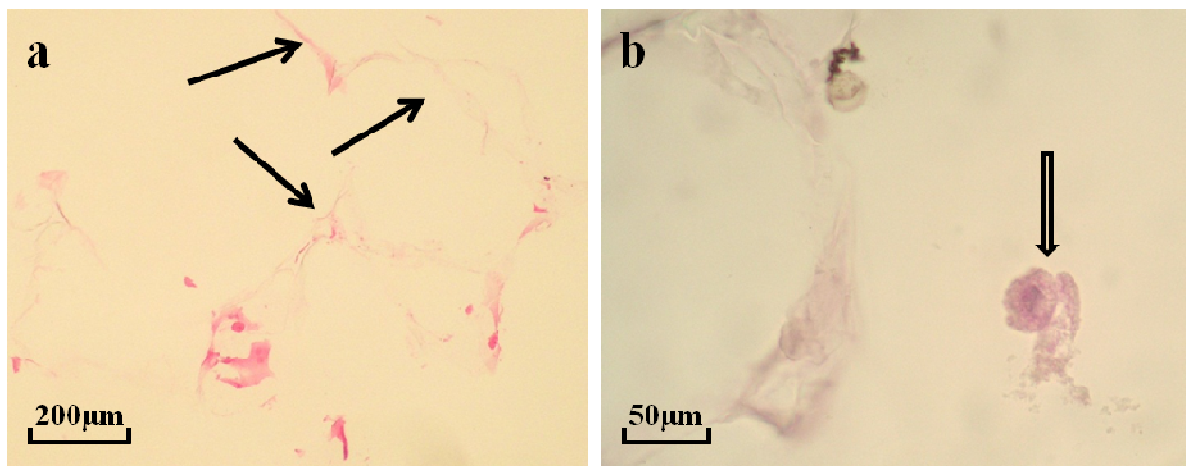


Abbildung AIII.2: a) Kryoschnittpräparat der Solid Sugar Polymere nach Zentrifugationsbesiedlung. HE-Färbung. Schichtdicke 18 μ m. Leere Polymerporen nach 12 Stunden Kulturdauer. Die Polymerporen sind zu erkennen (Pfeile). Vereinzelt finden sich Hepatozyten, die keine Gruppierungen bilden. b) PAS Färbung. Schichtdicke 18 μ m. Einzelner glykogenpositiver Hepatozyt (Hohlpfeil). Der Zellkern ist gut abgrenzbar.

In der Histologie zum Zeitpunkt 12h sieht man leere Polymerstrukturen mit vereinzelt Hepatozyten, die keine Formierung am Polymer oder Gruppierungen untereinander eingehen. Auch an den weiteren Zeitpunkten sind kaum Hepatozyten zu erkennen. Vereinzelte PAS positive Zellen zum Zeitpunkt 132h sind vorhanden.

5.2.4. Versuch AIV

Ziel: Optimierte Hydrophilierung des Solid Sugar Polymers zur Verbesserung der Kulturbedingungen. Das Polymer wurde im Vakuum in absteigender Alkoholreihe (ET-OH 100%, 50%, Aqua dest.) behandelt (vgl. Methoden). 9 Polymere wurden verwendet. Die Zeitpunkte der Abbrüche und Überstandsmessungen sowie das Plattenlayout gleichen denen in Versuch AIII. Die Zellvitalität nach Isolation betrug 87%. 2,0E+05 Hepatozyten auf kollagenbeschichteter Zellkulturplatten (2D) wurden mitgezogen.

5.2.4.1. Überstandsmessungen

Tabelle AIV.1: WST-1 Umsatz Test. Vergleich Solid Sugar Polymer AIV mit 2,0E+05 Hepatozyten in 2D Kultur. Pro Well wurden Mittelwerte aus 4 Messwerten bestimmt.

Zeitpunkte [h]	Umsatz [Absorption bei 450nm]				
	<i>Polymer AIV</i>				
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	<i>Mittelwert</i>
12	0,248	0,240	0,243	0,252	0,246
60	0,214	0,218	0,214	0,202	0,212
132	-0,019	-0,013	-0,012	-0,017	-0,015
	<i>2,0E+05 Zellen AIV</i>				
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	<i>Mittelwert</i>
12	1,899	1,921	1,924	1,946	1,923
60	1,702	1,711	1,541	1,501	1,614
132	1,798	1,794	1,808	1,760	1,790

Diagramm AIV.1: Graphische Darstellung WST-1 Umsatz. Vergleich Solid Sugar Polymer AI, AIII AIV und 2D Kultur AIV.

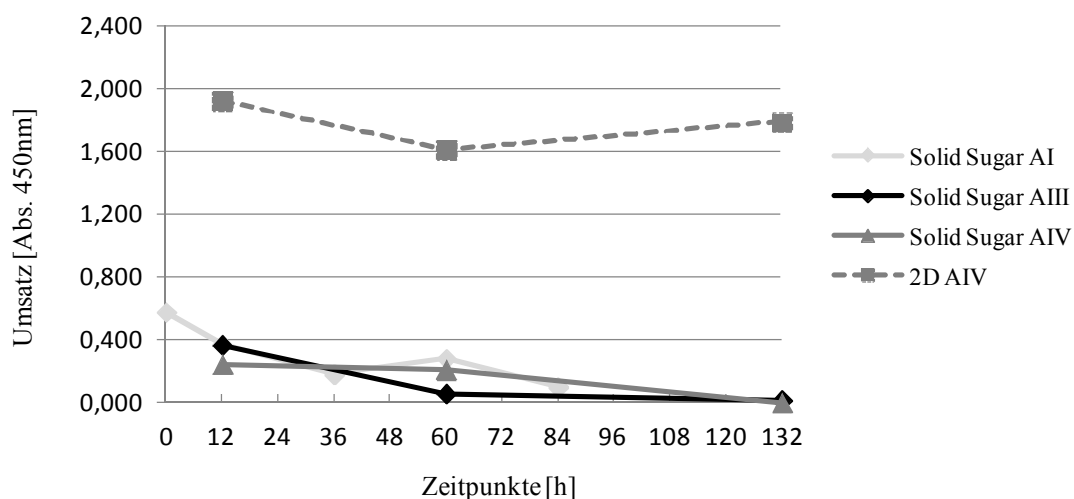
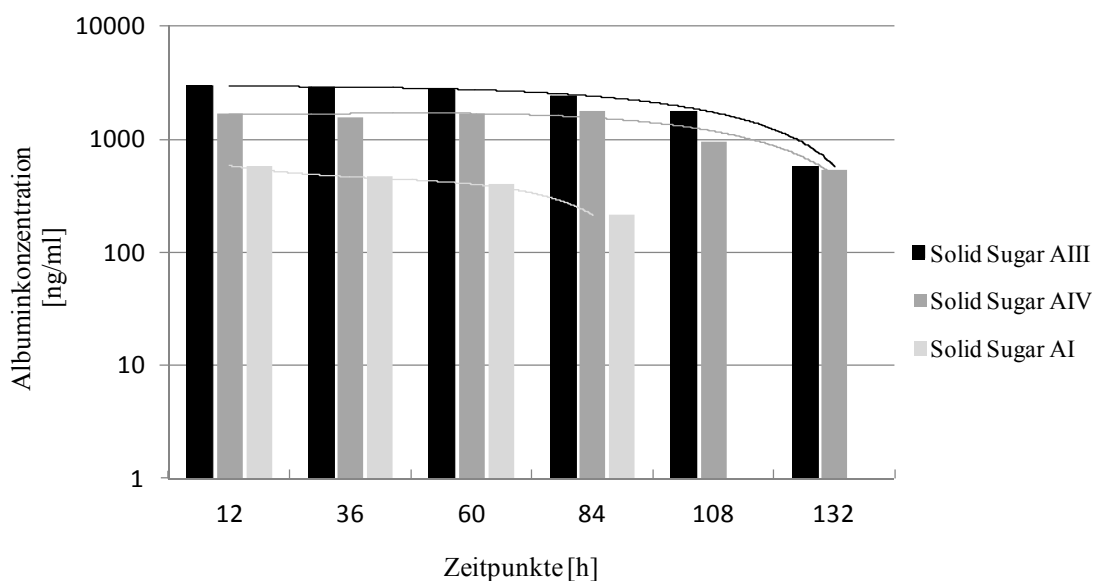


Tabelle AIV.2: Albuminkonzentration [ng/ml] im Überstand. Solid Sugar AIV und 2,0E+05 Hepatozyten in 2D Kultur.

Zeitpunkte [h]	Polymer AIV			
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert	Konzentration [ng/ml]
12	1,016	0,859	0,938	1687,24
36	0,933	0,902	0,918	1578,84
60	0,993	0,890	0,942	1683,45
84	0,950	0,979	0,965	1763,01
108	0,684	0,721	0,703	961,98
132	0,508	0,460	0,484	540,66
	2,0E+05 Zellen			
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert	Konzentration [ng/ml]
12	1,247	1,285	1,266	4231,29
36	1,211	1,323	1,267	4421,46
60	1,343	1,354	1,349	6153,12
84	1,060	0,993	1,027	2058,15
108	1,253	1,205	1,229	3696,04
132	1,008	0,919	0,964	1769,91

Diagramm AIV.2: Graphische Darstellung der Albuminkonzentration [ng/ml] im Überstand. Vergleich der Polymere AI, AIII und AIV. Mit dargestellt sind die polynomischen Trendlinien der einzelnen Versuche AI, AIII und AIV



In allen 3D Kulturen der Versuche AI-AIV im 24-Well Format ist über den gesamten Kulturverlauf Albumin nachweisbar. Die Faktoren der Abnahme der Albuminkonzentrationen bis zum Zeitpunkt 84h betragen aufsteigend: $F_{AIV} 0,96 < F_{AIII} 1,2 < F_{AI} 2,71$.

Die Faktoren der Konzentrationsabnahme bis zur Kulturdauer 132h betragen:

$$F_{AIV} 3,12 < F_{AIII} 5,04.$$

Hieraus ist ersichtlich, dass in Versuch AIV die konstanteste Albuminsynthese über den gesamten Kulturverlauf vorhanden ist. Die Albuminkonzentrationen der 2D Kultur (AIV) mit $2,0E+05$ Zellen liegen oberhalb des Sättigungsbereiches, daher können genaue Konzentrationen nicht errechnet und aufgezeigt werden. Vergleicht man die Trendlinien so ist zu sehen, dass der höchste Verlust der Albuminkonzentrationen der Versuche AIII und AIV vor allem zwischen 108 und 132h erfolgt. Im Versuch AI ist der Syntheseverlust schon zwischen 60h und 84h zu sehen. Zusammenfassend sind die absoluten Albuminkonzentrationen in Versuch AIII am höchsten. Jedoch ist der Verlust der Albuminsyntheseleistung der Hepatozyten im Versuch AIV am geringsten, was für die konstanteste Albuminsynthese spricht.

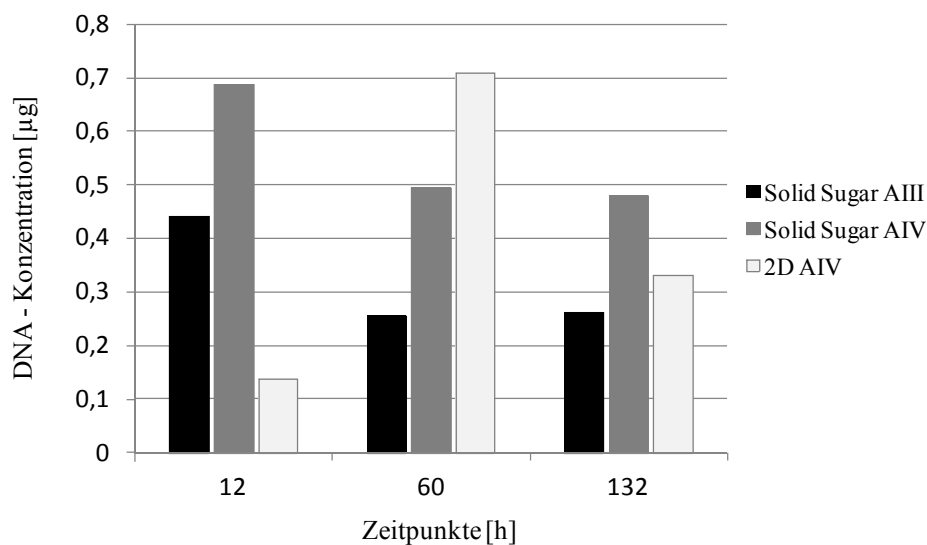
Vergleicht man die Ergebnisse des WST-1 Umsatzes der 3D mit denen der 2D Kultur gibt es erhebliche Unterschiede. Während in allen 3D Kulturen der WST-1 Umsatz im unteren Bereich liegt (<1), sind die Umsätze in der 2D Kultur zu allen Zeitpunkten $>1,5$.

5.2.4.2. DNA

Tabelle AIV.3: DNA Konzentration im Solid Sugar AIV und in 2D Kultur mit 2,0E+05 Zellen. Konzentrationen[$\mu\text{g}/\text{ml}$] eluiert in 300 μl Aqua dest.

Zeitpunkte [h]	Konzentration [ng/ μl]					
	Polymer AIV			2,0E+05 Zellen AIV		
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert
12	2,480	2,100	2,290	0,442	0,470	0,456
60	1,700	1,590	1,645	2,270	2,460	2,365
132	1,440	1,760	1,600	1,160	1,040	1,100
	Konzentration Gesamt [μg]					
	Polymer AIV			2,0E+05 Zellen AIV		
12	0,687			0,137		
60	0,494			0,710		
132	0,480			0,330		

Diagramm AIV. 3: Graphische Darstellung der Gesamtkonzentration der DNA [μg] im Solid Sugar AIII, AIV und in 2D Kultur AIV



Die gemessenen DNA Konzentrationen entsprechen ungefähren Zellzahlen von:

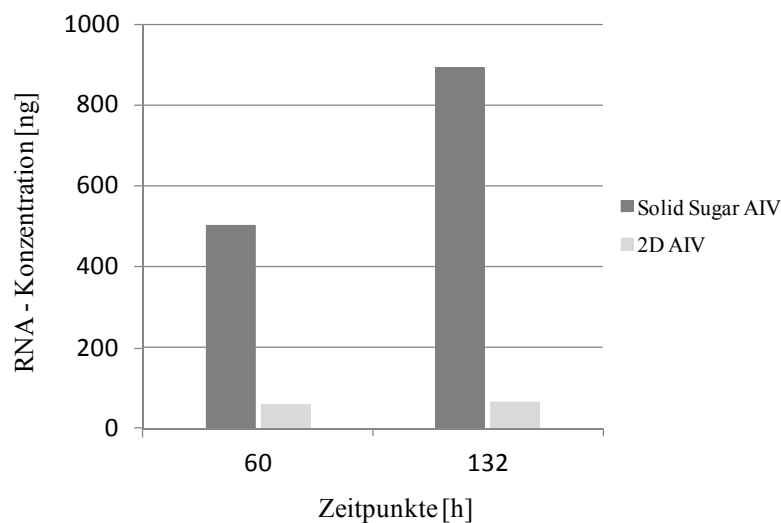
	Solid Sugar AIV	2D AIV
12h	9800	2000
60h	7000	10000
132h	6900	4700

5.2.4.3. RNA

Tabelle AIV.4: RNA Konzentration im Solid Sugar AIV und in 2D Kultur mit 2,0E+05 Zellen. Konzentrationen[ng/μl] eluiert in 30μl Aqua dest.

Zeitpunkte [h]	Konzentration [ng/μl]					
	Polymer AIV			2,0E+05 Zellen AIV		
	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert	Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert
60	16,7	16,7	16,7	2	2	2
132	29	30,3	29,65	2,3	2	2,15
	Konzentration Gesamt [ng]					
	Polymer AIV			2,0E+05 Zellen AIV		
60	501			60		
132	889,5			64,5		

Diagramm AIV.4: Graphische Darstellung der Gesamtkonzentration der RNA [ng] im Polymer Solid Sugar AIV und in 2D Kultur AIV mit 2,0E+05 Zellen.



RNA ist über den kompletten Zeitraum der Zellkultur messbar. Die RNA Konzentrationen [ng] im Solid Sugar AIV sind zum Zeitpunkt 60h um den Faktor 8,35 und zum Zeitpunkt 132h um den Faktor 13,79 höher als in der 2D Kultur AIV. Zum Zeitpunkt 60h und 132h ist in der 3D Kultur ausreichend RNA Material zur Umschreibung in cDNA vorhanden. Aus der RNA Isolierung der 2D Kultur ist wegen zu geringer Konzentrationen keine Umschreibung in cDNA möglich. Da unsere Studie auf Zellkulturen im 96-Well Format ausgelegt ist und die Zellkulturen im 24-Well Format der Charakterisierung und Optimierung des Polymers dienen, wurden keine weiteren cDNA und rtPCR Analysen des Versuchs AIV durchgeführt.

5.2.4.4. Histologie

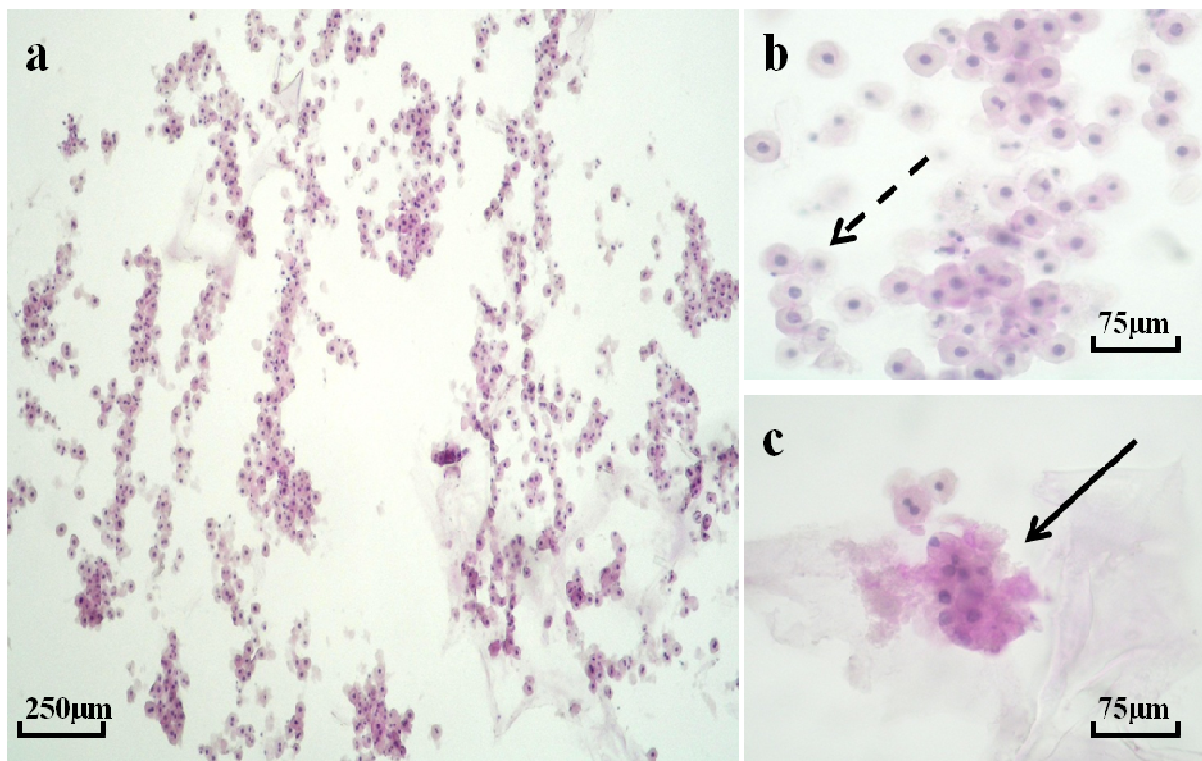


Abbildung AIV.2: Kryoschnittpräparat der Solid Sugar Polymere nach Zentrifugationsbesiedlung. 132 Stunden Kulturdauer. PAS Färbung. Schichtdicke 18µm. **a)** Übersicht über Hepatozyten in Polymerporen nach 132 Stunden Kultur. **b)** Gruppierte Hepatozyten mit negativer Glykogenspeicherung. (gestrichelter Pfeil) Zellgrenzen klar erkennbar. **c)** Glykogen positive Hepatozyten (Pfeil). Die Zellgrenzen sind nicht klar abzugrenzen. Die Zellmembranen sind verschmolzen.

Nach 132 Stunden Kulturdauer erkennt man Hepatozyten besiedelte Polymerstrukturen (vgl. Abbildung AIV.2a). Die Zellkerne sind klar zu erkennen. Es zeigt sich ein heterogenes Verteilungsmuster der Hepatozyten. Teils erkennt man Zellen in einzelnen Gruppenverbänden, deren Zellgrenzen klar voneinander abgrenzbar sind. Teils sind Zellen erkennbar, deren Zellmembranen miteinander verschmelzen und Spheroide bilden. Ebenfalls die PAS Färbung zeigt ein Mischbild aus Glykogen positiven und negativen Zellen. Hepatozyten, die Spheroide ausbilden, sind auch nach 132h Zellkultur Glykogen positiv (vgl. Abbildung AIV.2.c). Zellen, die in kleinen Gruppenverbänden vorliegen, deren Zellgrenzen nicht miteinander verschmelzen, sind eher Glykogen negativ (vgl. Abbildung AIV.2.b, Pfeil).

5.3. TEIL B: Durchführung der statischen Hepatozytenkultur im 96-Well Format

5.3.1. Versuch BI/II

Versuch BI/II wurde in 96-Well Kulturplatten durchgeführt. Dem Zellkulturmedium wurden 10 µg TPO und 10 µg rec. Hepatocyte Growth Factor (human) hinzugegeben (Vergleiche Methoden). Insgesamt wurden 40 Polymere verwendet. 2 Isolationen wurden durchgeführt, pro Isolation wurden 20 Polymere besiedelt.

1. Isolation (BI): 10 Polymere 2mm Höhe (BI/1) und 10 Polymere 3mm Höhe (BI/2).

2. Isolation (BII): 10 Polymere 2mm Höhe (BII/1) und 10 Polymere 3mm Höhe (BII/2).

20 Polymere mit 2mm Höhe und 20 Polymere mit 3mm Höhe wurden gegenübergestellt. Die Ergebnisse beider Isolationen wurden zusammengefasst (VBI/II). Alle Polymere wurden wie in AIV hydrophiliert. Die Kulturdauer wurde für 7 Tage angesetzt, die Zeitpunkte der Abbrüche für Histologie, Immunfluoreszenz, DNA und RNA waren Tag 1 und Tag 7. Überstandsmessungen (LDH, Albumin) wurden zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 7 durchgeführt, Überstände wurden den „DNA-Wells“ entnommen. Die Zellvitalität nach Isolation 1 betrug 91%, nach Isolation 2 80%. Die Polymere wurden mittels Zentrifugationsmethode besiedelt.

Plattenlayout

	1	2		11	12
A	DNA	DNA		DNA	DNA
B	HISTO	HISTO		HISTO	HISTO
C	RNA	BI/1		RNA	

G	TAG 1			TAG 7	
H					

	1	2		11	12
A	DNA	DNA		DNA	DNA
B	HISTO	HISTO		HISTO	HISTO
C	RNA	BII/1		RNA	

G	TAG 1			TAG 7	
H					

	1	2		11	12
A	DNA	DNA		DNA	DNA
B	HISTO	HISTO		HISTO	HISTO
C	RNA	BI/2		RNA	

G	TAG 1			TAG 7	
H					

	1	2		11	12
A	DNA	DNA		DNA	DNA
B	HISTO	HISTO		HISTO	HISTO
C	RNA	BII/2		RNA	

G	TAG 1			TAG 7	
H					

Abbildung BI/II.1: Plattenlayouts des Versuches BI/II

Aus Sterilitätsgründen wurden insgesamt vier 96-Well Platten mit gleichem Design verwendet. Die Platten wurden mit BI/1, I/2, II/1 und II/2 bezeichnet. Versuch BI wurde mit Hepatozyten aus Isolation 1 und Versuch BII mit Hepatozyten aus Isolation 2 besiedelt. BI/II.1 wurden mit Solid Sugar 2mm und BI/II.2 mit Solid Sugar 3mm kultiviert. Die Polymere der Spalten 1 und 2 wurden am Tag 1 abgebrochen. Die Polymere der Spalten 11 und 12 an Tag 7 (vgl. Abbildung BI/II.1)

5.3.1.1. Überstandsmessungen

Tabelle BI/II.1: Albuminkonzentration im Überstand. Vergleich Solid Sugar 2mm (BI/II.1) mit Solid Sugar 3mm (BI/II.2). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen der gemessenen Konzentrationen [ng/ml] pro Zeitpunkt [Tage] pro Polymer. Pro Zeiteinheit wurde aus den Mittelwerten der Median errechnet.

		Zeitpunkte [d]			
<i>Polymere 2mm</i>	Einheit	1	3	5	7
<i>BI/1 A1</i>	[ng/ml]	7473,30			
<i>BI/1 A2</i>	[ng/ml]	6611,80			
<i>BI/1 A11</i>	[ng/ml]	6434,10	3306,40	1044,70	441,82
<i>BI/1 A12</i>	[ng/ml]	6313,20	2698,10	1111,80	451,40
<i>BII/1 A1</i>	[ng/ml]	3713,20			
<i>BII/1 A2</i>	[ng/ml]	4161,40			
<i>BII/1 A11</i>	[ng/ml]	4225,00	589,47	244,93	164,63
<i>BII/1 A12</i>	[ng/ml]	4089,30	815,29	352,76	285,31
Median	[ng/ml]	5269,10	1756,70	698,73	363,57
<i>Polymere 3mm</i>					
<i>BI/2 A1</i>	[ng/ml]	7935,30			
<i>BI/2 A2</i>	[ng/ml]	8912,10			
<i>BI/2 A11</i>	[ng/ml]	8038,00	4465,70	2108,00	735,88
<i>BI/2 A12</i>	[ng/ml]	7542,00	3441,20	1585,30	551,84
<i>BII/2 A1</i>	[ng/ml]	4505,50			
<i>BII/2 A2</i>	[ng/ml]	3978,60			
<i>BII/2 A11</i>	[ng/ml]	5581,70	918,63	461,21	287,40
<i>BII/2 A12</i>	[ng/ml]	3849,80	865,37	647,68	289,16
Median	[ng/ml]	6561,85	2179,92	1116,49	420,50

Diagramm BI/II.1: Graphische Darstellung der Albuminkonzentration [ng/ml] im Überstand. Vergleich der Solid Sugar BI/II.1 (2mm) mit BI/II.2 (3mm). Säulen zeigen den Median der Konzentration [ng/ml] pro Zeiteinheit [Tage] mit positiven Standardabweichungen.

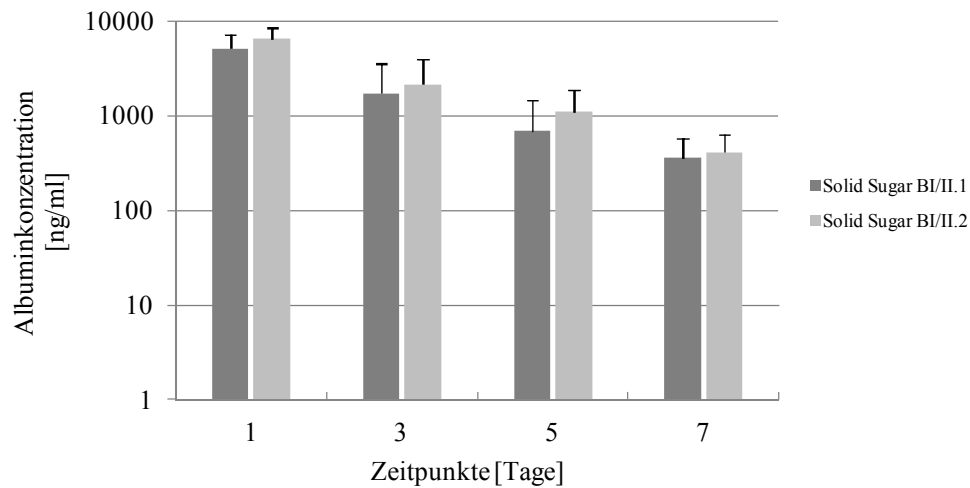
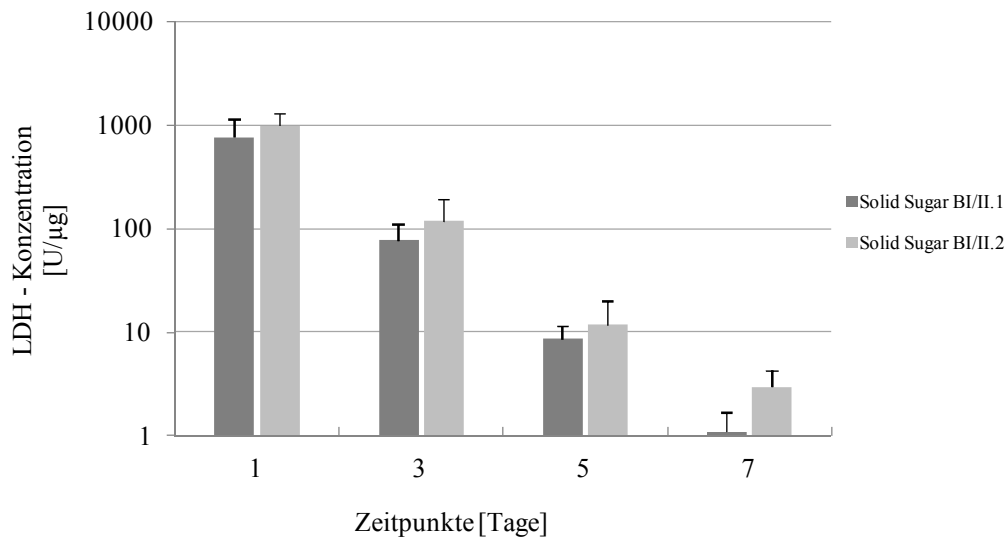


Tabelle BI/II.2: LDH Konzentration [U/μg] im Überstand. Vergleich Solid Sugar 2mm (BI/II.1) mit Solid Sugar 3mm (BI/II.2). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen der gemessenen Konzentrationen pro Zeitpunkt [Tage] pro Polymer. Pro Zeiteinheit wurde aus den Mittelwerten der Median errechnet.

		Zeitpunkte [d]			
Polymere 2mm	Einheit	1	3	5	7
BI/I A1	[U/μg]	1413,30			
BI/I A2	[U/μg]	858,96			
BI/I A11	[U/μg]	826,42	112,91	8,71	1,44
BI/I A12	[U/μg]	1019,20	100,92	8,68	1,98
BII/I A1	[U/μg]	686,97			
BII/I A2	[U/μg]	593,75			
BII/I A11	[U/μg]	494,40	43,92	6,67	0,77
BII/I A12	[U/μg]	694,80	54,10	13,40	0,76
Median	[U/μg]	760,61	77,49	8,69	1,10
Polymere 3mm					
BI/2 A1	[U/μg]	1057,40			
BI/2 A2	[U/μg]	918,140			
BI/2 A11	[U/μg]	1393,80	200,44	25,67	5,14
BI/2 A12	[U/μg]	1430,60	171,48	15,14	3,34
BII/2 A1	[U/μg]	1067,10			
BII/2 A2	[U/μg]	620,15			
BII/2 A11	[U/μg]	742,23	66,79	8,53	2,14
BII/2 A12	[U/μg]	635,82	50,59	6,88	2,62
Median	[U/μg]	987,77	119,13	11,84	2,98

Diagramm BI/II.2: Graphische Darstellung der LDH Konzentration [U/ μ g] im Überstand. Vergleich der Solid Sugar BI/II.1 (2mm) mit BI/II.2 (3mm). Säulen zeigen den Median der Konzentration [U/ μ g] pro Zeiteinheit [Tage] mit positiver Standardabweichung.



Albumin ist zu jedem Zeitpunkt der Zellkultur im 96-Well Format messbar. Initial hohe Albuminkonzentrationen (BI/II.1: $5269,10 \pm 2259,45$ ng/ml; BI/II.2: $6561,85 \pm 2042,01$ ng/ml) sinken im Verlauf der Zellkultur bei beiden Polymerdicken (2mm, 3mm) konstant. Zum Ende der Zellkultur an Tag 7 sind die Albuminkonzentrationen um eine Logstufe gefallen (BI/II.1: $363,52 \pm 137,18$ ng/ml; BI/II.2: $420,50 \pm 218,61$ ng/ml).

Auch LDH Konzentrationen waren über den gesamten Zellkulturverlauf messbar. An Tag 1 wurden bei beiden Polymerdicken (VBI/II.1/2) die höchsten Konzentrationen gemessen (VBI/II.1: $760,61 \pm 384,87$ U/ μ g; VBI/II.2: $987,77 \pm 315,34$ U/ μ g). Im Verlauf der Zellkultur nahmen die gemessenen Konzentrationen bei beiden Polymerdicken gleichmäßig um eine Logarithmusstufe pro gemessenem Zeitpunkt ab (vgl. Tabelle BI/II.2 und Diagramm BI/II.2). An Tag 7 waren mit ca. $1,1 \pm 0,59$ U/ μ g (VBI/II.1) und $2,98 \pm 1,32$ U/ μ g (VBI/II.2) fast keine LDH Konzentrationen im Überstand messbar. Im Vergleich beider Polymerdicken sind im 3mm Polymer (VBI/II.2) konstant höhere LDH Konzentrationen zu messen.

5.3.1.2. DNA

Tabelle BI/II.3: Quantitative Messung der DNA Konzentration. Aufgetragen sind die Mittelwerte der gemessenen Doppelbestimmungen. Die gemessenen Werte [ng/μl] wurden in 250μl eluiert. Die Gesamtkonzentration der DNA pro Polymer [μg] und Zeitpunkt [Tage] ist dargestellt.

	Zeitpunkte [d]					
	1			7		
Einheit		[ng/μl]	[μg]		[ng/μl]	[μg]
Polymere	2mm			2mm		
	BI/I A1	47,810	11,953	VB I/I A11	15,810	3,953
	BI/I A2	69,860	17,465	VB I/I A12	11,410	2,853
	BII/I A1	16,370	4,093	VB II/I A11	6,820	1,705
	BII/I A2	9,170	2,293	VB II/I A12	6,670	1,668
	Mittelwert	35,060	8,951	Mittelwert	10,178	2,544
	3mm			3mm		
	BI/2 A1	78,960	19,740	VB I/2 A11	6,360	1,590
	BI/2 A2	35,460	8,865	VB I/2 A12	6,560	1,640
	BII/2 A1	55,320	13,830	VB II/2 A11	7,220	1,805
	BII/2 A2	15,220	3,805	VB II/2 A12	3,420	0,855
	Mittelwert	46,240	11,560	Mittelwert	5,890	1,473

Diagramm BI/II.3: Graphische Darstellung der Gesamtkonzentration der DNA [μg] im Polymer pro Zeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte der DNA Konzentrationen [μg] mit positiver Standardabweichung.

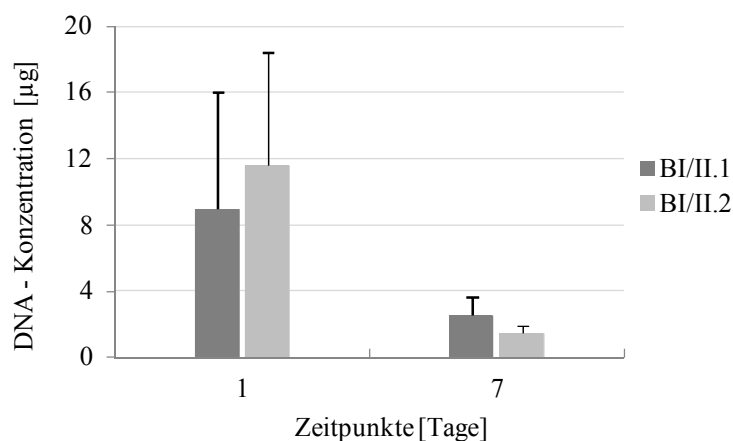


Tabelle BI/II.4: DNAGesamtkonzentrationen umgerechnet in ungefähre Zellzahlen. Der prozentuale Zellverlust wurde errechnet.

	BI/II.1	BI/II.2
Tag 1	128000	165000
Tag 7	36000	21000
Zellverlust [%]	71,875	87,27

Am Abbruchtag 1 zeigen sich nach Optimierung der Hydrophilie des Polymers und Zentrifugationsbesiedlung trotz 96-Well Format bei beiden Polymerdicken die höchsten DNA Konzentrationen, auch im Vergleich zum 24-Well Format (vgl. Tabelle BI/II.3 und Versuch A). Dabei ist auffällig, dass die DNA Konzentration im 3mm Polymer mit $11,56 \pm 6,818\mu\text{g}$ (VBI/II.2) zu Beginn höher war als im 2mm Polymer mit $8,951 \pm 7,058\mu\text{g}$ (VBI/II.1). Mit Hilfe der durch die Standardkurve erstellten Formel ergaben sich so ungefähre Zellzahlen von 128.000 (2mm) vs 165.000 (3mm). Im Polymer VBI/II.2 (3mm) sank die DNA Konzentration vom 1. zum 7. Zellkulturtag von $11,56 \pm 6,818\mu\text{g}$ auf $1,473 \pm 0,422\mu\text{g}$, während im Polymer VBI/II.2 (2mm) ein Verlust von $8,951 \pm 7,058\mu\text{g}$ auf $2,544 \pm 1,088\mu\text{g}$ zu verzeichnen war (vgl. Tabelle und Diagramm BI/II.3). Umgerechnet auf die Zellzahlen ergibt das einen Zellverlust von ca. 71,875% in Versuch BI/II.1 zu 87,27% in Versuch BI/II.2.

5.3.1.3. Histologie:

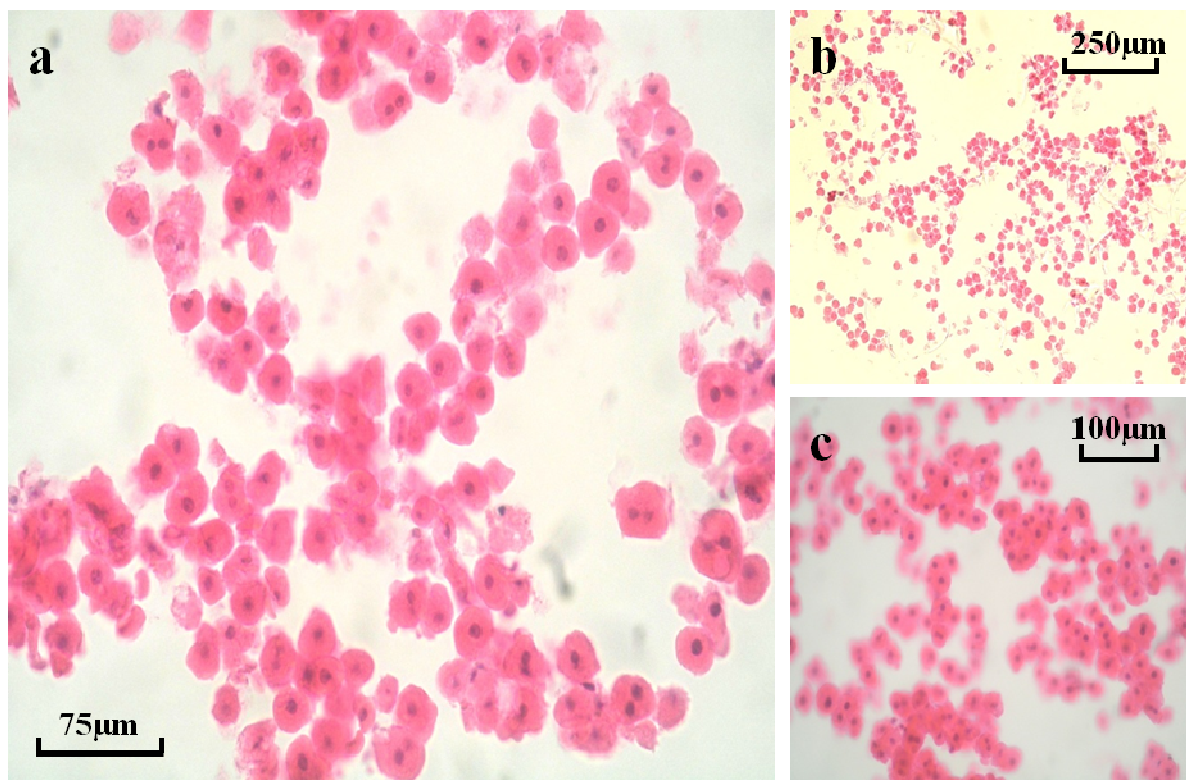


Abbildung BI/II.2: Kryoschnittpräparat der Solid Sugar Polymere nach Zentrifugationsbesiedlung am 7. Kulturtag. HE-Färbung. Schichtdicke $18\mu\text{m}$. **a)** Polymer BI.2. **b)** Übersicht über Zellverteilung der Hepatozyten im Polymer. BII.1. **c)** Zahlreiche vitale Zellen. Deutliche Kernfärbung zu erkennen Polymer BII.1.

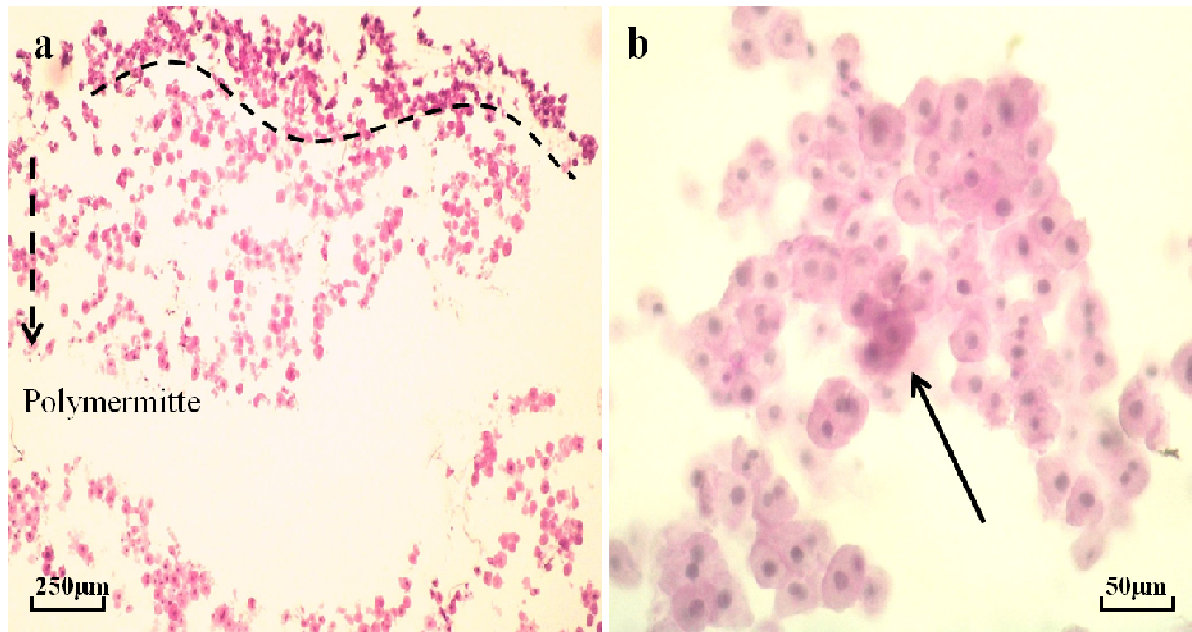


Abbildung BI/II.3: Kryoschnittpräparat der Solid Sugar Polymere nach Zentrifugationsbesiedlung. PAS-Färbung. Schichtdicke 18 µm. **a)** Polymer BI-1 Tag 1. Glykogenspeicherung der Hepatozyten. Der Pfeil markiert die Richtung vom Polymerrand zur Mitte. Die Schlangenlinie markiert den ungefähren Übergang von stark positiver Glykogenspeicherung zu weniger positiver Glykogenspeicherung. **b)** Polymer BI.2 Tag 7. Gruppierte Hepatozyten, in deren Mitte noch einige Glykogen positive Zellen zu erkennen sind.

Beide Polymerhöhen sind durch die Zentrifugationsbesiedlung in allen Schichten besiedelt. Die Zellen formieren sich besonders in den Polymerporen zu Gruppenverbänden (Abbildung BI/II.2.a). Dabei sind keine besonderen Interaktionen der Zellen mit Polymerstrukturen zu erkennen. Am 7. Kulturtag erkennt man lichtere Polymerstrukturen als am 1. Kulturtag, was für ein Abschwimmen einiger Zellen spricht. Am 7. Kulturtag sind die Zellkerne in der HE-Färbung gut abgrenzbar, was für vitale Zellen spricht (Abbildung BI/II.2.c+d). Durch PAS-Färbung kann die Glykogenspeicherung der Hepatozyten beurteilt werden. Dunkel violette Areale sind dabei als stark positiv zu werten. In der Histologie der PAS-Färbung fällt auf, dass die Glykogenspeicherung vom Polymerrand zur Polymermitte abnehmend ist (Abbildung BI/II.3.a). Am 7. Kulturtag sind großflächige Hepatozytenareale nur noch schwach positiv gefärbt (Abbildung BI/II.3.b).

5.3.1.4. Immunfluoreszenzfärbungen

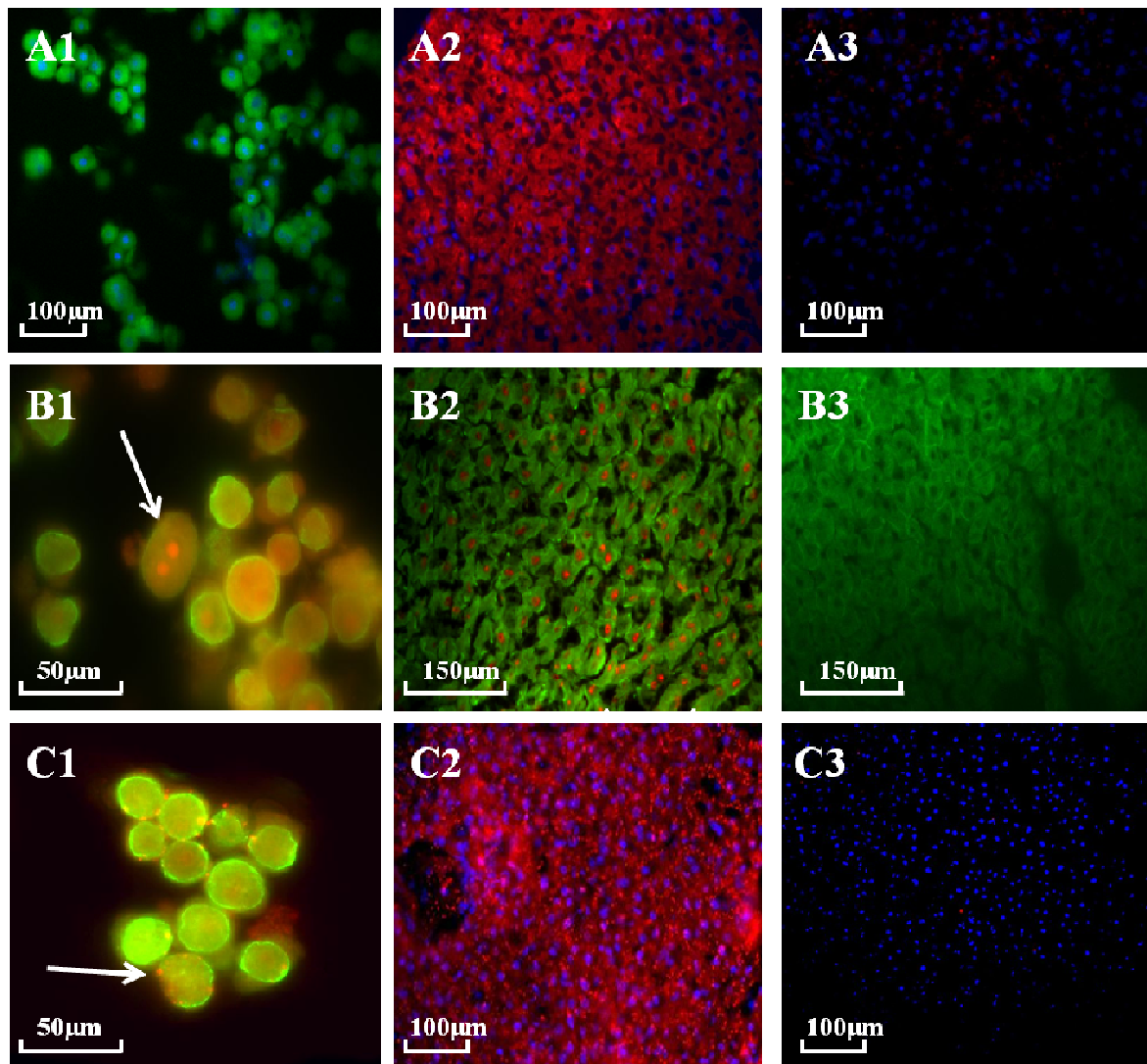


Abbildung BI/II.4: Immunfluoreszenz BI/II.1 und 2 am 7. Kulturtage. **A1)** CYP 450(rot)/DAPI(blau)/CK 18 (grün) Dreifachfärbung. CYP 450 färbt Cytochrome P 450, DAPI färbt intakten Zellkern, Cytokeratin 18 färbt Intermediärfilamente des intakten Zytoskelettes. **A2)** Positivkontrolle Cytochrome P450/Dapi. **A3)** Negativkontrolle **B1)** HNF-4 (rot)/CK 18 (grün) Doppelfärbung. Positives HNF 4 (weißer Pfeil) zeigt einen Hepatozyten spezifischen nuklearen Transkriptionsfaktor. **B2)** Positivkontrolle HNF-4/CK 18 **B3)** Negativkontrolle HNF-4/CK 18 **C1)** Co32 (rot)/CK 18 (grün). Positives Connexin 32 (weißer Pfeil) zeigt Transmembranproteine die Gap Junctions bilden und für Zell-Zell Kontakte stehen. **C2)** Positivkontrolle Co32(rote Punkte)/DAPI (blau). **C3)** Negativkontrolle Co32/DAPI

Die Antikörperreaktion für Cytochrom P450 ist am 7. Kulturtage negativ. Die Zellen sind jedoch CK18 und DAPI positiv, was für vitale Zellen mit intakten Intermediärfilamenten und Zellkernen spricht (Vgl. Abbildung BI/II.4 A1). Auch HNF-4 und Co32 sind am 7. Zellkulturtage positiv gefärbt (vgl. Abbildung BI/II.4 B1/C1). HNF-4 färbt einen leberspezifischen nuklearen Transkriptionsfaktor, was unter anderem für differenzierte Hepatozyten spricht. Connexin 32 (Co 32) färbt einen Hauptbestandteil des Gap junction Proteins, was für Zell-Zell Verbindungen verantwortlich ist.

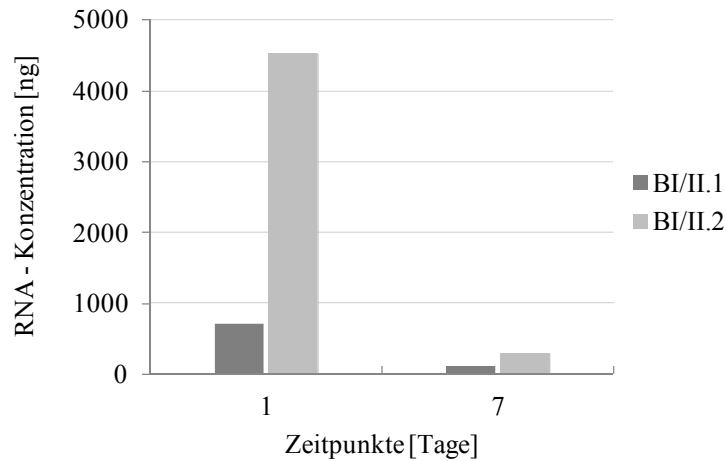
5.3.1.5. RNA

Neben Histologien und Überstandsmessungen sind auch leberspezifische Genexpressionen in der in vitro Kultur von besonderem Interesse. Dazu wurde in unserer Studie RNA isoliert, die dann mittels reverser Transkription in Einzelstrang cDNA umgeschrieben werden konnte. Die cDNA kann nun als Template für die rt PCR Analysen genutzt werden.

Tabelle BI/II.5: Quantitative Messung der RNA Konzentrationen. Aufgetragen sind die Doppelbestimmungen sowie deren Mittelwerte. Die Gesamtkonzentration der RNA pro Polymer ist in [ng] angezeigt. BI wurde in 30µl eluiert, BII in 10µl. Die Gesamtkonzentration wurde aus den Mittelwerten errechnet. Ein Median aus der Gesamtkonzentration an Tag 1 wurde errechnet. An Tag 7 konnten bei Isolation 2 (BII) keine RNA Konzentrationen gemessen werden.

Zeit [d]	1					
Einheit		[ng/µl]			[ng]	[ng]
		Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert		Median
Polymer	<i>2mm</i>					
	<i>BI/I C1</i>	36,44	36,03	36,24	1087,05	698,75
	<i>BII/I C1</i>	31,13	30,96	31,05	310,45	
	<i>3mm</i>					
	<i>BI/2 C1</i>	284,84	285,23	285,04	8551,05	4513,75
	<i>BII/2 C1</i>	47,45	47,84	47,65	476,45	
Zeit [d]	7					
Einheit		[ng/µl]			[ng]	
		Messwert 1	Messwert 2	Mittelwert		
Polymer	<i>2mm</i>					
	<i>BI/I C11</i>	3,38	3,54	3,46	103,80	
	<i>3mm</i>					
	<i>BI/2 C11</i>	9,70	9,54	9,62	288,60	

Diagramm BI/II.4: Graphische Darstellung der Gesamtkonzentration der RNA pro Polymer [ng] pro Zeitpunkt. An Tag 1 ist der Median der Gesamtkonzentration BI/II.1 und BI/II.2 dargestellt. An Tag 7 ist die Gesamtkonzentration BI.1 und BI.2 dargestellt. Isolation 2 (BII) an Tag 7 ohne Messwerte.



Im 96-Well Format ist generell eine RNA Isolierung möglich. An Tag 1 waren bei beiden Isolierungen BI und BII in beiden Polymerdicken 2mm und 3mm RNA isolierbar, so dass ein Median aus beiden Isolierungen errechnet wurde (vgl. Tabelle BI/II.4). An Tag 7 war in der 2. Isolierung (BII) mit einer Ausgangsvitalität von 80% im 2mm (VBII.1) sowie im 3mm Polymer (VBII.2) keine RNA nachweisbar, so dass an Tag 7 nur die Werte der Isolierung 1 (BI) tabellarisch und graphisch dargestellt sind (vgl. Tabelle und Diagramm BI/II.4). Die 3mm Polymere (VBI/II.2) haben mit 4513,75ng an Tag 1 höhere RNA Konzentrationen als die 2mm Polymere mit 698,75ng (VBI/II.1). Bei beiden Polymerdicken gibt es einen Abfall der RNA Mengen bis zum Tag 7. Dennoch sind im Vergleich die Konzentrationen des 3mm dicken Polymers mit 288,60ng höher als die des 2mm Polymers 103,80ng. An Tag 7 ist im 2mm Polymer der Isoilierung 1 (BI.1) eine Umschreibung in cDNA nicht möglich. Nach Konzentrierung der RNA des Versuchs BI.2 (3mm Polymer) konnte trotz einer Konzentartion von 288,60ng an Tag 7 eine Umschreibung in cDNA erfolgen, so dass eine Genexpressionsanalyse mittels rtPCR möglich war.

5.3.1.6. Real-Time PCR

Um zu zeigen, dass die Hepatozyten in der in vitro Zellkultur vital, stoffwechselaktiv und differenziert sind, nutzten wir die rt PCR Analyse. Genexpressionen von Albumin und Cytochrom P450 am letzten Kulturtag sind nur in vitalen stoffwechselaktiven Leberzellen nachweisbar.

Diagramm VB I/II.6: Vergleich der Expression leberzellspezifischer Gene am 1. und 7. Zellkulturtag. Die Genexpression im Vergleich zum stabilen Referenzgen Glycerinaldehyd – 3 – phosphat Dehydrogenase (GAPDH)

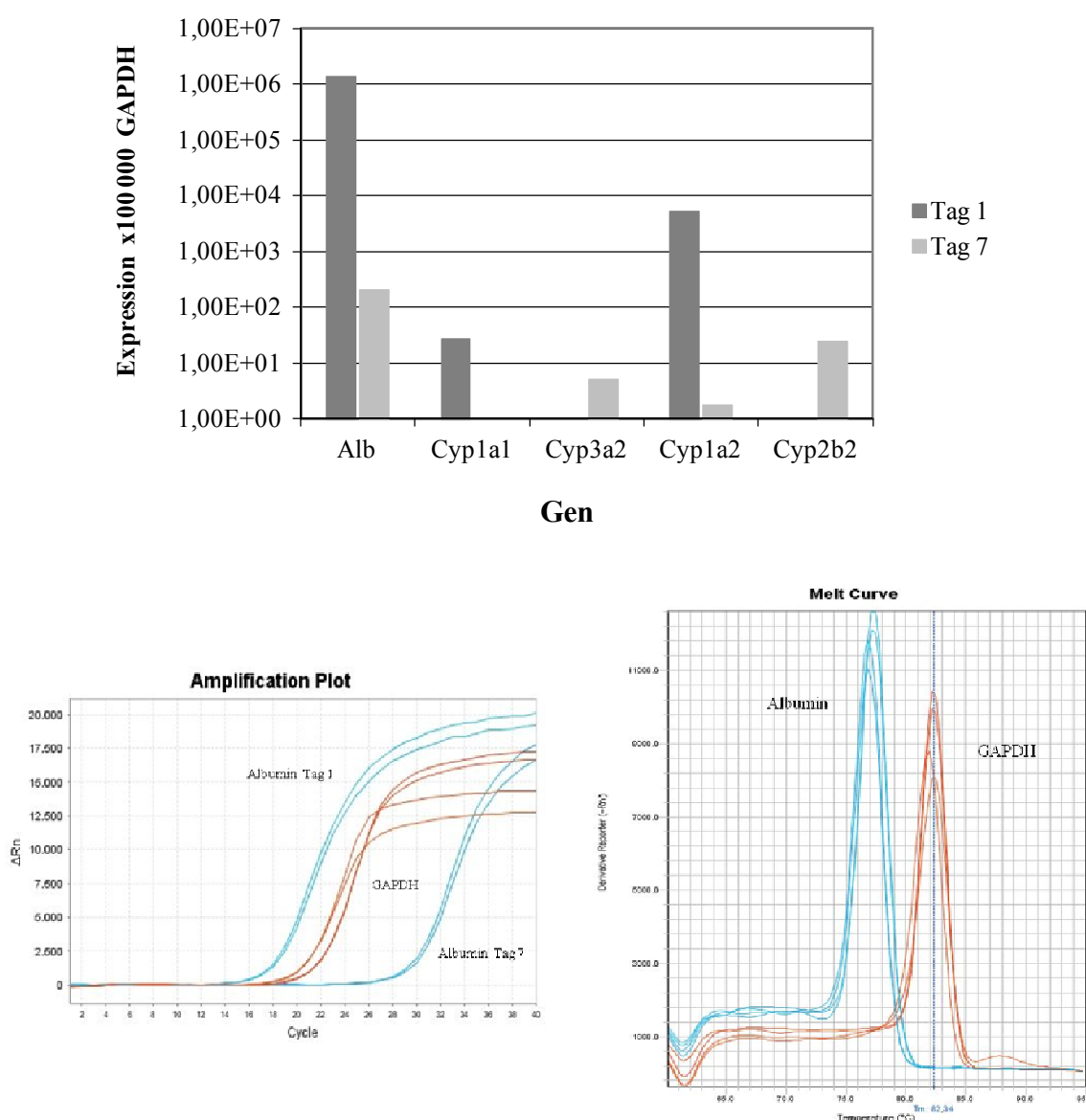


Abbildung BI/II.5: zeigt die Amplifikationskurven von Albumin und dem Referenzgen GAPDH an Tag 1 und Tag 7 (links). Rechts im Bild sind die spezifischen Schmelzpunkte der Gensequenz Albumin und GAPDH gezeigt.

In Versuch BI/II.1 (2mm) sind die gemessenen RNA Konzentrationen an Tag 7 zu niedrig um verlässlich cDNA zu transkriptieren. Daher sind die rtPCR Ergebnisse des Versuchs I/II.2 (3mm) aufgezeigt. Die Genexpressionen werden im Vergleich zum stabilen Referenzgen GAPDH graphisch aufgezeichnet. An Tag 1 sind in absteigender Reihenfolge folgende Gene expremiert: Albumin, Cyp1a2, Cyp1a1. An Tag 7 sind in absteigender Reihenfolge folgende Gene expremiert: Albumin, Cyp2b2, Cyp3a2, Cyp1a2 (vgl. Diagramm VBI/II.6). Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich eine wechselnde Expremierung der Cytochrome. Während an Tag 1 Cyp1a1 noch expremiert ist, sind an Tag 7 keine Genexpressionen mehr nachweisbar. Umgekehrt ist es bei den Genen für Cyp3a2 und 2b2, welche erst an Tag 7 expremiert sind. Gene für Albumin und Cyp1a2 sind während des gesamten Zellkulturverlaufs nachweisbar, verlieren jedoch beide bis Tag 7 an Expression.

5.3.2. Vergleich der 24- und 96-Well Kultur

5.3.2.1. Albumin

Tabelle 3. Albuminsynthese pro 1000 Zellen. Vergleich der Versuche AIII, AIV, BI/II.1 und BI/II.2. Bestimmt aus Zellzahlen pro Polymer pro Zeitpunkt und gesamter Albuminsynthese pro Zeitpunkt.

	Albumin gesamt [ng/ml]	Zellzahlen gesamt	Albumin pro 1000 Zellen [ng/ml]
AIII			
12h	2.946,57	6.300	467,71
60h	2.726,16	3.600	757,27
132h	570,87	3.700	154,29
AIV			
12h	1.687,24	9.800	172,17
60h	1.683,45	7.000	240,49
132h	540,66	6.900	78,36
BI/II.1			
24h	5.269,10	128.000	41,16
168h	363,57	36.000	10,10
BI/II.2			
24h	6.561,85	165.000	39,77
168h	420,50	21.000	20,02

Diagramm 2: Darstellung der Albuminsynthese pro 1000 Zellen. Vergleich der Polymere Solid Sugar AIII, AIV, BI/II.1 und BI/II.2.

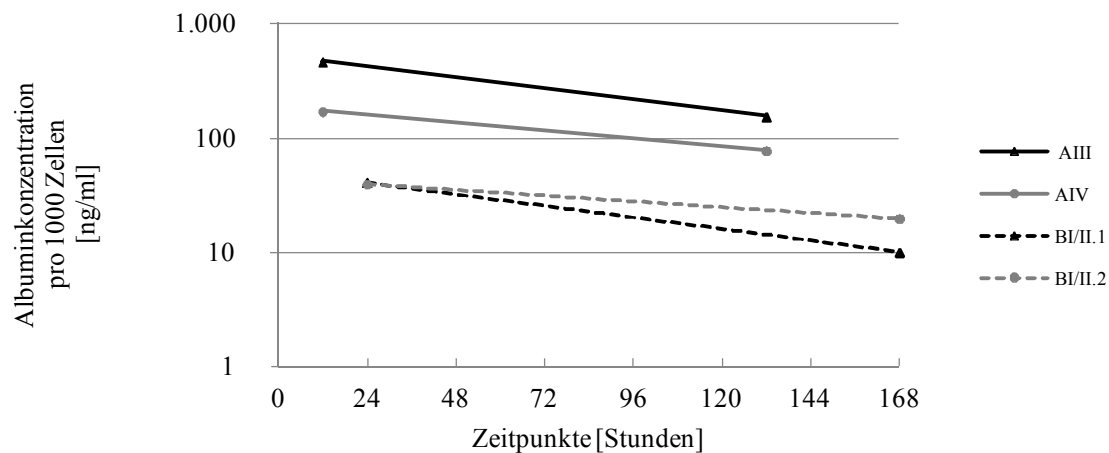


Tabelle 4: Vergleich der Abnahme der Albuminkonzentrationen vom Beginn bis zum Ende der jeweiligen Versuche AI, AIII, AIV und BI/II.1/2. Die Vitalität zeigt die prozentuale Ausgangsvitalität der Hepatozyten nach Isolation.

Versuche	Albuminkonzentration Beginn [ng/ml]	Albuminkonzentration Ende [ng/ml]	Vitalität [%]	Prozentualer Syntheseverlust [%]
AI	584,037	214,896	87,50	63,21
AIII	2946,57	570,87	66	80,63
AIV	1687,24	540,66	87	67,96
BI/II.1	5269,1	363,57	91/80	93,10
BI/II.2	6561,85	420,5	91/80	93,59

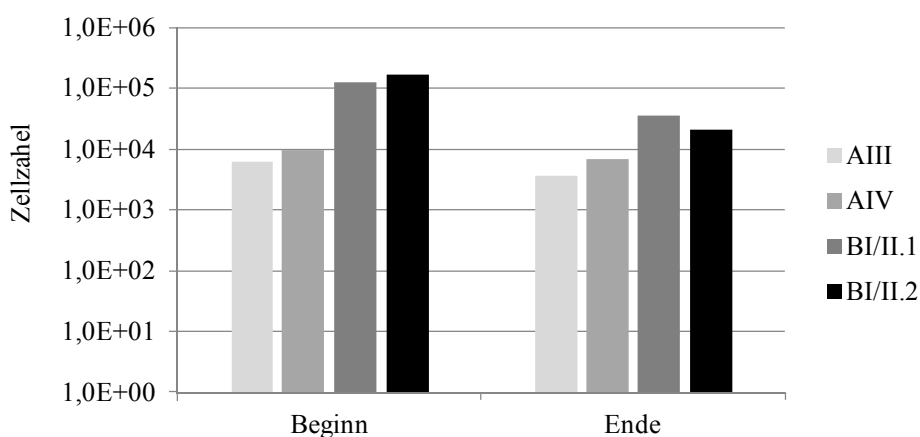
Die Albuminsynthese pro 1000 Zellen ist in den Versuchen AIII und AIV um einen Exponenten höher als in BI/II (vgl. Tabelle 3 und Diagramm 2). Berechnet man den prozentualen Verlust der Albuminkonzentration vom Beginn der Zellkultur bis zu dem jeweiligen Ende fällt auf, dass der Verlust der Albuminkonzentration im 96-Well am höchsten ist (vgl. Tabelle 4). Anzumerken ist bei dieser Auswertung jedoch die unterschiedliche Dauer der Zellkulturen. Versuch AI hatte eine Gesamtzellkulturdauer von 84h, AIII und AIV von 132h und BI/II.1 und 2 von 7 Tagen (168h).

5.3.2.2 DNA

Tabelle 5: Vergleich der DNA Gesamtkonzentrationen [μg] der Versuche AIII, AIV, BI/II pro Polymer und deren mittels Standardkurve errechneten Zellzahlen. Da die Zeitpunkte der DNA Bestimmung leicht differieren (AIII-AIV Beginn: 12h; Ende: 132; BI/II.1/2 Beginn: 24h; Ende: 168h) wurden sie mit Beginn und Ende bezeichnet.

	Beginn		Ende	
	μg	Zellzahl	μg	Zellzahl
AIII	0,441	6300	0,261	3729
AIV	0,687	9814	0,48	6857
BI/II.1	8,951	127871	2,544	36343
BI/II.2	11,56	165143	1,473	21043

Diagramm 3: Graphische Darstellung der Zellzahlen zu Beginn und Ende der Zellkulturen der Versuche AIII, AIV, BI/II.1/2.



Im 96-Well Format sind trotz beschränkter Platzverhältnisse die Zellzahlen zu Beginn ca. 1,0E+01 höher als im 24-Well Format (vgl. Tabelle 5). Trotz längerer Kulturdauer im 96-Well Format sind nach 7 Tagen Zellkultur die Zellzahlen pro Polymer immer noch 1,0E+01 höher als im 24-Well Format.

6. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war die Etablierung und Optimierung der statischen in vitro Hepatozytenkultur im 96-Well Format zur Nutzung für ADMET Studien. Toxikologiestudien an primären Rattenhepatozyten sind weit verbreitet und gut etabliert in der pharmakologischen Forschung (Wang K u. a. 2002; Rogiers V & Vercruysse A 1993; Aly HA & Domenech O 2009; Ellis JK u. a. 2010). Problem der derzeit genutzten Monolayerkulturen sind jedoch schnelle Dedifferenzierung mit spezifischem Funktionsverlust, geringe Lebensdauer und morphologische Strukturveränderungen der Hepatozyten, welche die Aussagekraft dieser Studien erschweren. (Hamilton GA u. a. 2001; Hewitt NJ u. a. 2007). Daher haben sich im Laufe der Jahre neue Zellkulturmöglichkeiten etabliert. Eine der gängigsten Zellkulturen, die derzeit genutzt wird, ist die Sandwichkultur in der Hepatozyten zwischen zwei Schichten einer Extrazellulärmatrix kultiviert werden. Dadurch konnte im Vergleich zur Monolayerkultur das Langzeitüberleben sowie die Differenzierung mit leberspezifischen Funktionen verlängert werden (Dunn JC u. a. 1991; Richert L u. a. 2002). Ebenfalls die statische 3D Hepatozytenkultur auf speziellen Matrizen verspricht eine bessere Imitierung der in vivo Situation und somit längeres Überleben mit hepatozytenspezifischen Funktionen (Bierwolf J u. a. 2011). Durch neue Zellkulturmöglichkeiten sind „alte“ Testsysteme nicht mehr eins zu eins anwendbar. So könnten zum Beispiel Diffusionsstörungen aufgrund der Matrix Testsysteme falsch positiv oder negativ ausfallen lassen. Da kleinere Wellformate geringere Zellzahlen bedingen, könnte man in untere Grenzbereiche der Messbarkeit stoßen. Hier sehen wir vor allem den Vorteil bei Verwendung von Matrizen. Da die dritte Dimension in der Matrix mehr Raum bietet, könnten auch mehr Zellen pro Well kultiviert werden, als in einer Sandwichkultur. Zur Etablierung und Optimierung der 96-Well Kultur waren zunächst Charakterisierungs- und Modifizierungsversuche am größeren 24-Well Format nötig. Um eine bessere in vivo Situation imitieren zu können, mussten vermehrt Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen in der gesamten Matrix möglich sein. Dazu verwendeten wir ein optimiertes Polymer, welches definierbare Porengrößen und -strukturen sowie Verbindungen der Porenstrukturen untereinander ermöglichte (Ma PX & Choi JW 2001).

6.1. 3D Poly L – Lactid Matrix

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde der Vorteil von 3D Matrizen in der in vitro Hepatozytenflusskultur gezeigt. (Pollok JM 2003; Pollok JM u. a. 1998; Török E u. a. 2001; Török E u. a. 2002; Török E u. a. 2006; Lütgehetmann M 2005). In diesen Versuchen wurden PLLA-Polymere verwendet, welche durch Salt-Leach Verfahren hergestellt wurden. Hierbei waren Porengrößen und -strukturen durch Größe und Form der Salzkristalle definierbar. Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens waren die unkontrollierten und fehlenden Verbindungen der Poren untereinander, wodurch die gesamte Zellpopulation im Polymer aufgrund fehlender Porenverbindungen von einander abgeschnitten war (Ma PX & Choi JW 2001; Lütgehetmann M 2005). Zur Verbesserung dieses Defizites verwendeten wir ein von der Arbeitsgruppe um Prof. Ma weiterentwickeltes Polymer. Dabei wurden mittels Paraffinkugeln/PLLA-Lösung Polymere mit definierbaren Porengrößen, -strukturen und definierten Porenverbindungen möglich (Ma PX & Choi JW 2001). Durch das Verhältnis von PLLA-Lösung zum Paraffin konnte unter anderem die Porosität beeinflusst werden. Um produktionsbedingte Lufteinschlüsse zu lösen, erfolgte eine Vakuumbehandlung (Ma PX & Choi JW 2001).

In unserer Studie zeigten histologische Kontrollen, dass nach Modifizierung der Besiedlung die Porenstrukturen mit vitalen Hepatozyten am 7. Zellkulturtag ausgefüllt waren (siehe Abbildung BI/II.2). Dieses Ergebnis spricht für eine Polymerstruktur, die in der in vitro Hepatozytenkultur verwendet werden kann. Im 96-Well Format konnten je nach Polymerdicke durch die dritte Dimension Zellzahlen von 128000 bis 165000 erreicht werden (siehe Tabelle BI/II.4). Dies zeigt, dass trotz vermindertem Wellformat hohe Zellzahlen pro Zellkultur durch geeignete Polymere erreicht werden können. Hierfür ist vor allem eine hohe Porosität mit großer Oberfläche verantwortlich. Zur RNA Isolierung, welche eine wesentliche Rolle zur Evaluierung von Stoffwechselinteraktionen spielt, sind Mindestkonzentrationen nötig. Diese konnten mit den oben genannten Zellzahlen auch im 96-Well Format erreicht werden (siehe Abbildung BI/II.4). In Zukunft könnten weitere Polymeroptimierungen, welche bei erhaltender Metrik die Oberfläche erhöhen von Vorteil sein. Eine neuere Innovation die bezuglich wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Prof. Ma entwickelt. So konnte mittels Nano – Fasern Matrix eine Vergrößerung der Oberfläche mit Imitierung von Kollagenfasern trotz erhaltender definierbarer Porengröße und –verbindungen erzeugt werden. (Wei G & Ma PX 2009; Chen VJ & Ma PX 2004). Neben den oben erläuterten Vorteilen großer Oberflächenstrukturen sind im Rahmen von Zelladhäsion und Proliferation Kollagenfasern der Größe 50 – 500nm ein entscheidender Faktor (Elsdale T & Bard J 1972;

Grinnell F & Bennett MH 1982). Die Vorteile dieser neuen Matrix konnten in der Osteoblastenkultur sowie in Studien unserer Arbeitsgruppe in der Hepatozytenkultur gezeigt werden (Bierwolf J u. a. 2011; Woo KM u. a. 2007; Chen VJ u. a. 2006).

6.2. Zell – Matrix Interaktionen

Nicht nur Polymerstrukturen sind von essentieller Bedeutung. Um Adsorption und Zell-Matrixinteraktionen zu gewährleisten, sind Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien als wichtiger Aspekt der in vitro Zellkultur zu nennen (Boyan BD u. a. 1996; Ito Y 1999; Mann BK u. a. 1999). Unsere PLLA Matrizen waren mit Gelatine beschichtet, um die negativen hydrophoben Eigenschaften der reinen PLLA Matrix auszugleichen (Liu X u. a. 2005). In Vorversuchen im 24 Well-Format zeigten sich stark hydrophobe Eigenschaften unserer Polymere, was in hohen Abschwimmraten und leeren Polymerstrukturen in der Histologie gezeigt wurde (siehe Abbildung AI.2, AIII.2). Durch Behandlung der Polymere im Vakuum in absteigender Ethanolreihe (siehe Material und Methoden) konnten unsere Polymere hydrophilisiert werden. Die Folge der hydrophileren Oberflächenstrukturen waren höhere Zellzahlen und vollere Polymerporen (siehe Abbildung AIV.2). Zell-Matrixinteraktionen konnten von uns jedoch nicht beobachtet werden. So sah man weder unter dem Polarisationsmikroskop noch in der Histologie Hepatozyten mit direkter Zell-Matrixinteraktion. Dies könnte unter anderem ursächlich für geringe Zellzahlen, hohe Abschwimmraten und Dedifferenzierung der Hepatozyten im Kulturverlauf sein. Dies ist ein Problem, was viele, rein synthetische Materialien teilen, da sie neben Problemen der Hydrophilie keine biologische Oberfläche besitzen und so von Adhäsionsmolekülen der Zellen nicht erkannt werden können. In der aktuellen Literatur gibt es zahlreiche Optimierungsversuche. So wird von Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation bis hin zu verschiedensten Matrixstoffen von synthetischen bis biologischen Materialien berichtet (vgl. Tabelle 1). Chitosan wird z.B. als vielversprechende Oberflächenbeschichtung sowie als Grundgerüst einer gesamten Matrice genannt (Cai K u. a. 2002; Wu XB u. a. 2011; Wan Y u. a. 2007). Daneben zeigten auch das chemische Koppeln von Adhäsionspeptiden z.B. RDG und YIGSR an Lysinreste der Matrix (Carlisle ES u. a. 2000; Cook AD u. a. 1997) und Niederdruckbeschichtungen mit NH_3 Plasma (Nitschke M u. a. 2002) Vorteile in der Osteoblasten- (Cai K u. a. 2002; Cook AD u. a. 1997) und Hepatozytenkultur (Carlisle ES u. a. 2000). Forschungen unserer eigenen Arbeitsgruppe mit humanen Hepatozyten auf Alginatpolymeren konnten ebenfalls Vorteile der Langzeitüberlebensrate und des geringeren Zellverlustes zeigen. So waren nach 14-tägiger in vitro Hepatozytenkultur vitale und

differenzierte Zellen nachweisbar. Der relative DNA Gehalt fiel von Tag 1 bis Tag 14 um ca. 35,23%. (Bierwolf J u. a. 2012) Vergleicht man diese Zahlen mit den oben genannten Daten welche eine Abschwimmrate von ca. 87,27 – 71,875% von Tag 1 bis Tag 7 zeigen (siehe Tabelle BI/II.4) könnte dies auf einen Vorteil von biologischen Matrizen zu synthetischen Matrizen hindeuten.

6.3. Besiedlungseffizienz

Um Zell-Zell und Zell-Matrixinteraktionen sowie bessere in vivo/vitro Vergleichbarkeiten gewährleisten zu können, sind hohe Besiedlungsraten nötig. Zudem verlangen einige Messungen für ADMET Studien eine gewisse Mindestzahl an Hepatozyten. So benötigt man z.B. zum Umschreiben von RNA in cDNA eine Mindestmenge von ca. 400ng.

Zunächst wurden unsere Polymere mittels Pipettenbesiedlung mit 100000 Hepatozyten pro Polymer besiedelt (siehe Versuch AI). Zum Vergleich des Kulturverlaufs wurde eine 2D Kultur parallel unter selben Bedingungen mitgeführt. Bei Auswertung der Versuche zeigten sich neben geringen Albuminkonzentrationen (vgl. Diagramm AI.2, AIII.2) auch leere Polymerstrukturen in der Histologie bereits zu frühen Abbruchstadien (vgl. Abbildung AI.2a/b). Unter dem Polarisationsmikroskop waren große Zellkolonien abgeschwommener Hepatozyten zu beobachten. Einen Grund dafür sahen wir neben geringer Hydrophilie des Polymers (siehe Zell-Matrixinteraktionen) in zu geringer Besiedlungseffizienz. So könnten durch Pipettenbesiedlung und Hydrophobie die Hepatozyten nur an der Oberfläche des Polymers siedeln, während der Polymerkern leer blieb. Um eine homogenere Verteilung der Zellen im Polymer zu gewährleisten, was neben verbesserten Möglichkeiten der Zell-Zell sowie Zell-Matrixinteraktionen auch die nutritive Versorgung der Zellen optimieren könnte, wurde die Zentrifugationsbesiedlung erprobt. So zeigten Studien, dass trotz der erforderlichen G-Kräfte die Zellen vital, differenziert und stoffwechselaktiv blieben (Dvir-Ginzberg M u. a. 2003; Yang TH u. a. 2001). Auch unsere Ergebnisse zeigten einen deutlichen Vorteil der Zentrifugationsbesiedlung zur Pipettenbesiedlung. So waren neben einer homogenen Verteilung der Zellen in der Histologie (vgl. Abbildung AI.2, AII.2, BI/II.2) auch die Zellzahlen an den Abbruchtage gemessen am DNA Gehalt [μg] deutlich höher (vgl. Tabelle AIII.3, Tabelle AIV.3, BI/II.3, DNA Messung bei Versuch AI aufgrund mangelnder Zellen nicht möglich). In der HE Färbung waren vitale Zellen nach Zentrifugation vom ersten bis zum letzten Zellkulturtag nachweisbar (vgl. Abbildung AII.2, BI/II.2).

6.4. 96-Well Kultur

Die Pharmazeutische Industrie erfordert effektive und robuste Hochdurchsatz-Assays, um dem wirtschaftlichen Druck standzuhalten (Gebhardt R u. a. 2003; Hertzberg RP & Pope AJ 2000; Hewitt NJ u. a. 2007). Darüber hinaus sind hohe Zellzahlen nötig, um Zell-Zell Kommunikationen, Interaktionen und normale Zellfunktionen in Zellkultur zu erhalten. Zudem erfordern gewisse Assays z.B. reverse Transkription von RNA in cDNA Mindestkonzentrationen, die zur optimalen Durchführbarkeit erreicht werden müssen. Hier liegt die Herausforderung der 96-Well Kultur, da trotz vermindertem Platzangebot pro Wellvertiefung eine ausreichende Zellzahl in Kultur verbracht und gehalten werden muss. Durch Verwendung der 3D Matrizen mit hoher Porosität sollten hohe Zellzahlen trotz geringem Platzangebot möglich sein. Zudem verwendeten wir eine spezielle 96-Well-Kulturschale mit längsovalen Vertiefungen der Firma Millipore. Zum einen war aufgrund der ovalen Form eine einfache Entfernung der Matrize aus dem Well, ohne mechanische Schäden am Polymergerüst oder den Zellen zu verursachen, möglich (siehe Abbildung 4). Zum anderen erhöhte die ovale Konfiguration das Volumen des Zellkulturmediums auf 350µl pro Well. Dadurch sollte das Oberflächen-/Volumenverhältniss optimiert werden, um einen besserern Effekt auf den Gasaustausch während der Zellkultur zu erreichen (Bierwolf J u. a. 2011; Provin C u. a. 2008; Mikos AG u. a. 1993). In den Versuchen BI/II.1. und BI/II.2 wurden 2mm und 3mm dicke Polymere in 96-Well Kultur verglichen. Nach Zentrifugationsbesiedlung und Bestimmung der DNA Konzentration am 1. Kulturtag konnten Zellzahlen im Mittelwert von 128000 ± 100826 pro 2mm und 165000 ± 97405 pro 3mm Polymer (vgl. Tabelle BI/II.3, BI/II.4) pro Wellformat erreicht werden. Im Vergleich mit der 24-Well Kultur konnte gezeigt werden, dass nach Optimierung der Polymerstrukturen und Zentrifugationsbesiedlung trotz geringerem Platzangebot höhere Zellzahlen möglich sind (vgl. Tabelle 3). Die höchsten Zellzahlen befanden sich an Tag 1 im 3mm Polymer (VBI/II.2). Am 7. Zellkulturtag befanden sich noch ca. 36000 pro 2mm und 21000 pro 3mm Polymer in Kultur. Das entspricht ungefähren Zellverlusten von 71,875% (BI/II.1) und 87,27% (BI/II.2). Dies könnte auf einen limitierenden Faktor der hohen Zellzahlen im 96-Well Format hindeuten. Denn aufgrund des beschränkten Platzangebotes mit hohen Zellzahlen könnte ein Mangel an Nährstoffen ursächlich für Zelltod, Abschwimraten und Dedifferenzierung sein. Trotz allem ist zu erwähnen, dass nach 7-tägiger Kultur im 96-Well Format die absoluten Zellzahlen einen Exponent höher sind als in der 24-Well Kultur (vgl Tabelle 3). Desweiteren ist im 96-Well Format die Zellkulturdauer mit 7 Tagen (168h) die längste im Vergleich mit den anderen Versuchen.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass mit optimierter hydrophiler Polymerstruktur und längsovalen Wellstrukturen ausreichende Zellzahlen im 96-Well Format erreichbar sind.

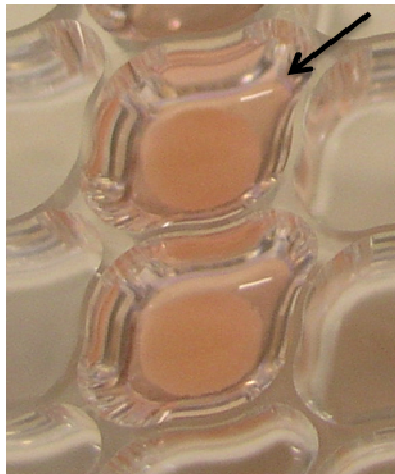


Abbildung 4: 96 – Well Millipore Kulturschale oval (Pfeil), mit Polymer und Zellkulturmedium

6.5. Überstandsmessungen (Albumin, WST, LDH)

Albumin

In allen Zellkulturen der Versuche AI – BI/II war über den gesamten Kulturverlauf Albumin messbar. In den Versuchen AI – AIV (24-Well) ist der Erfolg der Zentrifugationsbesiedlung ersichtlich. Höhere Zellzahlen resultieren ebenfalls in höheren Albuminkonzentrationen (vgl. Diagramm AIII.2). Das spricht dafür, dass trotz Zentrifugation die Zellvitalität und Syntheseleistung der Hepatozyten nicht negativ beeinflusst wird. Vergleicht man die Syntheseleistungen der Hepatozyten der Versuche AI – AIV über den gesamten Verlauf der Zellkultur, wird deutlich, dass eine hohe Ausgangsvitalität mit hohen Zellzahlen und einem hydrophilen Polymer die konstanteste Syntheseleistung der Hepatozyten zur Folge hat. So sind im Versuch AIII zwar die höchsten Konzentrationen (vgl. Tabelle AIII.2) messbar, bei jedoch schlechter Ausgangsvitalität (66%) und mäßiger hydrophilie ist ein Absinken der Syntheseleistung um den Faktor 5,04 nachweisbar. Im Gegensatz dazu fällt die Albuminkonzentration im Versuch AIV, bei hoher Ausgangsvitalität (87%) und modifiziertem Polymer um den Faktor 3,12 (vgl. Diagramm AIV.2).

Auch in der 96-Well Kultur sind hohe Albuminkonzentrationen über den gesamten Zellkulturverlauf messbar. Vergleicht man die maximalen Konzentrationen der 96- mit denen der 24-Well Kultur, wird deutlich, dass in der 96-Well Kultur zu Beginn die Albuminkonzentration um den Faktor 2,22 höher ist als in der 24-Well Kultur (vgl. Tabelle

BI/II.1 und Tabelle AIII.2). Der Verlauf der Albuminkonzentration über die gesamte Zellkulturdauer zeigt jedoch, dass in der 24-Well Kultur der prozentuale Verlust der Albuminkonzentration zwischen 63% - 80% liegt, während die Albuminkonzentration im 96-Well Format um ca. 93%. (vgl. Tabelle 4) fällt. Auch die Syntheseleistung pro 1000 Zellen zeigt in der 96-Well Kultur niedrigere Werte als in der 24-Well Kultur (vgl. Diagramm 2 und Tabelle 3). Fasst man diese Befunde zusammen, könnte dies für eine höhere Dedifferenzierungsrate der Hepatozyten im 96-Well Format sprechen. Eine mögliche Erklärung könnte trotz vergrößerter (ovaler) Well Struktur (vgl. Abbildung 4) ein nutritiver Mangel sein. So ist vorstellbar, dass bei erhöhten Zellzahlen im 96-Well Format (vgl. VBI/II mit VAIII/IV) mit weniger Zellkulturmedium eine Unterversorgung entstehen könnte, was zu Dedifferenzierung bzw. Zelltod führen würde (vgl. Abb. BI/II.3). Diesbezüglich könnten Optimierungen und Anpassungen der Zellkulturmedien an die erhöhten Bedürfnisse der 96-Well Formate eine Verbesserung bringen. So beobachteten z.B. Martin et al., dass bei niedrigem extrazellulärem Magnesium in der in vitro Kultur auch die Apoptoseraten von primären Hepatozyten erhöht seien. (Martin H u. a. 2003). In Folgeversuchen müsste gezeigt werden, ob Defizite im Zellkulturmedium der 96-Well Zellkultur bestehen und diese auszugleichen sind. Aber auch Dedifferenzierungen der Hepatozyten durch synthetische Polymerstrukturen sind vorstellbar. So zeigte Dvir-Ginzberg die Vitalität und Syntheseleistung der Hepatozyten auf Alginat-Polymeren bei höheren Zellzahlen sogar zunimmt (Dvir-Ginzberg M u. a. 2003). Im Rahmen unserer Studien zeigten sich immer wieder Probleme der Hydrophobie unserer PLLA Polymerstrukturen. Da Alginat von Natur aus stark hydrophil sind, könnten Nährstoffe leichter diffundieren, ohne dass man ein Überangebot schaffen muss, um Diffusionsmängel auszugleichen. Eine weitere Theorie könnte ein „Überladen“ der Polymerstruktur mit Hepatozyten sein. Durch die Zentrifugationsbesiedlung ist eine Kontrolle der besiedelten Zellzahlen nicht möglich. Durch die Zentrifugalkraft könnten zu viele Hepatozyten in das Polymer gepresst werden und so dazu führen, dass sich die Hepatozyten gegenseitig verdrängen. Eine Möglichkeit der Optimierung könnten vergrößerte Oberflächenstrukturen bieten. Dieser Ansatz wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Prof. Ma verfolgt. Ein neueres Polymer, welches durch Nanofasern bei erhaltender Metrik größere Oberflächenstrukturen bietet, wurde entwickelt (Chen VJ & Ma PX 2004; Woo KM u. a. 2003; Wei G & Ma PX 2009). Einsatzmöglichkeiten und Vorteile dieses Polymers wurden bereits in der Osteoblasten sowie durch unsere Arbeitsgruppe auch in der Hepatozytenforschung gezeigt (Bierwolf J u. a. 2011; Woo KM u. a. 2007; Chen VJ u. a. 2006).

WST-1 Umsatz Test

Um während des Kulturverlaufs Aussagen zur Zellvitalität treffen zu können, nutzten wir den WST-1 Umsatz Test. Hierbei wird die Testsubstanz nur von vitalen Zellen durch deren zelluläre (mitochondriale Atmungskette) Enzyme umgesetzt und im Anschluss photometrisch gemessen. Im Versuch AI zeigten sich nur geringe Unterschiede im WST-1 Umsatztest zwischen der 2D und 3D Kultur (vgl. Diagramm AI.1). Der Vergleich der Versuche AI und AIII zeigte trotz wesentlich höherer Zellzahlen in Versuch AIII einen geringeren Umsatz zu Beginn sowie einen steileren Abfall zum Ende der Kultur (vgl. Diagramm AIII.1). Vergleicht man die Versuche AI, AIII und AIV sieht man trotz deutlicher Unterschiede bei der Albuminsynthese, der Histologie sowie der DNA Konzentration keinen signifikanten Unterschied des WST-1 Umsatzes (vgl. Diagramm AVI.1). Aufgrund der Ergebnisse der Versuche AIII und AIV würde man jedoch höhere WST-1 Werte im Vergleich zu AI erwarten. Das lässt Zweifel an der Aussagekraft des WST-1 Umsatztests bei der Verwendung in der statischen 3D Hepatozytenkultur zu. Eine theoretische Erklärung für die falsch negativen Ergebnisse könnten Diffusionsprobleme der Testsubstanz im Polymer sein. So ist vorstellbar, dass in der 2D Kultur die Testsubstanz von allen Zellen umgesetzt werden kann, da keine Diffusionshindernisse vorhanden sind. Im Gegensatz dazu könnten die schlechten Ergebnisse der 3D Kultur durch mangelnde Diffusion der WST-1 Substanz in dem Polymerkern erklärbar sein. Dies erklärt jedoch nicht die fehlenden Unterschiede der Versuche AI, AIII und AIV. Diese könnten durch die unterschiedlichen Besiedlungsmethoden zustande kommen. Nach Zentrifugationsbesiedlung sind die Hepatozyten annähernd homogen im Polymer verteilt, während bei der Pipettenbesiedlung die Hepatozyten hauptsächlich auf der Polymeroberfläche siedeln. So könnte es sein, dass die Testsubstanz zum größten Teil nur von Hepatozyten der Polymeroberfläche und abgeschwommener Zellen umgesetzt wird und vitale Hepatozyten im Polymerkern nicht am Umsatz beteiligt sind.

In der aktuellen Literatur wird der WST-1 Umsatztest als ein wichtiger und zuverlässiger Parameter zur Bestimmung von Hepatotoxizität genannt. Im Vergleich mit anderen Biomarkern konnten Vorteile des WST-1 Tests bestätigt werden (Kikkawa R u. a. 2005). Diese Studie wurde allerdings an 2D kultivierten Hepatozyten vorgenommen. Andere Studien belegen ebenfalls die Aussagekraft des Vitalitätstests an 3D kultivierten Hepatozyten (Gotoh Y u. a. 2011; Kim M u. a. 2010; Bazou D 2010). Bei diesen Studien ist auffällig, dass die Matrizen aus biologischen oder hybrid (biologisch/synthetisch) Materialien hergestellt sind. Eine Studie von Huhtala et al. ist eine der wenigen, die die Verwendung von WST – 1 Tests an synthetischen PLGA Polymeren bei verschiedenen Augengeweben verwendet (Huhtala A

u. a. 2007). PLGA ist ein Copolymer aus PLA (Poly Lactid Acid) und PGA (Poly Glycolic Acid). Dabei ist zu beachten, dass die extra Methylgruppe bei der PLA Synthese einen zunehmend hydrophoberen Effekt bewirkt (Ma PX 2004). Die hydrophoben Eigenschaften dieser Polymere sind ein bekanntes Problem und limitierender Faktor in der Hepatozytenkultur, weshalb Oberflächenmodifizierungen auch Gegenstand aktueller Studien sind (Choi L u. a. 2012; You ES u. a. 2007). Da unsere Polymere aus PLA hergestellt sind, könnte diese hydrophobere Eigenschaft im Vergleich mit biologischen und PLGA Polymeren eine Erklärung für die Probleme der Messungen des WST-1 Umsatzes darstellen. Durch weitere Optimierungen der Hydrophilie sowie durch längere Inkubationszeiten der WST-1 Substanz im Well mit mechanischer Durchmischung von außen, z.B. Schütteln der Zellkulturplatte während der Inkubation, könnten diese Mängel ausgeglichen werden.

Wir verzichteten im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf den WST-1 Umsatztest. Vitalitätsverläufe sollten durch LDH Messungen und histologische Kontrollen ermöglicht werden.

LDH

Da Vitälitätsbestimmungen durch Überstandsmessungen technisch nicht umsetzbar waren (siehe WST-1 Umsatztest), nutzten wir die Lactatdehydrogenase (LDH) im Überstand als Kontrolle über den Zelltod im 96-Well Format (VBI/II). LDH ist ein Enzym, welches intrazellulär vorhanden ist und nach Beschädigung der Zellmembran im Überstand messbar wird. Die Ergebnisse der LDH Messungen zeigten eine konstante Abnahme der LDH Konzentration im Überstand über den gesamten Zellkulturverlauf (vgl. Tabelle BI/II.2 und Diagramm BI/II.2). Die Abnahme der gemessenen Konzentrationen beträgt ca. 1/10 oder eine Logarithmusstufe pro Zeiteinheit. Zum Ende der Zellkultur waren nur noch geringste LDH Konzentrationen messbar. Die hohen Konzentrationen an den ersten Kulturtagen erklären sich durch abgeschwommene Zellen, welche sich nicht im Polymer ansiedelten. Ab dem 5. Zellkulturtag besteht nur noch eine geringe Zelltodrate. Die höchsten Zelltodraten findet man an den ersten drei Zellkulturtagen. Ab diesem Zeitraum scheinen sich die Hepatozyten im Polymer organisiert und Zell-Zell Verbindungen ausgebaut zu haben (vgl. Kapitel Immunfluoreszenz). Zellen die nicht im Polymer „haften“ blieben, schwammen ab und wurden durch die Zellkulturwechsel entsorgt. So konnte man im Polarisationsmikroskop an den ersten Zellkulturtagen deutlich höhere Abschwimmraten als an den letzten Zellkulturtagen feststellen. In Zusammenschau der geringer werdenden LDH Konzentration

mit der Histologie und den DNA Konzentrationen spricht dies für vitale und organisierte Hepatozyten am 7. Zellkulturtag.

6.6. Histologie

Zur Überprüfung von Zellvitalität, Zellformierungen mit Zell-Zell und Zell-Matrixinteraktionen sowie Bildung von Sphroiden und Füllung der Polymerstrukturen führten wir Hämtoxylin-Eosin Färbungen durch. Als funktionell histologischen Parameter haben wir per PAS Färbung die Fähigkeit zur Glykogenspeicherung überprüft.

Der Vergleich der Versuche AI und AII im 24-Well Format zeigt die verbesserte Besiedlungseffizienz nach Zentrifugationsbesiedlung. Während in AI von Beginn an leere Polymerstücke mit teils versprengten vitalen und avitalen Zellen zu sehen waren (vgl. Abbildung AI.2), waren die Polymerstrukturen nach Zentrifugationsbesiedlung (AII) mit Hepatozyten gefüllt. Alle Zellen im Gesichtsfeld zeigten Hämalaun gefärbte Zellkerne mit scharf abgrenzbaren Zellmembranen, was für vitale Hepatozyten spricht (vgl. Abbildung AII.2). Im Versuch AIII fanden sich trotz erhöhter Albuminkonzentrationen im Überstand leere Polymerstrukturen in der Histologie (vgl. Abbildung AIII.2). Dies könnte ein Indiz für die mangelnde Hydrophilie des Solid Sugar AIII Polymers sein. Die erhöhten Albuminkonzentrationen könnten durch vitale Hepatozyten an der Polymeroberfläche sowie durch Apoptose und Zelltod abgeschwommener Zellen erklärt werden. Nach Optimierung der Hydrophilie des Polymers (siehe Material und Methoden) im Versuch AIV waren die Polymerporen mit Hepatozyten ausgefüllt (vgl. Abbildung AIV). Auch im 96-Well Format zeigten sich nach Zentrifugationsbesiedlung und 7-tägiger Zellkultur vitale Hepatozyten. Die Polymerstrukturen waren in allen Schichten gut befüllt (vgl. Abbildung BI/II.2). Zusammenfassend kann nach Auswertung der HE Färbung gezeigt werden, dass eine gesteigerte Besiedlungseffizienz nach Zentrifugationsbesiedlung erreicht werden kann. Im 24- und 96-Well Format konnten am 7. Zellkulturtag volle Polymerstrukturen mit vitalen Hepatozyten erreicht werden. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass keine Verschmelzungen von Zellmembranen mit Polymerstrukturen erkennbar sind, was gegen Zell-Matrixinteraktionen spricht. Auch die Ausbildung von Sphroiden ist nur angedeutet in einigen Versuchen (vgl. Abbildung AI.2 und Abbildung AIV.2) zu sehen. Spheroide sind Gruppenverbände von Zellen, deren Zellmembranen miteinander verschmelzen, und so verbesserte Zell-Zell Interaktionen ermöglichen. Der Vorteil von Sphroiden in der in vitro Kultur wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen mehrfach beschrieben (Olive PL & Durand

RE 1994; Koide N u. a. 1990; Kamihira M u. a. 1997; Dvir-Ginzberg M u. a. 2004; Dvir-Ginzberg M u. a. 2003; Glicklis R u. a. 2000; Glicklis R u. a. 2004).

Auch in unserer Studie kann man angedeutet anhand der PAS Färbung den Vorteil von Zellsphroiden erkennen. Im Versuch AIV waren nach 132 Stunden Zellkulturdauer Glykogen positive und negative Zellverbände erkennbar. Zellverbände, deren Zellmembranen miteinander verschmelzten und so funktionelle Einheiten bildeten, zeigten vermehrte Glykogenspeicherung. Zellgruppierungen mit funktionellen Einzelzellen waren hingegen nach 132 Stunden Zellkultur Glykogen negativ (vgl. Abbildung AIV.2).

In der 96-Well Kultur zeigte sich bereits an Tag 1 eine vom Polymerrand zur Polymermitte hin abnehmende Glykogenspeicherung (Abbildung BI/II.3.a). Am 7. Kulturtag waren großflächige Hepatozytenareale nur noch schwach positiv gefärbt (Abbildung BI/II.3.b). Ursächlich könnten hier, wie bereits oben erläutert, Probleme der Hydrophobie sein. Aber auch mangelnde Zell-Zell und Zell-Matrixinteraktionen könnten zu einer Dedifferenzierung mit negativer Glykogenspeicherung geführt haben. Neben den oben erwähnten Optimierungen bezüglich des Polymers und der Hydrophilierung könnten auch häufigere Medienwechsel einer nutritiven Mangelversorgung entgegenwirken. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass es durch die mechanische Manipulation eines Medienwechsels zu erhöhten Abschwimmraten kommen kann.

6.7. Immunfluoreszenz

Matrizen dienen als 3D Schablonen, um eine Unterstützung für Proliferation, Zellattachement und Differenzierung der Hepatozyten in der in vitro Zellkultur zu bieten. Daher haben wir eine Reihe von Immunfluoreszenzen etabliert, um die Strukturen des Zytoskelettes, Differenzierung, Zell-Zell Interaktionen und Cytochromausprägung darzustellen. Cytokeratin 18 und DAPI färben intakte Intermediärfilamente des Zytoskelettes (CK18) sowie den intakten Zellkern (DAPI). In Doppelfärbungen konnten so übersichtlich intakte Zellgerüste dargestellt werden. HNF-4 ist ein wichtiger hepatozytenspezifischer nuklearer Transkriptionsfaktor, welcher essentiell ist für die Herstellung und Erhaltung von leberspezifischen Genexpressionen (Dean S u. a. 2010; Li J u. a. 2000; Lindros KO u. a. 1997; Schremm H u. a. 2002). Connexin 32 ist ein Hauptbestandteil des Gap junction Proteins und ein Marker für Zell-Zell Verbindungen, welches in differenzierten Hepatozyten für Zell-Zell Interaktionen spricht (Piechocki MP u. a. 2000). Cytochrome P450 sind Hämproteine mit enzymatischer Aktivität, welche besonders in der Leber vorkommen. Cytochrome leisten einen wichtigen Beitrag zur Verstoffwechslung von wasserunlöslichen Stoffen

(Biotransformation) durch Oxidation. Ihre Aufgabe in der Phase I Reaktion besteht darin, molekularen Sauerstoff in eine reaktive Form zu überführen und diesen in die Substrate einzubauen. Dadurch sind Cytochrome neben anderen Funktionen ebenfalls essentiell für die Entgiftungsfunktion und den First-Pass Effekt der Leber. Daher spielen sie eine zentrale Rolle in der ADMET Forschung

Unsere Ergebnisse der Immunfluoreszenz am 7. Kulturtage zeigen Hepatozyten mit intaktem Zytoskelett und Zellkern, was an den positiven CK18 und DAPI Färbungen ersichtlich ist (vgl. Abbildung BI/II.4.A1). In Abbildung BI/II.4.C sind die Ergebnisse der Co32/CK18 Doppelfärbung zu sehen. Hier zeigen sich Hepatozyten ebenfalls mit intaktem Intermediärfilament. Zell-Zell Kontakte sind durch die rote Färbung des Gap junction Proteins Connexin 32 ersichtlich. Auch der Hepatozyten spezifische Transkriptionsfaktor HNF-4 färbt sich am 7. Zellkulturtage positiv, was ein Marker für differenzierte Hepatozyten zu diesem Zeitpunkt ist (vgl. Abbildung BI/II.4.B). Cytochrome P450 sind am 7. Kulturtage nicht nachweisbar. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass in konventionellen 2D Kulturen ein rascher Verlust der Cytochrom Induktion als Ausdruck einer Dedifferenzierung gewertet wurde (Shen C & Meng Q 2012; Hewitt NJ u. a. 2007; Tuschl G & Mueller SO 2006; Donato MT & Castell JV 2003). Hier zeigen eigentlich 3D Kulturen ihre Stärke, da sie längere Differenzierung mit der Möglichkeit zur Induktion der Cytochrom Expression bieten. Auch in Studien unserer eigenen Arbeitsgruppe mittels Nanofibrous PLLA Matrizen konnten diese Vorteile gezeigt werden (Bierwolf J u. a. 2011). In den Ergebnissen dieser Arbeit muss die fehlende Antikörperreaktion gegen Cytochrome P450 am 7. Zellkulturtage kein eindeutiger Beweis für eine Dedifferenzierung der Hepatozyten bedeuten. Da in unserer Studie keine spezifische Cytochrome Induktion stattgefunden hat, können die Ergebnisse der Cytochrom Fluoreszenz nicht als Marker für eine Dedifferenzierung gewertet werden. Genauere Untersuchungen der Cytochrome P450 mit Subgruppenanalysen wurden mittels Real-Time PCR Analysen durchgeführt (siehe unten). Positive HNF-4 und Co32 Färbungen beweisen eher das Vorliegen von hepatozytenspezifischen Faktoren mit Zell-Zell Verbindungen am 7. Zellkulturtage. Um genauere Aussagen über das cytochrome Verhalten mit Subgruppenanalysen zu treffen müssten Induktions- und Inhibitionsversuche im weiteren Verlauf folgen.

6.8. DNA

Die quantitative Messung der DNA Konzentrationen ist im 24 sowie im 96-Well Format möglich. Nachdem eine Standardkurve mit fünf verschiedenen Zellisolierungen mit einer Vitalität über 80% und Mindestzellzahl von $E+08$ erstellt wurde, konnte anhand dieser

zuverlässig die Zellzahl errechnet werden. Der Vergleich der Versuche AIII und AIV zeigt zu Beginn wie zum Ende der Zellkultur höhere Zellzahlen in AIV (vgl. Tabelle 5). Dies könnte aus der verbesserten Hydrophilierung in Versuch AIV resultieren (30min. Aqua dest. in AIII vs absteigender Alkoholreihe in AIV). Jedoch darf nicht vernachlässigt werden, dass die Ausgangsvitalität in AIII geringer als in AIV war (AIII 66% vs AIV 87%). Im 96-Well Format sind die gesammelten Optimierungen ersichtlich. Verbesserte Besiedlungseffizienz durch Zentrifugation, hydrophilere Polymerstruktur durch Vorbehandlung in einer absteigenden Alkoholreihe zusammen mit einer erstmalig verwendeten ovalären Well Form, welche ein größtmögliches Testvolumen erzielt, erbrachten die höchsten Zellzahlen zu Beginn wie zum Ende der Zellkultur (vgl. Tabelle 5 und Diagramm 3).

Bei genauer Betrachtung der Zellzahlen im Verlauf der 96-Well Kultur gibt es ebenfalls Unterschiede zwischen 2mm (BI/II.1) und 3mm (BI/II.2) Polymerdicken. Die DNA Konzentrationen an Tag 1 im 3mm Polymer (11,56µg) sind höher als im 2mm Polymer (8,951µg). Jedoch ist der Abfall der DNA Konzentration bis zum Ende der Zellkultur ebenfalls im 3mm Polymer mit 87,26% höher als im 2mm Polymer mit 71,58%. Dies könnte erahnen lassen, dass in dickeren Polymerstrukturen die nutritive Versorgung nicht ausreichend ist und dadurch die Zellzahlen drastischer fallen. Da unsere Werte diesbezüglich jedoch statistisch nicht signifikant sind, müssten in Zukunft noch weitere Tests erfolgen, um diese Hypothese zu belegen.

6.9. RNA und Real-Time PCR

Bei der Entwicklung neuer Pharmaka spielen ADMET-Studien eine wichtige Rolle. Gerade die Frage nach Toxizität und Metabolismus neuer Pharmakologika sind von besonderem Interesse im Rahmen der Pharmakokinetik. Hierbei spielt die Leber und der First-Pass Effekt eine entscheidene Rolle. Der Arzneimittelmetabolismus als wichtigste Determinante der Arzneimittelclearance wird hauptsächlich hepatogen durch die Cytochrome P450 Enzyme gesteuert (Zuber R u. a. 2002). Aufgrund der polymorphen und induzierbaren Expressionen der Cytochrome sind hierbei interindividuelle Unterschiede möglich.

Aufgrund der schnelleren Dedifferenzierung und schlechteren Induzierbarkeit der 2D Hepatozytenkultur waren in der Vergangenheit nur schlechte Vergleiche der in vitro mit der in vivo Situation möglich (Shen C & Meng Q 2012). Zudem ist eine Downregulierung der Cytochrome ab dem dritten Zellkulturtag als eine Konsequenz der Dedifferenzierung anzusehen (Donato MT & Castell JV 2003; Hewitt NJ u. a. 2007; Tuschl G & Mueller SO 2006). Die 3D Hepatozytenkulturen zeigten aufgrund längerer Differenzierung der Zellen und

besserer Vergleichbarkeit der Reaktionen auf CYP-Inhibition und Induktion im in vitro- zum in vivo Modell Vorteile zur 2D Kultur (Shen C & Meng Q 2012).

In unserer Studie verwendeten wir die quantitative Real-Time PCR zur Beurteilung leberspezifischer Genexpressionen. Die Expressionen wurden im Vergleich zum stabilen Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Bevor jedoch eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt werden konnte, musste zunächst die RNA aus den Hepatozyten isoliert werden. Falls genug RNA Material vorhanden war ca. 400ng pro Polymer, konnte eine Umschreibung von RNA in cDNA erfolgen.

Im 24-Well Format (Versuch AIV) konnte gezeigt werden, dass eine RNA Isolierung möglich ist. Die Gesamtkonzentration der RNA in der 3D Kultur betrug zum Zeitpunkt 60 Stunden 501ng und stieg bis zum Zeitpunkt 132 Stunden auf 889,5ng (vgl. Tabelle AIV.4). Damit konnte gezeigt werden, dass die RNA Konzentrationen in der 3D Zellkultur ausreichten, um eine rtPCR Analyse durchzuführen. Zudem war in der 3D Kultur deutlich mehr RNA zu isolieren als in der 2D Kultur (vgl. Tabelle und Diagramm AIV.4). In der 2D Kultur betrugen die Werte zum Zeitpunkt 60 Stunden 60ng und zum Zeitpunkt 132 Stunden 64ng und waren daher nicht zu weiteren rtPCR Analysen geeignet.

Auch im 96-Well Format (Versuch BI/II) konnte an Tag 1 und 7 genug RNA isoliert werden, um ein Umschreiben in cDNA vorzunehmen. Es scheint einen Vorteil von 3mm Polymeren zu 2mm Polymeren zu geben. Bei Betrachtung der Ergebnisse (vgl. Tabelle VBI/II.5 und Diagramm VBI/II.4) konnten wir feststellen, dass eine Umschreibung in cDNA wegen zu geringer RNA Konzentration am 7. Zellkulturtag bei den 2mm Polymeren (VBI.1) nicht möglich war. Da diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant sind, müssten diese Indizien erst durch weitere Studien belegt werden.

Die Genexpressionsanalyse für Albumin zeigte über den gesamten Zellkulturverlauf nachweisbare Gene, auch wenn sie vom 1. Kulturtag zum 7. Kulturtag abnehmend waren. Damit bestätigt die PCR Analyse unsere Überstandsmessungen, die ebenfalls Albuminsekretionen im Überstand über 7 Tage nachweisen konnten (vgl. Tabelle und Diagramm BI/II.1). Auffällig war die Betrachtung der Genexpressionen der Subgruppen der Cytochrome P450. Hier zeigte sich ein Wechsel einzelner Subgruppen im Verlauf der sieben tägigen Zellkultur. Während Cyp1a1 und Cyp1a2 am 1. Kulturtag noch expremiert waren, waren an Tag 7 keine (Cyp1a1) bis nur noch geringste (Cyp1a2) Genexpressionen messbar. Umgekehrt verlief es mit den Subgruppen Cyp2b2 und Cyp3a2, welche an Tag 1 keine und an Tag 7 erhöhte Genexpressionen aufwiesen. Generell ist anzumerken, dass wir keine spezifische Cytochrome Induktion vorgenommen haben. Dennoch könnten Bestandteile unseres

Zellkulturmediums diese Ergebnisse erklären. Wichtig ist zu wissen, dass in unserem Zellkulturmedium Dexamethason und Foetal Bovine Serum enthalten sind.

Aus anderen Studien ist bekannt, dass Dexamethason eine Induktion von Cyp3a und 2b Subgruppen erzeugen kann (Maurel P 1996; Lake BG u. a. 1998). In genaueren Subgruppenanalysen an Rattenhepatozyten zeigten Meredith et al, dass eine signifikante Steigerung der mRNA Werte von Cyp2b1, Cyp2b2 und Cyp3a1 durch Dexamethasoninduktion entstehen kann. Desweiteren wurden nur geringe Steigerungen von Cyp3a2 und keine Steigerung von Cyp1a2 und Cyp4a1 Expressionen beschrieben (Meredith C u. a. 2003). Tuschl und Mueller fanden zudem das die Expression von Cyp1a1 mRNA Serum abhängig ist. Sie zeigten, dass in Serumfreien Zellkulturen eine erhöhte Expression von Cyp1a1 messbar ist, während es in Serumbeinhalteten Medien zu einer Reduzierung der Cyp1a1 Expressionen kommt (Tuschl G & Mueller SO 2006).

Fast man diese Studien mit unseren Ergebnissen zusammen, sind die Ergebnisse der wechselnden Cytochrom Subgruppen erklärbar. Die Cyp2b2 und 3a2 sind nur an Tag 7 positiv, da sie durch das im Medium vorhandene Dexamethason induziert werden. Cyp1a2 weist laut Meredith et al nur eine geringe Induzierbarkeit auf, was auch unsere niedrigen Expressionsraten an Tag 7 erklären könnte. Durch das im Medium befindliche Bovine Serum wird das Cyp1a1 inhibiert, was den Expressionsverlust von Tag 1 zum Tag 7 erklären könnte. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die RNA Isolierung und Genexpressionsanalysen mittels rtPCR Verfahren im 96-Well Format möglich sind. Zudem sprechen die Ergebnisse der rtPCR Analysen für differenzierte Hepatozyten am 7. Zellkulturtag. Daher sind auch in vitro Hepatozytenkulturen im 96-Well Format ein ausreichendes Tool, um Expressionsanalysen durchzuführen.

7. Zusammenfassung

Einleitung: Hepatozytenkulturen mittels Tissue Engineering auf Polymergerüsten sind neben ihrer Verwendung in der Transplantationsmedizin auch als in vitro Testsysteme für Arzneimittelentwicklung für ADMET Studien interessant. Tierexperimentelle Forschung und klinische Studien an humanen Probanden sind notwendig, gelten jedoch als teuer und ethisch umstritten. Daher sind in vitro Zellkultursysteme für ADMET Studien als wichtige Alternative zu nennen. Sie zeichnen sich durch Kosteneffizienz, weniger Kontroversität und leichter Durchführbarkeit sowie besserer Reproduktion aus. Aufgrund des ökonomischen Drucks ist die Industrie auf robuste und effektive Testsysteme mit der Möglichkeit eines hohen Durchsatzes angewiesen. Hier sind vor allem 96-Well Systeme als zukunftssträchtig zu nennen. Die Anwendung dieser Kulturen ist in der pharmazeutischen Forschung momentan allerdings noch nicht ausreichend etabliert.

Methoden: Wir nutzten ein modifiziertes synthetisches PLLA Polymer, welches eine hohe Porosität mit Vernetzung zwischen den Poren für bessere Zell-Adhäsion, Migration, Genexpression, Nährstofftransport und Differenzierung bieten sollte. Zunächst wurden aufgrund der neuen Polymerstrukturen Charakterisierungsversuche im 24-Well Format nötig. Nach weiteren Polymer- und Besiedlungsmodifizierungen sowie Etablierungen von Überstandsmessungen, Histologiegewinnung, DNA und RNA Isolation erfolgte die Durchführung der statischen in vitro Hepatozytenkultur im 96-Well Format.

Ergebnis: Im 24-Well Format konnte die 3D in vitro Hepatozytenkultur erfolgreich etabliert werden. In Vorversuchen zeigte sich zunächst eine geringe Besiedlungseffizienz mit hydrophober Polymereigenschaft. Durch die Zentrifugationsbesiedlung und einem zusätzlichen Schritt zur Hydrophilierung des Polymers konnten vollere Polymerstrukturen mit vitalen Hepatozyten in der Histologie erreicht werden. In den Überstandsmessungen konnte über die gesamte Zellkulturdauer Albumin gemessen werden. Zudem wurde in der Etablierungsphase deutlich, dass Vitalitätsmessungen am Überstand durch den WST-1 Umsatztest nicht für unsere Polymerstrukturen geeignet waren. Im 96-Well Format konnte erfolgreich die statische in vitro Hepatozytenkultur durchgeführt werden. Überstandsmessungen sind möglich und zeigten die höchsten Albuminkonzentrationen auch im Vergleich zur 24-Well Kultur. Es konnten mittels DNA Messung Rückschlüsse auf die Zellzahlen gezogen werden. Zudem konnte ausreichend RNA isoliert werden, um eine reverse Transkription in cDNA durchzuführen. Mittels rtPCR sind spezifische Genanalysen (z.B.

Cytochrome P450) in der 96-Well Kultur möglich. In der Immunfluoreszenz konnten am letzten Kulturtag positive Antikörperreaktionen auf hepatozytenspezifische Faktoren (HNF-4), Intermediärfilamente (CK18), Gap junctions (Cx32) und Zellkerne (DAPI) nachgewiesen werden.

Diskussion: Wir konnten zeigen, dass die statische in vitro Hepatozytenkultur auch im 96-Well Format möglich ist und als Tool für ADMET-Studien verwendet werden kann. Trotz geringem Platzangebot konnten ausreichend Zellen kultiviert werden. Genanalysen, Überstandsmessungen, Histologie sowie Immunfluoreszenzen sind in der 3D Kultur im 96-Well Format möglich. Hydrophobe Polymereigenschaften konnten kompensiert werden. Die initial geringe Besiedlungseffizienz konnte gesteigert werden.

8. Literaturverzeichnis

- Aiken J, Cima L & Schloo B, Mooney D, Johnson L, Langer R, Vacanti JP, 1990. Studies in rat liver perfusion for optimal harvest of hepatocytes. *J Pediatr Surg.*, 25(1), S.140–4 discussion 144–5.
- Allen JW, Hassanein T & Bhatia SN, 2001. Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology.*, 34(3), S.447–55.
- Aly HA & Domenech O, 2009. Aroclor 1254 induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in isolated rat hepatocytes. *Toxicology*, 262(3), S.175–83.
- Bazou D, 2010. Biochemical properties of encapsulated high-density 3-D HepG2 aggregates formed in an ultrasound trap for application in hepatotoxicity studies : Biochemical responses of encapsulated 3-D HepG2 aggregates. *Cell Biol Toxicol.*, 26(2), S.127–41.
- Berry MN & Edwards AM, 2000. The Hepatocyte Review. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.
- Berry MN & Friend DS, 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.*, 43(3), S.506–20.
- Bierwolf J, 2011. *Tissue Engineering mittels primärer Hepatozyten auf dreidimensionalen Polymergerüsten*. Kumulative Dissertationsschrift. Hamburg: Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg.
- Bierwolf J, Lutgehetmann M & Deichmann S, Erbes J, Volz T, Dandri M, Cohen S, Nashan B, Pollok JM, 2012. Primary Human Hepatocytes from Metabolic Disordered Children Recreate Highly Differentiated Liver Tissue-like Spheroids on Alginate Scaffolds. *Tissue Eng.*
- Bierwolf J, Lutgehetmann M & Feng K, Erbes J, Deichmann S, Toronyi E, Stieglitz C, Nashan B, Ma PX, Pollok JM, 2011. Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research. *Biotechnol Bioeng.*, 108(1), S.141–50.
- Bissell DM, Hammaker LE & Meyer UA, 1973. Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies. *J Cell Biol.*, 59(3), S.722–34.
- Boyan BD, Hummert TW & Dean DD, Schwartz Z., 1996. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.*, 17(2), S.137–46.
- Cai K, Liu W & Yao K, Yang Z, Li X, Xie H., 2002. Modulation of osteoblast function using poly(D,L-lactic acid) surfaces modified with alkylation derivative of chitosan. *J Biomater Sci Polym Ed.*, 13(1), S.53–66.
- Carlisle ES, Mariappan MR & Nelson KD, Thomes BE, Timmons RB, Constantinescu A, Eberhart RC, Bankey PE., 2000. Enhancing hepatocyte adhesion by pulsed plasma deposition and polyethylene glycol coupling. *Tissue Eng.*, 6(1), S.45–52.

- Chen VJ & Ma PX, 2004. Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials.*, 25(11), S.2065–73.
- Chen VJ, Smith LA & Ma PX, 2006. Bone regeneration on computer-designed nano-fibrous scaffolds. *Biomaterials.*, 27(21), S.3973–9.
- Chesne C, Guyomard C & Chesné C, Guyomard C, Guillouzo A, Schmid J, Ludwig E, Sauter T., 1998. Metabolism of Meloxicam in human liver involves cytochromes P4502C9 and 3A4. *Xenobiotica.*, 28(1), S.1–13.
- Choi L, Kwak SJ & You AJ, Chun HJ, Kim HL, Shim YB, Kim MS, Park KD, 2012. Characterization and Hepatocytes Adhesion of Galactosylated Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Surface. *Macromol Res.*, 20(1), S.93–100.
- Cook AD, Hrkach JS & Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R., 1997. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res.*, 35(4), S.513–23.
- Dash A, Inman W & Hoffmaster K, Sevidal S, Kelly J, Obach RS, Griffith LG, Tannenbaum SR., 2009. Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 10(5), S.1159–74.
- Dean S, Tang JI & Seckl JR, Nyirenda MJ., 2010. Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents. *Gene Expr.*, 14(6), S.337–344.
- Donato MT & Castell JV, 2003. Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clin Pharmacokinet*, 42(2), S.153–178.
- Dunn JC, Tompkins RG & Yarmush ML, 1991. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog.*, 7(3), S.237–45.
- Dvir-Ginzberg M, Elkayam T & Aflalo ED, Agbaria R, Cohen S, 2004. Ultrastructural and functional investigations of adult hepatocyte spheroids during in vitro cultivation. *Tissue Eng.*, 10(11-12), S.1806–1817.
- Dvir-Ginzberg M, Gamlieli-Bonshtein I & Agbaria R, Cohen S., 2003. Liver tissue engineering within alginate scaffolds: effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function. *Tissue Eng*, 9(4), S.757–66.
- Elliot NT & Yuan F, 2011. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci*, 100(1), S.59–74.
- Ellis JK, Chan PH & Doktorova T, Athersuch TJ, Cavill R, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M, Nicholson JK, M D Ebbels T, Keun HC, 2010. Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatin a on the metabolome of cultured primary hepatocytes. *J Proteome Res*, 9(1), S.413–9.
- Elsdale T & Bard J, 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol.*, 54(3), S.626–37.

- Farkas D, Bhat VB & Mandapati S, Wishnok JS, Tannenbaum SR., 2005. Characterization of the secreted proteome of rat hepatocytes cultured in collagen sandwiches. *Chem Res Toxicol.*, 18(7), S.1132–9.
- Gebhardt R, Hengstler JG & Dieter Müller, Reinhild Glöckner, Peter Buening, Britta Laube, Eva Schmelzer, Martina Ullrich, Dietmar Utesch, Nicola Hewitt, Michael Ringel, Beate Reder Hilz, Augustinus Bader, Angelika Langsch, Thomas Koose, Hans-Jörg Burger, Jochen Maas, Franz Oesch, 2003. New Hepatocyte In Vitro Systems for Drug Metabolism: Metabolic Capacity and Recommendations for Application in Basic Research and Drug Development, Standard Operation Procedures. *Drug Metab Rev*, 35(2-3), S.145–213.
- Glicklis R, Merchuk JC & Cohen S, 2004. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnol. Bioeng.*, 86(6), S.672–680.
- Glicklis R, Shapiro L & Agbaria R, Merchuk JC, Cohen S., 2000. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.*, 67(3), S.344–353.
- Gotoh Y, Ishizuka Y & Matsuura T, Niimi S., 2011. Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. *Biomacromolecules.*, 12(5), S.1532–9.
- Griffith LG & Swartz MA, 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7(3), S.211–24.
- Grinnell F & Bennett MH, 1982. Ultrastructural studies of cell--collagen interactions. *Methods Enzymol.*, 82, S.535–44.
- Gross-Steinmeyer K, Stapleton PL & Tracy JH, Bammler TK, Lehman T, Strom SC, Eaton DL, 2005. Influence of Matrigel-overlay on constitutive and inducible expression of nine genes encoding drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes. *Xenobiotica.*, 35(5), S.419–38.
- Guguen-Guillouzo C, Campion JP & Brissot P, Glaise D, Launois B, Bourel M, Guillouzo A., 1982. High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep.*, 6(6), S.625–8.
- Guguen-Guillouzo C & Guillouzo A, 2010. General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications. *Methods Mol Biol.*, 640, S.1–40.
- Guillouzo A, 1998. Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect.*, 106, S.511–32.
- Guillouzo A & Guguen-Guillouzo C, 2008. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(10), S.1279–1294.

- Guillouzo A & Guguen-Guillouzo C, 1986. Isolated and Cultured Hepatocytes. *John Libbey Eurotext, Montrouge and Paris*.
- Hamilton GA, Jolley SL & Gilbert D, Coon DJ, Barros S, LeCluyse EL., 2001. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res.*, 306(1), S.85–99.
- Hertzberg RP & Pope AJ, 2000. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr Opin Chem Biol.*, 4(4), S.445–51.
- Hewitt NJ, Lechon MJ & Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG., 2007. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev*, 39(1), S.159–234.
- Hubbell JA, 1995. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*, 13(6), S.565–76.
- Huhtala A, Pohjonen T & Salminen L, Salminen A, Kaarniranta K, Uusitalo H., 2007. In vitro biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from various ocular tissues: direct contact studies. *J Biomed Mater Res A.*, 83(2), S.407–13.
- Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM & Yaszemski MJ, Mikos AG., 1998. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials.*, 19(15), S.1405–12.
- Ito Y, 1999. Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials.*, 20(23-24), S.2333–42.
- Li J, Ning G & Duncan SA, 2000. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev.*, 14(4), S.464–474.
- Justice BA, Badr NA & Felder RA, 2009. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug discovery today*, 14(1-2), S.102–107.
- Kamihira M, Yamada K & Hamamoto R, Iijima S., 1997. Spheroid formation of hepatocytes using synthetic polymer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 831, S.398–407.
- Kikkawa R, Yamamoto T & Fukushima T, Yamada H, Horii I., 2005. Investigation of a hepatotoxicity screening system in primary cell cultures --,what biomarkers would need to be addressed to estimate toxicity in conventional and new approaches?– *J Toxicol Sci.*, 30(1), S.61–72.
- Kim M, Lee JY & Jones CN, Revzin A, Tae G, 2010. Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes. *Biomaterials.*, 31(13), S.3596–603.
- Koide N, Sakaquchi K & Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Shinji T, Mori M, Tsuji T., 1990. Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Exp. Cell Res.*, 186(2), S.227–235.

- Lake BG, Renwick AB & Cunninghame ME, Price RJ, Surry D, Evans DC., 1998. Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology*, 131(1), S.9–20.
- LeClusye EL, Alexandre E & Hamilton GA, Viollon-Abadie C, Coon DJ, Jolley S, Richert L., 2005. Isolation and culture of primary human hepatocytes. *Methods Mol Biol.*, 290, S.207–29.
- LeClusye EL, Audus KL & Hochman JH, 1994. Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol.*, 266(6 Pt 1), S.C1764–74.
- Lindros KO, Oinonen T & Issakainen J, Nagy P, Thorgeirsson SS., 1997. Zonal distribution of transcripts of four hepatic transcription factors in the mature rat liver. *Cell Biol. Toxicol.*, 13(4-5), S.257–262.
- Lütgehetmann M, 2005. *Optimierung der PLLA Matrix basierten heterotopen Hepatozyten-Transplantation mittels Tissue Engineering, eine Langzeit in vivo Studie*. Dissertation. Hamburg: Fachbereich Medizin der Universität Hamburg. Available at: <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2006/2869/>.
- Ma PX, 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Materialstoday*, S.30–40.
- Ma PX & Choi JW, 2001. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.*, 7(1), S.22–33.
- Ma PX & Langer R, 1999. Fabrication of biodegradable polymer foams for cell transplantation and tissue engineering. *Methods Mol Med.*, 18, S.47–56.
- Ma PX & Zhang R, 1999. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res.*, 46(1), S.60–72.
- Ma PX, Zhang R & Xiao G, Franceschi R., 2001. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res.*, 54(2), S.284–93.
- Mann BK, Tsai AT & Scott-Burden T, West JL., 1999. Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition. *Biomaterials.*, 20(23-24), S.2281–6.
- Martin H, Richert L & Berthelot A, 2003. Magnesium deficiency induces apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *J Nutr.*, 133(8), S.2505–11.
- Maurel P, 1996. The CYP3 family. *Cytochromes P450, Metabolic and Toxicological aspects*, Ioannides C ed, S.pp 241–270.
- Mehrabi A, Fonouni H & Golriz M, Schmied B, Tahmasbirad M, Weitz J, Büchler MW, Zeier M, Schmidt J., 2010. [Living-donor kidney transplantation]. *Chirurg.*, 81(9), S.796–800.

- Meredith C, Scott MP & Renwick AB, Price RJ, Lake BG., 2003. Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, 33(5), S.511–527.
- Mikos AG, Bao Y & Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R., 1993. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res.*, 27(2), S.183–9.
- Nitschke M, Schmack G & Janke A, Simon F, Pleul D, Werner C., 2002. Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res.*, 59(4), S.632–8.
- Olive PL & Durand RE, 1994. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.*, 13(2), S.121–138.
- Page JL, Johnson MC & Olsavsky KM, Strom SC, Zarbl H, Omiecinski CJ., 2007. Gene expression profiling of extracellular matrix as an effector of human hepatocyte phenotype in primary cell culture. *Toxicol Sci.*, 97(2), S.384–97.
- Piechocki MP, Toti RM & Fernstrom MJ, Burk RD, Ruch RJ., 2000. Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin32. *Biochim. Biophys. Acta*, 1491(1-3), S.107–122.
- Pollok JM, 2003. Engineering of liver tissue within a dynamic flow culture bioreactor for transplntation. *University Medical Center Hamburg-Eppendorf*.
- Pollok JM, Kluth D & Cusick RA, Lee H, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R, Broelsch CE, Vacanti JP, 1998. Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions. *Eur J Pediatr Surg.*, 8(4), S.195–9.
- Provin C, Takano K & Sakai Y, Fujii T, Shirakashi R., 2008. A method for the design of 3D scaffolds for high-density cell attachment and determination of optimum perfusion culture conditions. *J Biomech.*, 41(7), S.1436–49.
- Reichmann E, Gobet R & Schneider J, 2005. Tissue Engineering: Utopie oder Realität? *Journal für Urologie und Urogynäkologie*, 12(3), S.24–26.
- Richert L, Binda D & Hamilton G, Viollon-Abadie C, Alexandre E, Bigot-Lasserre D, Bars R, Coassolo P, LeCluyse E, 2002. Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 16(1), S.89–99.
- Rogiers V & Vercruysse A, 1993. Rat hepatocyte cultures and co-cultures in biotransformation studies of xenobiotics. *Toxicology*, 82(1-3), S.193–208.
- Sahi J, Grepper S & Smith C, 2010. Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport and safety evaluations in drug discovery. *Curr Drug Discov Technol.*, 7(3), S.188–98.
- Santos DM, Santos MM & Viana RJ, Castro RE, Moreira R, Rodrigues CM., 2009. Naphtho[2,3-d]isoxazole-4,9-dione-3-carboxylates: potent, non-cytotoxic, antiapoptotic agents. *Chem Biol Interact.*, 180(2), S.175–82.

- Schremm H, Klempnauer J & Borlak J, 2002. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol. Rev.*, 54(1), S.129–158.
- Schutte M, Fox B & Baradez MO, Devonshire A, Minguez J, Bokhari M, Przyborski S, Marshall D., 2011. Rat primary hepatocytes show enhanced performance and sensitivity to acetaminophen during three-dimensional culture on a polystyrene scaffold designed for routine use. *Assay Drug Dev Technol*, 9(5), S.475–486.
- Seglen PO, 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 13, S.29–83.
- Seglen PO., 1972. Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp Cell Res*, 74(2), S.450–4.
- Shen C & Meng Q, 2012. Prediction of cytochrome 450 mediated drug-drug interactions by three-dimensional cultured hepatocytes. *Mini Rev Med Chem*.
- Shitara Y, Nagamatsu Y & Wada S, Sugiyama Y, Horie T., 2009. Long-lasting inhibition of the transporter-mediated hepatic uptake of sulfobromophthalein by cyclosporin a in rats. *Drug Metab Dispos.*, 37(6), S.1172–8.
- Thomson RC, Yaszemski MJ & , Powers JM, Mikos AG., 1995. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *J Biomater Sci Polym ED*, 7(1), S.23–38.
- Török E, Pollok JM & Ma PX, Kaufmann PM, Dandri M, Petersen J, Burda M-R, Kluth D, Perner F, Rogiers X, 2001. Optimization of Hepatocyte Spheroid Formation for Hepatic Tissue Engineering on Three-Dimensional Biodegradable Polymer within a Flow Bioreactor prior to Implantation. *Cells Tissues Organs*, 169(1), S.34–41.
- Török E, Pollok JM & Ma PX, Kaufmann PM, Dandri M, Petersen J, et al, 2002. Pre-implantation Optimization of Culture Conditions for Hepatocytes in a Flow Bioreactor for Hepatic Tissue Engineering on 3-dimensional Biodegradable Polymers. *Zentralblatt für Kinderchirurgie*, 11, S.188–194.
- Török E, Vogel C & Török E, Vogel C, Lütgehetmann M, Ma PX, Dandri M, Petersen J, Burda MR, Siebert K, Düllmann J, Rogiers X, Pollok JM, 2006. Morphological and functional analysis of rat hepatocyte spheroids generated on poly(L-lactic acid) polymer in a pulsatile flow bioreactor. *Tissue Eng*, 12(7), S.1881–90.
- Tuschl G & Mueller SO, 2006. Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes-cell morphology and differential gene expression. *Toxicology*, 218(2-3), S.205–215.
- Vacantie JP, 1988. Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture. *Arch Surg.*, 123(5), S.545–9.
- Wan Y, Fang Y & Wu H, Cao X, 2007. Porous polylactide/chitosan scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.*, 80(4), S.776–89.
- Wang K, Shindoh H & Inoue T, Horii I., 2002. Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *J Toxicol Sci.*, 27(3), S.229–37.

- Wei G & Ma PX, 2009. Partially nanofibrous architecture of 3D tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.*, 30(32), S.6426–34.
- Woo KM, Chen VJ & Ma PX, 2003. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A.*, 67(2), S.531–7.
- Woo KM, Jun JH & Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM, Kim GS, Somerman MJ, Ma PX., 2007. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials.*, 28(2), S.335–43.
- Wu XB, Peng CH & Huang F, Kuang J, Yu SL, Dong YD, Han BS., 2011. Preparation and characterization of chitosan porous microcarriers for hepatocyte culture. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.*, 10(5), S.509–15.
- Liu X, LeClusye EL & , Brouwer KR, Gan LS, Lemasters JJ, Stieger B, Meier PJ, Brouwer KL., 1999. Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol.*, 277(1), S.G12–21.
- Liu X, Won Y & Ma PX, 2005. Surface modification of interconnected porous scaffolds. *J Biomed Mater Res A.*, 74(1), S.84–91.
- Li Y, Qi XM & Xue X, Wu XF, Wu YF, Chen M, Xing GZ, Luan Y, Ren J., 2009. The relationship between diphenylamine structure and NSAIDs-induced hepatocytes injury. *Toxicol Lett*, 186(2), S.111–4.
- Yang TH, Miyoshi H & Ohshima N, 2001. Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocyte culture in porous scaffold. *J Biomed Mater Res.*, 55(3), S.379–86.
- You ES, Jang HS & Ahn WS, Kang MI, Jun MG, Kim YC, Chun HJ, 2007. In Vitro Biocompatibility of Surface-Modified Poly(DL-lactide-co-glycolide) Scaffolds with Hydrophilic Monomers. *J. Ind. Eng. Chem.*, 13(2), S.219–224.
- Zhang R & Ma PX, 2000. Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *J Biomed Mater Res.*, 52(2), S.430–8.
- Zuber R, Anzenbacherová E & Anzenbacher P, 2002. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J. Cell. Mol. Med.*, 6(2), S.189–198.

9. Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Dr. med. Jörg-Matthias Pollok für die großartige Betreuung, die Hilfe und nicht zuletzt für die Überlassung des Themas. Er hat mich unterstützt und mein wissenschaftliches Denken gefördert. Bei Fragen und Problemen war er stets ansprechbar. Seine schnellen und gezielten Überarbeitungsvorschläge waren sehr hilfreich beim Fertigstellen der Dissertationsschrift.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen im Labor. Dr. Jeanette Bierwolf, Dr. Marc Lütgehetmann und Johannes Erbes. Dr. Jeanette Bierwolf als wissenschaftliche Leiterin war stets das Rückrat im Labor. Durch ihr wissenschaftliches Denken sowie ihre Persönlichkeit hat sie unsere Projekte stets nach vorne getrieben und auch Nachtschichten zum „Zellen füttern“ waren nie ein Hindernis. Dr. Marc Lütgehetmann war als externer Betreuer bei Fragen und Problemen immer ansprechbar. Seine Beratung in praktischen Fragen des Laboralltags sowie kritische Diskussionen halfen uns sehr beim Aufbau des Versuchskonzeptes. Auch meinem Kompagnon und engen Freund Johannes Erbes gilt natürlich viel Dank. Die gemeinsame Laborarbeit hat durch ihn auch in frustrierten Zeiten immer viel Spaß gemacht.

Nicht zuletzt möchte ich mich in ganz besonderem Maße bei meiner Familie bedanken. Meiner Mutter Birgit Deichmann, meinem leider verstorbenen Vater Dr. Eckhard Deichmann, meinem großen Bruder Dr. Thorsten Deichmann und meiner kleinen Schwester Sandra Deichmann. Ohne den familiären Zusammenhalt auch in schwierigsten Zeiten wäre ich nicht dorthin gekommen, wo ich jetzt stehe. Meinen Eltern die mich in meiner schulischen sowie universitären Ausbildung immer unterstützt und zu manchen Zeiten auch ein bisschen gestupst haben, gilt besonderer Dank.

10. Lebenslauf

	Persönliche Daten *04.Mai 1981, in Aachen ledig, keine Kinder
2001	Schulische Ausbildung und Grundwehrdienst Abitur an der Mies van der Rohe Schule Aachen
2001 – 2002	Instandsetzungs- und Unterstützungskompanie Aachen
	Berufsausbildung
2002 – 2003	Ausbildung zum Rettungsassistent
	Studium
2004 – 2006	Studium der Humanmedizin, Universität Szeged, Ungarn
2006 – 2010	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
11/2010	Approbation als Arzt
	Praktisches Jahr
1. Tertial	Innere Medizin am Klinikum Nordfriesland
2. Tertial	Chirurgie an der Asklepios Klinik Altona
3. Tertial	Anästhesie am Bundeswehrkrankenhaus Hamburg
	Promotion
seit 06/2007	Experimentelle Forchung am Zentrum für Innere Medizin, Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf Doktorvater: PD Dr. med. Dr.phil. Jörg-Matthias Pollok
	Ärztliche Tätigkeit
seit 03/2011	Universitätsklinikum Schleswig – Holstein, Campus Lübeck, Klinik für Chirurgie, Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

Publikationen:

Bierwolf J, Lutgehetmann M, Deichmann S, Erbes J, Volz T, Dandri M, Cohen S, Nashan B, Pollok JM

Primary human hepatocytes from metabolic-disordered children recreate highly differentiated liver-tissue-like spheroids on alginate scaffolds.

Tissue Eng Part A. 2012 Jul; 18(13-14):1443-53. Epub 2012 Jun 27.

Bierwolf J, Lutgehetmann M, Feng K, Erbes J, Deichmann S, Toronyi E, Stieglitz C, Nashan B, Ma PX, Pollok JM

Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research.

Biotechnol Bioeng. 2011 Jan; 108(1):141-50.

Poster:

Deichmann S, Bierwolf J, Erbes J, Cohen S, Kaminer Y, Nashan B, Lütgehetmann M, Pollok J.-M

Tissue Engineering von humanen Leberzellen auf alginatbasierten, dreidimensionalen Polymergerüsten

Transplantationsmedizin, 20. Workshop für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie, Wilsede 2009 Jun.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: