

**Selektive Detektion von Hepatozyten und Sinusoidalen
Leberendothelzellen in einem Zellsheetlayersystem durch
Antikörper-basierte Immunfluoreszenz**

Bachelorarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science
des Studiengangs „Biotechnische Chemie“
der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

Verfasser: Ting Xie

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Schober
apl. Prof. Dr. rer. nat. habil. Uwe Ritter
Dr. Dana Brauer

Prüfungsdatum: 15.11.2019

Veröffentlichung: Mai 2020

DOI: 10.22032/dbt.40534

URN: urn:nbn:de:gbv:ilm1-2020200195

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Grobaufbau der Leber.....	1
1.2 Feinaufbau der Leber.....	1
1.3 Funktion von Hepatozyten und sinusoidaler Endothelzellen	2
1.4 Leber-Kokultur.....	4
1.5 Komplexere Kokultursysteme und Zellsheetlayersystem	4
1.6 upcyte® Hepatozyten und sinusoidale Leberendothelzellen.....	6
2 Zielstellung.....	6
3 Material und Methoden	7
3.1 Material.....	7
3.2 Methoden.....	8
3.2.1 Thermoformen der Cell-Sheet-Layer.....	8
3.2.2 Zellkultur	9
3.2.2.1 Zelltypen.....	10
3.2.2.2 Passagieren	10
3.2.3 Präparieren und Besiedelung der CSL.....	11
3.2.4 Immunfluoreszenz	12
3.2.4.1 Immunfluoreszenz mit verschiedenen Antikörper-Kombinationen	12
3.2.4.2 Immunfluoreszenz-Färbung auf CSL	14
4 Ergebnisse	15
4.1 <i>Immunfluoreszenzbasierte selektive Detektion von LSECs und Hepatozyten durch Antikörper.....</i>	<i>15</i>
4.1.1 Selektive Detektion der upcyte® LSECs mit einem anti-Stabilin-AK bzw. anti CD 31-AK	

4.1.2	Selektive Detektion der upcyte® Hepatozyten mit einem anti alpha antitrypsin-AK (AAT)	16
4.1.3	Immunfluoreszenzfärbung von Kokulturen von upcyte® Hepatozyten sowie –LSECs mit einem anti alpha antitrypsin-AK (AAT) und einem anti CD31-AK.....	16
4.1.4	Immunfluoreszenzfärbung von Kokulturen von upcyte-Hepatozyten sowie –LSECs mit einem anti Albumin-AK (polyklonal) und einem anti CD31-AK.....	18
4.1.5	Anwendung eines monoklonalen anti Albumin-AK in der selektiven Detektion von Hepatozyten in Hepatozyten/LSEC Kokulturen.....	19
4.1.6	Weitere Reduktion der Unspezifität durch nochmalige Verdünnung des monoklonalen anti-Albumin-AK.....	20
4.2	<i>Selektive Antikörper-basierte Immunfluoreszenzdetektion von LSECs und Hepatozyten auf einem Cellsheetlayersystem (CSL).....</i>	<i>21</i>
4.2.1	Antikörper-basierte Immunfluoreszenzdetektion von upcyte-LSECs und Hepatozyten auf dem CSL.....	21
4.2.2	Überprüfung der Kollagenbindung auf den CSL nach 3D microcontact printing durch Antikörper-basierte Detektion	22
4.2.3	Überprüfung des 3D microcontact printing-Prozesses durch Coomassie Färbung.....	22
4.2.4	Vergleich der Zelladhäsion von HepaRG-Zellen auf neue CSL beschichtet mit Kollagen in wasser bzw. Kollagen in Essigsäure	23
5	Diskussion	24
5.1	<i>Immunfluoreszenzbasierte selektive Detektion von LSECs und Hepatozyten durch Antikörper.....</i>	<i>24</i>
5.2	<i>Selektive Antikörper-basierte Immunfluoreszenzdetektion von LSECs und Hepatozyten auf einem Cellsheetlayersystem (CSL).....</i>	<i>26</i>
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	27
7	Abbildungsverzeichnis	29
8	Literaturverzeichniss	31
Anhang	34

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
3D μ CP	dreidimensionales Mikrokontaktprinting
AK	Antikörper
CD	Clusters of Differentiation
CSL	Cell-Sheet-Layer
ECM	Endothelial Cell Culture Medium
ECM	extrazelluläre Matrix
FEP	Perfluorethylenpropylen; Fluorinated Ethylene Propylen
HPM	Hepatocyte High Performance Medium
LSECs	Liver sinusoidal endothelial cells
MEM	Minimum Essential Medium Eagle (MEM)
PC	Polykarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
pHeps	primäre Upcyte [®] Hepatozyten
PHH	primäre humane Hepatozyten

1 Einleitung

1.1 Grobaufbau der Leber

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan des Menschen und ihr Gewicht beträgt ca. 1,5 kg bei Erwachsenen. Sie wird grob in zwei unterschiedlich große Leberlappen unterteilt. Hierbei ist der rechte Leberlappen größer als der linke Leberlappen [G. Aumüller, et al., 2017]. Die Hauptaufgaben der Leber sind die Speicherung der Kohlenhydrate in Form von Glykogen und deren Freisetzung bei Bedarf. Über die Galleproduktion ist sie in der Lage Stoffwechselprodukte auszuscheiden [A. Faller, 2016]. Zudem werden in der Leber wichtige Proteine, wie beispielweise das Serumprotein Albumin und Gerinnungsfaktoren hergestellt. Des Weiteren befindet sich das Cytochrom-P-450-Enzymsystem in der Leber, welches für die Biotransformation von Giftstoffen und Medikamenten eine wichtige Rolle spielt [A. Faller, 2016].

1.2 Feinaufbau der Leber

Zusammengesetzt ist die Leber aus ca. $5 \cdot 10^5$ - $1,5 \cdot 10^6$ Leberläppchen, welche einen Durchmesser von 1-2 mm aufweisen. Die Leberläppchen weisen in den Querschnitten eine sechseckige Geometrie auf und stehen in einer wabenförmigen Anordnung zueinander, wobei sie durch schwach ausgebildete Bindegewebszüge voneinander getrennt sind. [Vaupel · Schaible · Mutschler, 2015] (Abbildung 1). Bei dem Treffpunkt von drei Leberläppchen befinden sich die Periportalfelder. Diese weisen jeweils einem Ast der Pfortader und einen der Leberarterie auf sowie einen kleinen Gallengang, welche zusammen das sogenannte Glisson-Trias bilden [N. Menche 2016] (Abbildung 1). In der Mitte der Leberläppchen befindet sich die Zentralvene.

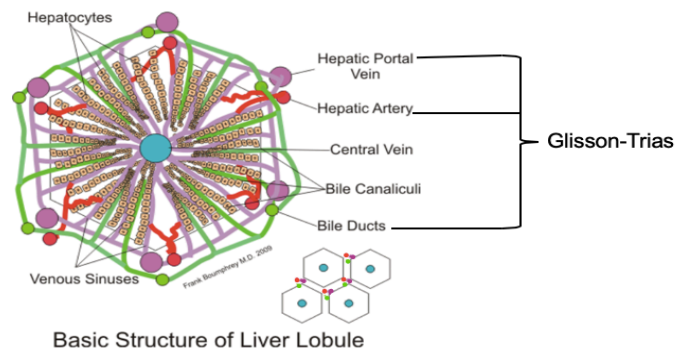


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Zentralvenen-Leberläppchens. Die Glisson-Trias befinden sich jeweils zwischen den Sechsecken, Bild unten rechts. Sie bestehen aus: Kleinem Gallengang (grün), Leberarterie (rot) und Ast der Pfortader (lila) [F. Hans, 1992]

Von der Zentralvene aus verlaufen die Hepatozyten radial in Leberzellbalken. Zwischen den Balken sind die Blutgefäße, welche Lebersinusoiden genannt werden und lückenhaft von Endothelzellen ausgekleidet sind. Sie bilden ein Kapillarsystem. Der Disse-Raum grenzt an das Sinusoid. An den Endothelzellen befinden sich zudem die Kupfer-Sternzellen, welche als Makrophagen Bakterien, Fremdstoffe und Zelltrümmer verdauen. Durch das Kapillarsystem wird das Blut von der Glisson-Trias zur Zentralvene abtransportiert [G. Aumüller, et al., 2017] (Abbildung 2). Der Stoffaustausch zwischen den Hepatozyten und dem Blut wird über Mikrovilli der Hepatozyten realisiert, welche sich bis in den Disse-Raum erstrecken [N. Menche 2016].

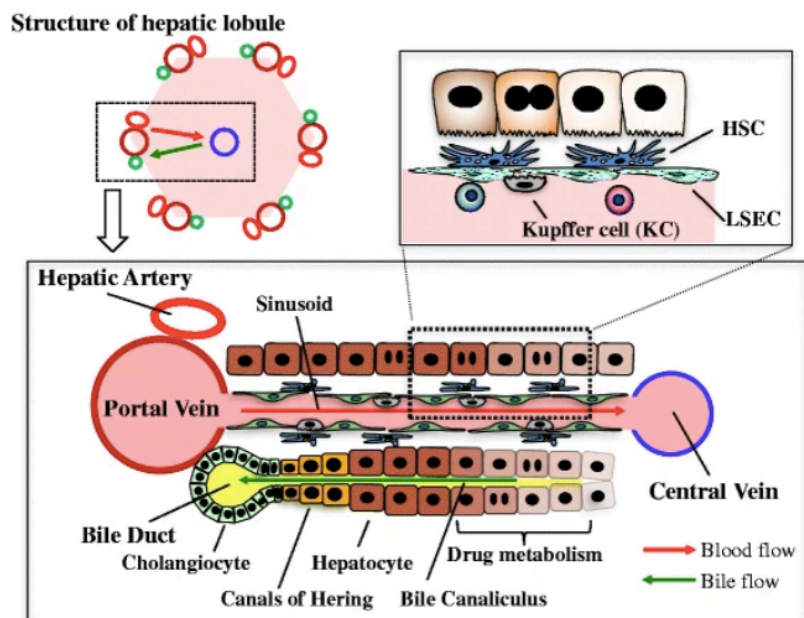


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zentralvenen-Leberläppchens. Das Blut fließt von der Pfortader und der Leberarterie in Richtung der Zentralvene durch die von fenestrierten sinusförmigen Leberendothelzellen (LSECs) umgebene Sinuskurve in die Leber. Von Hepatozyten produzierte Galle wird über die Gallenkanäle, die von der apikalen Hepatozytenmembran umgeben sind, in den Gallengängen gesammelt. Kupfer-Zellen (KC), residente Makrophagen in der Leber, befinden sich auf der luminalen Seite der Sinusoide, während hepatische Sternzellen (HSC) in unmittelbarer Nähe zu LSECs positioniert sind [T. Minoru, 2016].

1.3 Funktion von Hepatozyten und sinusoidaler Endothelzellen

Als Epithelzellen sind Hepatozyten polar organisiert und besitzen daher eine basolaterale und eine kanalikuläre Plasmamembran. Für die kanalikuläre Membran

(Abbildung 3) sind zwei benachbare Hepatozyten notwendig. Zusammen bilden diese einen Gallenkanal, in welchen die Hepatozyten die von ihnen gebildete Galle sezernieren können [P. Kugler, 2017]. Die basolaterale Membran ist dem Disse-Raum und den benachbarten Hepatozyten zugewandt, weshalb sie noch einmal in die sinusoidale (Disse-Raum) und laterale Membran unterteilt werden kann [G. Aumüller, et al., 2017].

Die Hauptaufgaben der Hepatozyten liegen in der Biotransformation von Xenobiotika, der Speicherung von Lipiden und Kohlehydraten sowie der Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel. Der Abbau von Metaboliten wird auch von Hepatozyten durchgeführt [P. Kugler, 2017].

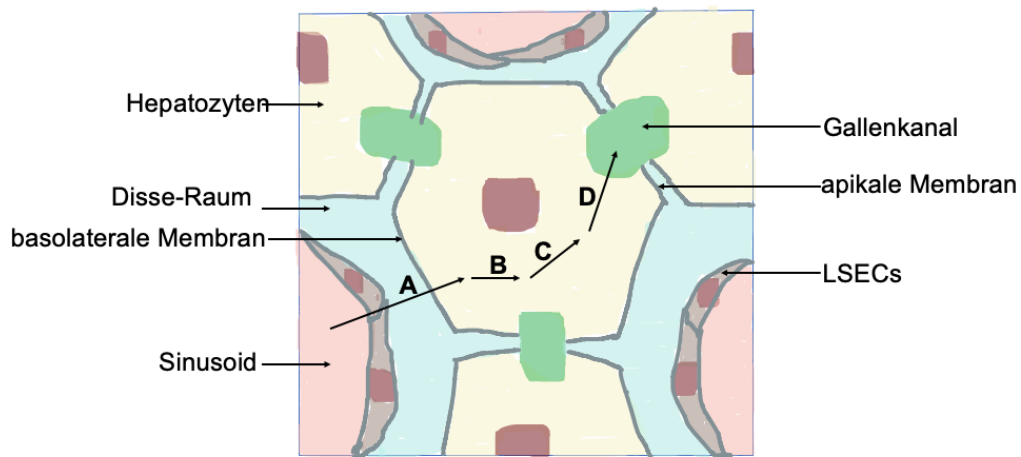


Abbildung 3: Hepatozyten können Stoffe in vier Schritten bearbeiten: A. Aufnahme aus dem Blut über die basolaterale Membran. B. Transport durch die Zelle. C. Abbau oder chemische Modifikation. D. Transport in Gallenkanälchen über die apikale Membran [H. Hinhofer-Szalkay].

Die Lebersinusendothelzellen (LSECs) bilden eine lückenhafte Barriere zwischen dem Blutstrom und den Hepatozyten. Der Stofftransport von den Blutgefäßen zu den Hepatozyten ist durch die Lücken in der Barriere möglich. Neben Matrixproteinen exprimieren die LSECs auch Endozytose-Rezeptoren, welche sie zur rezeptorvermittelten Endozytose befähigen [J. Poisson; 2017]. Charakteristisch für Endothelzellen ist die Expression des CD31-Proteins (CD: Cluster of Differentiation), jedoch mit der Besonderheit, dass diese im Gegensatz zu anderen Endothelzellen auf das Zytoplasma beschränkt ist [DeLeve, 2004].

1.4 Leber-Kokultur

Aufgrund der hohen CYP450-Enzymaktivität der primären humanen Hepatozyten (PHH) gelten diese als besonders geeignet für die Konstruktion menschlicher Lebermodelle [S. Wilkening, 2003]. Die Lebensdauer von primären Hepatozyten ist jedoch begrenzt. Die Kultur mit extrazellulären Matrixproteinen (ECM) führt zwar zu einer Verlängerung der Lebensdauer, allerdings auch zu einem raschen Anstieg der Zellproliferation, was mit einer Einschränkung der CYP450-Enzymaktivität einhergeht [Khetani SR; 2008]. Auch LSECs in einer in vitro Monokultur verlieren innerhalb weniger Tage wichtige Funktionen [March S; 2009]. In verschiedenen Studien konnte bereits festgestellt werden, dass die Kokultivierung von LSECs und PHH zum Aufrechterhalten der Zellfunktionen beitragen. Bei dieser Art der Kokultivierung stehen die beiden Zelltypen nicht im direkten Kontakt zueinander, was eine Simulation des Disse-Raums darstellt. Auf diese Weise konnte der Phänotyp von PHHs über 12 Tage beibehalten werden [Brenton R.Ware, 2017]. Unter Monokulturbedingungen wurde nach vier Tagen der Kultivierung ein Verlust des Phänotyps festgestellt [Y. Kim, 2010]. Für ein in vitro Lebermodell ist es also wichtig Parenchyme (Hepatozyten) und Nicht-Parenchyme (LSECs, Kupffer-Zellen, hepatische Sternzellen) miteinander zu kombinieren um PHH-Funktionen sowie die regenerativen und pathophysiologischen Vorgänge der Leber zu modellieren [T. Tokairin; 2002].

1.5 Komplexere Kokultursysteme und Zellsheetlayersystem

In einem perfundierten Bioreaktorsystem eingeschlossenen, biokompatiblen Zellen-Polycarbonat-Scaffold kann durch einen Mediumfluss eine dem Körper ähnliche Umgebung für primäre humane Hepatozyten geschaffen werden [U. Fernkorn, 2013]. Basierend darauf wurde ein sogenanntes Zell-sheet-Layer-System (cell-sheet-layer, CSL) entwickelt, welches die Struktur von Geweben imitiert. eine Nachahmung der Struktur von Geweben.

Für deren biologische Nutzbarkeit wurde eine Kombination aus Mikrosystemtechnik und Polymerwissenschaften angewandt. Diese Form der Kokultivierung spiegelt die in vivo Bedingungen besser wider als eine herkömmliche 2D-Monokultur [A. Schober, 2013]. Die CSL Struktur wird mit Hilfe eines Thermoformverfahrens auf eine vorgeätzte Polycarbonat-(PC) Folie geformt. Für das Lebermodell werden auf diese Weise 7

nebeneinander angeordnete Leberläppchen nachgeahmt.

In der Abbildung 4 links ist ein fertiges CSL zu erkennen. Mit Hilfe eines Lasers werden in die CSL-Folie spiralförmigen Löcher geschnitten (Abbildung 4, rechts) und dienen der gezielten Perfusion der Sinusoidalstrukturen.

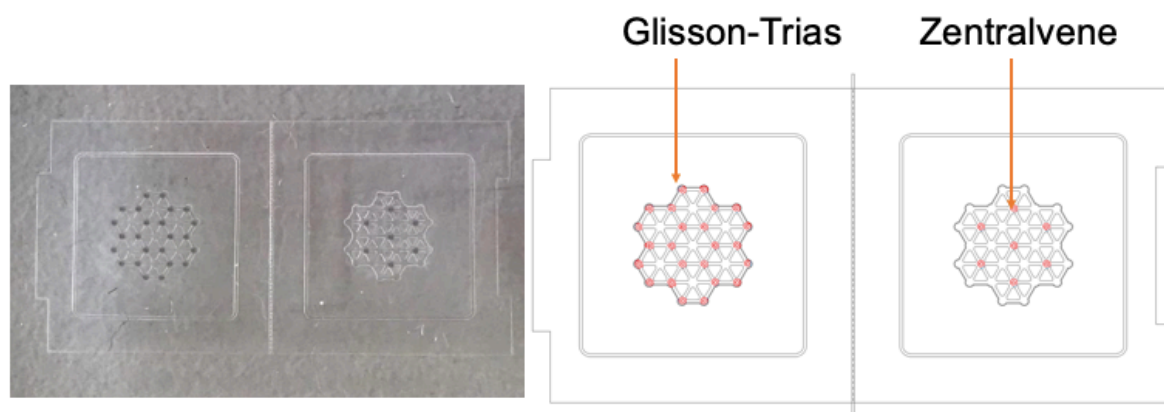


Abbildung 4: Links: CSL-Struktur nach Thermoformen. Rechts: Schematischer CSL-Struktur mit spiralförmigen Durchgängen der Glisson-Trias und der Zentralvene.

Im zusammengefalteten Zustand kann das Medium durch eine Öffnung in die Innenseite der CSL fließen und durch die Kanäle der Innenseite durch einen Durchgang der entgegengesetzten Seite verlassen. Eine 3D Struktur entsteht durch den gefalteten Zustand der CSL. Im Inneren der Kanäle befinden sich die Endothelzellen und die Hepatozyten auf der äußeren Seite (Abbildung 5). Dadurch ist es möglich, dass das Medium ungehindert durch die Kanäle strömt, welche als künstliche Blutgefäße dienen.

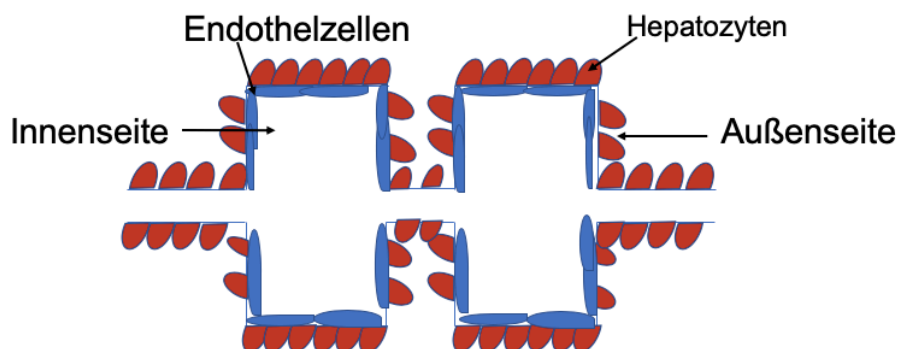


Abbildung 5: Schematischer Querschnitt einer gefalteten CSL.

1.6 upcyte® Hepatozyten und sinuoidale Leberendothelzellen

Upcyte® Hepatozyten (pHeps) ähneln in ihrer CYP450-Aktivität und somit in ihren biotransformatorischen Eigenschaften, den primären humanen Hepatozyten. Im Gegensatz zu PHHs lassen sie sich jedoch in vitro im großen Maßstab kultivieren [G. Levy. et al., 2015]. Die Erzeugung von upcyte® Hepatozyten erfolgt über die upcyte® Technologie.

Die upcyte® Technologie beruht auf der Einschleusung von E6/E7-Genen des humanen Papilloma Virus (HPV 16). Zellen, die eine geringe Expression dieser Gene aufweisen, werden für die upcyte® Zellen ausgewählt. Die Steuerung der Proliferation erfolgt über den OSM-Rezeptors gp 130, welcher durch die Expression der E6 und E7 Gene induziert wird. Bei Onconstatin M (OSM) handelt es sich um ein Mitglied der Interleukin-6-IL-6-Superfamilie, welches an der Hepatozytenregeneration beteiligt ist [G. Levy. et al., 2015].

Upcyte® LSECs wurden von primären LSECs eines einzelnen Spenders abgeleitet. Diese Zellen haben eine verlängerte Lebensdauer und aufgrund der gleichen Technologie und behalten dabei die Eigenschaften der Primärzellen bei [Upcyte Technologies].

2 Zielstellung

Humane Hepatozyten werden häufig zur Untersuchung von Arzneimitteltoxizität, Arzneimittelclearance und Arzneimittelwechselwirkungen verwendet. Aufgrund der schnellen Dedifferenzierung von Hepatozyten in zweidimensionalen Kulturen gehen der Leberphänotyp und die Leberfunktion verloren. 3D- Zellkultursystem können, die in vivo Leberphysiologie besser imitieren.

Zu diesem Zweck wurden Leberzell-Kokultur und Lebermodelle in vitro etabliert. In der vorliegenden Arbeit werden die Hepatozyten und Endothelzellen in einem dreidimensionalen Zellsheetlayersystem (CSL) kokultiviert. Die CSL-Struktur, welche mithilfe der 3D μ -contact printing hergestellt wird, stellt eine Nachahmung der Leberläppchen dar. Das Kultivieren von Zellen in diesen dreidimensionalen Strukturen könnte hierbei zu drastischen phänotypischen Verbesserungen bei den kokultivierten

Zelltypen führen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Antikörper-basierte Immunfluoreszenzdetektionsmethode zu entwickeln, bei der Hepatozyten und LSECs auf den CSL durch Farbstoff-markierte Antikörper selektiv detektiert werden können, ohne unspezifisch an den anderen Zelltyp zu binden. Dies dient zur besseren Charakterisierung des Kokultursystems. Zu diesem Zweck sollten primäre upcyte® Hepatozyten (pHeps) und primäre upcyte® LSECs verwendet werden, welche aufgrund gentechnischer Modifikationen länger proliferieren können. Mithilfe dieser beiden Zelltypen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Immunfluoreszenzdetektionsmethode etabliert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 1: Liste der verwendeten Substanzen

Substanzen	Hersteller	Bezeichnung
Trypsin	Sigma Aldrich	D8662-500ml
MEM	Sigma Aldrich	T4049-500ml
Kollagen Typ I	Sigma Aldrich	M5650-500ml
PBS	Sigma Aldrich	C3867-1VL
BSA	Appllichem	A1391,0100
PFA	Roth	0335.1
Triton®X100	Roth	3051.2
Mowiol	Selfmade	-
DAPI	Sigma Aldrich	D8417
HPM	Upcyte Technologies	MHE003
ECM	Promocell	C-22216
Medium LSEC	Gibco	11111-044
Polycarbonat-Folien	It4ip S.A.	Polycarbonatfolie mit einer Dicke von 50 µm

Tabelle 2: Liste der eingesetzten Geräte

Geräte	Hersteller	Bezeichnung/Funktion
Ozongenerator UV Ozone cleaner	Ossila Ltd	Erhöhung der Hydrophilie von PDMS durch mit UV Licht erzeugtem Ozon
Heizpresse WLP 1600S	Wickert Maschinenbau GmbH	Formen der CSL aus PC Folien
Sterilbank M12	Schulz Lufttechnik GmbH	Behandeln von Zellkulturen/steriles Arbeiten mit Zellkulturen
Brutschrank Forma Series II Water Jacket	Thermo Scientific	Inkubation von biologischem Material; konstante Parameter (37°C, 5 % CO ₂) bereitstellen
Lichtmikroskop Nikon ECLIPSE TS100	Nikon GmbH;	Vergrößerung/Überprüfung von Proben
Casy® TT Cell-Counter Artikel-Nr.: 5651697	Innovatis	Bestimmung von Zellzahl, Zellvitalität, und; Zellaggregation
Zentrifuge 1-15K 5810R	Sigma Eppendorf	Auftrennung von Bestandteilen durch Zentrifugalkraft
Laserscanningmikroskop (LSM)	Olympus	Untersuchung der Zellproben mittels Immunfluoreszenz

3.2 Methoden

3.2.1 Thermoformen der Cell-Sheet-Layer

Aus der Literatur ist ein dreidimensionales Mikrokontaktdruckverfahren (3-dimensional microcontact printing; 3D μ CP) bekannt, welches mit den Mikrotopografien auf der Oberfläche erzeugt wird und die Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) gleichzeitig in die erhaltenen Geometrien überträgt. Durch die Verwendung einer Kombination aus

Mikrokontaktdruck und Mikrothermoformen haben poröse PC-Folien ein großes Potenzial, die grundlegende Organisation des Leberlappens nachzuahmen [J. Borowiec et al., 2018].

Das CSL wird aus einer PC-Folie durch Thermoformen geformt. Objektträger und PDMS Stempel wurden für 15 min in Ethanol und anschließend für 15 min mit destilliertem Wasser in einem Ultraschallbad behandelt. Die gereinigten Objektträger und PDMS Stempel wurden auf einem Reinraumtuch ausgelegt und vorsichtig mit einem anderen Tuch von groben Wasserresten befreit. Im Anschluss wurden sie für eine Mindestdauer von drei Stunden unter einem Abzug getrocknet.

Auf der Rückseite des Objektträgers wurde mit einem Textmarker einer Markierung für die Kollagenapplikation und Stempelpositionierung angebracht. Auf die nicht beschriebene Seite des Objektträgers wurden innerhalb der Markierung für jede Struktur jeweils 50 μL einer Kollagen Typ I Lösung (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit Essigsäure oder Wasser aufgetragen. Die Kollagenlösung wurden für eine Stunde lang getrocknet. Nach Ablauf der Trocknungszeit wurden die Objektträger vorsichtig dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden sie unten einer Fume Haube getrocknet. Währenddessen wurden die PDMS Stempel mit Ozon behandelt, was zu einer Erhöhung der Hydrophilie führt. Nach der Ozonbehandlung wurden die Stempel auf den angehauchten Objektträger gedrückt, um das Kollagen aufzunehmen, und anschließend auf eine poröse PC-Folie überführt.

Die PDMS Stempel wurde angebracht und mittig auf die geschnittenen PC Folie festgedrückt. Die PC-Folien mit PDMS Stempel wurden in einer Heißpresse auf eine Perfluorethylenpropyle-(Fluorinated Ethylene Propylen, FEP) Folie (25 μm Schichtdicke) gelegt. Bei 50 bar und 158°C wurden für 30 s die Struktur auf die PC-Folien übertragen. Anschließend wurde die Folie aus der Maschine entnommen und von den Stempeln getrennt. Die fertigen CSL wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.2 Zellkultur

Alle Primärzellen wurden in sterilen Einweg-Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C in einer

feuchtigkeitsgesättigten, 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre. Alle Arbeiten mit Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, in steriler Atmosphäre d.h. unter einer Sterilbank durchgeführt. Medien, Puffer und Arbeitsgeräte wurden für Zellkulturarbeiten mittels geeigneter Methoden sterilisiert.

3.2.2.1 Zelltypen

Für die Kultivierung dieser Arbeit wurden upcyte® Zellen verwendet. upcyte® Hepatozyten sind expandierte Primärzellen, die von Primärzellen einzelner Spender stammen. upcyte® LSECs wurden von primären LSECs eines einzelnen Spenders abgeleitet. Diese Zellen haben eine verlängerte Lebensdauer und behalten dabei die Eigenschaften der Primärzellen bei. Die HepaRG-Zellen wurden als Kontrolle der Zelladhäsion auf den CSL verwendet. Die HepaRG™ Ursprungszellen wurden aus einem Spender mit Cholangiokarzinom isoliert.

Tabelle 3: Eingesetzte Zellen

Zellen	Anbieter	Donor
upcyte® Hepatozyten	upcyte technologies	462
upcyte® LSECs	upcyte technologies	10-3
Hepa RG	The HepaRG cell line	Zelllinie

3.2.2.2 Passagieren

Nach Erreichen von nahezu vollständiger Konfluenz wurde das Medium von den Zellen abgenommen und verworfen. Die auf der Fläche adhärenen Zellen wurden anschließend mit Trypsin gewaschen, um Reste von Medium und Serum zu entfernen. Danach wurde Trypsin auf die Zellen pipettiert und bei 37°C für 5 min inkubiert, sodass die Zellen sich vom Boden ablösten. Die Zellen wurden in 5% alpha-MEM aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Das Volumenverhältnis von alpha-MEM und Trypsin muss zur Inaktivierung 1:1 sein. Bei Primärzellen wurde anschließend eine Probe für die Zellzahlbestimmung mit dem automatischem Zellzählgeräte Casy entnommen (üblicherweise 50 µL) und die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert (LSECs 600 g, pHeps 90 g). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in der aus der Zellzahl berechneten notwendigen Menge an frischem Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturgefäße ausgesät.

3.2.3 Präparieren und Besiedelung der CSL

Die beiden Teile einer Rahmenapparatur wurden mit jeweils zwei Schrauben für 15 min in Ethanol sterilisiert, mit destilliertem Wasser gesäubert und anschließend unter der Sterilbank getrocknet. Die Rahmenapparatur, Schrauben und CSL wurden unter UV-Licht für 15 min sterilisiert, um diese für die Besiedelung vorzubereiten. Die CSL wurden durch die Rahmenapparatur in den 6-Well-Platten fixiert und gehalten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Seite mit den eingedrückten, mit Kollagen Typ I bedruckten Kanälen (im Folgenden Innenseite genannt) zum klappbaren Oberteil der Rahmenapparatur zeigt, während die Flächen für die Hepatozyten (im Folgenden Außenseite genannt) zum Unterteil der Apparatur gerichtet sind.

Auf die Außenseite der eingespannten CSL wurden jeweils 25 μL einer Kollagen Typ I Lösung in 0,02 M Essigsäure (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur kollagenisiert (0). Die CSL wurden vorsichtig mit jeweils 50 μL destilliertem Wasser 3-mal gewaschen und anschließend in einer 6-Well-Platte mit angehobenem Deckel getrocknet.

Für die Zellkulturversuche mit pHeps und LSECs wurden auf die Außenseite jeweils 50 μL einer ersten Zellsuspension bestehend aus 100 000 pHeps in HPM-Medium aufgetragen. Die Strukturen mit der ersten Zellsuspension wurden zur Adhäsion für 3 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden 2 Mal 25 μL Medium zugesetzt, damit die Zellsuspension nicht antrocknet. Nach 3 h wurden die CSL nach Adhäsion der ersten Zellsuspension für die Besiedelung der Innenseite gedreht (Abbildung 7). Dabei wurden die CSL mit der Rahmenapparatur vorsichtig in 3 ml HPM über Nacht eingetaucht und bei 37°C inkubiert, sodass sich keine Luftblasen auf der Außenseite der CSL ansammeln. Währenddessen blieb die Innenseite trocken.

Am nächsten Tag wurde auf die Strukturen der Innenseite je 50 μL LSECs Zellsuspension aufgetragen. Die 50 μL LSECs Zellsuspension beinhaltete 100 000 LSECs in ECM-Medium. Dabei wurden die CSL mit der Rahmenapparatur für 3 h bei 37°C inkubiert und zwischendurch 2 Mal 25 μL ECM-Medium zugesetzt, um die Zellsuspension vor dem Austrocknen zu bewahren. Nach der Inkubation wurde vom HPM-Medium zu einer 1:1 Mischung aus HPM-Medium und ECM-Medium gewechselt.

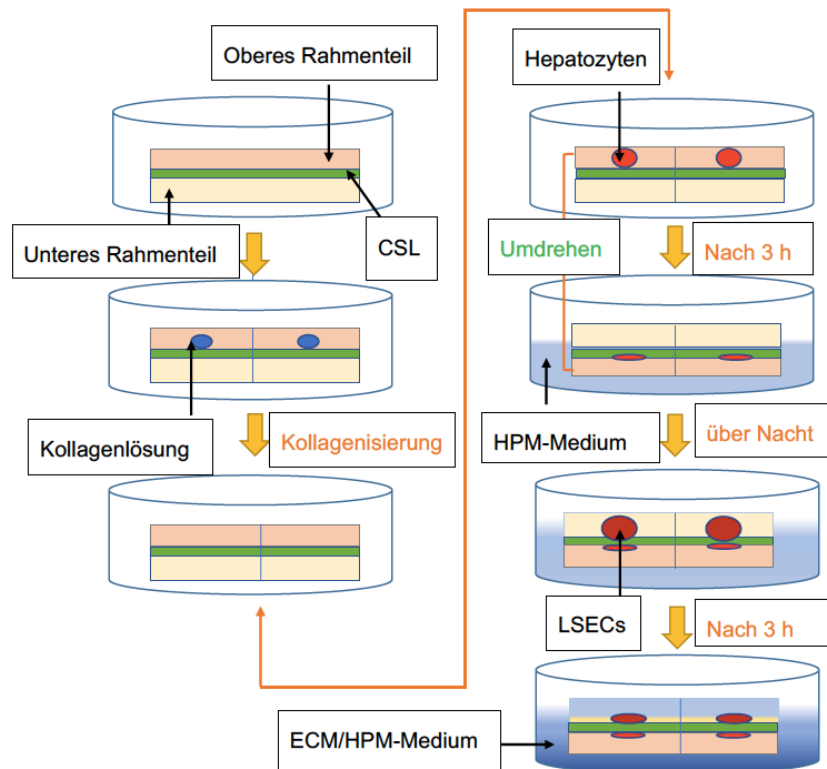


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Präparierung und Besiedlung der CSL. Die Außenseite der CSL ist nach dem oberen Rahmenteil und Die Innenseite ist nach dem unteren Rahmenteil.

3.2.4 Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Immunfluoreszenz beruht darauf, dass man Antigene in Zellen mit spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern detektieren und visualisieren kann. Dabei wird im ersten Schritt mit einem primären Antikörper das gesuchte Antigen über eine Antigen-Antikörper-Bindung markiert. Im zweiten Schritt wird der gebundene primäre Antikörper mit einem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, sichtbar gemacht.

3.2.4.1 Immunfluoreszenz mit verschiedenen Antikörper-Kombinationen

Die Verdünnungen der Antikörper erfolgte mit 1% BSA in PBS. Für eine klare Unterscheidung zwischen LSECs und pHeps ist eine Doppelfärbung mit einem für die jeweiligen Zelltypen spezifischem Antikörper notwendig. Um die beiden Zelltypen unterscheiden zu können, wurden die Doppelfärbung mit anti-CD31 und anti- α -1-Antitrypsin, polyklonalem anti-Albumin und anti-CD31, monoklonalem anti-FITC-

Albumin und anti-CD31 Antikörpern durchgeführt.

Tabelle 4: primäre Antikörper

Name	Antigen	Verdünnung	Bezeichnung	Herkunft
Anti-Stabilin (Maus)	Stabilin LSEC	1:20 1:50 1:100	Stabilin-1 Antibody (4G9) IgG 2a H00023166-M05 Monoclonal	NOVUS
Anti-CD31 (Maus)	CD31 LSEC	1:100	Anti-hPECAM-1 Purified Mouse IgG1 BBA7 Monoclonal	R&D Systems
α -1-Antitrypsin (AAT) (Kaninchen)	α -1- Antitrypsin pHeps	1:50 1:100	ABfinity™ Rabbit 711079 Oligoclonal	Invitrogen
Anti-Albumin (Kaninchen)	Albumin pHeps	1:100	pAb anti-Albumin (Rabbit) NBP1-32458 polyclonal	NOVUS
Anti-FITC- Albumin (Kaninchen)	Albumin pHeps	1:10	68001-R101-F HG08JL2519 monoclonal	Sino Biological Inc.

Tabelle 5: sekundäre Antikörper

Name	Antigen	Verdünnung	Bezeichnung	Herkunft
Alexa Fluor® 647	Maus Antikörper	1:100	Alexa Fluor 647 F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG(H+L)1948992	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor® 488	Rabbit Antikörper	1:100	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L) 1971418	Thermo Fisher Scientific

3.2.4.2 Immunfluoreszenz-Färbung auf CSL

Die CSL wurden 2 Mal mit PBS gewaschen und mit 400 μ L 4% PFA für 15 min fixiert. Anschließend wurden sie mit PBS 1-mal gewaschen und für 15 min in 0.25% Triton X-100 gelagert. Nachdem einmal mit PBS gewaschen wurden, wurden sie für 30 min mit 300 μ L 5% BSA in PBS blockiert. Die CSL wurden erneut mit PBS gewaschen.

Es wurden 25 μ L einer primären AK-Lösung zum Nachweis von CD31 (1: 100 in 1% BSA in PBS Lösung) und FITC-Albumin (1:10 in 1% BSA in PBS Lösung) auf einen Parafilm gegeben. Die CSL wurden mit einer Seite auf den Tropfen gelegt und auf die andere Seite wurde 25 μ L der geeigneten AK-Lösung pipettiert. D.h. die beiden Seiten der CSL wurden mit gleichen oder ungleichen AK-Lösung inkubiert. Die Inkubation erfolgt in Kühlschrank über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die CSL zweimal mit PBS gereinigt. Zur Färbung der sekundären Antikörper wurden 25 μ L einer AK-Lösung pro Struktur auf einen neuen Parafilm aufgetragen und die CSL auf den Tropfen gelegt. Auf die Rückseite wurden ebenfalls 25 μ L der geeigneten AK-Lösung gegeben. Die CSL wurden für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die zugegebenen primären und sekundären Antikörper wurden nach Tabelle 6 angesetzt.

Nach der Inkubation wurden die CSL in Mowiol auf einem Glasplättchen eingelegt und mit weiterem Mowiol bedeckt. Ein Glasplättchen wurde zur Fixierung darauf platziert. Im Anschluss wurden diese nach 24 h Inkubation unter einem Laserscanningmikroskop (LSM) bei einer Wellenlänge von 488 nm für FITC-Albumin oder AlexalFluor 488 und 647 nm für CD31, AAT oder Stabilin betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Immunfluoreszenzbasierte selektive Detektion von LSECs und Hepatozyten durch Antikörper

4.1.1 Selektive Detektion der upcyte® LSECs mit einem anti-Stabilin-AK bzw. anti CD 31-AK

Aktuell wurde ein neuer Stabilin-1 beschrieben, wobei es sich um ein Mitglied einer neueren Familie von Transmembranproteinen handelt, welche spezifisch in LSECs exprimiert werden [B. Hansen, 2005]. CD 31 wird ebenfalls von LSECs exprimiert. Zu Beginn des Versuches wurde zunächst überprüft, ob der Stabilin-spezifische AK und der CD31-spezifische AK für den Nachweis von LSECs geeignet sind. Die Ergebnisse dieses Versuchteils sind in Abbildung 7 abgebildet. Unter Verwendung des CD31-spezifischen AK kommt es zu einer Färbung der LSECs (Abbildung 7, links gelbe Kästchen). Der Stabilin-spezifische Antikörper führt zu keiner Markierung (Abbildung 7, links rote Kästchen) der LSECs. In Abbildung 7 rechts im gelbe Kästchen zeigte sich keine Anfärbung der pHeps mit dem verwendeten CD31-AK. Daraus lässt sich schließen, dass CD31 im Gegensatz zu Stabilin spezifisch für LSECs ist. Die Bilder der durchgeführten Negativkontrolle befinden sich im Anhang. Bei der 2D Monokultur wurden jeweils pHeps bzw. LSECs auf Deckgläschen mit einer Zellzahl von 100.000 Zellen pro Well ausgesät.

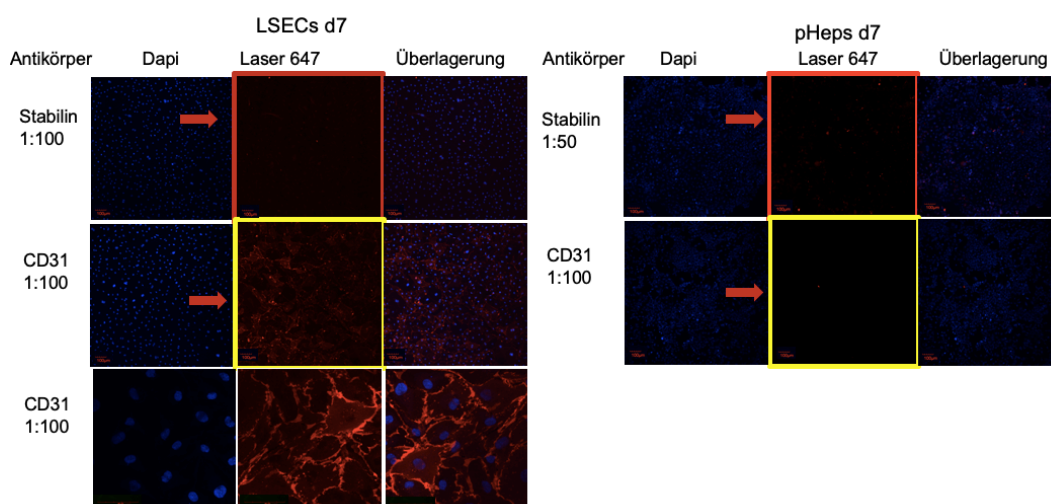


Abbildung 7: Links: Immunfluoreszenzfärbung von upcyte® LSECs mit anti-Stabilin AK 1: 100 und anti-CD 31 AK 1:100. Rechts: Immunfluoreszenzfärbung von upcyte® pHeps mit anti-Stabilin AK 1:50 und anti-CD 31 AK 1:100. (Die Messbarkeit der Bilder in der ersten und zweiten Zeile ist 100µm, die dritte Zeile 50µm)

4.1.2 Selektive Detektion der upcyte® Hepatozyten mit einem anti alpha antitrypsin-AK (AAT)

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass alpha 1-antitrypsin in Hepatozyten exprimiert ist und dass nicht parenchymale Zellen, wie die Endothelzellen nicht über eine AAT1 Expression verfügen [J. Gaudie, 1989]. Dafür wurde ein AAT-spezifischer AK zum Nachweis von pHeps in einer Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Die in der Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutlich grüne Färbung, was auf eine gute Detektion der pHeps mit AAT spezifischem AK in einer Verdünnung von 1:100 hinweist (Abbildung 8, links rote Kästchen). Daraus lässt sich schließen, dass der verwendete AAT-AK spezifisch für die pHeps ist. In Abbildung 8 rechts im roten Kästchen zeigte sich keine Anfärbung der LSECs mit dem verwendeten AAT-AK.

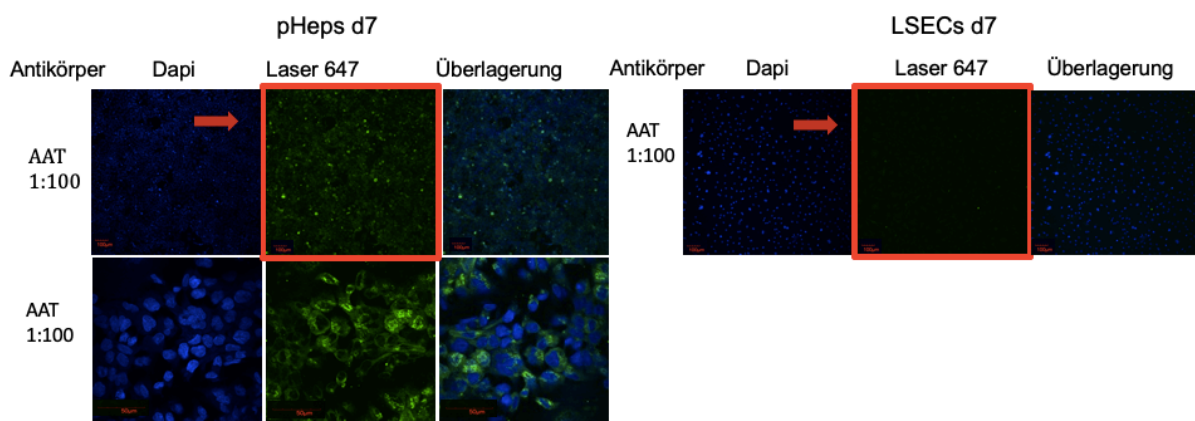


Abbildung 8: Links: Immunfluoreszenzfärbung von Upcyte® Hepatozyten mit anti- α -1-Antitrypsin AK 1:50 und AK 1:100. Rechts: Immunfluoreszenzfärbung von upcyte® LSECs mit anti- α -1-Antitrypsin AK 1:100. (Die Messbarkeit der Bilder in erste Zeile beträgt 100 μ m, die der zweite Zeile beträgt 50 μ m)

4.1.3 Immunfluoreszenzfärbung von Kokulturen von upcyte® Hepatozyten sowie – LSECs mit einem anti alpha antitrypsin-AK (AAT) und einem anti CD31-AK

Die Ergebnisse Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen, dass die Detektion der pHeps mit AAT-spezifischem AK und die der LSECs mit CD31-spezifischer AK vorgenommen werden kann. Für die in der Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse wurden eine Doppelfärbung mit anti AAT-AK und anti CD31-AK auf pHeps und LSECs in einem Kokultur-System durchgeführt. Allerdings färbt der anti AAT-AK am Tag 7 der Monokultivierung auch die LSECs an (Abbildung 9, links rote Kästchen). Daher ist es

schwierig, die zwei Zelltypen durch Immunfluoreszenzfärbung in einem KoKultur-System zu unterscheiden.

Das Kokultur-System in dem blauen Kästchen der Abbildung 9 zeigt, dass eine große Anzahl an LSECs rot angefärbt wurde. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung führte zu einer geringeren Anzahl an rot markierten Zellen, was auf die teilweise Markierung der LSECs durch den ATT zurückzuführen ist (Abbildung 9, lila Kästchen).

Die intensive grüne Färbung die in der Abbildung 9 links (im gelben Kästchen) zu erkennen ist, weist auf eine gute Detektion der pHeps mit AAT sepzifischem AK in einer Konzentration von 1:50 hin. Für die 2D Kokultur wurden jeweils 50.000 pHeps und 50.000 LSECs auf einem Deckgläschen ausgesät.

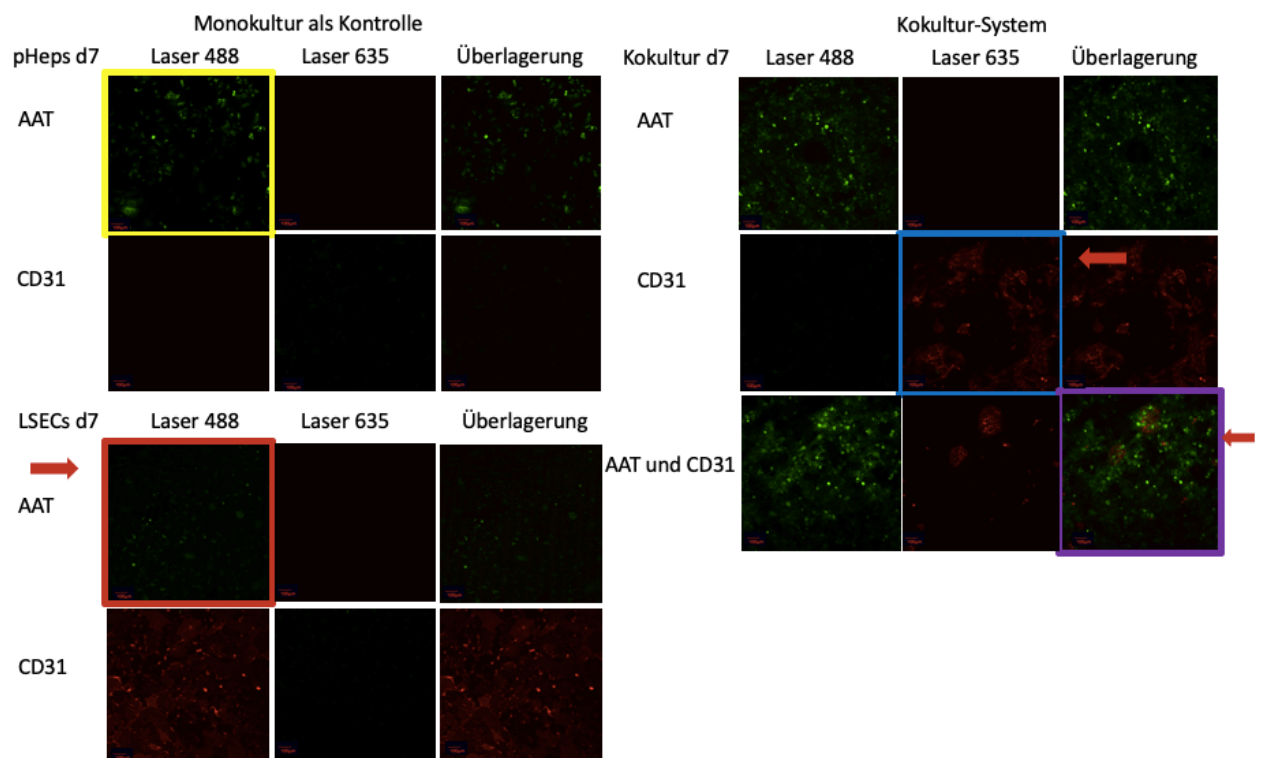


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von Upcyte® Hepatozyten sowie –LSECs mit Anti Alpha Antitrypsin AK 1:50 und Anti CD31 AK 1:100 für Mono- und Kokultur. Das Bilden links zeigt die Immunfluoreszenzfärbung der Monokultur der pHeps und LSECs und rechts Immunfluoreszenzfärbung der Kokultur. (Die Messbarkeit der Bild sind 100µm)

4.1.4 Immunfluoreszenzfärbung von Kokulturen von upcyte-Hepatozyten sowie – LSECs mit einem anti Albumin-AK (polyklonal) und einem anti CD31-AK

Aufgrund der nach 7 Tage der Kultivierung mit anti AAT-AK auftretenden unspezifischen Färbung der LSECs wurden ein weiterer Antikörper für die Detektion von pHeps getestet. Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen anti Albumin-spezifischem polyklonalen Antikörper. Dieser sollte spezifisch an die pHeps binden und somit eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung der beiden Zelltypen ermöglichen. Das Ergebnis der Färbung nach 7 Tagen Kultivierung ist in den Abbildung 10 im roten Kästchen gezeigt. Zu erkennen ist hier, dass auch der anti Albumin (polyklonal) AK in einer Konzentration von 1:100 eine schwache Färbung der LSECs hervorruft. Daraus lässt sich schließen, dass auch dieser Antikörper für Unterscheidung der Zellen in einem Kokultur-System ungeeignet ist. Die grüne Färbung der Zellen, die der Abbildung 10 links im gelben Kästchen zu entnehmen ist, wies zwar die Markierung der pHeps mit dem anti-Albumin (polyklonal) sepzifischem AK (Verdünnung 1:100) auf, allerdings mit einem schwachen Signal.

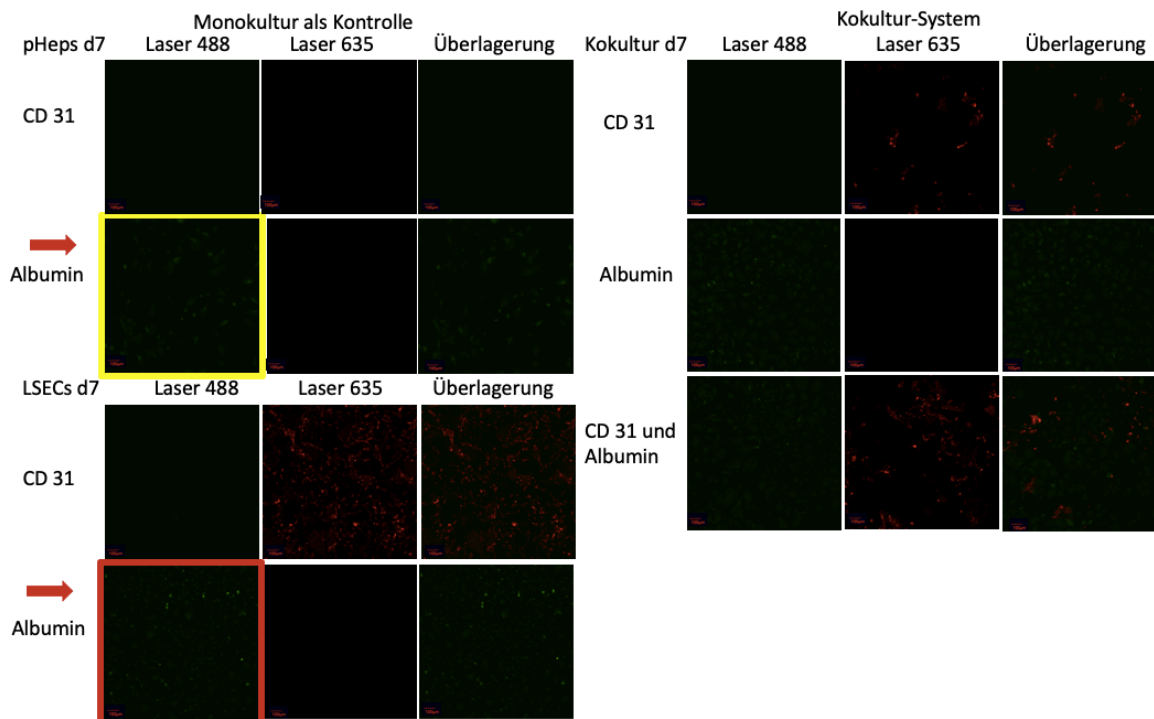


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von Upcyte® Hepatozyten sowie –LSECs mit Anti Albumin AK 1:100 und Anti CD31 AK 1:100 für Mono- und Kokultur. Das Bild links zeigt die Immunfluoreszenzfärbung der Monokultur der pHeps und LSECs und rechts die Immunfluoreszenzfärbung der Kokultur. (Die Messbarkeit der Bild sind 100µm)

4.1.5 Anwendung eines monoklonalen anti Albumin-AK in der selektiven Detektion von Hepatozyten in Hepatozyten/LSEC Kokulturen

Da der anti-Albumin (polyklonal) AK auch die LSECs nach 7 Tagen der Inkubation schwach anfärbt, wurde ein anti-Albumin-spezifischer monoklonaler Antikörper für den Nachweis von pHeps in einem Kokultur-System getestet. Hierbei handelt es sich beim monoklonalen Antikörper um einen FITC-anti-Albumin-AK (FITC, Fluorescein Isothiocyanate Konjugation). Die intensive grüne Färbung ist in der Abbildung 11 links im gelben Kästchen zu erkennen. Mit diesem Antikörper konnte eine gute Detektion der pHeps bei einer AK-Verdünnung von 1:10 erzielt werden. Des Weiteren blieb hier eine Färbung der LSECs aus, was dem roten Kästchen der Abbildung 11 zu entnehmen ist. Da der anti-CD31-AK die LSECs spezifisch markiert, wurde eine Doppelfärbung mittels einem FITC-anti-Albumin-AK und einem anti-CD31-AK durchgeführt. Das Ergebnis ist rechts in der Abbildung 11 im blauen Kästchen zu sehen und zeigt, dass eine Doppelanfärbung von Kokulturen bestehend aus pHeps und LSECs unter Verwendung dieser beiden Antikörper möglich ist.

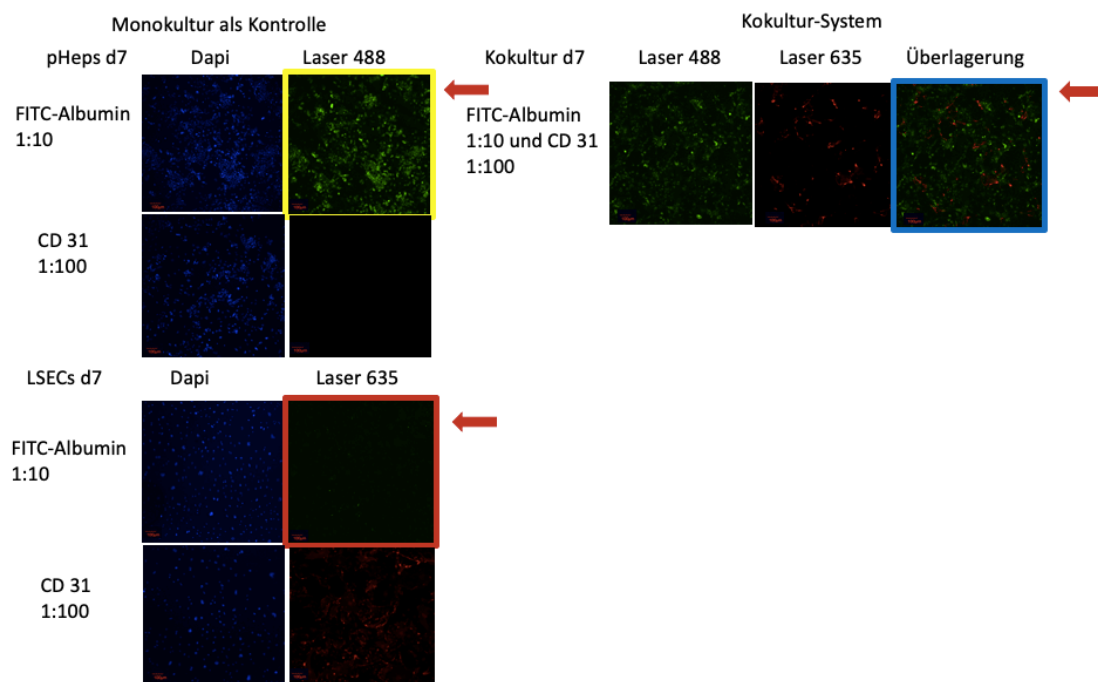


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung von Upcyte® Hepatozyten sowie –LSECs mit Anti FITC-Albumin AK 1:10 und Anti CD31 AK 1:100 für Mono- und Kokultur. Das Bild links zeigt Immunfluoreszenzfärbung der Monokultur der pHeps und LSECs und rechts Doppel-Immunfluoreszenzfärbung der Kokultur. (Die Messbarkeit der Bild sind 100µm)

4.1.6 Weitere Reduktion der Unspezifität durch nochmalige Verdünnung des monoklonalen anti-Albumin-AK

Abbildung 11 zeigt, dass die Detektion der pHeps mit einem monoklonalem anti-Albumin-AK und der LSECs mit einem anti-CD31-AK möglich ist. Für die in der Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse wurden weitere Verdünnung des Antikörpers für die Immunfluoreszenzfärbung mit anti-FITC-Albumin AK 1:50 und anti CD31 AK 1:100 auf pHeps und LSECs in einem Kokultur-System getestet. In der Abbildung 11 wurde bereits nachgewiesen, dass die Antikörper gegen CD 31 und FITC-Albumin für die Detektion der beiden Zelltypen in einer Kokultitur geeignet sind. In diesem Teil wurde die Verdünnung des FITC-Albumin Antikörpers auf 1:50 und die des CD31-Antikörpers auf 1:100 erhöht. Der Abbildung 12 ist zu entnehmen, dass auch eine stärkere Verdünnung der Antikörper noch ein ausschlaggebendes Ergebnis liefert.

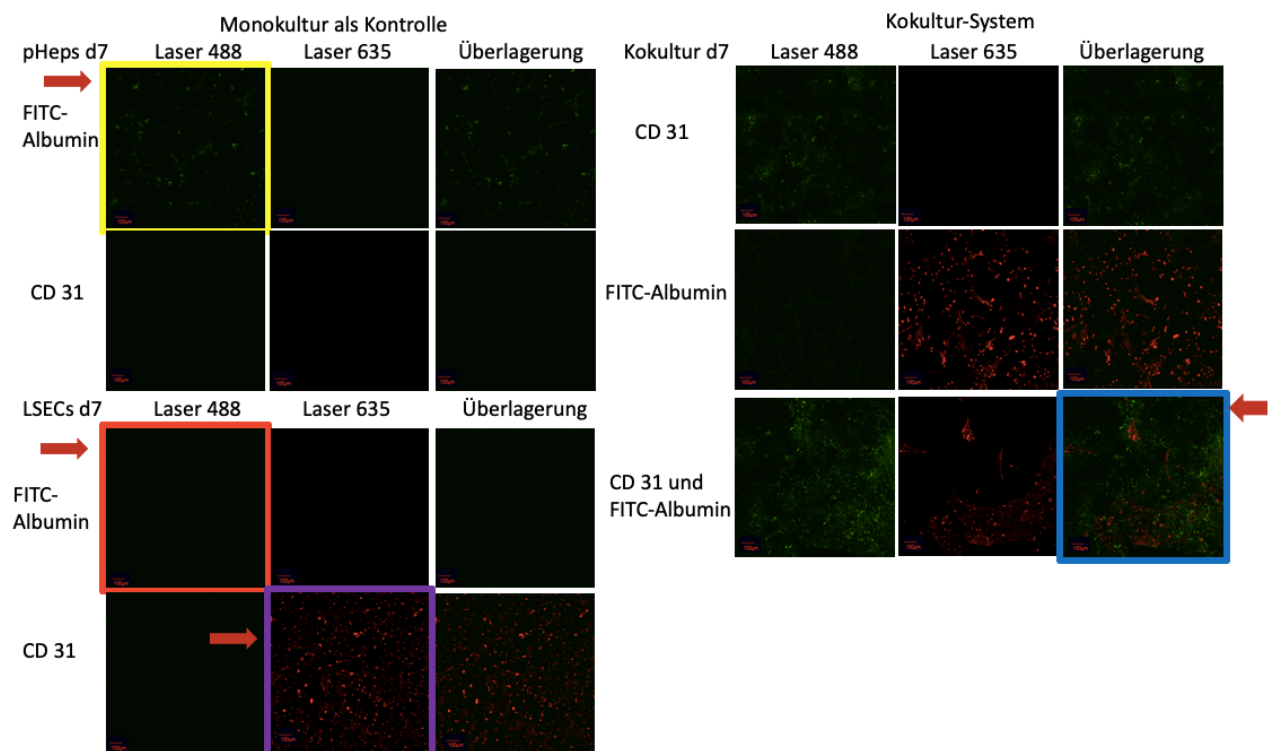


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von Upcyte® Hepatozyten sowie –LSECs mit Anti FITC-Albumin AK 1:50 und Anti CD31 AK 1:100 für Mono- und Kokultur. Das Bild links zeigt Immunfluoreszenzfärbung der Monokultur der pHeps und LSECs und rechts Immunfluoreszenzfärbung der Kokultur. (Die Messbarkeit der Bild sind 100µm)

4.2 Selektive Antikörper-basierte Immunfluoreszenzdetektion von LSECs und Hepatozyten auf einem Cellsheetlayersystem (CSL)

4.2.1 Antikörper-basierte Immunfluoreszenzdetektion von upcyte-LSECs und Hepatozyten auf dem CSL

Basierend auf der selektiven Detektion der pHeps mit Albumin-spezifischer (monoklonal) AK und der LSECs mit CD31-spezifischer AK wurden die Immunfluoreszenzfärbung von pHeps sowie LSECs auf den CSL durchgeführt. Durch die Färbung können die CSL besser charakterisiert und die Position der Zellen in der Kokultur auf den CSL bestimmt werden. Die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnissen nach der Besiedelung der CSL mit pHeps und LSECs zeigten, dass der CD31-spezifische AK für LSECs nur ein schwaches Signal gibt (Abbildung 13, gelbe Kästchen). Theoretisch sollten die LSECs in den Kanälen wachsen, allerdings sind viel zu wenig LSECs in den Kanälen adhärirt und ausserhalb sind keine Zellen gebunden.

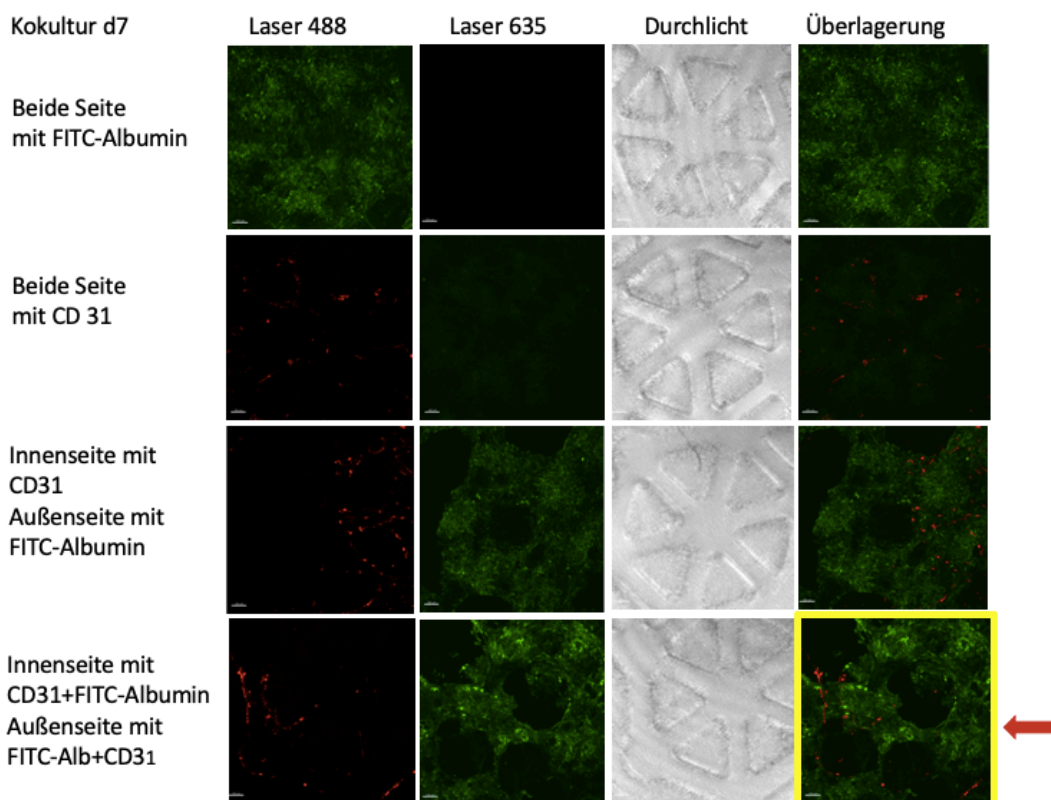


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von Upcyte® Hepatozyten sowie –LSECs mit Anti FITC-Albumin AK 1:10 und Anti CD31 AK 1:100 für Kokultur auf den CSL. Auf die Außenseite wurden 75.000 pHeps und Innenseite 75.000 LSECs ausgesät. Die Bild der ersten und zweiten Zeile sind die Kontrolle

für die Immunfluoreszenzfärbung. Die Bild der dritten und vierten Zeile sind Doppelfärbung für die Zellen in die beiden Seiten der CSL. (Die Messbarkeit für diesen Bildern sind 100µm)

4.2.2 Überprüfung der Kollagenbindung auf den CSL nach 3D microcontact printing durch Antikörper-basierte Detektion

Wegen der schwach mit dem anti-CD31-AK angefärbten und nicht in den Kanälen der CSL gewachsenen LSECs wurden für das auf der CSL-Struktur gepressten Kollagen eine Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Kollagen I-AK durchgeführt. Das Ergebnis der Färbung zeigt nur ein sehr schwaches rotes Signal, was darauf hinweist, dass in den Kanälen der CSL zu wenige Kollagen vorhanden ist (Abbildung 14). Eine mögliche Begründung hierfür stellt eine zu niedrig gewählte Kollagenkonzentration dar.

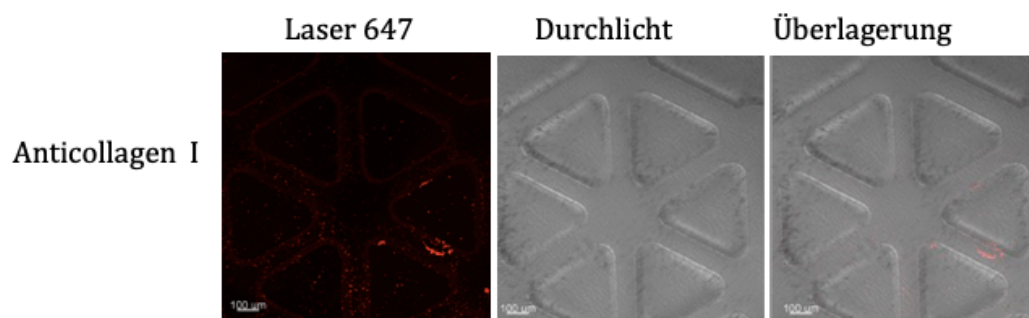


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen I auf den CSL mit einem anti-Kollagen I -AK nach der 3D microcontact printing-Methode.

4.2.3 Überprüfung des 3D microcontact printing-Prozesses durch Coomassie Färbung

Aufgrund der geringen Kollagenvorkommnisse auf den Kanälen der CSL wurde der 3D microcontact-printing-Prozess durch eine Coomassie-blaue-Färbung überprüft. Dafür werden die mit Kollagen bedeckten und mit den in den jeweiligen Prozessen verwendeten Materialien für ca. 30 min in eine Coomassie Lösung (0.25% Coomassie Blue R250 in 100ml Wasser) eingetaucht. Die Coomassie-Färbung mit dem Farbstoff Coomassie (Brilliant) Blue R 250 ist das am häufigsten verwendeten Verfahren zur Visualisierung von Proteinen. Aus den dargestellten Ergebnissen in Abbildung 15 lässt

sich anschließen, dass die Kanäle der verwendeten Stempel ungenügend sind. Des Weiteren lässt sich anhand der schwach blauen Farbe nach dem Coomassie erkennen, dass die Übertragung des Kollagens in die Kanäle der Zellsheetlayer nicht funktioniert hat und die Konzentration der Kollagenlösung, die mit 50µg/ml in den Kanälen eingesetzt hat, zu gering ist.

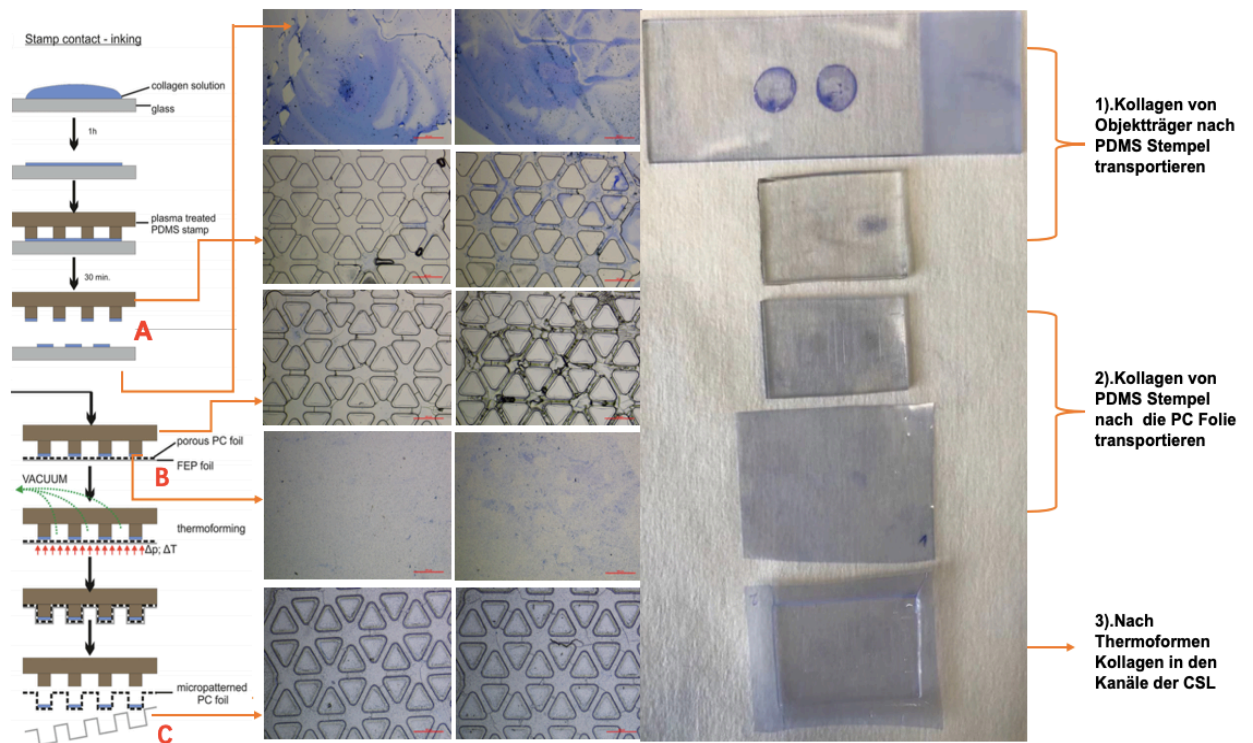


Abbildung 15: Überprüfung des 3D microcontact printing-Prozesses durch Coomassiefärbung.

Links Bild: Schematische Darstellung des invertierten Druckens von PDMS-Stempeln und des Mikrostrukturierens und Mikrokontaktdruckens von PC-Folien in einem Schritt [Abbildung links mit freundlicher Genehmigung von J. Borowiec, 2018] Hierbei könne der Überprüfung des Prozesses in drei Schnitt arbeiten. 1). Überprüfung des Prozess A: Die kollagen nach dem Objektträger zu auf PDMS Stempel. 2). Überprüfung des Prozess B: Die Kollagen nach PDMS Stempel zu auf PC-Folie. 3). Überprüfung des Prozess C: Die Kollagen nach Thermoformen zu auf den Kanälen der CSL.

4.2.4 Vergleich der Zelladhäsion von HepaRG-Zellen auf neue CSL beschichtet mit Kollagen in wasser bzw. Kollagen in Essigsäure

Aufgrund der Ergebnisse aus Abbildung 14 und Abbildung 15 wurden neuen CSL herstellt. Hierbei wurden die CSL nach dem Thermoformen mit einem neuen Stempel

und mit einer höher Konzentrierten Kollagenlösung behandelt. Eine Kollagen-Wasser-Lösung und eine Kollagen-Essigsäure-Lösung wurden jeweils mit einer Konzentration von 200 µg/ml auf die CSL gepresst. Da die primären Zellen sehr Kostenintensiv sind, wurden für diesen Teil HepaRG Zellen verwendet. Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Menge der HepaRG-Zellen auf den mit Kollagen-Essigsäure gepressten CSL (Abbildung 16, links) dicht an der Menge der mit Kollagen-Essigsäure gepressten CSL liegt. Zudem sind die Zellen in den Kanälen der CSL sehr gut adhärirt und gewachsen.

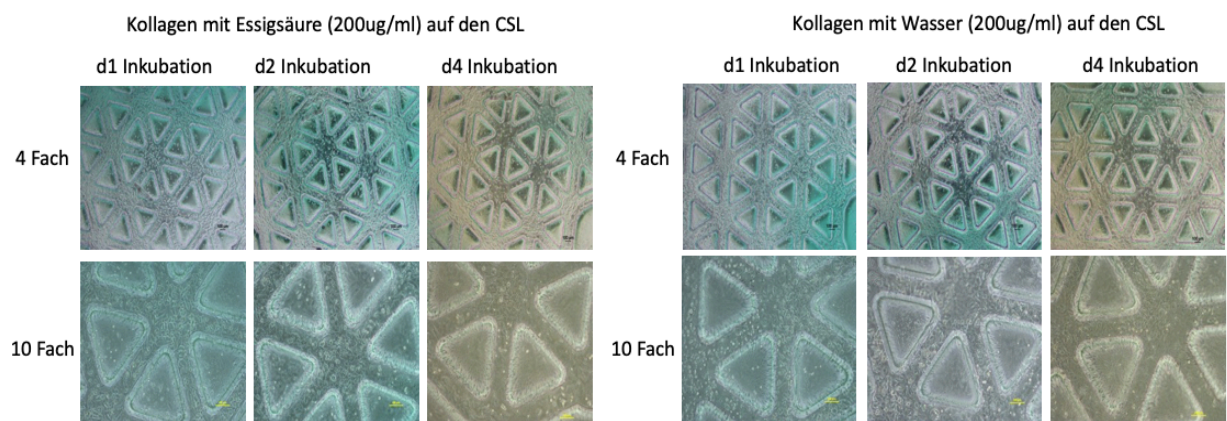


Abbildung 16: Die Zelladhäsion von HepaRG-Zellen auf neue CSL mit Kollagen-wasser bzw. Kollagen-Essigsäure. Links: HepaRG-Zellen wurden auf den Kollagen-Essigsäure (200µg/ml) gepressten CSL ausgesät werden. Rechts: HepaRG-Zellen auf den Kollagen-Wasser (200 µg/ml) gepressten CSL ausgesät werden.

5 Diskussion

5.1 Immunfluoreszenzbasierte selektive Detektion von LSECs und Hepatozyten durch Antikörper

Die selektive Detektion von Zellen mit Farbstoff-gelabelten Antikörpern ist ein wichtiger Faktor für die Charakterisierung unterschiedlicher Zellen in einem Kokultursystem. Deshalb wurden verschiedene Antikörper hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung zu zellulären Antigenen über Immunfluoreszenzfärbung getestet, um schließlich einen

spezifischen Antikörper für LSECs und pHeps in einem 2D Kokultur-system zu finden.

Zuerst wurde die Detektion von LSECs und pHeps mit Stabilin-, CD31-und alpha-Antitrypsin-AK durch Immunfluoreszenzfärbung in einem Monokultur-System getestet. Es konnte festgestellt werden, dass der CD31-AK spezifisch an LSECs bindet und die LSECs nach 7 Tage der Kultivierung auch eine ausgeprägte Färbung durch CD31 aufweisen. Der Stabilin-AK ist als Marker ungeeignet für LSECs [B. Hansen, 2005], da sie nach 7 Tagen der Kultivierung keine Färbung auf den Zellen bindet. Der AAT-AK bindet zwar zunächst spezifisch an die pHeps, nach sieben Tagen der Kultivierung, jedoch auch an die LSECs (Abbildung 9).

Aus diesem Grund wurde ein anti Albumin-spezifischer polyklonal AK anstelle des AAT-AK für den Nachweis von pHeps in einem Kokultur-System verwendet. Alledings führte dieser zu einer Anfärbung der LSECs (Abbildung 10). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die Interaktion des polyklonale Antikörper mit verschiedenen Epitopen des Antigens, während ein monoklonaler Antikörper mit einem bestimmten Epitop des Antigens interagiert.

Deshalb wurde ein anti Albumin-spezifischer monoklonaler AK für den Nachweis von pHeps in einem Kokultur-System erfolgreich getestet, da dieser Antikörper an ein bestimmtes Oberflächenprotein auf den Hepatozyten binden kann. Die Detektion der Zellen durch Antikörper-basierte Immunfluoreszenzfärbung konnte zeigen, dass die Kokultivierung die beiden Zelltypen durch FITC-Albumin AK und CD 31 AK zu einer deutlichen Unterscheidung der beiden führt (Abbildung 11).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der anti Albumin-spezifischer(monoklonal) AK und der CD31 AK zu einer Unterscheidung der pHeps und LSECs in einem Kokultur-System verwendet kann. Deshalb können die beiden Antikörper für die pHeps und LSECs in einem 3D Kokultur-System der CSL angewendet werden.

5.2 Selektive Antikörper-basierte Immunfluoreszenzdetektion von LSECs und Hepatozyten auf einem Cellsheetlayersystem (CSL)

Basierend auf der Detektion der pHeps durch den Albumin-spezifischer (monoklonalen) AK und der LSECs durch den CD31-spezifischen AK wurde die Immunfluoreszenzfärbung von pHeps sowie LSECs, welche auf den CSL kultiviert wurden, durchgeführt. Somit konnte überprüft werden, ob die Antikörper auch für diese Kultivierungsform geeignet sind. Zudem konnte so die Charakterisierung und die Position der Zellen in einem CSL bestimmt werden.

In den Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die Färbung für LSECs mit CD31-AK schwach ist und die LSECs nicht in den Kanälen der CSL wachsen. Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass das Kollagen auf den Kanälen der CSL nicht ausreichend vorhanden ist. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde das auf der CSL-Struktur gepressten Kollagen einer Immunfluoreszenzfärbung mit Anticollagen I-AK unterzogen. Die Ergebnisse der Färbung bestätigten diese Vermutung (Abbildung 14)

Daher wurde eine Überprüfungsexperiment der 3D microcontact- printing-Prozess durch eine Coomassie-blaue-Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 15 zeigen, dass die Strukturen der verwendeten Stempel Mängel aufweisen und die Mengen an Kollagen, welche zwischen diesen Prozessen übertragen werden, gering sind. Der Grund dafür ist vermutlich, dass die Oberfläche der PDMS Stempel durch mehrfache Bestrahlung unter UV bei der Ozonbehandlung verhärtet ist, was zu Schäden bei der anschließenden Ultraschallreinigung geführt hat.

Die niedrige Menge an Kollagen, welche vom vom Objektträger auf die CSL übertragen wurden, gibt Aufschluss darüber, dass die Konzentration in der Kollagenlösung zu niedrige ist.

Aus diesem Grund wurden die neuen CSL hergestellt. Hierbei wurden die CSL nach dem Thermoformen mit neuen PDMS Stempeln und mit hoher Konzentration an Kollagenlösung behandelt. Eine Kollagen-Wasser-Lösung und eine Kollagen-Essigsäure-Lösung wurden jeweils mit einer Konzentration von 200 µg/ml auf die CSL gepresst. Da die primären Zellen sehr Kostenintensiv sind, wurden für diesen Teil

HepaRG Zellen verwendet. Die starke Adhäsion der HepaRG-Zellen auf den Kollagen-Wasser gepresst CSL und Kollagen-Essigsäure gepresst CSL zeigt, dass die neu hergestellten CSL für die Zellkultur geeignet sind (Abbildung 16).

Da sich die vorliegende Bachelorarbeit dem Ende näherte, konnten leider die finalen Experimente zur Anfärbung der primären upcyte®-Heps sowie -LSECs auf den CSL, nicht von der Autorin durchgeführt werden. Aber durch die obigen Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass die spezifischen Antikörper zur Detektion von pHeps und LSECs in einem Kokultur-System geeignet sind und die Konzentration der auf den Kanälen der CSL gepressten Kollagenlösung, erhöht werden muss.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Spezifische Antikörper zur selektiven Detektion von pHeps und LSECs konnten für die Mono- und Ko-Kultur gefunden werden. Diese Antikörper können auch zur Immunfluoreszenzfärbung von beiden Zelltypen auf CSL angewendet werden. Mittels Immunfluoreszenzfärbung können somit die Zellen auf den CSL charakterisiert und ihre Position bestimmt werden. Eine räumliche Trennung der Zelltypen durch CSL konnte nachgewiesen werden, da die LSECs auf der Innenseite der CSL in den Kanälen geawachsen sind, während die pHeps auf der Außenseite der CSL gewachsen sind.

In Rahmen der durchgeführten Experimente konnte der Albumin-spezifische monoklonale Antikörper für den Nachweis von pHeps und der CD31-spezifische AK für den Nachweis von LSECs etabliert werden. Des Weiteren wurde die Kollagenkonzentration auf den CSL über den 3D microcontact printing-Prozess überprüft und die Zelladhäsion in den Kanälen von neu Überarbeiten CSL bestimmt. Für weitere Versuche wären die Auswirkungen einer höheren Konzentration an Kollagenlösungen (200 µg/ml) interessant.

In der Praxis sollten Experimente weiterhin überprüfen, ob diese Antikörper auch zur Detektion von pHeps und LSECs verwendet werden können, wenn für die Herstellung der CSL eine höhere Konzentration an Kollagen (200 µg/ml) verwendet wurde. Aus

zeitlichen Gründen konnten die Experimente jedoch nicht fortgesetzt werden. Der Grund dafür ist, dass zu viel Zeit damit verbracht habe, die Kollagenbindung auf den CSL zu überprüfen und die Zelladhäsion auf den Kanälen der CSL zu testen, da für die ersten Experimente eine zu niedrige Konzentration an Kollagen gewählt wurde. Diese niedrige Konzentration führte dazu, dass das nächste Mikrokontaktprinting nicht funktionierte.

Zudem könnten weiterführende Experimente darin bestehen, eine 7-tägige Koinkultivierung von pHeps und LSECs auf den neuen CSL durchzuführen werden, Dabei können die CSL in einer Rahmenapparatur gefaltet und entfaltet werden. Hierbei ist zu beachten, dass bei der Entfaltung der Zellrasen beschädigt werden könnte. Nach 7 Tagen der Inkubation könnte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Albumin-spezifischem (monoklonalen) AK und CD 31 AK auf diesen CSL durchgeführt werden. Dadurch ließe sich das Wachstum auf den CSL mittels LSM charakterisieren und somit könnte festgestellt werden, ob sich die LSECs auch in den Kanälen anordnen (200 µg/ml).

7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES ZENTRALVENEN-LEBERLÄPPCHENS. DIE GLISSON-TRIAS BEFINDEN SICH JEWEILS ZWISCHEN DEN SECHSECKEN, BILD UNTEN RECHTS. SIE BESTEHEN AUS: KLEINEM GALLENGANG (GRÜN), LEBERARTERIE (ROT) UND AST DER PFORTADER (LILA) [F. HANS, 1992]	1
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHEN DARSTELLUNG EINES ZENTRALVENEN-LEBERLÄPPCHENS. DAS BLUT FLIEßT VON DER PFORTADER UND DER LEBERARTERIE IN RICHTUNG DER ZENTRALVENE DURCH DIE VON FENESTRIERTEN SINUSFÖRMIGEN LEBERENDOTHELZELLEN (LSECs) UMGEBENE SINUSKURVE IN DIE LEBER. VON HEPATOZYTEN PRODUZIERT GALLE WIRD ÜBER DIE GALLENKANÄLE, DIE VON DER APIKALEN HEPATOZYTENMEMBRAN UMGEBEN SIND, IN DEN GALLENGÄNGEN GESAMMELT. KUPFFERZELLEN (KC), RESIDENTE MAKROPHAGEN IN DER LEBER, BEFINDEN SICH AUF DER LUMINALEN SEITE DER SINUSOIDE, WÄHREND HEPATISCHE STERNZELLEN (HSC) IN UNMITTLBARER NÄHE ZU LSECs POSITIONIERT SIND [T. MINORU, 2016].	2
ABBILDUNG 3: HEPATOZYTEN KÖNNEN STOFFE IN VIER SCHRITTEN BEARBEITEN: A. AUFNAHME AUS DEM BLUT ÜBER DIE BASOLATERALE MEMBRAN. B. TRANSPORT DURCH DIE ZELLE. C. ABBAU ODER CHEMISCHE MODIFIKATION. D. TRANSPORT IN GALLENKANÄLCHEN ÜBER DIE APIKALE MEMBRAN [H. HINHOFFER-SZALKAY].	3
ABBILDUNG 4: LINKS: CSL-STRUKTUR NACH THERMOFORMEN. RECHTS: SCHEMATISCHER CSL-STRUKTUR MIT SPIRALFÖRMIGEN DURCHGÄNGEN DER GLISSON-TRIAS UND DER ZENTRALVENE.	5
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHER QUERSCHNITT EINER GEFALTETEN CSL.	5
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PRÄPARIERUNG UND BESIEDLUNG DER CSL. DIE AUßENSEITE DER CSL IST NACH DEM OBEREN RAHMENTEIL UND DIE INNENSEITE IST NACH DEM UNTEREN RAHMENTEIL.	12
ABBILDUNG 7: LINKS: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON UPCYTE® LSECs MIT ANTI-STABILIN AK 1: 100 UND ANTI-CD 31 AK 1:100. RECHTS: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON UPCYTE® PHEPS MIT ANTI-STABILIN AK 1:50 UND ANTI-CD 31 AK 1:100. (DIE MESSBARKEIT DER BILDER IN DER ERSTEN UND ZWEITEN ZEILE IST 100µM, DIE DRITTE ZEILE 50µM)	15
ABBILDUNG 8: LINKS: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON UPCYTE® HEPATOZYTEN MIT ANTI-A-1-ANTITRYPSIN AK 1: 50 UND AK 1:100. RECHTS: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON UPCYTE® LSECs MIT ANTI-A-1-ANTITRYPSIN AK 1:100. (DIE MESSBARKEIT DER BILDER IN ERSTE ZEILE BETRÄGT 100µM, DIE DER ZWEITNE ZEILE BETRÄGT 50µM)	16
ABBILDUNG 9: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON UPCYTE® HEPATOZYTEN SOWIE –LSECs MIT ANTI ALPHA ANTITRYPSIN AK 1:50 UND ANTI CD31 AK 1:100 FÜR MONO- UND KOKULTUR. DAS BILDEN LINKS ZEIGT	

DIE IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER MONOKULTUR DER PHEPS UND LSECs UND RECHTS IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER KOKULTUR. (DIE MESSBARKEIT DER BILD SIND 100µM)	17
ABBILDUNG 10: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON VON UPCYTE® HEPATOZYTEN SOWIE –LSECs MIT ANTI ALBUMIN AK 1:100 UND ANTI CD31 AK 1:100 FÜR MONO- UND KOKULTUR. DAS BILD LINKS ZEIGT DIE IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER MONOKULTUR DER PHEPS UND LSECs UND RECHTS DIE IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER KOKULTUR. (DIE MESSBARKEIT DER BILD SIND 100µM)	18
ABBILDUNG 11: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON VON UPCYTE® HEPATOZYTEN SOWIE –LSECs MIT ANTI FITC-ALBUMIN AK 1:10 UND ANTI CD31 AK 1:100 FÜR MONO- UND KOKULTUR. DAS BILD LINKS ZEIGT IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER MONOKULTUR DER PHEPS UND LSECs UND RECHTS DOPPEL- IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER KOKULTUR. DIE MESSBARKEIT DER BILD SIND 100µM.	19
ABBILDUNG 12: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON VON UPCYTE® HEPATOZYTEN SOWIE –LSECs MIT ANTI FITC-ALBUMIN AK 1:50 UND ANTI CD31 AK 1:100 FÜR MONO- UND KOKULTUR. DAS BILD LINKS ZEIGT IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER MONOKULTUR DER PHEPS UND LSECs UND RECHTS IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DER KOKULTUR. DIE MESSBARKEIT DER BILD SIND 100µM.	20
ABBILDUNG 13: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON UPCYTE® HEPATOZYTEN SOWIE –LSECs MIT ANTI FITC- ALBUMIN AK 1:10 UND ANTI CD31 AK 1:100 FÜR KOKULTUR AUF DEN CSL. AUF DIE AUßENSEITE WURDEN 75.000 PHEPS UND INNENSEITE 75.000 LSECs AUSGESÄT. DIE BILD DER ERSTEN UND ZWEITEN ZEILE SIND DIE KONTROLLE FÜR DIE IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG. DIE BILD DER DRITTEN UND VIERTEN ZEILE SIND DOPPELFÄRBUNG FÜR DIE ZELLEN IN DIE BEIDEN SEITEN DER CSL. DIE MESSBARKEIT FÜR DIESEN BILDEN SIND 100µM.	21
ABBILDUNG 14: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON KOLLAGEN I AUF DEN CSL MIT EINEM ANTI-KOLLAGEN I -AK NACH DER 3D MICROCONTACT PRINTING-METHODE.	22
ABBILDUNG 15: ÜBERPRÜFUNG DES 3D MICROCONTACT PRINTING-PROZESSES DURCH COOMASSIEFÄRBUNG.	23
ABBILDUNG 16: DIE ZELLADHÄSION VON HEPARG-ZELLEN AUF NEUE CSL MIT KOLLAGEN-WASSER BZW. KOLLAGEN-ESSIGSÄURE. LINKS: HEPARG-ZELLEN WURDEN AUF DEN KOLLAGEN-ESSIGSÄURE (200µG/ML) GEPRESSTEN CSL AUSGESÄT WERDEN. RECHTS: HEPARG-ZELLEN AUF DEN KOLLAGEN- WASSER (200 µG/ML) GEPRESSTEN CSL AUSGESÄT WERDEN.	24

8 Literaturverzeichnis

A. Faller, 2016, *Der Körper des Menschen: Einführung in Bau und Funktion*, 17. überarbeitete Auflage Hrsg., Stuttgart: Thieme Verlag.

A. Schober, U.Fernekor, S.Singh, G.Schlingloff, M.Gebinoga, J.Hampl,A. Williamson,2013, *Mimicking the biological world:Methods for the 3D structuring of artificial cellular environments*, Eng. Life Sci, P.352-367

B. Hansen, P. Longati, K.Elvevold, 2005.*Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding. Exp Cell Res, P. 303(1):160-173.*

Brenton R. Ware, Mitchell J. Durham, Chase P. et al., 2017, *A cell Culture Platform to Maintain Long-Term Phenotype of Primary Human Hepatocytes and Endothelial cells. JCMGH283 PROOF 11*

DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, McCuskey RS. 2004 *Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is under paracrine and autocrine control. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287(4): G757–G763. doi: 10.1152/ajpgi.00017.*

F. Hans, L. Helmut, S. Dietrich: 1992. *Spezielle Anatomie. Band 2*, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-356904-X, S.132.Stuttgart

G. Aumüller, et al. 2017 *Anatomie*, Stuttgart; New York; Delhi: Georg Thieme Verlag.

G. Levy. et al., 2015. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nature biotechnology*, 26 Oktober, p. 1264–1271.

H. Hinghofer-Szalkay. Eigenschaften und Aufgaben der Hepatozyten [Online]. Available: <http://physiologie.cc/III.2.htm>. [Zugriff am 12 August 2019].

J. Borowiec, J. Hampl, S. Singh, S. Haefner, K. Friedel, P. Mai, D. Brauer, F. Ruther, L. Liverani, A.R.Boccaccini, A. Schober,2018, *3D Microcontact Printing for Combined Chemical and*

Topographical Patterning on Porous Cell Culture Membrane ACS Appl. Mater. Interfaces P,22857-22865

J. Gauldie, L. Lamontagne, P. Horsewood, and E. Jenkins 1980. *Immunohistochemical localization of alpha 1-antitrypsin in normal mouse liver and pancreas*. p. 101(3): 723–735.

J. Poisson, Sara Lemoine, Chantal Boulanger et al., 2017. „*Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases*, “ Volume 66, Issue 1, Pages 212-227.

Khetani SR, Bhatia SN.2008. *Microscale culture of human liver cells for drug development*. Nat Biotechnol P. 26:120-126.

March S, Hui EE, Underhill GH, Khetani SR, Bhatia SN.2009. *Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro*. *Hepatology* P 50:920-928.

N. Menche, B. Guzeck, H. Hasel, K. Munk, H. Renz-Polster und G. Raichle,2016. *Biologie, Anatomie, Physiologie: Kompaktes Lehrbuch Pflegeberufe*, 8. Auflage Hrsg., München: Elsevier.

P. Kugler, 2017 *Der Menschliche Körper: Anatomie, Physiologie, Pathologie*, 3. Auflage Hrsg., München: Elsevier.

S. Wilkening, F.Stahl,&A. Bader., 2003. *Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 01 August, p. 1035–1042.

T. Minoru, M. Atsushi, 2016, *Liver regeneration und fibrosis after inflammation*, <https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-016-0025-2/figures/1>Inflammation and Regeneration volume 36.

T. Tokairin, Nishikawa Y, Doi Y et al., 2002. *A highly specific isolation of rat sinusoidal endothelial cells by the immunomagnetic bead method using SE-1 monoclonal antibody*. *J Hepatol* 2002; 36: 725–33. [PubMed] [Google Scholar]

U. Fernekorn, J. Hampel, C. Augspurger et al., 2013 *In vitro cultivation of biopsy derived primary hepatocytes leads to a more metabolic genotype in perfused 3D scaffolds than static 3D cell culture* P. RSC Adv., 16558

Upcyte Technologies „<https://www.upcyte.com/>“, [Online]. Available: <https://www.upcyte.com/products/upcyte-technology.html>. [Zugriff am 5 November 2018].

Vaupel · Schaible · Mutschler, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: abavo, 2015.

Y. Kim, P. Rajagopalan (November 12, 2010) *3D Hepatic Cultures Simultaneously Maintain Primary Hepatocyte and Liver Sinusoidal Endothelial Cell Phenotypes*. [Online]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015456>

Anhang

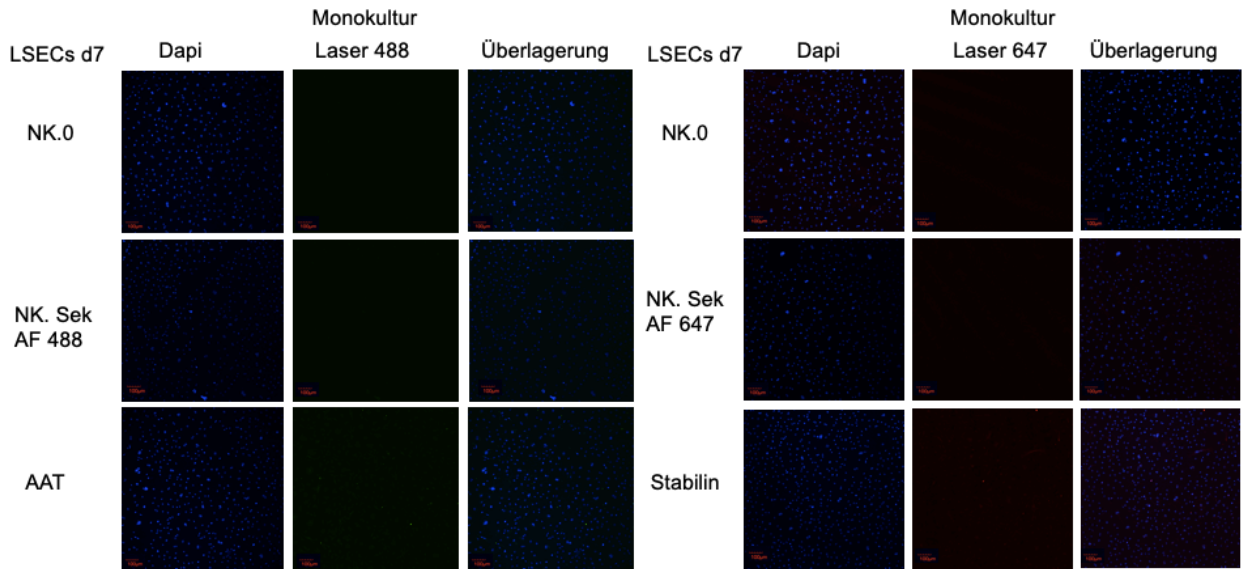


Abbildung 17: Negative Kontrolle von LSECs mit alpha- antitrypsin bzw. Stabilin für Monokultur

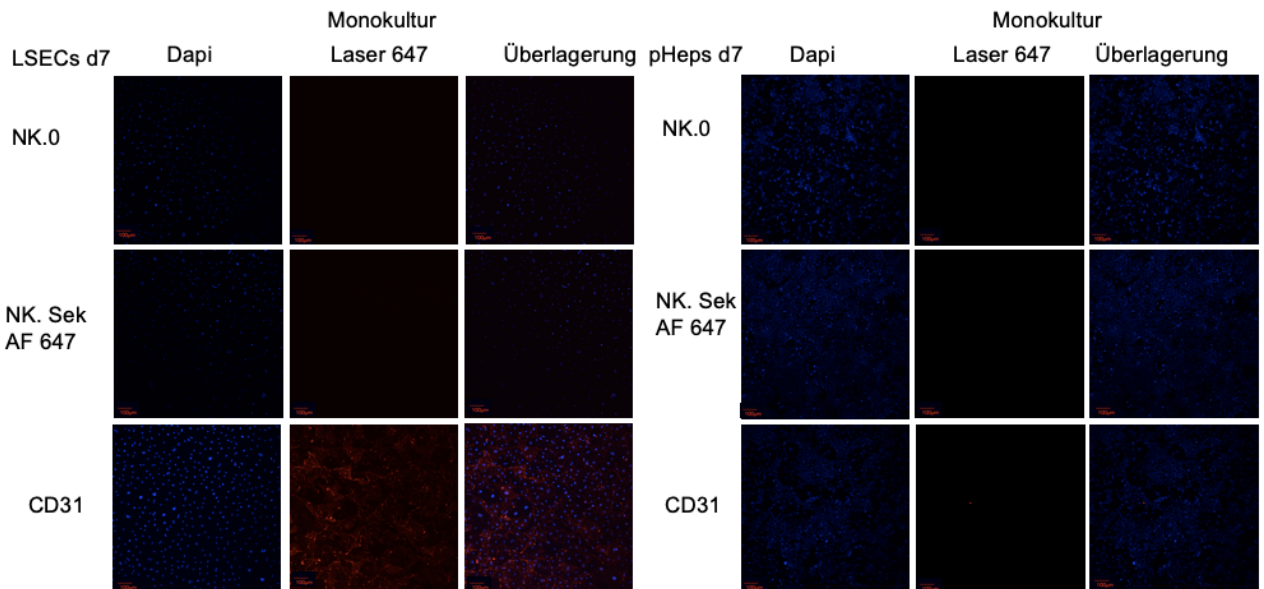


Abbildung 18: Negative Kontrolle von LSECs mit CD31 und pHeps mit CD31 für Monokultur

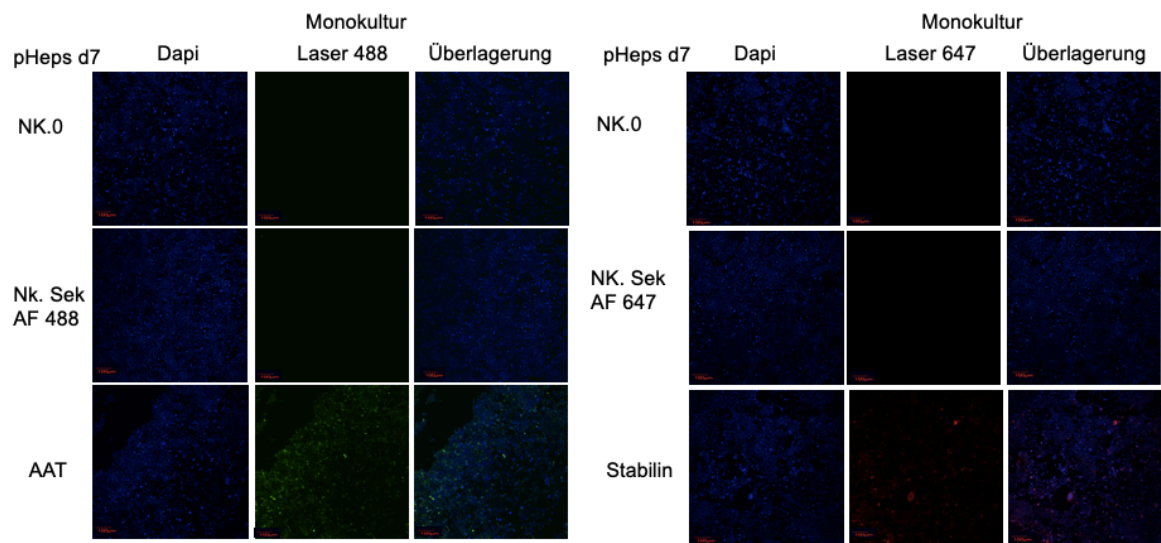


Abbildung19: Negative Kontrolle von pHeps mit alpha- antitrypsin bzw. Stabilin für Monokultur

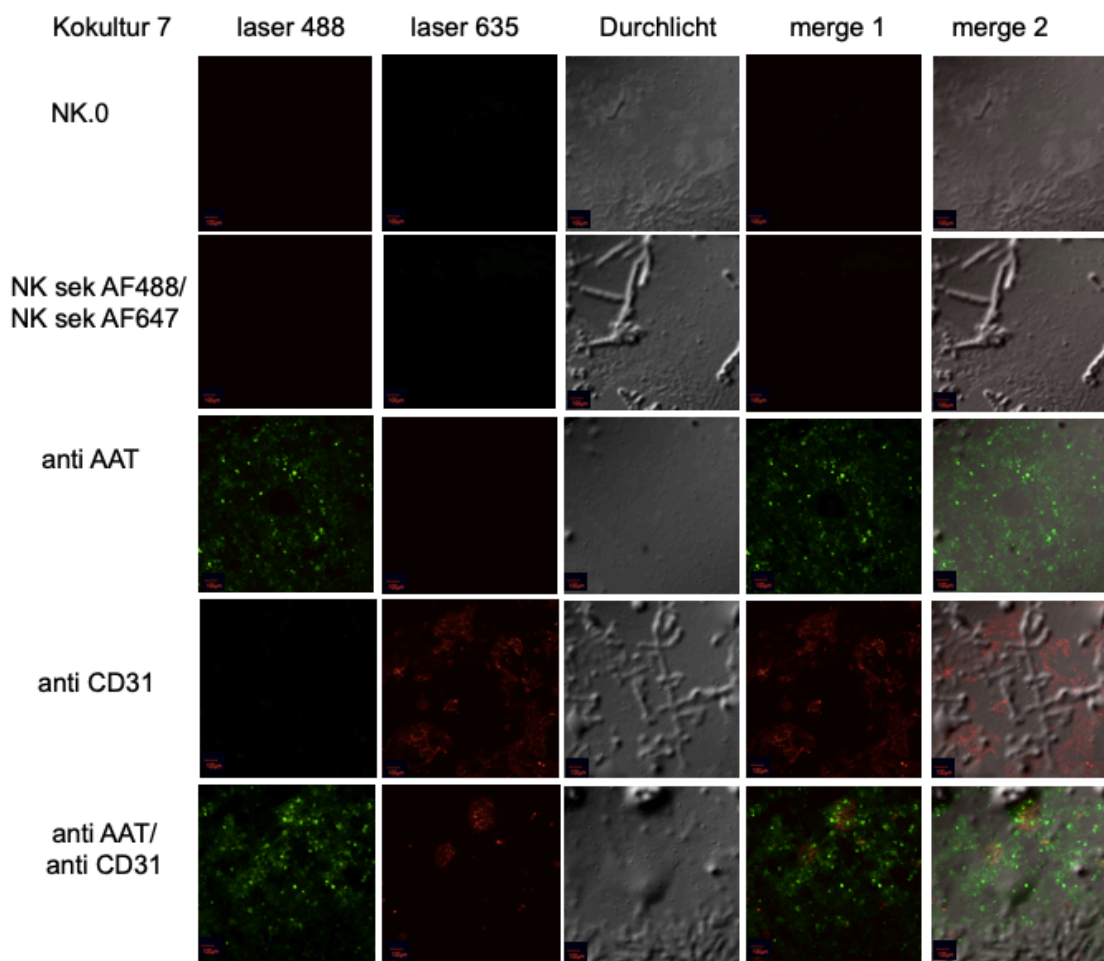


Abbildung 20: Negative Kontrolle von LSECs und pHeps mit alpha- antitrypsin bzw. CD31 für Kokultur

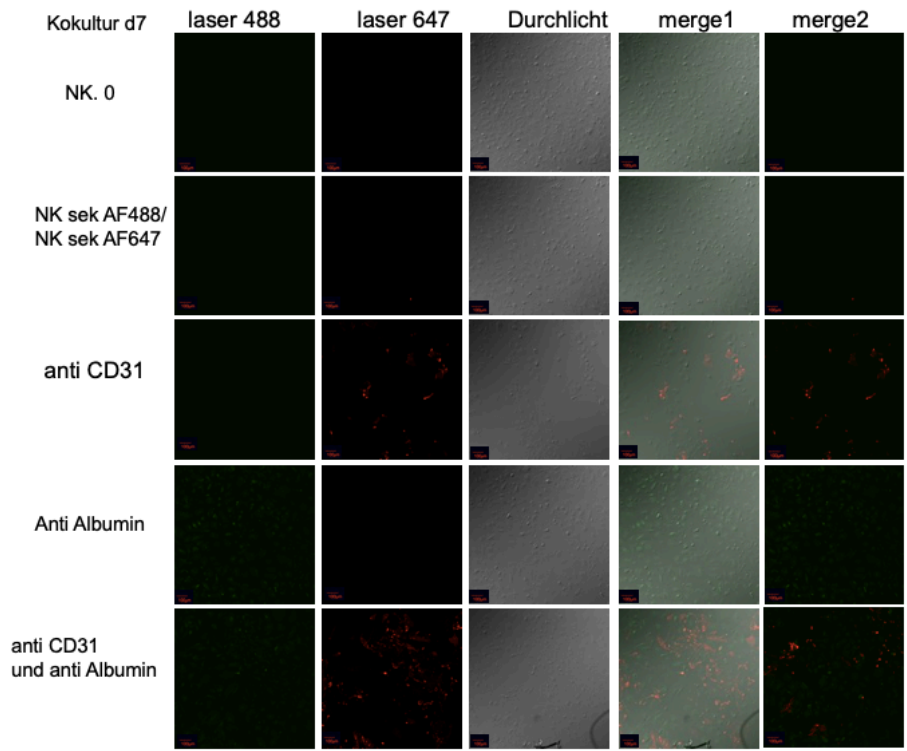


Abbildung 21: Negative Kontrolle von LSECs und pHePs mit polyklonale-Albumin bzw. CD31 für Kokultur

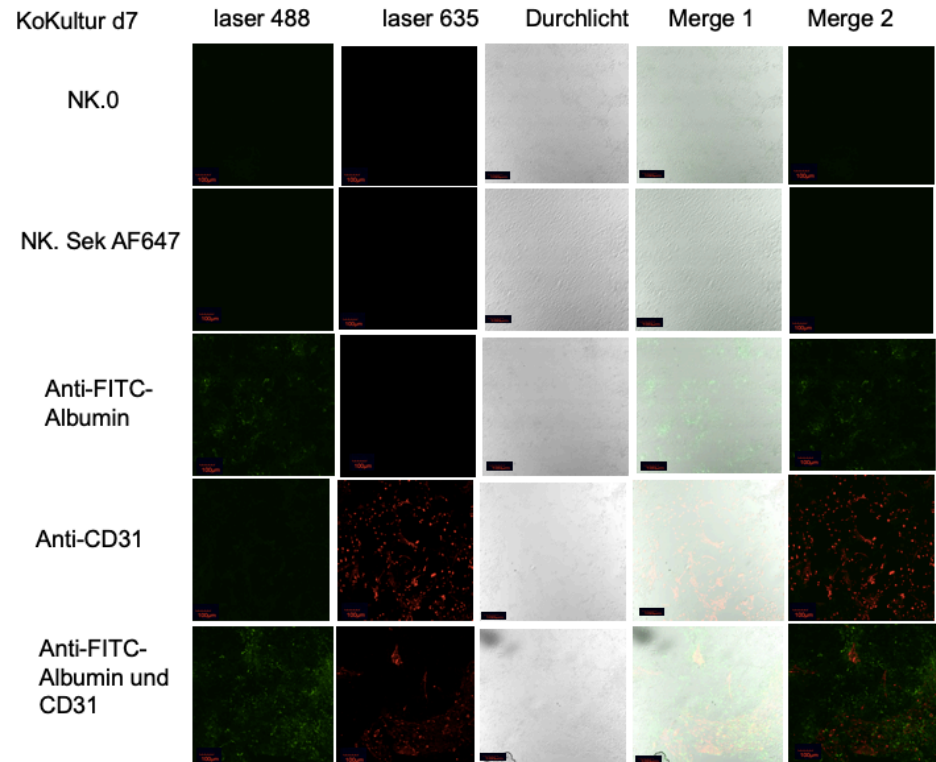


Abbildung 22: Negative Kontrolle von LSECs und pHePs mit monoklonale-Albumin bzw. CD31 für Kokultur