

Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen zur Etablierung dreidimensionaler Modelle für die autologe Geweberegeneration

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von:

M.Sc. Josefin Franziska Weber (geb. Baur)
aus Tübingen

Tübingen

2024

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2024

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. Meltem Avci-Adali

2. Berichterstatter/-in: Prof. Samuel Wagner, PhD

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Meltem Avci-Adali und Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Wendel für die Ermöglichung der Promotion im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Tübingen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. Avci-Adali, für die stets gute Beratung und Betreuung, die Anregungen, das gemeinsame Entwickeln von neuen Projekten, aber vor allem das mir entgegengebrachte Vertrauen während der gesamten Zeit und nicht zuletzt das freundschaftliche Verhältnis. Vielen Dank für alles, liebe Meltem!

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Wagner für die Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung und Begutachtung der Dissertation.

Mein weiterer Dank gilt meinen lieben Kolleg*innen des klinischen Forschungslabors, die mich bei all meinen Ideen und Experimenten jederzeit gerne unterstützt haben. Auch all meinen Student*innen sowie allen Kooperationspartner*innen, möchte ich danke sagen. Sie haben mit ihrer Unterstützung, Hilfsbereitschaft und ihrem Engagement einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei Ludmilla Hann und Melanie Wolf für ihre fachliche und moralische Unterstützung, vor allem aber für ihre Freundschaft. Auf weitere gemeinsame und schöne Jahre in unserem Büro!

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann und ehemaligen Kollegen Dr. Marbod Weber. Wir sind privat als Eltern unserer Tochter Lilia und beruflich ein eingespieltes Team. Mit seinem Ehrgeiz, seiner konstruktiven Kritik, vor allem aber mit der großen gemeinsamen Leidenschaft für die Forschung hat er mir immer wieder Denkanstöße gegeben und mich dabei unterstützt, meine Ziele zu verfolgen und zu erreichen.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern meinen tief empfundenen Dank zum Ausdruck bringen. Sie haben mich jederzeit bestärkt, dass dieser Weg genau der richtige ist. Sie haben mich gelehrt, ehrgeizig, beharrlich und vor allem aufrichtig durchs Leben zu gehen und sich von Rückschlägen nicht entmutigen zu lassen, sondern daraus zu lernen und gestärkt daraus hervorzugehen. Danke für eure jahrelange Unterstützung!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Regenerative Medizin	1
1.2 Stammzellen	4
1.2.1 Pluripotente Stammzellen (PSCs)	5
1.2.2 Humane induzierte Pluripotente Stammzellen (hiPSCs)	6
1.3 Reprogrammierung mit mRNA	8
1.3.1 Reprogrammierung mit selbstreplizierender RNA (srRNA)	9
1.4 Somatische Zellquellen	11
1.5 Tissue Engineering	11
1.5.1 Biomaterialien im Tissue Engineering	13
1.5.2 Limitierungen des Tissue Engineerings	14
1.5.3 Verwendung von hiPSCs im Tissue Engineering	14
1.5.4 Leber Tissue Engineering	15
1.5.5 Vaskuläres Tissue Engineering	20
2 Zielsetzung	25
3 Ergebnisse	27
3.1 Publikation I	27
3.2 Publikation II	29
3.3 Publikation III	31
4 Diskussion	32
4.1 Zellarten und Methoden zur Reprogrammierung	32
4.2 In vitro Charakterisierung der hiPSCs aus RECs	35

4.3	Der modifizierte CAM Assay als alternative Methode zu immundefizienten Mäusen	35
4.4	Differenzierung und Anwendung von hiPSCs-abgeleiteten Hepatozyten	38
4.5	Differenzierung und Anwendung von hiPSC-abgeleiteten Endothelzellen.....	42
5	Ausblick	46
6	Literaturverzeichnis	49
7	Anhang	62
7.1	Eigenanteil der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.....	62
7.1.1	Publikation I	62
7.1.2	Publikation II	63
7.1.3	Publikation III	64
7.2	Liste aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen	65
7.3	Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Original.....	66
7.3.1	Publikation I	66
7.3.2	Publikation II	76
7.3.3	Publikation III	95

Abkürzungsverzeichnis

CAM	Chorion-Allantois-Membran
CYP	Chytochrom
DES	Medikamentenfreisetzende Stents
DNA	Desoxyribonukleinsäure
pDNA	Plasmid DNA
3D	Dreidimensional
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECs	Endothelzellen
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein
ESC	Embryonale Stammzellen
HLCs	Hepatozytenähnliche Zellen
HUVECs	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
IFN	Interferon
iPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen
hiPSCs	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
ISGs	Interferon-stimulated genes
IVT	In vitro Transkription
JAK-STAT	Janus kinase; Signal transducer and activator of transcription
JPCs	Kieferknochenperiostzellen
Klf4	Kruppel-like factor 4
MACS	Magnetic-activated cell sorting
nsPs	Nichtstrukturelle Proteine
NuFF	Humane Vorhautfibroblasten von Neugeborenen
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
ORFs	Offene Leserahmen
PAC	Puromycin N-Acetyltransferase
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzellen
PCL	Poly- ϵ -Caprolacton
PDMS	Polydimethylsiloxan
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PSCs	Pluripotente Stammzellen
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
REC	Renale Epithelzellen
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
srRNA	Selbstreplizierende RNA
ssRNA	Einzelsträngige RNA
tRNA	Tyrosin kodierenden RNA
RBP	RNA bindende Proteine
SMCs	Glatte Muskelzellen
Sox2	Sex determining region Y box 2
VEE	Venezolanische Pferdeenzephalomyelitis
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
2D	Zweidimensional

Zusammenfassung

Derzeit ist die Regenerative Medizin eines der vielversprechendsten Forschungsgebiete für zukünftige, innovative Behandlungsansätze von Krankheiten, für die es bisher noch keine oder nur unzureichende Therapien gibt. Im Rahmen dieses Forschungsgebietes wird unter anderem an Strategien für die Geweberegeneration geforscht. In der Vergangenheit mangelte es vor allem an autologen Zellen, aber auch die Nachbildung realitätsgetreuer Gewebestrukturen war ein limitierender Faktor. In diesem Zusammenhang hat die Möglichkeit, aus somatischen Zellen patientenspezifische induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) zu generieren, hat eine nahezu unbegrenzte Quelle an autologen Zellen eröffnet.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine nicht-integrative, synthetische selbstreplizierende Messenger Ribonukleinsäure (RNA; srRNA) verwendet, um renale Epithelzellen (RECs) zu rückstandsfreien hiPSCs zu reprogrammieren. Die erhaltenen hiPSCs zeigten typische Charakteristika pluripotenter Stammzellen. Unter anderem war es möglich sie in die drei Keimbahnen (mesoderm, endoderm und ektoderm) zu differenzieren, was anhand des erstmals hierfür eingesetzten Chorion-Allantois-Membran (CAM)-Assays bestätigt werden konnte.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde ein Differenzierungsverfahren etabliert, um die aus RECs generierten hiPSCs in autologe hepatozytenähnliche Zellen (HCLs) zu differenzieren. Diese Zellen exprimierten hepatozytenspezifische Marker und zeigten wichtige zellspezifische Funktionen, wie die Albumin-Synthese, Cytochrom-(CYP)-P450 Aktivität, Glykogenspeicherung und Indocyaningrün (ICG)-Verstoffwechslung. Im Anschluss daran wurden biokompatible, dreidimensionale (3D) schmelzelektrogesponnene Poly- ϵ -Caprolacton (PCL)-Scaffolds hergestellt und mit vordifferenzierten Hepatoblasten besiedelt, die sich gleichmäßig an die Fasern der Scaffolds anlagerten und erfolgreich zu HLCs ausgereift werden konnten. Die Verwendung von patientenspezifischen HLCs stellt eine vielversprechende Zellquelle für personalisierte Leberregenerationsstrategien dar und bietet in Kombination mit biokompatiblen 3D-Modellen ein breiteres Anwendungsspektrum, das von der Gewebeherstellung über die Arzneimittelprüfung und -testung bis hin zur Krankheitsmodellierung reicht.

Um die Versorgung von Zellen bzw. Organen mit ausreichend Nährstoffen sicherzustellen, ist eine Vaskularisierung notwendig. Aus diesem Grund wurde nachfolgend

eine Methode zur Generierung von Endothelzellen (ECs) aus hiPSCs etabliert. Dazu wurde ein Differenzierungsprotokoll erarbeitet, welches innerhalb von 6 Tagen aus hiPSCs funktionelle ECs hervorbrachte, die zellspezifische Marker exprimierten. Im Anschluss daran wurde ein blutgefäßähnliches in vitro-Modell, auf Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) und den generierten ECs etabliert, um einerseits die Interaktion eines Endothels mit aus dem Blut stammenden Zellen in Echtzeit zu analysieren und um andererseits die Endothelialisierung vaskulärer Implantate zu testen. Zukünftig kann dieses Modell als in vitro-Testplattform eingesetzt werden, um die Interaktion des Endothels mit verschiedenen Blutzellkomponenten zu analysieren und um den Einfluss von unterschiedlichen Gefäßimplantaten und -beschichtungen auf die Endothelialisierung zu testen und somit kontinuierlich zu verbessern.

Im Bereich der regenerativen Medizin eröffnet der Einsatz von patientenspezifischen hiPSCs vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Unter Verwendung von srRNA können somatische Zellen in einem ersten Schritt zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert und anschließend zu autologen Gewebezellen wie z.B. zu HLCs und ECs differenziert werden. Der Einsatz dieser Zellen besteht sowohl in der Zelltherapie als auch im Bereich des Tissue Engineerings, aber auch in der Testung von Arzneimitteln oder Implantat- und biomaterialien und bietet die Grundlagen für neuartige Behandlungsoptionen.

Abstract

Regenerative medicine is currently one of the most promising areas of research for the future treatment of diseases. Among other things, this field of research is looking at strategies for tissue regeneration. In the future, it should be possible to have treatment options available for diseases for which there are currently no or only inadequate therapies. In the past, the lack of autologous cells and the reproduction of realistic tissue structures were the main limiting factors. The possibility of generating patient-specific induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from somatic cells has opened up an almost unlimited source of autologous cells, enabling research into innovative therapeutic options.

In this work, a non-integrative, synthetic self-replicating messenger ribonucleic acid (RNA; srRNA) was used to reprogram renal epithelial cells (RECs) into footprint-free hiPSCs. The resulting hiPSCs exhibited the typical characteristics of pluripotent stem cells. Among other things, it was possible to differentiate them into the three germ lines (mesoderm, endoderm and ectoderm), which could be confirmed using the chorion-allantois membrane (CAM) assay used for the first time for this purpose.

In the further course of this work, a differentiation procedure was established to differentiate the REC-derived hiPSCs into autologous hepatocyte-like cells (HCLs). The successfully differentiated cells expressed hepatocyte-specific markers and displayed important hepatocyte functions (albumin synthesis, cytochrome (CYP)-P450 activity, glycogen storage and indocyanine green metabolism). Subsequently, biocompatible three-dimensional (3D) melt electrospun poly- ϵ -caprolactone (PCL) scaffolds were fabricated and seeded with pre-differentiated hepatoblasts, which adhered uniformly to the scaffold fibers and matured into HCLs. The use of patient-specific HCLs represents a promising cell source for personalized liver regeneration strategies and, in combination with biocompatible 3D models, offers a wider range of applications from tissue engineering to drug testing and disease modelling.

Vascularization is indispensable to ensure that cells are supplied with sufficient nutrients. For this reason, a method for generating endothelial cells (ECs) from hiPSCs was subsequently established. In this context, a differentiation protocol was developed with which it was possible to generate functional ECs that express specific markers from hiPSCs within 6 days. Subsequently, a blood vessel-like model consisting of polydimethylsiloxane (PDMS) and the generated ECs was established to analyze the interaction

of an endothelium with blood-derived cells in vitro in real time and additionally to test vascular implants. In the future, this model can serve as an in vitro platform to firstly analyze the interaction of the endothelium with different blood cell components and secondly to test the influence of different vascular implants and coatings on endothelialization.

The use of patient-specific hiPSCs opens up enormous possibilities in the field of regenerative medicine. Somatic cells can be reprogrammed into pluripotent stem cells using srRNA and differentiated into autologous tissue cells such as HLCs and ECs. The potential applications of these cells are diverse and include cell therapy as well as tissue engineering and the testing of drugs or implant and biomaterials and provide the base for novel treatment options for which there are currently no or only limited therapeutic options.

1 Einleitung

1.1 Regenerative Medizin

Die derzeitige Möglichkeit der Transplantation intakter Organe und Gewebe zur Behandlung von Organ- und Gewebeversagen und -verlusten ist unter dem begrenzten Angebot an Spenderorganen und den oft schwerwiegenden immunologischen Komplikationen limitiert [1]. Potentielle Ansätze zur Umgehung dieser Problematiken werden im Bereich der Regenerativen Medizin entwickelt. Die regenerative Medizin ist ein multidisziplinäres Forschungsgebiet, das die Molekular- und zellbiologie, mit der Gewebezüchtung (auch als Tissue Engineering bezeichnet) und der Biomaterialforschung vereint (**Abbildung 1**). Im Rahmen der Regenerativen Medizin werden Therapiemöglichkeiten erforscht und entwickelt, die es ermöglichen, Zellen, Gewebe oder ganze Organe zu regenerieren oder zu ersetzen, die durch Alterung, Erkrankungen oder Traumata nicht mehr voll funktionsfähig sind oder auch um angeborene Defekte zu behandeln [2]. Dabei werden sowohl Möglichkeiten eines biologischen Gewebeeratzes [3] als auch die Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse erforscht [4]. Die regenerative Medizin umfasst zahlreiche innovative Strategien, darunter die Verwendung von Materialien und de novo erzeugten Zellen sowie verschiedene Kombinationen davon, um fehlendes Gewebe sowohl strukturell als auch funktionell wirksam zu ersetzen oder zur Geweberegeneration anzuregen [3]. In klinischer Hinsicht stellt dies dennoch eine enorme Herausforderung dar, da Säugetiere, einschließlich des Menschen, eine der schlechtesten Regenerationsfähigkeiten aller Wirbeltiere aufweisen [5]. Ein wichtiges Ziel der Regenerationsforschung ist daher das Verständnis der molekularen Mechanismen, die die Regeneration steuern. Durch die Stammzellforschung, aber auch durch die Möglichkeit Genom- und transkriptomana-lysen durchzuführen hat sich das Wissen über molekulare Mechanismen, die an der Geweberegeneration beteiligt sind stetig weiterentwickelt. Dadurch wurde die Regenerative Medizin zu einem möglichen Therapieansatz für Erkrankungen, für die bis dato nur begrenzte Behandlungs- bzw. therapiemöglichkeiten verfügbar waren.

Einleitung

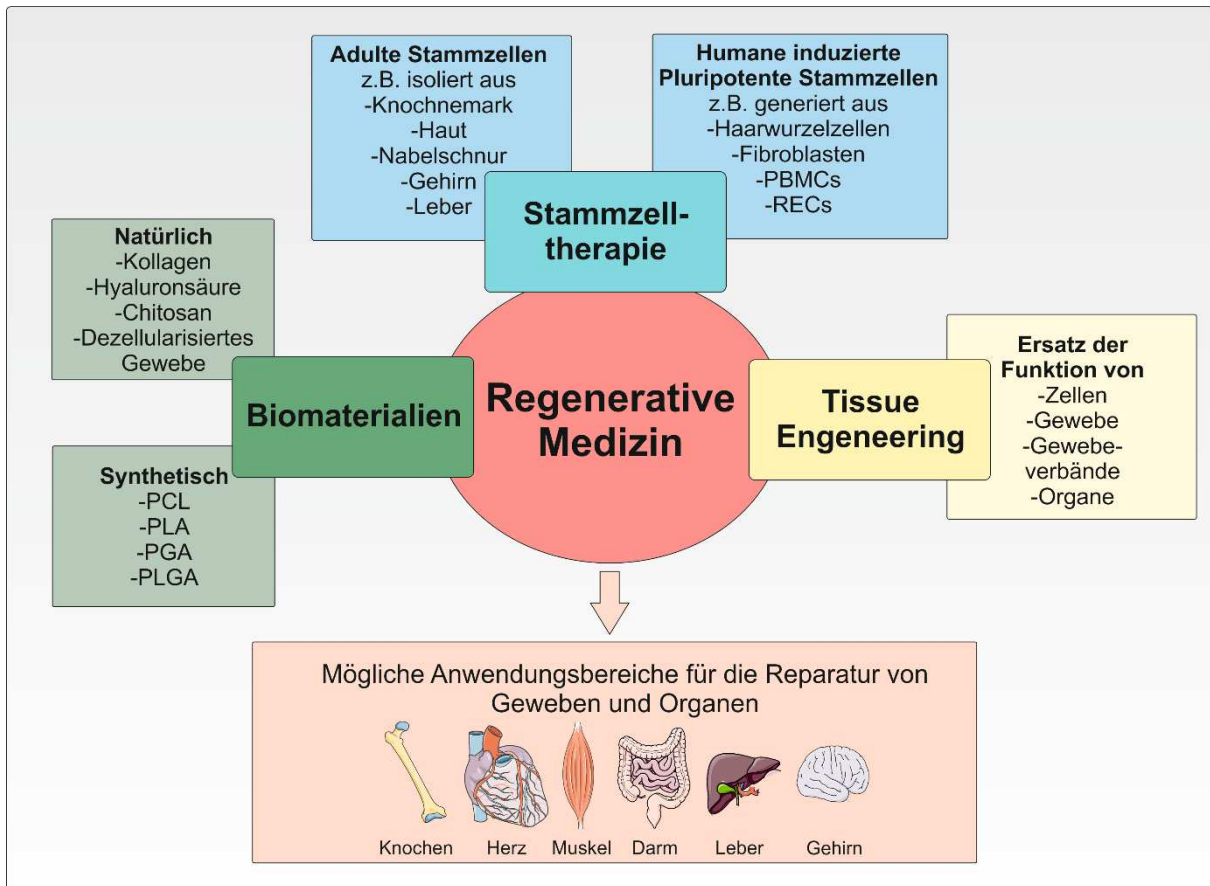


Abbildung 1: Übersicht der Teilgebiete und Anwendungsbereiche der Regenerativen Medizin.

Die Regenerative Medizin ist ein multidisziplinäres Forschungsgebiet der translationalen Medizin und verbindet die Biomaterialforschung, Zell-basierte Therapien und das Tissue Engineering mit dem Ziel der Entwicklung von Therapien, die die Möglichkeit bieten Zellen, Gewebestrukturen oder ganze Organe zu heilen oder zu ersetzen. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von Servier Medical Art gezeichnet. Servier Medical Art von Servier ist lizenziert unter einer „Creative Commons Attribution 3.0 Unported License“.

Stamm- oder Progenitorzellen können *in vitro* oder *in vivo* zu der gewünschten Zellart differenziert und anschließend zur Stimulation endogener Reparaturmechanismen genutzt werden. Aber auch der Einsatz bioaktiver Materialien, die Wachstumsfaktoren freisetzen oder die Transplantation von biotechnologisch hergestellten Gewebestücken kann zur Geweberegeneration führen, bevor es zu einem lebensbedrohlichen Organversagen kommt.

Vor allem die Zelltherapie gilt als eine der vielversprechendsten Zukunftstechnologien für die Reparatur von beschädigtem oder zerstörtem Gewebe [6]. Die zellbasierte Therapie beinhaltet die Verabreichung von Zellen als lebende Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheiten und hat in den letzten Jahren eine gesteigerte klinische Anwendung erfahren [7]. Die Zelltherapie umfasst stammzellbasierte und nicht-stammzellbasierte, einzellige und multizelluläre Therapien mit unterschiedlichen, immunphänotypischen Profilen, Isolierungstechniken, Wirkmechanismen und Regulierungsebenen [8]. Durch

Einleitung

gezieltes Einbringen von neuem, gesundem zellulärem Material in den Körper eines Erkrankten ist es möglich, kranke oder geschädigte Zellen eines Gewebeverbands zu ersetzen, neu zu generieren oder zu reparieren und somit Krankheiten zu behandeln. Des Weiteren können hierdurch lösliche Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, welche eine parakrine oder endokrine Wirkung erzielen können [9]. Trotz kontinuierlicher Fortschritte bei zellbasierten Behandlungen verschiedener Indikationen ist die Entwicklung neuer Produkte oder Therapieansätze ein schwieriger und zeitintensiver Prozess. Innovative Zelltherapien können auf Grund ihrer neuartigen Wirkmechanismen unterschiedliche Risiken für den Patienten mit sich bringen, wie beispielsweise Immunogenität oder Tumorigenität. Aus diesem Grund sind bisher nur wenige zellbasierte Therapien klinisch zugelassen. Gen- und zelltherapien werden in der Erforschung und der klinischen Erprobung sowie gegebenenfalls in der Vermarktungsphase einer strengen wissenschaftlichen, ethischen und behördlichen Überprüfung unterzogen, was viele Jahre dauern kann [10]. Zu den aktuell zugelassenen zellbasierten Therapien gehören unter anderem die Behandlung von Lymphdrüsenkrebs mittels Zelltransfer von genetisch veränderten CAR-T-Zellen [7], die Verwendung von patienteneigenen Limbusstammzellen zur Reparatur geschädigter Hornhautepithelien [11] sowie die Verwendung von adulten Stammzellen zur Behandlung von Fisteln im Zusammenhang mit Morbus Crohn [12]. Zudem ist seit 2017 eine Zelltherapie zur Behandlung von Knorpelschäden im Kniegelenk zugelassen. Den Patienten werden dabei Chondrozyten entnommen und expandiert, um anschließend Sphäroide zu generieren, die dann im Kniegelenk eingesetzt werden [13].

Die für Zelltherapien häufig verwendeten patienteneigenen Zellen werden meist durch eine Biopsie des entsprechenden Gewebes gewonnen. Anschließend werden sie vom Gewebeverband getrennt bzw. daraus isoliert und in einer in vitro-Zellkultur expandiert, um sie daraufhin dem Patienten zu Therapiezwecken wieder zuzuführen. Diese autologen Zellpopulationen sind für zelltherapeutische Behandlungsstrategien von großem Interesse, da sie ein minimales Abstoßungsrisiko aufweisen [9, 14]. Allerdings hängt der Erfolg der Therapie sowohl entscheidend von der Zellverfügbarkeit im Patienten als auch von den Eigenschaften der Zielzellen ex vivo ab.

1.2 Stammzellen

Stammzellen weisen keine oder nur eine geringfügige Differenzierung auf, wodurch ihre Funktion im späteren Organismus noch nicht festgelegt ist. Aus Stammzellen können durch Teilung, Tochterstammzellen oder durch Differenzierung spezialisierte Gewebezellen hervorgehen. Unterschieden werden drei Arten von Stammzellen. Sie alle haben die Eigenschaft, sich selbst zu erneuern und sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Eine Unterscheidung der Stammzellen erfolgt nach dem Grad ihrer Spezialisierung in totipotente, pluripotente oder multipotente bzw. adulte Stammzellen (**Abbildung 2**) [15].

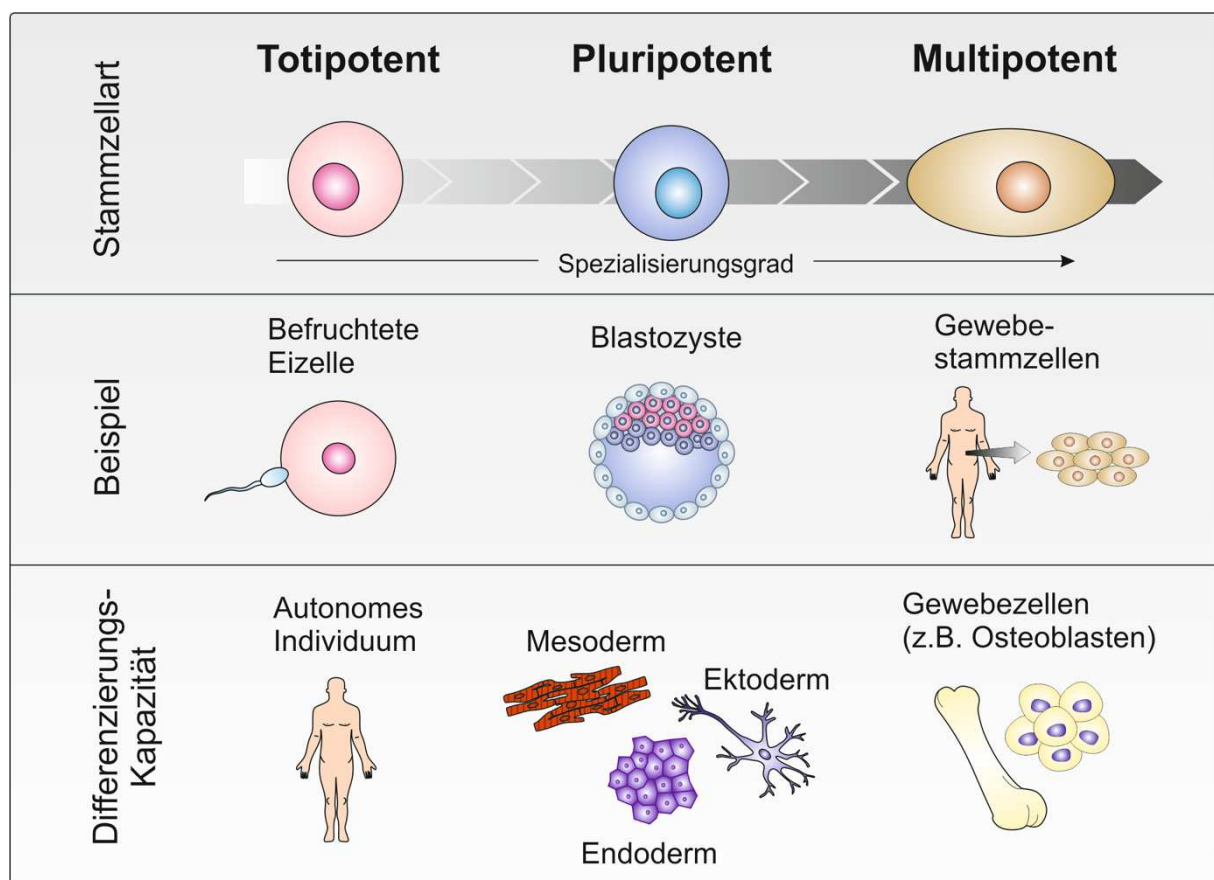


Abbildung 2: Schematische Abbildung der Einteilung von Stammzellen.

Mit zunehmender Spezialisierung der Stammzellen nimmt deren Differenzierungsfähigkeit allmählich ab. Aus einer befruchteten Eizelle entwickelt sich durch Teilung und Verdichtung der Zellen die Blastozyste, welche keine totipotenten Eigenschaften mehr aufweist, sondern in den pluripotenten Zustand übergegangen ist. Pluripotente Zellen können sich in gewebespezifische Zellen aller drei Keimbahnen (meso-, endo- und ektoderm) differenzieren. Die fortschreitende Spezialisierung führt zu multipotenten Stammzellen, die sich ausschließlich in Zellen einer bestimmten Keimbahn differenzieren lassen. Bei erwachsenen Menschen sind sie an der physiologischen Geweberegeneration beteiligt.

Totipotente Zellen sind am geringsten entwickelt aber die potentesten Stammzellen. Nach Befruchtung der Eizelle bis einschließlich vier bis acht Zellteilungen können sie

Einleitung

sich zu einem vollständigen Organismus entwickeln und das extra-embryonale Gewebe bilden [16]. Nach weiteren Teilungen erreichen die Zellen das Stadium der Blastozyste, in dem sie in die Pluripotenz übergehen und sich somit ausschließlich in die drei embryonalen Keimbahnen differenzieren können. Nach weiteren Teilungen beginnt die postembryonale Phase und die Zellspezialisierung schreitet weiter voran, was letztendlich zum Verlust der pluripotenten Eigenschaften führt. Die Fähigkeit zur Differenzierung ist dann auf Zellarten einer bestimmten Keimbahn oder eines Gewebes beschränkt, und die Stammzellen werden als adulte Stammzellen bezeichnet, da sie auch in erwachsenen Individuen vorhanden sind. Adulte multipotente Stammzellen liegen in einem metabolisch ruhenden Zustand vor, sind aber aktiv an der Geweberegeneration nach Verletzungen [17], sowie der physiologischen Erneuerung von Zellen beteiligt. Sie sind während der gesamten Lebenszeit in einem Organismus nachweisbar [18], beispielsweise in den Organen und im Knochenmark.

Adulte Stammzellen liegen in jedem Menschen vor. Dies eröffnet die Möglichkeit eines autologen Einsatzes für stammzellbasierte Therapien [19]. Des Weiteren können in diesem Zusammenhang auch embryonale Stammzellen (ESCs) oder pluripotente Stammzellen (PSCs) für innovative Therapieansätze zur Behandlung von Krankheiten oder medizinischen Problemstellungen genutzt werden.

1.2.1 Pluripotente Stammzellen (PSCs)

Studien zur erfolgreichen Anwendung von humanen Stammzellen im Bereich der Regenerativen Medizin haben gezeigt, dass Stammzellen eine optimale Lösung darstellen, um Gewebe- oder Organstrukturen zu generieren. Sie sind in der Lage, sich in unterschiedliche, spezifische Zelltypen zu differenzieren, die für die Reparatur von erkranktem Gewebe benötigt werden [20]. In den letzten Jahren hat sich die Anzahl klinischer Studien, die sich mit stammzellbasierten Therapien befassen, stark erhöht [21]. Gewebespezifische adulte Stammzellen, weisen dabei allerdings meist ein limitiertes Proliferations- und Differenzierungspotenzial auf. PSCs im Gegensatz dazu, haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung, um Tochterzellen zu produzieren, die die gleichen Eigenschaften der Vorläuferzelle besitzen [22]. Unter bestimmten Bedingungen oder bei bestimmten Signalen sind PSCs in der Lage in die drei Keimbahnen zu differenzieren [23]. Dadurch können nahezu unbegrenzt gewebespezifische Zellen für verschiedene Anwendungsmöglichkeiten hergestellt werden.

Einleitung

Im Allgemeinen werden zwei Arten von PSCs unterschieden: ESCs und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs). ESCs werden aus der inneren Zellmasse von Präimplantationsembryonen gewonnen [24] und können in vitro ihren pluripotenten Zustand unbegrenzt aufrechterhalten bzw. expandiert werden. Trotz zahlreicher Einsatzmöglichkeiten, die vor allem humane ESCs für die Forschung und Medizin bieten gibt es sowohl technische als auch ethische Limitierungen, die den klinischen Einsatz von humanen ESCs einschränken [25]. Insbesondere die Isolation der ESCs aus der Blastozyste geht mit ethischen Bedenken einher, da dieses Verfahren zur Zerstörung eines Embryos führt [24]. Neben der Zerstörung des Embryos handelt es sich bei humanen ESCs um eine ausschließlich allogenen verfügbare Zellquelle, deren geringe Verfügbarkeit, aber auch die Risiken der Immunreaktion den klinischen Einsatz weiter einschränken. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde in den vergangenen Jahren an alternativen Möglichkeiten geforscht, die es ermöglichen ausdifferenzierte adulte somatische Zellen in PSCs umzuwandeln.

1.2.2 Humane induzierte Pluripotente Stammzellen (hiPSCs)

Das Prinzip der Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen basiert auf der gezielten Umwandlung, auch als Reprogrammierung bezeichnet, von somatischen Zellen in Zellen, die durch die Expression embryonaler Transkriptionsfaktoren wieder einen pluripotenten Zustand aufweisen [26]. Dieser Prozess wird unter anderem durch Chromatinablagerungen und die Entfernung von Methylierungsmustern der Desoxyribonukleinsäure (DNA) ermöglicht. Die anschließende Überexpression von Transkriptionsfaktoren, die auch im embryonalen Stadium vorhanden sind, leitet den Prozess letztendlich ein. Die Transkriptionsfaktoren Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4), Sex determining region Y-box 2 (Sox2) und Nanog halten die Pluripotenz der Zellen aufrecht und werden somit auch am stärksten exprimiert. Weiterhin spielen auch die Expression von cMyc, Krüppel-like factor (Klf4) und Lin28 aber auch die Kulturbedingungen, eingesetzte Wachstumsfaktoren oder Zytokine usw. beim Erhalt der Pluripotenz eine Rolle [27].

Die erste gezielte Reprogrammierung von somatischen Zellen wurde bereits 1962 von John Gurdon durchgeführt. Durch Zellkerntransfer einer Darmzelle der *Xenopus*-Kaulquappe in ein enukleiertes Froschei gelang ihm die Einführung einer nuklearen Reprogrammierung [28]. Im weiteren zeitlichen Verlauf wurde die Strategie der Reprogram-

Einleitung

mierung 2006 von Yamanaka und Takahashi unter Verwendung von nur vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc), die von 24 Faktoren reduziert wurden, mittels retroviraler Transduktion an murinen und kurze Zeit später auch an humanen Fibroblasten durchgeführt [29, 30]. Diese Faktoren haben die Fähigkeit, Pluripotenz bei somatischen Zellen zu induzieren, so dass die entstandenen PSCs theoretisch, durch reversible epigenetische Veränderungen, in jeden der 220 bekannten Zelltypen differenzieren können [31]. Weiterführend konnte gezeigt werden, dass die so entstandenen PSCs wie auch ESCs in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und zu differenzieren und somit als Alternative zu ESCs verwendet werden können. Seitdem wurden weitere Reprogrammierungsfaktoren und -methoden getestet, sodass nun zur Generierung von hiPSCs Kombinationen verschiedener Reprogrammierungsfaktoren, Proteine, RNAs, Peptide usw. zur Verfügung stehen [32].

Die Generierung von hiPSCs aus patienteneigenen Zellen (**Abbildung 3**) ist im Vergleich zu ESCs oder dem Zellkerntransfer ethisch unbedenklich und ermöglicht die personalisierte Generierung unterschiedlichster Zellarten aus hiPSCs, wodurch die in vitro-Erforschung von Krankheitsbildern oder Medikamenten möglich ist. Aber auch für den Bereich der Regenerativen Medizin stellt die Möglichkeit der Generierung von hiPSCs eine nahezu unerschöpfliche Zellquelle dar.

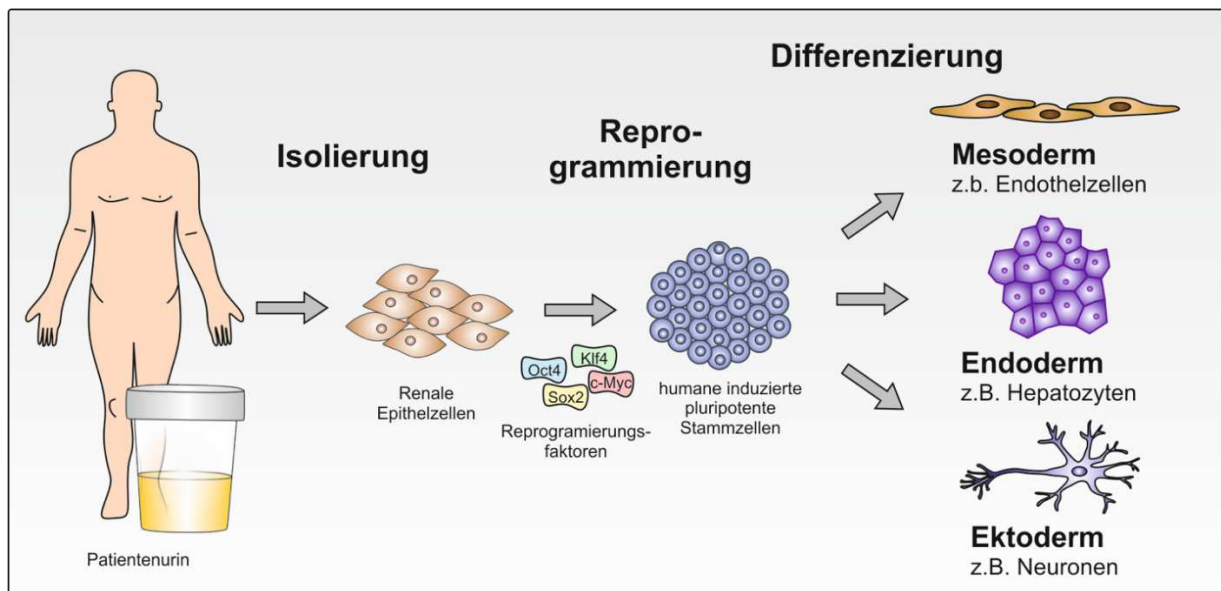


Abbildung 3: Generierung von hiPSCs durch Reprogrammierung somatischer Zellen und anschließende Differenzierung.

Schematische Darstellung der Reprogrammierung von humanen somatischen Zellen, anhand des Beispiels renaler Epithelzellen (RECs). Häufig eingesetzte Zellarten für die Reprogrammierung sind unter anderem Fibroblasten, oder RECs, welche über Hautbiopsien bzw. Urinproben gewonnen, isoliert und

Einleitung

in vitro expandiert werden. Durch das Einbringen und die darauffolgende Expression von Reprogrammierungsfaktoren (z.B. Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc) können hiPSCs entstehen, die anschließend wieder zu gewebespezifischen Zellen differenziert werden können.

Zur Induktion der Pluripotenz somatischer Zellen können integrierende und nicht-integrierende Reprogrammierungsmethoden angewendet werden. Vor allem integrierende virale Vektoren wurden in der Vergangenheit häufig zur Reprogrammierung somatischer Zellen verwendet [33]. Neben ihrer Immunogenität [34] kann die konstante Präsenz der Vektoren im Genom auch nach Beendigung der Reprogrammierung zu einer unerwünschten Reaktivierung der Transkriptionsfaktoren führen und dadurch die Genexpression oder die DNA-Methylierung verändern [35]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Qualität der erzeugten hiPSCs beeinträchtigt sein kann, da die Expression endogener Gene, die mit Pluripotenz assoziiert sind, nicht vollständig aktiviert wurde [36]. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass eine potentielle Reaktivierung des viralen Transgens und seine Restaktivität in den entstandenen hiPSCs den zellulären Entwicklungsprozess verändern und zur Tumorentstehung führen kann [37, 38]. Nach Beendigung der Reprogrammierung kann durch die Erweiterung der Vektorsequenz eine gezielte Entfernung der viralen Komponenten vorgenommen werden [39]. Das Risiko einer potenziellen Reaktivierung der Transkriptionsfaktoren im Falle einer nicht erfolgreichen oder unzureichenden Entfernung der viralen Vektorsequenzen bleibt aber bestehen.

Um die Verwendung von viralen Vektoren zu umgehen, sind mittlerweile verschiedene nicht-integrierende Reprogrammierungsmethoden etabliert, wie zum Beispiel die Transfektion somatischer Zellen mit Plasmid DNA (pDNA) [40], die Verwendung von Sendai- und Adenoviren [41, 42], Protein-basierte Transduktion [43], oder die Verwendung von synthetischer Messenger RNA (mRNA) [44]. Dadurch konnten in den vergangenen Jahren große Fortschritte mit hiPSCs im Bereich der Grundlagenforschung, aber auch in der klinischen Anwendung gemacht werden. Bereits im Jahr 2014 wurde die Sicherheit von regenerativen Therapieansätzen in einer ersten klinischen Studie zur Behandlung der Makula-Degeneration mittels hiPSC-abgeleiteten Zellen nachgewiesen werden [45].

1.3 Reprogrammierung mit mRNA

In den letzten Jahren wurden verschiedene, nicht-integrative, Reprogrammierungsmethoden erfolgreich etabliert, um Pluripotenz in verschiedenen somatischen Zelltypen zu induzieren [46, 47]. Ein vielversprechender Ansatz ist dabei die Verwendung einer

Einleitung

synthetischen mRNA zur Reprogrammierung [48, 49]. mRNAs, die beispielsweise für die "Yamanaka"-Faktoren (Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc) und zusätzlich Lin28 kodieren [50], können mittels einer in vitro-Transkription (IVT) synthetisiert (**Abbildung 4A**) und anhand einer Transfektion in die Zellen eingebracht werden, um eine Reprogrammierung zu induzieren (**Abbildung 4C**). Ein großer Vorteil der mRNA besteht in ihrem molekularen Aufbau, der sich von DNA unterscheidet und verhindert, dass sie ins Genom eingebaut werden kann. mRNA verbleibt im Zytoplasma und es besteht keine Gefahr einer Integrationsmutagenese. Die Transienz der mRNA stellt einen weiteren Vorteil dar, da mRNA-Moleküle in einem Zeitraum von 2-3 Tagen physiologisch von der Zelle abgebaut werden [48, 51] und eine Reaktivierung der Reprogrammierungsfaktoren zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr möglich ist. Allerdings erfordern die transienten Eigenschaften der mRNA eine tägliche Transfektion der Zellen, um eine kontinuierliche Expression der Reprogrammierungsfaktoren über den gesamten Zeitraum des Reprogrammierungsprozesses zu gewährleisten [48]. Die Erkennung der fremden RNA aktiviert, demzufolge täglich die angeborene Immunantwort, was zu erhöhtem zellulärem Stress und Zytotoxizität führt [52].

1.3.1 Reprogrammierung mit selbstreplizierender RNA (srRNA)

Um die Schwierigkeiten synthetischer mRNA-basierter Reprogrammierungsmethoden zu umgehen, ist der Einsatz von srRNA eine alternative Strategie zur Herstellung von rückstandsfreien hiPSCs, die erstmals von Yoshioka et al. im Jahr 2013 veröffentlicht wurde [53]. Im Rahmen dieser Studie wurde eine RNA entwickelt, die sich für eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen selbst repliziert (**Abbildung 4B**). Dadurch kann die zur Reprogrammierung notwendige Anzahl an Transfektionen reduziert werden. Das Ausgangskonstrukt ist ein nicht infektiöses, selbstreplizierendes RNA-Replikon des Venezolanischen Pferdeenzephalomyelitis (VEE)-Virus [54]. Das VEE-Virus ist ein positives einzelsträngiges RNA (ssRNA)-Virus, das die Information für eine RNA-Polymerase in Form der nichtstrukturellen Proteine (nsPs) 1-4 in die Zelle einschleust [55]. Die Translationsmaschinerie der Wirtszelle gewährleistet die Expression der nsPs. Über einen negativen RNA-Strang kann das Virus so seine genomische RNA replizieren und mit Hilfe des 26S Promotors eine subgenomische RNA herstellen. Die subgenomische RNA kodiert für die viralen Strukturproteine (Glykoproteine und Kapsid). Nach der Translation werden diese modifiziert und bilden nach dem Transport zur Wirtszellmembran neue Viruspartikel [56].

Einleitung

Die VEE-srRNA enthält ausschließlich die nsP1 bis nsP4, die für den RNA-Selbstreplikationskomplex VEE-Virus kodieren [44, 57]. Zusätzlich sind die "Yamanaka"-Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) in vier offenen Leserahmen (Open reading frames, ORFs) auf dem RNA-Konstrukt enthalten, wodurch die konstante Expression der Reprogrammierungsfaktoren nach einer einmaligen Transfektion über mehrere Zellteilungen hinweg möglich ist.

Die VEE-srRNA ahmt mit der 5'-Cap-Struktur und dem Poly(A)-Schwanz zelluläre mRNA nach [58]. Um eine Positivselektion der erfolgreich transfizierten Zellen durchführen zu können, wurde sie durch die Sequenz für eine Puromycin N-acetyltransferase (PAC) ergänzt, da Puromycin zytotoxisch wirkt. Strukturell ähnelt Puromycin einer Tyrosin kodierenden RNA (tRNA) [59] und ist in der Lage, bei nicht erfolgreich transfizierten Zellen an der Bindungsstelle der Ribosomen einzutreten und kovalent an mRNA zu binden [60]. Dies führt zu einem irreversiblen vorzeitigen Abbruch der Translation und die Zelle geht durch die Anhäufung von fehlerhaften Proteinen zu Grunde [59].

Durch zelleigene Nukleotide findet die Replikation der srRNA im Zytoplasma der zu transfizierenden Zellen statt. Dafür ist eine einzige Transfektion ausreichend. Dies reduziert die Immunogenität und den zellulären Stress. Dennoch wird auch die srRNA als fremd erkannt, was zu einer Immunreaktion (Typ-I-IFN Antwort) bei den Wirtszellen führt [61]. Die in Folge dessen freigesetzten Interferone (IFN)- α und IFN- β werden an IFN-Rezeptoren auf der Zellmembran gebunden. Dies führt über die Janus kinase; Signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT)-Signalkaskade zur Aktivierung von Interferon-stimulated genes (ISGs) [62]. Dabei werden unter anderem RNA bindenden Proteinen (RBPs) exprimiert, die eine Reduktion der Proteinbiosynthese, eine Degradierung von RNA und apoptotische Prozesse in den Zellen einleiten, um fremde RNA zu beseitigen [62]. Um die Degradation der RNA während der Reprogrammierung entsprechend reduzieren zu können, ist demnach die Verwendung eines Interferoninhibitors (B18R) notwendig. Ein Ausschleichen von B18R kann positiv genutzt werden, um die Selbstreplikation am Ende der Reprogrammierung zu stoppen und rückstandsfreie hiPSCs zu generieren.

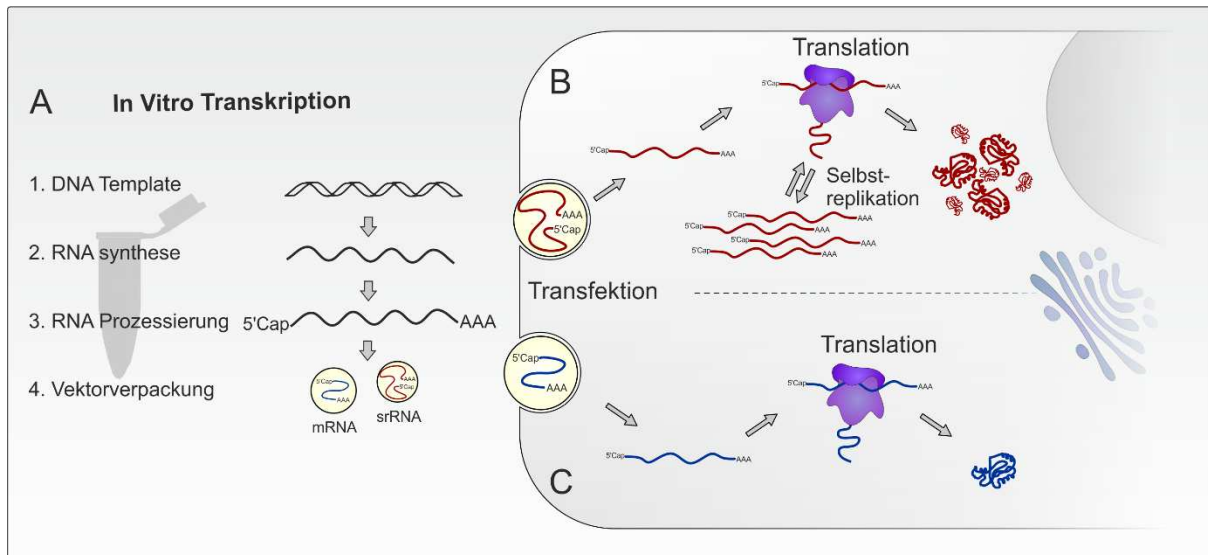


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Herstellung und Anwendung von mRNAs zur Reprogrammierung somatischer Zellen.

(A) mRNAs, die beispielsweise für die "Yamanaka"-Faktoren (Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc) und Lin28 kodieren, können mittels einer in vitro-Transkription (IVT) synthetisiert werden und anschließend anhand einer Transfektion in die Zellen eingebracht werden, um eine Reprogrammierung zu induzieren. (B) srRNA ist in der Lage, sich für eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen selbst zu replizieren, um so die Anzahl der notwendigen Transfektionen zu reduzieren. (C) Die transiente mRNA verbleibt im Zytoplasma und stellt keine Gefahr einer Integrationsmutagenese dar. Allerdings wird sie in einem Zeitraum von 2-3 Tagen auf natürlichem Wege abgebaut, wodurch mehrere Transfektionen für eine Reprogrammierung notwendig sind.

1.4 Somatische Zellquellen

Nachdem hiPSCs erstmalig aus humanen Fibroblasten generiert werden konnten, wurden weitere Arten somatischer Zellen für die Reprogrammierung etabliert, wie zum Beispiel Periphere Mononukleäre Blutzellen (PBMCs) [63], Keratinozyten aus Haarwurzeln [64], Fibroblasten aus der Haut oder Renalen Epithelzellen aus dem Urin [44]. Die in dieser Arbeit verwendeten RECs stellen eine nicht-invasive, patientenschonende somatische Zellquelle dar. Durch die physiologische Selbsterneuerung des Epithelgewebes im Harntrakt werden beim Menschen täglich zwischen 2000 und 7000 Epithelzellen des proximalen Nierentubulus über den Urin ausgeschieden [65]. Die Gewinnung und Reprogrammierung dieser Zellen ist somit eine nicht-invasive Strategie zur Gewinnung körpereigener Zellen von Patienten dar.

1.5 Tissue Engineering

Patienten, die an angeborenen oder erworbenen Erkrankungen leiden, werden derzeit häufig mit chirurgischen Therapien oder Proteinersatztherapien behandelt. Durch diese Ansätze kann jedoch nicht immer ein physiologischer Zustand erreicht werden. Auch chirurgische Verfahren können aufgrund verschiedenster Faktoren fehlschlagen

Einleitung

[66]. Sie konzentrieren sich in der Regel auf die Verpflanzung von Gewebe von einer Stelle auf eine andere beim selben Patienten (Autotransplantation) oder von einer Person auf eine andere (Transplantation oder Allotransplantation), was weitere Risiken und Folgen birgt. So ist die Entnahme von Autotransplantaten teuer, schmerzhaft, anatomisch begrenzt und geht mit einer Verletzung der Entnahmestelle und der Gefahr von Infektionen und Hämatomen einher. Im Fall einer Allotransplantation ist das zur Verfügung stehende Gewebe ebenfalls begrenzt und es besteht die Gefahr einer Abstoßung des Empfängers. Auch können Infektionen oder Krankheiten vom Spender auf den Empfänger übertragen werden [67].

Die Reparatur oder Regeneration von geschädigtem Gewebe oder Organen und die Wiederherstellung ihrer Funktionen bleibt daher ein großes Bestreben im Bereich der Regenerativen Medizin. Das Tissue Engineering bietet dafür therapeutische Techniken, die sich auf die Reaktivierung von Entwicklungsprozessen in vivo und ex vivo stützen, um Produkte oder Modelle zu entwickeln, die zur Linderung von Gesundheitsproblemen beitragen können, einschließlich des Verlusts von Gewebe-/Organfunktionen aufgrund von Traumata [68]. Um funktionelle, vorzugsweise autologe Ersatzstoffe [69] herzustellen, die ein beschädigtes Gewebe regenerieren oder ersetzen macht sich das Tissue Engineering im Allgemeinen drei wesentliche Komponenten zunutze [70]: Dazu zählen gewebespezifische Zellen sowie Gerüststrukturen (auch als „Scaffolds“ bezeichnet), die eine realitätsnahe Umgebung für die Zellen nachahmen, und spezifische Biomoleküle die eine Signalvermittlung innerhalb des Gewebes ermöglichen und gegebenenfalls die Zelldifferenzierung oder die Proliferation fördern [71].

Obwohl die beschriebenen Strategien noch am Anfang stehen, gibt es bereits einige Beispiele für eine erfolgreiche klinische Umsetzung des Tissue Engineerings. Dazu zählen unter anderem der Ersatz von Bronchialsegmenten [72], die Wiederherstellung von Knochen [73], sowie Knorpeldefekten [74] oder Therapiemöglichkeiten bei Bladendefekten [75]. Aber auch für die Entwicklung externer Hilfsmittel wie beispielsweise einer extrakorporalen Leber [76] oder künstlichen Geweben, die als in vitro-Modelle zur Untersuchung des Zellverhaltens und anderer Entwicklungsprozesse dienen, sowie für die Entwicklung neuer molekularer Therapeutika wird das Tissue Engineering bereits erfolgreich eingesetzt [77].

1.5.1 Biomaterialien im Tissue Engineering

Um möglichst gewebespezifische Bedingungen nachbilden zu können und eine Kultivierung unter möglichst physiologischen Bedingungen sicherzustellen, werden unterschiedliche Biomaterialien eingesetzt. Als Biomaterialien werden synthetische oder natürliche (nicht lebende) Materialien bezeichnet, die in der Medizin zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken, oder im Bereich der Forschung, eingesetzt werden und dabei in direkten Kontakt mit biologischem Gewebe des Körpers kommen können. Als Materialien können natürliche Polymere (z.B. Collagen, Alginat, Gelatine, Chitosan etc.) [78], dezellularisierte Extrazellulärmatrices [79], synthetische Polymere (z.B. PCL, Polylactid-co-Glycolid (PLGA)) [80, 81], Metall-basierte Materialien (z.B. Titan) [82] oder Keramiken (z.B. Calcium-Phosphate, bioaktive Gläser und Glaskeramiken) [83, 84] verwendet werden. Im Bereich des Tissue Engineerings sind vor allem Parameter wie Porosität und Architektur des Materials entscheidend für die Funktionalität der eingesetzten Zellen und an die spezifische extrazelluläre Matrix des jeweiligen Gewebes angepasst.

Zur Nachbildung der gewebespezifischen Architektur der extrazellulären Matrix (ECM), aber auch der biologischen und mechanischen Gewebeeigenschaften können verschiedene Herstellungsverfahren, darunter Gefriertrocknung, 3D-Druck, Elektrosponning, Phasentrennung, oder Selbstorganisation (z.B. in Hydrogelen) [85] genutzt werden. Zur weiteren Verbesserung der Materialeigenschaften können zusätzlich Plasmastrahlung oder verschiedene Beschichtungen als Oberflächenbehandlung durchgeführt werden. Aber auch eine Ergänzung der Trägermaterialien mit funktionellen Gruppen (z.B. Arg-Gly-Asp-Peptid) oder Wachstumsfaktoren ist möglich. Dadurch können die Zelladhäsion, Migration und Proliferation verbessert bzw. die Expression von spezifischen Faktoren gesteigert werden [86]. Für den klinischen Einsatz sollten Materialien zum Einsatz kommen, die biologisch abbaubar oder bioresorbierbar und vor allem biokompatibel sind. Etwaige Abbauprodukte sollten über Stoffwechselwege ausgeschieden werden können, um die Funktionen im Gewebe aufrecht zu erhalten. Die größte Herausforderung beim Einsatz von Biomaterialien liegt aber nach wie vor in der potenziellen Induktion von inflammatorischen Prozessen [87]. Diese körpereigenen Entzündungsreaktionen können zu nekrotischen Prozessen oder zur Abstoßung des Materials führen und müssen daher verhindert werden.

1.5.2 Limitierungen des Tissue Engineerings

Das Hauptziel des Tissue Engineerings besteht darin, geschädigtes Gewebe zu ersetzen oder zu reparieren und die Lebensqualität der Patienten auf sichere Weise zu verbessern, indem verschiedene unerwünschte Wirkungen oder Limitierungen medizinischer Standardtherapien umgangen werden [88]. Zu diesem Zweck sollen (autologe) Zellen, Biomaterialien und Wachstumsfaktoren, je nach Verwendungszweck kombiniert und auf den Patienten und dessen Erkrankung abgestimmt werden. Obwohl bereits zahlreiche Untersuchungen und Anwendungen zur Regeneration verschiedener Gewebe durchgeführt wurden, gibt es kritische Faktoren (Zellquelle, Konstruktion der Trägermaterialien (Scaffolds), Zellaussaat, Kulturumgebung, mechanische Eigenschaften des Zell-Scaffold-Konstrukts) zu beachten [89].

Ein häufig beschriebenes Problem bei biotechnologisch hergestellten Geweben ist, dass mit zunehmender Komplexität der biologischen Systeme und Prozesse das Modell selbst zunehmend komplizierter und individualisierter wird/werden muss [90]. Dies führt häufig zu einer eingeschränkten klinischen Anwendbarkeit oder Kommerzialisierung. Auch die Zellquelle hat einen enormen Einfluss auf den Erfolg des Tissue Engineering. Zellen für das Tissue Engineering werden dazu in autologe, allogene und xenogene Zellen unterteilt [91]. Autologe Zellen sind für das Tissue Engineering am besten geeignet, während allogene und xenogene Zellen immunogen sind und eine zusätzliche immunsuppressive Therapie benötigen, wenn neues Gewebe hergestellt werden soll. Eine Einschränkung in Zusammenhang mit autologen Zellen ist die Gewinnung einer ausreichenden Menge gesunder Zellen mit hohem Regenerationspotenzial, insbesondere wenn Patienten alt oder krank sind [92]. In solchen Fällen bieten vor allem Stammzellen ein enormes Potenzial für den Ersatz oder die Regeneration von geschädigtem Gewebe. Insbesondere hiPSCs erlauben hierbei die Möglichkeit für personalisierte Therapieansätze sowie eine nahezu unerschöpfliche patientenspezifische Zellquelle.

1.5.3 Verwendung von hiPSCs im Tissue Engineering

Die Unterschiede in der Physiologie und Molekularbiologie von Mensch und Tier werden als Hauptursache für Misserfolge bei der Arzneimittelentwicklung [93] oder bei der Entwicklung von Krankheitsmodellen angeführt [94], was die Verwendung von humanen Modellen umso erforderlicher macht. Fortschritte auf dem Gebiet der induzierten pluripotenten Stammzellen haben der therapeutischen Forschung viele Möglichkeiten

Einleitung

eröffnet [32]. Vor allem die Pluripotenz und das Potential der Selbsterneuerung sind einzigartige Eigenschaften von hiPSCs [95]. Ihre Fähigkeit, sich unbegrenzt in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, ist für die Behandlung von Verletzungen und Krankheiten besonders vorteilhaft.

Seit der Einführung der hiPSC-Technologie im Jahr 2006 schreitet die Entwicklung in diesem Forschungsgebiet kontinuierlich voran und verschiedene Studien konnten bereits die Anwendbarkeit der hiPSCs bei Herzkrankheiten, Augenkrankheiten oder neurologischen Störungen zeigen [96-98]. Aber auch für personalisierte Zelltherapien, die Modellierung von Krankheiten sowie für den Bereich des Tissue Engineerings haben hiPSCs großes Potential [95]. Dies konnte bereits bei der Behandlung genetischer Störungen (z.B. Sichelzellenanämie), sowie bei der Modellierung komplexer degenerativer Erkrankungen wie Diabetes und Alzheimer gezeigt werden [26, 99].

Somit stellt die Forschung an hiPSC-basierten Therapiemöglichkeiten einen Schlüsselaspekt für das Verständnis, aber auch für die zukünftige Behandlung menschlicher Krankheiten dar. Vor allem Probleme wie die Verfügbarkeit von patientenspezifischen Zellen oder mögliche Immunreaktion des Wirts, können durch die Anwendung von hiPSCs, bzw. durch patientenspezifische hiPSC-basierte Modelle umgangen werden [100, 101]. Häufig ist für realitätsnahe Tissue Engineering Modelle/Produkte eine kombinierte Kultur mehrerer Zellarten notwendig um die Funktion des jeweiligen Gewebes optimal zu simulieren [102]. Auch in diesem Fall sind Gewebemodelle, die aus hiPSCs gewonnene multiple Zellarten enthalten, ein vielversprechender Ansatz.

1.5.4 Leber Tissue Engineering

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle bei verschiedenen physiologischen Funktionen wie dem Protein-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, der Entgiftung von Xenobiotika, der Speicherung von Glykogen und lebenswichtigen Biomolekülen, der Produktion und Ausscheidung von Gallen- und Cholesterinverbindungen, der Synthese von Albumin und Gerinnungsfaktoren, der Ammoniakentgiftung und vielem mehr [103]. In diesem Zusammenhang kann eine Störung oder Einschränkung der Leberfunktionen zu einer Vielzahl von nachfolgenden Komplikationen des Körpers (darunter Infektionen, Blutungen oder erhöhter Druck im Gehirn) mit unterschiedlichem Schweregrad, Morbidität oder Mortalität führen [104].

Einleitung

Die Leber ist die größte Drüse des Körpers, die bei Erwachsenen etwa 1,5 kg wiegt und in einen großen rechten Lappen und einen kleineren linken Lappen (**Abbildung 5A**) unterteilt ist [105]. Jeder Lappen ist weiter in Leberläppchen unterteilt, die die Funktionseinheiten der Leber darstellen (**Abbildung 5B**). Die Leberläppchen, die kleinsten Strukturen der Leber, sind ein Netzwerk aus Hepatozyten und weiteren leberspezifischen Zellen, sowie Gallengängen und Lebersinusoiden, die zwischen den Hepatozyten verlaufen (**Abbildung 5C**). Primäre Hepatozyten machen 60-80 % der Lebermasse aus und erfüllen viele wichtige Funktionen im Körper [106]. Sie werden als parenchymale Zellen bezeichnet, während Cholangiozyten, Endothelzellen, gewebeansässige Makrophagen (Kupffer-Zellen) sowie stellate Zellen als nicht-parenchymale Leberzellen bezeichnet werden. Eine aktive, effiziente Interaktion zwischen Hepatozyten und den sie umgebenden Zellen und/oder der Mikroumgebung ist für ihre Aufrechterhaltung sowie ordnungsgemäße Funktion erforderlich [107].

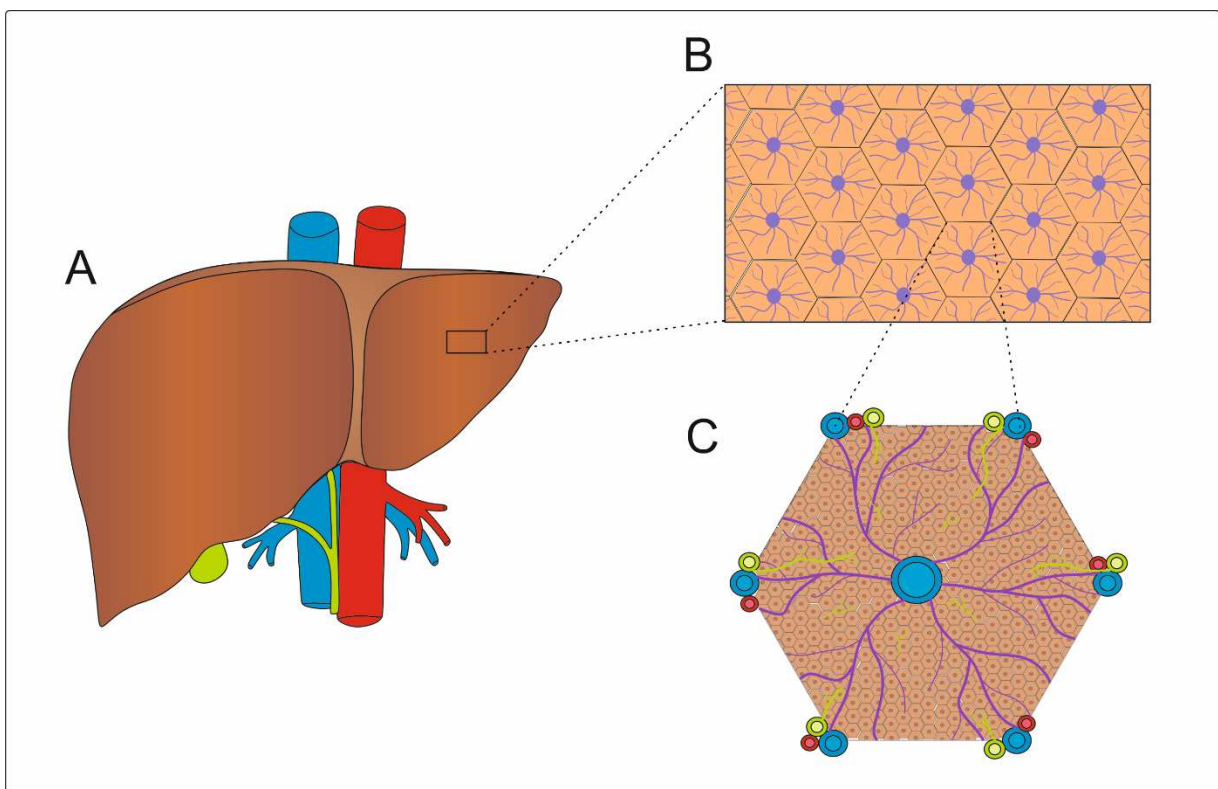


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Komplexität der Leber.

(A) Die Leber besteht aus dem großen rechten Leberlappen und dem kleineren linken Leberlappen. An der Unterfläche der Leber treten die große Leberarterie und die Pfortader in das Organ ein, zudem verlässt der Gallengang hier die Leber und mündet in den Zwölffingerdarm. (B) Die beiden großen Leberlappen bestehen aus sogenannten Leberläppchen. (C) Jedes Leberläppchen besteht aus einem dreidimensionalen Netz aus verschiedenen hepatischen Zellen, Sinusoiden, und Gallenkanälchen. Im Zentrum jedes Leberläppchens liegt außerdem ein Ästchen der Lebervene.

Einleitung

Eine gesunde Leber verfügt über eine ausgezeichnete Regenerationsfähigkeit als Reaktion auf Verletzungen. Diese Fähigkeit kann erheblich beeinträchtigt werden, wenn die Leber einer schweren akuten Verletzung oder einer extremen chronischen Erkrankung ausgesetzt ist, die in der Regel mit einer fortschreitenden Leberentzündung und Fibrose einhergeht [108]. Die orthotope Lebertransplantation ist noch immer der "Goldstandard" und die einzige etablierte Behandlungsoption für Lebererkrankungen im Endstadium und bei akutem Leberversagen. Allerdings ist die Lebertransplantation mit bekannten Einschränkungen verbunden, wie zum Beispiel dem Mangel an Spenderorganen, postoperativen Komplikationen und hohen Krankenhauskosten sowie einer notwendigen lebenslangen immunsuppressiven Therapie [109, 110]. Aufgrund der genannten Einschränkungen sind daher alternative therapeutische Ansätze erforderlich, um Lebererkrankungen zu behandeln, oder die Leber ganz oder teilweise zu ersetzen. Die Anwendung von zellbasierten Therapien ist ein Ansatz, der bereits vor einigen Jahren für die Behandlung verschiedener Krankheitsbilder eingeführt wurde [111-114]. Die Infusion von reifen, isolierten primären Hepatozyten ist jedoch mit einer geringen Anheftungsrate der implantierten Zellen verbunden [115]. Aus diesem Grund wird kontinuierlich an Tissue Engineering-Ansätzen gearbeitet, die darauf abzielen, dreidimensionales (3D)-Lebergewebe oder ganze biotechnologisch hergestellte Lebermodelle oder Leberteile herzustellen, um die eingeschränkte Leberfunktion selbst nach massiven Verletzungen wiederherzustellen und das Problem des Spendermangels zu umgehen [106].

Um leberähnliche Strukturen zu generieren können unterschiedliche Verfahren zum Einsatz kommen. Unter anderem werden dezellularisierte Lebergerüste (z.B. vom Schwein) verwendet, die den Aufbau einer natürlichen extrazellulären 3D-Matrix recht präzise nachbilden können und dadurch eine gute Integration, Differenzierung und Reifung der verwendeten Zellen zur Folge haben [116].

Häufig werden aber auch biologisch abbaubare Gerüststrukturen (sogenannte Scaffolds) aus natürlichen oder synthetischen Materialien verwendet. Diese Scaffolds dienen als ECM, die die eingebetteten Zellen in einer 3D-Architektur organisieren und ihnen Wachstums- und Reifungsstimuli bieten [106]. Durch die Zugabe spezifischer Mikroumfangsfaktoren kann die Funktion solcher Organ-Modelle verbessert wer-

Einleitung

den. Beispielsweise kann die Funktion durch Co-Kultivierung von parenchymalen Zellen mit Nicht-Parenchymzellen wie Endothelzellen und Fibroblasten verbessert werden [117].

Auch Hydrogele sind aufgrund ihres hohen Wassergehalts, ihrer Biokompatibilität und ihrer mechanischen Eigenschaften, die denen von natürlichem Gewebe ähneln, als Gerüstmaterialien für die Generierung von Gewebestrukturen von großem Interesse [118]. Durch die Zugabe von Zellen vor dem Gelierprozess können die Zellen homogen im Gel verteilt werden. Darüber hinaus können Hydrogele dazu verwendet werden, lösliche oder immobilisierte Signalmoleküle an Zellen abzugeben, als Stützstrukturen für Zellwachstum und -funktion zu fungieren und als Raumfüller für das zukünftige Einwachsen von Gewebe zu dienen [119].

Auch unterschiedliche 3D-Biodrucktechnologien werden eingesetzt um Biomaterialien mit hoher Komplexität zu entwerfen. Aufgrund der Vielfalt der verfügbaren Druckverfahren (darunter Stereolithografie, lasergestützte System, düsenbasierte Bioprinting-Techniken, Extrusions-Bioprinting, mikrofluidisches Bioprinting oder Multi-Material-Bioprinting [120, 121]) und der präzisen Steuerbarkeit konnten bereits Fortschritte bei der Bildung von Gefäßnetzwerken von Lebergewebe und anderen Organen erzielt werden [122]. Verstärkt wird aktuell auch an der Verbesserung von 3D-gedruckten vaskulären Strukturen gearbeitet, um Tissue Engineering Konstrukte in den medizinischen Bereich einzuführen [122].

Neben den genannten Verfahren im Bereich des Leber Tissue Engineerings kommt häufig auch die Methode des Elektrosinnens zum Einsatz um poröse Scaffolds, bestehend aus elektrogewebenen Fasern, herzustellen [123], die das dichte Kollagenetz der natürlichen ECM nachahmen. Durch Elektrosinnen können benutzerdefinierte Gerüste aus unterschiedlichen Materialien mit einer Porengröße entsprechend den Anforderungen der Zellen hergestellt werden. Die Ausrichtung der elektrogewebenen Nanofasern kann die Anheftung von Zellen fördern, indem sie optimale Abstände für die Integrinbindung bietet [124].

Häufig bestehen Scaffolds aus Hybridmaterialien, Biokeramik oder Polymeren [125], welche zusätzlich mit ECM-Proteinen kombiniert werden, um eine bessere Zellanhaftung zu erreichen und die Oberfläche den in vivo-Bedingungen anzunähern. Entweder werden die entsprechenden ECM-Proteine direkt in die Gerüstmatrix integriert oder

Einleitung

das Gerüst wird nachträglich mit ihnen beschichtet. Neben den leberspezifischen ECM-Proteinen werden häufig auch Fibronectin, Kollagen Typ I und Gelatine verwendet, die nachweislich ebenfalls zu einer verbesserten Zelladhäsion führen [126, 127].

Als innovative 3D-Kultursysteme werden vermehrt auch Perfusions-Systeme etabliert, die ein Potenzial zur Nachbildung der Mikroumgebung von Gewebe *in vivo* aufweisen. Im Gegensatz zu konventionellen, zweidimensionalen (2D) Monolayer-Systemen können sich die Zellen in einem perfusionsbasierten Kultursystem übereinander anlagern, was wiederum zu einem verbesserten Materialaustausch und einer besseren Kommunikation zwischen den Zellen führt, insbesondere bei längerer Kulturdauer [128, 129]. Auch verschiedene Nanomaterialien, die die native Extrazellulär Matrix der Leber nachbilden, und biologisch abbaubare Nanopartikel werden im Bereich des Leber Tissue Engineerings eingesetzt. Biologisch abbaubare Nanopartikel [130], werden verwendet, um hepatogene, kleine Moleküle, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteine direkt an die Zellen abzugeben [131].

Ansätze im Bereich des Leber Tissue Engineering entwickeln sich kontinuierlich weiter. Dabei sind die Bereiche Stammzellbiologie, Gen-Editing-Technologie, Synthese von biofunktionalen Gerüsten, Nanotechnologie und intelligenter 3D-Druck die zukunftsreichsten Forschungsfelder. Insbesondere die Kombination aus patientenspezifischen Zellen und definierten Matrizen mit bioaktiven Faktoren zur Generierung von *in vitro*-Modellen oder implantierbaren Konstrukten mit physiologischen Eigenschaften ist ein angestrebtes Ziel der Forschung im Bereich des Leber Tissue Engineering [132].

hiPSCs im Leber Tissue Engineering

Ein breites Spektrum von Zellen, das von primären Hepatozyten, Hepatozyten-Zelllinien bis hin zu patientenspezifischen Hepatozyten, die aus hiPSCs generiert wurden, reicht, kommen im Leber Tissue Engineering zu Einsatz. Humane primäre Hepatozyten, die als eine der ausgereiftesten Leberzellquellen gelten, verlieren bei der Kultivierung *in vitro* aufgrund der großen Unterschiede zwischen der nativen und der Kulturumgebung innerhalb kurzer Zeit viele leberspezifischen Funktionen [133, 134]. Darüber hinaus erfordert deren Gewinnung Leberbiopsieproben von jedem Patienten, was deren Verwendung in personalisierten Lebermodellen zusätzlich erschwert. Transformierte Zelllinien (am häufigsten verwendet werden HepG2-Zellen) weisen nur eine geringe Kapazität zur Verstoffwechslung von Arzneimitteln und eine eingeschränkte allgemeine Funktionalität auf, was sie für die Modellierung von Lebererkrankungen und

Einleitung

die Prüfung der Toxizität von Arzneimitteln suboptimal macht [135]. Infolgedessen wurden Hepatozyten, die aus hiPSCs gewonnen wurden, als eine der vielversprechendsten Zellquellen für die Entwicklung patientenspezifischer humaner Lebermodelle anerkannt, da sie leicht zugänglich sind [136, 137] und zudem in großer Menge generiert werden können sowie eine angemessene Kompatibilität mit dem Wirtsimmunsystem aufweisen. In den letzten Jahren ist es gelungen, eine Differenzierung unter 2D Bedingungen von hiPSCs in HLCs durchzuführen und bei diesen Zellen Hepatozyten-spezifische Funktionen wie beispielsweise die Verstoffwechslung von Medikamenten, nachzuweisen [137-139]. Dennoch gelten hiPSC-abgeleitete Hepatozyten in Bezug auf viele leberspezifische Genexpressionen, Funktionen und CYP-Enzymaktivitäten noch als nicht komplett ausgereift [139] und viele Ansätze zur Verwendung von hiPSC-abgeleiteten Hepatozyten für ein patientenspezifische in vitro-Lebermodell sind daher noch vereinfacht [140-142].

Um die Ausreifung von hiPSC-Hepatozyten stetig zu verbessern und 3D-Zellkulturmodelle zu etablieren werden innovative Strategien angewandt [143] (siehe Kapitel 1.5.4). Dabei werden ein Zelltyp oder mehrere verschiedene Zelltypen eingesetzt, die entweder aus einer oder mehreren Keimschichten stammen. Die Verwendung einer 3D-Struktur in Kombination mit unterschiedlichen Zelltypen der Leber und einer adäquaten Vaskularisierung ermöglicht eine kontinuierliche Verbesserung der Modelle. Vor allem Modelle, die in der Lage sind den leberspezifischen Stoffwechsel sowie die Organisation der Leber und die Zell-Zell-Signalübertragung abzubilden, können für eine patientenspezifische Vorhersage der Toxizität von Arzneimitteln [135], aber auch zur Modellierung von Krankheiten genutzt werden.

1.5.5 Vaskuläres Tissue Engineering

Unter physiologischen Bedingungen ist das Gewebe auf das Kreislaufsystem des Körpers angewiesen, um die einzelnen Zellen bzw. Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, so dass die Vaskularisierung eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche (Wieder-)Herstellung von Gewebe ist.

Vaskularisierung und Perfusion sind daher ein kritischer Schritt während der Regeneration und Neubildung von Gewebe, wobei die Verzögerung dieses Prozesses (z.B. bei Diabetikern) ein Risikofaktor für schwere Infektionen und Geschwüre sein kann [144, 145]. Um in vitro-Modelle entsprechend zu vaskularisieren oder auch um Transplantate zu entwickeln, ist es wichtig, die strukturellen Komponenten der Blutgefäße

Einleitung

zu berücksichtigen, da das Verständnis dieser Parameter für das Biomaterialdesign und die Auswahl einer geeigneten Zellquelle erforderlich ist.

Viele Blutgefäße weisen gemeinsame strukturelle Merkmale auf. Die Wände von Venen und Arterien bestehen aus drei Schichten (**Abbildung 6**). Die innerste Schicht ist die Tunica interna die bei den Venen auch die Venenklappen beinhaltet. Diese Schicht wird von ECs gesäumt, die die Grenzschicht zum Blut darstellen, die Gerinnung regulieren, selektive Permeabilität verleihen und am Transport von Immunzellen beteiligt sind [146]. Arterien und Venen sind außerdem durch eine zweite Schicht, die Tunica media, verbunden. Während Arterien und Venen grundsätzlich aus denselben Bestandteilen aufgebaut sind (glatte Muskelzellen (SMCs), Kollagen, Elastin und Proteoglykanen) unterscheiden sie sich in der Stärke der Tunica media, die aufgrund der Nähe zum Herzen und der damit einhergehenden höheren Pumpkraft bei Arterien dicker ausfällt. Die äußerste Schicht der Blutgefäße ist die Tunica adventitia (Tunica externa). Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und in Arterien noch zusätzlich aus elastischem Bindegewebe. Diese äußere Schicht dient der Befestigung der Gefäße an angrenzende Strukturen. Kapillaren sind der dritte Gefäßtyp im Blutkreislauf und stellen den Übergang zwischen Venen und Arterien dar. Die Wand der Kapillaren besteht nur aus einer Schicht ECs und wird von außen durch die Basalmembran und Perizyten verstärkt [146]. Arteriolen und Venolen, die kleinere Äquivalente von Arterien und Venen, welche mit dem bloßen Auge für den Menschen noch sichtbar sind und im weiteren Verlauf unmittelbar in eine Kapillare übergehen. Sie sind nach den größeren Arterien und Venen geschaltet [147].

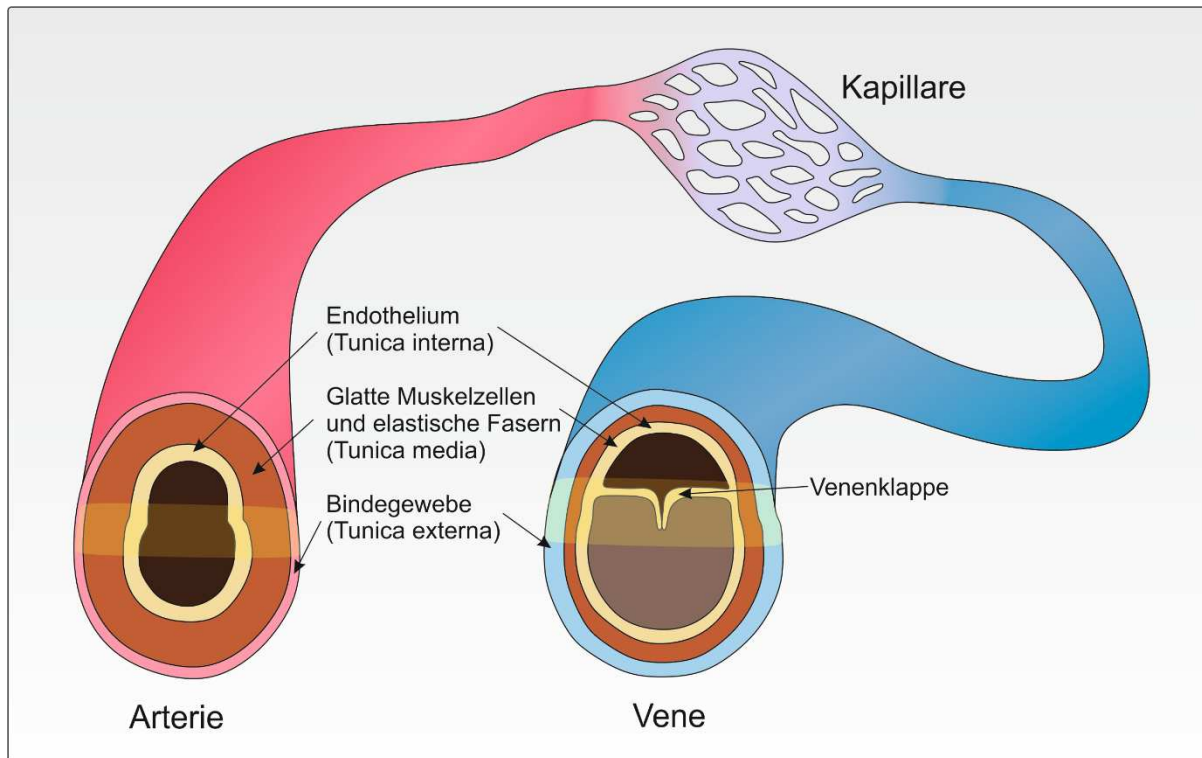


Abbildung 6: Schematische Abbildung unterschiedlicher Blutgefäßarten

Blutgefäße ermöglichen einen Blutfluss durch den Körper. Arterien transportieren das Blut aus dem Herz in die Peripherie und Venen transportieren es zurück. Die Kapillaren dienen als Verbindungen zwischen den Arterien und Venen. Die Wand der meisten Blutgefäße besteht aus drei Schichten: Tunica externa (Adventitia), Tunica media und Tunica interna. Durch diese Schichten ist das Lumen umschlossen.

Die Herstellung von implantierbaren Gefäßen in klinischer Qualität, die im Wirt gesund überleben könnten und langfristig durchgängig sind, ist jedoch nach wie vor eine große Herausforderung und trotz aller Bemühungen haben die künstlichen Gefäßtransplantate noch immer nicht die Leistungsfähigkeit körpereigener Gefäße erreicht, so dass es keine kommerziell erhältlichen Transplantate gibt [148]. Das vaskuläre Tissue Engineering zielt demnach darauf ab, die oben beschriebenen Gefäßstrukturen nachzubilden, um diese entweder in Zukunft zu transplantieren bzw. die Bildung neuer Gefäße an der Transplantationsstelle zu stimulieren [149] oder aber um realitätsnahe in vitro-Modelle zur Erforschung von Krankheiten [150] oder der Austestung von Gefäßimplantaten [151] zu etablieren.

Zu diesem Zweck können unterschiedliche Herstellungsverfahren der Blutgefäße angewandt werden. Rein experimentelle Modelle können beispielsweise durch kleinste mikrofluidischen Chips (auch als "Organ-on-Chip"-Technologie bekannt) nachgebildet werden [152], die die Physiologie auf Gewebe- oder Organebene in vitro nachahmen. Aber auch Scaffold-basierte Strategien sind für das vaskuläre Tissue Engineering sehr

Einleitung

vielversprechend, da die meist porösen 3D-Architekturen eine Vaskularisierung und die damit einhergehende Diffusion von Nährstoffen ermöglichen, was die Neubildung von Gewebe und den biologischen Abbau von Materialien erleichtert [153]. Auch das Abformen (Molding) von Biomaterialien, zur Herstellung tubulärer Gefäßstrukturen ist ein mögliches Vorgehen [154, 155]. Dabei wird eine vormodellierte gefäßähnliche Struktur zur Besiedelung mit Zellen verwendet. Des Weiteren können auch mittels 3D-Druck künstliche Blutgefäße gefertigt werden. Hierbei ist es möglich, die benötigten Zellen direkt im Biomaterial zu drucken. Dadurch können komplexe und funktionelle, heterozelluläre Strukturen mit dem Potenzial einer anatomischen Morphologie und einer präzisen Platzierung von Zellen hergestellt werden [156].

hiPSCs im Vaskulären Tissue Engineering

Sowohl für mögliche in vivo-Anwendungen also auch für in vitro-Modelle ist eine geeignete Zellquelle erfolgsentscheidend. Autologe primäre Patientenzellen sind eine mögliche Zellquelle. Allerdings sind sowohl Isolierung als auch Vermehrung lebensfähiger primärer Zellen in therapeutisch relevantem Ausmaß wie auch im Bereich der Leberregeneration schwierig, da bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung die Wahrscheinlichkeit besteht, dass deren Zellen ein vermindertes Wachstums- oder Regenerationspotenzial aufweisen. Demzufolge sind autologe adulte Stammzellen oder hiPSCs auch im Bereich des vaskulären Tissue Engineerings eine vielversprechende Zellquelle [157, 158].

Heutige Gefäßmodelle sind oft noch auf primäre Zellen gestützt [159-161]. Humane Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (HUVECs) sind der am häufigsten verwendete Zelltyp für die vaskuläre Forschung. Für die Gewinnung dieser Zellen ist eine Gefäßbiopsie erforderlich, ein invasives Verfahren, bei dem nur eine begrenzte Anzahl an Zellen gewonnen werden kann [162]. Trotz ihrer vielfachen Anwendung sind HUVECs nicht patientenspezifisch und auch in ihrer Vermehrung begrenzt. Andere vaskuläre Modelle beinhalten die Verwendung von Kleintieren; diese Experimente können aber nicht alle Aspekte der humanen Biologie genau rekapitulieren [163] und weisen unter anderem Unterschiede auf genetischer Ebene auf.

HiPSCs bieten den Zugang zu funktionellen Zellen in großer Menge und einheitlicher Qualität [164], was die möglichen Qualitätsschwankungen primärer zellbasierter vaskulärer Modelle umgeht und gleichzeitig auch einen klinischen Einsatz möglich macht. Die zunehmende Verfügbarkeit von hiPSCs, hat auch die Entwicklung experimenteller

Einleitung

Modelle des Gefäßsystems beschleunigt: Humane ECs, aber auch Perizyten sowie SMCs können mit hoher Effizienz aus hiPSCs erzeugt und in Modellen verwendet werden [148]. Dadurch ist es möglich Krankheitsmodelle, Gefäßtransplantate, oder auch in vitro-Modelle auf den individuellen Patienten abzustimmen. Aber auch Modelle anderer Organe (z.B. Lebermodelle) können durch eine ergänzende Vaskularisierung mit denselben Ausgangszellen noch realitätsgetreuer und funktionaler abgebildet werden.

2 Zielsetzung

Die Anwendungsmöglichkeiten der Regenerativen Medizin sind vielfältig und tragen zu einer kontinuierlichen Erforschung und Entwicklung neuartiger Therapien für die Behandlung unterschiedlichster Krankheitsbilder bei. So wird unter anderem das Ziel verfolgt, durch Alterung, Erkrankungen oder Traumata nicht mehr voll funktionsfähiges oder fehlendes Gewebe sowohl strukturell als auch funktionell wirksam zu ersetzen oder die körpereigene Regeneration anzuregen. Mit der Kombination aus Biomaterialien und de novo erzeugten, autologen Zellen soll dafür die Grundlage geschaffen werden.

Die Transplantation autologer Zellen kann zur Regeneration von Geweben beitragen. Allerdings sind deren Verfügbarkeit, Anzahl und Integrationsfähigkeit limitierende Faktoren. Die Reprogrammierung von patienteneigenen somatischen Zellen zu hiPSCs ist daher eine vielversprechende Strategie. Vor allem nicht-integrative Reprogrammierungsmethoden (mRNA oder srRNA) bieten die Möglichkeit, sichere und rückstandsfreie hiPSCs herzustellen und dadurch eine nahezu unbegrenzte Quelle autologer Zellen zu schaffen, die nach Bedarf in die benötigten Zelltypen differenziert werden können.

Zu diesem Zweck sollten im Rahmen dieser Arbeit in einem ersten Schritt RECs mittels einer srRNA, die für die Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc kodiert, in hiPSCs reprogrammiert werden. Zur Untersuchung der pluripotenten Eigenschaften der hiPSCs sollte zunächst ein in vivo-Modell etabliert werden, welches als Alternative zum konventionellen Maus-Teratombildungsmodell eingesetzt werden kann, um sowohl Kosten als auch Zeit zu sparen, aber vor allem, um zukünftig eine Tierleidreduzierende Option zur Verfügung zu stellen. Daher sollte der CAM Assay modifiziert und erstmals als Testplattform für die spontane Teratombildung, als Pluripotenzmerkmal, eingesetzt werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte dann die Differenzierung autologer HLCs aus hiPSCs etabliert werden, um diese mit einem biologisch kompatiblen 3D-Scaffold aus PCL zu kombinieren. Dadurch sollte die Basis für ein in vitro-Modell geschaffen werden, das zukünftig unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten (z.B. Untersuchung der Regenerationsfähigkeit von Lebergewebe, Analyse patientenspezifischer genetischer Krankheiten oder Entwicklung personalisierter Medikamente) bieten kann. Dazu

Zielsetzung

wurden die generierten HLCs zunächst auf Hepatozyten-spezifische Marker und verschiedene essenzielle Leberfunktionen untersucht. Anschließend wurden die PCL-Scaffolds mit hiPSC-Hepatoblasten besiedelt, welche innerhalb des Scaffolds ausgereift und dann ebenfalls charakterisiert und funktionell analysiert werden sollten.

Zur optimalen Funktion aller Organe in vivo, aber auch bei in vitro-Modellen ist eine funktionierende Vaskularisierung notwendig. Dazu sind vor allem ECs, welche das Lumen von Blutgefäßen auskleiden, erforderlich. In dieser Arbeit sollte daher weiterführend mit den generierten hiPSCs ein Protokoll zur Herstellung von autologen hiPSC-ECs etabliert werden. Die ECs wurden in einem ersten Schritt auf EC-spezifische Marker und Funktionen (z.B. Reaktion auf proinflammatorische Signale) untersucht und sollten anschließend zur Etablierung eines vereinfachten vaskulären in vitro-Modells eingesetzt werden. Anhand dieses Modells sollten einerseits die Funktionalität der Zellen unter realitätsnahen Bedingungen und andererseits zellspezifische Reaktionen auf vaskuläre Implantate gezeigt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Publikation I

An Alternative In Vivo Model to Evaluate Pluripotency of Patient-Specific hiP-SCs

Josefin Weber*, Marbod Weber*, Heidrun Steinle, Christian Schlensak,
Hans-Peter Wendel, Meltem Avci-Adali

** gleichermaßen beigetragen*

ALTEX - Alternatives to animal experimentation

Akzeptiert am 20. Januar 2021

Zusammenfassung:

Die Generierung autologer hiPSCs aus patienteneigenen Zellen und die drauffolgende Differenzierung dieser Zellen in die gewünschten Zelltypen ist eine vielversprechende Strategie für die Regeneration von erkranktem oder geschädigtem Gewebe. Zur Sicherstellung der pluripotenten Eigenschaften werden die hergestellten hiPSCs in der Regel in immundefiziente Mäuse implantiert und 4 bis 6 Wochen später auf die spontane Entstehung von Teratomen analysiert.

Im Rahmen dieser Studie wurde auf Basis der CAM von Hühnereiern ein alternatives in vivo-Modell entwickelt, um die Pluripotenz neu generierter hiPSC-Linien zu analysieren. Zur Bestimmung der idealen Versuchsparameter wurden verschiedene Zellzahlen von hiPSCs (0,5, 1, 2 und 4×10^6 Zellen) auf die CAM appliziert und anschließend 9 Tage lang unter definierten Bedingungen inkubiert. Die Applikation von 2×10^6 Zellen (70 %) und 4×10^6 Zellen (100 %) führte zur effizientesten Teratombildung. Die explantierten Teratome wurden nach Beendigung der Inkubation auf das Vorhandensein der drei Keimschichten (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) untersucht. Dazu wurden histochemische Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen sowie eine Genexpressionsanalyse von Keimbahn-spezifischen Markern durchgeführt. Alle Teratome wiesen typische Gewebestrukturen der drei Keimbahnen auf und zeigten vaskuläre Strukturen. Somit konnte die Tauglichkeit des CAM Assays als alternatives Modell zu immundefizienten Mäusen bestätigt werden. Durch die Verwendung von zwei weiteren hiPSC-Linien (aus Fibroblasten und Kieferperiostzellen) konnte die uneingeschränkte Eignung des Modells sichergestellt werden.

Ergebnisse

Durch diese innovative Methode konnte eine optimale Testplattform für die Bewertung der Pluripotenz von hiPSC-Linien etabliert werden. Auch das Tierleiden kann eingeschränkt und somit die Prinzipien der 3R (Replacement, Reduction, Refinement) umgesetzt werden.

3.2 Publikation II

Combination of melt-electrospun poly- ϵ -caprolactone scaffolds and hepatocyte-like cells from footprint-free hiPSCs to create 3D biohybrid constructs for liver tissue engineering

Josefin Weber¹, Carsten Linti², Christiane Lörch¹, Marbod Weber¹, Madelene Andt², Christian Schlensak¹, Hans Peter Wendel¹, Michael Doser², Meltem Avci-Adali¹

1 University Hospital Tuebingen, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Calwerstraße 7/1, 72076 Tuebingen, Germany

2 Biomedical Engineering, German Institutes of Textile and Fiber Research Denkendorf DITF, Körschtalstraße 26, 73770 Denkendorf, Germany

Scientific Reports

Akzeptiert am 04. Dezember 2023

Zusammenfassung:

Die Leber ist ein lebenswichtiges Organ mit zahlreichen Funktionen, darunter Stoffwechselfunktionen, Entgiftung und die Synthese von Sekretionsproteinen. Die zunehmende Prävalenz von Lebererkrankungen erfordert die Entwicklung wirksamer Behandlungen, Modelle und regenerativer Ansätze. Durch das hiPSC-basierte Leber Tissue Engineering ist es möglich, neue Plattformen für die patientenspezifische Krankheitsmodellierung und therapeutische Ansätze für Lebererkrankungen zu entwickeln, um geschädigte Organe zu regenerieren, zu reparieren oder zu ersetzen. In dieser Studie wurde zunächst ein Differenzierungsverfahren etabliert, um autologe HCLs aus hiPSCs zu gewinnen, die mit Hilfe selbstreplizierender mRNA aus renalen Epithelzellen reprogrammiert wurden. Die erhaltenen Zellen exprimierten Hepatozyten-spezifische Marker und zeigten wichtige Hepatozytenfunktionen wie die Albumin-synthese, Cytochrom-P450-Aktivität, Glykogenspeicherung und Indocyaningrün-Stoffwechsel.

Anschließend wurden poröse 3D-Biohybridkonstrukte hergestellt. Diese wurden aus biokompatiblen Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) mit Hilfe eines Schmelz-Elektrospinn-Verfahrens hergestellt und mit vordifferenzierten Hepatoblasten besiedelt. Die Hepatoblasten lagerten sich gleichmäßig an die Konstrukte an und konnten erfolgreich zu HLCs ausdifferenziert werden.

Ergebnisse

Die Verwendung von patientenspezifischen hiPSC-HLCs stellt eine vielversprechende Zellquelle für personalisierte Leberregenerationsstrategien dar. In Kombination mit biokompatiblen 3D-Scaffolds bietet dieser innovative Ansatz ein breiteres Anwendungsspektrum, das von der Generierung von Gewebestrukturen über die Arzneimittelpüfung bis hin zur Modellierung von Krankheiten reicht.

3.3 Publikation III

Development of an In Vitro Blood Vessel Model Using Autologous Endothelial Cells Generated from Footprint-Free hiPSCs to Analyze Interactions of the Endothelium with Blood Cell Components and Vascular Implants

Josefin Weber, Marbod Weber, Adrian Feile, Christian Schlensak, Meltem Avci-Adali

MDPI Cells

Akzeptiert am 20. April 2023

Zusammenfassung:

Sowohl in vivo als auch bei in vitro-Modellen ist eine optimale Versorgung der Zellen durch Nährstoffe und Sauerstoff wichtig, dies kann durch eine funktionierende Vaskularisierung sichergestellt werden. Diese wird vor allem durch ECs, welche das Lumen von Blutgefäßen auskleiden, gewährleistet. Daher wurden im Rahmen dieser Studie unter Verwendung von rückstandsfreien hiPSCs und anschließender Differenzierung, funktionelle ECs innerhalb von 6 Tagen generiert. Diese wurden charakterisiert und anschließend verwendet um ein blutgefäßähnliches Polydimethylsiloxan (PDMS)-Modell zu entwickeln, mit dem die Interaktion eines Endothels mit aus dem Blut stammenden Zellen in vitro unter Echtzeit-Bedingungen analysiert werden kann.

Darüber hinaus wurden Stents in das endothelialisierte Lumen des Modells eingesetzt, um die Oberflächenendothelialisierung von vaskulären Implantaten zu untersuchen und deren Bio- und hämokompatibilität zu verbessern.

In Zukunft könnten die generierten hiPSC-ECs in Tissue Engineering Konstrukte integriert werden, um deren Funktionalität zu verbessern und sie somit noch realitätsgetreuer zu gestalten. Außerdem könnte das etablierte blutgefäßähnliche Modell als in vitro-Plattform dienen, um die Interaktion des Endothels mit Blutzellkomponenten zu analysieren oder um den Einfluss von Gefäßimplantaten und -beschichtungen auf die Endothelialisierung zu testen.

4 Diskussion

Ein sehr präsent Thema im Bereich der Regenerativen Medizin, insbesondere des Tissue Engineerings, ist die Generierung von autologen Zellen oder Gewebeersatzstrukturen, die zur Regeneration geschädigter Gewebe eingesetzt werden können. Patientenspezifische Ausgangszellen, vor allem hiPSCs, sind hierfür besonders gut geeignet. Neben einer geeigneten und sicheren Reprogrammierungsmethode zur Generierung rückstandsfreier hiPSCs ist deren Differenzierung und Charakterisierung aber auch die Anwendung mit verschiedenen biokompatiblen Trägermaterialien zu einem entscheidenden Bestandteil des Tissue Engineerings geworden.

4.1 Zellarten und Methoden zur Reprogrammierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pluripotenz von hiPSCs aus RECs analysiert, welche mittels einer srRNA-basierten Reprogrammierung hergestellt wurden [165]. Diese Methode ermöglicht die Herstellung von hiPSCs in einem Zeitraum von 21-30 Tagen mit nur einer Transfektion. Die srRNA kodiert für nsP1-4, die Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc sowie eGFP (Enhanced green fluorescent protein) und einer PAC, die eine Positivselektion der transfizierten Zellen sicherstellt. Um eine Aufrechterhaltung der srRNA über den Reprogrammierungszeitraum zu gewährleisten wird der Typ-I-IFN Inhibitor B18R eingesetzt.

Die erste Reprogrammierung wurde zunächst mit murinen und später mit humanen Fibroblasten durchgeführt [29, 30]. Dabei wurde die Reprogrammierung mit vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc) und retroviraler Transduktion herbeigeführt. Noch immer sind Fibroblasten, welche einfach zu transfizieren sind und sich schnell und effizient reprogrammieren lassen [44] eine häufig verwendete Zellart für die Generierung von hiPSCs. Zusätzlich zu ihrer Verfügbarkeit können diese leicht kultiviert, expandiert und kryokonserviert werden [166]. Allerdings muss zur Gewinnung dieser Zellen ein invasiver Eingriff in Form von Hautbiopsien erfolgen, was ein potentielles Infektionsrisiko darstellt.

Alternativ können PBMCs aus Patientenblut isoliert und zur Reprogrammierung verwendet werden [167, 168]. Es konnte gezeigt werden, dass bereits 10 µl Blut ausreichend sind, um genügend PBMCs zur Reprogrammierung zu isolieren [169]. Allerdings ist die Transfektionseffizienz für Suspensionszellen verglichen mit adhärenen Zellarten geringer [170].

Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten RECs stellen eine nicht-invasive, kostengünstige Methode zur Isolation somatischer Zellen für die Generierung von hiPSCs dar [171]. Jeden Tag werden zwischen 2000 bis 7000 Zellen über den Urin physiologischer Weise ausgeschieden [172]. Dieser Vorgang dient der Selbsterneuerung des Epithelgewebes im Urinaltrakt. Im Urin sind drei Arten von Epithelzellen (Nieren-, Übergangs- und Plattenepithelzellen) vorhanden [173]. Übergangszellen werden physiologisch eher selten ausgeschieden. Sie kommen vorwiegend nach einer Katheterisierung der Harnröhre oder des Harnleiters vor [173]. Plattenepithelzellen, die die Harnröhre und Vagina auskleiden, sind vermehrt in weiblichem Urin nachweisbar, adhären allerdings nach der Inkulturnahme nicht und werden aus dem Überstand entfernt. Folglich sind RECs den Nierenepithelzellen zuzuweisen, die das Nephron auskleiden [173]. Liegt eine erhöhte Anzahl dieser Zellen im Urin vor, kann dies auf Infektionen oder Erkrankungen im Nieren- und Harntrakt hindeuten [173, 174].

Die in dieser Arbeit angewandte bereits etablierte Reprogrammierungsstrategie [65] ermöglichte die Herstellung von spenderspezifischen hiPSCs unter Verwendung von 100-200 ml Urin. Nach einer Kulturdauer von nur 14 Tagen liegen die isolierten RECs gewöhnlich in ausreichender Anzahl für die Reprogrammierung vor. Um die Isolierungseffizienz der RECs zu steigern, können größere Urinmengen oder der erste Morgenurin verwendet werden. Dadurch kann die Expansionszeit verringert und die Reprogrammierung schneller begonnen werden.

Die nicht-invasive Gewinnung somatischer Zellen aus Urin und die einmalige Applikation von srRNA ermöglicht die effiziente Generierung einer nahezu unbegrenzten Anzahl von patientenspezifischen hiPSCs, die ohne genomische Integration in unterschiedliche gewünschte Zelltypen differenziert werden können. Vor allem für einen möglichen klinischen Einsatz sind nicht-integrative Reprogrammierungsstrategien notwendig. DNA- oder Vektor-basierte Methoden bergen unter anderem das Risiko einer genomischen Integration und einer Insertionsmutagenese [48]. Zudem erfordert die Verwendung von (p)DNA- oder viralen Vektoren eine Kernlokalisierung, um in mRNA transkribiert zu werden und ist somit von der Auflösung der Kernhülle während der Mitose abhängig. Die Transfektionseffizienz von Plasmiden und/oder viralen Vektoren in postmitotischen oder wachstumsgestörten Zellen ist folglich gering, wohingegen die in dieser Arbeit verwendete srRNA sowohl für die Transfektion mitotischer Zellen als auch sich langsam oder gar nicht teilender Zellen geeignet ist [175, 176]. Außerdem

Diskussion

wird synthetische mRNA nicht in das Genom der Wirtszellen integriert, was die Gefahr einer Insertionsmutagenese somit verhindert [175, 177]. Synthetische mRNA ist transient und wird auf natürliche Weise durch physiologische Stoffwechselfvorgänge der Zellen abgebaut. Dadurch ist die Expression exogener Proteine in den Zellen zeitlich begrenzt [175, 178] was Komplikationen im Zusammenhang mit einer anhaltenden Proteinexpression verhindern kann. Andere nicht-integrative Reprogrammierungsmethoden, wie die beispielsweise die Verwendung von rekombinanten Proteinen oder Sendai Viren bringen hohe Herstellungskosten und einen großen Aufwand bei der Aufreinigung der Proteine mit sich [179]. Zusätzlich muss nach der Reprogrammierung eine Behandlung der Zellen zur Entfernung der replizierenden Viren erfolgen [180, 181].

Einerseits vorteilhaft, andererseits nachteilig an der Verwendung von mRNA ist deren bereits beschriebene Transienz. Die Dauer der durch mRNA vermittelten Proteinexpression in Zellen ist begrenzt (2-3 Tage) [175, 182]. Aus diesem Grund muss die Transfektion, die zur Reprogrammierung somatischer Zellen notwendig ist, täglich über den gesamten Zeitraum der Reprogrammierung wiederholt werden [48, 51]. Dies ist mit zellulärem Stress, sowie einem hohen Arbeitsaufwand verbunden und kann durch die Verwendung von synthetischer srRNA umgangen werden. Die srRNA enthält dabei alle erforderlichen Reprogrammierungsfaktoren und die Sequenz der nsP1-4, die wie beim VEE-Virus für den Selbstreplikationskomplex der RNA kodieren [54], in einem Molekül [44, 53, 57]. Die Ergänzung der srRNA um die eGFP-Sequenz ermöglicht die mikroskopische Überwachung der Translation. Dadurch können unterschiedliche Parameter (z.B. RNA-Menge, Transfektionsreagenzien, Inkubationszeiten etc.) kontinuierlich analysiert werden. Nach dem Absetzen des IFN-Inhibitors B18R, der eine vorzeitige Degradierung der srRNA unterdrückt, am Ende des Reprogrammierungsprozesses liefert die abnehmende eGFP-Expression Anzeichen auf einen erfolgreichen Abbau der srRNA.

Durch das Einbringen der srRNA wird eine Typ-I-IFN Immunantwort ausgelöst [48], was die Zugabe des IFN-Inhibitor B18R [183] erfordert um eine effiziente Reprogrammierung sicherstellen zu können. B18R ist dafür bekannt, die Lebensfähigkeit von Zellen und die Effizienz der mRNA-Transfektion zu erhöhen [184]. Es ist in der Lage, RNA-Replikone zu erhalten und die Lebensfähigkeit von Zellen nach Transfektion mit synthetischer mRNA zu erhöhen. Dadurch kann einerseits einer Degradierung der

srRNA [48, 53, 57, 185] und andererseits einem vorzeitigen Abbruch des Reprogrammierungsprozesses entgegengewirkt werden. Sobald erste hiPSC-Kolonien sichtbar werden, wird B18R aus dem Reprogrammierungsmedium entfernt, wodurch die Typ-I-IFN Immunantwort aktiviert und die srRNA gezielt eliminiert wird [53, 57]. In verschiedenen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass auch eine Co-Transfektion mit B18R mRNA oder die Anwendung von B18R konditioniertem Medium die Typ-I-IFN vermittelte Immunantwort einschränken kann [44, 53, 57, 186, 187].

4.2 In vitro Charakterisierung der hiPSCs aus RECs

Bevor eine neue hiPSC-Linie für Experimente oder klinische Anwendungen verwendet werden kann, ist eine umfassende Charakterisierung erforderlich. Dazu gehören Tests, um nachzuweisen, dass die hiPSCs pluripotent sind - also in der Lage, Zellen aus allen drei Keimschichten hervorzubringen. Ziel der Charakterisierung ist es, einheitliche und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten und mögliche Sicherheitsprobleme bei stammzellbasierten Therapien bereits in einem frühen Stadium der Entwicklung auszuschließen. Um die Pluripotenz zu bestätigen, gibt es unterschiedliche Methoden. Dazu gehören unter anderem in vitro-Strategien wie der Nachweis einer alkalischen Phosphatase [188], oder eine gezielte Differenzierung in alle drei Keimbahnen (mesoderm, endoderm, ektoderm) mit anschließender spezifischer Antikörperfärbung und/oder Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie [65]. Die Durchführung einer Karyotypisierung ist eine Möglichkeit die hiPSCs weiterführend auf chromosomaler Ebene zu analysieren [65]. Zudem kann die Abwesenheit der srRNA auf Nukleinsäure-Ebene in den generierten hiPSCs untersucht werden.

Besonders wichtig ist hierbei die Abnahme der Expression der beiden Reprogrammierungsfaktoren c-Myc und Klf4 nach Beendigung der Reprogrammierung, da eine dauerhafte Überexpression mit einem erhöhten Tumorrisiko und der Entstehung von Krebs einhergehen kann [189-192].

4.3 Der modifizierte CAM Assay als alternative Methode zu immundefizienten Mäusen

Neben den bereits genannten in vitro-Methoden zum Nachweis der Pluripotenz, gilt die spontane in vivo-Teratombildung in immundefizienten Mäusen noch immer als Goldstandard [193]. Teratome sind benigne d.h. gutartige Tumore mit pluripotenten Eigenschaften. Das bedeutet, sie können Zellen aus allen drei Keimbahnen enthalten.

Diskussion

Standardmäßig werden die zu analysierenden hiPSCs in 15 bis 20 Tiere im Alter von 6 bis 10 Wochen [20, 193] subkutan [194] oder intramuskulär [195] injiziert. Die Mäuse werden dann für einen Zeitraum von etwa 4 bis 6 Wochen gehalten, um das Teratomwachstum zu ermöglichen. Nach diesem Zeitraum haben sich in der Regel deutlich sicht- und tastbare Teratome gebildet [196]. Die Bildung des Teratoms führt häufig durch Größe und Gewicht zu einer eingeschränkten Beweglichkeit oder zu einer eingeschränkten Futter- und Wasseraufnahme der Tiere durch Schmerzen und Ängste [193].

Um ein alternatives in vivo-Modell für die Bewertung der Pluripotenz von hiPSCs zu etablieren, welches das 3R-Prinzip („Reduction, Replacement, Refinement“) berücksichtigt und das Leiden von Versuchstieren verringert, wurde in dieser Arbeit die Anwendbarkeit eines modifizierten CAM Assays getestet. Die CAM wird ungefähr am dritten Tag der Entwicklung des Hühnerembryos gebildet und besteht aus einem Zusammenschluss von Allantois und Chorion [197, 198]. Die stark vaskularisierte Membran stellt optimale Wachstumsbedingungen für die Applikation von hiPSCs dar [199]. In den letzten Jahren wurde der CAM Assay unter anderem zur Untersuchung der Angiogenese, der Tumorgenese, zur Analyse von Knochen- und Knorpelbildung und zum Test des Reizpotenzials von Chemikalien eingesetzt [165].

Im Rahmen dieser Studie wurde die CAM befruchteter Hühnereier an Tag 3 nach Start der Inkubation freipräpariert und das Ei nach Applikation der hiPSCs an Tag 7 wieder verschlossen und weiter bebrütet. Anschließend konnten bereits nach 9 bis 10 Tagen charakteristische Gewebestrukturen aller drei Keimschichten, die sich aus den implantierten hiPSCs entwickelten, nachgewiesen werden. Damit ist das etablierte CAM Modell weit weniger zeitaufwendig als Mausmodelle und damit einhergehend auch kostengünstiger. Zudem ist die CAM nicht innerviert. Dadurch entstehen keine Beeinträchtigungen für den Hühnerembryo [197] und das 3R-Prinzip kann umgesetzt werden [200], was einen ethischen Vorteil im Vergleich zu Mausmodellen darstellt. Außerdem ist die CAM natürlicherweise immundefizient, wodurch die Applikation xenogener Zellen möglich ist, ohne dass eine Abstoßungsreaktion auftritt. Die CAM ermöglicht das Wachstum von Xenotransplantaten und unterstützt das Wachstum des Teratoms effizient.

Entscheidend für die Bildung von Teratomen ist neben der Inkubationszeit auch die applizierte Zellzahl. Es konnte gezeigt werden, dass 1×10^6 PSCs pro Injektion zur

Diskussion

erfolgreichen Teratombildung im Nagermodell führen [193]. Wachstums- und Differenzierungsrate können abhängig von der verwendeten Zelllinie variieren, was eine Anpassung der Zellzahl erfordern kann [193]. Im hier etablierten CAM Modell führte die Erhöhung der hiPSC Anzahl von $0,5 \times 10^6$ auf 2×10^6 hiPSCs zu einer höheren Teratombildungseffizienz (von 30 % auf 70 %). Eine weitere Erhöhung der Zellzahl auf 4×10^6 führte zu 100 % Teratombildungseffizienz. Allerdings konnten bereits bei einer Zellzahl von 2×10^6 applizierten hiPSCs Teratome explantiert werden, die Gewebestrukturen aller drei Keimbahnen aufwiesen, was mittels H&E Färbung, spezifischer Antikörperfärbung (Immunhistochemie und Immunocytochemie) sowie qRT-PCR gezeigt wurde.

Obwohl die etablierte Methode auf Grundlage des CAM Assays einige Vorteile gegenüber dem Mausmodell bietet, weist sie auch einige Einschränkungen auf. Die CAM wird am dritten Tag der Bebrütung gebildet und ist erst ab Tag 7 für Zellapplikationen ausreichend vaskularisiert. Da die Küken 21 Tage nach Beginn der Inkubation schlüpfen muss die Inkubationsdauer auf maximal 12 weitere Tage beschränkt sein. Im Gegensatz dazu beträgt die gängige Inkubationszeit beim Mausmodell 4 bis 6 Wochen [193]. Durch die größere Zeitspanne können Größe und Differenzierungs- bzw. Reifegrad des Teratoms gesteigert werden. Daher kann angenommen werden, dass die Gewebestrukturen, die im Rahmen des CAM Modells entstehen, weniger ausgereift sind als die in Mäusen. Dennoch konnten unter Verwendung des CAM Assays Gewebeararten der drei Keimbahnen nachgewiesen werden, wodurch der CAM Assay zur in vivo-Analyse und Bestätigung der Pluripotenz bedenkenlos anwendbar ist. Durch die erfolgreiche Teratombildung drei verschiedener hiPSC-Linien, die aus RECs, humanen Vorhautfibroblasten von Neugeborenen (Human newborn foreskin fibroblasts, NuFFs) oder Kieferknochenperiostzellen (Jaw Periosteal Cells, JPCs) generiert wurden, konnte die Effizienz der CAM Methode verifiziert werden.

Für den klinischen Einsatz müssen hiPSCs zwingend vollständig in einen ausgereiften Zelltyp differenziert sein, um die Bildung von Teratomen in vivo auszuschließen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits 245 Stammzellen ausreichen, um nach 10 Wochen in vivo Teratome zu bilden [201]. Eine Abwandlung des CAM Assay kann demnach auch zur Prüfung der Sicherheit von bereits aus hiPSCs differenzierten, gewebespezifischen Zellen eingesetzt werden. Die ausdifferenzierten Zellen sollten folglich nach einer Applikation auf die CAM keine spontane Differenzierung aufweisen. Studien

belegten in diesem Zusammenhang, dass vermeintlich ausdifferenzierte Zellpopulationen, die jedoch noch wenige restliche Stammzellen enthielten, zu Teratom-artigen Gewebeelementen in Mäuse führten [202-204]. Für eine klinische Studie der Phase 1 mit hiPSC-abgeleiteten MSCs [205] wurden dazu entsprechende Freigabetests etabliert, um die Qualität und Sicherheit der hergestellten Zellen sicherzustellen. Die Arbeitsgruppe führte zu diesem Zweck zunächst einen PCR-Assay mit Primern, die spezifisch für den Reprogrammierungsvektor für die Erzeugung der hiPSC-Linie durch, um zu überprüfen, dass die Reprogrammierungsplasmide nicht in die reprogrammierten Zellen integriert wurden. Anschließend wurde mit Hilfe eines TaqMan-Genexpressions-Assays (qRT-PCR) nach restlichen undifferenzierten hiPSCs gesucht. Die Analyse zielte dabei vor allem auf Lin28 ab, ein Gen, das mit dem pluripotenten Stammzellstatus assoziiert ist. Des Weiteren wurde ein Tumorigenitätstest mit einer Soft-Agar-Koloniebildung in vitro durchgeführt. Ein in vivo-Modell wie der CAM Assay wird allerdings bisher noch nicht für solche Sicherheitstests durchgeführt.

4.4 Differenzierung und Anwendung von hiPSCs-abgeleiteten Hepatozyten

Nach der erfolgreichen Herstellung von sicheren und rückstandsfreien hiPSCs wurden diese zu HLCs differenziert und in einem PCL-Modell angewendet. Lebererkrankungen sind weltweit für etwa zwei Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich, von denen eine Million auf Komplikationen der Leberzirrhose und eine Millionen auf virale Hepatitis und hepatozelluläres Karzinom zurückzuführen sind [206]. Daher ist die Entwicklung neuer Strategien zur Regeneration der Leber, zur medikamentösen Behandlung und zur Modellierung von Krankheiten von großer Relevanz.

In dieser Arbeit wurden zwei komplementäre Komponenten des Tissue Engineerings kombiniert. In einem ersten Schritt wurde eine Methode zur Differenzierung von patientenspezifischen hiPSCs in HLCs etabliert, die dann weiterführend auf biokompatible, schmelzelektrogesponnene 3D-PCL-Scaffolds übertragen wurden, um die Grundlage für eine stark vereinfachte dreidimensionale Leberstruktur zu schaffen.

Die etablierte Differenzierungsstrategie zur Herstellung autologer HLCs umfasste einen Zeitraum von 20 Tagen. Die so generierten Zellen exprimierten Hepatozyten-spezifische Marker und wiesen funktionelle Merkmale wie Albumin-Synthese, ICG-Stoffwechsel, Glykogenspeicherung und Cytochrom-P450-(CYP)-Aktivität auf. Insbeson-

Diskussion

dere die CYP-Enzymaktivität ist eine wichtige Funktion von Leberzellen, da CYP-Enzyme eine zentrale Rolle beim Metabolismus klinisch relevanter Medikamente spielen [207]. Es konnte gezeigt werden, dass primäre Hepatozyten während der in vitro-Kultivierung schnell ihre leberspezifischen Funktionen, einschließlich der CYP-Induzierbarkeit und der Produktion von Plasmaproteinen wie Albumin, verlieren [208]. Auch weisen die meisten Zelllinien, z.B. HepG2 [209], nur eingeschränkt die natürlichen funktionellen Eigenschaften von Hepatozyten auf [210]. Darüber hinaus sind Krebszelllinien bis zu einem gewissen Grad unreif und zeigen aufgrund ihres tumorigenen Ursprungs ein verändertes apoptotisches Verhalten, was sie potenziell resistent gegenüber toxikologischen Einflüssen und daher für etwaige Wirkstoff-Test-Systeme ungeeignet macht.

Die etablierte Differenzierungsstrategie beinhaltet zusätzlich eine selektive Eliminierung undifferenzierter hiPSCs durch eine einstündige L-Alanin-Behandlung nach Abschluss der ersten Differenzierungsphase (endoderme Differenzierung). Es konnte gezeigt werden, dass undifferenzierte hiPSCs empfindlicher auf die Behandlung mit einem Medium reagieren, das mit einer hohen L-Alanin-Konzentration angereichert ist, als humane Fibroblasten, Skelettmuskelzellen, aus hiPSCs gewonnene Kardiomyozyten oder aus hiPSCs gewonnene Fibroblasten-ähnliche Zellen [211]. Undifferenzierte hiPSCs, die mit differenzierten Zellen co-kultiviert wurden, konnten nach der L-Alanin-Behandlung selektiv eliminiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Übertragung und Modifikation dieser einfachen, kostengünstigen und sicheren Eliminierungsmethode bereits zu Beginn des Differenzierungsprozesses eine reine Endoderm-Population erzielt werden, wodurch die Effizienz der weiteren Differenzierung und Ausreifung gefördert werden konnte. Auch für eine spätere, mögliche klinische Anwendung sind undifferenzierte verbleibende Stammzellen aufgrund des Tumorrisikos in jedem Fall auszuschließen [211].

Studien haben gezeigt, dass in 3D-Modellen kultivierte Zellen die leberspezifischen Funktionen im Vergleich zu 2D-Kulturen verbessern können, da die 3D-Modelle in vivo-ähnliche Bedingungen imitieren [212]. Insbesondere hepatische 3D-Modelle sind ein wertvolles in vitro-Instrument für unterschiedlichste Anwendungen, wie z.B. die Untersuchung der Organogenese, der Lebermorphologie und des Stoffwechsels, aber auch für Arzneimittel- oder zellbasierte Tests. Die Entwicklung von Strukturen, die den

Diskussion

Leberzellen eine 3D-Architektur und vor allem eine Art ECM bieten, ist daher notwendig, um regenerative Strategien im Leber Tissue Engineering zu verbessern. Zur Nachbildung der nativen Mikroumgebung wurden bereits verschiedenste Ansätze verfolgt. Vor allem dezellularisierte Leber-Scaffolds wurden und werden aufgrund ihrer Fähigkeit, die in vivo-Mikroumgebung naturgetreu nachzubilden häufig im Bereich des Leber Tissue Engineerings verwendet [213]. Allerdings beinhaltet die Methode der Dezellularisierung enzymatische, chemische oder physikalische Prozesse, um die ursprünglichen Leberzellen zu entfernen und ein wenig immunogenes Scaffold zu schaffen [213]. Darüber hinaus mangelt es dezellulierten Scaffolds häufig an einem noch intakten vaskulären Netzwerk, und es besteht die Gefahr von Nachblutungen und Thrombosen. Aber auch allgemeine Aspekte wie die Spezies [214] oder die Dauer der Konservierung oder Lagerung [215] erschweren die Anwendung dieser Strukturen. Daher können synthetische Scaffolds dazu beitragen, diesen Herausforderungen entgegen zu wirken. Zu diesem Zweck werden häufig gedruckte 3D-Hydrogele [216] oder poröse, faserbasierte 3D-Scaffolds eingesetzt [106]. Porosität, Material und chemische Eigenschaften sowie die 3D-Architektur der Scaffolds spielen hierbei eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Zellfunktionen und des Zellverhaltens [136]. Ideale Gerüste sollten das Anheften von Zellen erleichtern, die Versorgung mit Nährstoffen zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen ermöglichen und sich im Laufe der Zeit biologisch abbauen [106], ohne dabei die Umgebungsbedingungen negativ zu beeinflussen oder toxische Stoffe freizusetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl ein biokompatibles Material als auch ein dazu passendes Herstellungsverfahren getestet, um in Kombination mit autologen HLCs die Basis für ein vereinfachtes Lebergewebe zu schaffen. Dazu wurden die aus Fasern bestehenden, porösen 3D-PCL-Scaffolds mittels Schmelzelektrospinnen hergestellt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass solche Strukturen vollständig von Zellen durchdrungen werden können, was zur Bildung einer ECM innerhalb des Gerüsts führt [217]. Dies hat sich vor allem für die Kommunikation zwischen den Zellen als vorteilhaft erwiesen [218]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen nach einer potentiellen Transplantation in porösen PCL-Strukturen einwandern können, um eine Vaskularisierung zu gewährleisten [123, 219] und die Lebensfähigkeit der Zellen in den 3D-PCL-Scaffolds verbessern. Mehrere Studien konnten außerdem zeigen, dass die Verwendung poröser, durch Elektrospinnen hergestellter Scaffolds im Bereich des Le-

Diskussion

ber Tissue Engineerings gewinnbringend ist, insbesondere im Hinblick auf die Zellfunktionalität, die durch Albuminsekretion, Harnstoffsynthese und enzymatische Aktivität nachgewiesen wurde [220-222]. Interessanterweise wurde festgestellt, dass elektrogenesponnene PCL-Konstrukte teilweise ähnliche Reaktionen wie das ursprüngliche Lebergewebe zeigen [223]. Insbesondere die Wachstumsrate von Hepatozyten zeigte auf PCL-Scaffolds vergleichbare Werte wie Hepatozyten, die auf natürlichen Gewebe Scaffolds wie z.B. dezellularisierter Schweineleber ECM ausgesät wurden.

Auch die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigten, dass die ausgesäten Zellen (Hepatoblasten) gleichmäßig an die PCL-Fasern anhefteten und zu funktionalen HLCs heranreiften. Eine lebend/tot-Zellanalyse konnte ebenso zeigen, dass die Nährstoffzufuhr der Zellen bis in den Kern der Scaffolds gewährleistet werden konnte. Die erfolgreich ausgereiften HLCs wiesen zudem Hepatozyten-spezifische Marker und Funktionen auf und bildeten somit eine stark vereinfachtes dreidimensionales Leber-ähnliches Gewebe. Diese Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen von Studien, die gezeigt haben, dass bei der Bildung und dem Selbstaufbau künstlicher Gewebestrukturen ähnliche biologische Prozesse wie in vivo ablaufen und dazu beitragen, die morphologische Struktur des nativen Gewebes zu imitieren [224].

Das in dieser Arbeit eingesetzte PCL gilt als biokompatibles Material, das auch als biologisch abbaubares Nahtmaterial verwendet wird [225]. Aufgrund seiner teilkristallinen und hydrophoben Struktur besitzt das hier verwendete PCL eine langsame Abbaurrate (2 - 4 Jahre) [226]. Dadurch ist es für Langzeitimplantate oder für künstliche ex vivo-Lebersysteme geeignet [227]. Es wurde gezeigt, dass die Abbaugeschwindigkeit von PCL je nach Verarbeitungsform variieren kann. Beispielsweise haben elektrogenesponnene Faser-Konstrukte eine kürzere Degradationszeit im Vergleich zu einem PCL-Block, was auf ein höheres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und eine geringere Kristallinität durch den Elektrospinnprozess zurückzuführen ist [226]. Bei der Entwicklung von Strukturen zur Nachempfindung von Lebergewebe kann PCL zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften eingesetzt werden [228]. In dieser Arbeit wurden PCL-Scaffolds für eine in vitro-Kultivierungsdauer von 14 Tagen verwendet. In diesem Zeitraum wurde keine Degradation beobachtet. Allerdings müssen Langzeitexperimente durchgeführt werden, um die Degradationszeit der Scaffolds unter den beschriebenen Bedingungen zu analysieren.

Trotz des außergewöhnlichen Selbstorganisationsverhaltens von Hepatozyten in 3D-Umgebungen bleibt es eine Herausforderung, die Komplexität der Leberarchitektur in vivo zu reproduzieren, z.B. Leberläppchen in Mikrogeweben [229] aber auch die Vaskularisierung. Darüber hinaus können 3D-Lebergewebemodelle, die mehrere Zelltypen enthalten, die Leberfunktionen aufgrund ihrer physiologischen Interaktion weiter verbessern. Allerdings ist es nach wie vor schwierig, das geeignete Medium und Zellverhältnis für die Co-Kultivierung leberspezifischer Zelltypen in einem Modell auszuwählen [230]. Diese Herausforderungen sowie die Stabilität und Lebensfähigkeit der HLCs in den Scaffolds müssen über einen längeren Zeitraum detailliert untersucht und durch eine vereinfachte Vaskularisierung ergänzt werden.

4.5 Differenzierung und Anwendung von hiPSC-abgeleiteten Endothelzellen

Eine unzureichende Vaskularisierung während der Gewebereparatur ist häufig mit schlechten klinischen Ergebnissen verbunden [231]. Dies ist vor allem bei Verletzungen kritisch, bei denen die Größe des Defekts die Vaskularität einschränkt, oder auch bei Defekten, die unter besonderen Bedingungen behandelt werden müssen, wie z. B. mit einer Strahlentherapie, die die Vaskularisierung behindert [232]. Tatsächlich ist eine schlechte Vaskularisierung eines der größten Hindernisse für die klinische Anwendung von Tissue Engineering-Methoden [232]. Vor allem eine mangelnde Integration des Transplantats, durch eine unzureichende Vaskularisierung nach der Implantation kann zu dessen Versagen führen. Darüber hinaus beeinträchtigt eine schlechte Vaskularisierung die Lebensfähigkeit von tiefer im Scaffold/Transplantatmaterial liegenden Zellen, aufgrund von Hypoxie und unzureichender Nährstoffversorgung [233]. Um biomimetische Gewebekonstrukte herzustellen, welche die natürliche Gewebeumgebung annähernd nachbilden und ggf. auch implantiert werden können, müssen Strategien zur Vaskularisierung entwickelt werden. Ins Besondere das Verständnis einer funktionierenden Endothelialisierung ist entscheidend und kann durch realitätsnahe in vitro-Modelle unterstützt werden.

Vor allem ECs sind an der Vaskulogenese beteiligt und tragen somit entscheidend zur Ausbildung eines Gefäßsystems bei [234]. Durch sie wird der Blutfluss ermöglicht und somit die Versorgung aller Körperteile mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf dieser Forschungsarbeit eine Methode zur Generierung autologer ECs aus hiPSCs etabliert, um mit diesen anschließend ein

Diskussion

blutgefäßähnliches Modell herzustellen. Dieses Modell kann für unterschiedliche Anwendungen genutzt werden. Einerseits um die Interaktion des generierten autologen Endothels mit aus dem Blut stammenden Immunzellen zu analysieren und andererseits um vaskuläre Implantate in Kontakt mit ECs zu testen.

Um autologe humane ECs zu gewinnen, ist häufig eine Gefäßbiopsie erforderlich, ein invasives Verfahren, bei dem nur eine begrenzte Anzahl von ECs gewonnen werden kann. HUVECs sind der am häufigsten verwendete Zelltyp für in vitro-Anwendungen [162]. Trotz einiger Vorteile sind HUVECs in der Regel nicht patientenspezifisch und auch in ihrer Proliferation begrenzt [235]. Aus diesem Grund sind ECs, die aus hiPSCs differenziert wurden besonders wertvoll, da sie eine nahezu unbegrenzte Quelle für die Erzeugung spenderspezifischer Zellen darstellen [236]. Auch die in dieser Studie verwendeten hiPSCs wurden aus RECs reprogrammiert. Um die anschließende Differenzierung zu ECs effizienter zu gestalten wurde Forskolin eingesetzt. Durch Verwendung dieses Stimulators kann die Differenzierungseffizienz gesteigert werden, da es die Konzentration des zweiten Botenstoffs cAMP in den Zellen stark erhöhen kann [237], was zu einer verstärkten Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptors (VEGFR)-2 führt [238]. VEGF-A ist ein Protein, das an der Vaskulogenese und der Angiogenese beteiligt ist. Dieses wird während des Differenzierungsprozesses eingesetzt und kann durch die Applikation von Forskolin effizienter an VEGFR-2 binden.

Nach erfolgreicher Etablierung einer Differenzierungsstrategie wurde im Rahmen dieser Studie ein in vitro blutgefäßähnliches PDMS-Kanal-Modell entwickelt. Für die Herstellung solcher in vitro-Gefäßmodellen wurden bis dato verschiedenste Strategien entwickelt, darunter elektrogenesponnene Konstrukte [239], 3D-gedruckte Polymere [240] oder auch dezellularisierte Gerüste [241] und hydrogelbasierte Ansätze [242]. Das in dieser Studie eingesetzte Polymer, auf Siliciumbasis, PDMS hat für biomedizinische Anwendungen einige relevante Eigenschaften, wie z.B. chemische Stabilität, Gasdurchlässigkeit, gute mechanische Eigenschaften, Biokompatibilität, optische Transparenz und einfache Herstellung durch z.B. Abformung [243, 244]. Zur Generierung von blutgefäßähnlichen Strukturen für Endothelialisierungsexperimente ist PDMS daher besonders geeignet. Vor allem die transparenten Eigenschaften ermöglichen das Mikroskopieren ohne Zerstörung des Materials und erlauben die Visualisierung

Diskussion

der Endothelialisierung unter statischen und Fließbedingungen, sowie die Echtzeitdetektion der Adhäsion von Blutzellen. Das etablierte EC-PDMS-Modell stellt somit eine kontrollierte und leicht anpassbare in vitro-Testplattform für Endothelialisierungsexperimente aber auch für die Untersuchung von vaskulären Implantaten dar.

Eine wesentliche Funktion des Gefäßendothels besteht darin, auf Verletzungen und Entzündungen zu reagieren und Immunzellen zu stimulieren. Das etwaige Einsetzen von Implantaten in Blutgefäße führt häufig zu einer Verletzung des Endothels, begleitet von einer Entzündungsreaktion und der Aktivierung von Gerinnung und Blutplättchen sowie einer SMC-Hyperplasie [245, 246], was schließlich zum Versagen des Implantats [247] oder einer erneuten Stenose im Bereich der Stentimplantation führen kann. Obwohl medikamentenfreisetzende Stents (DES) die Proliferation von SMCs hemmen und somit das Risiko einer Restenose reduzieren können, ist dies mit einer verzögerten Heilung verbunden. Eine fehlende Interaktion des Endothels mit dem Implantatmaterial birgt zusätzlich das Risiko einer künstlichen Oberflächenerkennung und einer späten Stentthrombose [248]. Daher werden das Stentdesign und -material sowie die Interaktion mit dem Gefäßendothel ständig weiter erforscht [249, 250]. Neben der Entwicklung neuer Materialien und Beschichtungen spielt auch deren präklinische Prüfung eine wichtige Rolle. Bislang wurden zur Prüfung von Gefäßimplantaten häufig Computersimulationen [251] oder idealisierte Gefäßmodelle ohne Zellen verwendet [252]. Darüber hinaus wurden Stents ausschließlich mit ECs ohne eine umgebende, gefäßähnliche Struktur besiedelt [253], was die in vivo-Bedingungen nicht adäquat nachahmt. Daher werden die Gefäßimplantate in verschiedenen in vivo-Tiermodellen wie beispielsweise Schweinen [254] oder Hunden [255] oder auch in ex vivo-Modellen wie Kaninchen [256] getestet. Diese Modelle sind sehr kostspielig, gehen mit Leiden der Tiere einher und sind meist auf Grund unterschiedlicher Reaktionen der Spezies auf die Prüfkörper nur begrenzt auf den menschlichen Körper übertragbar.

Mit dem etablierten PDMS-Modell könnten Tierversuche reduziert oder vermieden werden. Auch die Verwendung humaner Zellen ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit mit dem menschlichen in vivo-System. Zudem könnten auch die Entstehung von Krankheiten, die die Blutgefäße betreffen, und der Einfluss von Wachstumsfaktoren oder Therapeutika auf die Krankheitsentwicklung zukünftig mit dem beschriebenen Modell analysiert werden [257]. Darüber hinaus bietet das Modell eine gute Grundlage

Diskussion

für das Verständnis eines funktionierenden Endothels und könnte somit nach verschiedenen Anpassungen auch in andere Gewebekonstrukte integriert werden. Insbesondere die Verwendung von patientenspezifischen hiPSCs stellt einen Schritt in Richtung personalisierte Behandlung dar und macht das in vitro-Modell noch realitätsgetreuer.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch eine Modifikation des CAM Assays eine alternative Strategie zur Teratombildung in Nagetieren für die Analyse der Pluripotenz von hiPSCs etabliert werden. Nach erfolgreicher Charakterisierung der hiPSCs mittels CAM Assay wurden diese im weiteren Verlauf zu funktionellen HLCs sowie ECs differenziert. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei patientenspezifische hiPSC-basierte in vitro-Modelle etabliert: ein vereinfachtes 3D Leberkonstrukt sowie ein blutgefäßähnliches Modell.

Beide beschriebenen humanen in vitro-Modelle oder eine Kombination dieser könnten künftig im Bereich präklinischer Analysen Anwendung finden und dadurch zu einer Verbesserung der klinischen Umsetzung neuer Behandlungsstrategien beitragen. Für die Weiterentwicklung der Modelle und einen möglichen klinischen Einsatz der hiPSCs und der aus ihnen generierten Zellen muss die Sicherheit dieser Zellen getestet und sichergestellt werden. Vor allem die Reprogrammierung von somatischen Zellen zu hiPSCs geht mit einer detaillierten in vitro und in vivo-Charakterisierung einher, da eine Restexpression von Reprogrammierungsfaktoren mit einer erhöhten Tumorentwicklung in Zusammenhang stehen kann. Der abgewandelte CAM Assay kann somit zukünftig eine kostengünstige und schnelle in vivo-Methode zum Nachweis der Pluripotenz darstellen. Auch die 3R-Regel (Replacement, Reduction und Refinement) zur Reduktion von Tierversuchen und Tierleid konnte bei diesem Modell umgesetzt werden.

Um die Sicherheit der aus den hiPSCs differenzierten Zellen sicherzustellen, kann zudem eine Separierung anhand spezifischer Oberflächenmoleküle mittels Magnet-(MACS)-gestützten Systeme durchgeführt werden. Aber auch der CAM Assay könnte zur Analyse der Zellreinheit- und Sicherheit wieder Einsatz finden. Die reine Zellpopulation kann anschließend weiter differenziert oder expandiert werden. Zudem kann durch chemische Inhibitoren oder die selektive Abtötung von verbliebenen hiPSCs bereits während des Differenzierungsprozesses die Wahrscheinlichkeit einer ungewollten spontanen Differenzierung und/oder Teratombildung in vivo verringert werden. Auch eine Spezialisierung der generierten Zellen wie beispielsweise durch eine Subdifferenzierung der hiPSC-ECs in arterielle oder venöse ECs kann durchgeführt werden, um die Funktionalität der Zellen optimal auf den jeweiligen Verwendungszweck abzustimmen.

Ausblick

Darüber hinaus stellen hiPSC-basierte realitätsnahe Modelle eine wichtige Komponente im Bereich der Regenerativen Medizin dar. Insbesondere die Leber erfüllt vielfältige Funktionen im Körper, die für Gesundheit und Langlebigkeit unerlässlich sind. Sie sorgt beispielsweise für die Entgiftung von Arzneimitteln, reguliert das Blutvolumen, unterstützt das Immunsystem und steuert über endokrine Signale verschiedene Stoffwechselfvorgänge. Erkrankungen der Leber, die unbehandelt bleiben oder nicht behandelt werden können z.B. auf Grund von Mangel an Spenderorganen, gehen meist mit einer hohen Mortalität einher. Daher sind Modelle erforderlich, um Krankheitsmechanismen besser verstehen zu können, oder um wirksame Behandlungen zu entwickeln. Vor allem biohybride künstliche Lebersysteme als künstliche extrakorporale Hilfsmittel für Patienten mit Leberversagen gilt es zu entwickeln. In Zukunft sollen 3D in vitro-Modelle im Bereich der Krankheitsmodellierung sowie der Arzneimittelprüfung und -entwicklung eingesetzt werden. Allerdings stellt die Nachbildung der Komplexität der Leberarchitektur (z.B. die Mikrogefäße oder Leberläppchen) nach wie vor eine sehr große Herausforderung dar. Die Integration mehrerer leberspezifischer Zelltypen innerhalb eines Systems kann die Funktionalität aufgrund ihrer physiologischen Interaktion weiter verbessern, allerdings ist es schwierig, alle Zellarten ausreichend zu versorgen und somit das Verhältnis der Zellen in der Co-Kultur langfristig aufrecht zu erhalten.

Zur optimalen Funktionalität von Gewebekonstrukten trägt eine Vaskularisierung entscheidend bei, ist aber noch immer eines der größten Hindernisse für die klinische Anwendung von Tissue Engineering-Methoden. Eine unzureichende Vaskularisierung des Konstrukts beeinträchtigt die Lebensfähigkeit von Zellen. Bei einer möglichen klinischen Anwendung kann eine schlechte Vaskularisierung zu einer mangelnden Integration und damit zum Versagen des Transplantats führen. Um biomimetische Gewebekonstrukte herzustellen, welche die natürliche Gewebeumgebung annähernd nachbildet bzw. sich potentiell in die in vivo-Bedingungen integrieren lässt, müssen daher Strategien zur Vaskularisierung entwickelt werden. Vor allem hiPSC-basierte, patientenspezifische Ansätze mit autologen Zellen könnten zukünftig zur Entwicklung personalisierter Therapien beitragen.

Ein funktionierendes Endothel stellt die Grundlage eines intakten vaskulären Systems dar. Erkrankungen dieses Systems können unbehandelt zum Tod führen. Vor allem verschlossene oder verengte Blutgefäße müssen umgehend mit Gefäßimplantaten

Ausblick

(wie z.B. Stents) behandelt werden. Bei dem sogenannten Stenting-Verfahren kommt es jedoch häufig zu einer umfassenden Verletzung des Gefäßendothels, was zu Komplikationen (Thrombogenität, Entzündung und SMC-Hyperplasie etc.) führen kann. Zudem können sich auch bereits behandelte Blutgefäße wieder verschließen. Dabei bildet sich kurze Zeit nach dem Einsetzen des Stents ein Thrombus innerhalb des Stents, da dieser als Fremdmaterial die lokale Blutgerinnung anregt. Daher werden Modelle benötigt, um innovative Stentmaterialien und -beschichtungen zu testen und präklinische Teststrategien zu entwickeln, um die Bio- und Hämokompatibilität der derzeitigen Stents kontinuierlich zu verbessern. Im Rahmen solcher Modelle könnten auch die Entwicklung von Krankheiten, die die Blutgefäße betreffen, und der Einfluss von Wachstumsfaktoren oder Therapeutika auf die Krankheitsentwicklung erforscht werden. Insbesondere patientenspezifische Modelle stellen auch hier einen Schritt in Richtung personalisierter Behandlung dar und machen Modelle noch effizienter.

6 Literaturverzeichnis

1. Orlando, G., et al., *Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges*. *Transpl Int*, 2011. **24**(3): p. 223-32.
2. Jaklenec, A., et al., *Progress in the tissue engineering and stem cell industry "are we there yet?"*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2012. **18**(3): p. 155-66.
3. Bajaj, P., et al., *3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2014. **16**: p. 247-76.
4. Kami, D. and S. Gojo, *Tuning cell fate: from insights to vertebrate regeneration*. *Organogenesis*, 2014. **10**(2): p. 231-40.
5. Iismaa, S.E., et al., *Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues*. *NPJ Regen Med*, 2018. **3**: p. 6.
6. Sanchez, A., T. Schimmang, and J. Garcia-Sancho, *Cell and tissue therapy in regenerative medicine*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **741**: p. 89-102.
7. Bashor, C.J., et al., *Engineering the next generation of cell-based therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2022.
8. El-Kadiry, A.E., M. Rafei, and R. Shammaa, *Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits*. *Front Med (Lausanne)*, 2021. **8**: p. 756029.
9. Atala, A., F.K. Kasper, and A.G. Mikos, *Engineering complex tissues*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(160): p. 160rv12.
10. Scherer, J. and R. Seitz, *[Safety cell therapeutics/cell based medicinal products (CBMP)]*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2015. **58**(11-12): p. 1199-200.
11. Pellegrini, G., et al., *Navigating Market Authorization: The Path Holoclar Took to Become the First Stem Cell Product Approved in the European Union*. *Stem Cells Transl Med*, 2018. **7**(1): p. 146-154.
12. Buscail, E., et al., *Adipose-Derived Stem Cells in the Treatment of Perianal Fistulas in Crohn's Disease: Rationale, Clinical Results and Perspectives*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(18).
13. Collins, J.A., et al., *Articular chondrocytes isolated from the knee and ankle joints of human tissue donors demonstrate similar redox-regulated MAP kinase and Akt signaling*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019. **27**(4): p. 703-711.
14. Amiel, G.E., et al., *Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(8): p. 2355-65.
15. Zakrzewski, W., et al., *Stem cells: past, present, and future*. *Stem Cell Res Ther*, 2019. **10**(1): p. 68.
16. Aly, R.M., *Current state of stem cell-based therapies: an overview*. *Stem Cell Investig*, 2020. **7**: p. 8.
17. Korbling, M., Z. Estrov, and R. Champlin, *Adult stem cells and tissue repair*. *Bone Marrow Transplant*, 2003. **32 Suppl 1**: p. S23-4.
18. Sieburg, H.B., G. Cattarossi, and C.E. Muller-Sieburg, *Lifespan differences in hematopoietic stem cells are due to imperfect repair and unstable mean-reversion*. *PLoS Comput Biol*, 2013. **9**(4): p. e1003006.
19. Prentice, D.A., *Adult Stem Cells*. *Circ Res*, 2019. **124**(6): p. 837-839.
20. Aldahmash, A., et al., *Teratoma formation in immunocompetent mice after syngeneic and allogeneic implantation of germline capable mouse embryonic stem cells*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. **14**(10): p. 5705-11.
21. Perez Lopez, S. and J. Otero Hernandez, *Advances in stem cell therapy*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **741**: p. 290-313.

22. Romito, A. and G. Cobellis, *Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 9451492.
23. Brivanlou, A.H., et al., *Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells*. *Science*, 2003. **300**(5621): p. 913-6.
24. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
25. Kiskinis, E. and K. Eggen, *Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(1): p. 51-9.
26. Stadtfeld, M. and K. Hochedlinger, *Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications*. *Genes Dev*, 2010. **24**(20): p. 2239-63.
27. Yamanaka, S., *[Molecular mechanisms underlying pluripotency of embryonic stem cells]*. *Seikagaku*, 2006. **78**(1): p. 27-33.
28. Gurdon, J.B., T.R. Elsdale, and M. Fischberg, *Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei*. *Nature*, 1958. **182**(4627): p. 64-5.
29. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
30. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
31. Liu, G., et al., *Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications*. *Stem Cell Rev Rep*, 2020. **16**(1): p. 3-32.
32. Singh, V.K., et al., *Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery*. *Front Cell Dev Biol*, 2015. **3**: p. 2.
33. Al Abbar, A., et al., *Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy*. *Biores Open Access*, 2020. **9**(1): p. 121-136.
34. Zhao, T., et al., *Immunogenicity of induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2011. **474**(7350): p. 212-5.
35. Pera, M.F., *Stem cells: The dark side of induced pluripotency*. *Nature*, 2011. **471**(7336): p. 46-7.
36. Sridharan, R., et al., *Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency*. *Cell*, 2009. **136**(2): p. 364-77.
37. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. *Science*, 2008. **322**(5903): p. 949-53.
38. Lee, C.S., et al., *Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine*. *Genes Dis*, 2017. **4**(2): p. 43-63.
39. Soldner, F., et al., *Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors*. *Cell*, 2009. **136**(5): p. 964-77.
40. Gonzalez, F., S. Boue, and J.C. Izpisua Belmonte, *Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte*. *Nat Rev Genet*, 2011. **12**(4): p. 231-42.
41. Ferrari, R., et al., *Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a*. *Science*, 2008. **321**(5892): p. 1086-8.
42. Chen, I.P., et al., *Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia*. *Cell Reprogram*, 2013. **15**(6): p. 503-13.
43. Seo, B.J., Y.J. Hong, and J.T. Do, *Cellular Reprogramming Using Protein and Cell-Penetrating Peptides*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(3).

44. Steinle, H., et al., *Generation of iPSCs by Nonintegrative RNA-Based Reprogramming Techniques: Benefits of Self-Replicating RNA versus Synthetic mRNA*. *Stem Cells Int*, 2019. **2019**: p. 7641767.
45. Takahashi, M., [*Retinal Cell Therapy Using iPS Cells*]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 2016. **120**(3): p. 210-24; discussion 225.
46. Stadtfeld, M., et al., *Induced pluripotent stem cells generated without viral integration*. *Science*, 2008. **322**(5903): p. 945-9.
47. Anokye-Danso, F., et al., *Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency*. *Cell Stem Cell*, 2011. **8**(4): p. 376-88.
48. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(5): p. 618-30.
49. Plews, J.R., et al., *Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e14397.
50. Park, I.H., et al., *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors*. *Nature*, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
51. Yakubov, E., et al., *Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **394**(1): p. 189-93.
52. Angel, M. and M.F. Yanik, *Innate immune suppression enables frequent transfection with RNA encoding reprogramming proteins*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11756.
53. Yoshioka, N., et al., *Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA*. *Cell Stem Cell*, 2013. **13**(2): p. 246-54.
54. Petrakova, O., et al., *Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in Mammalian cells*. *J Virol*, 2005. **79**(12): p. 7597-608.
55. Jose, J., J.E. Snyder, and R.J. Kuhn, *A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly*. *Future Microbiol*, 2009. **4**(7): p. 837-56.
56. Weaver, S.C., et al., *Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence*. *Antiviral Res*, 2012. **94**(3): p. 242-57.
57. Yoshioka, N. and S.F. Dowdy, *Enhanced generation of iPSCs from older adult human cells by a synthetic five-factor self-replicative RNA*. *PLoS One*, 2017. **12**(7): p. e0182018.
58. Kinney, R.M., et al., *The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83*. *Virology*, 1989. **170**(1): p. 19-30.
59. Aviner, R., *The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020. **18**: p. 1074-1083.
60. Yarmolinsky, M.B. and G.L. Haba, *Inhibition by Puromycin of Amino Acid Incorporation into Protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1959. **45**(12): p. 1721-9.
61. Bruns, A.M., et al., *The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly*. *Mol Cell*, 2014. **55**(5): p. 771-81.
62. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. *Annu Rev Immunol*, 2014. **32**: p. 513-45.
63. Quintana-Bustamante, O. and J.C. Segovia, *Generation of Patient-Specific induced Pluripotent Stem Cell from Peripheral Blood Mononuclear Cells by Sendai Reprogramming Vectors*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1353**: p. 1-11.

64. Wustner, L.S., et al., *Generating iPSCs with a High-Efficient, Non-Invasive Method-An Improved Way to Cultivate Keratinocytes from Plucked Hair for Reprogramming*. Cells, 2022. **11**(12).
65. Steinle, H., et al., *Reprogramming of Urine-Derived Renal Epithelial Cells into iPSCs Using srRNA and Consecutive Differentiation into Beating Cardiomyocytes*. Mol Ther Nucleic Acids, 2019. **17**: p. 907-921.
66. Atala, A., *Tissue engineering of reproductive tissues and organs*. Fertil Steril, 2012. **98**(1): p. 21-9.
67. Vats, A., et al., *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications*. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2003. **28**(3): p. 165-72.
68. Murry, C.E. and G. Keller, *Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development*. Cell, 2008. **132**(4): p. 661-80.
69. Khademhosseini, A. and R. Langer, *Microengineered hydrogels for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(34): p. 5087-92.
70. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
71. Lindroos, B., R. Suuronen, and S. Miettinen, *The potential of adipose stem cells in regenerative medicine*. Stem Cell Rev Rep, 2011. **7**(2): p. 269-91.
72. Tsai, R.J., L.M. Li, and J.K. Chen, *Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 86-93.
73. Macchiarini, P., et al., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. Lancet, 2008. **372**(9655): p. 2023-30.
74. Quarto, R., et al., *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med, 2001. **344**(5): p. 385-6.
75. Atala, A., et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. Lancet, 2006. **367**(9518): p. 1241-6.
76. Chamuleau, R.A., *Artificial liver support in the third millennium*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2003. **31**(2): p. 117-26.
77. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1009-14.
78. Insuasti-Cruz, E., et al., *Natural Biomaterials from Biodiversity for Healthcare Applications*. Adv Healthc Mater, 2022. **11**(1): p. e2101389.
79. Grant, R., et al., *Blended electrospinning with human liver extracellular matrix for engineering new hepatic microenvironments*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 6293.
80. Oh, S.H., et al., *In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method*. Biomaterials, 2007. **28**(9): p. 1664-71.
81. BaoLin, G. and P.X. Ma, *Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review*. Sci China Chem, 2014. **57**(4): p. 490-500.
82. Lee, E.J., F.K. Kasper, and A.G. Mikos, *Biomaterials for tissue engineering*. Ann Biomed Eng, 2014. **42**(2): p. 323-37.
83. Dejob, L., et al., *Electrospinning of in situ synthesized silica-based and calcium phosphate bioceramics for applications in bone tissue engineering: A review*. Acta Biomater, 2021. **123**: p. 123-153.
84. Baino, F., G. Novajra, and C. Vitale-Brovarone, *Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering*. Front Bioeng Biotechnol, 2015. **3**: p. 202.

85. Lu, T., Y. Li, and T. Chen, *Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 337-50.
86. Place, E.S., et al., *Strontium- and zinc-alginate hydrogels for bone tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(21-22): p. 2713-22.
87. Huzum, B., et al., *Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review)*. Exp Ther Med, 2021. **22**(5): p. 1315.
88. Bedian, L., et al., *Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications - A review*. Int J Biol Macromol, 2017. **98**: p. 837-846.
89. Ngadiman, N.H.A., et al., *A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions*. Proc Inst Mech Eng H, 2017. **231**(7): p. 597-616.
90. Loskill, P. and N. Huebsch, *Engineering Tissues from Induced Pluripotent Stem Cells*. Tissue Eng Part A, 2019. **25**(9-10): p. 707-710.
91. Yam, G.H., et al., *Nerve regeneration by human corneal stromal keratocytes and stromal fibroblasts*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45396.
92. Zhang, J., et al., *Adipose Tissue-Derived Pericytes for Cartilage Tissue Engineering*. Curr Stem Cell Res Ther, 2017. **12**(6): p. 513-521.
93. Scannell, J.W., et al., *Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(3): p. 191-200.
94. Seok, J., et al., *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. 3507-12.
95. Aboul-Soud, M.A.M., A.J. Alzahrani, and A. Mahmoud, *Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening*. Cells, 2021. **10**(9).
96. Ye, L., et al., *The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiac Disease Modeling and Drug Testing*. J Cardiovasc Transl Res, 2018. **11**(5): p. 366-374.
97. Mandai, M., et al., *Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration*. N Engl J Med, 2017. **376**(11): p. 1038-1046.
98. Sundberg, M., et al., *Improved cell therapy protocols for Parkinson's disease based on differentiation efficiency and safety of hESC-, hiPSC-, and non-human primate iPSC-derived dopaminergic neurons*. Stem Cells, 2013. **31**(8): p. 1548-62.
99. Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSC cells generated from autologous skin*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1920-3.
100. Garcia Delgado, A.B., et al., *Subretinal Transplant of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium on Nanostructured Fibrin-Agarose*. Tissue Eng Part A, 2019. **25**(9-10): p. 799-808.
101. Pferdehirt, L., et al., *A Synthetic Gene Circuit for Self-Regulating Delivery of Biologic Drugs in Engineered Tissues*. Tissue Eng Part A, 2019. **25**(9-10): p. 809-820.
102. Cho, H.J., et al., *Bioengineered Multicellular Liver Microtissues for Modeling Advanced Hepatic Fibrosis Driven Through Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Small, 2021. **17**(14): p. e2007425.
103. Godoy, P., et al., *Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME*. Arch Toxicol, 2013. **87**(8): p. 1315-530.
104. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.

105. Nichols, W.G., et al., *Hepatotoxicity observed in clinical trials of aplaviroc (GW873140)*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(3): p. 858-65.
106. Hosseini, V., et al., *Current progress in hepatic tissue regeneration by tissue engineering*. *J Transl Med*, 2019. **17**(1): p. 383.
107. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(10): p. 836-47.
108. Forbes, S.J. and P.N. Newsome, *Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(8): p. 473-85.
109. Vosough, M., et al., *Cell-based therapeutics for liver disorders*. *Br Med Bull*, 2011. **100**: p. 157-72.
110. Nicolas, C.T., et al., *Concise Review: Liver Regenerative Medicine: From Hepatocyte Transplantation to Bioartificial Livers and Bioengineered Grafts*. *Stem Cells*, 2017. **35**(1): p. 42-50.
111. Fisher, R.A., et al., *Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion*. *Transplantation*, 2000. **69**(2): p. 303-7.
112. Gramignoli, R., et al., *Clinical hepatocyte transplantation: practical limits and possible solutions*. *Eur Surg Res*, 2015. **54**(3-4): p. 162-77.
113. Vosough, M., et al., *Repeated Intraportal Injection of Mesenchymal Stem Cells in Combination with Pioglitazone in Patients with Compensated Cirrhosis: A Clinical Report of Two Cases*. *Arch Iran Med*, 2016. **19**(2): p. 131-6.
114. Mohamadnejad, M., et al., *Intraportal Infusion of Bone Marrow Mononuclear or CD133+ Cells in Patients With Decompensated Cirrhosis: A Double-Blind Randomized Controlled Trial*. *Stem Cells Transl Med*, 2016. **5**(1): p. 87-94.
115. Matsui, A., et al., *Prolonged engraftment of transplanted hepatocytes in the liver by transient pro-survival factor supplementation using ex vivo mRNA transfection*. *J Control Release*, 2018. **285**: p. 1-11.
116. Jaramillo, M., et al., *Decellularized human liver extracellular matrix (hDLM)-mediated hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (hIPSCs)*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. **12**(4): p. e1962-e1973.
117. Radisic, M., et al., *Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(52): p. 18129-34.
118. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*. *Chem Rev*, 2001. **101**(7): p. 1869-79.
119. Elisseeff, J., et al., *Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering*. *J Orthop Res*, 2001. **19**(6): p. 1098-104.
120. Vanderburgh, J., J.A. Sterling, and S.A. Guelcher, *3D Printing of Tissue Engineered Constructs for In Vitro Modeling of Disease Progression and Drug Screening*. *Ann Biomed Eng*, 2017. **45**(1): p. 164-179.
121. Leijten, J., et al., *Spatially and Temporally Controlled Hydrogels for Tissue Engineering*. *Mater Sci Eng R Rep*, 2017. **119**: p. 1-35.
122. Kryou, C., et al., *Bioprinting for Liver Transplantation*. *Bioengineering (Basel)*, 2019. **6**(4).
123. Vasudevan, A., et al., *Evolution of Electrospinning in Liver Tissue Engineering*. *Biomimetics (Basel)*, 2022. **7**(4).
124. Cavalcanti-Adam, E.A., et al., *Cell adhesion and response to synthetic nanopatterned environments by steering receptor clustering and spatial location*. *HFSP J*, 2008. **2**(5): p. 276-85.

125. Yang, Y., A.C. Ritchie, and N.M. Everitt, *Comparison of glutaraldehyde and procyanidin cross-linked scaffolds for soft tissue engineering*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **80**: p. 263-273.
126. Ruoss, M., et al., *A Standardized Collagen-Based Scaffold Improves Human Hepatocyte Shipment and Allows Metabolic Studies over 10 Days*. Bioengineering (Basel), 2018. **5**(4).
127. Rajendran, D., et al., *Long-term liver-specific functions of hepatocytes in electrospun chitosan nanofiber scaffolds coated with fibronectin*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(8): p. 2119-2128.
128. Verstegen, M.M.A., et al., *Decellularization of Whole Human Liver Grafts Using Controlled Perfusion for Transplantable Organ Bioscaffolds*. Stem Cells Dev, 2017. **26**(18): p. 1304-1315.
129. Prodanov, L., et al., *Long-term maintenance of a microfluidic 3D human liver sinusoid*. Biotechnol Bioeng, 2016. **113**(1): p. 241-6.
130. Kucuk, N., et al., *Sustainable Biodegradable Biopolymer-Based Nanoparticles for Healthcare Applications*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(4).
131. Zhao, C., et al., *Enhanced hepatic differentiation of human amniotic epithelial cells on polyethylene glycol-linked multiwalled carbon nanotube-coated hydrogels*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(7): p. 1556-1566.
132. Sears, N.A., et al., *A Review of Three-Dimensional Printing in Tissue Engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2016. **22**(4): p. 298-310.
133. Sivaraman, A., et al., *A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction*. Curr Drug Metab, 2005. **6**(6): p. 569-91.
134. Hewitt, N.J., et al., *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, 2007. **39**(1): p. 159-234.
135. Tricot, T., C.M. Verfaillie, and M. Kumar, *Current Status and Challenges of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Liver Models in Drug Discovery*. Cells, 2022. **11**(3).
136. Bhatia, S.N., et al., *Cell and tissue engineering for liver disease*. Sci Transl Med, 2014. **6**(245): p. 245sr2.
137. Schwartz, R.E., et al., *Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells*. Biotechnol Adv, 2014. **32**(2): p. 504-13.
138. Mallanna, S.K. and S.A. Duncan, *Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2013. **26**: p. 1G 4 1-1G 4 13.
139. Kondo, Y., et al., *An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity*. Drug Metab Pharmacokinet, 2014. **29**(3): p. 237-43.
140. Berger, D.R., et al., *Enhancing the functional maturity of induced pluripotent stem cell-derived human hepatocytes by controlled presentation of cell-cell interactions in vitro*. Hepatology, 2015. **61**(4): p. 1370-81.
141. Takebe, T., et al., *Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant*. Nat Protoc, 2014. **9**(2): p. 396-409.
142. Du, C., et al., *Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes and endothelial cells in multi-component hydrogel fibers for liver tissue engineering*. Biomaterials, 2014. **35**(23): p. 6006-14.
143. Tutty, M.A., D. Movia, and A. Prina-Mello, *Three-dimensional (3D) liver cell models - a tool for bridging the gap between animal studies and clinical trials*

- when screening liver accumulation and toxicity of nanobiomaterials*. Drug Deliv Transl Res, 2022. **12**(9): p. 2048-2074.
144. Randeria, P.S., et al., *siRNA-based spherical nucleic acids reverse impaired wound healing in diabetic mice by ganglioside GM3 synthase knockdown*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. 5573-8.
145. Baltzis, D., I. Eleftheriadou, and A. Veves, *Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights*. Adv Ther, 2014. **31**(8): p. 817-36.
146. Herbert, S.P. and D.Y. Stainier, *Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(9): p. 551-64.
147. Song, H.G., et al., *Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise*. Cell Stem Cell, 2018. **22**(3): p. 340-354.
148. Jouda, H., L. Larrea Murillo, and T. Wang, *Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications*. Cells, 2022. **11**(3).
149. Chang, W.G. and L.E. Niklason, *A short discourse on vascular tissue engineering*. NPJ Regen Med, 2017. **2**.
150. Simon, L.R. and K.S. Masters, *Disease-inspired tissue engineering: Investigation of cardiovascular pathologies*. ACS Biomater Sci Eng, 2020. **6**(5): p. 2518-2532.
151. Weber, J., et al., *Development of an In Vitro Blood Vessel Model Using Autologous Endothelial Cells Generated from Footprint-Free hiPSCs to Analyze Interactions of the Endothelium with Blood Cell Components and Vascular Implants*. Cells, 2023. **12**(9).
152. Cochrane, A., et al., *Advanced in vitro models of vascular biology: Human induced pluripotent stem cells and organ-on-chip technology*. Adv Drug Deliv Rev, 2019. **140**: p. 68-77.
153. Ovsianikov, A., A. Khademhosseini, and V. Mironov, *The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies*. Trends Biotechnol, 2018. **36**(4): p. 348-357.
154. Seifu, D.G., et al., *Viscoelastic properties of multi-layered cellularized vascular tissues fabricated from collagen gel*. J Mech Behav Biomed Mater, 2018. **80**: p. 155-163.
155. Kinoshita, K., et al., *Fabrication of multilayered vascular tissues using microfluidic agarose hydrogel platforms*. Biotechnol J, 2016. **11**(11): p. 1415-1423.
156. Datta, P., B. Ayan, and I.T. Ozbolat, *Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication*. Acta Biomater, 2017. **51**: p. 1-20.
157. Chan, X.Y., et al., *Human Pluripotent Stem Cells to Engineer Blood Vessels*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2018. **163**: p. 147-168.
158. Wang, C.C., et al., *Combination of resveratrol-containing collagen with adipose stem cells for craniofacial tissue-engineering applications*. Int Wound J, 2018. **15**(4): p. 660-672.
159. Augustin-Voss, H.G., A.K. Voss, and B.U. Pauli, *Senescence of aortic endothelial cells in culture: effects of basic fibroblast growth factor expression on cell phenotype, migration, and proliferation*. J Cell Physiol, 1993. **157**(2): p. 279-88.
160. van Beijnum, J.R., et al., *Isolation of endothelial cells from fresh tissues*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1085-91.
161. Gui, L., et al., *Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(9): p. 2665-76.

162. Lau, S., et al., *Venous and Arterial Endothelial Cells from Human Umbilical Cords: Potential Cell Sources for Cardiovascular Research*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
163. Zaragoza, C., et al., *Animal models of cardiovascular diseases*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 497841.
164. Wang, L., et al., *Fabrication of tissue-engineered vascular grafts with stem cells and stem cell-derived vascular cells*. Expert Opin Biol Ther, 2016. **16**(3): p. 317-30.
165. Weber, J., et al., *An alternative in vivo model to evaluate pluripotency of patient-specific iPSCs*. ALTEX, 2021. **38**(3): p. 442-450.
166. Raab, S., et al., *A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation*. Stem Cells Int, 2014. **2014**: p. 768391.
167. Ye, L., et al., *Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors*. Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(8): p. 558-66.
168. Kim, Y., et al., *The Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Blood Cells: An Efficient Protocol Using Serial Plating of Reprogrammed Cells by Centrifugation*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 1329459.
169. Tan, H.K., et al., *Human finger-prick induced pluripotent stem cells facilitate the development of stem cell banking*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3**(5): p. 586-98.
170. Loh, Y.H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from human blood*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5476-9.
171. Zhou, T., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from urine*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(7): p. 1221-8.
172. Ingelfinger, J.R., *Nephrogenic adenomas as renal tubular outposts*. N Engl J Med, 2002. **347**(9): p. 684-6.
173. Ringsrud, K.M., *Cells in the Urine Sediment*. Laboratory Medicine, 2001. **32**(3): p. 153-155.
174. Schumann, G.B., *Urine sediment examination / G. Berry Schumann*. 1980, Baltimore: Williams & Wilkins.
175. Sahin, U., K. Kariko, and O. Tureci, *mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(10): p. 759-80.
176. Kwon, H., et al., *Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine*. Biomaterials, 2018. **156**: p. 172-193.
177. Dean, D.A., D.D. Strong, and W.E. Zimmer, *Nuclear entry of nonviral vectors*. Gene Ther, 2005. **12**(11): p. 881-90.
178. Yang, E., et al., *Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes*. Genome Res, 2003. **13**(8): p. 1863-72.
179. Zhou, H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(5): p. 381-4.
180. Fusaki, N., et al., *Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2009. **85**(8): p. 348-62.
181. Ban, H., et al., *Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14234-9.
182. Golombek, S., et al., *Intradermal Delivery of Synthetic mRNA Using Hollow Microneedles for Efficient and Rapid Production of Exogenous Proteins in Skin*. Mol Ther Nucleic Acids, 2018. **11**: p. 382-392.

183. De Beuckelaer, A., et al., *Type I Interferons Interfere with the Capacity of mRNA Lipoplex Vaccines to Elicit Cytolytic T Cell Responses*. *Mol Ther*, 2016. **24**(11): p. 2012-2020.
184. Patsch, C., et al., *Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(8): p. 994-1003.
185. Kim, Y.G., et al., *Recombinant Vaccinia virus-coded interferon inhibitor B18R: Expression, refolding and a use in a mammalian expression system with a RNA-vector*. *PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0189308.
186. Michel, T., et al., *Efficient reduction of synthetic mRNA induced immune activation by simultaneous delivery of B18R encoding mRNA*. *J Biol Eng*, 2019. **13**: p. 40.
187. Umrath, F., et al., *Generation of iPSCs from Jaw Periosteal Cells Using Self-Replicating RNA*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(7).
188. Stefkova, K., J. Prochazkova, and J. Pachernik, *Alkaline phosphatase in stem cells*. *Stem Cells Int*, 2015. **2015**: p. 628368.
189. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
190. Yu, F., et al., *Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion*. *Oncogene*, 2011. **30**(18): p. 2161-72.
191. Foster, K.W., et al., *Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GKLf*. *Cell Growth Differ*, 1999. **10**(6): p. 423-34.
192. Foster, K.W., et al., *Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6488-95.
193. Nelakanti, R.V., N.G. Kooreman, and J.C. Wu, *Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research*. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2015. **32**: p. 4A 8 1-4A 8 17.
194. Cao, F., et al., *Spatial and temporal kinetics of teratoma formation from murine embryonic stem cell transplantation*. *Stem Cells Dev*, 2007. **16**(6): p. 883-91.
195. Lee, A.S., et al., *Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(16): p. 2608-12.
196. Zhang, W.Y., P.E. de Almeida, and J.C. Wu, *Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research*, in *StemBook*. 2008: Cambridge (MA).
197. Kunz, P., et al., *Optimization of the chicken chorioallantoic membrane assay as reliable in vivo model for the analysis of osteosarcoma*. *PLoS One*, 2019. **14**(4): p. e0215312.
198. Dohle, D.S., et al., *Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works*. *J Vis Exp*, 2009(33).
199. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(6): p. 1119-30.
200. Petrovova, E., et al., *Preclinical alternative model for analysis of porous scaffold biocompatibility in bone tissue engineering*. *ALTEX*, 2019. **36**(1): p. 121-130.
201. Hentze, H., et al., *Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies*. *Stem Cell Res*, 2009. **2**(3): p. 198-210.

202. Kelly, O.G., et al., *Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(8): p. 750-6.
203. Kroon, E., et al., *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 443-52.
204. Rezaia, A., et al., *Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice*. Diabetes, 2012. **61**(8): p. 2016-29.
205. Bloor, A.J.C., et al., *Production, safety and efficacy of iPSC-derived mesenchymal stromal cells in acute steroid-resistant graft versus host disease: a phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study*. Nat Med, 2020. **26**(11): p. 1720-1725.
206. Asrani, S.K., et al., *Burden of liver diseases in the world*. J Hepatol, 2019. **70**(1): p. 151-171.
207. Katsuda, T., et al., *Generation of human hepatic progenitor cells with regenerative and metabolic capacities from primary hepatocytes*. Elife, 2019. **8**.
208. Shulman, M. and Y. Nahmias, *Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes*. Methods Mol Biol, 2013. **945**: p. 287-302.
209. Zeilinger, K., et al., *Cell sources for in vitro human liver cell culture models*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(15): p. 1684-98.
210. Satoh, D., et al., *Establishment of a novel hepatocyte model that expresses four cytochrome P450 genes stably via mammalian-derived artificial chromosome for pharmacokinetics and toxicity studies*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0187072.
211. Nagashima, T., et al., *Selective Elimination of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Medium with High Concentration of L-Alanine*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 12427.
212. Cox, C.R., et al., *Current Perspective: 3D Spheroid Models Utilizing Human-Based Cells for Investigating Metabolism-Dependent Drug-Induced Liver Injury*. Front Med Technol, 2020. **2**: p. 611913.
213. Zhang, X., et al., *Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering*. Bioact Mater, 2022. **10**: p. 15-31.
214. Balestrini, J.L., et al., *Comparative biology of decellularized lung matrix: Implications of species mismatch in regenerative medicine*. Biomaterials, 2016. **102**: p. 220-30.
215. Fakoya, A.O.J., D.A. Otohinoyi, and J. Yusuf, *Current Trends in Biomaterial Utilization for Cardiopulmonary System Regeneration*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 3123961.
216. You, S., et al., *Nanoscale 3D printing of hydrogels for cellular tissue engineering*. J Mater Chem B, 2018. **6**(15): p. 2187-2197.
217. Farrugia, B.L., et al., *Dermal fibroblast infiltration of poly(epsilon-caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning in a direct writing mode*. Biofabrication, 2013. **5**(2): p. 025001.
218. Huang, G., et al., *Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment*. Chem Rev, 2017. **117**(20): p. 12764-12850.
219. Wang, K., et al., *Enhanced vascularization in hybrid PCL/gelatin fibrous scaffolds with sustained release of VEGF*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 865076.

220. Reid, J.A., et al., *Architected fibrous scaffolds for engineering anisotropic tissues*. Biofabrication, 2021. **13**(4).
221. Wang, T., et al., *Nanoporous fibers of type-I collagen coated poly(l-lactic acid) for enhancing primary hepatocyte growth and function*. J Mater Chem B, 2013. **1**(3): p. 339-346.
222. Terrell, J.A., et al., *From cells-on-a-chip to organs-on-a-chip: scaffolding materials for 3D cell culture in microfluidics*. J Mater Chem B, 2020. **8**(31): p. 6667-6685.
223. Slivac, I., et al., *Bioactivity Comparison of Electrospun PCL Mats and Liver Extracellular Matrix as Scaffolds for HepG2 Cells*. Polymers (Basel), 2021. **13**(2).
224. Athanasiou, K.A., et al., *Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering*. Annu Rev Biomed Eng, 2013. **15**: p. 115-36.
225. Ye, S., et al., *Hydrogels for Liver Tissue Engineering*. Bioengineering (Basel), 2019. **6**(3).
226. Dias, J.R., et al., *Electrospun Polycaprolactone (PCL) Degradation: An In Vitro and In Vivo Study*. Polymers (Basel), 2022. **14**(16).
227. Perez, R.A., C.R. Jung, and H.W. Kim, *Biomaterials and Culture Technologies for Regenerative Therapy of Liver Tissue*. Adv Healthc Mater, 2017. **6**(2).
228. Lee, J.W., et al., *Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering*. Biofabrication, 2016. **8**(1): p. 015007.
229. Huang, D., et al., *Engineering liver microtissues for disease modeling and regenerative medicine*. Adv Funct Mater, 2020. **30**(44).
230. Ma, X., et al., *Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(8): p. 2206-11.
231. Gouin, J.P. and J.K. Kiecolt-Glaser, *The impact of psychological stress on wound healing: methods and mechanisms*. Crit Care Nurs Clin North Am, 2012. **24**(2): p. 201-13.
232. Masson-Meyers, D.S. and L. Tayebi, *Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair*. J Tissue Eng Regen Med, 2021. **15**(9): p. 747-762.
233. Liew, A.W.L. and A.Y. Zhang, *In vitro pre-vascularization strategies for tissue engineered constructs-Bioprinting and others*. Int J Bioprint, 2017. **3**(1): p. 008.
234. Serbo, J.V. and S. Gerecht, *Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(1): p. 8.
235. Cerella, C., et al., *Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging*. Curr Drug Targets, 2016. **17**(4): p. 405-15.
236. Williams, I.M. and J.C. Wu, *Generation of Endothelial Cells From Human Pluripotent Stem Cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(7): p. 1317-1329.
237. Seamon, K.B., W. Padgett, and J.W. Daly, *Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3363-7.
238. Yamamizu, K., et al., *Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3707-16.
239. Rickel, A.P., et al., *Electrospun nanofiber scaffold for vascular tissue engineering*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021. **129**: p. 112373.
240. Kyle, S., et al., *'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art*. Adv Healthc Mater, 2017. **6**(16).

Literaturverzeichnis

241. Schaner, P.J., et al., *Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering*. J Vasc Surg, 2004. **40**(1): p. 146-53.
242. Wang, Y., et al., *Advances in hydrogel-based vascularized tissues for tissue repair and drug screening*. Bioact Mater, 2022. **9**: p. 198-220.
243. Miranda, I., et al., *Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review*. J Funct Biomater, 2021. **13**(1).
244. Tanyeri, M. and S. Tay, *Viable cell culture in PDMS-based microfluidic devices*. Methods Cell Biol, 2018. **148**: p. 3-33.
245. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
246. Schwartz, B.G., et al., *The endothelial cell in health and disease: its function, dysfunction, measurement and therapy*. Int J Impot Res, 2010. **22**(2): p. 77-90.
247. Zilla, P., D. Bezuidenhout, and P. Human, *Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing*. Biomaterials, 2007. **28**(34): p. 5009-27.
248. Takayama, T., T. Hiro, and A. Hirayama, *Stent thrombosis and drug-eluting stents*. J Cardiol, 2011. **58**(2): p. 92-8.
249. Antoniadis, A.P., et al., *Biomechanical Modeling to Improve Coronary Artery Bifurcation Stenting: Expert Review Document on Techniques and Clinical Implementation*. JACC Cardiovasc Interv, 2015. **8**(10): p. 1281-1296.
250. Genuardi, L., et al., *Local fluid dynamics in patients with bifurcated coronary lesions undergoing percutaneous coronary interventions*. Cardiol J, 2021. **28**(2): p. 321-329.
251. Samant, S., et al., *Computational and experimental mechanical performance of a new everolimus-eluting stent purpose-built for left main interventions*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 8728.
252. Gijzen, F.J., et al., *Simulation of stent deployment in a realistic human coronary artery*. Biomed Eng Online, 2008. **7**: p. 23.
253. Chang, H.K., et al., *Coronary stents with inducible VEGF/HGF-secreting UCB-MSCs reduced restenosis and increased re-endothelialization in a swine model*. Exp Mol Med, 2018. **50**(9): p. 1-14.
254. Diaz-Rodriguez, S., et al., *Coronary stent CD31-mimetic coating favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo*. Eur Heart J, 2021. **42**(18): p. 1760-1769.
255. Paul, A., et al., *Bioactive baculovirus nanohybrids for stent based rapid vascular re-endothelialization*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2366.
256. Larsen, K., et al., *Capture of circulatory endothelial progenitor cells and accelerated re-endothelialization of a bio-engineered stent in human ex vivo shunt and rabbit denudation model*. Eur Heart J, 2012. **33**(1): p. 120-8.
257. Ortega, M.A., et al., *Increased Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Placental Villi of Women with Chronic Venous Disease during Pregnancy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(7).

7 Anhang

7.1 Eigenanteil der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

7.1.1 Publikation I

An Alternative In Vivo Model to Evaluate Pluripotency of Patient-Specific hiPSCs

Josefin Weber*:	Studien Design und Konzept, Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Schreiben des Manuskripts
Marbod Weber*:	Studien Design und Konzept, Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Schreiben des Manuskripts
Heidrun Steinle:	Methodenetablierung
Christian Schlensak:	Korrekturlesen des Manuskripts
Hans Peter Wendel:	Supervision der Studie, Korrekturlesen des Manuskripts
Meltem Avci-Adali:	Konzeption und Supervision der Studie, Daten Evaluierung, Korrekturlesen des Manuskripts

* gleichermaßen beigetragen

7.1.2 Publikation II

Combination of melt-electrospun poly- ϵ -caprolactone scaffolds and hepatocyte-like cells from footprint-free hiPSCs to create 3D biohybrid constructs for liver tissue engineering

Josefin Weber:	Studien Design und Konzept, Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Schreiben des Manuskripts
Carsten Linti:	Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten
Christiane Lörch:	Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten
Marbod Weber:	Methodenetablierung
Madelene Andt:	Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten
Christian Schlensak:	Korrekturlesen des Manuskripts
Hans Peter Wendel:	Supervision der Studie, Korrekturlesen des Manuskripts
Michael Doser:	Korrekturlesen des Manuskripts
Meltem Avci-Adali:	Konzeption und Supervision der Studie, Daten Evaluierung, Korrekturlesen des Manuskripts

7.1.3 Publikation III

Development of an In Vitro Blood Vessel Model Using Autologous Endothelial Cells Generated from Footprint-Free hiPSCs to Analyze Interactions of the Endothelium with Blood Cell Components and Vascular Implants

Josefin Weber:	Studien Design und Konzept, Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Schreiben des Manuskripts
Marbod Weber:	Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten
Adrian Feile:	Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten
Christian Schlensak:	Korrekturlesen des Manuskripts
Meltem Avci-Adali:	Konzeption und Supervision der Studie, Daten Evaluierung, Korrekturlesen des Manuskripts

7.2 Liste aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen

J. Weber, M. Weber*, H. Steinle, C. Schlensak, H. P. Wendel and M. Avci-Adali (2021). "An alternative in vivo model to evaluate pluripotency of patient-specific iPSCs." ALTEX **38**(3): 442-450.

* gleichermaßen beigetragen

H. Steinle, **J. Weber**, S. Stoppelkamp, K. Grosse-Berkenbusch, S. Golombek, M. Weber, T. Canak-Ipek, S. M. Trenez, C. Schlensak and M. Avci-Adali (2021). "Delivery of synthetic mRNAs for tissue regeneration." Adv Drug Deliv Rev **179**: 114007.

J. Weber, M. Weber, A. Feile, C. Schlensak and M. Avci-Adali (2023). "Development of an In Vitro Blood Vessel Model Using Autologous Endothelial Cells Generated from Footprint-Free hiPSCs to Analyze Interactions of the Endothelium with Blood Cell Components and Vascular Implants." Cells **12**(9)

S. Golombek, T. Hoffmann, L. Hann, M. Mandler, S. Schmidhuber, **J. Weber**, Y. T. Chang, R. Mehling, A. Ladinig, C. Knecht, J. Leyens, C. Schlensak, H. P. Wendel, A. Schneeberger and M. Avci-Adali (2023). "Improved tropoelastin synthesis in the skin by codon optimization and nucleotide modification of tropoelastin-encoding synthetic mRNA." Mol Ther Nucleic Acids **33**: 642-654.

J. Weber, C. Linti, C. Lorch, M. Weber, M. Andt, C. Schlensak, H. P. Wendel, M. Doser and M. Avci-Adali (2023). "Combination of melt-electrospun poly-epsilon-caprolactone scaffolds and hepatocyte-like cells from footprint-free hiPSCs to create 3D biohybrid constructs for liver tissue engineering." Sci Rep **13**(1): 22174

Anhang

7.3 Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Original

7.3.1 Publikation I

An Alternative In Vivo Model to Evaluate Pluripotency of Patient-Specific hiPSCs

Research Article

An Alternative *In Vivo* Model to Evaluate Pluripotency of Patient-Specific hiPSCs

Josefin Weber[#], Marbod Weber[#], Heidrun Steinle, Christian Schlensak, Hans-Peter Wendel and Meltem Avci-Adali

University Hospital Tuebingen, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Tuebingen, Germany

Abstract

The generation of autologous human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from patient's somatic cells and the subsequent differentiation of these cells into desired cell types offer innovative treatment options for tissue regeneration. The hiPSCs obtained are usually implanted in immunodeficient mice and teratoma formation is analyzed after 4 to 6 weeks to assess the pluripotency of these cells. In this study, an alternative *in vivo* model based on chicken egg chorioallantoic membrane (CAM) was established to analyze the pluripotency of newly created hiPSCs. Therefore, 0.5, 1, 2, 4 x 10⁶ hiPSCs generated from urine-derived renal epithelial cells were seeded on CAM and incubated for 9 days. Teratoma formation was detected in 70% of eggs inoculated with 2 x 10⁶ hiPSCs and in 100% of eggs after the application of 4 x 10⁶ hiPSCs. All teratomas exhibited vascular structures. The robustness of the CAM model was further confirmed using two additional hiPSC lines derived from human fibroblasts (NuFFs) or jaw periosteal cells. The presence of all three germ layers within the teratomas was successfully verified by histochemical and immunofluorescence staining and gene expression analysis of germ layer-specific markers. Urine-derived renal epithelial cells were used as negative control and showed no teratoma formation. The CAM-based *in vivo* model provides an optimal *in vivo* test environment for the pluripotency evaluation of newly generated hiPSC lines. Furthermore, this simple, fast, inexpensive, and reproducible method reduces the suffering of animals and thus implements the principles of the 3Rs (replacement, reduction, and refinement).

1 Introduction

The groundbreaking discovery of the reprogrammability of somatic cells into human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) opened up new opportunities in the field of tissue engineering and the development of personalized cell therapies. Since hiPSCs are derived from patient's somatic cells, their generation and use avoid ethical concerns related to embryonic stem cells. Thus, hiPSCs are a promising cell source to generate patient-specific cell types. Yamanaka and colleagues first reprogrammed murine fibroblasts into iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006), and shortly thereafter reprogramming was also demonstrated in human fibroblasts using retroviral vectors encoding four transcription factors, Klf4, c-Myc, Oct4, and Sox2 (Takahashi et al., 2007). However, retroviral vectors are inserted into the host genome and this is associated with a significant risk of insertional mutagenesis, incomplete transgene silencing or reactivation, and residual expression of reprogramming factors, which can lead to tumor development (Cieřlar-Pobuda et al., 2017). Therefore, to prevent genetic alterations in hiPSCs for later clinical applications, several non-genome integrating approaches have been developed (Kaji et al., 2009; Yu et al., 2009; Warren et al., 2010). Especially, synthetic messenger RNA-based reprogramming methods using synthetic messenger RNA (mRNA) or self-replicating RNA (srRNA) are promising (Steinle et al., 2017, 2019a). After the exogenous delivery of reprogramming factor encoding RNAs into somatic cells, desired reprogramming factors are expressed under physiological conditions by cells' translational machinery until the cells are reprogrammed. In comparison to plasmid DNA, synthetic mRNAs or srRNAs do not need to enter the cell nucleus. This allows the expression of desired proteins in dividing and non-dividing cells and results in an immediate translation of delivered mRNA or srRNA in the cytosol. Since these RNAs are not integrated into the genome, the risk of insertional mutagenesis can be eliminated (Rabinovich and Weissman, 2013).

After the successful generation of hiPSC lines, a detailed characterization of the cells is inevitable. In addition to the exclusion of genetic abnormalities and the expression of proteins associated with stem cell properties, the confirmation of pluripotency is required. To confirm the pluripotency of newly generated hiPSC lines, the differentiation into three germ layers is analyzed by subcutaneous or intramuscular injection of hiPSCs in immunodeficient mice (DeBord et al., 2018;

[#] equally contributed

Received May 22, 2020; Accepted January 20, 2021;
Epub January 25, 2021; © The Authors, 2021.

ALTEX 38(##), ###-####. doi:10.14573/altex.2005221

Correspondence: Meltem Avci-Adali, Ph.D.,
Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tuebingen,
Calwerstr. 7/1, 72076 Tuebingen, Germany
(meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is appropriately cited.

Nelakanti et al., 2015). Animals are monitored for 6–8 weeks and sacrificed to explant the teratoma before it is larger than 1 cm³. Because of its tumor-like growth, it can cause pain and suffering of the animals and raises ethical concerns (Buta et al., 2013). In addition, keeping immunodeficient mice is time-consuming and expensive. In recent years, the chorioallantoic membrane (CAM) assay was applied to investigate angiogenesis (Steinle et al., 2018; Naik et al., 2018), tumorigenesis (Li et al., 2015; Dexter et al., 1983; Durupt et al., 2012; Rovithi et al., 2017), bone and cartilage generation (Moreno-Jimenez et al., 2016), and irritant potential of chemicals (Gilleron et al., 1996; Ying et al., 2010). CAM is formed by the fusion of the mesodermal layer of the allantois with the mesodermal layer of the chorion until the third day of development of the chicken embryo (Kunz et al., 2019; Dohle et al., 2009). The highly vascularized CAM mimics a perfect environment for cell transplantation and it can maintain engrafted cells (Deryugina and Quigley, 2008). Furthermore, CAM assay provides a highly reproducible, cost-effective, immunodeficient, and noninnervated extra-embryonic test environment (Kunz et al., 2019; Kunzi-Rapp et al., 2001), and implements the 3R principles (reduction, replacement, and refinement) (Petrovova et al., 2019). An ethical advantage of the CAM assay is that the CAM itself is not innervated, allowing the growth of xenografts without pain or impairment of the embryo (Kunz et al., 2019). Furthermore, the lack of nociception in chicken embryos due to incomplete neuronal differentiation until 14 days of its gestation period makes the model a favorable alternative to rodent models (Buhr et al., 2020). Therefore, in some countries, ethical approval is not required for CAM assays with chicken embryos until 14 days of development. However, there are other countries, where the chicken embryo is not considered as an independent living animal until day 17 or hatching (Winter et al., 2020), so ethical approval for animal experiments is not required. Thus, depending on the country, the legal requirements should be followed and, if necessary, the approval of the ethics committee for animal experiments should be obtained.

In this study, we describe the applicability of a CAM assay-based *in vivo* model as an alternative to conventional rodent models for analyzing the pluripotency of patient-specific hiPSCs by spontaneous teratoma formation.

2 Material and methods

Cultivation of hiPSCs

Footprint-free hiPSCs were generated by reprogramming of human renal epithelial cells (RECs) isolated from 100–200 ml urine of healthy human donors using VEE-OXSIM-GFP srRNA encoding OCT4, KLF4, SOX2, cMYC, and GFP. The transfection and reprogramming were performed according to our recent study (Steinle et al., 2019b). The obtained hiPSCs were cultivated on T25 culture flasks coated with 0.5 mg/cm² vitronectin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in E8 stem cell medium (Essential 8, Thermo Fisher Scientific) at 37 °C and 5 % CO₂. After reaching 70 % confluence, hiPSCs were washed once with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Thermo Fisher Scientific) and incubated for 5 min at 37 °C with DPBS containing 0.5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). After detachment, cells were suspended in E8 medium containing 10 µM ROCK inhibitor Y-27632 (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) and passaged at a 1:10 split ratio into a new vitronectin-coated T25 culture flask. hiPSCs were cultivated at 37 °C and 5 % CO₂ (normoxia). After 24 h, the medium was changed to E8 medium without ROCK inhibitor Y-27632 and daily medium changes were performed.

Cultivation of RECs

RECs were isolated as described in our previously published study (Steinle et al., 2019b) and cultivated at 37 °C with 5 % CO₂ in 0.1 % gelatin-coated 12-well plates with proliferation medium consisting of 50 % renal epithelial (RE) basal medium with REGM Bullet Kit supplements (Lonza, Basel, Switzerland) and 50 % mesenchymal cell proliferation medium (DMEM high glucose supplemented with 10 % FBS, 1x GlutaMax, 1x MEM (minimum essential medium) non-essential amino acids (NEAA), 50 mg/mL gentamicin, and 250 mg/mL amphotericin B, 5 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), 5 ng/mL platelet-derived growth factor (PDGF)-AB, and 5 ng/mL epidermal growth factor (EGF). Cell culture reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific and recombinant human growth factors were acquired from Peprotech (Hamburg, Germany). The medium was changed every three days. When reaching 80 % confluency, RECs were passaged using 0.04 % trypsin/0.03 % EDTA. The reaction was stopped using trypsin-neutralizing solution (TNS; 0.05 % trypsin inhibitor in 0.1 % BSA, PromoCell, Heidelberg, Germany). Afterwards, cells were centrifuged for 5 min at 300 x g and seeded on 0.1 % gelatin (Sigma-Aldrich)-coated T75 cell culture flasks.

Chorioallantoic membrane (CAM) assay

Fertilized chicken eggs of the Lohmann White x White Rock breed chicken were obtained from a breeding facility (Matthias Sittig, Buchholz, Germany). Feathers, dirt, and excrement from the eggshells were removed by wiping with a wet tissue. Then, the eggs were placed in the egg incubator (Heka-Brutgeräte, Rietberg-Varensell, Germany) and incubated at 37 °C and 60 % relative humidity (Day 0). The eggs were completely rotated twice a day. At day 3 after fertilization, an 18G needle was inserted at the tip of the egg without harming the yolk and 2–3 ml albumen was removed to lower the level of the CAM. In the following, a semi-permeable adhesive tape, Suprasorb F (Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Germany) was fixed on the eggshell. Then, under a sterile bench, using sterile surgical scissors a circular opening (Ø 1–1.5 cm) was cut into the eggshell without destroying the CAM. Unfertilized eggs without heart beating or any vasculature were discarded. Afterwards, the window of the eggshell of viable eggs was closed again with the adhesive tape to prevent dehydration and to minimize the risk of contamination. Subsequently, eggs were incubated without rotation at 37 °C and 75 % relative humidity. On day 7, the semi-permeable adhesive tape covering the circular opening was carefully opened with sterile scissors. Then, the development of the eggs was analyzed. Insufficiently developed or contaminated eggs without clearly visible vasculature and movement of the embryo were removed. Sterile silicone sealing rings of cryovials with an inner diameter of 0.85 cm (neoLab, Leonberg, Germany) were carefully placed onto the CAM. To apply the hiPSCs into the silicone ring, 0.5, 1, 2, or 4 x 10⁶ hiPSCs (passage 11) were suspended in 50 µl cell culture medium and mixed with 50 µl Matrigel (hECS qualified,

Corning, NY, USA). As a control, 1×10^6 RECs were also applied onto CAM. After the application, the opening in the eggshell was sealed with the adhesive tape again and further incubated at 38 °C and 80 % relative humidity. On day 16, the CAMs including the generated teratoma were excised around the silicone ring and fixed overnight at 4 °C with 4 % paraformaldehyde (PFA, Merck, Darmstadt, Germany) for further analysis.

To verify the robustness of the CAM model, 2×10^6 hiPSCs, which were generated from newborn human foreskin fibroblasts (NuFFs, Amsbio, Milton Park, UK) or human jaw periosteal cells (JPCs) using srRNA were also applied onto CAM and the teratomas generated were analyzed.

Paraffin embedding and histochemical evaluation of teratomas

The PFA-fixed teratomas and CAMs seeded with RECs as negative controls were washed with DPBS, dehydrated using ascending ethanol series from 50 %, 70 %, 80 %, 90 % to 99 %, and embedded in paraffin for sectioning. Using a microtome (MICROM GmbH, Walldorf, Germany), 5 µm thick sections were obtained from paraffin-embedded tissues. Sections were placed on SuperFrost microscope slides (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen). The sections were then deparaffinized and rehydrated by xylene, a descending ethanol series from 100 %, 80 %, 70 % to 60 %, and deionized water. Afterwards, the sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (Morphisto, Frankfurt, Germany). In the next step, sections were dehydrated using an ascending ethanol series from 60 %, 70 %, 80 % to 100 %, and xylene. Finally, the sections were covered with glass coverslips. The teratoma structures were microscopically analyzed regarding the presence of tissue-specific structures.

To prove the presence of the cells from all three germ layers, immunohistochemical stainings were performed using an automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Inc., Arizona, USA) and specific antibodies against early cell types of three germ layers according to the company's protocols with slight modifications. Monoclonal mouse anti-human CD34 antibody (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used to show the presence of mesoderm tissue. CD34 is a marker for hematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells. Monoclonal mouse anti-human SALL4 antibody (M03), clone 6E3, (Abnova, Taipei, Taiwan) was used to detect endoderm tissue. The presence of ectodermal tissue was validated using the monoclonal mouse anti-human vimentin (V9) (ROCHE, Basel, Switzerland) antibody, which is a neural and pancreatic progenitor cell marker. CAMs with the generated teratomas and RECs as negative controls were stained to confirm specific antibody staining. All antibodies were visualized by the automated immunostainer using DAB (deaminobenzidine). Counterstaining was performed using hematoxylin. Images were taken using Axiovert135 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and EOS Utility software (Canon, Tokyo, Japan).

Cryosectioning and immunofluorescence staining of teratomas

The PFA-fixed teratomas were washed in DPBS and then dehydrated at RT by sucrose (Saccharose, Sigma-Aldrich) solutions of increasing concentrations of 10%, 15%, and 20%. Each incubation was performed for 15 minutes. Teratomas were then transferred into Tissue-Tek Cryomolds (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau, Germany), embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek Germany GmbH), and stored at -80 °C. The frozen block was sectioned at 18 µm using the cryomicrotome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Germany). After overnight drying at RT, the immunostaining of sections was performed.

To perform immunofluorescence staining, the teratoma sections were washed with DPBS and blocked with 4% BSA in DPBS for 1 h at RT. Sections were then incubated for 1 h at RT with fluorescently labeled antibodies in DPBS with 2% BSA or in DPBS with 2% BSA and Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for intracellular staining. After washing, the coverslips were mounted using Fluoroshield mounting medium with DAPI (Abcam, Cambridge, UK). To detect the three different germ layers Alexa Fluor® 488-mouse anti-human β-tubulin (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), PE-mouse anti-human CD31, and PE-mouse anti-human CXCR4 (both from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) antibodies were used. Stainings with the respective isotypes were performed as controls.

qRT-PCR analysis

RNA was isolated from the explanted teratomas generated from 2×10^6 hiPSCs or hiPSCs cultivated in cell culture plates (control) using the Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Munich, Germany). 300 ng RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the iScript kit (Bio-Rad). The primers used for the specific amplification of transcripts ordered from Eurofins (Luxembourg, Luxembourg) or ELLA Biotech (Martinsried, Germany) and listed in Table 1. They were used at a final concentration of 300 nM. Real-time qRT-PCR reactions were performed in a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Expression of constitutively expressed gene GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) was used as an internal control for the amount of RNA input. Primers were designed by using the Primer-Blast tool from NCBI (Ye et al., 2012). Melting temperatures and self-complementarities were checked using the Oligonucleotide Properties Calculator from Northwestern University Medical School (Kibbe, 2007).

The qRT-PCR amplification of cDNA was performed under the following conditions: 3 min at 95 °C for one cycle, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 10 s. After 40 cycles, melt curve analyses were performed to detect the specific amplification of transcripts. The qRT-PCR reactions were run in triplicates with a total volume of 15 µL per well. Levels of mRNA for each gene were normalized to GAPDH. The results are shown relative to control mRNA levels.

Table 1: List of primer sequences used for qRT-PCR analysis

Gene	Germ layer	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'
GAPDH	-	TCAACAGCGACACCCACTCC	TGAGGTCCACCACCCTGTTG
CD31	Mesoderm	GAACGGAAGGCTCCCTTGA	AGGGCAGGTTTCATAAATAAGTGC
CD34		GATTGCACTGGTCACCTCGG	TCCGTGTAATAAGGGTCTTCGC
α SMA		GAGGGAAGGTCCTAACAGCC	TAGTCCCAGGGATAGGCAAA
FOXA2	Endoderm	TGCACTCGGCTTCCAGTATG	CGTGTTTCATGCCGTTTCATCC
AFP		AAATGCGTTTCTCGTTGCTT	GAGTTGGCAACAAGTGGCTG
Pax6	Ectoderm	CTGAGGAATCAGAGAAGACAGGC	ATGGAGCCAGATGTGAAGGAGG
Sox1		AATACTGGAGACGAACGCCG	AACCAAGTCTGGTGTCTCAGC

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; α SMA: alpha-smooth muscle actin; FOXA2: Forkhead box protein A2; AFP: Alpha-fetoprotein; Pax6: Paired box gene 6; Sox1: Sex determining region Y-box 1.

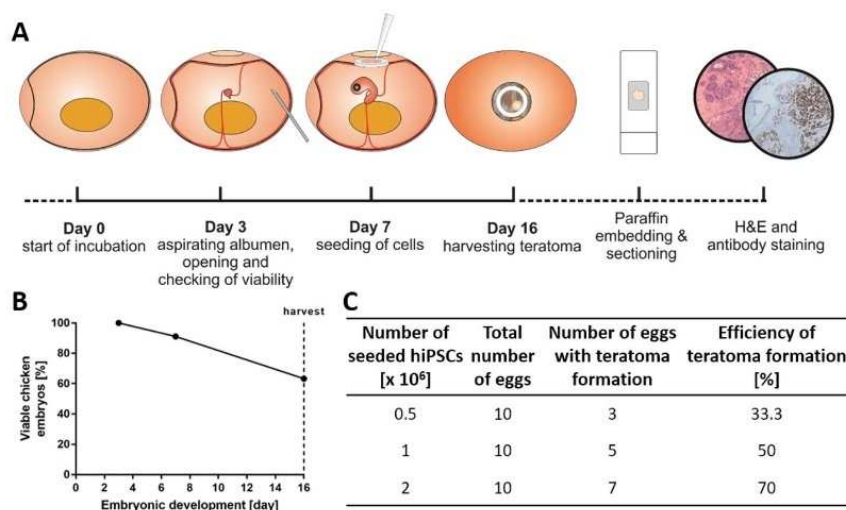
3 Results

3.1 Analysis of teratoma formation by application of hiPSCs onto CAM

To analyze the teratoma formation of newly generated hiPSCs, a CAM-based assay was established (Fig. 1A). The viability of embryos was evaluated with 176 viable eggs. After the opening of eggs on day 3 and incubating the eggs until day 7, only 15 embryos died, which corresponds to a survival rate of 91.14%. After 16 days, 63.31 % of the initial embryos were still viable (Fig. 1B). Using a total of 33 eggs, the formation of teratomas was analyzed by seeding different numbers of hiPSCs on CAM. Teratoma formation was analyzed 9 days after the inoculation of CAM with 0.5, 1, 2, or 4×10^6 hiPSCs (Fig. 1C). Teratomas were formed in 30.33 % (3/10) of the eggs after the application of 0.5×10^6 hiPSCs and the efficiency increased to 50 % (5/10) after the application of 1×10^6 hiPSCs. Above all, the inoculation of CAM with 2×10^6 hiPSCs increased the generation of teratoma formation to 70 % (7/10). The application of 4×10^6 hiPSCs resulted in the formation of teratomas in 100 % of the eggs (Fig. S1¹).

3.2 Analysis of the teratoma size, tissue structures, and vascularization

To analyze the effect of the initial cell number on the resulting size of the teratoma, 0.5 , 1 , or 2×10^6 hiPSCs were seeded on the CAM (Fig. 2A). Additionally, teratoma formation was analyzed after the application of 4×10^6 hiPSCs in three eggs (Fig. S1¹). On the 16th day of incubation, the hiPSC-derived teratomas were explanted. The H&E staining of CAMs seeded with 0.5 , 1 , 2×10^6 hiPSCs (Fig. 2B), or 4×10^6 hiPSCs (Fig. 1D) showed that the teratomas formed contain different types of tissues. The seeding of 1×10^6 RECs onto the CAM showed no teratoma formation (Fig. 2B, control). Furthermore, the size of the teratomas was measured (Fig. 2A, 2C). Especially, the seeding of 2×10^6 hiPSCs on CAM led to an increased teratoma size ($24.47 \pm 11.71 \text{ mm}^2$) compared to the seeding of 1×10^6 ($12.79 \pm 1.91 \text{ mm}^2$) or 0.5×10^6 hiPSCs ($12.5 \pm 0.69 \text{ mm}^2$) (Fig. 2C). Furthermore, the histological examinations showed the formation of vascular structures within the teratomas, which enable the blood supply to the cells within the teratoma (Fig. 2D).

**Fig. 1: Evaluation of teratoma formation after the seeding of hiPSCs on CAM**

A) Schematic representation of the CAM-based assay to evaluate teratoma formation. The teratoma formation assay was completed within 16 days after the start of the incubation of the eggs. Subsequently, teratomas were embedded, sectioned, and histologically analyzed. **B)** The survival rate of chicken embryos in CAM assay ($n = 176$). **C)** Efficiency of teratoma formation depending on the inoculated hiPSC numbers on CAM.

¹ doi:10.14573/altex.2005221s

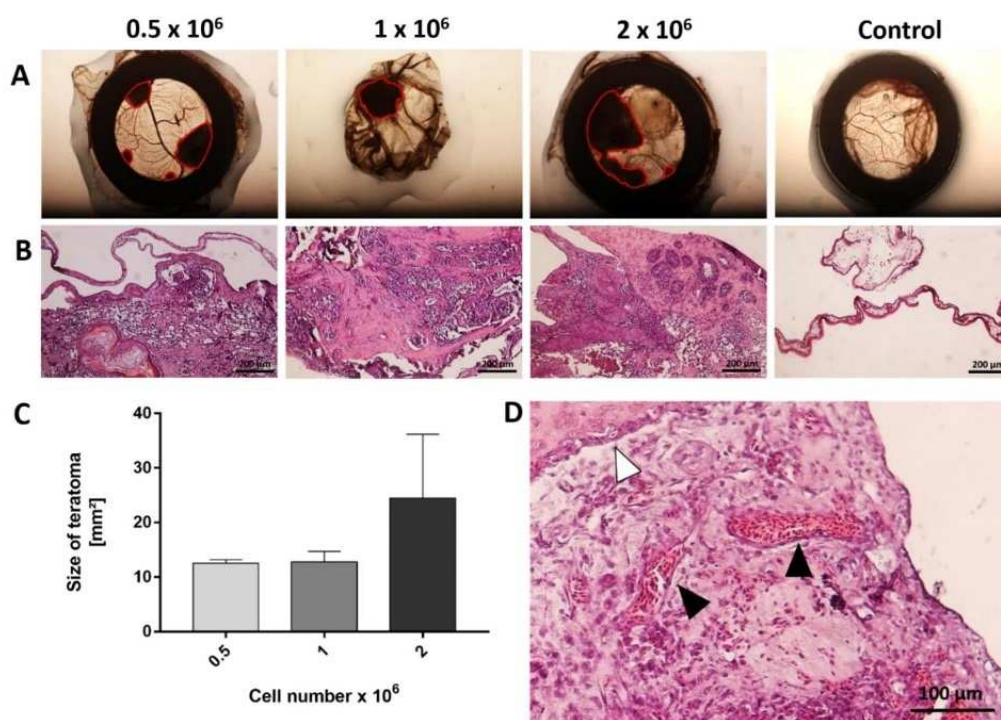


Fig. 2: Analysis of teratoma size, tissue structures, and vascularization

A) Pictures of excised CAM with formed teratomas after the seeding of 0.5 , 1 , or 2×10^6 hiPSCs on CAM. As a control, 1×10^6 RECs were seeded. Teratomas are encircled in red. **B)** H&E-stained sections of the teratomas or CAM. **C)** The size of the generated teratomas was determined by area calculation (red encircled area in **A**). **D)** H&E staining of a teratoma section showing vascular structures (black arrows) inside a teratoma generated from 2×10^6 hiPSCs. The white arrow shows the CAM.

3.3 Analysis of the tri-lineage differentiation of the hiPSCs

The H&E staining of the explanted teratomas, which were generated from 2×10^6 hiPSCs, revealed the tri-lineage differentiation of hiPSCs seeded on CAM (Fig. 3). The differentiation into mesodermal tissue was demonstrated by the presence of bone-like (Fig. 3A I) and into endodermal tissue was shown by the detection of the primitive gut-like epithelium (Fig. 3A II). Furthermore, the presence of squamous epithelial tissue (Fig. 3A III) showed the differentiation of hiPSCs into ectoderm tissue. In addition, the immunohistochemical analyses demonstrated the expression of the mesoderm marker CD34 (Fig. 3B I), endoderm marker SALL4 (Fig. 3B II), and the ectoderm marker vimentin (Fig. 3B III) associated with the respective morphological structures. The antibodies showed no binding to tissue sections of CAMs that were seeded with RECs (Fig. S2A¹).

The immunofluorescence analyses of cryosections with specific antibodies revealed a strong expression of CD31 within the mesodermal tissue structures (Fig. 3C I), CXCR4 within endodermal tissue (Fig. 3C II), and β -tubulin within ectodermal structures (Fig. 3C III). As a control, teratoma tissue sections were also stained with isotype controls, which showed no binding (Fig. S2B¹). Furthermore, the immunofluorescence analyses of CAMs seeded with RECs showed no binding to CAM (Fig. S2C¹).

Moreover, using qRT-PCR, increased expression of mesoderm (CD31, CD34, and SMA), endoderm (FOXA2 and AFP), and ectoderm (SOX1 and PAX6) markers was detected on CAMs seeded with 2×10^6 hiPSCs and incubated for 16 days compared to hiPSCs cultivated in cell culture flasks with E8 medium (Fig. 3D).

To further prove the functionality of the CAM model, the teratoma formation potential of two other hiPSC lines, which were generated in our laboratory by reprogramming of human fibroblasts (NuFFs) or JPCs, was assessed by seeding of 2×10^6 cells on CAM. The H&E staining of the explanted teratomas, which were generated from NuFFs-derived (Fig. 4A) or JPCs-derived (Fig. 4B) hiPSCs, demonstrated the tri-lineage differentiation potential as the RECs-derived hiPSCs (Fig. 3). The differentiation into mesodermal tissue was demonstrated by the presence of bone-like structures (Fig. 4A I) and adipose tissue (Fig. 4B I). Furthermore, gut-like epithelium showing endodermal differentiation (Fig. 4A II and Fig. 4B II) and squamous epithelium showing ectodermal differentiation (Fig. 4A III and Fig. 4B III) were detected.

4 Discussion

Patient-specific hiPSCs offer the possibility to regenerate destroyed cell types and tissues for personalized treatment. After the generation of hiPSCs and the differentiation, an extensive characterization of the cells including the pluripotency is required. Typically, cells are implanted in immunodeficient mice to demonstrate the ability of newly created hiPSCs to

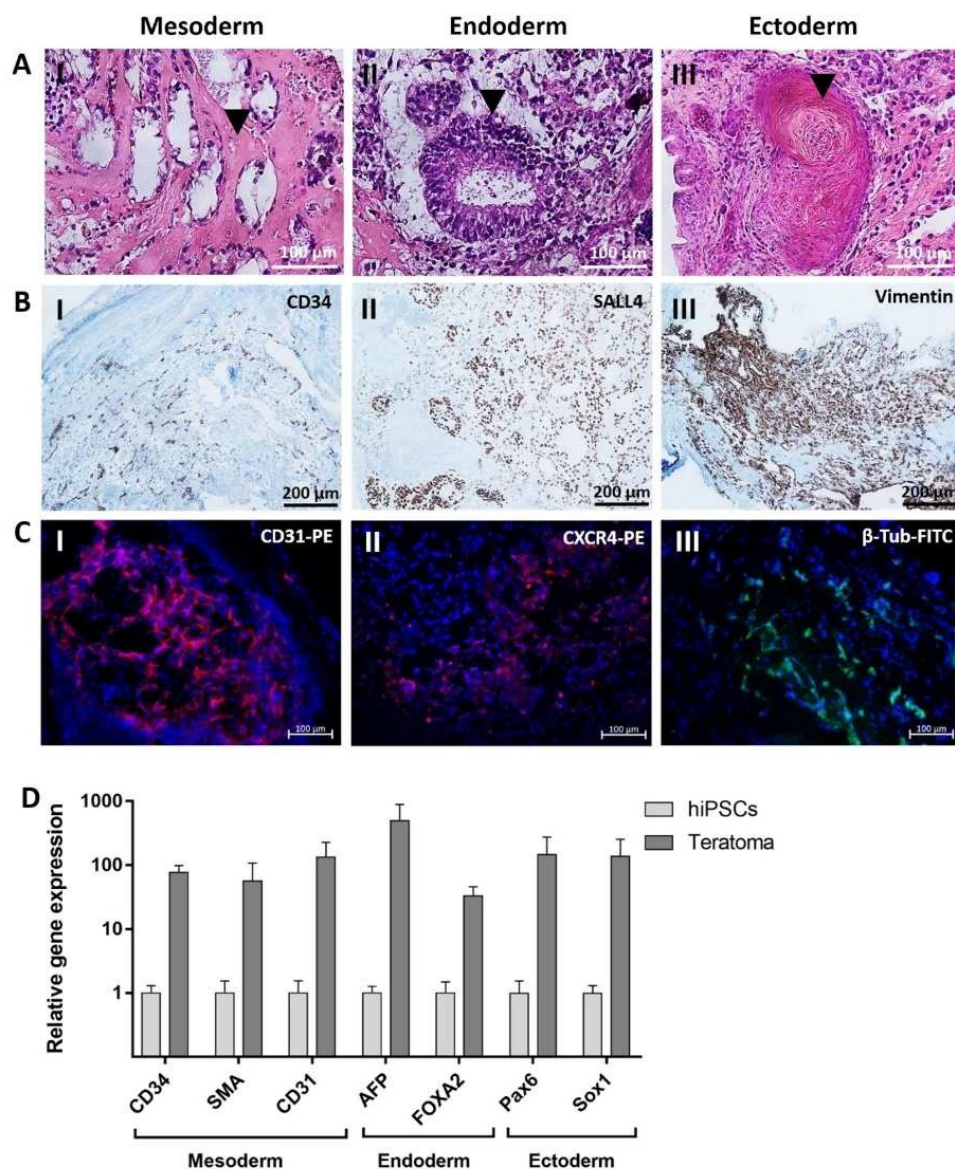


Fig. 3: Detection of three germ layer-specific tissue types in teratoma sections

Teratomas were generated by seeding of 2×10^6 hiPSCs on CAMs. **A)** Representative microscopic images of teratoma sections stained with H&E showing hiPSC-derived tissues of all three germ layers. Mesoderm: **(I)** bone-like tissue, Endoderm: **(II)** primitive gut-like epithelium, Ectoderm: **(III)** squamous epithelium. The arrows indicate the described germ layer-specific structures. **B)** Representative microscopic images of immunohistochemical stainings using antibodies against **(I)** CD34, **(II)** SALL4, and **(III)** vimentin. Antibody-stained tissue structures are brown and the sections were counterstained with hematoxylin. **C)** Representative immunofluorescence images of teratoma sections stained with **(I)** PE-mouse anti-human-CD31, **(II)** PE-mouse anti-human CXCR4, or **(III)** Alexa Fluor® 488-mouse anti-human β -tubulin antibodies. **D)** qRT-PCR expression analysis of CD34, SMA, CD31, AFP, FOXA2, Pax6, and Sox1 transcripts in teratomas generated from 2×10^6 hiPSCs. mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels. Results are shown relative to hiPSCs cultivated in cell culture flask as mean + SEM (n=3)

differentiate into all cell types of three germ layers, mesoderm, endoderm, and ectoderm (Nelakanti et al., 2015). In this study, we tested the applicability of the CAM assay as a new *in vivo* model for the evaluation of the pluripotency of hiPSCs to reduce animal suffering.

Commonly, subcutaneous (Cao et al., 2007), intramuscular (Lee et al., 2009), intramyocardial (Cao et al., 2006), or sub-renal capsule implantation of hiPSCs is performed into 15 to 20 immunodeficient mice aged 6 to 10 weeks. The animals are maintained for a period of approximately 4 to 6 weeks to allow the growth of the implanted cells and teratoma formation (Nelakanti et al., 2015; Aldahmash et al., 2013). If the cells are transplanted subcutaneously or intraperitoneally, very palpable teratomas are often formed 4 to 6 weeks post-injection (Zhang et al., 2008). The teratomas can be measured using the traditional caliper method and visually (Hentze et al., 2009). Mice should be sacrificed before the teratoma is larger than 1

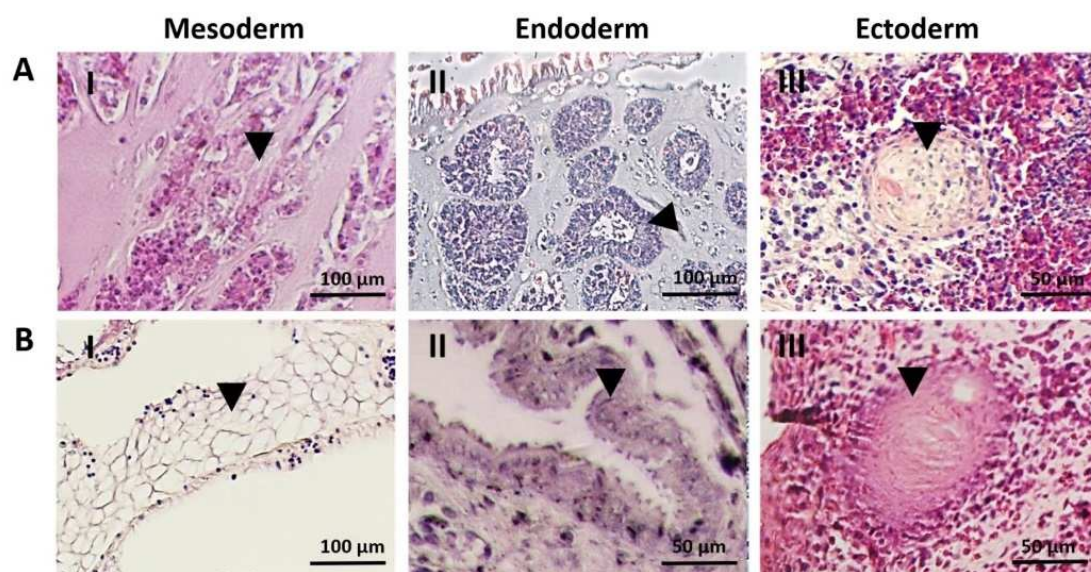


Fig. 4: Detection of the three germ layer-specific tissue types in teratoma sections generated from NuFFs- or JPCs-derived hiPSCs

Representative microscopic images of H&E stained teratoma sections of **A**) NuFFs-derived hiPSCs: Mesoderm: **(I)** bone-like tissue, Endoderm: **(II)** primitive gut-like epithelium, and Ectoderm: **(III)** squamous epithelium, and **B**) JPCs-derived hiPSCs: Mesoderm: **(I)** adipose tissue, Endoderm: **(II)** primitive gut-like epithelium, and Ectoderm: **(III)** squamous epithelium. The arrows indicate the described germ layer-specific structures.

cm³ or earlier if the dimension reached impairs animals' behavior, motility, food and water intake due to pain or distress (Nelakanti et al., 2015). The composition of the explanted teratomas is then analyzed using histological and immunohistochemical stainings. Using the established CAM assay, the incubation of implanted hiPSCs for 9 days was sufficient to form characteristic tissue structures of all three germ layers. Thus, the established CAM model is cost-effective and less time-consuming. Moreover, since the CAM is not innervated, it allows the growth of xenografts without pain or impairment of the embryo (Kunz et al., 2019). The highly vascularized CAM efficiently supports the growth of the teratoma. Furthermore, the immaturity of the chicken embryo's immune system enables the applicability of cells from different species (Deryugina and Quigley, 2008) without rejecting the seeded cells.

Although the established CAM assay-based method has several advantages over the *in vivo* mouse teratoma assay, it also has some limitations. Teratoma formation on CAM can only be performed for 9-10 days after the application of hiPSCs, as the chick hatches 21 days after incubation. In contrast, teratoma formation in mice is performed for approximately 4 to 6 weeks (Nelakanti et al., 2015) and the incubation period can be extended to increase the size or tissue maturation of the teratoma if the animal's behavior is not negatively affected by the size of the teratoma. In a recent study, kinetic trajectories showed that approximately 37 days are required to see and measure the size of the teratoma externally (McDonald et al., 2020). Thus, we assume that the tissue structures formed in teratomas on CAM are less mature than those in mice, since the teratoma formation in mice lasts about 6 weeks and on CAM for 9-10 days. However, the established CAM assay is clearly appropriate to demonstrate the tri-lineage differentiation capability of the generated hiPSCs. The robustness of the established CAM assay has been demonstrated by the successful generation of teratomas after the application of hiPSC lines generated from NuFFs or JPCs in addition to hiPSCs derived from RECs. The tri-lineage differentiation was successfully demonstrated with all three hiPSC lines. RECs seeded on CAM did not cause any teratoma formation.

The Matrigel used to apply the hiPSCs to CAM is obtained from the murine Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) tumor. Therefore, replacing Matrigel by synthetic hydrogels, such as polymers and scaffolds based on polyacrylamide and polyethylene glycol (PEG) (Aisenbrey and Murphy, 2020), will further reduce and prevent pain and suffering of animals in the future.

To test the influence of inoculated cell numbers on teratoma formation, different numbers of hiPSCs were seeded on CAM. The increase of the cell number from 0.5×10^6 to 2×10^6 hiPSCs led to a higher teratoma formation efficiency (33.3% versus 70%). The further increase of hiPSC number to 4×10^6 cells resulted in teratoma formation on all CAMs. However, our results showed that 2×10^6 hiPSCs are sufficient to obtain teratomas containing cells of all three germ layers. Thus, we recommend using 2×10^6 or more hiPSCs for the teratoma analysis. In immunodeficient mice, usually, 1×10^6 cells are used per injection, and it has also been shown that injections of 2 or 4×10^6 hiPSCs can increase the chances of successful teratoma formation in mice (Nelakanti et al., 2015).

Cells of all three germ layers were detected within the formed teratoma from 2×10^6 hiPSCs. The presence of endoderm, mesoderm, and ectoderm tissue cell types was detected using specific antibodies as well as by detection of the expression using qRT-PCR. In addition to using the established CAM model to analyze the pluripotency of hiPSCs, it can also be applied to determine whether unwanted hiPSCs remain in the differentiated cells. The implantation of remaining not fully differentiated hiPSCs can lead to the formation of teratomas and has to be avoided for clinical use. Thus, this CAM

assay can be also applied to analyze the safety of the hiPSC-derived cell types and the complete differentiation of hiPSCs into somatic cells.

5 Conclusion

In this study, an alternative *in vivo* model was established and tested to evaluate the pluripotency of newly generated hiPSC lines within 9 days. The CAM model is a valuable method to bridge the gap between *in vitro* cell culture and *in vivo* animal experiments. In contrast to the immunodeficient mouse model, it is simple, inexpensive, and time-saving. The application of this CAM assay will reduce the number of required animals and suffering to respect the 3Rs principles. Besides the pluripotency evaluation of the reprogrammed cells, CAM assay can be also applied to test the safety of differentiated cells from hiPSCs.

References

- Aisenbrey, E. A. and Murphy, W. L. (2020). Synthetic alternatives to matrigel. *Nat Rev Mater* 5, 539-551. doi:10.1038/s41578-020-0199-8
- Aldahmash, A., Atteya, M., Elsafadi, M. et al. (2013). Teratoma formation in immunocompetent mice after syngeneic and allogeneic implantation of germline capable mouse embryonic stem cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 14, 5705-5711. doi:10.7314/apjcp.2013.14.10.5705
- Buhr, C. R., Wiesmann, N., Tanner, R. C. et al. (2020). The chorioallantoic membrane assay in nanotoxicological research-an alternative for *in vivo* experimentation. *Nanomaterials (Basel)* 10, 2328. doi:10.3390/nano10122328
- Buta, C., David, R., Dressel, R. et al. (2013). Reconsidering pluripotency tests: Do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res* 11, 552-562. doi:10.1016/j.scr.2013.03.001
- Cao, F., Lin, S., Xie, X. et al. (2006). *In vivo* visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113, 1005-1014. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.588954
- Cao, F., van der Bogt, K. E., Sadzadeh, A. et al. (2007). Spatial and temporal kinetics of teratoma formation from murine embryonic stem cell transplantation. *Stem Cells Dev* 16, 883-891. doi:10.1089/scd.2007.0160
- Cieślak-Pobuda, A., Knoflach, V., Ringh, M. V. et al. (2017). Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1864, 1359-1369. doi:10.1016/j.bbamer.2017.04.017
- DeBord, L. C., Pathak, R. R., Villaneuva, M. et al. (2018). The chick chorioallantoic membrane (cam) as a versatile patient-derived xenograft (pdx) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res* 8, 1642-1660.
- Deryugina, E. I. and Quigley, J. P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol* 130, 1119-1130. doi:10.1007/s00418-008-0536-2
- Dexter, D. L., Lee, E. S., DeFusco, D. J. et al. (1983). Selection of metastatic variants from heterogeneous tumor cell lines using the chicken chorioallantoic membrane and nude mouse. *Cancer Res* 43, 1733-1740.
- Dohle, D. S., Pasa, S. D., Gustmann, S. et al. (2009). Chick ex ovo culture and ex ovo cam assay: How it really works. *J Vis Exp* doi:10.3791/1620
- Durupt, F., Koppers-Lalic, D., Balme, B. et al. (2012). The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther* 19, 58-68. doi:10.1038/cgt.2011.68
- Gilleron, L., Coecke, S., Sysmans, M. et al. (1996). Evaluation of a modified het-cam assay as a screening test for eye irritancy. *Toxicol In Vitro* 10, 431-446. doi:10.1016/0887-2333(96)00021-5
- Hentze, H., Soong, P. L., Wang, S. T. et al. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* 2, 198-210. doi:10.1016/j.scr.2009.02.002
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A. et al. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775. doi:10.1038/nature07864
- Kibbe, W. A. (2007). Oligocalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35, W43-46. doi:10.1093/nar/gkm234
- Kunz, P., Schenker, A., Sahr, H. et al. (2019). Optimization of the chicken chorioallantoic membrane assay as reliable *in vivo* model for the analysis of osteosarcoma. *PLoS One* 14, e0215312. doi:10.1371/journal.pone.0215312
- Kunzi-Rapp, K., Genze, F., Kufer, R. et al. (2001). Chorioallantoic membrane assay: Vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *J Urol* 166, 1502-1507. doi:10.1016/s0022-5347(05)65820-x
- Lee, A. S., Tang, C., Cao, F. et al. (2009). Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle* 8, 2608-2612. doi:10.4161/cc.8.16.9353
- Li, M., Pathak, R. R., Lopez-Rivera, E. et al. (2015). The in ovo chick chorioallantoic membrane (cam) assay as an efficient xenograft model of hepatocellular carcinoma. *J Vis Exp* doi:10.3791/52411
- McDonald, D., Wu, Y., Dailamy, A. et al. (2020). Defining the teratoma as a model for multi-lineage human development. *Cell* 183, 1402-1419 e1418. doi:10.1016/j.cell.2020.10.018
- Moreno-Jimenez, I., Hulsart-Billstrom, G., Lanham, S. A. et al. (2016). The chorioallantoic membrane (cam) assay for the study of human bone regeneration: A refinement animal model for tissue engineering. *Sci Rep* 6, 32168. doi:10.1038/srep32168
- Naik, M., Brahma, P. and Dixit, M. (2018). A cost-effective and efficient chick ex-ovo cam assay protocol to assess angiogenesis. *Methods Protoc* 1, doi:10.3390/mps1020019

- Nelakanti, R. V., Kooreman, N. G. and Wu, J. C. (2015). Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 32, 4A 8 1-17. doi:10.1002/9780470151808.sc04a08s32
- Petrovova, E., Giretova, M., Kvasilova, A. et al. (2019). Preclinical alternative model for analysis of porous scaffold biocompatibility in bone tissue engineering. *ALTEX* 36, 121-130. doi:10.14573/altex.1807241
- Rabinovich, P. M. and Weissman, S. M. (2013). Cell engineering with synthetic messenger rna. *Methods Mol Biol* 969, 3-28. doi:10.1007/978-1-62703-260-5_1
- Rovithi, M., Avan, A., Funel, N. et al. (2017). Development of bioluminescent chick chorioallantoic membrane (cam) models for primary pancreatic cancer cells: A platform for drug testing. *Sci Rep* 7, 44686. doi:10.1038/srep44686
- Steinle, H., Behring, A., Schlensak, C. et al. (2017). Concise review: Application of *in vitro* transcribed messenger rna for cellular engineering and reprogramming: Progress and challenges. *Stem Cells* 35, 68-79. doi:10.1002/stem.2402
- Steinle, H., Golombek, S., Behring, A. et al. (2018). Improving the angiogenic potential of cpcs via engineering with synthetic modified mnas. *Mol Ther Nucleic Acids* 13, 387-398. doi:10.1016/j.omtn.2018.09.005
- Steinle, H., Weber, M., Behring, A. et al. (2019a). Generation of ipscs by nonintegrative rna-based reprogramming techniques: Benefits of self-replicating rna versus synthetic mrna. *Stem Cells Int* 2019, 7641767. doi:10.1155/2019/7641767
- Steinle, H., Weber, M., Behring, A. et al. (2019b). Reprogramming of urine-derived renal epithelial cells into ipscs using srna and consecutive differentiation into beating cardiomyocytes. *Mol Ther Nucleic Acids* 17, 907-921. doi:10.1016/j.omtn.2019.07.016
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M. et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T. et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mrna. *Cell Stem Cell* 7, 618-630. doi:10.1016/j.stem.2010.08.012
- Winter, G., Koch, A. B. F., Löffler, J. et al. (2020). Multi-modal pet and mr imaging in the hen's egg test-chorioallantoic membrane (het-cam) model for initial *in vivo* testing of target-specific radioligands. *Cancers (Basel)* 12, doi:10.3390/cancers12051248
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I. et al. (2012). Primer-blast: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Ying, Y., Xingfen, Y., Wengai, Z. et al. (2010). Combined *in vitro* tests as an alternative to *in vivo* eye irritation tests. *Altern Lab Anim* 38, 303-314. doi:10.1177/026119291003800413
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K. et al. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797-801. doi:10.1126/science.1172482
- Zhang, W. Y., de Almeida, P. E. and Wu, J. C. (2008). Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research. In (eds.), *Stembook*. Cambridge (MA): doi:10.3824/stembook.1.53.1

Conflict of interest

All authors declare no competing financial interests relevant to the submitted work.

Acknowledgements

For antibody staining, the authors would like to thank Dr. Irene Gonzalez Menendez and Prof. Dr. Leticia Quintanilla de Fend at the Institute of Pathology, University Hospital & Comprehensive Cancer Center, University of Tübingen. JPCs were obtained from Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital Tübingen.

We acknowledge support by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft; DFG) through AV 133/7-1 and the Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

7.3.2 Publikation II

Combination of melt-electrospun poly- ϵ -caprolactone scaffolds and hepatocyte-like cells from footprint-free hiPSCs to create 3D biohybrid constructs for liver tissue engineering



OPEN

Combination of melt-electrospun poly- ϵ -caprolactone scaffolds and hepatocyte-like cells from footprint-free hiPSCs to create 3D biohybrid constructs for liver tissue engineering

Josefin Weber¹, Carsten Linti², Christiane Lörch¹, Marbod Weber¹, Madelene Andt², Christian Schlensak¹, Hans Peter Wendel¹, Michael Doser² & Meltem Avci-Adali¹✉

The liver is a vital organ with numerous functions, including metabolic functions, detoxification, and the synthesis of secretory proteins. The increasing prevalence of liver diseases requires the development of effective treatments, models, and regenerative approaches. The field of liver tissue engineering represents a significant advance in overcoming these challenges. In this study, 3D biohybrid constructs were created by combining hepatocyte-like cells (HLCs) derived from patient-specific footprint-free human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and 3D melt-electrospun poly- ϵ -caprolactone (PCL) scaffolds. First, a differentiation procedure was established to obtain autologous HLCs from hiPSCs reprogrammed from renal epithelial cells using self-replicating mRNA. The obtained cells expressed hepatocyte-specific markers and exhibited important hepatocyte functions, such as albumin synthesis, cytochrome P450 activity, glycogen storage, and indocyanine green metabolism. Biocompatible PCL scaffolds were fabricated by melt-electrospinning and seeded with pre-differentiated hepatoblasts, which uniformly attached to the fibers of the scaffolds and successfully matured into HLCs. The use of patient-specific, footprint-free hiPSC-derived HLCs represents a promising cell source for personalized liver regeneration strategies. In combination with biocompatible 3D scaffolds, this innovative approach has a broader range of applications spanning liver tissue engineering, drug testing and discovery, and disease modeling.

As the largest solid internal organ of the body, the liver fulfills various functions that are essential for health and longevity, such as the production of plasma proteins, e.g. albumin, fibrinogen, apolipoproteins, coagulation factors, anti-trypsin, plasminogen, transferrin, or retinol-binding protein. In addition, the liver is essential for bile secretion and drug detoxification¹, it regulates the blood volume, supports the immune system, and controls several metabolic processes through endocrine signaling. Viral infections, autoimmune or hereditary diseases can lead to liver failure. In 2017, approximately 2.14 million deaths were attributed to liver-related conditions, with liver cirrhosis and liver cancer accounting for 61.7% and 38.3%, respectively². Thus, novel strategies are needed to understand the disease mechanisms, enable effective treatment, and to develop biohybrid artificial liver systems as artificial extracorporeal supportive devices for patients with liver failure.

Successful liver tissue engineering requires appropriate cells, extracellular matrix (ECM), and signaling molecules³. By using three-dimensional (3D) scaffolds, the natural environment of the cells can be mimicked to improve the growth, organization, and function of seeded cells. Human primary hepatocytes are an ideal cellular source for liver regeneration, as they account for 60–80% of the liver mass and have many important functions in the human body. Especially, cytochrome P450 enzymes found in hepatocytes are responsible for

¹Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tuebingen, Calwerstraße 7/1, 72076 Tuebingen, Germany. ²Biomedical Engineering, German Institutes of Textile and Fiber Research Denkendorf DITF, Körschtalstraße 26, 73770 Denkendorf, Germany. ✉email: meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de

drug metabolism. Furthermore, hepatocytes are crucial for bile secretion and endocytic blood filtration and contribute to the maintenance of glucose homeostasis in the body⁴. However, the applicability of primary human hepatocytes for tissue engineering as well as drug testing is compromised by their limited availability, lack of proliferative capacity, and rapid loss of functions during *in vitro* culture⁵. In addition, the genetic metabolic mechanisms of animal models differ from those of humans, meaning that the results cannot be often transferred to clinical practice. Thus, hepatocytes of human origin are needed for experimental and therapeutic studies. Several approaches exist to mimic the native liver microenvironment⁶, including the use of decellularized liver scaffolds⁷, 3D bioprinted hydrogels⁸, and fiber-based 3D scaffolds⁹. Various parameters, such as porosity, material and chemical properties, as well as the 3D architecture of the scaffolds, play an important role in controlling cellular functions and behavior¹⁰. Ideal scaffolds should therefore facilitate cell attachment, enable the supply of nutrients to maintain cell viability and biodegrade over time⁹. Various techniques have been established to fabricate porous structures from biodegradable polymers, such as solvent extraction¹⁸, 3D printing¹⁹, and electrospinning²⁰.

Poly- ϵ -caprolactone (PCL) is a biocompatible, biodegradable, non-toxic, thermoplastic polyester that can be used in electrospinning to produce 3D scaffolds¹¹. Furthermore, its chemical properties and degradability with very low acidification, as well as its mechanical strength can be easily adjusted¹². Due to its adaptability, PCL can be used for the engineering of soft or hard tissues by changing its molecular weight and degradation time¹². The porous structure of PCL scaffolds allows the efficient supply of nutrients to the cells and enables the maintenance of the cells in the 3D constructs¹³. Furthermore, when transplanted, endothelial cells can infiltrate the porous PCL scaffolds to revascularize the scaffolds^{14,15} and ensure the viability of the cells in the 3D PCL scaffolds. Several studies have shown that the use of porous scaffolds produced by electrospinning has provided a significant contribution to liver tissue engineering, in terms of cell functionality demonstrated by albumin secretion, urea synthesis, and enzymatic activity^{16–18}. Interestingly, it has been found that electrospun PCL mats can exhibit some similar responses to original liver tissue¹⁹, especially the growth rate of hepatocytes on PCL scaffolds was comparable to natural tissue scaffolds such as decellularized porcine liver ECM. Thus, PCL has the potential to mimic the ECM as a cell growth-supporting material.

The combination of fused filament fabrication (FFF) 3D printing with melt electrospinning for tissue engineering approaches has been introduced in recent years²⁰. In this study, melt electrospinning was used for scaffold formation. The electrohydrodynamic jetting technology with electrical instabilities results in the generation of fibers with larger diameters compared with solution electrospinning²¹. Other advantages of melt electrospinning compared to solution electrospinning include simple equipment, no need for solvents, higher productivity, and the ability to fabricate various structures for cell culture scaffolds.

In recent years, the ability to reprogram human somatic cells into human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) has opened up novel possibilities for regenerative medicine by enabling the generation of autologous desired cell types, such as neurons, cardiomyocytes, or hepatocytes²². By avoiding the use of vectors that can be inserted into the genome of somatic cells during the reprogramming, footprint-free hiPSCs can be obtained. The exogenous delivery of self-replicating messenger RNA (srRNA) into somatic cells leads to the expression of the desired reprogramming factors under physiological conditions by the cells' translational machinery in the cytosol²³. Since srRNA does not need to enter the nucleus to be translated into proteins, the risk of genomic integration and insertional mutagenesis is prevented. The use of srRNA instead of conventional synthetic messenger RNA (mRNA) also eliminates the need for daily transfection of the cells until the reprogramming is complete²⁴.

In this study, srRNA was used to obtain footprint-free hiPSCs from adult human epithelial cells derived from urine. A differentiation protocol was established to generate hepatocyte-like cells (HLCs) from these hiPSCs. The successful generation of HLCs was demonstrated by the expression of hepatocyte-specific markers at the transcriptional and protein levels. In addition, the obtained cells exhibited essential hepatic functions such as cytochrome P450 activity, albumin synthesis, indocyanine green metabolism, and glycogen storage. The use of melt-electrospun PCL scaffolds facilitated the 3D cultivation and differentiation of hiPSC-derived hepatoblasts into HLCs. These 3D constructs can be applied for disease modeling, drug screening, as well as for tissue reconstruction studies by using patient-specific HLCs.

Materials and methods

Ethics statement

Renal epithelial cells were isolated from the urine of adult healthy donors, which gave written informed consent to participate. The study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Tuebingen (911/2018BO2). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Since no living animals were used in this study, ethical approval for animal testing was not required.

Fabrication of melt-electrospun PCL scaffolds

The PCL (Internal labeling: batch number PCL-19) used for this study was produced by ITV Denckendorf Productservice GmbH. The inherent viscosity was 1.9 dl/g and the melt temperature $57.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2.5 \text{ }^\circ\text{C}$. PCL filaments with 1.75 mm diameter (ITV Denckendorf Productservice GmbH) were produced using a fused filament fabrication 3D printing device (German RepRap X350pro, InnovatiQ GmbH + Co KG, Feldkirchen, Germany) which was modified using a high voltage electrostatic source (Eltex KNH34, Eltex-Elektrostatik GmbH, Weil am Rhein, Germany) and an aluminum printing bed as electrostatic target. PCL filaments were extruded through printing nozzles with a diameter of 0.1 mm and a nozzle spacing of 25 mm. A melt jet was then generated with an accelerating voltage that enabled the manufacturing of fibers with smaller diameters at $265 \text{ }^\circ\text{C}$ and a printing speed of 0.2 mm/s. With this process, 3D nonwoven PCL scaffolds were fabricated. The melt-electrospun PCL scaffolds were analyzed via scanning electron microscopy (SEM) imaging (Hitachi TM1000, Tokyo, Japan)

and characterized via directional diameter analysis (MAVIfiber2d, Fraunhofer ITFM, Germany). The printing parameters were controlled by slicing software (Simplify3D, Cincinnati, USA).

Swelling behavior analysis

The swelling capacity of scaffolds plays an important role in the absorption of body fluids and the transfer of nutrients and metabolites. Thus, swelling studies were performed to determine the water absorption capacity of the fabricated PCL scaffolds. The dry weight (W_d) of the scaffold was determined before it was immersed in 1 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) for 24 h at 37 °C. After incubation, scaffolds were taken out of DPBS, excess DPBS on the surface was removed with filter paper, and their wet weight (W_w) was determined. The swelling ratio was determined by $(W_w - W_d)/W_d$.

Coating of PCL scaffolds with vitronectin

Scaffolds were incubated for 1 h at room temperature (RT) with 70% EtOH. Subsequently, the EtOH was evaporated overnight under the sterile bench. Scaffolds were placed in 12-well plates and coated with 0.5 ml of 5, 10, or 20 µg/ml vitronectin dissolved in DPBS for 1 h at RT. Afterwards, the vitronectin coating solution was aspirated.

Cultivation of HepG2 cells

HepG2 cells (ECACC General Cell Collection, Porton Down, UK) were cultured in T75 flasks in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12 medium) (Gibco by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific). Medium changes were performed every 2–4 days. At a confluence of 80%, the cells were washed once with DPBS and detached with 0.05% trypsin–EDTA (Gibco by Thermo Fisher Scientific) for 5 min at 37 °C. Cells were then centrifuged for 5 min at 300×g and cultivated with a splitting ratio of 1:10 or 1:20.

Seeding of HepG2 cells on vitronectin-coated PCL scaffolds

After vitronectin coating, the scaffolds were soaked in 200 µl HepG2 cell culture medium. 5×10^5 HepG2 cells were resuspended in 100 µl HepG2 medium and the suspension was applied dropwise onto the scaffold and incubated for 1 h to allow the cells to attach to the scaffold. Afterwards, 1 ml fresh culture medium was added per well. After 24 h, cell attachment and morphology were analyzed.

Cultivation of human renal epithelial cells (RECs) from human urine

RECs were isolated and cultivated as described in our recently published study²³. Briefly, around 200 ml of urine from human healthy volunteers was collected. Approximately 20–50 RECs were obtained and cultivated at 37 °C with 5% CO₂ in gelatin-coated well plates (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in REC proliferation medium, consisting of 50% renal epithelial basal medium (Lonza, Basel, Switzerland) in combination with 50% proliferation medium. Medium changes were performed every third day. At 80% confluency, RECs were used for further experiments.

Reprogramming of RECs using srRNA into hiPSCs

Footprint-free hiPSCs were generated by reprogramming of RECs using VEE-OKSiM-GFP srRNA encoding OCT4, KLF4, SOX2, cMYC, and GFP. The transfection and reprogramming were performed according to our recently published study²³.

Cultivation of hiPSCs derived from RECs

The obtained hiPSCs were cultivated in Essential 8 medium (E8 stem cell medium, Thermo Fisher Scientific) on T25 culture flasks coated with 5 µg/ml vitronectin (Thermo Fisher Scientific) at 37 °C and 5% CO₂. At 70% confluence, hiPSCs were detached with 0.5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 5 min at 37 °C. Then, the cells were resuspended in E8 medium along with 10 µM Y-27632 (ROCK inhibitor, Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) and seeded in 12-well plates for hepatic differentiation. The medium was changed after 24 h to E8 medium without ROCK inhibitor and daily medium changes were performed.

Differentiation of hiPSCs towards HLCs

2×10^4 hiPSCs (passage 25–40) were seeded in vitronectin-coated (5 µg/ml) 12-well plates and cultivated for 2 days at 37 °C and 5% CO₂. The medium was changed daily (1 ml/well). To initiate the differentiation, E8 medium was changed to endoderm medium 1 (1 ml/well) containing 0.5% DMSO (SERVA Serving Scientists, Heidelberg, Germany) in E8 medium. After 24 h, the medium was changed to endoderm medium 2 containing RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) with 3 µM CHIR99021 (Peptrotech) and 1% B27 supplement minus insulin (Thermo Fisher Scientific). The next day, endoderm medium 3, RPMI 1640 medium containing 1% B27 supplement (Thermo Fisher Scientific) was applied for another 24 h.

To improve differentiation efficiency, undifferentiated hiPSCs were eliminated selectively using RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1.2 mol/l L-alanine (Thermo Fisher Scientific)²⁵. Therefore, after endoderm induction (day 3), RPMI 1640 medium supplemented with L-alanine was added to the cells and incubated for 1 h at 37 °C. Then, the cells were cultivated for another 24 h with endoderm medium 3. Then, at day 4, a medium change was performed and the endodermal cells were cultivated in RPMI 1640 with 1% B27 supplement, 20 ng/ml bone morphogenic protein 4 (BMP4) (Peptrotech), 5 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peptrotech) and 0.5% DMSO for another 5 days to induce hepatoblast stage. The culture medium was changed daily (1 ml/well). For the differentiation of hepatoblasts towards HLCs, the cells were first cultivated

for 5 days in RPMI 1640 containing 0.5% DMSO, 1% B27 supplement, and 20 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (Peprotech). The medium was changed daily (1.5 ml/well). Then, immature hepatocytes were further differentiated in hepatocyte culture medium BulletKit (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 20 ng/ml HGF, 20 ng/ml Oncostatin M (OSM) (Peprotech), 100 nM dexamethasone and 0.5% DMSO for 7 days to obtain mature HLCs. The medium was changed every other day (2 ml/well).

As a negative control, 2×10^4 hiPSCs (passage 25–40) were seeded in vitronectin-coated (5 μ g/ml) 12-well plates and cultivated at 37 °C and 5% CO₂ using E8 medium along with 10 μ M Y-27632 ROCK inhibitor. The medium was changed after 24 h to E8 medium without ROCK inhibitor and daily medium changes were performed until the corresponding differentiation stage of HLCs was completed.

Seeding of hiPSC-derived hepatoblasts on vitronectin-coated PCL scaffolds and differentiation into HLCs

On day 3 after inducing the hepatoblast differentiation of definitive endoderm cells (3 days after selection with L-alanine), the cells were detached using TrypLE Express (Gibco by Life Technologies) and 5×10^5 hepatoblasts in 100 μ l hepatoblast medium supplemented with 2% KnockOut Serum Replacement (KOSR) (Gibco by Life Technologies), 1% B27, and 10 μ M ROCK inhibitor Y-27632 were seeded onto scaffolds coated with 20 μ g/ml vitronectin. The cell suspension was added dropwise onto the scaffold and incubated for 1 h at 37 °C with 5% CO₂ to let the cells attach to the scaffold. Afterwards, 1 ml of fresh hepatoblast culture medium was added per scaffold. After the colonization of the scaffolds, cultivation was performed in hepatoblast medium for an additional 2 days. Then, cells were differentiated into mature HLCs according to the described differentiation protocol above.

Simultaneously with the transfer of the hepatoblasts to the PCL scaffolds, 5×10^5 hiPSCs (passage 25–40) were seeded in 100 μ l E8 medium and 10 μ M Y-27632 ROCK inhibitor onto scaffolds coated with 20 μ g/ml vitronectin as a negative control. The cell suspension was added dropwise onto the scaffolds and incubated for 1 h at 37 °C with 5% CO₂ to allow the cells to attach. Afterwards, 1 ml of fresh E8 medium with ROCK inhibitor was added to each scaffold. The medium was changed after 24 h to E8 medium without ROCK inhibitor and daily medium changes were performed.

Uptake and release of indocyanine green (ICG) by hiPSC-derived HLCs

The metabolism of ICG (Diagnostic Green GmbH, Aschheim, Germany) was analyzed to evaluate the ability of the generated hiPSC-derived HLCs for the uptake, conjugation, and release of the substance. ICG can only be metabolized by functional hepatocytes and is also clinically established to detect the functionality of hepatocytes. For the preparation of a stock solution, ICG was dissolved in DMSO (5 mg/ml). Then, cells were incubated with 1 mg/ml ICG in 1 ml hepatocyte culture medium BulletKit for 30 min at 37 °C with 5% CO₂. Cells were then washed 3× with DPBS and ICG uptake was analyzed by phase-contrast microscopy. Afterwards, the medium was replaced by fresh medium and the cells were incubated for another 6 h at 37 °C with 5% CO₂ followed by microscopic examination. Images were acquired using an Axiovert135 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and EOS Utility software (Canon, Tokyo, Japan).

Detection of cytochrome P450 activity

To detect cytochrome P450 activity, hiPSC-derived HLCs differentiated in 12-well plates were washed with 1 ml DPBS. For cytochrome P450 induction, cells were incubated with 25 μ M and 50 μ M rifampicin (Merck, Darmstadt, Germany) in hepatocyte culture medium BulletKit for 48 h. Afterwards, the cells were washed once with 1 ml DPBS. The cytochrome P450 activity was analyzed using a nonlytic P450-Glo assay (Luciferin-IPA) (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's protocol. Therefore, cells were incubated with CYP3A4/Luciferin-IPA diluted 1:1000 in hepatocyte culture medium BulletKit (Lonza, Basel, Switzerland) at 37 °C with 5% CO₂ for 45 min. Next, 25 μ l of the supernatant was transferred into one well of a white 96 well-plate, and 25 μ l luciferin detection reagent was added. The CYP3A4 activity was then measured in triplicates with a fluorescence microplate reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

Flow cytometry analysis

Cells were washed and detached using TrypLE Express (Gibco by Life Technologies). The cells were then centrifuged for 3 min at 600×g and washed with 1 ml DPBS. For intracellular staining, cells were fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde (PFA) at RT. After a washing step with DPBS, cells were suspended in permeabilization buffer (2% BSA in DPBS and 0.2% Triton X-100), and fluorescently labeled antibodies were added at a concentration indicated by the manufacturer and incubated at RT for 45 min. For extracellular staining, cells were suspended in wash buffer (2% BSA in DPBS) and fluorescently labeled antibodies were added at a concentration indicated by the manufacturer and the sample was incubated for 45 min at RT. Following this, a washing step was performed, then the cells were suspended in 500 μ l CellFIX (1×) (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and analyzed via flow cytometry analysis using the following antibodies: PE-labeled mouse anti-human CXCR4 and PE-labeled mouse anti-human alpha-fetoprotein antibodies (both from R&D Systems, Minneapolis, USA), PE-labeled mouse anti-human FOXA2 and PE-labeled mouse anti-human ASGPR1 antibodies (both from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), Alexa Fluor 488-labeled goat anti-human ALB antibody (Thermo Fisher Scientific) and DyLight 488-labeled mouse anti-human TRA-1-60 antibody (Stemgent, Cambridge, USA).

qRT-PCR

RNA was isolated with Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Munich, Germany). Using the iScript kit (Bio-Rad, Hercules, USA) 300 ng RNA from cells was then reverse-transcribed into cDNA. Primers (final concentration: 300 nM) used are listed in Table 1. They were obtained from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). IQ

Marker for	Gene	Sense primer 5'-3'	Antisense primer 5'-3'
-	GAPDH	TCAACAGCGACACCCACTCC	TGAGGTCCACCACCCTGTTG
Stem cells	Nanog	TGAACCTCAGCTACAAACAG	TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG
Endoderm	CXCR4	TCCATTCTTTGCCTCTTTTGC	TGTCGGTCATGCTTCTCAGTT
	SOX17	GATTGCACTGGTCACCTCGG	TCCGTGTAATAAGGGTCTTCGC
	FOXA2	TGCACTCGGCTTCCAGTATG	CGTGTTCATGCCGTTTCATCC
Hepatoblasts	HNF4a	ACTACATCAACGACCCGCCAGT	ATCTGCCAGGTGATCTCTCTG
	AFP	AAATGCGTTTCTCGTTGCTT	GAGTTGGCAACAAGTGGCTG
HLCs	ALB	GCACAGAATCCTTGGTGAACAG	ATGGAAGGTGAATGTTTCAGCA
	CYP3A4	CCGAGTGGATTCTCTCAGCTG	TGCTCGTGGTTTCATAGCCAGC
	CYP2C9	CAAGATTGAGCAGCCCTG	TGGTTGTGCTTTCTCTCTCCA
	APOA2	GCCGAGGCCAAGTCTTACTTT	GCTGTGTCCAAGTTCACAG
	A1AT	AGGTGCCTATGATGAAGCGT	TCAGGCAGGAAGAAGATGGC
	CYP1A2	ATGTGAGCAAGGAGGCTAAGG	GGCAGTCTCCACGAACTCA
	CYP2D6	GGTGGTCGTGCTCAATGGG	GCGAAAGGGGCGTCTTG

Table 1. List of all primer sequences, used for gene expression studies. *GAPDH* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Nanog* homeobox protein NANOG, *CXCR4* C-X-C chemokine receptor type 4, *SOX17* SRY-box 17, *FOXA2* forkhead box protein A2, *HNF4a* hepatocyte nuclear factor 4 alpha, *AFP* alpha-fetoprotein, *ALB* albumin, *CYP3A4* cytochrome P450 3A4, *CYP2C9* cytochrome P450 2C9, *CYP1A2* cytochrome P450 1A2, *CYP2D6* cytochrome P450 2D6, *APOA2* apolipoprotein A-II, *A1AT* alpha-1 antitrypsin.

SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and the CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) were used to perform qRT-PCR analyses. *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) was taken as housekeeping gene. Primers were self-designed with the Primer-Blast tool from NCBI²⁶. To control melting temperatures and self-complementarities, the Oligonucleotide Properties Calculator from Northwestern University Medical School was used²⁷.

Immunofluorescence staining

After washing with DPBS, the cells were fixed for 15 min with 4% PFA at RT. Then, cells were blocked for 45 min at RT in 4% BSA. For intracellular staining, permeabilization buffer (DPBS containing 2% BSA and 0.2% Triton X-100) with fluorescently labeled antibodies at concentrations indicated by the manufacturer was applied for 1 h at RT. For extracellular staining, cells were incubated in washing buffer (2% BSA in DPBS) with fluorescently labeled antibodies. The cells were then washed 3× with permeabilization buffer or washing buffer and 1× with DPBS. If a secondary antibody was used, cells were treated for 1 h at RT with permeabilization or washing buffer and the secondary antibody. Subsequently, the cells were rinsed 3× with permeabilization buffer or washing buffer and then 1× with DPBS. Finally, the cells were covered with DAPI mounting medium (Abcam, Cambridge, UK). The following antibodies were used: PE-labeled mouse anti-human CXCR4 and PE-labeled mouse anti-human alpha-fetoprotein antibodies (both from R&D Systems), PE-labeled mouse anti-human FOXA2 and PE-labeled mouse anti-human ASGPR1 antibodies (both from Miltenyi Biotec), and Alexa Fluor 488-labeled goat anti-human albumin antibody (Thermo Fisher Scientific). Using a fluorescence microscope (Axiovert 135 microscope with AxioVision 4.8.2 software from Carl Zeiss), images were acquired.

F-actin staining of cells

To visualize the attachment and distribution of cells on the scaffolds, F-actin staining was performed using ActinRed™ 555 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Therefore, scaffolds seeded with cells were washed twice with DPBS and fixed with 4% PFA at RT for 15 min. Subsequently, the scaffolds were washed again with DPBS and incubated for 15 min at RT in 1 ml permeabilization buffer containing 2% BSA, 0.2% Triton X-100, and 1 drop of ActinRed™ 555. In the end, the scaffolds were stained with DAPI mounting medium (Abcam) to visualize the cell nuclei.

Periodic acid-Schiff (PAS) staining for the detection of glycogen synthesis

To identify glycogen storage in hiPSC-derived HLCs, PAS staining was performed at the end of the differentiation process (day 20) using a PAS staining kit (Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Germany). Therefore, cells were washed 2× with DPBS and fixed with 4% PFA at RT for 15 min. Subsequently, the cells were treated with 1% periodic acid solution at RT for 10 min and then incubated in Schiff's reagent at RT for 15 min. After rinsing with water, cells were stained with Mayer's hematoxylin for 5 min at RT. Images were acquired using an Axiovert135 microscope (Carl Zeiss) and EOS Utility software (Canon).

Detection of albumin secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

At the end of the hepatocyte differentiation process (day 20), the HLCs were cultivated for 24 h with 2 ml medium. To detect secreted albumin in the supernatant of the generated HLCs, albumin concentration in

100 μ l was determined in duplicate using a human albumin-specific ELISA (Thermo Fisher) as described by the manufacturer. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, USA).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM or SD. For data analysis of repeated measurements one-way ANOVA, paired or unpaired t-test followed by Bonferroni's multiple comparison test was applied. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Differentiation of footprint-free generated hiPSCs into HLCs

After reprogramming adult somatic RECs into hiPSCs, the cells were seeded into vitronectin-coated wells of a 12-well plate to induce hepatic differentiation. A 20-day protocol using a cocktail of small molecules and growth factors was applied. The protocol was divided into 4 differentiation stages of the cells including definitive endoderm, hepatoblasts, immature hepatocytes, and mature HLCs (Fig. 1A). After 3 days of endoderm differentiation, hiPSC colonies transformed into flatter cells with prominent nuclei similar to early hepatoblasts. At this point of differentiation, a selective elimination of undifferentiated hiPSCs was established by incubation of the cells with L-alanine for 1 h. After this selection, the cells underwent a continuous morphological change. After completion of endodermal induction and subsequent L-alanine selection, hepatic differentiation was initiated on day 4, and the cells transformed from clusters to hepatoblast-specific cuboidal shapes. At the end of the maturation phase, the generated HLCs showed hepatocyte-specific polygonal morphology.

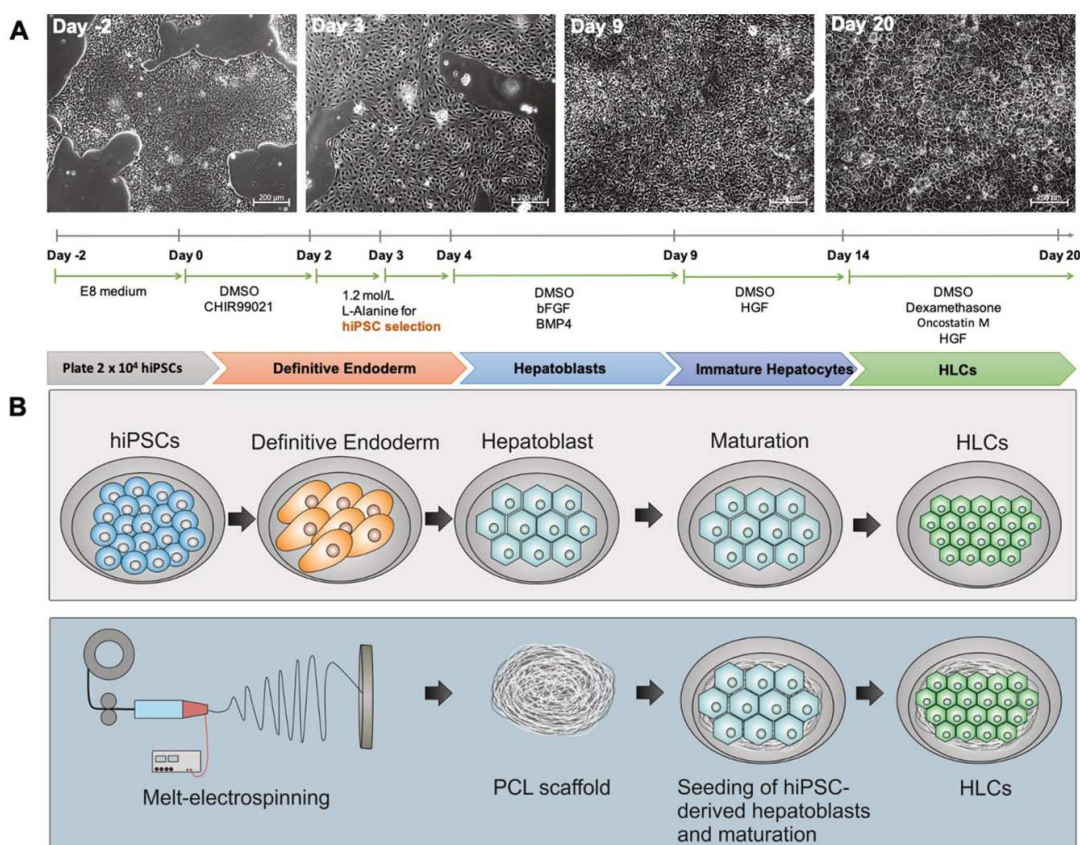


Figure 1. Differentiation of hiPSCs into HLCs and cultivation on 3D melt-electrospun poly- ϵ -caprolactone (PCL) scaffolds. **(A)** The sequence of the protocol for the differentiation of human renal epithelial cells derived hiPSCs into HLCs and morphological overview of cells at different stages. **(B)** Schematic representation of the hepatic differentiation, the fabrication of 3D melt-electrospun PCL scaffolds, the following population with hiPSC-derived hepatoblasts and their maturation towards HLCs within the three-dimensional (3D) construct.

To allow hepatocyte differentiation and growth in a 3D environment, 3 days after starting the hepatoblast differentiation of definitive endoderm cells, 5×10^5 hiPSC-derived hepatoblasts were seeded onto vitronectin-coated PCL melt-electrospun scaffolds (Fig. 1B) and cultivated for 2 days until hepatoblast differentiation was complete. Cells were either analyzed or further differentiated into HLCs within the scaffold for 12 days.

Induction of definitive endoderm stage and subsequent elimination of undifferentiated hiPSCs using L-alanine

After induction of the definitive endoderm stage using DMSO and CHIR99021, cells were incubated for 1 h with L-alanine to eliminate undifferentiated hiPSCs and then cultivated for 24 h in endoderm medium 3. The treatment of cells for 1 h with L-alanine resulted in the successful reduction of residual hiPSCs (Fig. 2A). Phase-contrast microscopy analyses showed the elimination of residual hiPSC clusters, which resulted in pure definitive endoderm cell populations compared with the unselected cells.

24 h after the L-alanine treatment, approximately 8.5×10^5 cells per well were dead and 1×10^6 cells per well were viable (Fig. 2B). Furthermore, qRT-PCR revealed a significant reduction of the stem cell marker expression (Nanog) in endoderm cells compared with the initial hiPSCs (Fig. 2C). Moreover, flow cytometry analyses confirmed a significant reduction of TRA-1-60 expressing cells from 58.1 ± 8.4 to 33.4 ± 7.1 % TRA-1-60 expressing cells after L-alanine selection (Fig. 2D).

The efficiency of endoderm differentiation was determined by the analysis of the endoderm specific marker expression levels of CXCR4, FOXA2, SOX17, and Gata4 by qRT-PCR with and without L-alanine treatment (Fig. 2E). Compared to hiPSCs, significantly increased expression of all analyzed genes was detected after the treatment of cells with L-alanine, and successful endoderm induction was demonstrated by an upregulation of the expression levels detected in endoderm cells compared to the initial hiPSCs. Flow cytometry analyses showed an increase in CXCR4 and FOXA2 positive cells after the L-alanine treatment (Fig. 2F). Furthermore, the increased level of CXCR4 and FOXA2 positive cells compared to the initial hiPSCs showed successful endoderm induction. The fluorescence microscopy analyses proved also the presence of CXCR4 and FOXA2 expressing cells (Fig. 2G) within the endoderm cells after 1 h of treatment. Since the analyses demonstrated that the L-alanine treatment effectively eliminates undifferentiated hiPSCs, the following experiments were performed with cells treated for 1 h with L-alanine.

Characterization of generated hiPSC-derived hepatoblasts

After completion of the definitive endoderm stage including selective elimination of residual hiPSCs, the second stage of differentiation (hepatoblast stage) started at day 4. After 5 days of hepatoblast differentiation (day 9 in total), the expression levels of the specific hepatoblast markers alpha-fetoprotein (AFP) and hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) were analyzed. The qRT-PCR analysis at day 9 of the hepatic differentiation of hiPSC-derived hepatoblasts confirmed the strong expression of HNF4 α and AFP (Fig. 3A). The obtained hepatoblasts showed significantly higher expression of HNF4 α (1945-fold) and AFP (51,938-fold) compared with the initial hiPSCs. The presence of AFP was also detected by immunostaining (Fig. 3B) of hiPSC-derived hepatoblasts. Flow cytometry analyses demonstrated that approximately 90% of the analyzed cells express AFP (Fig. 3C).

Characterization and functionality analyses of the generated HLCs

At day 20, the expression of hepatocyte-specific markers was evaluated. Gene expression analysis by qRT-PCR revealed significantly upregulated levels of ALB, APOA2, and A1AT expression compared to the initial hiPSCs (Fig. 4A). Furthermore, a significant reduction of the stem cell marker expression (Nanog) was detected by qRT-PCR in hiPSC-derived HLCs compared with the initial hiPSCs (Fig. 4B). The presence of albumin could be confirmed by immunostaining (Fig. 4C). Moreover, flow cytometry analyses confirmed a significant reduction of TRA-1-60 expressing cells (Fig. 4D) and a significant increase of ALB expressing cells at day 20 (Fig. 4E). In addition, the expression of ASGPR1, HFE, and CD81 was examined, and a clear presence of each marker was detected (Supplementary Fig. 1). Furthermore, the functionality of the hiPSC-derived HLCs was analyzed. To examine metabolic activity, hiPSC-derived HLCs were treated with 25 μ M and 50 μ M rifampicin for 48 h, which resulted in increased CYP2C9 and CYP1A2 expression levels compared to unstimulated HLCs and initial hiPSCs (Fig. 4F). Moreover, a significant increase in CYP3A4 activity was measured after the treatment of cells with 25 μ M and 50 μ M rifampicin (Fig. 4H). In addition, significantly increased albumin secretion into the supernatant was detected in hiPSC-derived HLCs compared with the hiPSC control (Fig. 4G). PAS staining revealed the ability of the generated hiPSC-derived HLCs to store glycogen, as demonstrated by the pink staining of the cells (Fig. 4I). Another hepatocyte-specific function, the metabolization of ICG, was successfully demonstrated by uptake of the ICG (cells appeared green) and metabolization within 6 h (Fig. 4J).

Scaffold fabrication and analysis of cell attachment to vitronectin-coated scaffolds

The melt-electrospun PCL scaffolds were produced using an FFF 3D printing device combined with a high-voltage electrostatic source and an aluminum printing bed as the electrostatic target. Thereby, nonwoven scaffolds were printed on the printing bed (Fig. 5A). Two different printing speeds were analyzed, resulting in different scaffold structures. Printing with 0.2 mm/s resulted in scaffold structures with smaller pores (Fig. 5C I) compared to a printing speed of 0.4 mm/s (Fig. 5C II). Furthermore, two extrusion temperatures with a printing speed of 0.2 mm/s were tested. The application of 270 °C resulted in fused fibers (Fig. 5C III) that did not meet the requirements. The application of 265 °C resulted in uniform distribution and separation of the fibers (Fig. 5C IV). For the final setup of the scaffold fabrication, the voltage was kept constant at +15 kV and a nozzle offset of 25 mm, a printing speed of 0.2 mm/s, and an extrusion temperature of 265 °C were used. Afterwards, the fiber diameter distribution from three scaffold batches was analyzed at eight different positions of the printing bed and

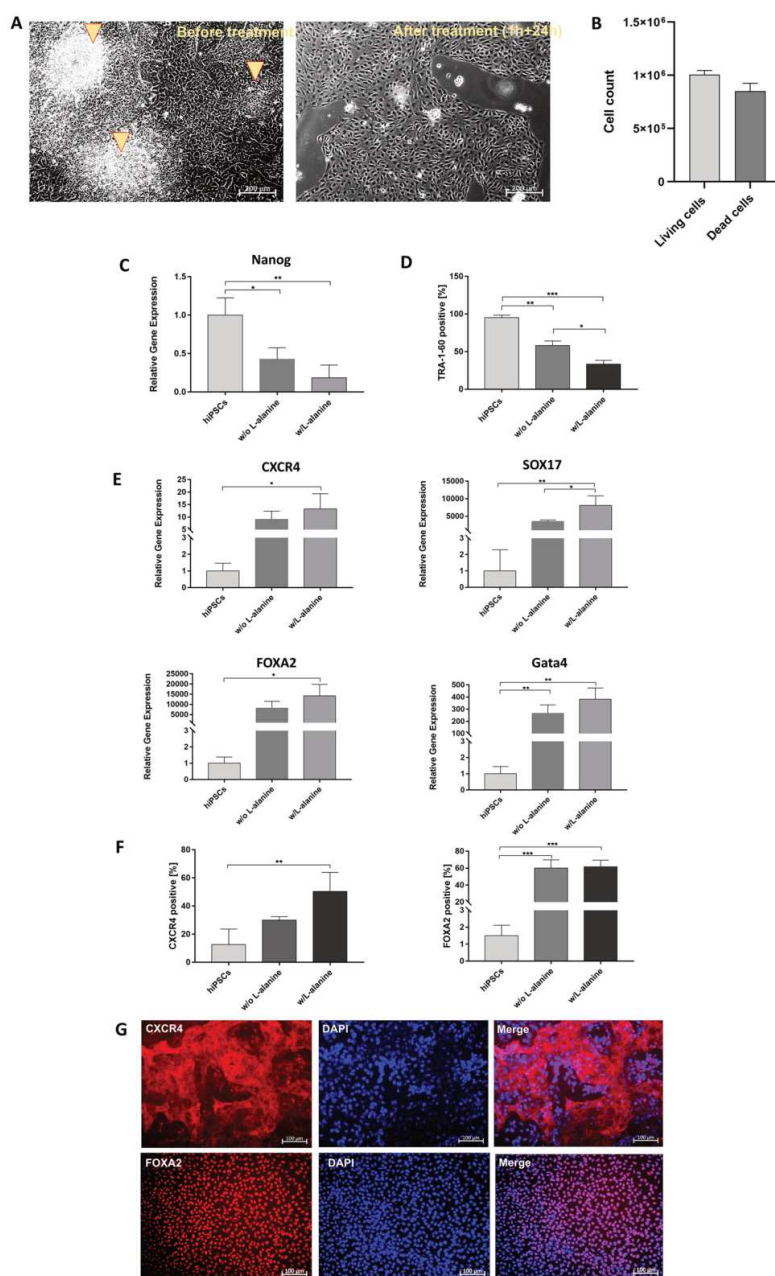


Figure 2. Elimination of undifferentiated hiPSCs with L-alanine treatment and analysis of endoderm differentiation. (A) Microscopic images of endoderm cells before and after L-alanine treatment for 1 h. Arrows show undifferentiated hiPSCs before selection. Scale bars show 200 μm . (B) Determination of living and dead cells 24 h after L-alanine treatment using hemocytometer. The results are presented as mean \pm SEM ($n = 3$). (C) qRT-PCR analysis of the presence of hiPSC-specific Nanog expression. mRNA levels were normalized to GAPDH, and the results are shown relative to hiPSCs. (D) Flow cytometry analysis of TRA-1-60-expressing cells after endoderm induction and selective elimination of undifferentiated hiPSCs. (E) Expression analysis of CXCR4, SOX17, FOXA2, and Gata4 transcripts performing qRT-PCR. (F) Flow cytometry analysis of CXCR4 and FOXA2-expressing cells after endoderm induction and selective elimination of undifferentiated hiPSCs. (G) Representative immunofluorescence microscopy images of endodermal cells after selection, stained with CXCR4 and FOXA2-specific antibodies. Scale bars represent 100 μm . All results are presented as mean \pm SEM ($n = 3$). Statistical differences were identified with one-way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

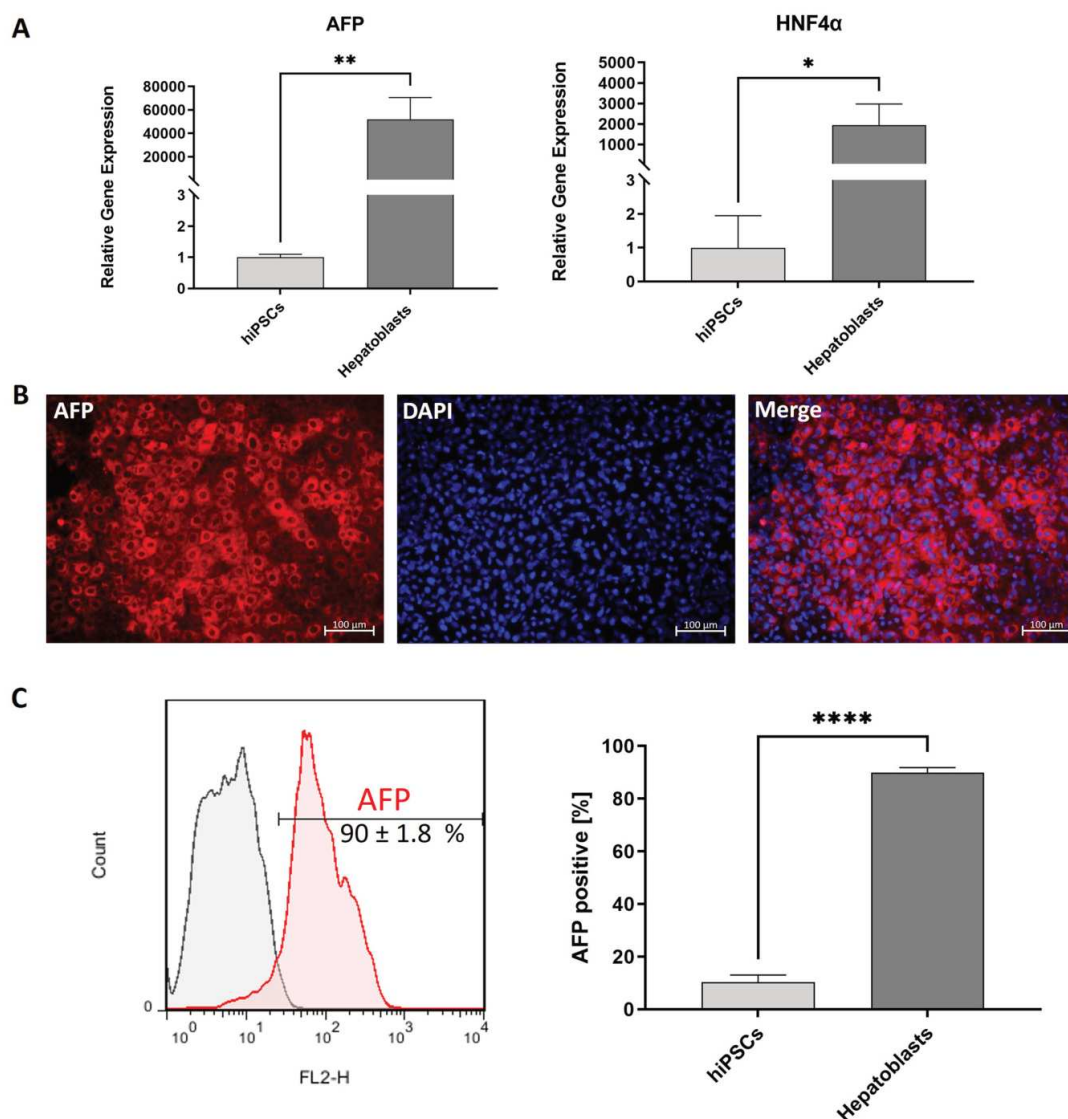


Figure 3. Characterization of generated hepatoblasts. (A) Expression analysis of AFP and HNF4α transcripts performing qRT-PCR. (B) Representative immunofluorescence microscopy images of hepatoblasts, stained with AFP-specific antibody (red) and nuclei with DAPI (blue). Scale bars represent 100 μm. (C) Flow cytometry analyses of AFP expression in cells after hepatoblasts differentiation. All results are presented as mean + SEM (n = 3). Statistical differences were identified using unpaired t-test (*p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001).

resulted in a mean fiber diameter of 12.5 ± 1.4 μm (Fig. 5B). Only minor variations in fiber thickness between the batches were measured, which did not influence cell attachment. Round and porous scaffolds with a diameter of 2 cm were fabricated, which fitted into one well of a 12-well plate (Fig. 5D). After 24 h of incubation in DPBS, a swelling ratio of 2.69 ± 0.27 was determined, which showed the swelling behavior of the scaffolds. This was accompanied by an increase in the weight of the scaffolds (Fig. 5E).

To improve the adhesion of cells to the PCL fibers, the fibers were coated with different concentrations of vitronectin (5, 10, and 20 μg/ml) (Supplementary Fig. 2) and seeded with HepG2 cells. Coating with 20 μg/ml vitronectin (Fig. 5F) resulted in an even distribution and adhesion of cells around the fibers, 24 h after seeding of 5×10^5 HepG2 cells onto the scaffold.

Figure 4. Hepatic maturation under 2D conditions and subsequent analyses of the cells. (A) Expression analysis of A1AT, ALB, and APOA2 transcripts performing qRT-PCR. mRNA levels were normalized to GAPDH, and the results are shown relative to hiPSCs (n = 3). (B) Expression analysis for the presence of the hiPSC marker Nanog. mRNA levels were normalized to GAPDH, and the results are shown relative to hiPSCs (n = 5). (C) Representative immunofluorescence microscopy images of HLCs, stained with albumin-specific antibodies. Scale bars show 50 μ m or 100 μ m. (D) Flow cytometry analyses of TRA-1-60 expressing cells after 20 days. All results are presented as mean + SEM (n = 3). Statistical differences were identified using unpaired t-test (****p < 0.0001). (E) Flow cytometry analyses of ALB-expressing cells after 20 days. All results are presented as mean + SEM (n = 3). Statistical differences were identified using unpaired t-test (***p < 0.001). (F) Expression analysis of CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2, and CYP2D6 transcripts using qRT-PCR (n = 3). Expression levels were examined after stimulation with 25 μ M and 50 μ M rifampicin for 48 h and without rifampicin treatment. (G) Analysis of albumin secretion by ELISA (n = 5). Results were compared to the initial hiPSCs. (H) Metabolic activity of hiPSC-derived HLCs was determined by measuring the activity of cytochrome P450 CYP3A4 (n = 4). (I) PAS staining showing glycogen storage in hiPSC-derived HLCs. (J) Detection of ICG uptake (left) and release after 6 h. Scale bars represent 50 μ m. All results are shown as mean + SEM. Statistical differences were identified with unpaired t-test or one-way ANOVA. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

Analysis of hepatoblasts seeded on PCL scaffolds

The coating of PCL scaffolds with 10 μ g/ml vitronectin also resulted in less attachment of hepatoblasts (Supplementary Fig. 3) than with 20 μ g/ml vitronectin coating, similar to the results with HepG2 cells. Thus, to perform the differentiation of hepatoblasts on PCL scaffolds, 5×10^5 pre-differentiated hepatoblasts (at day 3 of hepatoblast differentiation) were seeded on 20 μ g/ml vitronectin-coated scaffolds. Uniform attachment of the cells to the fibers and uniform distribution within the scaffolds were observed (Fig. 6A). At the end of hepatoblast differentiation within the PCL (3 days after seeding), live-dead staining was performed. Only a few dead cells were detected (Fig. 6B), indicating that the scaffold had no cytotoxic effect on the cells. The number of hepatoblasts attached to the fibers of the PCL scaffolds was determined 24 h after seeding (Fig. 6C) and showed that approximately 4.6×10^5 cells were attached to the scaffold.

Flow cytometry analysis showed significantly higher numbers of cells expressing AFP ($73.2 \pm 6.9\%$) compared to the initial hiPSCs (Fig. 6D). The immunostaining of the cells 3 days after seeding demonstrated also a strong expression of the hepatoblast marker AFP (Fig. 6E). The qRT-PCR analysis revealed significantly higher expression levels of HNF4 α and AFP, compared with the initial hiPSCs (Fig. 6F).

Analysis of the maturation of hiPSC-derived hepatoblasts in PCL scaffolds into HLCs

The expression of hepatic markers within the PCL scaffolds was evaluated at day 20 of the differentiation. Live/dead analysis revealed that most cells were viable (Fig. 7A). The cells remained attached to the fibers and formed networks between the fibers of the scaffold, as demonstrated by F-actin staining (Fig. 7B) and SEM (Fig. 7C). Immunostainings showed that the generated cells produced albumin, mainly in 3D cellular clusters within the fibers (Fig. 7D). In addition, albumin secretion into the supernatant was detected by ELISA and showed significantly increased production of albumin (23-fold) by HLCs compared to the hiPSCs (Fig. 7E). Moreover, significantly increased expression of A1AT (428-fold), APOA2 (490-fold), and ALB (99-fold) was detected by qRT-PCR compared with the undifferentiated hiPSCs (Fig. 7F).

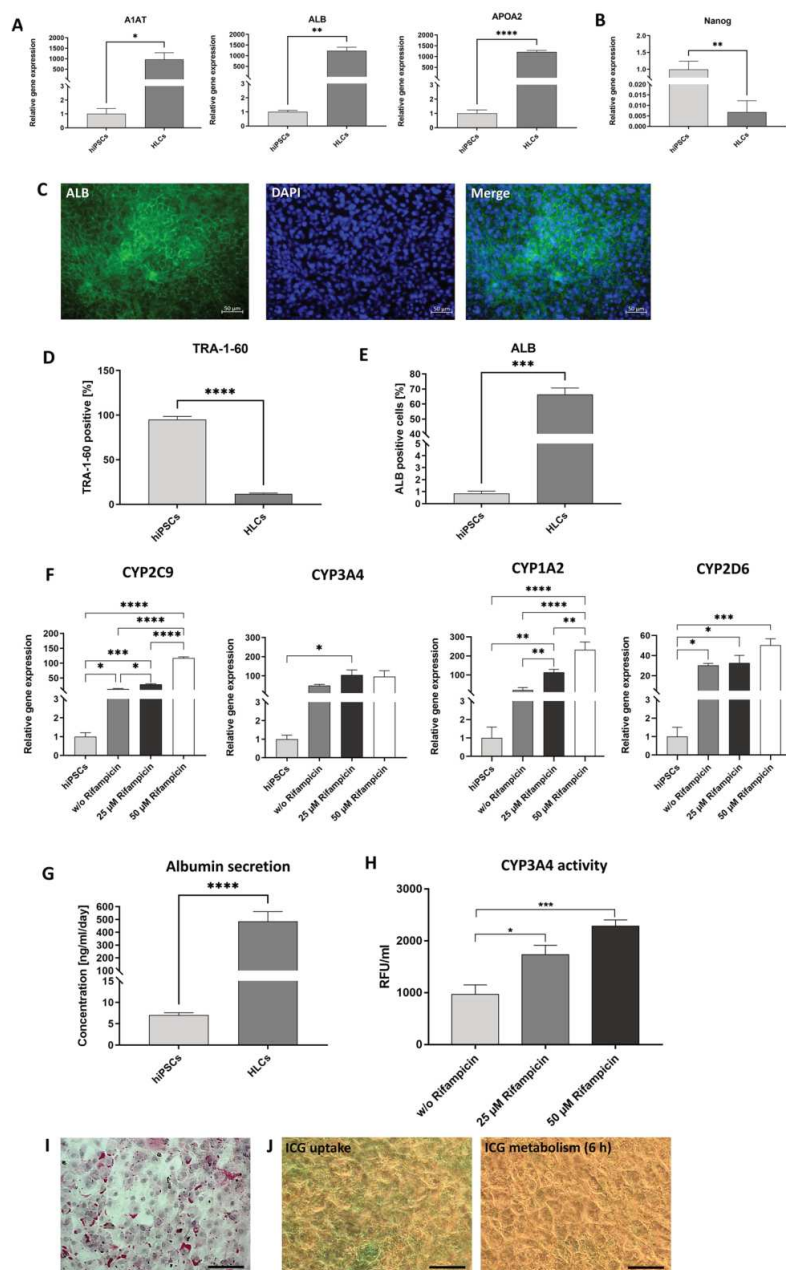
Analysis of the metabolic activity of generated hiPSC-derived HLCs in PCL scaffolds

To investigate the metabolic activity of generated HLCs, scaffolds with cells were treated for 48 h with 25 μ M or 50 μ M rifampicin. The stimulation with 50 μ M rifampicin resulted in a significant increase in CYP2C9 and CYP3A4 gene expression compared with the unstimulated HLCs (Fig. 8A). Moreover, a significant increase in CYP3A4 activity was measured after the treatment of cells with 25 μ M and 50 μ M rifampicin (Fig. 8B).

Discussion

Liver diseases are responsible for approximately 2 million deaths per year worldwide, of which 1 million are due to complications of liver cirrhosis and 1 million are due to viral hepatitis and hepatocellular carcinoma²⁸. Thus, liver tissue engineering plays an important role in the development of novel strategies for liver regeneration and drug treatment as well as in the modeling of diseases. In this study, two key complementary components of tissue engineering were combined. First, biocompatible 3D melt-electrospun PCL scaffolds were fabricated, and second, autologous HLCs were generated from footprint-free hiPSCs to colonize these scaffolds.

The generation of patient-specific hiPSCs and the subsequent differentiation into HLCs could enable personalized treatment and liver tissue engineering by providing an unlimited source of autologous hepatocytes. A widely used strategy to obtain hiPSCs that can be further differentiated into the desired cell type, such as hepatocytes, is to reprogram skin fibroblasts using viral vectors^{29,30}. However, the use of fibroblasts from skin biopsies is an invasive procedure associated with pain for the patient²³. Additionally, genome-integrating viral vectors carry the risk of random insertion into the genome, which can potentially lead to mutations or the development of tumors³¹. Thus, meanwhile, several non-integrating reprogramming strategies have been established^{32–34}. Especially, synthetic mRNA-based strategies are becoming more and more relevant³⁵. The exogenous transfer of mRNAs into somatic cells results in transient expression of desired proteins. This technique can be applied for the expression of reprogramming factors for the generation of footprint-free hiPSCs³³. Due to the transient presence of the mRNAs, a daily transfection of the cells during the reprogramming process is inevitable. This



causes stress to the cells and is time-consuming and expensive. To address these challenges, srRNAs can be used for the temporary expression of the reprogramming factors³⁶ without performing daily transfection³⁷.

In this study, hiPSCs were used, generated by applying an innovative srRNA-based strategy. The donor-specific hiPSCs were obtained by reprogramming of urine-derived RECs with srRNA and a differentiation method was developed to obtain autologous HLCs from these footprint-free hiPSCs. After 20 days of differentiation, cells expressing hepatic lineage markers were generated. Furthermore, these hiPSC-derived HLCs exhibited functional characteristics, such as albumin synthesis, ICG metabolism, glycogen storage, and cytochrome P450 activity. Especially, CYP enzyme activity is a major function of hepatic cells, as CYP enzymes play a central role in the metabolism of clinically relevant drugs³⁸. Primary hepatocytes rapidly lose their liver-specific functions, including CYP inducibility and the production of plasma proteins like albumin, during in vitro cultivation³⁹. Most cell

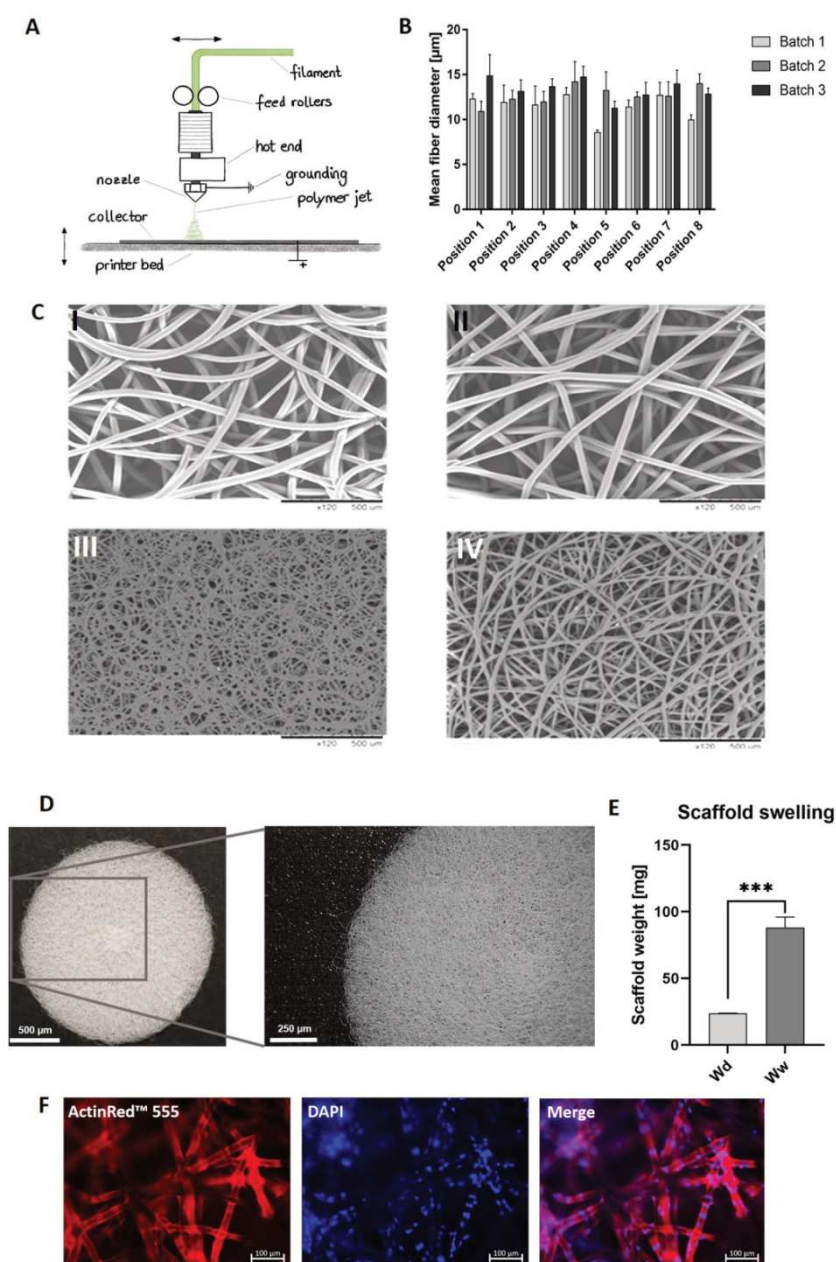


Figure 5. Fabrication of PCL scaffold and coating with vitronectin. (A) Schematic representation of PCL scaffold production using the extruder of a 3D printer and a high-voltage source. (B) The fiber diameters of the scaffold were analyzed at 8 different positions of the printing bed ($n = 3$). Scaffolds were fabricated with a printing speed of 0.2 mm/s, and an extrusion temperature of 265 °C. (C) Representative scanning electron microscopy (SEM) images of melt-electro-spun nonwoven scaffolds with varied printing speeds (I) 0.2 mm/s and (II) 0.4 mm/s and extrusion temperatures (III) 270 °C and (IV) 265 °C and a printing speed of 0.2 mm/s. The nozzle offset (25 mm) and the voltage (+15 kV) were kept constant. (D) Representative macroscopic images of PCL scaffold produced with the final setup. The scaffold had a diameter of 2 cm and fitted into a 12-well plate. Scale bars represent 500 μm and 250 μm . (E) Evaluation of the swelling behavior of PCL scaffolds. The dry weight (Wd) of the scaffold was determined before the scaffolds were immersed in DPBS for 24 h. After incubation, the wet weight (Ww) of the scaffolds was measured. (F) Representative immunofluorescence images of 5×10^5 HepG2 cells seeded on 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vitronectin-coated PCL scaffolds and stained with ActinRed™ 555. Scale bars represent 100 μm .

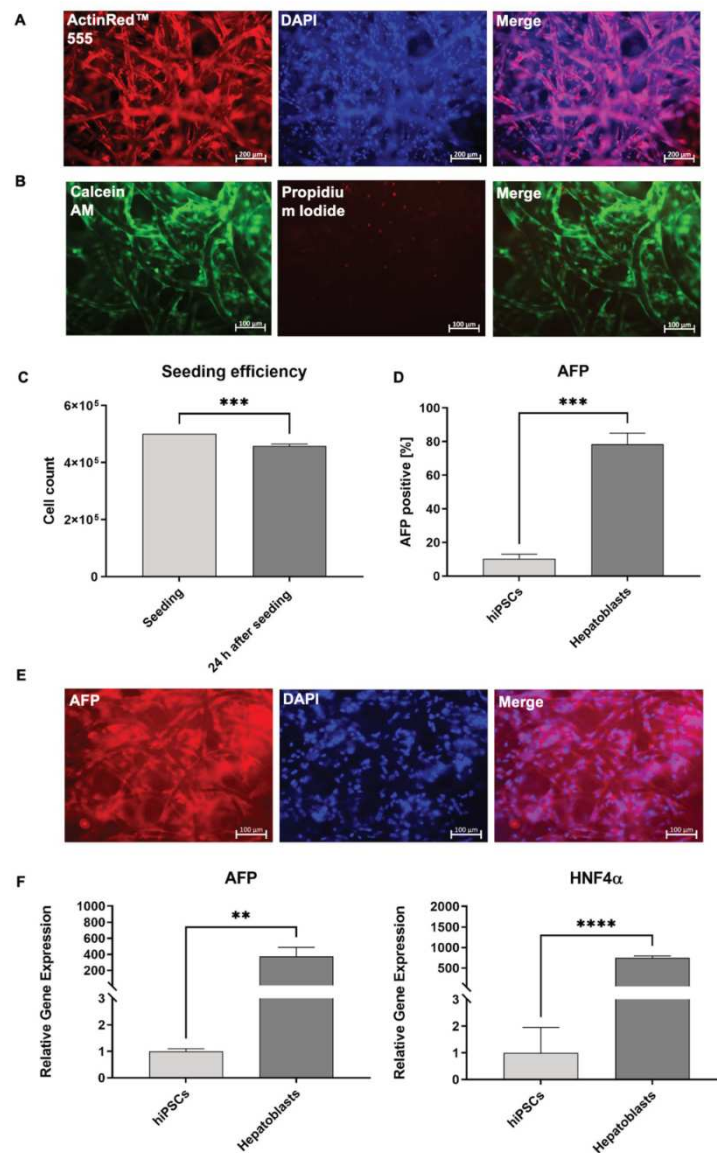


Figure 6. Analysis of hepatoblasts after the seeding on PCL scaffolds. (A) Analysis of the cell attachment and cell distribution within the scaffold using F-actin staining. (B) Live/dead staining of hepatoblasts, 24 h after seeding on PCL scaffolds. Scale bars represent 100 μ m. (C) Analysis of the seeding efficiency of hepatoblasts on PCL scaffolds 24 h after seeding of hepatoblasts on PCL scaffolds. (D) Flow cytometry analysis of AFP-expressing cells compared to the initial hiPSCs. (E) Representative immunofluorescence microscopy images of hepatoblasts, stained with AFP-specific antibodies. Scale bars represent 100 μ m. (F) Expression analysis of AFP and HNF4 α transcripts using qRT-PCR. mRNA levels were normalized to GAPDH, and the results are shown relative to hiPSCs. All results are presented as mean \pm SEM ($n = 3$). Statistical differences were identified with unpaired t-test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

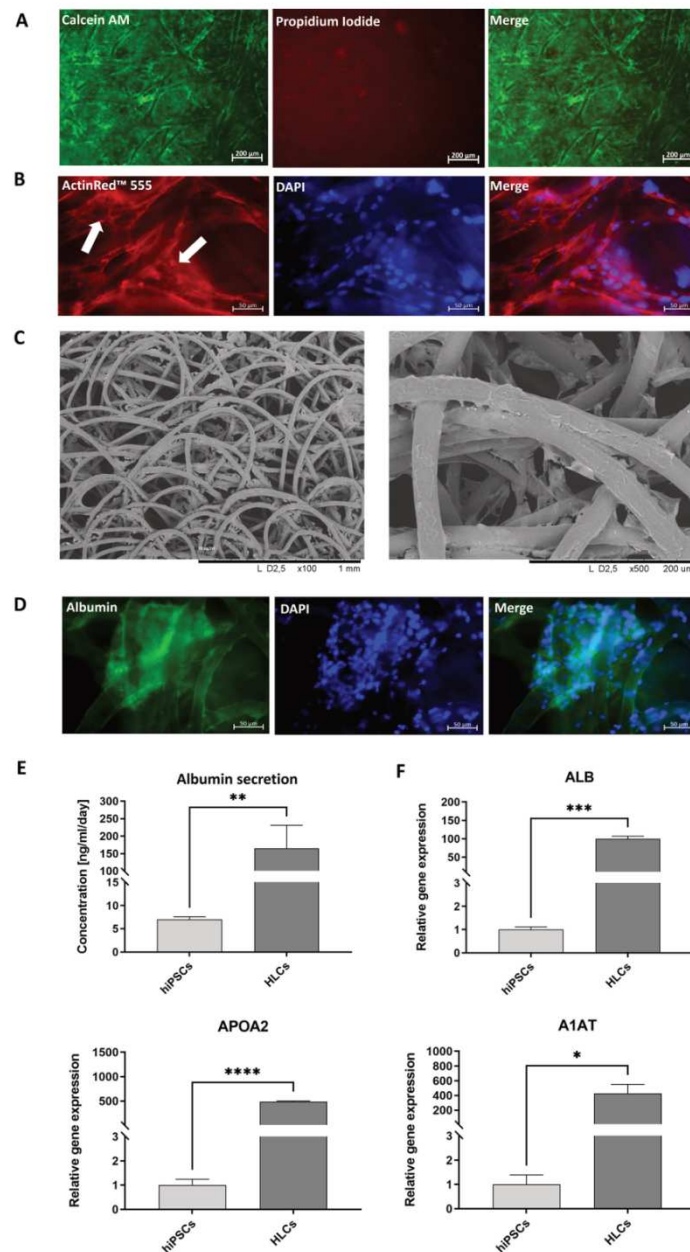


Figure 7. Analyses of PCL scaffolds after hepatic maturation and characterization of HLCs. (A) Live/dead staining of HLCs generated on PCL scaffolds. Scale bars represent 200 μm. (B) Analysis of the distribution and attachment of cells by F-actin staining. Cells attached to the scaffold and formed networks between the fibers (white arrows). Scale bars represent 50 μm. (C) Representative scanning electron microscopy (SEM) images of scaffolds containing hiPSC-derived HLCs. (D) Representative immunofluorescence microscopy images of HLCs stained with an albumin-specific antibody. Scale bars represent 50 μm. (E) Analysis of albumin secretion from generated HLCs compared with the initial hiPSCs using ELISA. Results are presented as mean + SEM (n = 5). Statistical differences were identified using unpaired t-test (**p < 0.01). (F) Expression analysis of ALB, APOA2, and A1AT transcripts by qRT-PCR. mRNA levels were normalized to GAPDH, and the results are shown relative to hiPSCs. Results are shown as mean + SEM (n = 3). Statistical differences were identified with unpaired t-test (*p < 0.05; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

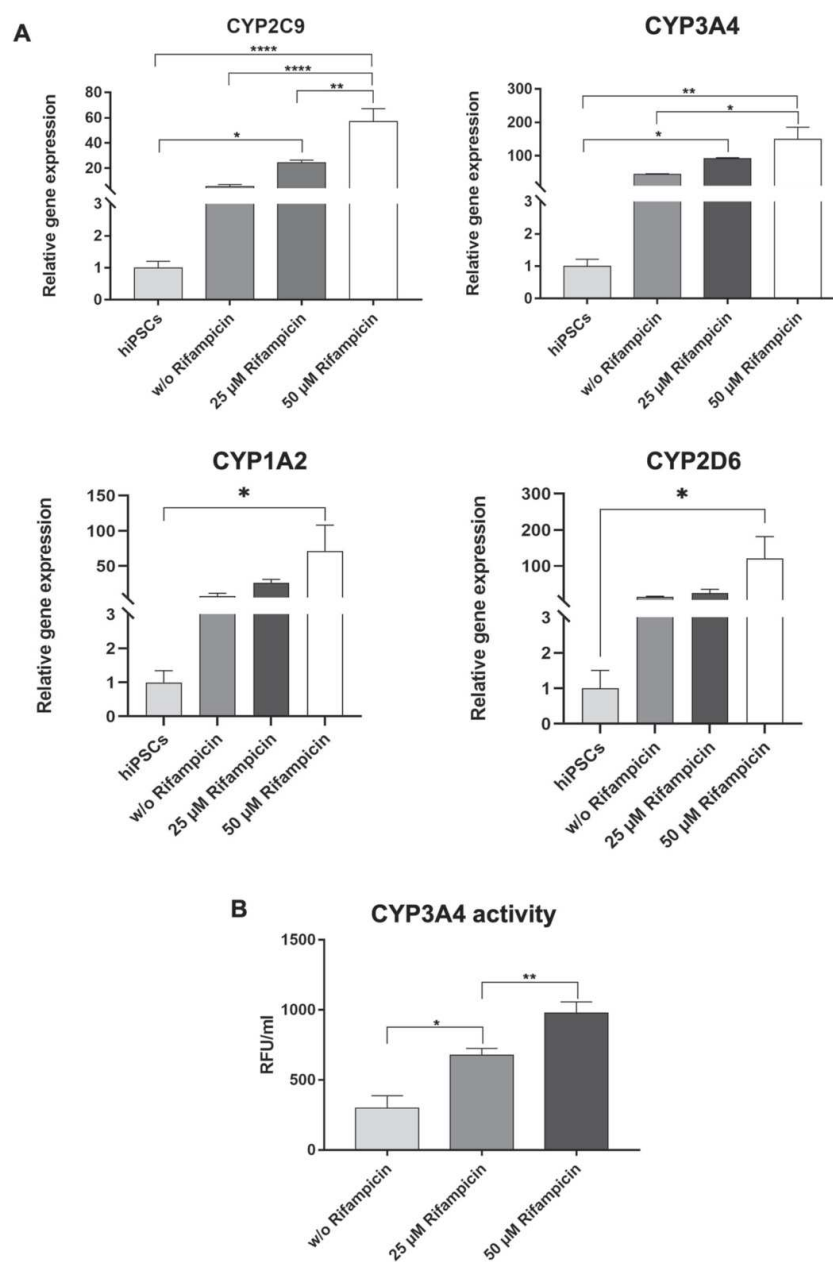


Figure 8. Metabolic activity of hiPSC-derived HLCs differentiated in PCL scaffolds. **(A)** Expression analysis of CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2, and CYP2D6 transcripts performing qRT-PCR. Expression levels were examined after stimulation with 25 μ M and 50 μ M rifampicin for 48 h and without rifampicin treatment. **(B)** Metabolic activity of hiPSC-derived HLCs in PCL scaffolds was determined by measuring the activity of cytochrome P450 CYP3A4. All results are presented as mean \pm SEM (n = 3). Statistical differences were identified with one-way ANOVA (*p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001).

lines, e.g. HepG2⁴⁰, also do not exhibit the natural functional properties of hepatocytes, such as CYP activities⁴¹. Furthermore, cancer cell lines are to some extent immature and have altered apoptotic behavior because of their tumorigenic origin, making them potentially resistant to toxicological influences and therefore inapplicable for drug screening systems⁴².

The established differentiation strategy also includes the selective elimination of undifferentiated hiPSCs by 1 h L-alanine treatment²⁵ after the completion of the endodermal differentiation stage. By using this simple, inexpensive, and safe elimination method, a purified endoderm population was obtained, which promoted further differentiation efficiency.

Studies showed that cells cultured in 3D models can improve liver-specific functions compared to two-dimensional (2D) cultures due to the in vivo-like conditions mimicked by 3D models⁴³. In particular, hepatic 3D models are a valuable in vitro tool for studying organogenesis, liver morphology and metabolism, but also for drug testing or cell-based assays. Thus, the development of scaffolds providing the 3D architecture to the liver cells and mimicking the extracellular matrix composition is also critical for the improvement of liver tissue engineering strategies.

PCL in particular is considered a tissue-compatible material that is also used as a biodegradable suture material⁴⁴. Due to its semi-crystalline and hydrophobic structure, it has a slow degradation rate (2–4 years)⁴⁵, making it suitable for long-term implants or for ex vivo biohybrid artificial liver systems⁴⁶. It has been reported that the degradation rate of PCL can vary depending on the processing form. For example, electrospun fibers have a shorter degradation period compared to bulk PCL as a consequence of a higher surface-to-volume ratio and reduced crystallinity caused by the electrospinning process⁴⁵. For liver tissue engineering applications, PCL can be used to enhance mechanical properties⁴⁷. For this study PCL scaffolds were used for an in vitro cultivation period of 14 days and no degradation has been observed. However, long-term experiments must be carried out to analyze the degradation time of the scaffolds under the described conditions.

In this study, porous 3D scaffolds were fabricated by melt-electrospun PCL. This technique results in a nonwoven scaffold made of a resorbable polymer to create a microenvironment for hepatic cells using additive manufacturing methods. Other advantages of melt electrospinning include the simple equipment, and no need for solvents. The fabricated porous scaffolds can be fully penetrated with cells, which leads to the formation of an extracellular matrix within the scaffold⁴⁸. This was found to be beneficial for the long-distance communication of cells⁴⁹. The results of our study demonstrated that seeded hepatoblasts were uniformly attached to the PCL fibers of the scaffolds and matured into HLCs, simulating a highly simplified liver microenvironment with the self-organization of the cells. Moreover, live/dead cell analysis revealed no negative influence of the PCL scaffolds on the cells. The cells could be provided with sufficient nutrients, even in the core of the scaffolds. The hepatoblasts successfully differentiated into HLCs and exhibited hepatocyte-specific markers and functions and uniformly covered the fiber surfaces.

It has been shown that during the formation and self-assembly of artificial tissue structures, biological processes similar to those in vivo occur and help to mimic the morphological structure of native tissue⁵⁰. In the field of liver tissue engineering, a wide variety of approaches exists to mimic the native liver microenvironment, including decellularized liver scaffolds⁷, 3D bioprinted hydrogels⁸, fiber-based 3D scaffolds⁹, or freeze-dried scaffolds^{51,52}. Especially, parameters such as porosity, material and chemical properties, or scaffold architecture influence cell functions and behavior⁵³. Due to their ability to mimic the in vivo microenvironment very close to nature, decellularized liver scaffolds have been frequently used for tissue engineering strategies⁵⁴. Unfortunately, this method includes enzymatic, chemical, or physical processes to get rid of the original liver cells, to obtain a low-immunogenic scaffold⁵⁴. Moreover, repopulated decellularized liver scaffolds often lack an intact vascular network, and bear the risk of post-transplant hemorrhage and thrombosis. But also general aspects like species⁵⁵ or the length of scaffold preservation or storage⁵⁶ complicate the application of decellularized scaffolds. Therefore, the generation and application of artificial scaffolds can help to overcome these challenges.

Despite the exceptional self-organizing behavior of hepatocytes in 3D environments, it remains a challenge to reproduce the complexity of the in vivo hepatic architectures, such as microvasculature, or hepatic lobules within microtissues⁵⁷. Moreover, 3D liver tissue models including multiple cell types can further increase hepatic functions, due to their physiological interaction. However, it remains difficult to select the appropriate media and cell ratio for the co-cultivation of liver-specific cell types within one model⁵⁸. These challenges as well as the stability and viability of the obtained hepatocytes in the scaffolds will be studied in detail over an extended time in a follow-up study.

Conclusion

In summary, 3D biohybrid constructs were created by combining HLCs derived from patient-specific footprint-free hiPSCs and 3D melt-electrospun PCL scaffolds. The established hepatic differentiation procedure allowed the efficient and reproducible generation of HLCs from footprint-free hiPSCs in vitro. In addition, biocompatible 3D scaffolds were fabricated by melt-electrospinning of PCL, which could be uniformly populated with the generated hiPSC-derived hepatoblasts from the established in vitro differentiation procedure. Subsequent differentiation resulted in HLCs that expressed hepatocyte-specific markers and exhibited characteristic functions. In the future, these biohybrid 3D constructs could be used for ex vivo liver tissue engineering applications, disease modeling, drug testing and development. They may also represent a step towards the development of an extracorporeal hybrid bioartificial liver for the treatment of liver failure. Moreover, patient-specific footprint-free hiPSC-derived HLCs represent a promising cell source for the regeneration of the liver.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 19 December 2022; Accepted: 4 December 2023

Published online: 13 December 2023

References

- Lee, M. K. *et al.* A bio-inspired, microchanneled hydrogel with controlled spacing of cell adhesion ligands regulates 3D spatial organization of cells and tissue. *Biomaterials* **58**, 26–34 (2015).
- Fedeli, U. *et al.* Mortality from chronic liver disease: Recent trends and impact of the COVID-19 pandemic. *World J. Gastroenterol.* **29**(26), 4166–4173 (2023).
- Mirdamadi, E. S. *et al.* Liver tissue engineering as an emerging alternative for liver disease treatment. *Tissue Eng. Part B Rev.* **26**(2), 145–163 (2020).
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E. & Klip, A. The cell biology of systemic insulin function. *J. Cell Biol.* **217**(7), 2273–2289 (2018).
- Hu, C. & Li, L. In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration. *Protein Cell* **6**(8), 562–574 (2015).
- Wu, Q. *et al.* Ectopic expansion and vascularization of engineered hepatic tissue based on heparinized acellular liver matrix and mesenchymal stromal cell spheroids. *Acta Biomater.* **137**, 79–91 (2022).
- Grant, R. *et al.* Blended electrospinning with human liver extracellular matrix for engineering new hepatic microenvironments. *Sci. Rep.* **9**(1), 6293 (2019).
- You, S. *et al.* Nanoscale 3D printing of hydrogels for cellular tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* **6**(15), 2187–2197 (2018).
- Hosseini, V. *et al.* Current progress in hepatic tissue regeneration by tissue engineering. *J. Transl. Med.* **17**(1), 383 (2019).
- Bhatia, S. N. *et al.* Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci. Transl. Med.* **6**(245), 245r2 (2014).
- Gao, Y. & Callanan, A. Influence of surface topography on PCL electrospun scaffolds for liver tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* **9**(38), 8081–8093 (2021).
- Malikmammadov, E. *et al.* PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **29**(7–9), 863–893 (2018).
- Osorio, L. A., Silva, E. & Mackay, R. E. A review of biomaterials and scaffold fabrication for organ-on-a-chip (OOAC) systems. *Bioengineering (Basel)* **8**(8) (2021).
- Wang, K. *et al.* Enhanced vascularization in hybrid PCL/gelatin fibrous scaffolds with sustained release of VEGF. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 865076 (2015).
- Vasudevan, A. *et al.* Evolution of electrospinning in liver tissue engineering. *Biomimetics (Basel)* **7**(4) (2022).
- Reid, J. A. *et al.* Architected fibrous scaffolds for engineering anisotropic tissues. *Biofabrication* **13**(4) (2021).
- Wang, T. *et al.* Nanoporous fibers of type-I collagen coated poly(L-lactic acid) for enhancing primary hepatocyte growth and function. *J. Mater. Chem. B* **1**(3), 339–346 (2013).
- Terrell, J. A. *et al.* From cells-on-a-chip to organs-on-a-chip: Scaffolding materials for 3D cell culture in microfluidics. *J. Mater. Chem. B* **8**(31), 6667–6685 (2020).
- Slivac, I. *et al.* Bioactivity comparison of electrospun PCL mats and liver extracellular matrix as scaffolds for HepG2 cells. *Polymers (Basel)* **13**(2) (2021).
- Dalton, P. D. *et al.* Electrospinning and additive manufacturing: Converging technologies. *Biomater. Sci.* **1**(2), 171–185 (2013).
- Grosshaus, C. *et al.* Melt electrospinning of nanofibers from medical-grade poly(epsilon-caprolactone) with a modified nozzle. *Small* **16**(44), e2003471 (2020).
- Wu, S. M. & Hochedlinger, K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat. Cell Biol.* **13**(5), 497–505 (2011).
- Steinle, H. *et al.* Reprogramming of urine-derived renal epithelial cells into iPSCs using srRNA and consecutive differentiation into beating cardiomyocytes. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **17**, 907–921 (2019).
- Steinle, H. *et al.* Generation of iPSCs by nonintegrative RNA-based reprogramming techniques: benefits of self-replicating RNA versus synthetic mRNA. *Stem Cells Int.* **2019** (2019).
- Nagashima, T. *et al.* Selective elimination of human induced pluripotent stem cells using medium with high concentration of L-alanine. *Sci. Rep.* **8**(1), 12427 (2018).
- Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* **13**, 134 (2012).
- Kibbe, W. A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**(Web Server issue), W43–46 (2007).
- Asrani, S. K. *et al.* Burden of liver diseases in the world. *J. Hepatol.* **70**(1), 151–171 (2019).
- Huang, C. S. *et al.* Generation of high quality of hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells with Parp1 but lacking c-Myc. *J. Chin. Med. Assoc.* **81**(10), 871–877 (2018).
- Raab, S. *et al.* A comparative view on human somatic cell sources for iPSC generation. *Stem Cells Int.* **2014**, 768391 (2014).
- Nowrouzi, A. *et al.* Retroviral vectors: Post entry events and genomic alterations. *Viruses* **3**(5), 429–455 (2011).
- Kaji, K. *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**(7239), 771–775 (2009).
- Warren, L. *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**(5), 618–630 (2010).
- Stadtfeld, M. *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**(5903), 945–949 (2008).
- Steinle, H. *et al.* Concise review: Application of in vitro transcribed messenger RNA for cellular engineering and reprogramming: Progress and challenges. *Stem Cells* **35**(1), 68–79 (2017).
- Yoshioka, N. *et al.* Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell* **13**(2), 246–254 (2013).
- Umrath, F. *et al.* Generation of iPSCs from Jaw Periosteal Cells Using Self-Replicating RNA. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(7) (2019).
- Katsuda, T. *et al.* Generation of human hepatic progenitor cells with regenerative and metabolic capacities from primary hepatocytes. *Elife* **8** (2019).
- Shulman, M. & Nahmias, Y. Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. *Methods Mol. Biol.* **945**, 287–302 (2013).
- Zeilinger, K. *et al.* Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **241**(15), 1684–1698 (2016).
- Satoh, D. *et al.* Establishment of a novel hepatocyte model that expresses four cytochrome P450 genes stably via mammalian-derived artificial chromosome for pharmacokinetics and toxicity studies. *PLoS One* **12**(10), e0187072 (2017).
- Corbett, J. L. & Duncan, S. A. iPSC-derived hepatocytes as a platform for disease modeling and drug discovery. *Front. Med. (Lausanne)* **6**, 265 (2019).
- Cox, C. R. *et al.* Current perspective: 3D spheroid models utilizing human-based cells for investigating metabolism-dependent drug-induced liver injury. *Front. Med. Technol.* **2**, 611913 (2020).
- Ye, S. *et al.* Hydrogels for liver tissue engineering. *Bioengineering (Basel)* **6**(3) (2019).

45. Dias, J.R. *et al.* Electrospun polycaprolactone (PCL) degradation: An in vitro and in vivo study. *Polymers (Basel)* **14**(16) (2022).
46. Perez, R.A., Jung, C.R. & Kim, H.W. Biomaterials and culture technologies for regenerative therapy of liver tissue. *Adv. Healthc. Mater.* **6**(2) (2017).
47. Lee, J. W. *et al.* Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering. *Biofabrication* **8**(1), 015007 (2016).
48. Farrugia, B. L. *et al.* Dermal fibroblast infiltration of poly(epsilon-caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning in a direct writing mode. *Biofabrication* **5**(2), 025001 (2013).
49. Huang, G. *et al.* Functional and biomimetic materials for engineering of the three-dimensional cell microenvironment. *Chem. Rev.* **117**(20), 12764–12850 (2017).
50. Athanasiou, K. A. *et al.* Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **15**, 115–136 (2013).
51. Jiang, Z. *et al.* Construction of chitosan scaffolds with controllable microchannel for tissue engineering and regenerative medicine. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **126**, 112178 (2021).
52. Xiao, Y. *et al.* Hepatocyte culture on 3D porous scaffolds of PCL/PMCL. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **173**, 185–193 (2019).
53. Loh, Q. L. & Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Eng. Part B Rev.* **19**(6), 485–502 (2013).
54. Zhang, X. *et al.* Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact. Mater.* **10**, 15–31 (2022).
55. Balestrini, J. L. *et al.* Comparative biology of decellularized lung matrix: Implications of species mismatch in regenerative medicine. *Biomaterials* **102**, 220–230 (2016).
56. Fakoya, A. O. J., Otohinoi, D. A. & Yusuf, J. Current trends in biomaterial utilization for cardiopulmonary system regeneration. *Stem Cells Int.* **2018**, 3123961 (2018).
57. Huang, D. *et al.* Engineering liver microtissues for disease modeling and regenerative medicine. *Adv. Funct. Mater.* **30**(44) (2020).
58. Ma, X. *et al.* Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**(8), 2206–2211 (2016).

Author contributions

J.W.: Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing—original draft. C.L.: Methodology, Validation, Investigation, Data curation. C.L.: Methodology, Validation. M.W.: Methodology, Validation. M.A.: Methodology, Validation. C.S.: Writing—review & editing, Resources. H.-P.W.: Writing—review & editing, Resources. M.D.: Writing—review & editing, Resources. M.A.-A.: Conceptualization, Project administration, Supervision, Writing—original draft, Writing—review & editing, Resources.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49117-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A.-A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

7.3.3 Publikation III

Development of an In Vitro Blood Vessel Model Using Autologous Endothelial Cells Generated from Footprint-Free hiPSCs to Analyze Interactions of the Endothelium with Blood Cell Components and Vascular Implants

Article

Development of an In Vitro Blood Vessel Model Using Autologous Endothelial Cells Generated from Footprint-Free hiPSCs to Analyze Interactions of the Endothelium with Blood Cell Components and Vascular Implants

Josefin Weber, Marbod Weber , Adrian Feile, Christian Schlensak and Meltem Avci-Adali * 

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tuebingen, Calwerstraße 7/1, 72076 Tuebingen, Germany

* Correspondence: meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de

Abstract: Cardiovascular diseases are the leading cause of death globally. Vascular implants, such as stents, are required to treat arterial stenosis or dilatation. The development of innovative stent materials and coatings, as well as novel preclinical testing strategies, is needed to improve the bio- and hemocompatibility of current stents. In this study, a blood vessel-like polydimethylsiloxane (PDMS) model was established to analyze the interaction of an endothelium with vascular implants, as well as blood-derived cells, in vitro. Using footprint-free human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and subsequent differentiation, functional endothelial cells (ECs) expressing specific markers were generated and used to endothelialize an artificial PDMS lumen. The established model was used to demonstrate the interaction of the created endothelium with blood-derived immune cells, which also allowed for real-time imaging. In addition, a stent was inserted into the endothelialized lumen to analyze the surface endothelialization of stents. In the future, this blood vessel-like model could serve as an in vitro platform to test the influence of vascular implants and coatings on endothelialization and to analyze the interaction of the endothelium with blood cell components.

Keywords: human induced pluripotent stem cells (hiPSCs); endothelial cells (ECs); tissue engineering; in vitro model; vascular implants; regenerative medicine



Citation: Weber, J.; Weber, M.; Feile, A.; Schlensak, C.; Avci-Adali, M. Development of an In Vitro Blood Vessel Model Using Autologous Endothelial Cells Generated from Footprint-Free hiPSCs to Analyze Interactions of the Endothelium with Blood Cell Components and Vascular Implants. *Cells* **2023**, *12*, 1217. <https://doi.org/10.3390/cells12091217>

Academic Editors: Agnes Klar and Yang Lin

Received: 20 February 2023

Revised: 18 April 2023

Accepted: 20 April 2023

Published: 22 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cardiovascular diseases are a group of disorders of the heart and blood vessels and the leading cause of death worldwide [1], claiming an estimated 17.9 million lives each year. In particular, an alteration in the functionality of the vascular endothelium, a monolayer of endothelial cells (ECs) lining blood vessels, is a key mediator in the development of cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and hypertension [2]. The endothelium is responsible for transporting oxygen, nutrients, hormones, and immune cells to the various tissues of the body and for removing waste products from tissues [3]. It is in close contact with the blood and prevents thrombosis and leukocyte adhesion under healthy conditions. It responds to cytokines or bacteria by upregulating the genes involved in inflammation [4] and regulates fluid and solute transport and vascular tone. Patients with occluded, narrowed, or aneurysmal vessels require treatment with vascular implants, such as stents [5].

However, the treatment of stenosed arteries using stents leads to vascular endothelial injury at the treatment site and initiates a complex cascade of inflammatory processes that may lead to the development of in-stent restenosis (ISR). At the site of injury, the release of pro-inflammatory factors, such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), and interleukin-1 (IL-1), mediate the adhesion and aggregation of inflammatory cells [6]. Inflammation can stimulate the proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth

muscle cells (SMCs) in the vessel wall, which in turn may lead to ISR of the stented vessel. In addition, both the damaged endothelium and the implanted foreign material (stent) are susceptible to the activation of coagulation and platelets, leading to the deposition of platelets and fibrin, which may result in thrombus formation.

Drug-eluting stents (DES) are commonly used to prevent restenosis by inhibiting SMC proliferation [7]. Although the beneficial effects of DES reduce inflammation and restenosis, the adverse effects delay re-endothelialization and impair endothelial function [8], preventing an essential step towards successful vessel repair [9]. Therefore, novel stent materials, designs, and coatings are needed to improve the endothelialization of blood-contacting implant surfaces [10].

The development of these novel vascular stents and coatings requires innovative *in vitro* models, to evaluate their bio- and hemocompatibility, as well as their effects on endothelialization, so that their biocompatibility and hemocompatibility can be continuously improved. To date, computer simulations [11] or idealized vascular models without cells have often been used to test vascular implants [12].

In this study, a blood vessel-like PDMS model was established to investigate the interaction of the endothelium with blood-derived immune cells and vascular implants. To obtain autologous ECs, footprint-free human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) were generated from adult human urine-derived renal epithelial cells (RECs) using self-replicating mRNA (srRNA), and a protocol was established to differentiate them into hiPSC-derived ECs (hiPSC-ECs) within 6 days. These cells were then used to create an endothelium in a polydimethylsiloxane (PDMS)-based blood vessel-like model and to analyze the interaction with immune cells and implanted stents.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

Renal epithelial cells were isolated from the urine of adult healthy donors, who gave their written informed consent to participate. The study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Tuebingen (911/2018BO2). The blood sampling procedure was also approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Tuebingen (287/2020BO2), and all the subjects gave their written informed consent. All the experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Since no living animals were used in this study, ethical approval for animal testing was not required.

2.2. Cultivation of hiPSCs Derived from Human Renal Epithelial Cells (RECs)

Footprint-free hiPSCs were generated by reprogramming RECs isolated from 100–200 mL of urine from healthy human donors using VEE-OXSiM-GFP srRNA encoding OCT4, KLF4, SOX2, cMYC, and GFP. Transfection and reprogramming were performed according to our recent study [13]. The obtained hiPSCs were cultivated in T25 culture flasks coated with 5 µg/mL of vitronectin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using an E8 stem cell medium (Essential 8, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37 °C with 5% CO₂. After reaching 70% confluence, the hiPSCs were passaged at a 1:10 split ratio or seeded in vitronectin-coated 12-well plates for endothelial differentiation. After detachment, the hiPSCs were resuspended in an E8 medium containing 10 µM of ROCK inhibitor Y-27632 (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland). The medium was changed after 24 h to an E8 medium without the ROCK inhibitor and daily medium changes were performed. The hiPSCs were cultivated at 37 °C and 5% CO₂.

2.3. Differentiation of hiPSCs Towards ECs

For the initial endothelial differentiation, 4×10^4 hiPSCs (passage 10–25) were seeded in 12-well plates, pre-coated with 0.5 mL of vitronectin (5 µg/mL) per well (day-3) and cultivated in an E8 medium at 37 °C and 5% CO₂. The E8 medium was changed daily (1 mL/well). To initiate the differentiation (day 0), the E8 medium was exchanged to an

endothelial medium 1 containing an RPMI-1640 medium (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 1% NEAA (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 25 ng/mL of BMP4 (PeproTech, Cranbury Township, NJ, USA), and 5 μ M of CHIR99021 (PeproTech, Cranbury Township, NJ, USA). The next day, the medium was replaced with a fresh medium (1.5 mL/well). After 2 days, the medium was exchanged for an endothelial medium 2 containing a DMEM/F12 medium (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 50 ng/mL of VEGF-A (PeproTech, Cranbury Township, NJ, USA), 1% B27 supplement, 1% NEAA (both from Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 2 μ M of forskolin (Abcam, Cambridge, UK). The medium was changed every other day (2 mL/well) until the completion of the differentiation on day 6.

2.4. Separation of CD31⁺ Cells after Endothelial Differentiation

At the end of the endothelial differentiation (day 6), the hiPSC-ECs were selected by magnetic cell sorting using a CD31 magnetic micro-bead kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the hiPSC-ECs were washed with 1 mL DPBS and detached using TrypLE (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cells were then centrifuged at 300 \times *g* for 3 min and resuspended in 60 μ L of the endothelial medium 2. Additionally, 20 μ L of an FcR blocking reagent and 20 μ L of CD31 MicroBeads were added to the cells, which were further incubated for 15 min at 4 °C. Then, 1 mL of the endothelial medium 2 was added, and the cells were centrifuged again at 300 \times *g* for 3 min. The cell pellet was resuspended in 1 mL of the endothelial medium 2.

At the same time, a LS column was placed in the QuadroMACS separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and rinsed 3 \times with the endothelial medium 2. Afterwards, the cell solution was applied to the column and flushed 3 \times with the medium to remove unlabeled cells. Following this, the LS column was removed from the QuadroMACS separator and placed into a fresh 15 mL falcon tube. Subsequently, 5 mL of the endothelial cell growth medium-2 (EGM-2) BulletKit (Lonza Basel, Switzerland) was added to the column, and CD31⁺ cells were flushed out and subsequently transferred into a vitronectin-coated (5 μ g/mL) culture flask. The cells were cultivated in the EGM-2 medium supplemented with 10% human AB serum (Merck, Darmstadt, Germany).

2.5. Flow Cytometry

The cells were washed with 1 mL of DPBS, detached using TrypLE (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the reaction was stopped by adding TNS (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany). The cells were centrifuged at 600 \times *g* for 3 min. For intracellular staining, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature (RT) for 15 min. After washing with DPBS, the cells were suspended in a permeabilization buffer (DPBS containing 2% BSA and 0.2% Triton X-100), and fluorescently labeled antibodies were added at a concentration indicated by the manufacturer and incubated at RT for 45 min. For extracellular staining, the cells were resuspended in DPBS with 2% BSA, fluorescently labeled antibodies were added at a concentration indicated by the manufacturer, and the sample was incubated for 45 min at RT. The cells were then washed with DPBS containing 2% BSA or a permeabilization buffer, suspended in 500 μ L of 1 \times BD CellFIX solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), and measured using a BD FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). For the staining, a PE-labeled mouse anti-human CD144 (VE-cadherin) antibody (Clone: REA199, Art. No.: 130-118-495, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), PE-labeled anti-human CD31 REAfinity antibody (Clone: REA730, Art. No.: 130-110-669, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), PE-labeled anti-human CD66b REAfinity antibody (Clone: REA306, Art. No.: 130-122-966, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), FITC-labeled mouse anti-human CD34 antibody (Clone: AC136, Art. No.: 130-113-740, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and PE-labeled mouse anti-human CD62E (E-selectin) antibody

(Clone: P2H3, Art. No.: 12-0627-42, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were applied.

2.6. Immunocytochemistry

The cells differentiated in the 12-well plates were washed 2× with 1 mL of DPBS and fixed for 15 min at RT with 4% PFA. After washing with 0.5 mL of DPBS, the cells were blocked for 1 h at RT in DPBS containing 4% BSA. For intracellular staining, the cells were incubated for 1 h at RT in a permeabilization buffer with fluorescently labeled antibodies at concentrations indicated by the manufacturer. For extracellular staining, the cells were incubated in DPBS containing 2% BSA and fluorescently labeled antibodies. After incubation, the cells were washed 3× with a permeabilization buffer or washing buffer (DPBS containing 2% BSA) and then 1× with DPBS. Subsequently, the cells were mounted using a Fluoroshield mounting medium with DAPI (Abcam, Cambridge, UK). The following antibodies were used: PE-labeled mouse anti-human CD144 (VE-cadherin, Clone: REA199, Art. No.: 130-118-495, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) antibody (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA), PE-labeled anti-human CD31 REAfinity antibody (Clone: REA730, Art. No.: 130-110-669, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), PE-labeled anti-human CD66b REAfinity antibody (Clone: REA306, Art. No.: 130-122-966, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), FITC-labeled mouse anti-human CD34 antibody (Clone: AC136, Art. No.: 130-113-740, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and PE-labeled mouse anti-human CD62E (E-selectin) antibody (Clone: P2H3, Art. No.: 12-0627-42, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Fluorescence images were acquired using an Axiovert 135 microscope and AxioVision 4.8.2 software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

2.7. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

The RNA was isolated using the Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Munich, Germany), and 300 ng of RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the iScript kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The primers (Table 1) for the specific amplification of the transcripts were ordered from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) and used at a final concentration of 300 nM. Real-time qRT-PCR reactions were performed using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The expression of the constitutively expressed gene GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) served as an internal control for the amount of RNA input. The primers were designed by using the Primer-Blast tool from NCBI (accessed on 7 January 2020) [14]. Melting temperatures and self-complementarities were checked using the Oligonucleotide Properties Calculator from Northwestern University Medical School (accessed on 7 January 2020) [15].

2.8. Tube Formation Assay

The wells of a 48-well plate were coated with 150 µL of Matrigel (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) and incubated at 37 °C for 15 min to solidify the gel. Then, 1.2×10^5 hiPSC-ECs (day 12 after starting the differentiation) were seeded and after 4 h of incubation at 37 °C with 5% CO₂, images of the cells were acquired with the Axiovert 135M phase contrast microscope (Carl-Zeiss, Jena, Germany) using the phase contrast microscope.

2.9. TNF-α Stimulation of hiPSC-ECs

The hiPSC-ECs were detached on days 12–18 after starting the endothelial differentiation and 3×10^5 cells were seeded per well of a 12-well plate coated with 0.5 mL of vitronectin (5 µg/mL). The cells were incubated overnight in the EGM-2 medium at 37 °C with 5% CO₂. The next day, the medium was changed to the EGM-2 medium without or with 50 ng/mL of TNF-α. After 4 h, the expression of CD62E, ICAM-1, and VCAM-1 was analyzed via flow cytometry, fluorescence microscopy, and qRT-PCR.

Table 1. List of primer sequences used for the qRT-PCR analysis.

Gene	Forward Primer 5'–3'	Reverse Primer 5'–3'
CD31	GAACGGAAGGCTCCCTTGA	AGGGCAGGTTCAATAAAGTGC
CD34	GATTGCACTGGTCACCTCGG	TCCGTGTAATAAGGGTCTTCGC
CD62E	GCCCAGAGCCTTCAGTGATACC	GGAATGGCTGCACCTCACAG
GAPDH	TCAACAGCGACACCCACTCC	TGAGGTCCACCACCTGTTG
ICAM-1	CTTGAGGGCACCTACTCTGTGTC	CGGCTGTACCACAGTGATG
Lin28	CTTCTTCTCCGAACCAACC	CAGCCACCTGCAAACCTG
Nanog	TGAACCTCAGTACAAACAG	TGGTGGTAGGAGAGTAAAG
Oct4	AGCGAACCAAGTATCGAGAAC	TTACAGAACCACACTCGGAC
Sox2	AGCTACAGCATGATGCAGGA	GGTCATGGAGTTGTACTGCA
VEGFR2	TCACAATTCCAAAAGTGATCGG	GGTCACTAACAGAAGCAATAAATGG
VCAM-1	ACACTTTATGTCAATGTTGCCCC	GAGGCTGTAGTCCCCGTTAG

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; Lin28: Lin-28 homolog A; Nanog: homeobox protein NANOG; Oct4: octamer-binding transcription factor 4; Sox2: SRY-box transcription factor 2; VEGFR2: vascular endothelial growth factor 2 receptor; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1.

2.10. Cultivation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

HUVECs (passage 2–5) (Promocell, Heidelberg, Germany) were seeded in T75 cell culture flasks coated with 0.1% gelatin and cultivated at 37 °C with 5% CO₂ in the Vasculife® EnGS EC culture medium (CellSystems, Troisdorf, Germany) containing the Vasculife EnGS LifeFactors Kit (Lifeline Cell Technology, Frederick, MD, USA), 50 mg/mL of gentamicin, and 0.05 mg/mL of amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The medium was changed every 3 days. After reaching 80% confluency, the cells were detached using trypsin/EDTA (0.04%/0.03%, PromoCell, Heidelberg, Germany).

2.11. Isolation of Granulocytes

Human whole blood was collected from the antecubital vein of non-medicated healthy volunteers via venipuncture in monovettes preloaded with 1 IU/mL of sodium heparin (LEO Pharma Inc., Neu-Isenburg, Germany). A total of 13.3 mL of the anticoagulant blood was layered onto 18.7 mL of the Lymphoprep™ density gradient medium (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and then centrifuged at 340 × g for 45 min. Afterwards, all the separated components except the granulocytes and erythrocytes, were aspirated. The granulocyte layer was carefully extracted, washed with 15 mL DPBS and centrifuged at 340 × g for 15 min. This step was repeated once again. The remaining erythrocytes were then lysed using an erythrocyte lysis (EL) buffer from the QIAamp RNA Blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the granulocytes and erythrocytes were incubated on ice in the EL buffer for 30 min. The cells were then centrifuged at 4 °C and 400 × g for 10 min, the supernatant was aspirated, and the residual cells were washed once again with the EL buffer. This was followed by another centrifugation at 4 °C and 400 × g for 10 min resulting in isolated granulocytes.

2.12. Calcein AM Labeling of the Isolated Granulocytes

For fluorescence labeling, the granulocytes were incubated in 1 mL of RPMI-1640 medium (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 250 ng/mL of calcein AM (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 15 min at 37 °C. Afterwards, the granulocytes were washed twice with DPBS.

2.13. Static Interaction of Granulocytes with TNF- α Stimulated hiPSC-ECs

The 3.5×10^5 hiPSC-ECs were seeded per well of a 12-well plate coated with vitronectin ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated in the EGM-2 medium at 37°C and $5\% \text{CO}_2$ for 24 h. Then, the medium was changed to an EGM-2 medium containing $50 \text{ ng}/\text{mL}$ TNF- α , and the cells were incubated for 4 h at 37°C with $5\% \text{CO}_2$. Afterwards, the EGM-2 medium was removed and the hiPSC-ECs were incubated with 1×10^5 fluorescently labeled granulocytes for 10 min at 37°C and $5\% \text{CO}_2$. Subsequently, the non-adherent granulocytes were aspirated and the cell layer was washed with 1 mL DPBS. Fluorescence images were then acquired on five pre-defined spots in the well using an Axiovert 135 microscope and AxioVision 4.8.2 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). The attached cells were counted using ImageJ software.

2.14. Fabrication of a Blood Vessel-Like Structure Embedded in Polydimethylsiloxane (PDMS)

To fabricate a blood vessel-like structure, a histological embedding mold ($25 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$, EXACT, Norderstedt, Germany) was pierced with a sterile 20 G needle ($\varnothing 0.9 \text{ mm}$) and 3 mL of SYLGARD[®]184 (Dow, Midland, MI, USA) was filled into the embedding mold until the needle was fully covered. Therefore, the catalyst and elastomer were mixed in a ratio of 1:10 and subsequently centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min to remove air bubbles. To cure the PDMS, the priced mold was incubated for 60 min at 60°C . The needle was then removed from the embedding mold and the PDMS model containing a blood vessel-like structure was peeled out of the embedding mold (see results).

2.15. Population of the Blood Vessel-Like Structure with hiPSC-ECs and Perfusion

Before use, the PDMS model was incubated with 70% EtOH for 1 h at RT and then rinsed $2 \times$ with the DPBS. Then, the blood vessel-like structure was coated with $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ of vitronectin for 45 min at RT. Following this, 1×10^5 hiPSC-ECs were seeded in the EGM-2 medium and incubated for 30 min at 37°C with $5\% \text{CO}_2$. Then, the construct was rotated 180° and incubated again for 30 min. This procedure was repeated two more times to completely populate the lumen of the PDMS model. In the last rotation step, the model was rotated to its initial position and incubated for 24 h at 37°C with $5\% \text{CO}_2$. Subsequently, the ability of hiPSC-ECs to stably line the lumen of the PDMS model under physiological shear forces was investigated. Therefore, a perfusion pump system was designed that contained a medium reservoir connected to a $0.25 \mu\text{m}$ filter (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to allow sterile oxygenation. After seeding with hiPSC-ECs, using a pump (Ismatec SA, Opfikon, Switzerland), the lumen of the PDMS model was perfused with $2.3 \text{ mL}/\text{min}$ EGM-2 medium, corresponding to a flow rate of $5 \text{ dyne}/\text{cm}^2$. The setup was run with 25 mL of the EGM-2 medium for 24 h at 37°C and $5\% \text{CO}_2$. After perfusion, the PDMS model lined with hiPSC-ECs was fixed with 4% PFA and subsequently stained with a DAPI and PE-labeled mouse anti-human CD144 (VE-cadherin) antibody. Afterwards, representative images of the PDMS model were acquired first without cutting the model to obtain an overview of the endothelialization of the lumen. Subsequently, the PDMS model was cut manually into 1 mm-thick sections and analyzed via fluorescence microscopy to obtain detailed images.

2.16. Dynamic Interaction of Granulocytes with TNF- α Stimulated Endothelium in the PDMS Blood Vessel Model

To analyze the interaction of immune cells (granulocytes) with hiPSC-ECs, 1×10^5 Ecs were seeded into the vitronectin-coated ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) lumen of the PDMS blood vessel model as described above and incubated overnight at 37°C and $5\% \text{CO}_2$. The next day, the Ecs were incubated in the EGM-2 medium without or with $50 \text{ ng}/\text{mL}$ TNF- α at 37°C and $5\% \text{CO}_2$ for 4 h. Then, 1×10^5 calcein AM labeled granulocytes per ml were perfused with a flow rate of $150 \mu\text{L}/\text{min}$ for 10 min over the Ecs, corresponding to a shear stress of $0.4 \text{ dyne}/\text{cm}^2$. Afterwards, fluorescence images were acquired on five pre-defined spots in the PDMS blood vessel model using an Axiovert 135 microscope and AxioVision 4.8.2

software (Carl Zeiss, Jena, Germany). The attached cells were then counted using ImageJ software (v.153f51 NIH, Bethesda, MD, USA).

2.17. Analysis of Stent Endothelialization in the PDMS Blood Vessel Model

To investigate the endothelialization of blood-contacting implants, stents were inserted into the lumen of the PDMS blood vessel model with a diameter of 3.5 mm and a length of 25 mm. The PDMS model was first coated with vitronectin (10 µg/mL), populated with 3.5×10^5 ECs as described above, and incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂. Self-expanding nitinol stents (Derivo 3.5 × 15 mm, Acandis GmbH, Pforzheim, Germany) with or without vitronectin (10 µg/mL) coating were then inserted under the sterile bench into the lumen of the endothelialized PDMS model. Afterwards, the PDMS model containing the stent was filled up with the medium and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂.

To analyze the endothelialization of the surface, the lumen with the stent was fixed with 4% PFA and the cells were stained with DAPI and ActinRed. The samples were analyzed via fluorescence microscopy. Furthermore, to prepare thin sections with the cutting and grinding method, the samples were dehydrated in ascending ethanol series (50%, 70%, 80%, 96%, and 100%). The samples were then infiltrated with an ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and Technovit 7200 (Morphisto GmbH, Offenbach, Germany) mixture in a ratio of 1:1 for 24 h at 4 °C and then with pure Technovit 7200 at 4 °C for 24 h. Then, curing by light was performed in an EXAKT 520 light chamber (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Germany) for 10 h under white light and 10 h under blue light. The polymerized blocks containing the stents were bonded to plastic slides (Resolab GmbH, Bad Oeynhausen, Germany) with Technovit 7210 by curing with blue light for 10 min using the EXAKT 402 precision adhesive press. Subsequently, the diamond band saw EXAKT 300/310 was used to obtain sections of 50–100 µm. To further reduce the thickness, the specimens were ground and polished using the EXAKT 400CS grinding system.

2.18. Statistical Analyses

Data are shown as mean ± standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). Paired *t*-test or one-way ANOVA for repeated measurements followed by Bonferroni's multiple comparison test were performed to compare means. Two-tailed statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Differentiation of Footprint-Free Generated hiPSCs into ECs

After reprogramming the adult somatic RECs into hiPSCs, the obtained cells were seeded into vitronectin-coated wells of a 12-well plate to induce endothelial differentiation. A 6-day protocol was established using a cocktail of small molecules and growth factors, followed by the separation of CD31⁺ cells and the further cultivation of these cells (Figure 1A). After 2 days of differentiation, hiPSC colonies were induced towards the ECs and transformed into a dense cell layer. Over the next 4 days, the cells developed tube-like structures (Figure 1B). The fluorescence microscopy analysis on day 6 of the differentiation (before the separation) proved the presence of CD31-expressing cells, especially in dense cell clusters of the tube-like structures (Figure 1C). Moreover, the qRT-PCR analysis revealed a significant decrease in stem cell marker expression (Nanog, Oct4, Sox2) in the hiPSC-ECs compared with the initial hiPSCs (Figure 1D). To purify the differentiated ECs, a CD31⁺ cell separation was performed on day 6 of the differentiation. Before the separation, $38.5 \pm 6.5\%$ of cells were CD31-positive (Figure 1E). After the separation, a significant increase of CD31-expressing cells ($96.9 \pm 0.49\%$) compared to the control confirmed the successful separation of CD31-positive cells. The purified CD31⁺ ECs were applied for subsequent experiments.

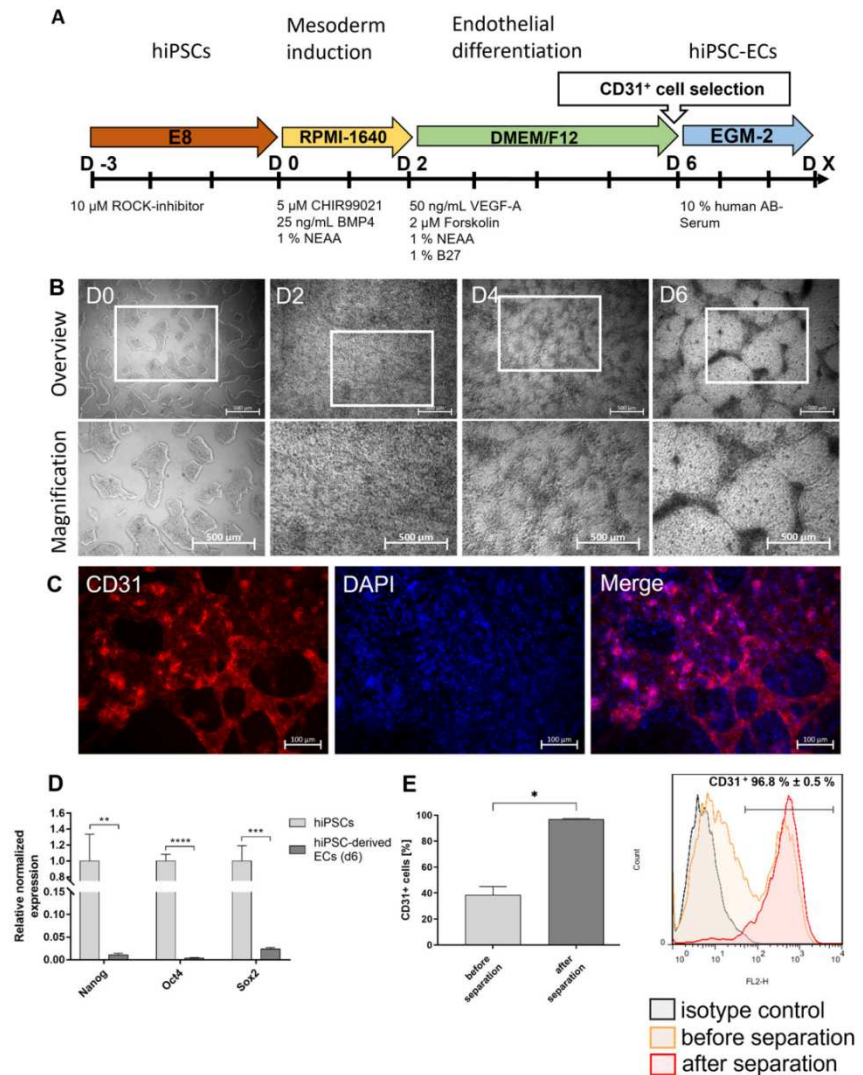


Figure 1. Differentiation of hiPSCs into endothelial cells (ECs). (A) Timeline of the protocol for the differentiation of human renal epithelial cells (RECs)-derived hiPSCs into ECs and (B) morphological overview and magnification of the cells at different stages cultivated in vitronectin-coated 12-well plates. Scale bars represent 500 μ m. (C) Representative immunocytochemistry images of ECs stained with a PE-labeled CD31-specific antibody on day 6 of the differentiation (before separation). Scale bars represent 100 μ m. (D) Expression analysis of stem cell-specific characteristics using qRT-PCR. The mRNA levels were normalized to GAPDH, and the results are presented relative to the expression levels in hiPSCs. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using one-way ANOVA. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). (E) Flow cytometric analysis of CD31-expressing cells before and directly after the selection of CD31⁺ cells. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using paired t -test (* $p < 0.05$).

3.2. Characterization of hiPSC-ECs

After the completion of endothelial differentiation and the separation of CD31⁺ cells at day 6 of the differentiation, the purified ECs were further cultivated until day 20 and compared with HUVECs. At day 8 (2 days after the CD31⁺ cell separation) and 12 of the differentiation, the ECs derived from hiPSCs showed a comparable cell morphology to HUVECs (Figure 2A). In addition, a qRT-PCR analysis was performed after the CD31⁺ cell separation on days 6, 12, and 20 of the differentiation to detect EC-specific markers (Figure 2B). A strong expression of CD31 was detected on day 6 of the differentiation, directly after the separation of CD31⁺ cells. The expression levels of CD31 on days 12 and 20 were comparable to the expression levels in HUVECs. The expression of CD34 and VEGFR2 decreased significantly between days 6 and 12, but the expression levels on days 12 and 20 were similar to those of HUVECs. In general, the expression levels of EC-specific markers were significantly increased compared to the initial hiPSCs. The expression of CD31 and CD34 was confirmed by the immunostaining of hiPSC-ECs on days 8 and 12 of the differentiation (Figure 2C). A reduction in CD34 expression was also detected on day 12 of the differentiation compared with the expression on day 8. Furthermore, Figure S1 shows the immunostaining of hiPSC-ECs at days 6 (before the separation) and 10 with CD144 and VEGFR2. Moreover, the flow cytometry analysis demonstrated the significantly upregulated expression of the EC-specific markers, CD31, CD34, and VE-cadherin (CD144), compared with the initial hiPSCs (Figure 2D). The constant expression levels of CD31 and CD144 and a significant reduction in CD34-expressing cells between day 6 and day 20 were detected.

3.3. Functional Analyses of hiPSC-Derived ECs

EC-specific functions were analyzed on day 12 after the start of endothelial differentiation. One of the most commonly used *in vitro* assays to model the reorganization phase of angiogenesis is the tube formation assay. The assay measures the ability of endothelial cells, plated in subconfluent density with the appropriate extracellular matrix, to form capillary-like structures (also called tubes). *In vitro*, the formation of tube-like structures was observed 4 h after the seeding of cells on matrigel (Figure 3A). Additionally, hiPSC-ECs were stimulated with 50 ng/mL of TNF- α to investigate the response to a pro-inflammatory stimulus and the TNF- α stimulation resulted in the increased expression of ICAM-1, VCAM-1, and CD62E compared with unstimulated ECs (Figure 3B). Moreover, a flow cytometric analysis demonstrated significantly higher numbers of CD62E-expressing cells after the stimulation with TNF- α (Figure 3C) compared to the control group. The expression of CD62E on stimulated hiPSC-ECs was also detected via fluorescence microscopy (Figure 3D). In addition, the ability of TNF- α -stimulated hiPSC-ECs to interact with immune cells was analyzed. Therefore, granulocytes were isolated from human whole blood and evaluated (Figure S3), and then incubated with hiPSC-ECs under static conditions. Significantly higher numbers of granulocytes were attached to stimulated hiPSC-ECs than to unstimulated ones (Figure 3E,F).

3.4. Fabrication of a Blood Vessel-Like PDMS Model and Analysis of Endothelialization with hiPSC-ECs

To create a transparent endothelialized vascular structure, a PDMS model was fabricated using a histological embedding mold that was punctured with a 20G needle and filled with PDMS (Figure 4A). This PDMS model (Figure 4B) was connected to a circular system with a rotary pump and a medium reservoir (Figure 4C). Then, 1×10^5 hiPSC-ECs were seeded into the lumen of the PDMS model and analyzed 24 h after seeding. The staining of the cells with a VE-cadherin-specific antibody showed the formation of a confluent endothelial layer with a characteristic EC morphology in the lumen of the model (Figure 4D). This endothelial layer remained intact after 24 h of perfusion at a physiological flow rate of 5 dyne/cm² (Figure 4E). The images of cross-sections showed that the entire lumen of the model was covered with ECs (Figure 4F).

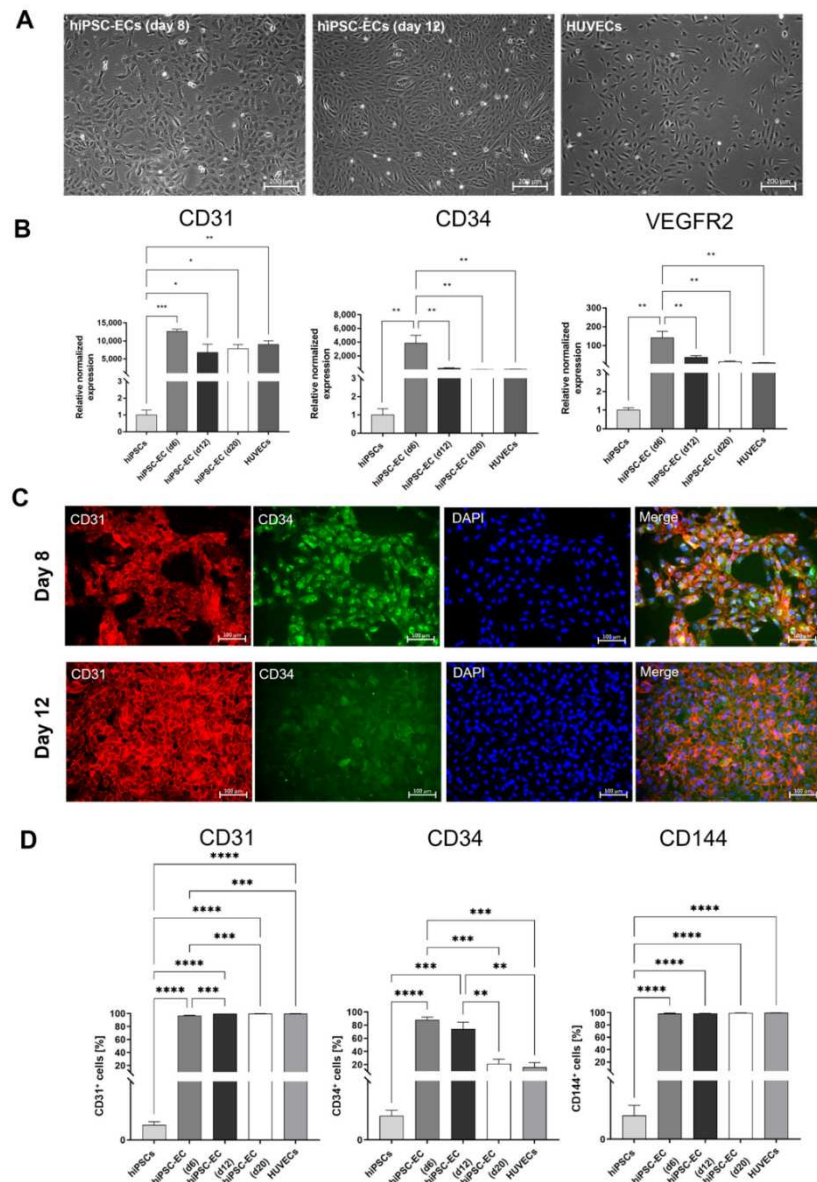


Figure 2. Characterization of ECs derived from hiPSCs. (A) Microscopic images of endothelial cells (ECs) on days 8 and 12 of the differentiation, compared with HUVECs, cultivated in vitronectin-coated 12-well plates. Scale bars of phase contrast microscopy images represent 200 μm . (B) Expression analysis of CD31, CD34, and VEGFR2 transcripts by qRT-PCR at different time points of the differentiation. The mRNA levels were normalized to the GAPDH mRNA levels, and the results are presented relative to the expression levels in hiPSCs. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using one-way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). (C) Representative immunocytochemistry images of hiPSC-derived ECs stained with PE-labeled CD31- or FITC-labeled CD34-specific antibodies on days 8 and 12 of the differentiation. Scale

bars represent 100 μm . Samples were fixed, processed, and imaged identically. (D) Flow cytometric analysis of CD31-, CD34, and VE-cadherin (CD144)-expressing cells on days 6, 12, and 20 of the differentiation. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using one-way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

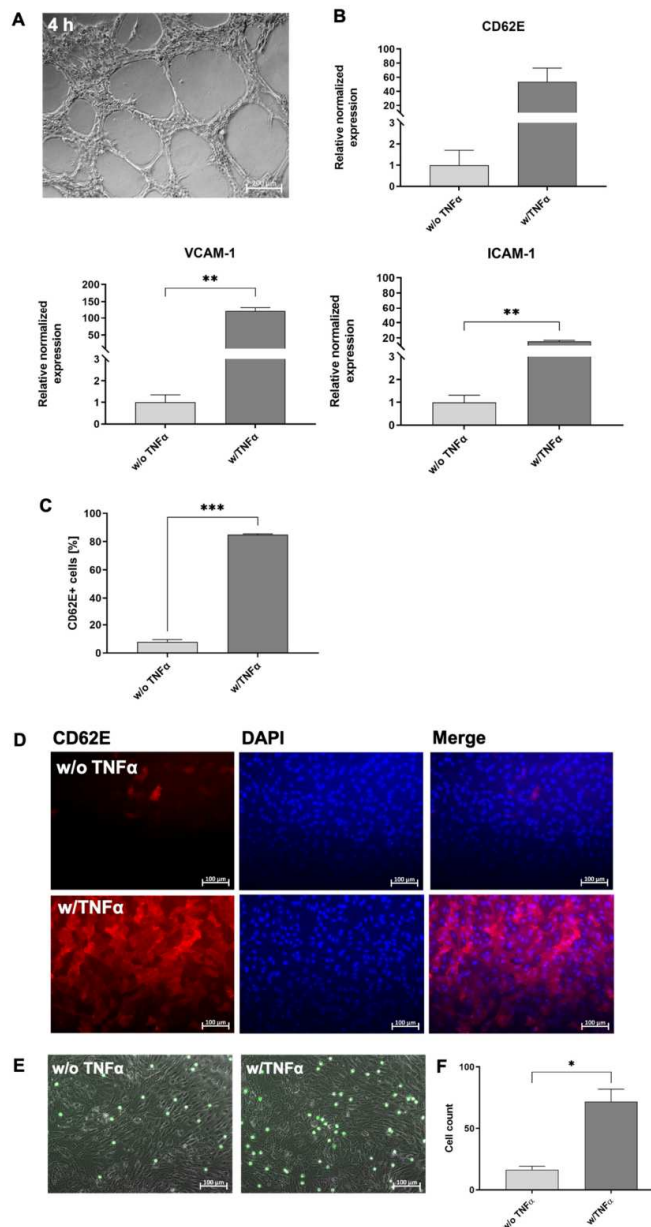


Figure 3. Functional analyses of hiPSCs-derived ECs (hiPSC-ECs) at day 12 of cultivation. (A) hiPSC-ECs formed tube-like structures when seeded on matrigel. Scale bars represent 200 μm . (B) Expression analysis of CD62E, ICAM-1, and VCAM-1 transcripts using qRT-PCR in unstimulated and TNF- α -stimulated hiPSC-ECs differentiated in vitronectin-coated 12-well plates. The mRNA levels were normalized to

GAPDH mRNA levels, and the results are presented relative to the expression levels in hiPSCs. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using the paired t -test (** $p < 0.01$). (C) Flow cytometric analysis of CD62E-expressing hiPSC-ECs without and with 50 ng/mL of TNF- α stimulation differentiated in vitronectin-coated 12-well plates. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using paired t -test (** $p < 0.01$). (D) Representative immunocytochemistry images of hiPSC-ECs differentiated in vitronectin-coated 12-well plates without or with subsequent TNF- α stimulation and staining with a PE-labeled CD62E-specific antibody. Scale bars represent 100 μm . Samples were fixed, processed, and imaged identically. (E) Interaction of granulocytes (calcein AM: green) with unstimulated and TNF- α -stimulated hiPSC-ECs under static conditions. (F) Numbers of attached granulocytes to unstimulated and TNF- α -stimulated hiPSC-ECs under static conditions. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using the paired t -test (* $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

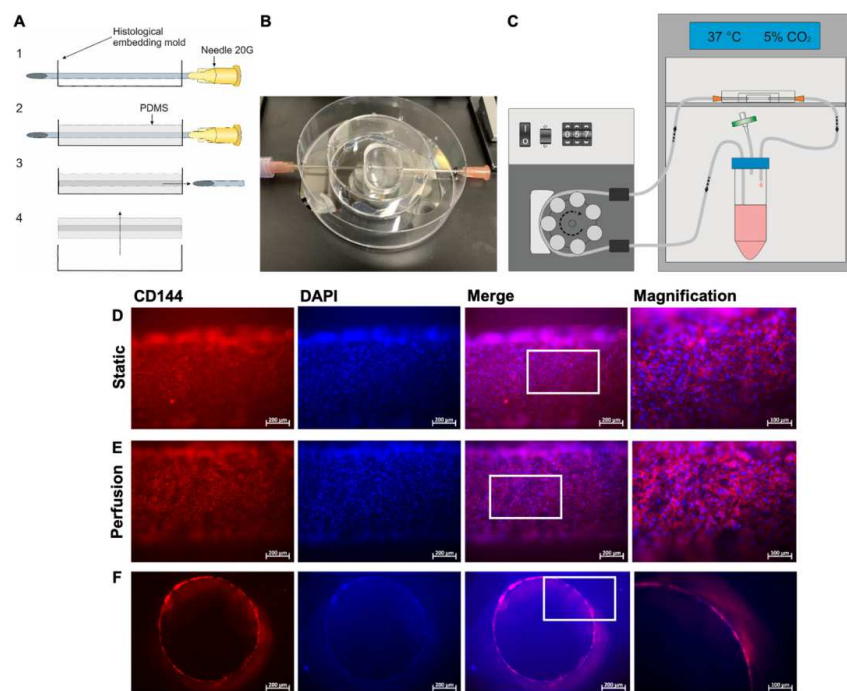


Figure 4. Preparation of the blood vessel-like PDMS model and colonization with hiPSC-derived ECs (hiPSC-ECs). (A) The PDMS model was fabricated using a histological embedding mold that was penetrated with a sterile 20G needle (1), filled up with PDMS until the needle was completely covered, and cured at 60 °C (2). Afterwards, the needle was removed (3) and the PDMS model was peeled out of the mold (4). (B) Representative image of a PDMS model prepared for connection to a perfusion system. (C) Schematic design of the experimental setup of the perfusion system. The system was placed in an incubator. (D) Representative immunocytochemistry images of hiPSC-ECs stained with a PE-labeled VE-cadherin-specific antibody and DAPI 24 h after seeding in the PDMS model. Representative images were acquired at different spots of the PDMS model without cutting the model. (E) hiPSC-ECs were seeded into the lumen of the PDMS model and cultivated for 24 h under perfusion at a flow rate of 2.3 mL/min, corresponding to a shear stress of 5 dyne/cm². Representative immunocytochemistry images of hiPSC-ECs stained with a PE-labeled VE-cadherin-specific antibody and DAPI are shown. Representative images were acquired at different points of the PDMS model without

cutting the model. (F) Representative immunocytochemistry images of ActinRed (red) and DAPI (blue) stained cross sections of the lumen of the PDMS model populated with hiPSC-ECs after 24 h of perfusion with a flow rate of 2.3 mL/min and a shear stress of 5 dyne/cm². The cross-sections were generated by cutting the PDMS model manually into 1 mm thick slices. The area of the enlarged image is highlighted by the white box. Scale bars represent 100 μ m or 200 μ m.

3.5. Analysis of the Interaction of Immune Cells with the Generated Endothelium in the Blood Vessel-Like PDMS Model

To evaluate the applicability of the designed model for the analysis of the interaction with immune cells, 1×10^5 hiPSC-ECs (from day 12 of the differentiation) were seeded into the lumen of the PDMS model. To mimic an inflammation, the endothelium was stimulated for 4 h with 50 ng/mL of TNF- α . After washing with DPBS, the lumen was perfused with calcein AM-labeled granulocytes (1×10^5 /mL) at a flow rate of 150 μ L/min for 10 min. Directly afterwards images were acquired in the PDMS model to evaluate the attachment behavior (Figure 5). After 10 min, a significantly increased attachment of granulocytes to the inflamed endothelium was observed (Figure 5B) compared to the unstimulated endothelium (Figure 5A). After 10 min of perfusion, a significantly increased number of granulocytes was detected on the inflamed endothelium (Figure 5C). Images and recorded time points were also acquired after 2, 4, 6, and 8 min of perfusion in Supplementary Figure S4 and Supplementary Time Point Videos S1 and S2.

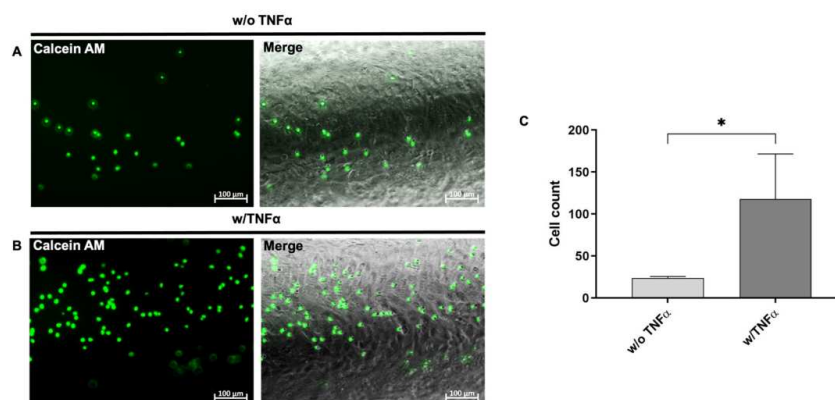


Figure 5. Analysis of the interaction of immune cells with the generated endothelium in the blood vessel-like PDMS model. 1×10^5 calcein AM-labeled granulocytes per ml were perfused with a flow rate of 150 μ L/min for 10 min over the ECs, corresponding to a shear stress of 0.4 dyne/cm². Images were acquired after 10 min of perfusion in the PDMS model. (A) Representative image of the interaction of calcein AM (green)-labeled granulocytes with unstimulated and (B) TNF- α -stimulated hiPSC-ECs in the PDMS model after 10 min of perfusion. (C) Numbers of attached granulocytes to unstimulated and TNF- α -stimulated hiPSC-ECs. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$). Statistical differences were determined using the paired t -test ($* p < 0.05$).

3.6. Evaluation of the Stent Endothelialization

The endothelialization of blood-contacting implant surfaces is of great importance, since the coverage of the implant surface significantly influences the patency of the blood vessel, for example after the implantation of a stent. Thus, to evaluate the applicability of the designed model for the analysis of the interaction of the stent material with the ECs lining the blood vessel after the implantation, the diameter of the lumen of the PDMS model was increased to 3.5 mm and endothelialized with hiPSC-ECs. Vitronectin-coated and uncoated nitinol stents were implanted into the endothelialized lumen of the PDMS model. After 24 h, the cells were stained with ActinRed, and the fluorescence microscopy

analysis revealed an increased migration and attachment of hiPSC-ECs and lining of the surface of the vitronectin-coated stent (Figure 6B). Uncoated stents (negative control) only rested on the dense EC-monolayer; however, the cells showed no tendency to overgrow the stent struts (Figure 6A). These results could be confirmed by generating thin sections of the implanted stents using the cutting-grinding technique (Figure 6C). Uncoated stents exhibited less endothelialization, whereas stents coated with vitronectin were much more densely endothelialized.

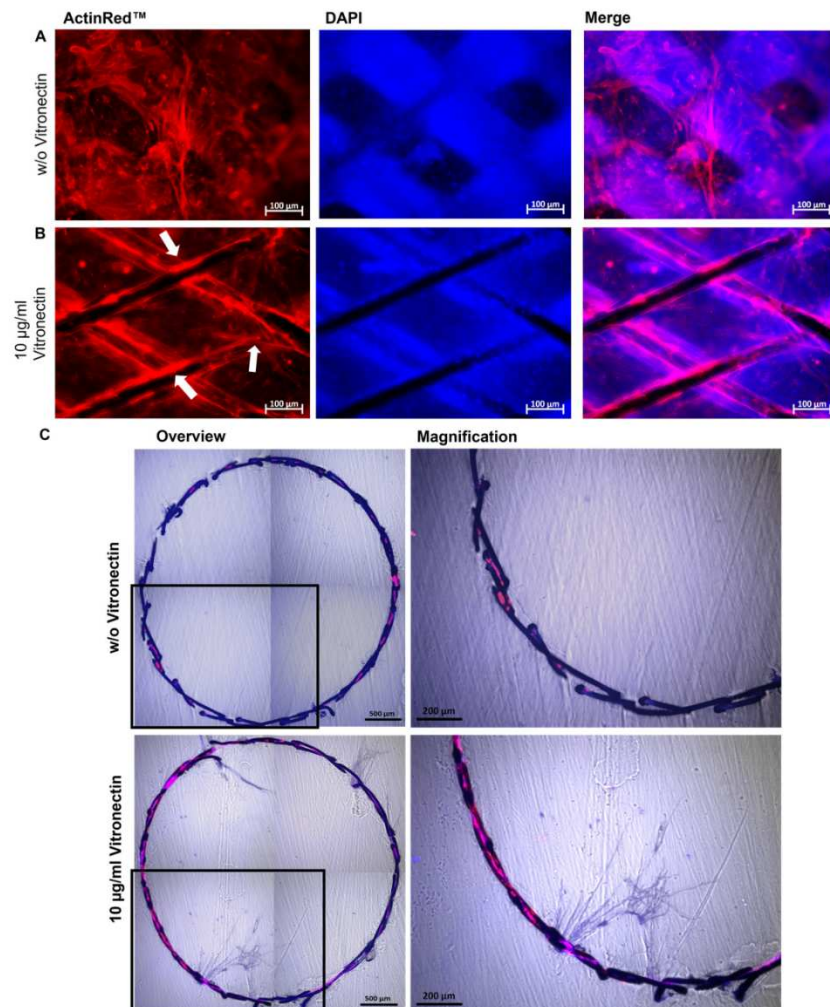


Figure 6. Analysis of the endothelialization of vascular stents in the blood vessel-like PDMS model. Representative immunocytochemistry images of hiPSC-ECs stained with ActinRed 24 h after the implantation of (A) an uncoated or (B) vitronectin (10 µg/mL)-coated stent into the PDMS model. Endothelialized stent struts within the PDMS model are indicated with white arrows. (C) Representative immunocytochemistry images of stents after applying the cutting-grinding technique: overviews (composition of four single images) and magnified sections. The hiPSC-ECs on the stent surface were stained 24 h after the implantation of an uncoated and vitronectin-coated stent into the PDMS model

with ActinRed and embedded in Technovit 7200. Using a diamond band saw and grinding, 50–100 μm thick crosssections were generated. Images of the stents were composed of four single images. Scale bars represent 100 or 500 μm . ($n = 3$).

4. Discussion

The insertion of implants into blood vessels results in injury to the endothelium accompanied by an inflammatory reaction and the activation of coagulation and platelets. This leads to a risk of re-stenosis in the area of stent implantation due to the proliferation of SMCs and the activation of coagulation. Although DES can inhibit the proliferation of SMCs and reduce restenosis, this is associated with delayed healing. The absence of an endothelium on the implant material also poses the risk of artificial surface recognition and late stent thrombosis. Therefore, the development of new coatings and materials is needed to improve the compatibility of current stents. In addition to the development of new materials and coatings, their preclinical testing also plays an important role in finding the most suitable material and coating for treatment. In this study, a blood vessel-like model was developed using a PDMS material and ECs derived from hiPSCs to create a blood vessel-like in vitro model for the in vitro evaluation of the endothelialization of inserted stents and the interaction of ECs with blood-derived cells, such as immune cells.

Various strategies have been developed to fabricate in vitro vascular models, including electrospun constructs [16], 3D-printed polymeric [17] or decellularized scaffolds [18], and hydrogel-based approaches [19]. The elastomeric polymer PDMS has several interesting properties for biomedical applications, such as chemical stability, gas permeability, good mechanical properties, biocompatibility, excellent optical transparency, and ease of fabrication by molding [20,21]. Therefore, this material was used in this study to create blood vessel-like structures for endothelialization. In particular, its transparency allowed for microscopy without destroying the material and allowed for the real-time monitoring of cell adhesion as well as the visualization of cells under static and flow conditions. The created PDMS model also allowed for a controlled and easily adjustable environment for the endothelialization and implantation of a stent into an endothelialized lumen and a subsequent analysis by fluorescence microscopy and histology using thin sections obtained by the cutting and grinding method. To create a more in vivo blood vessel-mimicking model with the complex structure of a vessel, it is planned to additionally integrate SMCs and fibroblasts in a follow-up study.

To obtain adult autologous human ECs, a vascular biopsy is often required, which is an invasive procedure with a limited number of ECs obtained. HUVECs are the most widely used cell type for in vitro EC research [22,23]. However, despite their benefits, HUVECs are not patient-specific and are also limited in terms of their proliferation [24]. To obtain adult ECs in sufficient numbers, ECs derived from hiPSCs are particularly valuable, since these cells offer a nearly unlimited source for generating donor-specific ECs [25]. In this study, easily accessible urine-derived RECs were used to be reprogrammed by srRNA into hiPSCs [13]. The use of self-replicating mRNA allows for a less time-consuming, faster, and more efficient reprogramming of cells compared to reprogramming with synthetic mRNA [26]. Subsequently, a differentiation method was established to obtain autologous ECs. To increase the efficiency of the differentiation, forskolin was used since it can strongly increase the concentration of the second messenger cAMP in cells [27], which leads to the enhanced expression of VEGFR-2 [28].

An essential function of the vascular endothelium is to respond to injury and attract immune cells. Unfortunately, the stenting procedure induces extensive injury to the vascular endothelium, which may lead to complications, such as thrombogenicity, inflammation, and SMC hyperplasia [29,30], and eventually to implant failure [31]. Therefore, the stent design and material, as well as the interaction with the vascular endothelium are constantly being researched [32,33]. To date, computer simulations [11] or idealized vessel models without cells have often been applied to test vascular implants [12]. Moreover, stents have been exclusively seeded with ECs without a surrounding vessel-like structure [34], which

does not adequately mimic in vivo conditions. Thus, the vascular implants are tested in in vivo animal models such as pigs [35] or dogs [36], or ex vivo models such as rabbits [37]. These models are very costly, contribute to animal suffering, and have limited translatability to the human body. Using the established blood vessel-like model, animal testing could be reduced or avoided, and the use of human cells allows for better comparability with the human in vivo system. This model could also be used to analyze the development of diseases affecting the blood vessels and the influence of growth factors or therapeutics on disease development [38]. In particular, the combination of PDMS and patient-specific hiPSCs represents a step towards personalized treatment, making the artificial model even more realistic.

5. Conclusions

In summary, an in vitro PDMS-based model was established to generate a blood-vessel-like model for the analysis of the interaction of the endothelium with vascular implants, as well as blood cell components, such as immune cells. Using patient-specific, footprint-free hiPSCs and subsequent differentiation, ECs with specific markers and functions were obtained and used for the endothelialization of an artificial lumen. The established blood vessel-like model allows for real-time imaging of the interaction of the created endothelium with immune cells. Furthermore, a vascular stent could be implanted into the endothelialized lumen to analyze the endothelialization of implant surfaces. In the future, this blood vessel-like model could be used to test the influence of different vascular implants and coatings on endothelialization, as well as to analyze the interaction of the endothelium with blood cells, such as immune cells. Furthermore, the use of human models for pre-clinical analyses will improve the clinical translation of novel treatment strategies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12091217/s1>, Figure S1: Representative immunofluorescence microscopy images of hiPSC-ECs; Figure S2: Characterization of hiPSC-ECs; Figure S3: Characterization of isolated granulocytes from human blood; Figure S4: Interaction of fluorescently labeled granulocytes with hiPSC-ECs under flow conditions. Video S1: with TNF α ; Video S2: without TNF α .

Author Contributions: Conceptualization, M.A.-A.; methodology, A.F., J.W., and M.W.; validation, A.F., J.W., and M.W.; formal analysis, J.W.; investigation, A.F., J.W., and M.W.; resources, C.S. and M.A.-A.; data curation, A.F., J.W., and M.W.; writing—original draft preparation, J.W. and M.A.-A.; writing—review and editing, C.S. and M.A.-A.; visualization, J.W.; supervision, M.A.-A.; project administration, M.A.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We acknowledge support from the Open Access Publishing Fund of the University of Tübingen.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Tuebingen (911/2018BO2 (Date of approval 2018) and 287/2020BO2 (Date of approval 2020)).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The analyzed data sets generated during the study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Li, Z.; Lin, L.; Wu, H.; Yan, L.; Wang, H.; Yang, H.; Li, H. Global, Regional, and National Death, and Disability-Adjusted Life-Years (DALYs) for Cardiovascular Disease in 2017 and Trends and Risk Analysis From 1990 to 2017 Using the Global Burden of Disease Study and Implications for Prevention. *Front. Public Health* **2021**, *9*, 559751. [CrossRef]
2. Dogne, S.; Flamion, B.; Caron, N. Endothelial Glycocalyx as a Shield against Diabetic Vascular Complications: Involvement of Hyaluronan and Hyaluronidases. *Thromb. Vasc. Biol.* **2018**, *38*, 1427–1439. [CrossRef]
3. Kennedy, C.C.; Brown, E.E.; Abutaleb, N.O.; Truskey, G.A. Development and Application of Endothelial Cells Derived From Pluripotent Stem Cells in Microphysiological Systems Models. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 625016. [CrossRef] [PubMed]

4. Hosoya, T.; Maruyama, A.; Kang, M.I.; Kawatani, Y.; Shibata, T.; Uchida, K.; Itoh, K.; Yamamoto, M. Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27244–27250. [[CrossRef](#)]
5. Leal, B.B.J.; Wakabayashi, N.; Oyama, K.; Kamiya, H.; Braghirolli, D.L.; Pranke, P. Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts. *Front. Cardiovasc. Med.* **2020**, *7*, 592361. [[CrossRef](#)]
6. Hu, W.; Jiang, J. Hypersensitivity and in-stent restenosis in coronary stent materials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 1003322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Maisel, W.H.; Laskey, W.K. Cardiology patient page. Drug-eluting stents. *Circulation* **2007**, *115*, e426–e427. [[CrossRef](#)]
8. Inoue, T.; Croce, K.; Morooka, T.; Sakuma, M.; Node, K.; Simon, D.I. Vascular inflammation and repair: Implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovasc. Interv.* **2011**, *4*, 1057–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tang, R.; Chen, S.Y. Smooth muscle-specific drug targets for next-generation drug-eluting stent. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2014**, *12*, 21–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Avci-Adali, M.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization—A review of current strategies. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 119–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Samant, S.; Wu, W.; Zhao, S.; Khan, B.; Sharzehee, M.; Panagopoulos, A.; Makadia, J.; Mickley, T.; Bicek, A.; Boismier, D.; et al. Computational and experimental mechanical performance of a new everolimus-eluting stent purpose-built for left main interventions. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8728. [[CrossRef](#)]
12. Gijzen, F.J.; Migliavacca, F.; Schievano, S.; Socci, L.; Petrini, L.; Thury, A.; Wentzel, J.J.; Van Der Steen, A.F.; Serruys, P.W.; Dubini, G. Simulation of stent deployment in a realistic human coronary artery. *Biomed. Eng. Online* **2008**, *7*, 23. [[CrossRef](#)]
13. Steinle, H.; Weber, M.; Behring, A.; Mau-Holzmann, U.; von Ohle, C.; Popov, A.-F.; Schlensak, C.; Wendel, H.P.; Avci-Adali, M. Reprogramming of Urine-Derived Renal Epithelial Cells into iPSCs Using srRNA and Consecutive Differentiation into Beating Cardiomyocytes. *Mol. Ther.-Nucleic Acids* **2019**, *17*, 907–921. [[CrossRef](#)]
14. Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* **2012**, *13*, 134. [[CrossRef](#)]
15. Kibbe, W.A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W43–W46. [[CrossRef](#)]
16. Rickel, A.P.; Deng, X.; Engebretson, D.; Hong, Z. Electrospun nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2021**, *129*, 112373. [[CrossRef](#)]
17. Kyle, S.; Jessop, Z.M.; Al-Sabah, A.; Whitaker, I.S. 'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700264. [[CrossRef](#)]
18. Schaner, P.J.; Martin, N.; Tulenko, T.N.; Shapiro, I.M.; Tarola, N.A.; Leichter, R.F.; Carabasi, R.; DiMuzio, P.J. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J. Vasc. Surg.* **2004**, *40*, 146–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wang, Y.; Kankala, R.K.; Ou, C.; Chen, A.; Yang, Z. Advances in hydrogel-based vascularized tissues for tissue repair and drug screening. *Bioact. Mater.* **2022**, *9*, 198–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Miranda, I.; Souza, A.; Sousa, P.; Ribeiro, J.; Castanheira, E.M.S.; Lima, R.; Minas, G. Properties and applications of PDMS for biomedical engineering: A review. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *13*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Tanyeri, M.; Tay, S. Viable cell culture in PDMS-based microfluidic devices. In *Methods in Cell Biology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; Volume 148, pp. 3–33.
22. Lau, S.; Gossen, M.; Lendlein, A.; Jung, F. Venous and Arterial Endothelial Cells from Human Umbilical Cords: Potential Cell Sources for Cardiovascular Research. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 978. [[CrossRef](#)]
23. Majewska, A.; Wilkus, K.; Brodaczewska, K.; Kieda, C. Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-Dependent Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 520. [[CrossRef](#)]
24. Cerella, C.; Grandjette, C.; Dicato, M.; Diederich, M. Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 405–415. [[CrossRef](#)]
25. Williams, I.M.; Wu, J.C. Generation of Endothelial Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 1317–1329. [[CrossRef](#)]
26. Steinle, H.; Weber, M.; Behring, A.; Mau-Holzmann, U.; Schlensak, C.; Wendel, H.P.; Avci-Adali, M. Generation of iPSCs by Nonintegrative RNA-Based Reprogramming Techniques: Benefits of Self-Replicating RNA versus Synthetic mRNA. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 7641767. [[CrossRef](#)]
27. Seamon, K.B.; Padgett, W.; Daly, J.W. Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 3363–3367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yamamizu, K.; Kawasaki, K.; Katayama, S.; Watabe, T.; Yamashita, J.K. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. *Blood* **2009**, *114*, 3707–3716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Deanfield, J.E.; Halcox, J.P.; Rabelink, T.J. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* **2007**, *115*, 1285–1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Schwartz, B.G.; Economides, C.; Mayeda, G.S.; Burstein, S.; Kloner, R.A. The endothelial cell in health and disease: Its function, dysfunction, measurement and therapy. *Int. J. Impot. Res.* **2010**, *22*, 77–90. [[CrossRef](#)]
31. Zilla, P.; Bezuidenhout, D.; Human, P. Human, Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5009–5027. [[CrossRef](#)]

32. Antoniadis, A.P.; Mortier, P.; Kassab, G.; Dubini, G.; Foin, N.; Murasato, Y.; Giannopoulos, A.A.; Tu, S.; Iwasaki, K.; Hikichi, Y.; et al. Biomechanical Modeling to Improve Coronary Artery Bifurcation Stenting: Expert Review Document on Techniques and Clinical Implementation. *JACC Cardiovasc. Interv.* **2015**, *8*, 1281–1296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Genuardi, L.; Chatzizisis, Y.S.; Chiastra, C.; Sgueglia, G.; Samady, H.; Kassab, G.S.; Migliavacca, F.; Trani, C.; Burzotta, F. Local fluid dynamics in patients with bifurcated coronary lesions undergoing percutaneous coronary interventions. *Cardiol. J.* **2021**, *28*, 321–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chang, H.-K.; Kim, P.-H.; Kim, D.W.; Cho, H.-M.; Jeong, M.J.; Kim, D.H.; Jung, Y.K.; Lim, K.S.; Kim, H.B.; Lim, H.C.; et al. Coronary stents with inducible VEGF/HGF-secreting UCB-MSCs reduced restenosis and increased re-endothelialization in a swine model. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Diaz-Rodriguez, S.; Rasser, C.; Mesnier, J.; Chevallier, P.; Gallet, R.; Choqueux, C.; Even, G.; Sayah, N.; Chaubet, F.; Nicoletti, A.; et al. Coronary stent CD31-mimetic coating favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 1760–1769. [[CrossRef](#)]
36. Paul, A.; Elias, C.B.; Shum-Tim, D.; Prakash, S. Bioactive baculovirus nanohybrids for stent based rapid vascular re-endothelialization. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Larsen, K.; Cheng, C.; Tempel, D.; Parker, S.; Yazdani, S.; Dekker, W.K.D.; Houtgraaf, J.H.; De Jong, R.; Hoor, S.S.-T.; Ligtenberg, E.; et al. Capture of circulatory endothelial progenitor cells and accelerated re-endothelialization of a bio-engineered stent in human ex vivo shunt and rabbit denudation model. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 120–128. [[CrossRef](#)]
38. Ortega, M.A.; Saez, M.A.; Fraile-Martínez, O.; Asúnsolo, Á.; Pekarek, L.; Bravo, C.; Coca, S.; Sainz, F.; Álvarez-Mon, M.; Buján, J.; et al. Increased Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Placental Villi of Women with Chronic Venous Disease during Pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2487. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.