

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
an der Universität Tübingen

Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung des
Einflusses der Matrixsteifigkeit auf den
Hepatozyten - Metabolismus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Büringer, Karsten Robert

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. K. Nüssler
2. Berichterstatter: Professor Dr. N. Malek

Tag der Disputation: 01.03.2017

Für meine Großeltern,
Eltern, Geschwister und Hanna.

INHALTSVERZEICHNIS:

Abkürzungsverzeichnis:	1
1. Einleitung	2
Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Leber.....	2
Zellen der Leber und ihre Funktionen.....	4
Relevanz der ECM–Steifigkeit für die Hepatozyten.....	6
Lebererkrankungen und ihre Folgen – kurzer Überblick über die Leberfibrose und Leberzirrhose.....	7
Beschreibung der neuen Modelle und die damit verbundenen Ziele	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Materialien und Geräte	11
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Chemikalien	13
Primer	15
Immunfluoreszenz – Antikörper.....	16
2.1.3 Materialien	17
2.2 Kultivierungsmethoden	18
2.2.1 Herstellung und Beschichtung der Polyacrylamidgele	18
2.2.2 Herstellung des Collagen Sandwich und des Collagen Monolayer	20
2.3 Zellbiologische Methoden	21
2.3.1 Herstellung der Zellkulturmedien für HuH-7 Zellen, primäre Rattenhepatozyten und primäre humane Hepatozyten	22
2.3.2 Kultivierung von HuH-7 Zellen	22
Zellen auftauen.....	22
Zellen splitten	22
2.3.3 Aufarbeitung und Plattieren der verschiedenen Hepatozyten - Gewinnung und Isolation primärer Human- und Rattenhepatozyten	23
2.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Trypan-Blau-Methode	24
2.4 Proteinbiochemische Methoden	25
2.4.1 Messung von Glykolyse und Gluconeogenese	25
2.4.2 Messung des Harnstoffumsatzes (Urea)	26
2.4.3 Messung von Laktatdehydrogenase (LDH) und Aspartataminotransferase (AST)	28
2.4.4 Messung des Resazurinumsatzes (Alamar-Blau-Umsatz)	30
2.4.5 Messung der MDR-1 / MRP-1-Transporter Aktivität	30
2.4.6 Messung der Albumin Konzentration mit Hilfe des „Human Albumin - ELISA-Quantitation-Set“	32
2.5 Molekularbiologische Methoden	34
2.5.1 RNA-Isolierung aus primären humanen Hepatozyten	34
2.5.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	35
2.5.3 Agarosegelelektrophorese / RNA-Integrity-Check	35
2.5.4 c-DNA-Synthese	37
2.5.5 PCR des Housekeeping-Gens GAPDH und Cytochrom P 450	38
2.6 Immunfluoreszenz – Färbung zur Charakterisierung der Zellmorphologie	40
2.7 Statistische Auswertung der Versuche	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Literaturrecherche und Evaluation der Polyacrylamidgele mit Hilfe der Atomic-Force-Mikroskopie	43

3.2 Überprüfung der Zellkulturkompatibilität der Polyacrylamidgele anhand der HuH-7 Zelllinie.....	44
3.2.1 Messung der HuH-7 Viabilität auf den Polyacrylamidgelen.....	45
Laktatdehydrogenase-Aktivität	45
Aspartataminotransferase-Aktivität.....	46
3.2.2 Evaluierung der metabolischen Aktivität	47
Messung des Glukosemetabolismus.....	48
Messung des Harnstoffmetabolismus	49
3.2.3 Darstellung der HuH-7 Zellmorphologie.....	52
3.3 Überprüfung der neuen Kulturmodelle mit Hilfe primären Rattenhepatozyten	55
3.3.1 Laktatdehydrogenase-Aktivität	55
3.3.2 Evaluierung der metabolischen Aktivität	56
Messung des Glukosemetabolismus.....	57
Messung des Harnstoffmetabolismus	58
3.4 Validierung der Polyacrylamidgele anhand primär humaner Hepatozyten	60
3.4.1 Überprüfung der Verträglichkeit von Polyacrylamidgele.....	60
Resazurin-Aktivität.....	60
Laktatdehydrogenase-Aktivität	62
Aspartataminotransferase-Aktivität.....	63
3.4.2 Untersuchung der metabolischen Aktivität.....	63
Messung des Glukosemetabolismus.....	64
Messung des Harnstoffmetabolismus	65
3.4.3 Messung der Syntheseleistung der pHH mit Hilfe der Albumin-	
konzentration im Lysat.....	68
3.4.4 Überprüfung der Biotransformationsfähigkeit von pHH.....	69
Messung der Transporter-Aktivität	69
Darstellung der Cytochrom P 450 - Genexpression mit Hilfe von PCRs.....	74
3.4.5 Darstellung der Morphologie von pHH	79
4. Diskussion	82
Biokompatibilität der Polyacrylamidgele	84
Metabolisierungsfähigkeit der Hepatozyten.....	87
Proteinsyntheseleistung der Hepatozyten	90
Morphologische Veränderungen der Hepatozyten	91
Genexpression der Phase I-Enzyme	93
Transporteraktivität der Hepatozyten (Phase III).....	95
Limitierungen der neuen Kultivierungsmodelle.....	97
Ausblick	98
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis	102
6.1 Abbildungsverzeichnis	110
6.2 Tabellenverzeichnis	112
6.3 Formelverzeichnis	113
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	114
8. Veröffentlichungen.....	115
9. Danksagungen.....	116

Abkürzungsverzeichnis:

A		M	
AK	Antikörper	MDR	Multi-Drug-Resistance
ALT	Alaninaminotransferase	µFS	Micro-Fiber-Scan
AST	Aspartataminotransferase	MRP	Multi-Drug-Resistance-Related-Protein
ATP	Adenosintriphosphat		
C		N	
CFDA	5-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetat	NED	N-(1-naphthyl) Ethylendiamine dihydrochloride
CFSA	5-Carboxyfluorescein	Nm	Nanometer
CV	Zentralvene	NPC	Nicht-Parenchymzelle
Cyp	Cytochrom P 450	P	
D		PAA	Polyacrylamid
ddH ₂ O	destilliertes Wasser	PFA	Paraformaldehyd
DNA	Desoxynukleinsäure	PGP	P-Glycoprotein
DPBS	Dubecco's Phosphate Buffered Saline	pHH	primäre humane Hepatozyten
E		PV	Portalvene
ECM	Extrazelluläre Matrix	R	
H		rHeps	Rattenhepatozyten
HSC	Hepatische-Sternzelle	RNA	Ribonukleinsäure
I		RS	Reaktionslösung zur Vermessung der Glykolyse
IF	Immunfluoreszenz	T	
IL	Interleukine	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
K		U	
k.A.	keine Angabe	u. a.	unter anderem
KC	Kupffer-Zelle	UKT	Universitätsklinikum Tübingen
kPa	Kilopascal	uvw	und vielen weiteren
L			
LDH	Laktatdehydrogenase		
LS	Laktatlösung zur Vermessung der Gluconeogenese		

1. Einleitung

„Die Leber stellt das größte unpaarige parenchymatöse Organ des menschlichen Körpers dar“ (1). „Die Größe des im rechten Oberbauch gelegenen Organs variiert mit der Körpergröße und dem Geschlecht. Insgesamt beträgt das Gewicht der Leber etwa 2% des Körpergewichts, und ihr Volumen schwankt zwischen 1400 und 1700 ml“ (2).

Die Leber ist das vielseitigste Organ im Körper des Menschen. Sie ist beteiligt bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, wie zum Beispiel der Proteinsynthese-, den Steroid- und Fettstoffwechselfvorgängen sowie, bei der Speicherung von Vitaminen, Eisen und Glukose. Des Weiteren leistet sie entscheidende Beiträge bei der Entgiftung des systemischen und portalen Blutes (3).

Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Leber

Der makroskopische Aufbau der Leber besteht aus vier Leberlappen, die jeweils acht Lebersegmente umfassen (Abb. 1.1 A). Im mikroskopischen Querschnitt sind im Hexagon angeordnete Lobuli erkennbar, die an den gemeinsamen Ecken dreier Lobuli jeweils eine sogenannte Portal-Trias (Glissons Trias / periportales Feld) bilden (Abb. 1.1 B).

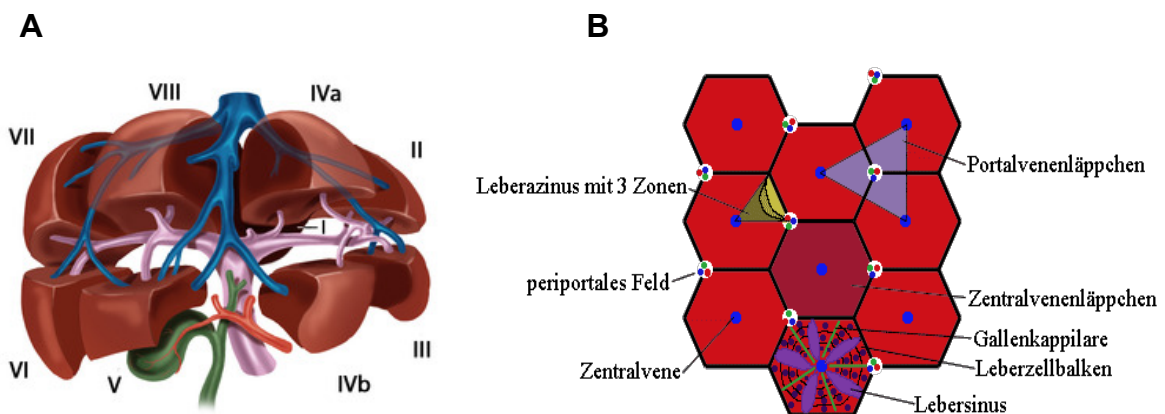


Abbildung 1.1: Bild A zeigt die acht Lebersegmente, Bild B den mikroskopischen Aufbau der Leber im Überblick (4 / 5).

Die Portal Trias bestehen aus der Arteria interlobularis, Vena interlobularis und dem Ductus interlobularis (6) und sind für die Zufuhr des Blutes sowie für den Abtransport der Galle zuständig. Die Galle wird zu 2/3 in den Hepatozyten (Leberzellen) und zu 1/3 in den Cholangiozyten (Gallengangszellen) produziert. Jeder Lobuli hat einen Leberazinus der in drei Segmente/Zonen unterteilt werden kann (Abb. 1.1 B / Abb. 1.2), die verschiedene Funktionen wahrnehmen. Zone eins ist spezifisch für den Stoffwechsel von Ethanol, den Harnstoffmetabolismus und die Gluconeogenese zuständig. In Zone drei, wo das Enzym Cytochrom P 450 3A4 stark vertreten ist, erfolgen auch die Stoffwechselforgänge der Glykolyse und der Liponeogenese. Zone zwei übernimmt verschiedene Funktionen der Zone eins und drei (6). Von Zone eins bis Zone drei erhöhen sich sowohl der Sauerstoffverbrauch, der Metabolismus als auch die Größe der Zellen. Der Sauerstoffgehalt im Blut sinkt durch die Abgabe des Sauerstoffs an die einzelnen Zellen des Leberazinus.

Die Leber ist ein stark vaskularisiertes Organ. Sie enthält 25-30% des totalen Blutvolumens pro Zeiteinheit, schätzungsweise 100 ml Blut pro 100 g Leber pro Minute (7). Durch die einzelnen Portalvenen (PV), siehe Abbildung 1.2, gelangt das Blut in die Leberlobuli, fließt durch die drei Zonen der Leberzellen und verlässt jeweils die Leberlobuli über die Zentralvene (CV), in der Mitte der Lobuli. Dies wird auch Lebersinus genannt (6). Während dieses Transports finden die oben genannten Austauschprozesse in den drei Zonen statt.

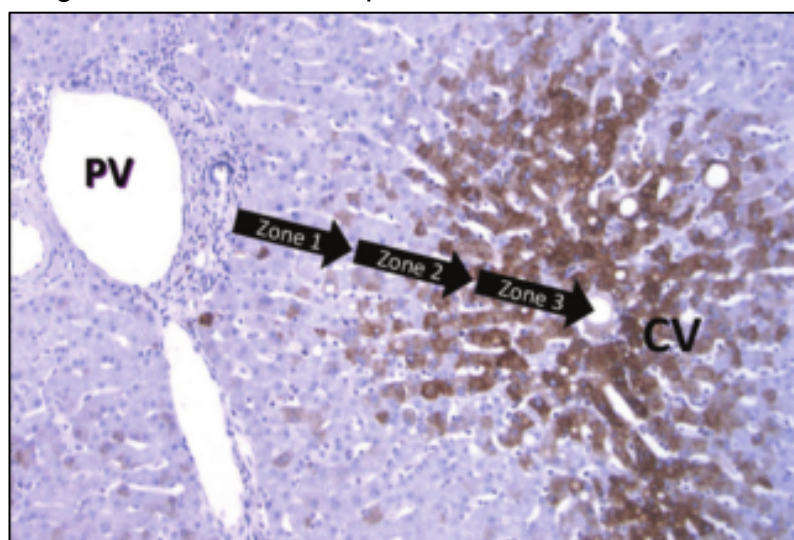


Abbildung 1.2: Blutfluss der Leber von der Portalvene (PV) über die einzelnen Leberlobuli, durch die drei Zonen zur Zentralvene (CV) (7).

Zellen der Leber und ihre Funktionen

Die Leber erbringt ihre Funktionen dank einer Vielzahl verschiedenster Zellen. Diese sind in zwei Hauptgruppen unterteilt. Die Parenchymzellen, zu 80% aus Hepatozyten bestehend, sowie die Nicht-Parenchymzellen (NPC) (8). Die NPC setzen sich aus Gallengangsepithelzellen, Sinusendothelzellen, hepatischen Sternzellen und Kupffer-Zellen (KC) zusammen. Sie regulieren das Zellwachstum, durch Bildung von Wachstumsfaktoren und führen Transport- und Metabolismusfunktionen aus (9). Die Kupffer-Zellen sind antigenpräsentierende Makrophagen, die für die Immunabwehr in der Leber zuständig sind. Die NPC sind häufig auch das erste Angriffsziel der Toxine bei einer Leberzellschädigung (10).

Die Hepatozyten, die 80% der einzelnen Leberlappen ausmachen, sind hoch differenzierte Epithelzellen (8). Sie übernehmen zum überwiegenden Teil die physiologischen Funktionen der Leber, wie den Protein-, Steroid- und Fettmetabolismus sowie das Speichern von Vitaminen, Eisen und Glukose. Außerdem erbringen sie Funktionen im effizienten Transport von endo- und exogenen Substanzen aus dem Blut bis hin zu deren Abtransport durch die Galle (6). Die Galle ist neben dem Abtransport toxischer Produkte auch für die Fettabsorption wichtig. Wird dieser komplexe Transportmechanismus der Leber gestört, so kann es zu einer Akkumulation von Giftstoffen und damit zu einer gravierenden Leberschädigung kommen.

Die Lebersinusoiden bestehen aus Endothelzellen, welche die Gänge zwischen den einzelnen Hepatozyten bilden (siehe Abbildung 1.1 B). In der Schicht aus Sinusoiden entstehen kleine Fenster und Poren mit einer Größe von 50-200 Nanometer, die die freie Diffusion von Substanzen ermöglichen und durch die weder Zellen, Chylomikronen (Lipoproteinpartikel) noch Blut austreten können (11 / 12). Die Sinusoide haben demnach drei wichtige Aufgaben: Sie bilden ein selektives Sieb für Stoffe, dienen als Reinigungssystem und übernehmen Funktionen der Leberimmunologie. Außerdem erledigen sie Aufgaben beim Clearance und der Bioaktivierung von Medikamenten (10).

Zwischen den Hepatozyten und den Sinusoiden, im sogenannten Disse-Raum (perisinusoidaler Raum), sind hepatische Sternzellen (HSC), auch als Perisinusoidalzellen, Itozellen oder Fettspeicherzellen bezeichnet, zu finden. Neben der Vitamin A - Speicherung sind sie an der Bildung der extrazellulären Matrix (ECM) und der Regulation der Sinusoide beteiligt. Sie bilden zusammen mit verschiedenen Kollagen-Arten (I, III, IV und V), einer großen Menge an Elastin und weiteren Substanzen ein Netzwerk, das die ECM in ihrer Steifigkeit und Elastizität beeinflusst (6). Die HSC produzieren auch wichtige Zytokine und Wachstumsfaktoren, die sowohl bei der gesunden, als auch der krankhaften Leber für die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen essentiell sind. Die Zytokine beeinflussen ebenfalls die ECM-Steifigkeit (6). Die KC sind, wie bereits oben erwähnt, wichtige immunologische Zellen, die sowohl endo- als auch phagozytische Funktionen der Leber übernehmen. Die KC und ihre Produkte sind bei der Induktion der Apoptose von Hepatozyten beteiligt (13), und sie können mit ihrer Antigenpräsentation T-Zellen aktivieren, deren Proliferation steuern, und damit die Leber schützen (14).

Eine weitere Art der NPCs sind die Cholangiozyten, die wie die Hepatozyten zu den Epithelzellen gehören und den Gallengang bilden. Sie machen 5% der gesamten Leberzellpopulation aus (6) und übernehmen Teile der Immunabwehr und der Aufnahme von Stoffen, beispielsweise von Glukose. Die Cholangiozyten sind sowohl in der Absorption als auch der Sekretion von Wasser, organischen Anionen und Kationen, Lipiden, Elektrolyten sowie der Regulation der Gallensekretion aktiv involviert (15). Insgesamt sind an der Bildung der ECM eine sehr große Vielfalt von Zellen und Faktoren beteiligt. Da der ECM in diesem Projekt ein besonderes Augenmerk zu kommt, wird sie im nächsten Kapitel näher beschrieben.

Relevanz der ECM–Steifigkeit für die Hepatozyten

Großen Einfluss auf die ECM haben die Zellpolarität und die Ausbildung der Zell-Zell-Interaktion. Die ECM befindet sich im Disse-Raum zwischen Hepatozyten und Lebersinusoiden. Und zusammen mit den beiden unten genannten Interaktionen wird die ECM aus Kollagen (Typ I-IV), Laminin, Vimentin und Hyaluron gebildet (16 / 17 / 18).

Die Hepatozyten haben im Gegensatz zu anderen Zellen, die jeweils nur eine apikale und eine basolaterale Seite besitzen, eine apikale und zwei basolaterale Seiten. Zum einen werden durch die beiden basolateralen Seiten der Hepatozyten Kanäle mit Sinusoiden gebildet, die die Mikrovaskularisation der Leber darstellen (19). Zum anderen bilden die verbundenen Hepatozyten in einer Linie, ähnlich eines Gürtels, ein Netzwerk an Kanälen. Dieses Netzwerk kleiner Gallenkanälchen, Hering-Kanälchen (Ductuli billiferi) genannt, verbindet die Portal-Trias mit den ableitenden Gallengängen und letztlich mit der Gallenblase (20).

Durch den Verbund an Hepatozyten und durch den Kontakt der Hepatozyten untereinander entsteht eine Zellpolarität, die essentiell ist für das Wachstum der Zellen und auch für die Strukturbildung der Leber (21). Wie alle epithelialen Zellen, müssen auch Hepatozyten polarisiert sein, um damit die Voraussetzung zu schaffen, dass die Formation der spezifischen Membran und des Zytoskeletts funktioniert (22). Neben der Zellpolarisierung der einzelnen Hepatozyten ist auch die Zell-Zell-Interaktion unverzichtbarer Bestandteil der komplexen Morphologie der Leber und relevant für Struktur und Funktionen der Hepatozyten. Die Zell-Zell-Interaktionen zwischen den Hepatozyten werden mit Hilfe einfacher, zwischen der apikalen und basolateralen Seite liegender, epithelialer Verbindungen, wie Tight Junctions, Gap Junctions oder Desmosomen, gebildet (23). Cadherine und Connexine sind neben ihrer Rolle als Zellpolaritätsstabilisator auch primäre Mediatoren und können dadurch Zellaktivitäten, wie beispielsweise die Verstoffwechslung von xenobiotischen Stoffen, steuern (24). Bei einer Störung der Zell-Zell-Interaktion kann es zu einer Steigerung in der Karzinogenese und dadurch zu einem

gestörten Zellwachstum kommen (25). Die Störung kann auch die Entgiftungsfunktion der Leber beeinträchtigen, wodurch es zu einer toxischen Schädigung der Hepatozyten durch Anreicherung von Medikamenten und xenobiotischen Stoffen kommen kann (26).

Die ECM, welche die Hepatozyten *in vivo* umgibt, wurde als Vorbild für den Untergrund der Hepatozyten bei den Experimenten dieses Projektes verwendet. Zu untersuchen war, wie stark das Verhalten des Lebergewebes mit seinen Zellkomponenten durch die biophysikalischen und biomechanischen Verhältnisse der ECM-Steifigkeit beeinflusst wird. *In vivo* wird die Zytoskelettstruktur und die allgemeine Leberstruktur größtenteils durch die Matrixbiologie, die Matrixchemie und den Zellphänotyp reguliert (27 / 28). Die ECM-Veränderung entsteht durch die Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen einschließlich Kollagen. Diese werden durch HSC oder portale Fibro- und Myofibroblasten gebildet und häufig durch eine chronische Schädigung der Leber verursacht, was letztendlich zu einer Leberfibrose führt. Die häufigsten Lebererkrankungen, die in eine Leberfibrose und später in eine Leberzirrhose münden können, werden im nächsten Abschnitt erläutert.

Lebererkrankungen und ihre Folgen – kurzer Überblick über die Leberfibrose und Leberzirrhose

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Funktionen, die durch den anatomischen Aufbau der Leber mit ihren Zellen und der ECM erbracht werden, können durch pathologische Veränderungen der Leber gestört werden. Solche pathologische Veränderungen treten in großer Zahl und vielfältigen Ausprägungen auf.

In Deutschland sind aktuell mindestens drei Millionen Menschen leberkrank (29) und weisen dadurch pathologische Veränderungen wie Leberfibrose und -zirrhose auf. In den letzten vier Jahren wurden allein in Deutschland mehr als 80.000 neue Fälle von Leberfibrose und -zirrhose diagnostiziert (30). Hauptursachen der Leberzirrhose sind starker und dauerhafter Alkoholkonsum, chronische Hepatitis C und auch die nicht-alkoholbedingte Fettleberentzündung (31). Die Todesursachenstatistik (Abb. 1.3) des Statistischen Bundesamtes Deutschland für 2009 - 2013 zeigt,

dass Lebererkrankungen, meist Leberfibrose oder –zirrhose, mit mehr als 15.000 Fällen pro Jahr eine konstant häufige Todesursache sind.

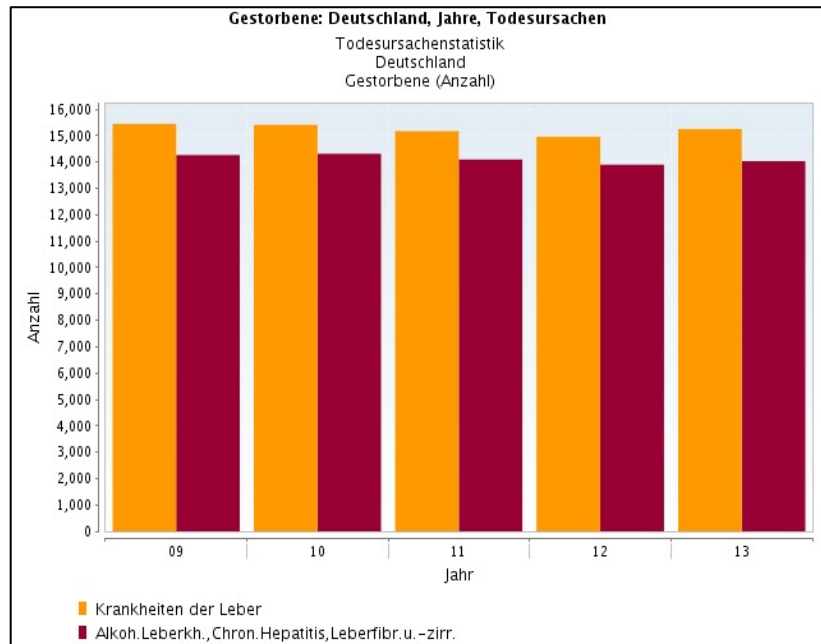


Abbildung 1.3: Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes Deutschland. Auf der X-Achse sind Jahre (2009-2013) und auf der y-Achse Anzahl der Todesopfer aufgetragen. Orange stellt allgemeine Krankheiten der Leber dar und rot die alkoholischen Lebererkrankungen, chron. Hepatitis und Leberfibrose und –zirrhose (30).

Die Begriffe Leberfibrose und –zirrhose beschreiben Umbauvorgänge in der Leber. Durch die verschiedenen Schädigungen der Leber, bedingt durch Alkohol, Infekte oder auch autoimmun ausgelöst, kommt es zu einer Inflammation bedingten Veränderung der Leberarchitektur. Im ersten Stadium handelt es sich um einen reversiblen fibrotischen Umbau der Leber (sog. Leberfibrose). Wird dieser Umbauprozess nicht therapiert, so verändert sich die Leberstruktur irreversibel, siehe Abbildung 1.4, (sog. Leberzirrhose) und es kommt zu einem wachsenden Verlust der Leberfunktionen.

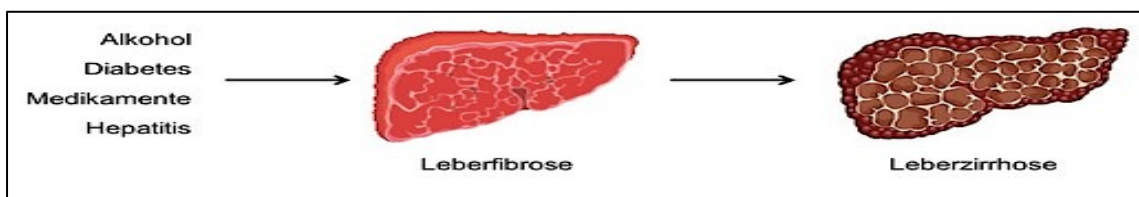


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Leberstrukturveränderung in Folge verschiedener Ursachen (Alkohol, Diabetes, etc.) in Richtung einer Leberfibrose und –zirrhose (32).

In den 1990er Jahren konnte gezeigt werden, dass sich die Leber nach einer Leberfibrose regenerieren kann. Es wurden antifibrotische Medikamente entwickelt, die an den Fibro- und Myofibroblasten angreifen und diese hemmen. Zudem werden ECM-Proteine (z.B. Kollagen, Elastin) geblockt (31), um eine Akkumulation der ECM-Proteine zu verhindern. Eine solche Akkumulation führt zu einer veränderten Leber-Architektur mit nicht nur fibrosierten Narben sondern auch zu einem die Leberzirrhose definierenden knotigen Umbau der Leber (31). Dieser knotige Umbau bewirkt eine „[...] verstärkte hepatozelluläre Dysfunktion mit erhöhtem intrahepatischen Widerstand im Blutfluss, der in eine Leberinsuffizienz und portalen Hypertonie mündet“ (31).

Die Auswirkungen der Erkrankungen, im Besonderen auf die Stoffwechselfvorgänge im menschlichen Körper, sind jedoch bis heute nicht komplett verstanden.

Beschreibung der neuen Modelle und die damit verbundenen Ziele

Um weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der beiden Krankheiten, Leberfibrose und –zirrhose, auf den Organismus zu gewinnen, wurden in Studien häufig zunächst Tiermodelle herangezogen. Da diese hinsichtlich Funktion und Darstellung einzelner Signalkaskaden begrenzt sind, ging man über, *in vitro* Modelle zu entwickeln. Als Standardmodelle sind in der ‚Laborlandschaft‘ das 2D- (Collagen Monolayer) und 3D-Modell (Collagen Sandwich) (33 / 34) etabliert. „Das 2D-Modell weist im Zeitablauf einen teilweisen oder vollständigen Verlust der Viabilität und des Phänotyps in Zellkulturen auf“ (6). Neben dieser Problematik ist die fehlende Polarität und damit eine gestörte Struktur beobachtet worden (6). Grund dafür ist unter anderem, dass die Zellen auf eine hauchdünne Kollagenschicht gesät werden. „Wichtigster Einfluss zur Aufrechterhaltung der normalen Leberstruktur und der Funktionen *in vitro* [...] ist die ECM“ (35). Und wesentliche Faktoren für die ECM sind die Polarisierung und Zytoarchitektur. Daher entstand die Idee der 3D-Kultur. In 3D-Kulturen sind die Hepatozyten sowohl unten als auch oben mit einer Typ I Kollagenschicht bedeckt. Durch diese „[...] Sandwich Konfiguration bildet sich eine normale Verteilung von Mikrotubuli und Aktin-Filamenten [...],

wodurch ein stärkeres physiologisches Aussehen erreicht wird“ (6). Jedoch weder diese beiden Kultivierungssysteme noch Co-Kultur-Systeme, die neben Hepatozyten weitere Leberzellen mit kultivieren und dadurch die unterschiedlichen Leberfunktionen verbessern, erreichen den angestrebten *in vivo* Zustand mit seinem komplexen Aufbau (6).

Da bis dato kein Modell existiert, welches sowohl den gesunden *in vivo* Zustand einer Leber als auch den fibrotischen / zirrhotischen Zustand widerspiegelt, entstand die Idee, ein Modell zu etablieren, welches die oben genannten drei Zustände (gesund, fibrotisch, zirrhotisch) mit Hilfe der Variation der ECM-Steifigkeit auf die Hepatozyten abbildet.

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass sich die Steifigkeit der Leber durch die Leberfibrose und Leberzirrhose verändert (1). Der Leberaufbau verändert sich sowohl genetisch als auch durch äußere Faktoren bedingt in Richtung eines bindegewebigen Umbaus, bei dem die Umgebung der Zellen, die ECM, härter wird. Die Zunahme der Steifigkeit der Leber wurde in Studien verschiedentlich mit Hilfe eines Micro-Fiber-Scan vermessen, siehe Kapitel 3.1. In diesen Studien wurde gezeigt, dass eine gesunde Leber eine Steifigkeit von 3,5 Kilopascal (kPa), eine fibrotische Leber hingegen von 8,2 kPa und eine zirrhotische Leber sogar eine solche von 24 kPa aufweist (1). Diese Umgebungsveränderung sollte in den durchgeführten Versuchen mit Hilfe einer Kopie der ECM-Steifigkeit erreicht werden. Dabei wurde die Steifigkeit mit Hilfe eines Polyacrylamid (PAA) Gels nachgebildet. Dieses soll unter den Leberzellen (Hepatozyten) als ECM auf die Hepatozyten wirken und ein gesundes Leber-, Leberfibrose- und Leberzirrhosemodell bilden (1). Die Hepatozyten selbst sind nochmals in einem 3D – Collagen Sandwich verpackt. Die PAA-Gele wurden in den Steifigkeiten angefertigt, die bei Studien mit Hilfe des Mico-Fiber-Scan an Patienten mit Leberfibrose und Leberzirrhose gemessen wurden, siehe Kapitel 3.1. So entstanden mit den PAA-Gelen weiterentwickelte 3D-Modelle mit der Steifigkeit einer gesunden Leber (3,5 kPa), einer fibrotischen Leber (8,2 kPa) und einer zirrhotischen Leber (24 kPa). Mit dem Micro-Fiber-Scan ist es in der Klinik möglich die Steifigkeit der Leber von außen einzuschätzen und damit strukturelle Leberveränderungen zu

erkennen, genaueres siehe Kapitel 3.1. Nähere Ausführungen zum Aufbau der Modelle sind im Kapitel „Material und Methoden“ dargestellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe dieser *in vitro* Kultivierungsmodelle die verschiedenen *in vivo* Zustände der Leber besser nachzustellen. Die in diesem Projekt untersuchten Modelle dienen außerdem der Überprüfung von Auswirkungen der ECM-Steifigkeit auf die Hepatozyten. Als Vergleich dienen die Standardmodelle (2D und 3D). Da Leberpatienten häufig an weiteren Erkrankungen (Co-Morbiditäten) leiden, wie beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen, ist es zusätzlich wichtig zu wissen, wie Patienten mit Leberfibrose oder Leberzirrhose auf neue medikamentöse Therapiemöglichkeiten reagieren. Daraus ergibt sich eine zusätzliche Motivation zur Entwicklung neuer Modelle, mit deren Hilfe Auswirkungen von Medikamenten auf Hepatozyten in fibrotischem und leberzirrhotischem Zustand überprüft werden können. Damit erscheint es erreichbar, den klinischen Zustand leberkranker Patienten zu modellieren und Reaktionen und Auswirkungen von Medikamenten zu testen.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde im Rahmen dieses Projektes zunächst das Modell auf seine tatsächliche Steifigkeit, Verträglichkeit und auf die physiologischen Funktionen der Leber hin überprüft.

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Methoden unter Angabe der benötigten Lösungen sowie Ablauf und Protokollierung beschrieben.

2.1 Materialien und Geräte

Gesamtheit der verwendeten Geräte, Chemikalien und Materialien.

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräteliste

Name:	Firma:
Arktik Thermal Cycler	Thermo Scientific, Waltham
CO ₂ – Inkubator C 150	Binder, Tuttlingen
Elektrophorese PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio RAD, München
Feinpipetten Lambda Plus – „Research Pipette“ (0,1 – 2,5 µl ; 0,5 – 10 µl ; 10 – 100 µl ; 50 – 200 µl ; 100 – 1000 µl)	Corning, New York
Feinwaage, Kern ABJ 120-4M	Kern & Sohn, Balingen
Gefrierschrank, -80°C, Forma 900 Series	Thermo Scientific, Waltham
Kühlschrank, +4°C / -20°C, Liebherr Comfort	Liebherr, Bulle
Laborwaage, Kern PCB 250-3	Kern & Sohn, Balingen
LVis Plate	BMG Labtech, Ortenberg
Mikroskope Primo Vert, 12 V DC, 30 W EVOS FI (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss, Oberkoch Advanced Microscopy Group, Carlsbad Waagen
Minizentrifuge	Firma Labnet, Edison
Neubauer Zähl Kammer	Carl Roth, Karlsruhe
Spektralphotometer, Fluostar Omega	BMG Labtech, Ortenberg
Sterilarbeitsbank, Safe 2020, class II, EN 12469	Thermo Scientific Waltham
Schwenktisch, Shaker DRS-12, Sky Line	Elmi Laboratory, Riga
Ultraviolettamera	Intas Science Imaging, Göttingen
Ultraviolettlampe, UV-B	Sankyo Denki, Shinagawa
Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems, Carlsbad
Wasserbad, AQUAline AL 25	Lauda, Königshofen
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 40R	Thermo Scientific, Waltham
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2.2: Chemikalien Liste

Name:	Firma:	Artikelnummer:
Agarose Standard	Carl Roth	3810.4
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth	K298.1
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma Aldrich	A3678-25G
BSA, (Bovine Serum Albumin)	Carl Roth	8076.4
Borsäure	Carl Roth	6943.1
Brij. 35	Carl Roth	CN21.1
C		
5-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat	Sigma Aldrich	21884
5-Carboxyfluorescein	Sigma Aldrich	86826
Chloroform	Carl Roth	Y015.1
D-(+)-Glukose	Sigma Aldrich	G7021
ddH ₂ O	Carl Roth	3175.1
DEPC		
(Diethylpyrocarbonate)	Carl Roth	K020.3
Dimethylsulfoxid	Carl Roth	4720.2
DMEM		
(Dulbeccos's Modified Eagle Medium)	Sigma Aldrich	D5796
DMEM (ohne Phenolrot)		
(Dulbeccos's Modified Eagle Medium)	Sigma Aldrich	D5030
DPBS		
(Dubecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich	D8537
EDTA		
(Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth	8043.2
Ethanol vergällt	SAV-Liquid	ETO-5000-99
Ethanol (99,9%)	Carl Roth	P076.1
Ethidium Bromid	Carl Roth	2218.1
FCS, (Fötale Kälberserum)	Gibco	10270-106

Name:	Firma:	Artikelnummer:
Glukose Oxidase from Aspergillus Niger	Sigma Aldrich	G6125-50U
Glutamine	PAA GmbH	M11-006
Glycerol	Carl Roth	7530.1
Glykogen	Carl Roth	HP51.1
Harnstoff (Urea)	Sigma Aldrich	51459-250G
Hepes Buffer 1M	Sigma Aldrich	H0887
Hoechst 33342	Sigma Aldrich	
Human Albumin Elisa Quantitation Set	Bethyl Laboratories	E80-129
- Human Albumin Coating Antibody		A80-129A
- Human Reference Serum		RS10-110
- HRP konjugierter albumin Detection Antibody		A80-129P
Human Insulin (Actrapid Flex Pen)	Novo Nordisk	Nicht bekannt
Hydrocortison	Pfizer	8Q0695
Isopropanol	VWR	20842.330
L-Glutamine Lösung	PAA	M11-006
Luminol	Carl Roth	4203.1
Magnesiumchlorid	Carl Roth	KK36.2
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma Aldrich	M4655
N-(1-naphthyl)-Ethylendiamindihydrochlorid	Carl Roth	4342.1
Natriumchlorid	VWR	27.810.295
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth	6885.2
Natronlauge	Carl Roth	T135.1
Non-essential Amino Acids	PAA	M11-003
O-Dianisidine	Sigma Aldrich	D9143-5G
O-Phthalaldehyd	Sigma Aldrich	P1378
Ornithinmonohydrochlorid	Sigma Aldrich	O5250-1G
Paraformaldehyd 37%	Carl Roth	4979.1
P-Cumar Säure	Carl Roth	9908.1
Penicillin / Streptomycin	Sigma Aldrich	P0781
PeqGOLD Trifast	Peqlab	30-2020
Percol	Biochrom	L 6145
Peroxidase (from horseradish)	Sigma Aldrich	P8250-100U
Phalloidin	Life Technology	
PUC 19 Marker	Carl Roth	X901.1

Name:	Firma:	Artikelnummer:
ReadyMix	Peqlab	07-KK510103
Resazurin (Alamar Blau)	Sigma Aldrich	199303-1G
Rhodamin 123	Sigma Aldrich	83702
Rotiphorese Gel A (30% Acrylamid Lösung)	Carl Roth	3037.1
Rotiphorese Gel B (2% Bisacrylamid Lösung)	Carl Roth	3039.1
Salzsäure	Carl Roth	T134.1
Schwefelsäure	Carl Roth	X873.1
Sodium Pyruvat Solution, 100 mM	Sigma Aldrich	S8636
Sodium L-Laktat	Sigma Aldrich	L7022
Sulfo-SANPAH	Thermo Scientific	22589
TEMED, (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth	2367.3
TRIS (hydroxymethyl) aminomethan	AppliChem	A1086
Trypan Blau 0,5%	Carl Roth	CN76.1
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich	T3924
TWEEN 20	Carl Roth	9127.1
Wasserstoffperoxid	Carl Roth	CP26.5
Williams Medium E	Sigma Aldrich	W1878

Primer

Alle von mir verwendeten Primer wurden von der Eurofins Gruppe (Luxemburg) hergestellt (36).

hCyp 1A1

T_A: 55°C / Verwendete cDNA Menge: 30 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 302 bp

F: TTCGTCCCCTTCACCATC

R: CTGAATTCCACCCGTTGC

hCyp 1A2

T_A: 60°C / Verwendete cDNA Menge: 30 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 180 bp

F: TCG ACC CTT ACA ATC AGG TGG

R: GCA GGT AGC GAA GGA TGG G

hCyp 3A4

T_A: 64°C / Verwendete cDNA Menge: 30 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 314 bp

F: ATTCAGCAACAAGAACAAGGACA

R: TGGTGTTCTCAGGCACAGAT

hCyp 2B6

T_A: 62°C / Verwendete cDNA Menge: 30 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 283 bp

F: ATGGGGCACTGAAAAAGACTGA

R: AGAGGCGGGGACACTGAATGAC

hCyp 2C8

T_A: 60°C / Verwendete cDNA Menge: 30 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 147 bp

F: CAT TAC TGA CTT CCG TGC TAC AT

R: CTC CTG CAC AAA TTC GTT TTC

hCyp 2C9

T_A: 59°C / Verwendete cDNA Menge: 30 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 308 bp

F: CTGGATGAAGGTGGCAATTT

R: AGATGGATAATGCCCCAGAG

hCyp 2E1

T_A: 59°C / Verwendete cDNA Menge: 30 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 296 bp

F: GACTGTGGCCGACCTGTT

R: ACACGACTGTGCCCTGGG

hGapdH

T_A: 56°C / Verwendete cDNA Menge: 20 ng / Zyklen: 35 / Produktgröße: 420 bp

F: GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT

R: AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG

Immunfluoreszenz – Antikörper

- Anti-Rabbit ZO-1 Invitrogen
- Vimentin Leica Biosystems
- ZO-1 Santa Cruz

2.1.3 Materialien

Tabelle: 2.3: Materialienliste

Name:	Firma:	Artikelnummer:
Parafilm	Laboratory Film	
pH Indikator Papier Pehanon	Macherey-Nagel	90417
Pipettenspitzen	StarLab TipOne	S1113-1006
Sterile Filter MILLEX GP 0,22 µm	Merck Millipore	SLGP033RS
Sterile Spritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun,	
T 25 CELLSTAR Cell Culture Flask, 25 cm ² , 50 mL PS, red filter cap, sterile	Greiner Bio-One	690175
T 75 Cell Culture Flask	Corning	430641
Tubes/Röhrchen (1,5 ml, 15 ml, 50 ml)		
1,5 mL CELLSTAR Tubes	Carl Roth	4190.1
15 mL CELLSTAR Tubes	Greiner Bio One	188271
50 mL CELLSTAR Tubes	Greiner Bio One	227261
0,2 mL PCR-Reaktionsstreifen	Carl Roth	CH89.1
Zellkulturplatten		
24 Well Platte Cellstar	Greiner Bio One	662160
96 Well Platte Cellstar	Greiner Bio One	655180

Fertige Chemikalien-Kits werden jeweils bei der zugehörigen Methode mit aufgeführt.

2.2 Kultivierungsmethoden

2.2.1 Herstellung und Beschichtung der Polyacrylamidgele

Die unterschiedlichen Gelsteifigkeiten wurden in den in der Tabelle 2.4 angegebenen Mischungsverhältnissen, entsprechend der Publikation von Amnon Buxboim (37) hergestellt.

Tabelle 2.4: Mischungsverhältnis der PAA-Gele (37).

Steifigkeit μFS	% (v/v) Verhältnis Acryl/Bisacryl	30% Acrylamid (Rotiphorese A)	2% Bis-Acrylamid (Rotiphorese B)	PBS
3,5 kPa	4,0/0,11	669 μl	275 μl	4,058 ml
8,2 kPa	4,0/0,2	667 μl	500 μl	3,833 ml
24 kPa	7,5/0,12	1,254 ml	299 μl	3,435 ml

Die PAA-Gele werden auf den Deckel einer 48-Loch-Platte gegossen. Die Katalysatoren Ammoniumpersulfat (APS - 10% - 50 μl) und Tetramethylethylendiamin (TEMED – 5 μl) werden nacheinander am Schluss zur Initiation der Polymerisation der Lösung zugegeben. Jeweils 75 μl der fertigen Lösung werden auf den Deckel der 48-Loch-Platte aufgebracht und mit einem Gläschen, Durchmesser 18 mm, abgedeckt, um eine luftblasenfreie Polymerisation zu erreichen. Nach circa 20 Minuten werden die fertigen PAA-Gele gedreht, in eine saubere 24-Loch-Platte gelegt und zweimal mit DPBS gewaschen. Vor der Beschichtung mit Kollagen wird die Oberfläche mit 250 μl Sulfo-SANPAH (50 mg/ml in DPBS) bedeckt und mit einer Wellenlänge von 238 nm (UV-B) fünf Minuten bestrahlt, um die Oberfläche der PAA-Gele zu aktivieren und damit das im nächsten Schritt aufgebrachte Kollagen haftet (siehe Abbildung 2.1). Zum eigenen Schutz vor dem UV-B Licht wird ein Karton während der Bestrahlung über den Aufbau gestülpt.

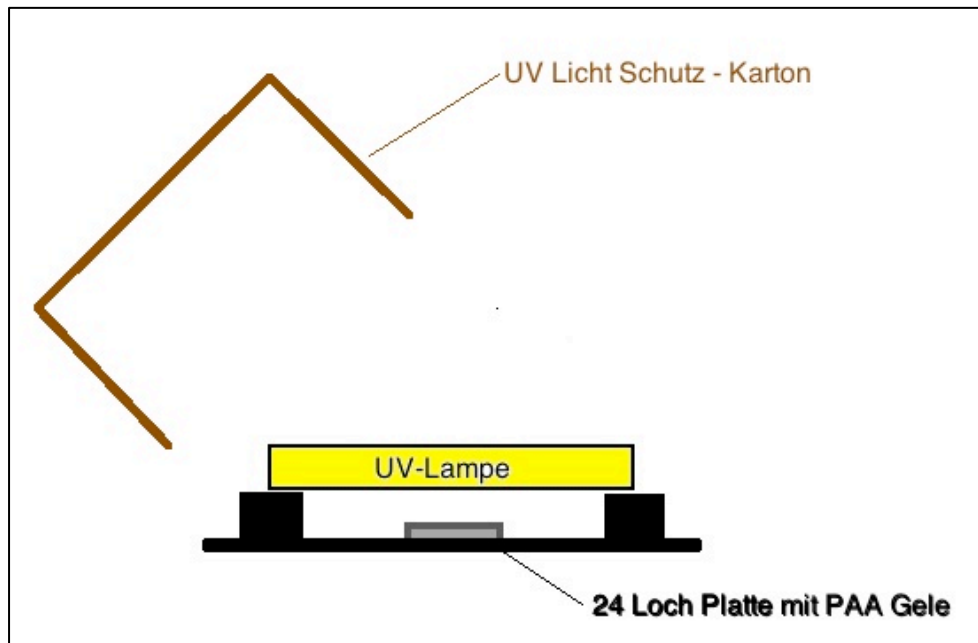


Abbildung 2.1: Aufbau der UV-Aktivierung der PAA-Gele.
(Quelle: Karsten Büringer, Siegfried-Weller-Institut, Tübingen).

Nach der fünfminütigen Bestrahlung ändert sich die Farbe der Sulfo-SANPAH Reaktionslösung von rot zu einem transparenten braun; (siehe Abbildung 2.2). Die Reaktionslösung wird mit einer Pipette abgezogen und die PAA-Gele werden mit DPBS gewaschen, um das restliche Sulfo-SANPAH zu entfernen.

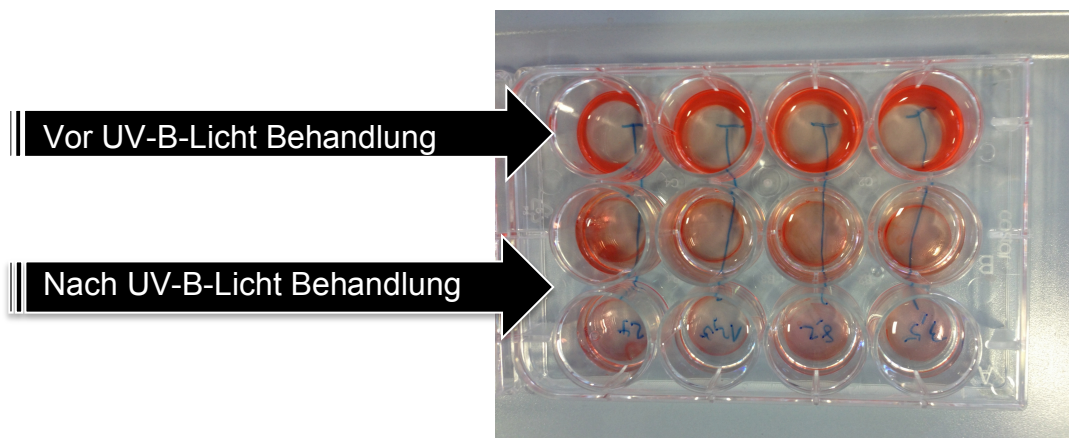


Abbildung 2.2: PAA-Gele vor und nach der UV – Bestrahlung.
(Quelle: Karsten Büringer, Siegfried-Weller-Institut, Tübingen).

Anschließend werden die PAA-Gele bei vier Grad Celsius über Nacht oder bei 37 Grad Celsius für 30 Minuten im Inkubator mit einer 200 µg/ml Kollagenlösung inkubiert. Die kurze Inkubation wurde benutzt, wenn die Gele direkt benötigt wurden, die längere für später geplante Versuche. Unterschiedliche Resultate zwischen den beiden Varianten gibt es nicht.

Das überschüssige Kollagen wird vorsichtig abpipetiert und verworfen. Anschließend werden die PAA-Gele zwei Mal mit DPBS gewaschen, um sie von Kollagenresten zu befreien (38). Das fertige Modell als Skizze ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

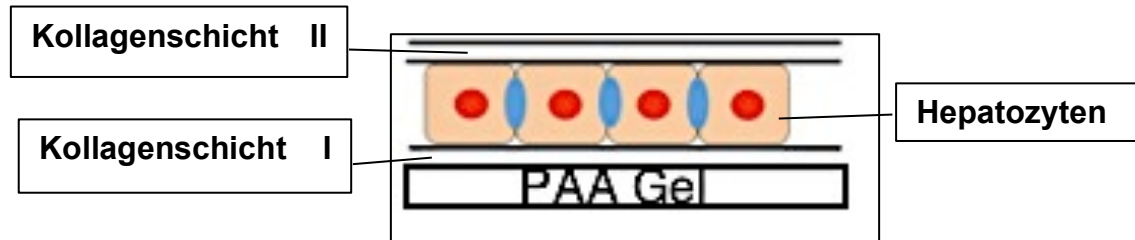


Abbildung 2.3: Aufbau der PAA-Gel-Modelle mit Collagen Sandwich.

Es gilt anzumerken, dass die hier verwendeten PAA-Gele mit den verschiedenen Steifigkeiten (3,5 kPa / 8,2 kPa / 24 kPa) lediglich von unten auf die Hepatozyten wirken. Die von oben wirkende Steifigkeit entspricht der dem Collagen Sandwich Modell, siehe Kapitel 4.

2.2.2 Herstellung des Collagen Sandwich und des Collagen Monolayer

Das Collagen Monolayer Modell (2D-Modell) und das Collagen Sandwich Modell (3D-Modell) wurden entsprechend dem Laborprotokoll (39 / 40) hergestellt.

Pro Loch einer 24-Loch-Platte werden 1000 μ l einer 100 μ g/ml Collagenlösung gegeben. Nach 10 Minuten wird die Lösung abgesaugt und verworfen. Die restliche Suspension trocknet und bildet eine milchig weiße Schicht.

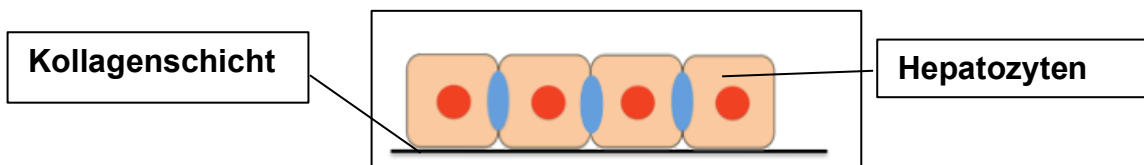


Abbildung 2.4: Skizze des 2D-Modells (Collagen Monolayer).

Für das Collagen Sandwich, im weiteren Verlauf auch als reines 3D-Modell bezeichnet, wird eine Konzentration von 2000 μ g/ml Kollagen eingestellt.

Die Verdünnung wird für 150 µl pro Loch bei einer Gesamtmenge von zwei Milliliter wie folgt hergestellt:

- 1330 µl Kollagen
- 200 µl 10x DMEM (mit Phenolrot)
- 470 µl DPBS

Da das Kollagen polymerisieren soll, ist eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 bis 7,4 mit Hilfe von NaOH notwendig.

Danach werden 150 Mikroliter pro Loch ausplattiert und die Polymerisation erfolgt für mindestens 30 Minuten im Inkubator bei 37°C.

Schematisch dargestellt ist das Collagen Sandwich Modell (3D-Modell) in Abbildung 2.5.

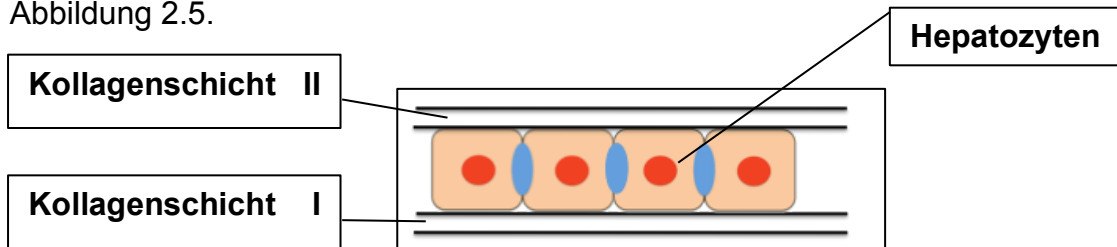


Abbildung 2.5: Skizze des 3D-Modells (Collagen Sandwich).

2.3 Zellbiologische Methoden

Die PAA-Gele wurden an insgesamt drei verschiedenen Zellarten evaluiert. Im ersten Schritt erfolgte die Überprüfung der Verträglichkeit der PAA-Gele anhand einer Zelllinie, die im Jahr 1982 aus einem Leberzelltumor (41/42) entnommen wurde, die Leberkrebszelllinie HuH-7. Diese Leberkrebszelllinie mit dem entsprechenden Zell-Medium stellt eine sehr vielseitige, proliferierende und beständige Zelllinie dar (41) und eignet sich sehr gut für die Evaluation neuer Zellkulturmodelle. Es wurden nicht von Beginn an primär humane- oder primäre Rattenhepatozyten verwendet, da deren Verfügbarkeit knapp ist (43 / 44).

2.3.1 Herstellung der Zellkulturmedien für HuH-7 Zellen, primäre Rattenhepatozyten und primäre humane Hepatozyten

Die Zellkulturmedien wurden entsprechend dem Laborprotokoll hergestellt (41).

Tabelle 2.5: Zellkulturmedien HuH-7 Zellen und primärer Hepatozyten.

Zellkulturmedium für HuH 7 – Zellen	Zellkulturmedium für primäre humane- und Rattenhepatozyten
500 ml DMEM	500 ml Williams Medium E
5 ml Penizillin / Streptomycin	5 ml Penizillin / Streptomycin
50 ml Fetal Bovine Serum	50 ml Fetal Bovine Serum
	5 ml L-Glutamine
	8 µl Hydrocortison
	7,5 ml HEPES
	5 ml Natrium Pyruvat
	0,25 µl Human Insulin
	5 ml Nicht-Essentielle Aminosäuren

Das fertige Medium wird im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und für die Experimente auf jeweils 37°C erwärmt.

2.3.2 Kultivierung von HuH-7 Zellen (39 / 41 / 45 / 46)

Zellen auftauen

Die aufgetauten HuH-7 Zellen werden nach Zugabe von DPBS in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei Raumtemperatur wird der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 5 ml des auf 37°C erwärmten HuH-7- Kulturmediums vermischt. Die Zelllösung wird in eine Zellkulturflasche umgefüllt und mit 15 ml HuH-7-Kulturmedium aufgefüllt. Die HuH-7 Zellen können im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ für drei Tage gelagert werden.

Zellen splitten

Das HuH-7-Kulturmedium, siehe Tabelle 2.5, und das Trypsin/EDTA wird auf eine Temperatur von 37°C im Wasserbad erwärmt. Das Medium aus der Zellkulturflasche wird abgesaugt und die Zellen werden mit 15 ml DPBS gewaschen. Die Zellen werden mit 2 ml Trypsin überschichtet und für 5-10

Minuten in den Inkubator gestellt. Mikroskopisch wird das Ablösen der Zellen überprüft. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgt mit FCS-haltigem Kulturmedium. Die entstehende Lösung wird in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zelloösung wird für 10 Minuten bei 4° C bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wird bis zum Zell-Pellet vorsichtig abgesaugt und dann mit 10 ml Kulturmedium vermischt. Für die Durchführung eines Experimentes werden die Zellen, wie unter 2.3.4 dargestellt, ausgezählt und danach ausplattiert, siehe 2.3.3.

Nicht verwendete Zelloösung wird mit 25 ml Kulturmedium in eine Zellkulturflasche umgefüllt und in den Inkubator zurückgestellt (41 / 45 / 46 / 47).

2.3.3 Aufarbeitung und Plattieren der verschiedenen Hepatozyten - Gewinnung und Isolation primärer Human- und Rattenhepatozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten pHH wurden aus Leberresektionen gewonnen. Die Patienten litten unter verschiedenen Lebererkrankungen, die jeweils eine Operation notwendig machten. Sowohl die Entnahme als auch die Weiterleitung des Spendergewebes wurden nach den Richtlinien des Ethikantrags mit der Nummer 3681/2012B02 der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Die Rattenhepatozyten wurden von der Firma Pharmacelsus GmbH in Saarbrücken bereitgestellt.

Die im Folgenden beschriebenen Schritte (47 / 48) werden alle unter der Steril Bank durchgeführt.

Tabelle 2.6: Benötigte Lösungen für die Aufarbeitung und Plattieren der verschiedenen Hepatozyten.

1. Hepatozyten Medium	Siehe Kapitel 2.3.1	
2. Percoll-Lösung	15 ml PBS 5 ml Percoll	C _{final} 25%

Die Zellen werden nach der Isolation auf Eis gelagert. Aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen wird die Zellsuspension in ein Falconröhrchen mit 4°C kalten

DPBS transferiert. Anschließend wird das Falconröhrchen bei 4°C mit 80-facher Gravitationsbeschleunigung (80 x g) für 5 Minuten zentrifugiert. Das überschüssige DPBS wird vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet wird zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend in 20 ml Nährmedium transferiert. Aus dieser Suspension werden mit Hilfe der Trypan-Blau-Methode, siehe Kapitel 2.3.4, die Zahl der Hepatozyten und die Viabilität bestimmt.

Im Falle einer Viabilität unter 50% in der Suspension erfolgt die Trennung in lebende und tote Zellen mit Hilfe einer Percoll-dichtezentrifugation. Eine 25%ige Percoll-Lösung wird vorsichtig mit 4 bis 5 ml Zellsuspension überschichtet und bei 4°C mit 1278 x g für 12 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht eine obere Schicht mit toten Zellen und ein Zellpellet das die lebenden Zellen enthält. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und die Zellen werden ausgezählt und anschließend ausplattiert (47 / 48).

Ausplattieren der Zellen in 24-Loch-Platten

Pro Loch werden 250.000 Zellen ausgesät, die zuvor in 500 µl Medium resuspendiert wurden. Die insgesamt benötigte Zellzahl wird vorher berechnet und mit dem entsprechenden Medienvolumen versetzt. Anschließend werden die Zellen auf die verschiedenen Modelle, 2D (Collagen Monolayer), PAA-Gele und 3D (Collagen Sandwich) ausplattiert.

Bei den Hepatozyten bestehen keinerlei Spezies-spezifische Unterschiede bezüglich Prozessierung und Ausplattieren.

2.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Trypan-Blau-Methode

Die Neubauer Zählkammer wird mit 70% Ethanol gereinigt und das Deckglas aufgesetzt, so dass die Newtonschen Ringe sichtbar werden.

Die Zellsuspension wird 1:1 mit Trypanblau gemischt. Zehn µl der Zellsuspension werden zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Die Membran toter Zellen ist für den Farbstoff durchlässig und erscheinen unter dem Mikroskop blau, wohingegen die viablen Zellen nicht permeabel für den

Farbstoff sind und somit braun erscheinen. Beide Zelltypen werden ausgezählt und anschließend die Viabilität berechnet (40), siehe Formel 1.

Formel 1: Berechnung der Gesamtanzahl an Zellen und ihrer Viabilität.

$$\text{Gesamtanzahl an Zellen} = n * V_f * V * 10^4$$

$$\text{Anzahl lebender Zellen} = m * V_f * V * 10^4$$

$$\text{Viabilität} = \text{Anzahl lebender Zellen} / \text{Gesamt-Zell-Zahl} * 100 = m / n * 100$$

n: Mittelwert an gezählten Zellen

m: Mittelwert an lebenden Zellen

V_f: Verdünnungsfaktor (in diesem Fall zwei)

V: Volumen der Zelllösung

10⁴: Faktor der Zählkammer

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Messung von Glykolyse und Gluconeogenese

Tabelle 2.7: Benötigte Lösungen zur Messung von Glykolyse und Gluconeogenese.

1. Reaktionslösung	19 mg MgCl ₂ 2 ml Natrium Pyruvat Lösung (100 mM) 200 ml DPBS	C _{final} 1 mM 1 mM
2. L-Laktat-Lösung	1 mg Lakat pro ml Reaktionslösung	C _{final} 11 mM
3. Glukose Standard Lösung	10,9 mg D-Glukose 100 ml demin. H ₂ O	C _{final} 600 µM
4. TRIS Puffer (pH = 8.0)	12,2 g TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan 60 ml demin. H ₂ O	C _{final} 1 M
5. Gesättigte o-Dianisidin Lösung	10 mg o-Dianisidine 1 ml 99,9% Ethanol	C _{final} 1%

6. GLOX Lösung		C _{final}
	15,5 mg Glukose Oxidase	0.04%
	2,8 mg Peroxidase	0.007%
	10 ml 1 M TRIS Puffer	250 mM
	31,7 mg EDTA	0,2 mM
	40 ml ddH ₂ O	
	400 µl Gesättigte o-Dianisidine Lösung	0.01%

Die oben aufgeführten Lösungen werden vor der Stimulierung frisch zubereitet und steril filtriert (49).

Um die Zellen zu stimulieren werden zwei verschiedene Lösungen benötigt: Die Reaktionslösung, im weiteren Text mit RS abgekürzt, bestehend aus Magnesiumdichlorid, Natrium-Pyruvat und DPBS und die Stimulationslösung bestehend aus RS plus Laktat, im weiteren Text mit LS abgekürzt. Mit Hilfe der RS untersuchen wir die Glykolyse der Hepatozyten, wohingegen mit der LS die Gluconeogenese analysiert wird.

Die Stimulationen werden jeweils an Tag 1 und Tag 3 für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Von den Zellen wird das Kulturmedium vorsichtig abgezogen und die Hepatozyten werden mit DPBS gewaschen. Danach werden 400 µl RS oder LS auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden werden die Überstände der Duplikate vorsichtig in ein Eppendorf Röhrchen überführt (49). Zur spektroskopischen Messung werden 100 µl der Überstände in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Diese werden mit 150 µl GLOX Lösung (Inhaltsstoffe siehe oben) bedeckt. Die 96-Loch-Platte muss nun für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert werden, bevor die Überstände mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 420 nm vermessen werden. Anhand einer Glukosestandardkurve (0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 nmol/ml) erfolgt die Konzentrationsbestimmung in den einzelnen Löchern.

2.4.2 Messung des Harnstoffumsatzes (Urea)

Um die Fähigkeit der Hepatozyten zur Neutralisierung von Ammoniak beurteilen zu können (Harnstoffumsatz), werden die Zellen mit der Standard-

Reaktionslösung (U1) (siehe Tabelle 2.8) stimuliert und der Grundumsatz, im nachfolgenden auch als Basalstimulation bezeichnet, bestimmt (50). Auf der nächsten Stufe der Stimulierung wird zur Standard-Reaktionslösung Ammoniak hinzugegeben, um eine mögliche gesteigerte Hepatozyten-Aktivität durch die größere Menge an Ammoniak zu messen, in den Ergebnis-Abbildungen als Ammoniumchlorid (U2) zusammengefasst. Die letzte Stimulationsstufe wird neben Ammoniak zusätzlich durch die Aminosäure Ornithin ergänzt. In den Abbildungen als Ammoniumchlorid plus Ornithin (U3) bezeichnet. Das Ornithin ist ein wichtiger Bestandteil des Harnstoffzyklus. Durch die Hinzugabe wird die Aktivität der Hepatozyten bei der Detoxifikation unterstützt (50).

Tabelle 2.8: Benötigte Lösungen zur Messung des Harnstoffumsatzes (Urea).

1. Reaktionslösung = U1	19 mg MgCl ₂ 2 ml Natrium-Pyruvat Lösung 200 ml DPBS	C _{final} 1 mM 1 mM
2. NH ₄ Cl Lösung (17mg/ml) = U2	17 mg NH ₄ Cl 1000 µl Reaktionslösung	C _{final} 300 mM
3. L-Ornithine Lösung 10 mg/ml = U3	10 mg L-Ornithine 17 mg NH ₄ Cl 1000 µl Reaktionslösung	C _{final} 100 mM 300 mM
4. Harnstoff Standard Lösung (für die Standard Kurve)	10 mg Harnstoff 100 ml ddH ₂ O	C _{final} 100 µg/mL
5. 10% Brij 35 Lösung (für die NED Lösung)	5 g Brij 35 50 ml ddH ₂ O (bei 50°C Auflösen)	C _{final} 30 %
6. o-Phthalaldehyd-Lösung	800 ml ddH ₂ O 74 ml konzentrierte Schwefelsäure 200 mg o-Phthalaldehyd 3 ml 30 % Brij 35 Lösung	C _{final} 7,4 % 0,0002 % 0,03 %

7. NED-Lösung		C _{final}
	600 ml ddH ₂ O	
	222 ml konzentrierte Schwefellösung	22,2 %
	5 g Borsäure	0,5 %
	600 mg N-(1-naphthyl)- ethylenediamin- dihydrochlorid	0,0006 %
	3 ml 30 % Brij Lösung	0,03 %

Für die Bestimmung des Harnstoffs müssen zunächst alle benötigten Lösungen hergestellt werden, wobei die Lösungen U1 – U3 vor jedem Versuch frisch hergestellt und steril filtriert werden. Die Zellen werden mit DPBS gewaschen und mit 400 µl der Lösungen U1 – U3 versetzt.

Die Inkubation erfolgt an Tag 1 und 3 für fünf Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Die Überstände werden in sterilen Eppendorf-Röhrchen gesammelt. 80 µl pro Überstand werden in einer 96-Loch-Platte zur Vermessung pipettiert. Danach werden jeweils 60 µl der o-Phthalaldehyde-Lösung und der NED-Lösung (Inhaltsstoffe siehe oben) auf die Überstände pipettiert. Die 96-Loch-Platte wird für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert bevor die Überstände mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 460 nm vermessen werden (40). Anhand einer Harnstoffstandardkurve (0; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25, 50, 100 µg/ml) erfolgt die Konzentrationsbestimmung in den einzelnen Löchern.

2.4.3 Messung von Laktatdehydrogenase (LDH) und Aspartataminotransferase (AST)

Tabelle 2.9: Benötigte Lösungen zur Messung von LDH und AST.

Name:	Firma:	Artikelnummer:
Kit Fluitest LDH-L	Analyticon Biotechnologie AG	2222
Kit Fluitest AST	Analyticon Biotechnologie AG	1167

Beide Werte werden photometrisch ermittelt (51 / 52). LDH und AST sind intrazelluläre Enzyme und liefern einen Vergleichswert für das Überleben der Zellen unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen. Die Aktivität dieser Enzyme im Kulturüberstand gilt als Maß für erlittenen Zellschaden. LDH ist ein Enzym, das in der Klinik als Hämolyse-, Herzparameter gilt und generell

Zellschäden im Körper anzeigen kann (3). Wohingegen AST als leber-spezifischer Wert gilt.

LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Während dieser Reaktion wird NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ (siehe Abbildung 2.6). Dieses NADH kann durch die photometrische Messung detektiert werden. Der Anstieg von $\text{NADH} + \text{H}^+$ ist proportional zu LDH in der Probe.

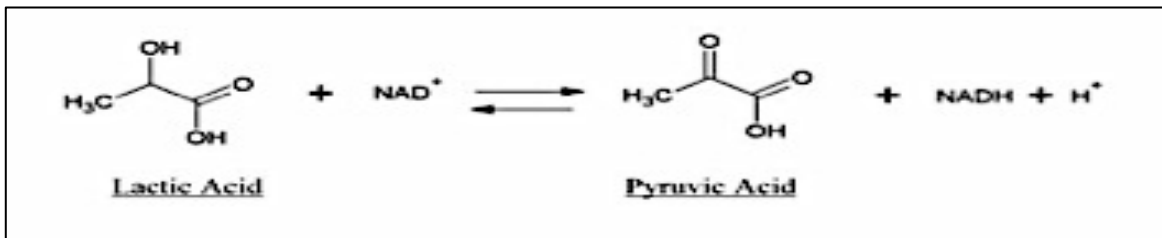


Abbildung 2.6: LDH-Katalisation mit Entstehung des detektierbaren $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Strukturformel für Laktat und Pyruvat (38).

AST katalysiert die Reaktion von Aspartat zu Oxalacetat und Glutamat. Diese Reaktion ist elementar, um das NADH für die Atmungskette zu generieren (3). Hier wird ebenfalls die photometrische Methode zur Detektion des NADH verwendet.

Tabelle 2.10: Mischung der Arbeitslösungen vom LDH- und AST-Assay.

1. Arbeitslösungen	R1 und R2 werden in einem Verhältnis von	C_{final}
(„Working“-Lösungen)	5:1 gemischt	5:1

LDH und AST werden jeweils aus den Medien der Überstände von Tag 1 und 3 bestimmt (51 / 52). Das Medium wird vor der Stimulation der Zellen abpipettiert und in sterile Eppendorf-Röhrchen gegeben.

40 μl des Zell-Überstandes werden in eine 96-Loch-Platte gegeben. Danach werden die beiden „Working“ – Lösungen R1 und R2 in einem Verhältnis von 5:1 miteinander vermischt. Schließlich werden 145 μl der gemischten Lösung in jedes Loch pipettiert, wodurch das Volumen der Gesamtlösung pro Loch 185 μl beträgt, (siehe Formel 2).

Formel 2: Gesamtvolumen der LDH- und AST-Messungen.

$$\text{Volumen (185 } \mu\text{l)} = 145 \mu\text{l „Working“ Lösungen} + 40 \mu\text{l Probe}$$

Die Vermessung erfolgt luftblasenfrei mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm (51 / 52).

2.4.4 Messung des Resazurinumsatzes (Alamar-Blau-Umsatz)

Die Messung von Resazurin dient der Bestimmung der Anzahl lebender Zellen anhand der mitochondrialen Aktivität (53 / 54). Lebende Zellen haben die Fähigkeit, das nicht fluoreszenzierende Resazurin in das sehr stark fluoreszenzierende Resorufin zu reduzieren (siehe Abbildung 2.7). Die entstehende Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl lebender Zellen.

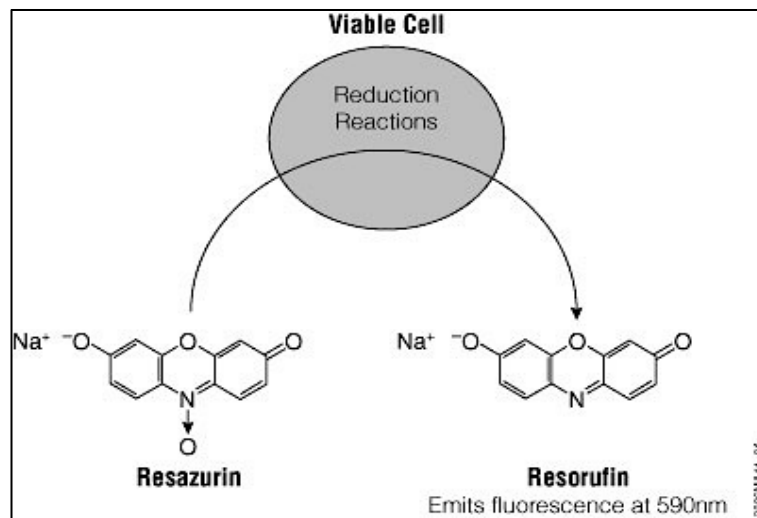


Abbildung 2.7: Reduktion von Resazurin zu Resorufin und Strukturformel für Resazurin und Resorufin (41).

Das Medium wird auch hier für spätere Versuche zunächst in sterile Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Nach dem Waschen der Zell-Modelle mit DPBS werden 500 µl Resazurin (Alamar-Blau) auf die Modelle pipettiert. Nach jeweils 20, 40, 60, 80, 100, und 120 Minuten wird die Aktivität direkt in der 24-Loch-Platte mit Hilfe des Spektralphotometers bei 590 nm vermessen (53 / 54).

Zur Berechnung der gesuchten Aktivität wird die Hintergrund-Aktivität von den gemessenen Werten abgezogen.

2.4.5 Messung der MDR-1 / MRP-1-Transporter Aktivität

Die Transporterleistung wird mit Hilfe eines modifizierten Fluoreszein Assays bestimmt (55). Von den sogenannten ABC – Transportern wird zum einen der Multi-Drug-Resistance-1 (MDR-1) - Transporter und zum anderen der Multi-Drug-Resistance-Related-Protein-1 (MRP-1) - Transporter gemessen.

Die MDR-1-Transporter Aktivität wird mit Hilfe der Umwandlung des P-Glycoprotein-Rhodamine 123, die MRP-1-Transporter Aktivität mit Hilfe der Umwandlung von 5-Carboxy-dichlorofluorescein-diacetat (CFDA) in 5-Carboxyfluorescein (5-CF) bestimmt.

Tabelle 2.11: Benötigte Lösungen zur Messung der MDR-1- / MRP-1-Transporter Aktivität.

1. 5-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetat (CFDA)	5 mg CFDA 236 µl Dimethylsulfoxid	C_{final} 40 mM
2. 5-Carboxyfluorescein (CF)	5 mg CF 332 µl Dimethylsulfoxid	C_{final} 40 mM
3. Rhodamine-123	2 mg Rhodamine 123 175 µl Ethanol	C_{final} 30 mM
4. Glukoselösung	19,8 mg Glukose 10 ml DPBS	C_{final} 11 mM

Die Transporteraktivität wird direkt in der 24-Loch-Platte mit Hilfe des Spektralphotometers vermessen. Für spätere Versuche werden das Medium in Eppendorf-Röhrchen eingefroren und die Zell-Modelle mit DPBS gewaschen. Pro Loch werden 500 µl der verdünnten CFDA- oder Rhodamine-123-Lösung pipettiert. Die Lösungen haben eine Konzentration von 40 mM bei CFDA und 30 mM bei Rhodamin. Damit werden 1,1 µl CFDA oder Rhodamine-123 in 10989 µl Medium gelöst. Die Zellen werden mit dem Substrat im 2D-Modell für 30 Minuten und im 3D-Modell für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS werden die Hepatozyten mit 500 µl DPBS bei 520 nm im Spektralphotometer vermessen. Diese Messung entspricht dem Gesamtwert an CFDA / Rhodamine-123, der von den Zellen aufgenommen wurde. Anschließend wird das DPBS aspiriert und auf die Zellen werden 550 µl der Glukoselösung (Konzentration von 100 mol) gegeben. Dies stimuliert die Freisetzung der fluoreszierenden Farbstoffe und während der einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ werden nach 15, 30 und 60

Minuten jeweils 100 µl der Überstände im Spektralphotometer vermessen. Die gemessenen Werte entsprechen der Abgabe-Aktivität (Efflux) der Transporter. Die Standardkurve wurde mit Hilfe von 5-Carboxyfluorescein und Medium in einer Verdünnungsreihe (0,0015625 / 0,003125 / 0,00625 / 0,0125 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,2 und 0,4 Nanomol pro 100µl) erstellt (55).

2.4.6 Messung der Albumin-Konzentration mit Hilfe des „Human Albumin - ELISA-Quantitation-Set“

Das von den pHH produzierte Albumin wird aus dem Überstand des Kulturmediums mit Hilfe des „Human Albumin-Elisa-Quantitation-Set“ bestimmt (56). Das Prinzip dieses Assays besteht darin, dass mit Hilfe von Antikörpern das gelöste Albumin im Medium detektiert werden kann.

Tabelle 2.12: Benötigte Lösungen zur Messung der Albumin Konzentration mit Hilfe des Elisa-Quantitation-Set.

1. Puffer	Lösung 1 NaHCO ₃ + H ₂ O Lösung 2 Na ₂ CO ₃ + H ₂ O Mit Hilfe von Lösung 2 wird der pH-Wert von Lösung 1 auf 9,6 eingestellt	C _{final} 4,2 g / H ₂ O 5,3 g / H ₂ O
2. Waschlösung	1 g Tween 20 2 l TBS	0,5 g / l TBS
3. TBS	12,11 g Tris 16,36 g NaCl 2 l dest. H ₂ O	12,11 g / 2l 16,36 g / 2l
4. Puffer zum Blocken	10 g Albumin 1 l TBS	10 g / l
5. Proben-Konjugat-Basispuffer	10 g Albumin 0,5 g Tween 20 1 l TBS	10 g / l 0,5 g / l
6. TRIS Puffer	12,1 g Tris 800 ml dest. H ₂ O	100 mM
7. Luminol Lösung	0,88 g Luminol 20 ml DMSO	250 mM
8. p-Cumaräure Lösung	0,15 g p-Cumar 10 ml DMSO	90 mM

9. Lösung A	2,5 ml	100 mM TRIS	
	25 µl	250 mM Luminol Lösung	2.5 mM
	11 µl	90 mM p-Cumarsäure Lösung	0,4 mM
10 Lösung B	2.5 ml	100 mM TRIS	
	3-5 µl	30% H ₂ O ₂ Lösung	0,06 %
11. ECL Lösung für die Lumineszenz Messung	2,5 ml	Lösung A + B	

Alle Lösungen werden mit Hilfe von NaOH und HCL auf den pH Wert 8 eingestellt. Zunächst wird 1 µl Human-Albumin-Coating-Antibody auf 100 µl Coating-Buffer pro Loch einer 96-Loch-Platte verdünnt und hineinpipettiert, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur.

Danach wird die Platte 5-mal mit 100 µl Waschlösung gewaschen und ausgeklopft, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Pro Loch werden nun 200 µl Blocking-Lösung pipettiert und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von fünfmaligem Waschen mit 100 µl Waschlösung. In Reihe 1-3 werden 100 µl Standardlösung pro Loch, bestehend aus Human-Referenz-Serum und Konjugat-Puffer pipettiert. Die Verdünnungsreihe des Standards ist exponentiell. In die restlichen Reihen werden 100 µl der Proben hineinpipettiert. Anschließend wird erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Proben und dem Standard werden 100 µl HRP-Detektionsantikörper pipettiert. Der Antikörper wurde vorab mit Hilfe des Probe-Konjugat-Puffers verdünnt. Nach 1-stündigem Inkubieren bei Raumtemperatur wird die Platte erneut 5-mal gewaschen und ausgeklopft. Die ECL-Lösung wird aufgetragen und anschließend die Albuminkonzentration mit Hilfe des Spektralphotometers bei 450 nm vermessen (56).

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung aus primären humanen Hepatozyten (57)

Tabelle 2.13: Benötigte Lösungen zur RNA-Isolierung aus pHH.

1. DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC 1 l dd H ₂ O → 1h bei 37°C Inkubieren dann autoklavieren	C _{final} 0,1%
2. 70% Ethanol (zum Waschen)	35 ml 99 % Ethanol 15 ml DEPC H ₂ O	C _{final} 70%
3. Glykogen		

Die RNA-Isolation erfolgt in den 24-Loch-Platten. Pro Loch werden 500 µl TriFast auf die Zellen gegeben, um sie zu lysieren. Anschließend werden sie bei minus 20° C für einen Tag eingefroren.

Im nächsten Schritt wird das aufgetaute Zelllysat in ein steriles Eppendorf-Röhrchen pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die RNA, DNA und Proteine zu trennen, werden 100 µl Chloroform pro Röhrchen hinzugegeben. Nach Vermischung und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird das Lysat für 20 Minuten bei 4°C mit 14.000 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden frische Eppendorf-Röhrchen mit 375 µl Isopropanol vorbereitet. Durch die Zentrifugation trennen sich RNA, DNA und Proteine in drei verschiedene Schichten. In der obersten klaren Phase befindet sich die RNA, in der Zwischenphase die DNA und in der untersten trüben Phase sind die Proteine gelöst. Die oberste Phase wird nun vorsichtig in die mit Isopropanol befüllten Röhrchen pipettiert, durchmischt und mit 1 µl Glykogen versetzt. Anschließend werden die Röhrchen für 24 Stunden bei minus 20°C erneut eingefroren.

Die Röhrchen werden nach 24 Stunden auf Eis aufgetaut und für 60 Minuten bei 4°C und 14.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das RNA-Pellet von der Flüssigkeit getrennt und dreimal mit 70%igem Ethanol

gewaschen. Abschließend wird das Zellpellet mit 20 – 50 µl DEPC-H₂O aufgelöst.

Zur Konservierung bis zur weiteren Verarbeitung wird die RNA bei minus 20°C eingefroren.

2.5.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ / $\lambda = 280 \text{ nm}$ liegt die Ratio bei gut gereinigter RNA zwischen 1,8 und 2. Je kleiner die Ratio, umso stärker verunreinigt ist die RNA.

Tabelle 2.14: Benötigte Lösungen zur Photometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.

1. DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC 1 l dd H ₂ O → 1h bei 37°C inkubieren dann autoklavieren	C _{final} 0,1%
--------------------------	--	----------------------------

Vermessen wird die RNA im Spektralphotometer mit Hilfe der „LVis Plate“. Vor der Messung wird die Platte mit Ethanol gereinigt und mit DEPC-H₂O als Grundwert vermessen. Anschließend werden das DEPC-H₂O entsorgt und jeweils 2 µl der zu vermessenden Proben auf die entsprechenden Positionen gegeben. Die Konzentration ist in µg/µl angegeben (58).

2.5.3 Agarosegelelektrophorese / RNA-Integrity-Check

Horizontale Agarosegele werden zur analytischen Trennung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dabei werden der Größe nach die einzelnen Bestandteile der RNA und DNA getrennt. Nach Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im TBE-Puffer durch die Poren des Gels zum positiven Pol.

Das hinzugefügte Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäure und dient der Visualisierung der DNA/RNA unter der UV-Licht-

Kamera. Konzentration und Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren werden mit Hilfe eines aufgetragenen Größenmarkers bestimmt.

Vor der c-DNA-Synthese, siehe Kapitel 2.5.4, wird überprüft, ob RNA in der Probe vorhanden ist. Dies wird mit Hilfe des sogenannten RNA-Integrity-Check überprüft (59).

Tabelle 2.15: Benötigte Lösungen zur Agarosegelelektrophorese / RNA-Integrity-Check.

1. DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC 1 l dd H ₂ O → 1h bei 37°C inkubieren dann autoklavieren	C _{final} 0,1%
2. 10 X TBE	540 g TRIS 275g Borsäure 37,3 g EDTA	C _{final} 0,89 M 0,89 M 20 mM

1. Herstellung des Agarosegels:

Zunächst wird die Elektrophoresekammer mit dem eingelegten Gel-Kamm vorbereitet. Dann werden zwischen 1,5 – 2 g Agarose abgewogen in ein hitzebeständiges Gefäß gegeben, anschließend 100 ml 1X TBE hinzugegeben und für maximal drei Minuten in der Mikrowelle bei ca. 600 Watt aufgeköcht bis die Agarose sich komplett aufgelöst hat. Danach werden 7 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das flüssige Gel direkt in die Kammer gegossen. Nach ca. 20-30 Minuten ist das Gel polymerisiert, so dass der Kamm entfernt und das Gel in die mit TBE gefüllte Kammer überführt werden kann.

2. Durchführung des Integrity Check:

Um die vorhandene RNA zu überprüfen, werden direkt nach Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration die RNA Proben mit Hilfe des Agarosegels, aufgetrennt, wobei der Größenstandard in die erste Geltasche pipettiert wird. Durch Anlegen einer Spannung von 90 Volt an die geschlossene Elektrophoresekammer für 45 Minuten werden die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die entstandenen Nukleinsäurebanden werden unter einer UV-Kamera (312 nm) sichtbar gemacht und fotografiert (59 / 60).

2.5.4 c-DNA-Synthese

Bei der c-DNA-Synthese wird die RNA in den komplementären DNA-Strang umgeschrieben. Dies geschieht mit Hilfe der Oligo- und Random-Primer, die die komplementären Abschnitte auf der RNA binden. Das Enzym Reverse-Transkriptase komplettiert mit Hilfe der Nukleotide (dNTPs) den DNA-Strang. Durch die Zugabe von Ribolock, eines RNase Inhibitor, werden Enzyme gehemmt, die die RNA verdauen (59 / 60).

Tabelle 2.16: Benötigte Lösungen für die c-DNA-Synthese.

1. DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC 1 l dd H ₂ O → 1h bei 37°C inkubieren dann autoklavieren	C _{final} 0,1%
2. Mastermix cDNA (für 11 Proben)	44 µl Reaktion Buffer 22 µl dNTP Mix 22 µl MNCV 11 µl Ribolock	

Es wurde das „First Strand c-DNA-Synthesis-Kit“ der Firma Thermo Scientific (K1621 / K1622) verwendet (60). Nach Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und des RNA-Integrity-Check wird die RNA in c-DNA umgeschrieben (59 / 60). Dann wird zunächst die Konzentration der Proben berechnet, um eine Endkonzentration von 10 ng/ml einzustellen (siehe Formel 3).

Formel 3: Berechnung der Proben-Konzentration für die c-DNA-Synthese.

$$\frac{C}{P_{ges}} = V1 \rightarrow \frac{V1}{10 \text{ ng/ml}} = V2 \rightarrow V2 \times 20 = V_{ges} \rightarrow V_{ges} - P_{ges} = A$$

C = Konzentration Nukleinsäure

P_{ges.} = Probe Gesamtvolumen

→ 9 µl Probe + 1 µl Random- und Oligo-Primer + 9 µl MasterMix c-DNA

V_{ges.} = Gesamtvolumen → Probe + DEPC-H₂O

A = Anteil DEPC-H₂O zur Verdünnung

Danach werden aus jeder Probe 9 µl aspiriert und in ein frisches Eppendorf-Röhrchen gegeben und je Probe werden 1 µl Random-Primer und 1 µl Oligo-Primer hinzugegeben. Die Eppendorf-Röhrchen werden für fünf Minuten in den Cyclyer bei 95 Grad Celsius inkubiert (siehe Abbildung 2.8). Anschließend werden 9 µl des MasterMix der c-DNA hinzupipettiert und erneut in den Cyclyer gegeben (siehe Abbildung 2.8 – Quelle: Siegfried-Weller-Institut (SWI)).

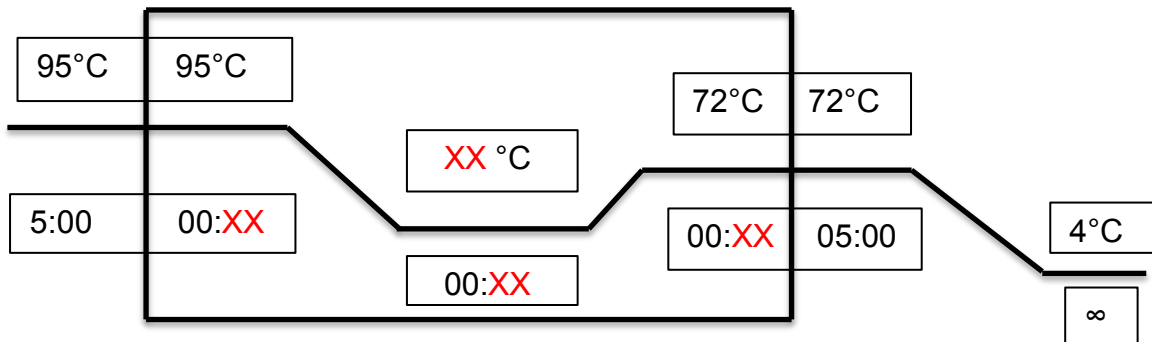


Abbildung 2.8: Cyclyer-Grundschem: In den rot markierten Felder werden, abhängig von den Primern, die Temperatur und Durchläufe eingetragen. Die im schwarzen Kasten markierten Zyklusphasen wiederholen sich entsprechend dem Primer (SWI).

In den rot markierten Feldern werden, abhängig von den Primern, die Temperatur und Durchläufe eingetragen. Die jeweiligen Werte sind in Kapitel 2.1.2 und 2.5.6 dargestellt. Die im schwarzen Kasten markierten Zyklusphasen wiederholen sich entsprechend dem Primer.

Im ersten Schritt des Cyclyer-Schemas kommt es zur Denaturierung der RNA bei 95 Grad Celsius. Danach lagern sich die Primer komplementär an die entsprechende Ziel-Sequenz an, „primer annealing“ genannt. Bei der Elongation oder auch Transkription füllt die Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Der letzte Schritt, die Amplifikation, bezeichnet die Vermehrung der gewonnenen Abschnitte (61).

2.5.5 PCR des Housekeeping-Gens GAPDH und Cytochrom P 450

Anhand der c-DNA werden mit Hilfe von Primern das Housekeeping-Gen GAPDH und die verschiedenen Cyp-Gene sequenziert.

Folgende Cytochrome P 450 wurden detektiert:
 Cyp 1A1 / Cyp 1A2 / Cyp 3A4 / Cyp 2B6 / Cyp 2C8 / Cyp 2C9 / Cyp 2E1

Tabelle 2.17: Benötigte Lösungen für die PCRs.

1. DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC 1 l dd H ₂ O → 1h bei 37°C inkubieren dann autoklavieren	C _{final} 0,1%
2. 10x TBE	108 g Tris Base 55 g Borsäure 40 ml EDTA → pH 8 852 ml ddH ₂ O	0,5 M
3. 1x TBE	100 ml 10x TBE 900 ml ddH ₂ O	

Nach der c-DNA-Synthese werden die Proben durch Vorlage von DEPC-H₂O auf 10 ng/μl verdünnt (siehe Formel in Kapitel 2.5.4). Insgesamt werden 10 Messproben plus eine Negativkontrolle, hier DEPC-H₂O, und eine Positivkontrolle, hier c-DNA, von unbehandelten primären humanen Hepatozyten vermessen.

Je Messung werden 10 μl ReadyMix, je 1 μl Forward- / Reverse-Primer, 6 μl DEPC-H₂O und jeweils 2 μl der zu messenden Probesubstanz hinzugegeben. Die Röhren werden in den Thermocycler gegeben (siehe Kapitel 2.5.4). Die Proben werden bei den jeweiligen Temperaturen und Cycles (siehe Tabelle 2.18 - Quelle: Siegfried-Weller-Institut (SWI)) sequenziert.

Nach Sequenzierung werden in die erste Tasche des vorbereiteten Gels (siehe Kapitel 2.5.3) 3 μl des Größenmarkers (PUC 19) und in die restlichen Taschen jeweils 9 μl der verschiedenen Proben pipettiert. Bei geschlossener Elektrophoresekammer wird eine Spannung von 90 Volt über 45 Minuten angelegt. Die entstandenen Nukleinsäurebanden werden unter der UV-Kamera (312 nm) visualisiert und fotografiert (59 / 60).

Tabelle 2.18: PCR-Daten der getesteten Cytochrom P 450-Enzyme (SWi).

Cyp	Template (µL)	T (°C)	Cycles	Größe (BP)
1A1	3	55	35x 15'/15'/10'	302
1A2	3	60	35x 15'/15'/10'	180
2B6	3	62	35x 15'/15'/10'	283
2C8	3	60	35x 15'/15'/10'	147
2C9	3	59	35x 15'/15'/10'	308
2E1	8	59	35x 15'/15'/10'	296
3A4	8	64	35x 15'/15'/10'	314

Alle Cyp-Genexpressionen werden bei 10 ng/µl auf das Housekeeping-Gen GAPDH normalisiert (60).

2.6 Immunfluoreszenz – Färbung zur Charakterisierung der Zellmorphologie

Die Immunfluoreszenz-Färbung ist eine Technik zur Darstellung biologischer Strukturen mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops. Diese Technik nutzt die Spezifität von Antikörpern, um damit Antigene, also biomolekulare Ziele, zu detektieren (62).

In diesem Projekt dient die Immunfluoreszenz-Färbung der Charakterisierung der Zellmorphologie. Diese Methode wurde sowohl an der Leberkrebszelllinie HuH-7, auf dem 2D-, 3D-, 8,2 kPa- und 24 kPa Modell, als auch an den primären humanen Hepatozyten, auf den vier genannten Modelle plus dem Modell der gesunden Leber (3,5 kPa), durchgeführt. Genaueres zur allgemeinen Funktionsweise dieser Methode ist in Kapitel 3.2.3 ausgeführt.

Tabelle 2.19: Benötigte Lösungen zur Immunfluoreszenz – Färbung (62).

1. Paraformaldehyd Lösung	12 ml	37% ige Formaldehyd Lösung	C _{final} 4%
	88 ml	DPBS	
2. BSA – Puffer zum Blocken	0,5 g	BSA	1%
	50 ml	DPBS	
3. Antikörper Lösung	1 ml	1%ige BSA Lösung	1:500
	2 µl	jeweiligen Antikörper	

Die Hepatozyten werden mit 4%iger Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert (2D für 5 Minuten, 3D für 30 Minuten) und anschließend werden die Hepatozyten mit DPBS in drei Durchgängen jeweils für 5 Minuten beim 2D-Modell und für 30 Minuten bei den 3D-Modellen gewaschen. Die Lagerung kann anschließend bei 4°C für bis zu vier Wochen erfolgen.

Für eine Detektion mit Antikörpern werden die Hepatozyten in einer 1%igen BSA-Lösung für eine Stunde inkubiert. Dieser Schritt verhindert unspezifische Antikörperbindungen. Anschließend wird der erste Antikörper (ZO-1 oder Vimentin) in einer Verdünnung von 1:500 in 1%iger BSA-Lösung auf die Hepatozyten pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 24 Stunden werden die Modelle erneut in drei Durchgängen gewaschen (siehe oben). Anschließend wird der Zweit-Antikörper, Anti-Rabbit, Phalloidin oder Hoechst (DAPI), ebenfalls in einer Verdünnung von 1:500 auf die Hepatozyten pipettiert und für eine Stunde erneut bei 4°C auf den Zellen belassen. Nach dem erneuten Waschgang können die Proben auf einem Objektträger eingedeckelt werden (62+eigene Ergänzung). Visualisiert und fotografiert werden die Proben mit Hilfe des Immunfluoreszenz-Mikroskops, ausgewertet mit Hilfe von ImageJ.

2.7 Statistische Auswertung der Versuche

Sowohl die rechnerische Auswertung als auch die Darstellung der Ergebnisse wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Microsoft Excel 2011 durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm GraphPad-Prism. Dazu wurden die Ergebnisse mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Zur Überprüfung möglicher Signifikanzen wurden der Kruskal-Wallis-Test oder der Test „One-Way Analysis of variance“ angewendet. Damit wurden die Ergebnisse auf signifikante und nicht signifikante Unterschiede hin getestet. Die statistische Auswertung geht von einer Nullhypothese aus, bei der die unterschiedlichen Ergebnisse nur als Zufälligkeiten betrachtet werden. Die Signifikanzen geben an, wie unwahrscheinlich die Nullhypothese ist. GraphPad-Prism gibt dabei drei unterschiedliche P-Werte an.

P-Wert (*) < 0,05 P-Wert (**) < 0,01 P-Wert (***) < 0,002

Falls eine Signifikanz vorliegt, wird dies beim jeweiligen Graph durch die zu den P-Werten gehörige Anzahl der Sterne gekennzeichnet.

Auswertung und Bearbeitung der Immunfluoreszenz-Bilder und PCR-Daten erfolgte mit ImageJ. Bei den Immunfluoreszenz-Bildern wurde mit Hilfe von ImageJ jeweils ein Overlay von drei Einzelbildern gebildet. Die PCR-Daten wurden auf das Housekeeping-Gen GAPDH normalisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Literaturrecherche und Evaluation der Polyacrylamidgele mit Hilfe der Atomic-Force-Mikroskopie

Zunächst wurde durch eine Literaturrecherche die Steifigkeit einer gesunden, einer fibrotischen und einer zirrhotischen Leber evaluiert. Beispielhaft sind in Abbildung 3.1 die mittels Micro-Fiber-Scan gemessenen Werte dargestellt. F0 entspricht einer gesunden, F2 einer fibrotischen Leber, Grad 2, und F4 einer zirrhotischen Leber.

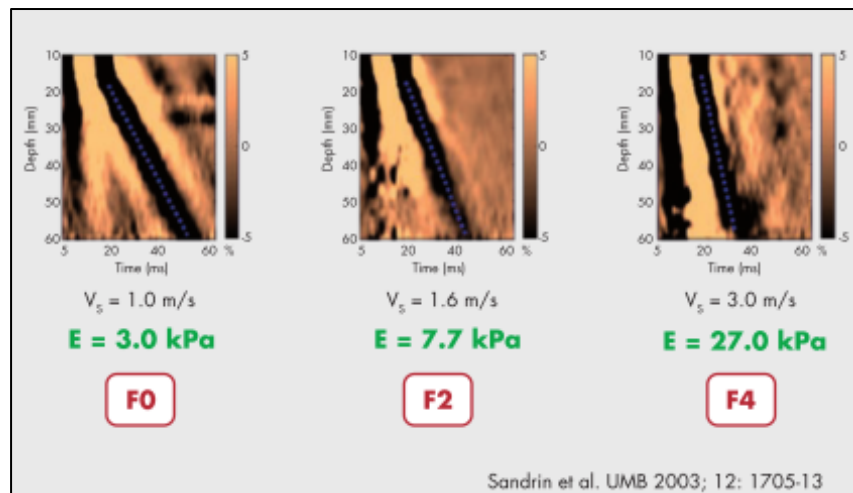


Abbildung 3.1: Beispiel einer Micro-Fiber-Scan Messung (47).

Bei diesem Verfahren werden durch einen, der herkömmlichen Sonographie ähnlichen, Schallkopf mechanische Stoßwellen über die Thoraxwand in die Leber abgegeben. Gemessen wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit. „Je steifer, d.h. fibrotischer, das Lebergewebe ist, desto rascher ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Stoßwelle. Höhere Geschwindigkeit (V_B) entspricht einer höheren Steifigkeit, die in kPa gemessen wird“ (63).

Die hergestellten Gele, die für die durchgeführten Versuche verwendet wurden, haben für die gesunde Leber eine Steifigkeit von 3,5 kPa, für die fibrotische 8,2 kPa und für die zirrhotische 24 kPa.

Diese drei Steifigkeiten wurden gewählt, da sie neben dem gesunden Zustand (3,5 kPa) auch die beiden Steifigkeiten der häufigsten morphologischen Veränderung der Leber, der Fibrose (8,2 kPa) und der Zirrhose (24 kPa)

widerspiegeln. Gemäß Literaturrecherche wurden die zugehörigen Entitäten am häufigsten genannt (47 / 1). Im Vergleich hierzu zeigt das Standardkulturmodell 2D eine Steifigkeit im Bereich von Gigapascal und das herkömmliche 3D Modell ohne PAA Gel eine Steifigkeit von ca. 0,7 kPa.

Die Steifigkeit der Gele wurde in Zusammenarbeit mit dem Physikalischen Institut der Universität Tübingen mit Hilfe eines „Atomic-Force-Mikroskope“ (AFM) überprüft (1). Insgesamt wurden für die Vermessung der Gelsteifigkeit zweimal (N=2) drei Gele hergestellt und mit dem AFM untersucht. Jedes Gel wurde mit Hilfe eines Gitternetzes mit einer Fläche von 32 x 32 Punkten (insgesamt n=1024 Messpunkte pro Gel) vermessen.

Die Ergebnisse der Messungen sind nachfolgend in Abbildung 3.2 graphisch dargestellt.

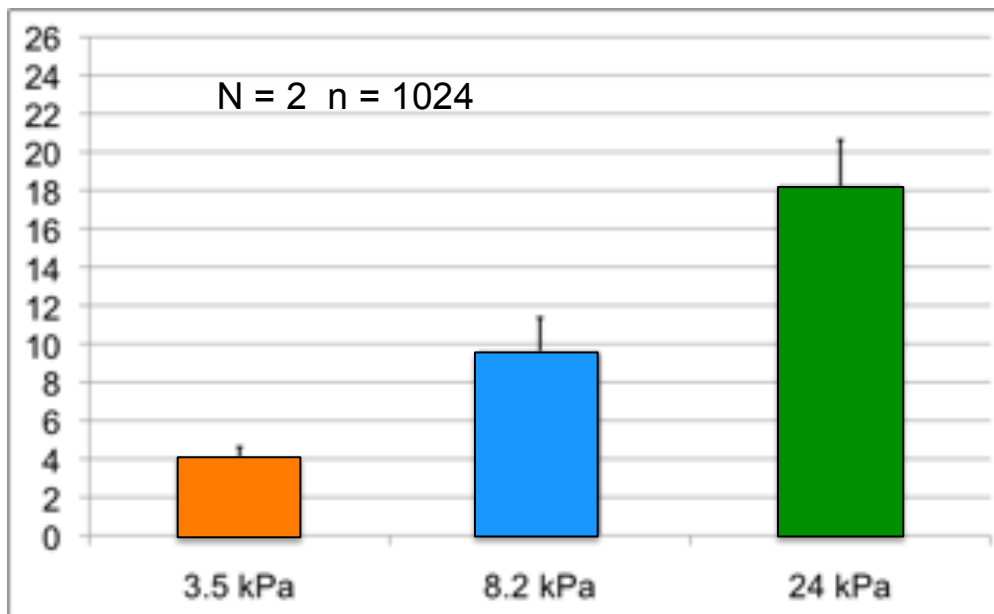


Abbildung 3.2: Messungen mit dem AFM. Jedes Gel wurde mit einer Fläche von 32x32 Punkten (insgesamt 1024 Messpunkte pro Gel) vermessen.

3.2 Überprüfung der Zellkulturkompatibilität der Polyacrylamidgele anhand der HuH-7 Zelllinie

Zur Prüfung der Zellkulturkompatibilität wurden verschiedene standardisierte Assays an der HuH-7 Zelllinie eingesetzt, und zwar nach Tag 1 und 3 sowohl an den beiden für Vergleichszwecke verwendeten Standardmodellen 2D und 3D wie auch am Modell der gesunden (3,5 kPa), fibrotischen (8,2 kPa) und der zirrhotischen (24 kPa) Leber.

3.2.1 Messung der HuH-7 Viabilität auf den Polyacrylamidgelen

Zur Evaluation der HuH-7 Viabilität unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (2D, 3D, 3,5 kPa, 8,2 kPa, 24 kPa) wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase und der Aspartataminotransferase im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Parameter wurden in drei verschiedenen Versuchspassagen der HuH-7 Zelllinie an Tag 1 sowie an Tag 3 gemessen.

Laktatdehydrogenase-Aktivität

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, das nach einer Zellschädigung im extrazellulären Raum vorliegt. In der Klinik wird dieser Parameter als Indikator für das Vorliegen einer Zellschädigung, zum Beispiel bei Hämolyse oder Myokardinfarkt, gewertet (Normwert: 135 – 235 Units pro Liter) (64). *In vitro* wurde dieser Parameter verwendet, um eine Aussage bezüglich der Überlebensrate der Zellen und der Zellschädigung auf den Polyacrylamidgelen zu treffen (51). Die LDH-Aktivität wird in Prozent angegeben. Der 100%-Wert gilt als der Wert, bei dem alle Zellen im vermessenen Lysat geschädigt sind.

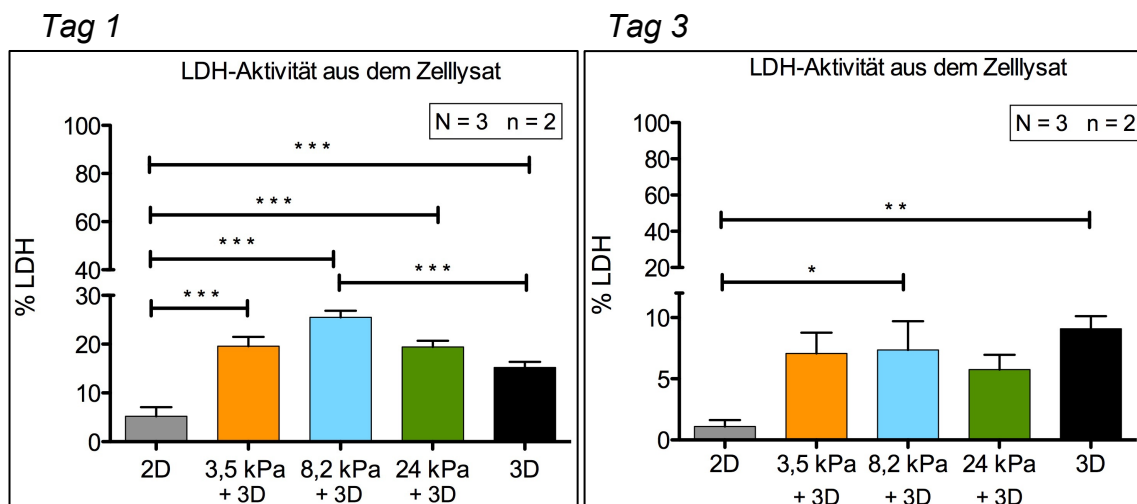


Abbildung 3.3: Gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen, angegeben in Prozent. Der 100%-Wert gilt als der Wert, bei dem alle Zellen im vermessenen Lysat tot sind. Dieses Lysat wird als Nullwert genommen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

An Tag 1 zeigen sich unter den 3D-Kultivierungsbedingungen mehr geschädigte Zellen als beim 2D-Modell (Abbildung 3.3). Das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) zeigt den stärksten Zellschaden mit fast 30%.

Die Modelle der gesunden (3,5 kPa) und der zirrhotischen Leber (24 kPa) zeigen einen ähnlich hohen Zellschaden, wohingegen das 2D-Modell den geringsten Zellschaden verursacht. Über die Dauer der Kultivierung bis Tag 3 sinkt die Zellschädigung bei allen Modellen, beim 2D-Modell am wenigsten (Abb. 3.3 – Tag 3). Die höchste Zellschädigung weist das 3D-Modell auf, bei signifikantem Unterschied zum 2D-Modell. Die Modelle der gesunden und der fibrotischen Leber haben tendenziell das gleiche Ausmaß an Zellschädigungen. Im Vergleich zu Tag 1 ist eine Reduzierung >10% zu beobachten. An Tag 3 zeigt das Modell der zirrhotischen Leber den geringsten Zellschaden unter den 3D-Modellen.

Da jedoch die Beurteilung der Leberzellschädigung allein durch die Messung der LDH als leberspezifischem Parameter nicht akzeptiert wird, wurden die erzielten Ergebnisse nochmals durch die Messung der Aspartataminotransferase validiert.

Aspartataminotransferase-Aktivität

Die Aspartataminotransferase (AST) ist ein Enzym, das zur Gruppe der Transaminasen gehört und speziell bei Leberzellschädigungen erhöht ist. AST ist wie LDH ein Wert, der auch in der Klinik eine wichtige Rolle bei Zellschädigungen spielt (Normwert 1–50 Units pro Liter) (65). Neben der Hepatozyten-Schädigung gilt dies auch bei Herzmuskel- und Skelettmuskelschädigungen.

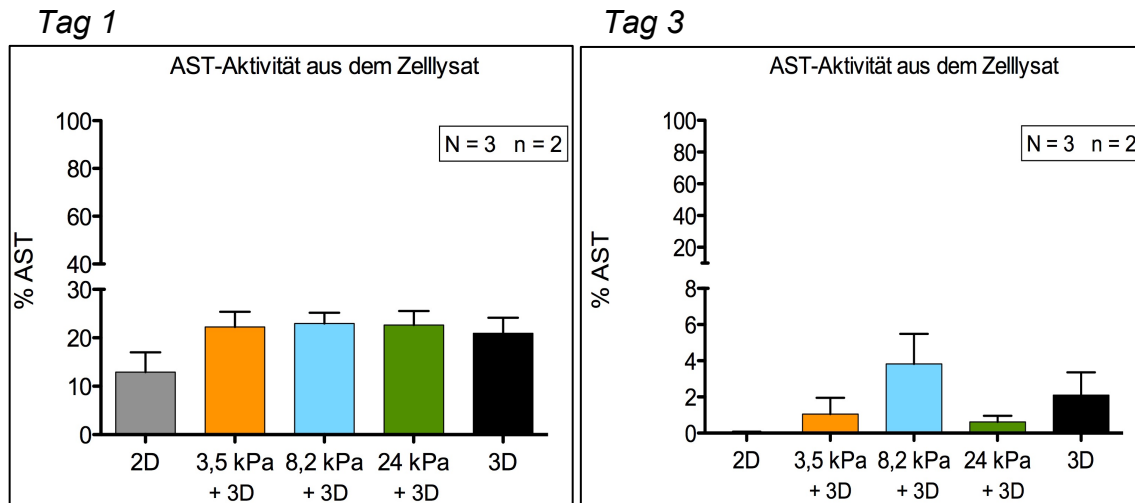


Abbildung 3.4: Gemessene AST-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen, angegeben in Prozent. Der 100%-Wert gilt als der Wert, bei dem alle Zellen im vermessenen Lysat tot sind. Dieses Lysat wird als Nullwert genommen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

An Tag 1 besteht die geringste Zellschädigung im 2D-Modell (Abb. 3.4). Die 3D-Modelle weisen alle tendenziell den gleichen Zellschaden auf. Bei Tag 1 LDH (Abb. 3.3) und Tag 1 AST (Abb. 3.4) ist die Zellschädigung fast identisch. Die AST-Aktivität reduziert sich an Tag 3 im Vergleich zu Tag 1 in allen fünf Modellen (Abb. 3.4), wohingegen unter 2D-Bedingungen und dem Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) fast keine Zellschädigung mehr nachweisbar ist. Die stärkste Zellschädigung ist im Modell der fibrotischen Leber messbar. Interessanterweise zeigt sich bei den Messungen der AST-Aktivität eine geringere Zellschädigung als bei der LDH-Aktivität.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die weiterentwickelten 3D – Modelle zumindest im Vergleich zum Standard 3D-Modell keinen größeren Zellschaden bewirken.

3.2.2 Evaluierung der metabolischen Aktivität

Nach der Überprüfung der HuH-7 Biokompatibilität, stellt sich die Frage nach der metabolischen Aktivität der HuH-7 Zellen unter den verschiedenen Bedingungen. Als Parameter wurden hierfür die Fähigkeit der Hepatozyten zur Glykolyse, Gluconeogenese und Detoxifikation durch die Messung der Harnstoffneubildung herangezogen.

Messung des Glukosemetabolismus

Zum Einen wurde der Abbau der vorhandenen Glukose, die sogenannte Glykolyse, bestimmt und zum Anderen der Anteil neuproduzierter Glukose, die sogenannte Gluconeogenese. Durch die Glykolyse wird der Abbau von Glukose in Pyruvat sichergestellt und Adenosintriphosphat (ATP), als Energiequelle des Körpers, gebildet (66). Wohingegen bei der Gluconeogenese aus verschiedenen Substraten neue Glukose hergestellt wird. Die Glykolyse- und Gluconeogenese-Aktivität der HuH-7 Zellen wurde an drei verschiedenen Zellpassagen jeweils nach einer 24-stündigen Stimulation an Tag 1 und Tag 3 bestimmt.

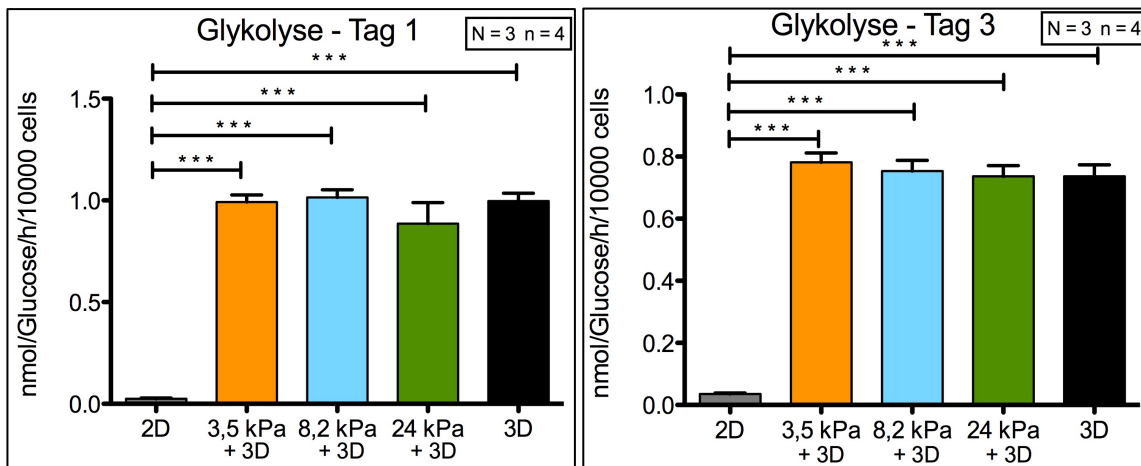


Abbildung 3.5: Gemessene Glykolyse an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen, angegeben in Nanomol Glukose pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Reaktionslösung (siehe Kapitel 2.4.1) wurde über 24 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

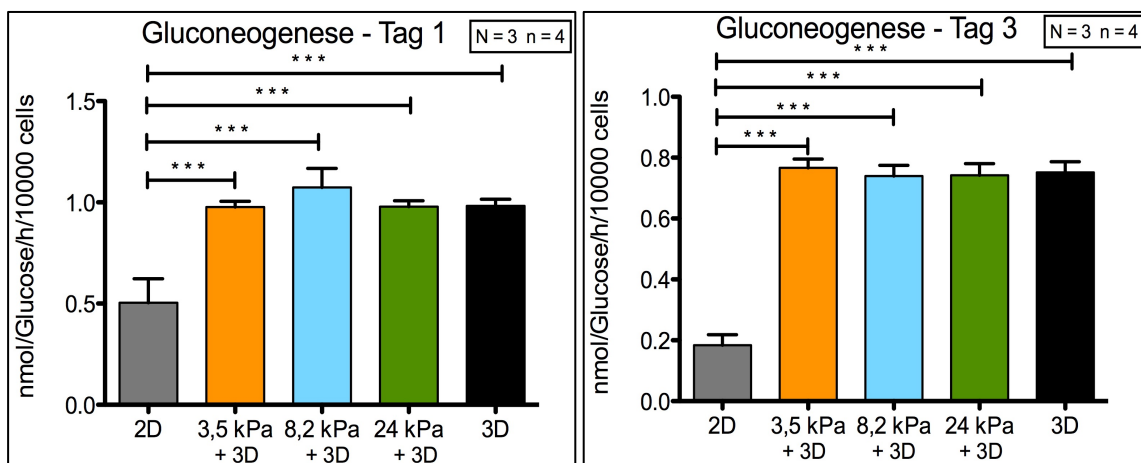


Abbildung 3.6: Gemessene Gluconeogenese an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen, angegeben in Nanomol Glukose pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Laktatlösung (siehe Kapitel 2.4.1) wurde über 24 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Es ist hoch signifikant, dass an beiden Tagen (Tag 1 und Tag 3) sowohl bei der Glykolyse als auch bei der Gluconeogenese alle vier 3D-Modelle eine höhere Aktivität aufweisen als das 2D-Modell (Abb. 3.5 und 3.6).

An Tag 1 weist das Modell der gesunden (3,5 kPa) und der fibrotischen (8,2 kPa) Leber zusammen mit dem 3D-Modell die höchste Glykolyse-Aktivität auf (Abb. 3.5). Das Modell der zirrhotischen Leber hat unter den 3D-Modellen die schwächste Aktivität. An Tag 3 der Glykolyse-Aktivität ist tendenziell eine Absenkung der Aktivität proportional zum Anstieg der Steifigkeit feststellbar (Abb. 3.5). Das reine 3D-Modell hat unter allen 3D-Modellen die schwächste Aktivität. Die stärkste Glykolyse-Aktivität an Tag 3 zeigt das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa).

An Tag 1 der Gluconeogenese ist zwischen den Kultivierungsmodellen kaum ein Unterschied zu detektieren (Abb. 3.6). Das Modell der fibrotischen Leber zeigt unter den 3D-Modellen die stärkste Aktivität an Tag 1.

Am dritten Tag der Gluconeogenese ist bei allen vier 3D-Modellen kaum ein Unterschied messbar. Jedoch hat das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) bei der Gluconeogenese-Aktivität eine minimal höhere Aktivität zu den restlichen 3D-Modellen und ist damit das Modell mit der höchsten Aktivität (Abb. 3.6), wenngleich auch keine Signifikanz zu erkennen ist.

Messung des Harnstoffmetabolismus

Die Basalstimulation, Ammoniumchlorid-Stimulation und die Ammoniumchlorid plus Ornithin-Stimulation wurden an vier verschiedenen Zellpassagen jeweils nach einer fünfstündigen Stimulation an Tag 1 und Tag 3 bestimmt. Sie wurde auf fünf Stunden begrenzt, da Vortests gezeigt haben, dass eine längere Dauer toxisch wirkt.

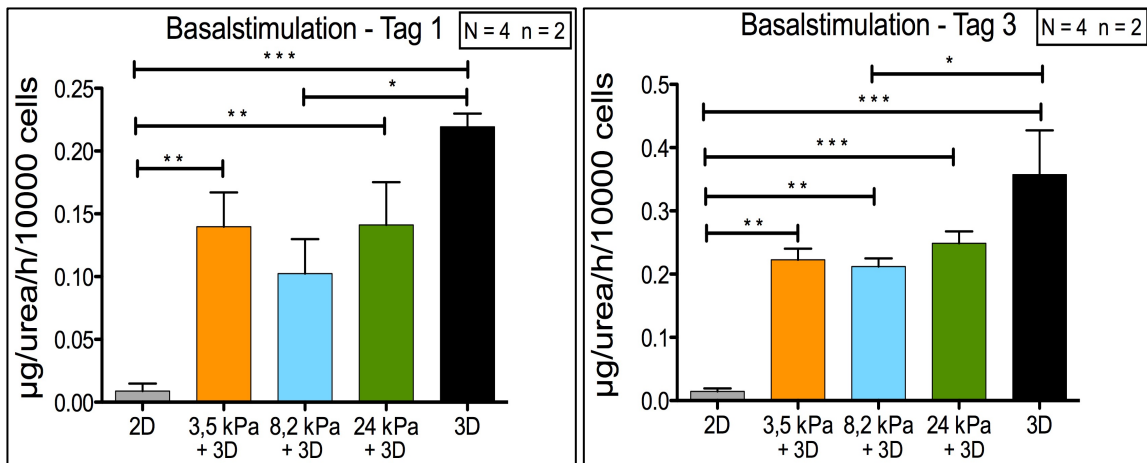


Abbildung 3.7: Gemessene Basalstimulation an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Reaktionslösung (siehe Kapitel 2.4.2) wurde über 5 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die Aktivität der Basisdeammonisierung ist an Tag 1 und an Tag 1 in den 3D-Modellen stärker als im 2D-Modell (Abb. 3.7). In den Modellen der gesunden (3,5 kPa), der zirrhotischen Leber (24 kPa) und im reinen 3D-Modell ist die Aktivität an Tag 1 im Vergleich zum 2D-Modell signifikant erhöht. Das 3D-Modell mit der geringsten Aktivität ist das der fibrotischen Leber. Die höchste Aktivität der Basisdeammonisierung an Tag 1 hat das 3D-Modell. Das Modell der gesunden (3,5 kPa) und der fibrotischen Leber (8,2 kPa) haben an Tag 3 tendenziell gleich starke Aktivitäten. Die stärkste Aktivität an Tag 3 weist das 3D-Modell auf (Abb. 3.7). Im Vergleich zwischen Tag 1 und Tag 3 bestehen nur geringe Unterschiede. Das 2D-Modell bleibt über die Dauer konstant, die 3D-Modelle weisen eine geringe Steigerung der Aktivität auf.

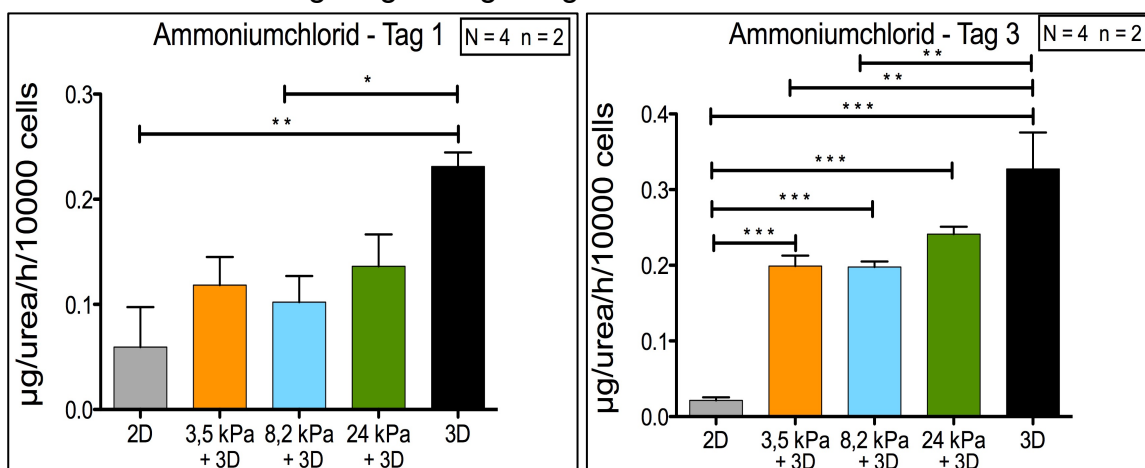


Abbildung 3.8: Gemessene Ammoniakmenge nach 5-stündiger Stimulation mit Reaktionslösung plus Ammoniumchlorid (siehe Kapitel 2.4.2) an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die Ammoniumchlorid-Stimulation fällt beim reinen 3D-Modell an Tag 1 gegenüber dem 2D-Modell signifikant höher aus (Abb. 3.8). An beiden Tagen weisen die 3D-Modelle eine höhere Aktivität auf als das 2D-Modell, die höchste Aktivität besitzt das reine 3D-Modell. An Tag 3 ist bei den 3D-Modellen gegenüber dem 2D-Modell die erhöhte Aktivität signifikant, wohingegen das reine 3D-Modell höhere Werte aufweist. Die Aktivität in den 3D-Modellen ist an Tag 3 deutlich höher als an Tag 1. Im 2D-Modell reduziert sich die Aktivität über die Zeit. Zwischen der Basalstimulation (Abb. 3.7) und der Ammoniumchlorid-Stimulation (Abb. 3.8) nimmt die Aktivität der Hepatozyten an Tag 1 durch die ergänzende Stimulation mit Ammoniak (Abb. 3.8) im Vergleich zur Basalstimulation ab, die Aktivitäten beider Stimulationen (Abb. 3.7 + 3.8) an Tag 3 weisen dagegen kaum Unterschiede auf.

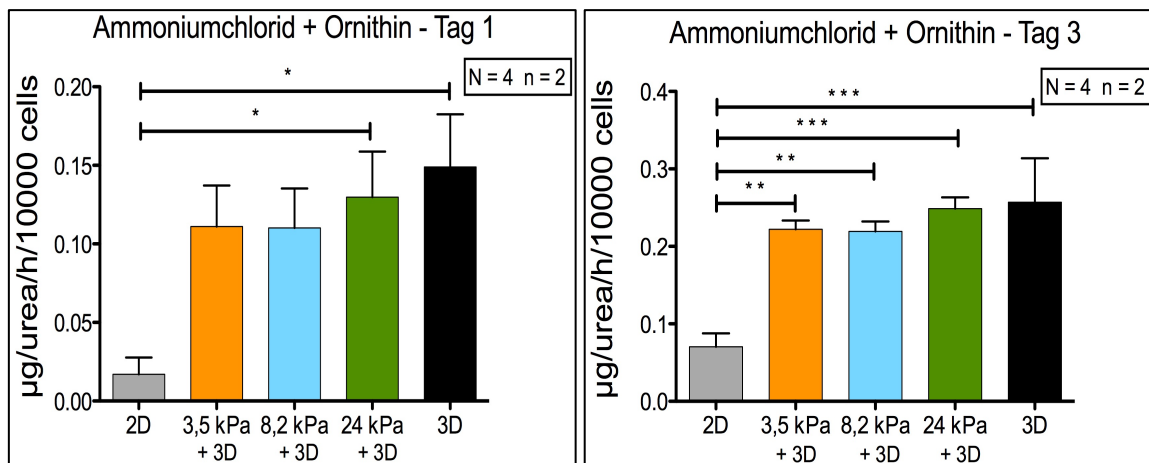


Abbildung 3.9: Gemessene Ammoniakmenge nach 5-stündiger Stimulation mit Reaktionlösung plus Ammoniumchlorid und Ornithin (siehe Kapitel 2.4.2) an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

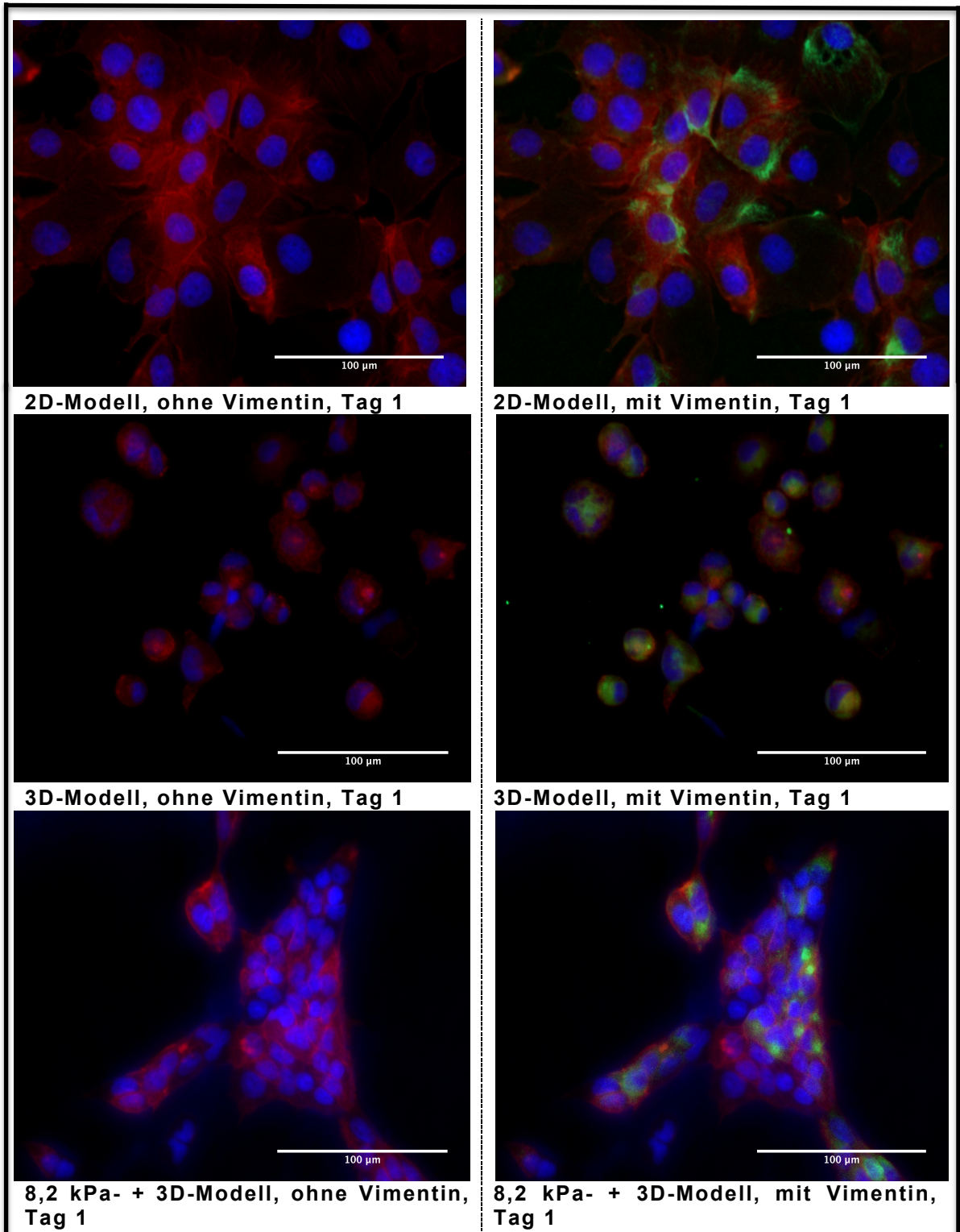
Auch bei der Erweiterung der Stimulation mithilfe von Ornithin weisen alle vier 3D-Modelle sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 im Vergleich zum Standardmodell 2D eine erhöhte Aktivität auf (Abb. 3.9). An Tag 1 ist die erhöhte Aktivität des zirrhotischen- (24 kPa) und des reinen 3D-Modells im Vergleich zum 2D-Modell signifikant. An Tag 3 fallen alle 3D-Modelle in ihrer Aktivität im Vergleich zum Standardmodell 2D höher aus. An beiden Tagen hat das reine 3D-Modell die höchste Aktivität. Auch hier ist die Aktivitätsverteilung sehr ähnlich zu den beiden vorherig dargestellten Stimulationen, Basal (Abb. 3.7) und Ammoniumchlorid (Abb. 3.8).

3.2.3 Darstellung der HuH-7 Zellmorphologie

Über die Dauer der Kultivierung verändern sich die Polarität und die Morphologie der Zellen. Die Hepatozyten auf dem 2D-Modell erwerben nach kurzer Zeit eine fibroblasten-ähnliche Form wohingegen die Hepatozyten auf dem 3D-Modell ihre kubische Form über eine längere Zeit behalten (67). Um die Frage zu beantworten, wie sich die Hepatozyten auf den neuen Kultivierungsmodellen morphologisch verändern, wurden die HuH-7 Zellen mit verschiedenen Immunfluoreszenzfarbstoffen eingefärbt. Verglichen wurden hier 2D-, 3D-, 8,2 kPa- und 24 kPa-Modelle. Es existieren verschiedene Farb-Antikörper, welche unterschiedliche Zellstrukturen markieren. Bei jeder Färbung wurde der Farbstoff Hoechst (Dapi) verwendet um die Zellkerne anzufärben. Er lagert sich in doppelsträngige DNA, auf den Bildern erscheinen die Zellkerne dadurch blau. Der Antikörper F-Aktin lagert sich zwischen die F-Aktin-Fasern, welcher ein Strukturprotein des Zytoskeletts und gleichzeitig ein Hauptbestandteil des Gallengangkanälchens ist (68). Da der Antikörper mit einem Farbstoff gekoppelt ist, werden die Fasern sichtbar.

Mehrere aneinander gereihte Aktin-Proteine bilden das F-Aktin, das zur Stabilisierung der äußeren Zellform dient (68). Der ZO-1-Antikörper markiert die Tight Junctions der zytoplasmatischen Seite der Hepatozyten und dient zur Darstellung der Polarisierung von Hepatozyten (69). Das Vimentin gehört zur Gruppe der Desmine und bildet ebenfalls einen Bestandteil des Zytoskeletts (6). Die Abbildung 3.10 zeigt Überlagerungen an Tag 1 mittels verschiedener Färbungen mit Hoechst, mit oder ohne Vimentin und mit F-Aktin.

Die morphologischen Veränderungen wurden an pHs und an der humanen Leberkrebszelllinie HuH-7 erfasst.



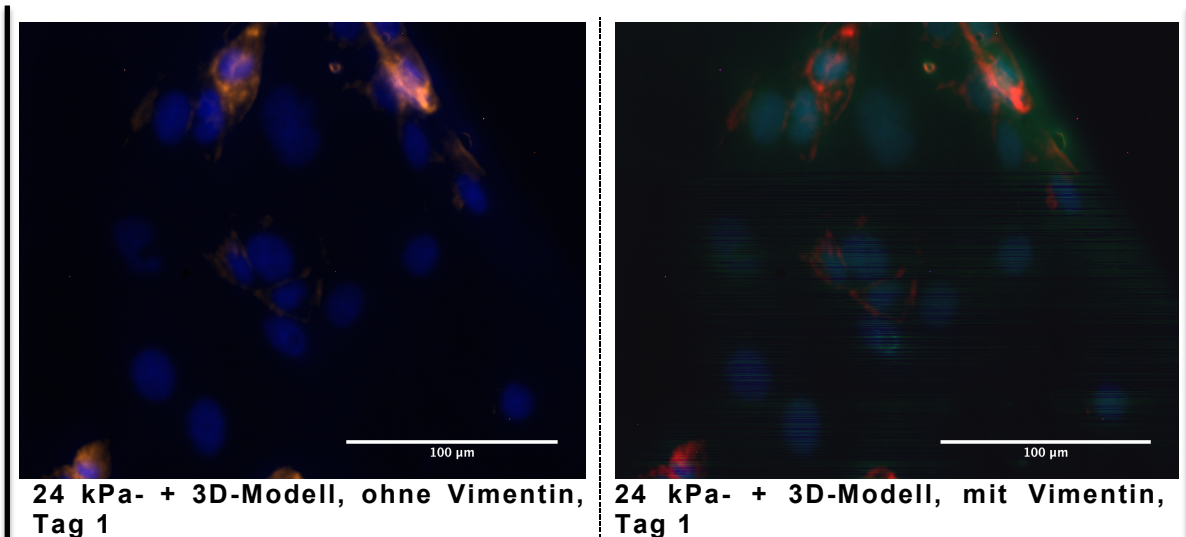


Abbildung 3.10: Immunfluoreszenz-Färbungen von HuH-7 Zellen an Tag 1 mit Hoechst, mit / ohne Vimentin und mit F-Aktin. Hoechst markiert die Zellkerne blau, F-Aktin erscheint Rot und Vimentin erscheint grün. Die Größe des Balkens ist 100 µm und prozessiert wurden die Bilder mit dem Programm ImageJ. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Im Vergleich zwischen dem 2D- und 3D-Modell wird deutlich sichtbar, dass die Stressfasern (rot) im 2D-Modell stärker zunehmen (Abb. 3.10 Vergleich 2D- / 3D-Modelle). Gleichzeitig ist im 2D- und im Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) eine Clusterbildung zu sehen (Abb. 3.10 Vergleich 2D- / 8,2 kPa-Modell) Dagegen konnte im Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) und im 3D-Modell keine Clusterbildung beobachtet werden (Abb. 3.10 Vergleich 3D- / 24kPa-Modell). Mit Hilfe von Vimentin wurde die Morphologie der Gallengangskanälchen dargestellt, welche in den Bildern grün-orange erscheinen. Ein Nachweis der Gallengangskanälchen ist nur in den 3D-Modellen (3D, 8,2 kPa und 24 kPa) sichtbar (Abb. 3.10 im 3D-, 8,2 kPa- und 24kPa-Modell). Das Zytoskelett wurde mit F-Aktin angefärbt und in der Überlagerung von Vimentin und F-Aktin ist die Polarisierung der Zellen zu erkennen, speziell beim Modell der fibrotischen Leber durch die Clusterbildung (Abb. 3.10 - 8,2 kPa-Modell).

Die ersten Versuche an der Leberkrebszelllinie zeigen, dass die Zellen auf den neuen Modellen mit verschiedener ECM-Steifigkeit überleben und dass eine gute Aktivität im Glukose- und Harnstoff-Metabolismus gewährleistet wird.

3.3 Überprüfung der neuen Kulturmodelle mit Hilfe primärer Rattenhepatozyten

Zur Entwicklung eines neuen Kultivierungsmodell, das dem humanen *in vivo* Zustand möglichst nahe kommt, erfolgte im nächsten Schritt der Übergang auf primäre Hepatozyten. Allerdings wurden nicht direkt primäre humane Hepatozyten sondern zunächst primäre Rattenhepatozyten (rHeps) verwendet, um die Auswirkungen und die Verträglichkeit der PAA-Gele an primären Hepatozyten zu evaluieren. Die Überprüfung der Biokompatibilität erfolgte auch hier mit verschiedenen standardisierten Assays an den primären rHeps. Die Überprüfung wurde ebenfalls an Tag 1 und 3 an den Kultivierungsmodellen (2D, 3D, 3,5 kPa, 8,2 kPa) an drei verschiedenen Rattenhepatozytenpräparationen durchgeführt. Um Ressourcen zu sparen und da es galt, ein Modell für pHH zu etablieren wurde bei den Versuchen mit den primären rHeps auf das Modell mit der Steifigkeit von 24 kPa verzichtet.

3.3.1 Laktatdehydrogenase-Aktivität

Zur Evaluation der primären Rattenhepatozyten-Viabilität wurde, wie bei der HuH-7 Zelllinie, die Aktivität der LDH im Zellkulturüberstand bestimmt.

Um die Viabilität der Zellen aufzuzeigen, genügt der Vergleich von zwei der drei Steifigkeiten mit zu den beiden Standardkultivierungsmethoden 2D und 3D. Es wurde das Modell der gesunden Leber und der fibrotischen Leber, stellvertretend für beide Krankheitsentitäten, ausgewählt.

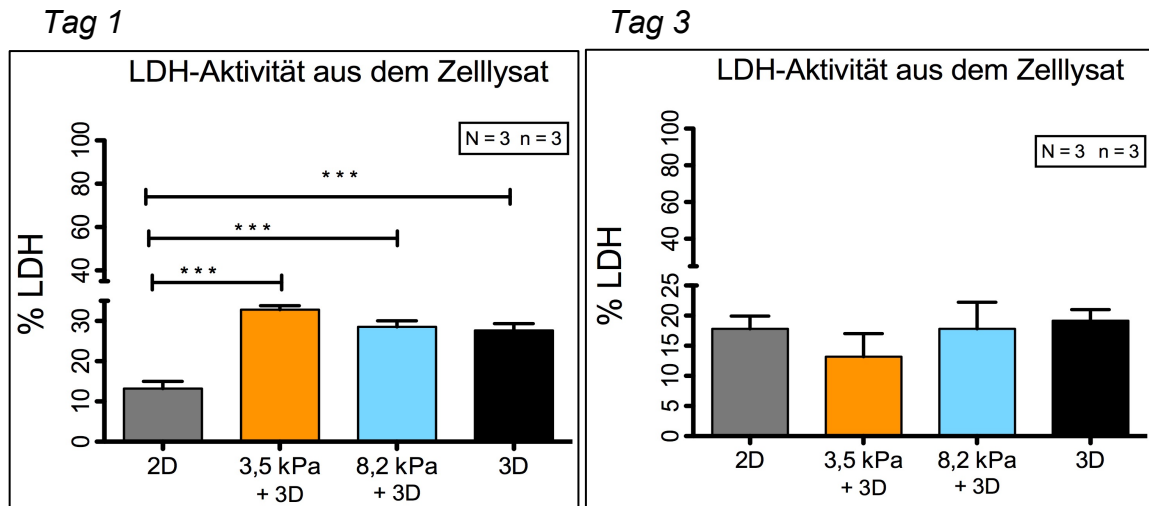


Abbildung 3.11: Gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten, angegeben in Prozent. Der 100%-Wert gilt als der Wert, bei dem alle Zellen im vermessenen Lysat tot sind. Dieses Lysat wird als Nullwert genommen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Signifikant ist, dass an Tag 1 im Überstand der auf den PAA-Gelen kultivierten Zellen, mehr LDH im Zelllysat nachweisbar war als bei der 2D-Kultur (Abb. 3.11), wohingegen sich dies bei längerer Kulturdauer angleicht. Das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) weist an Tag 3 die geringste LDH Menge auf.

3.3.2 Evaluierung der metabolischen Aktivität

Die metabolische Aktivität (Glukose- und Harnstoff-Aktivität) wurde auf den PAA-Gelen auch an den primären Rattenhepatozyten im Vergleich zu den beiden Standardkultivierungsmodellen vermessen.

Messung des Glukosemetabolismus

Zur Evaluierung der Glukoseaktivität wurde ebenfalls der Abbau der vorhandenen Glukose (Glykolyse) und der Anteil an neuproduzierter Glukose (Gluconeogenese) bestimmt.

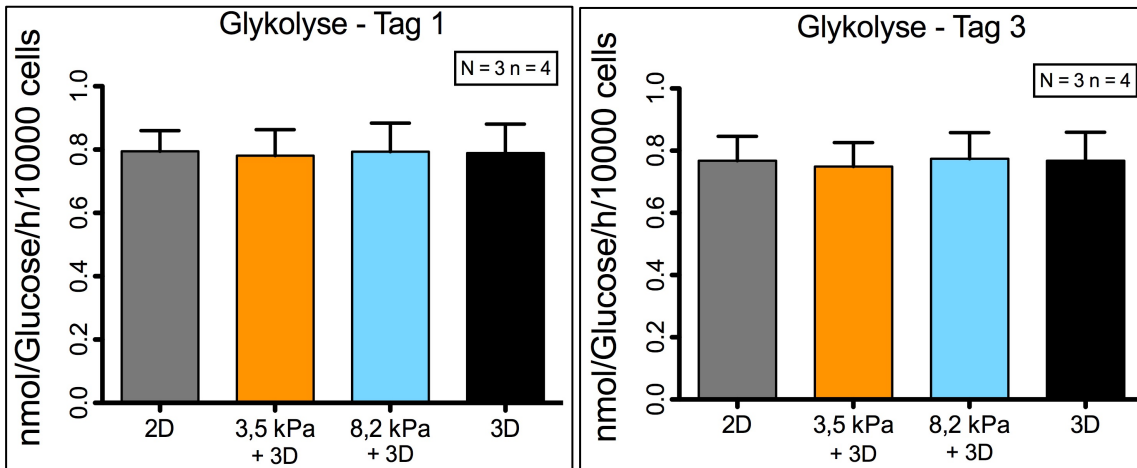


Abbildung 3.12: Gemessene Glykolyse an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten, angegeben in Nanomol Glukose pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Reaktionslösung (siehe Kapitel 2.4.1) wurde über 24 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

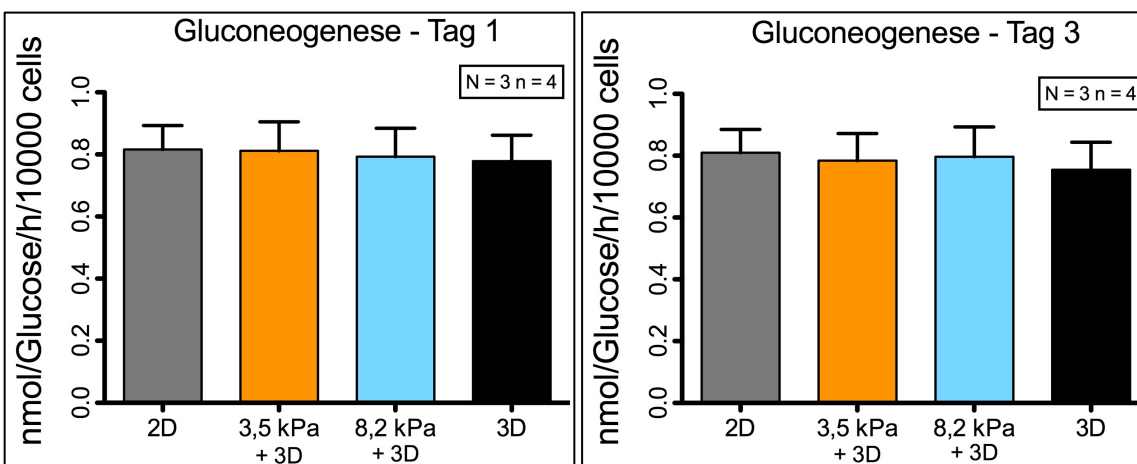


Abbildung 3.13: Gemessene Gluconeogenese an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten, angegeben in Nanomol Glukose pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Laktatlösung (siehe Kapitel 2.4.1) wurde über 24 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Sowohl bei der Glykolyse als auch bei der Gluconeogenese hat die Kultivierung auf den PAA-Gelen keinen negativen Effekt auf die Hepatozyten (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Es besteht kein Nachteil in der Glykolyse und Gluconeogenese der PAA-Gele zu den beiden Standardmodellen (2D und 3D). Die Aktivität der

Glykolyse und der Gluconeogenese lässt an Tag 1 und Tag 3 (Abb. 3.12 und 3.13) nicht nach. Die Messwerte bleiben sehr stabil über die Zeit.

Messung des Harnstoffmetabolismus

Die Messung des Harnstoffmetabolismus an den primären Rattenhepatozyten erfolgte wie die an der Leberkrebszelllinie HuH-7, siehe Kapitel 3.2.2.

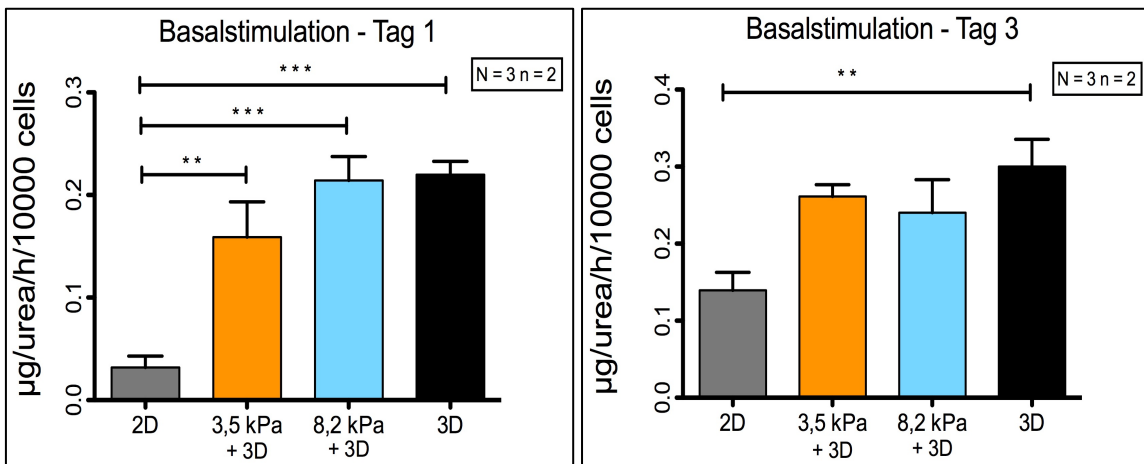


Abbildung 3.14: Gemessene Basalstimulation an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Reaktionslösung (siehe Kapitel 2.4.2) wurde über 5 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

An Tag 1 und Tag 3 weisen die 3D-Modelle eine höhere Aktivität auf als das 2D-Modell. Die Aktivität erhöht sich über die Kultivierungsdauer (Abbildung 3.14). Die höhere Aktivität des reinen 3D-Modells ist an beiden Tagen im Vergleich zum 2D-Modell signifikant.

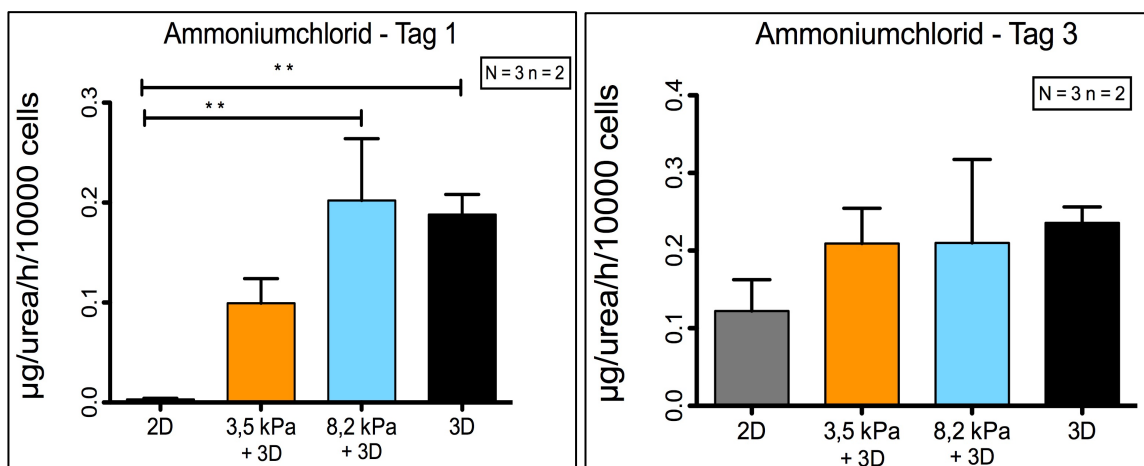


Abbildung 3.15: Gemessene Ammoniakmenge nach 5-stündiger Stimulation mit Reaktionslösung plus Ammoniumchlorid (siehe Kapitel 2.4.2) an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Auch bei der erweiterten Stimulation mit Ammoniumchlorid ist an Tag 1 (Abb. 3.15) ein deutlicher Unterschied zwischen den 2D- und 3D-Modellen nach fünfständiger Stimulation sichtbar. Das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) zeigt an Tag 1 eine deutliche Erhöhung in der Aktivität im Vergleich zum 2D-Modell. Durch die zusätzliche Gabe des Ammoniumchlorids haben die Hepatozyten eine größere Menge an Ammoniak in Harnstoff umzuwandeln. Die 3D-Modelle haben ihre Aktivitätsstärke beibehalten (Abb. 3.14 und 3.15), wohingegen das 2D-Modell Aktivitätseinbußen aufweist. Dennoch gleicht sich das 2D-Modell den anderen Modellen im Zeitverlauf an. Das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) weist an Tag 3 (Abb. 3.15) die gleiche Aktivität auf wie das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa).

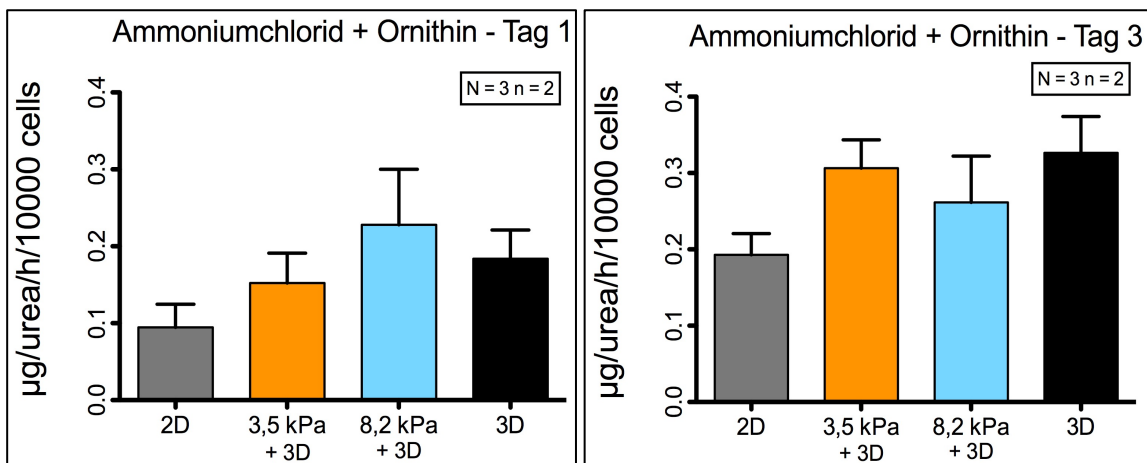


Abbildung 3.16: Gemessene Ammoniakmenge nach 5-stündiger Stimulation mit Reaktionslösung plus Ammoniumchlorid und Ornithin (siehe Kapitel 2.4.2) an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Trotz der Zugabe der Aminosäure Ornithin, die den Ablauf des Harnstoffzyklus unterstützen soll, ist die Aktivität an Tag 1 und Tag 3 bei allen 3D-Modellen höher als beim 2D-Modell (Abb. 3.16). Dennoch ist im Unterschied zu den beiden vorherigen Stimulationen die Aktivität auch beim 2D-Modell gestiegen. Die Aktivität beim Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) und der fibrotischen Leber (8,2 kPa) bleibt zwischen den drei verschiedenen Stimulationen tendenziell konstant. An Tag 3 zeigen das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) und das reine 3D-Modell (ca. 0,7 kPa) die stärkste Aktivität (Abb. 3.16).

3.4 Validierung der Polyacrylamidgele anhand primär humaner Hepatozyten

Nachdem die ersten Tests mit HuH-7 Zellen und Rattenhepatozyten gezeigt hatten, dass die Kultivierung auf den Polyacrylamidgelen nicht toxisch für die Zellen ist, wurden nun pHH, die in der pharmakologischen Testung den Goldstandard darstellen (70), untersucht.

Zu diesem Ergebnisteil ist anzumerken, dass für die hier angewendeten Experimente pHH von kranken Patienten verwendet wurden. Zwar handelte es sich um tumorfreies Gewebe, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen durch vorherige Medikation und diverse Stresseinflüsse in Mitleidenschaft gezogen waren.

3.4.1 Überprüfung der Verträglichkeit von Polyacrylamidgele

Resazurin-Aktivität

Um die Zellviabilität darstellen zu können, wurde bei den pHH die Resazurin-Aktivität bestimmt (siehe Kapitel 2.4.4) (I). Vitale Zellen haben die Fähigkeit, Resazurin durch Reduktion in Resorufin, einen fluoreszierenden Farbstoff, umzuwandeln. Die Umsetzung ist proportional zur Zellviabilität und somit ein indirektes Maß für die Zellviabilität.

Die Resazurin-Aktivität wurde an vier verschiedenen Spendern sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 zu verschiedenen Zeitpunkten, nach 20, 40, 60, 80, 100 und 120 Minuten, vermessen. Die Aktivitäten sind exponentiell dargestellt (Abbildung 3.17).

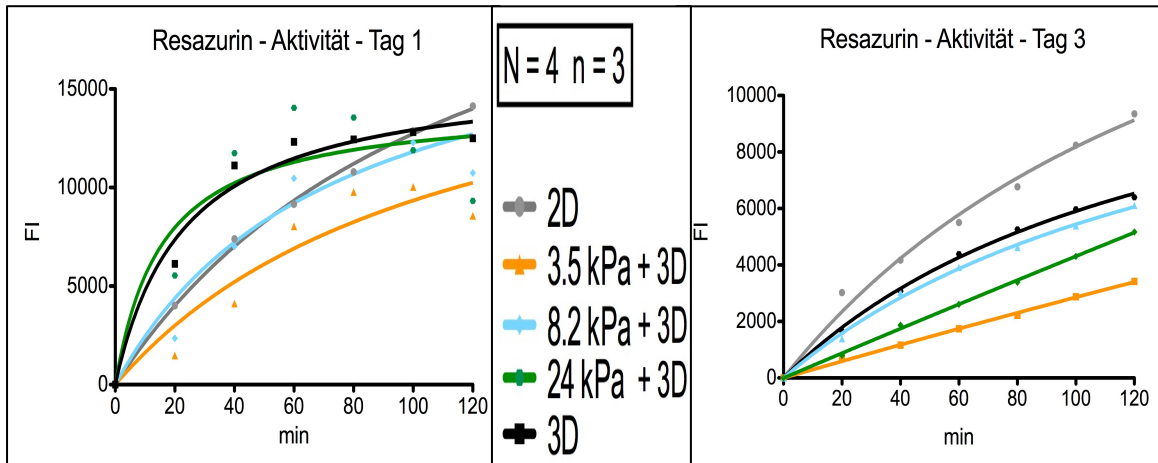


Abbildung 3.17: Gemessene Resazurin-Aktivität an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) nach 20, 40, 60, 80, 100 und 120 Minuten mit 500 μ l Resazurin an pH. 2D-Modell graue Linie, Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) orange Linie, Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) blaue Linie, Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) grüne Linie und 3D-Modell schwarze Linie. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

An beiden Tagen steigt die Resazurin-Aktivität bei allen fünf Modellen proportional mit der Zeitdauer. An Tag 1 weisen das reine 3D-Modell und das Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) die höchste Zellviabilität auf. Von Minute 0 bis 60 haben das 2D-Modell und das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) tendenziell die gleiche Aktivität. Nach 120 Minuten hat das 2D-Modell die höchste und das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) die geringste Resazurin-Aktivität.

An Tag 3 nimmt die Aktivität bei vier von fünf Modellen gegenüber Tag 1 um fast die Hälfte ab. Nur das 2D-Modell erreicht eine Aktivität wie an Tag 1 und ist damit auch das Modell mit der höchsten Zellviabilität an Tag 3. Das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) zeigt an Tag 1 wie auch an Tag 3 den geringsten Resazurin-Umsatz. Das 3D-Modell und das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) liegen auf einer gemeinsamen Linie. Das Modell mit der Steifigkeit von 24 kPa hat an Tag 3 eine geringere Aktivität.

Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 ist im Zeitablauf keine Verminderung der Zellviabilität sichtbar. Da sich aus der Messung des Resazurin-Umsatzes kein Rückschluss auf eine mögliche Schädigung der Zellen ableiten lässt, wurden zusätzlich LDH und AST gemessen.

Laktatdehydrogenase-Aktivität

Um die Verträglichkeit der PAA-Gele auf die pHH zu überprüfen, wurde auch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) an den pHH vermessen (I). LDH ist ein guter Marker, um einen Zellschaden zu detektieren, aber nicht rein leberspezifisch.

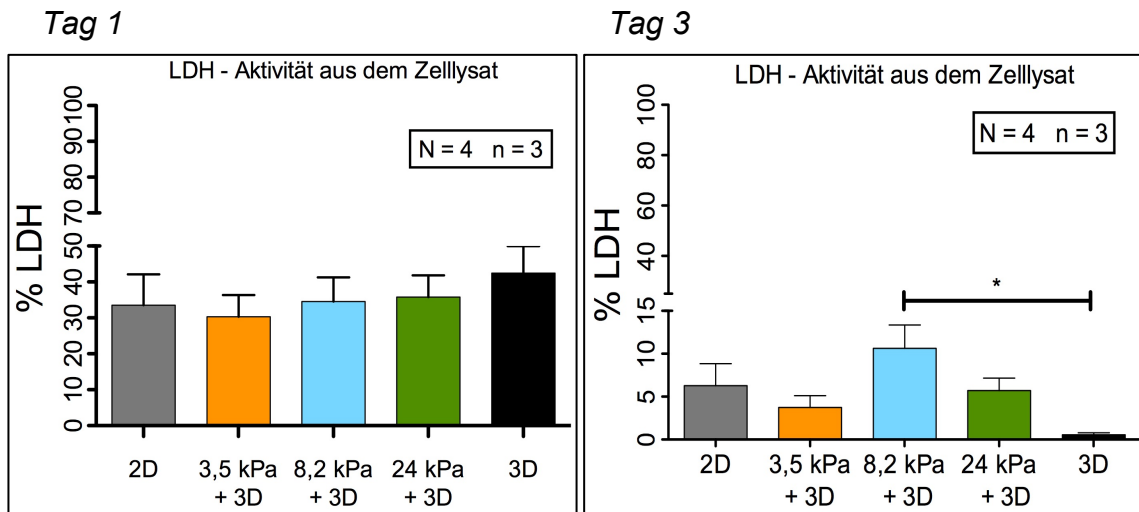


Abbildung 3.18: Gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von pHH, angegeben in Prozent. Der 100%-Wert gilt als der Wert, bei dem alle Zellen im vermessenen Lysat tot sind. Dieses Lysat wird als Nullwert genommen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die LDH – Aktivität und damit der Zellschaden ist an Tag 1 bei allen Modellen ähnlich ausgeprägt (Abb. 3.18). Das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) zeigt einen minimalen Unterschied zu den restlichen Modellen und weist damit die geringste Zellschädigung an Tag 1 auf. Hingegen zeigt das reine 3D-Modell den größten Zellschaden. Die Zellschädigung im 2D-Modell und in den Modellen der fibrotischen (8,2 kPa) und zirrhotischen (24 kPa) Leber ist gleich und zeigt keinen signifikanten Unterschied. Zwischen Tag 1 und Tag 3 reduziert sich der Schaden an den Hepatozyten um mehr als die Hälfte und zwar bei allen Modellen.

An Tag 3 besteht hinsichtlich des erhöhten Zellschadens eine deutliche Signifikanz zwischen dem reinen 3D-Modell und dem Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa). Das 2D-Modell und das Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) weisen einen ähnlichen Zellschaden auf. Neben dem reinen 3D-Modell mit

dem geringsten Zellschaden weist auch das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) einen vergleichsweise geringen Zellschaden auf.

Aspartataminotransferase-Aktivität

Zur Bestimmung der hepatozytenspezifischen Zellschädigung diente die Aspartataminotransferase (AST) als spezifischer Parameter (I).

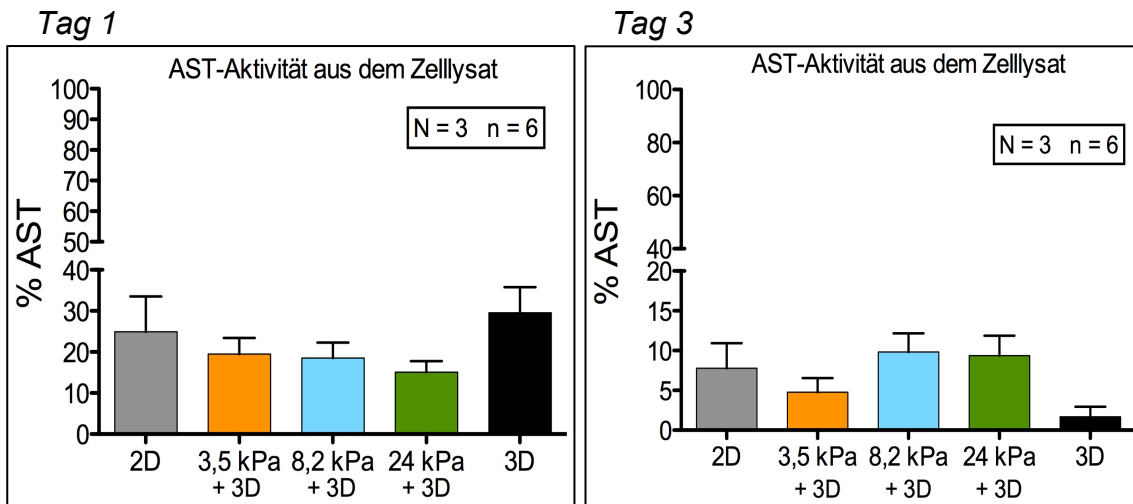


Abbildung 3.19 Gemessene AST-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von pHH, angegeben in Prozent. Der 100%-Wert gilt als der Wert, bei dem alle Zellen im vermessenen Lysat tot sind. Dieses Lysat wird als Nullwert genommen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die AST-Aktivität und damit die Zellschädigung ist an Tag 1 bei beiden Standardmodellen, 2D und 3D, am höchsten (Abb. 3.18), wohingegen das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) wie auch das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) einen identischen Grad der Zellschädigung aufweisen. Die geringste Zellschädigung liegt im Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) an Tag 1 vor. Im zeitlichen Verlauf reduziert sich der Schaden an den Hepatozyten um bis zu 15% bei allen Modellen (Abb. 3.19, Tag 1 und Tag 3).

3.4.2 Untersuchung der metabolischen Aktivität

Metabolische Aktivität, Glukoseabbau und -neubildung sowie Detoxifikation mit Harnstoffneubildung wurden durch die Messung an mindestens drei verschiedenen Spendern jeweils an Tag 1 und Tag 3 überprüft.

Messung des Glukosemetabolismus

Bestimmt wurde der Abbau der vorhandenen Glukose, die sogenannte Glykolyse sowie der Anteil an neuproduzierter Glukose, die sogenannte Gluconeogenese (I).

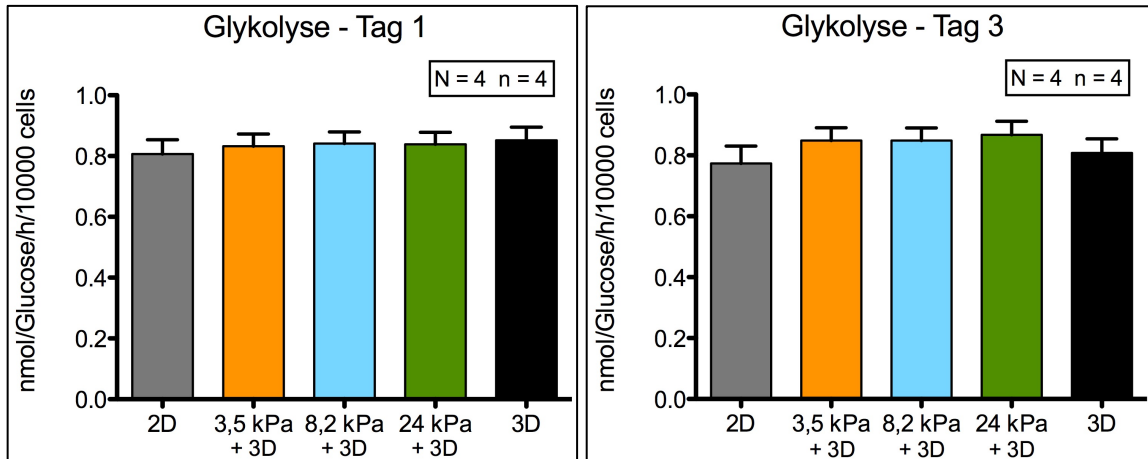


Abbildung 3.20: Gemessene Glykolyse an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von pHH, angegeben in Nanomol Glukose pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Reaktionslösung (siehe Kapitel 2.4.1) wurde über 24 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

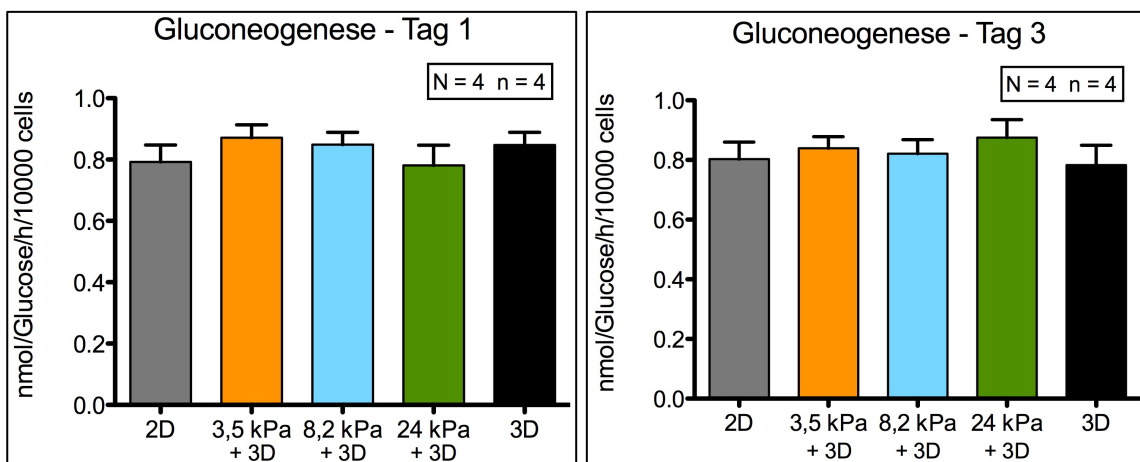


Abbildung 3.21: Gemessene Gluconeogenese an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von pHH, angegeben in Nanomol Glukose pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Laktatlösung (siehe Kapitel 2.4.1) wurde über 24 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Sowohl bei der Glykolyse als auch der Gluconeogenese bestehen nach Messungen an vier verschiedenen Spendern bei allen fünf Modellen an Tag 1 und Tag 3 nur sehr geringe Unterschiede (Abb. 3.20 und 3.21). Die Glykolyse-Aktivität pro Stunde und pro 10.000 Zellen ist an Tag 1 bei allen Modellen

nahezu identisch (Abb. 3.20 – Tag 1). An Tag 3 weisen die Modelle der gesunden (3,5 kPa), fibrotischen (8,2 kPa) und zirrhotischen (24 kPa) Leber eine höhere Aktivität auf als die beiden Standardmodelle 2D und 3D (Abb. 3.20 – Tag 3). Bei der Gluconeogenese zeigt das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) an Tag 1 die höchste Aktivität, jedoch besteht zwischen diesem und den restlichen Modellen ein nur geringer Unterschied (Abb. 3.21 – Tag 1). An Tag 3 der Gluconeogenese ist die Verteilung entsprechend der Glykolyse (Abb. 3.21 – Tag 3). Hier hat das Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) die höchste Aktivität.

Messung des Harnstoffmetabolismus

Die Überprüfung der Harnstoff-Aktivität erfolgte in drei Untergruppen (Kapitel 2.4.2). Die Stimulation erstreckte sich über fünf Stunden.

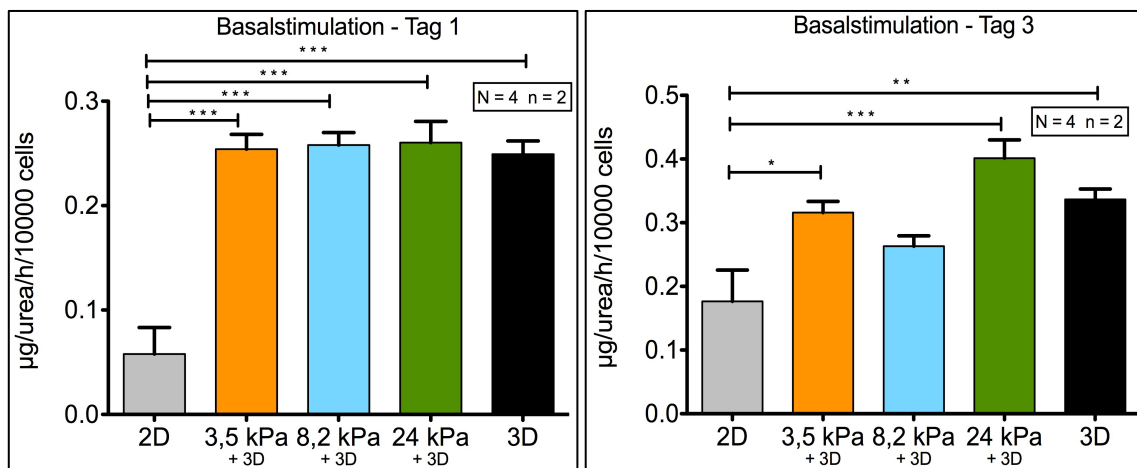


Abbildung 3.22: Gemessene Basalstimulation an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von pHH, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Mit Hilfe der Reaktionslösung (siehe Kap. 2.4.2) wurde über 5 Stunden stimuliert. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Nach der fünfstündigen Basalproduktion haben an Tag 1 alle 3D-Modelle eine signifikant höhere Aktivität als das Standardmodell 2D (Abb. 3.22 – Tag 1). Zwischen den einzelnen 3D-Modellen gibt es keinen signifikanten Unterschied. Ein minimaler Unterschied ist zwischen dem reinen 3D-Modell und den drei PAA-Gel-Modellen sichtbar, die demnach an Tag 1 die höchste Basisdeammonisierung aufweisen.

An Tag 3 war am Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) und dem reinen 3D-Modell eine gleich hohe Aktivität (Abb. 3.22 – Tag 3) zu messen. Das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) zeigt diesen beiden gegenüber eine geringere Aktivität, jedoch eine höhere Aktivität als das 2D-Modell. Das Modell der zirrhotischen Leber weist an Tag 3 die höchste Aktivität auf.

Von Tag 1 auf Tag 3 steigt die Konzentration an gebildetem Harnstoff und somit die Fähigkeit der Zellen zur Verstoffwechslung des toxischen Ammoniaks deutlich an (Abb. 3.22, Vergleich Tag 1 und Tag 3).

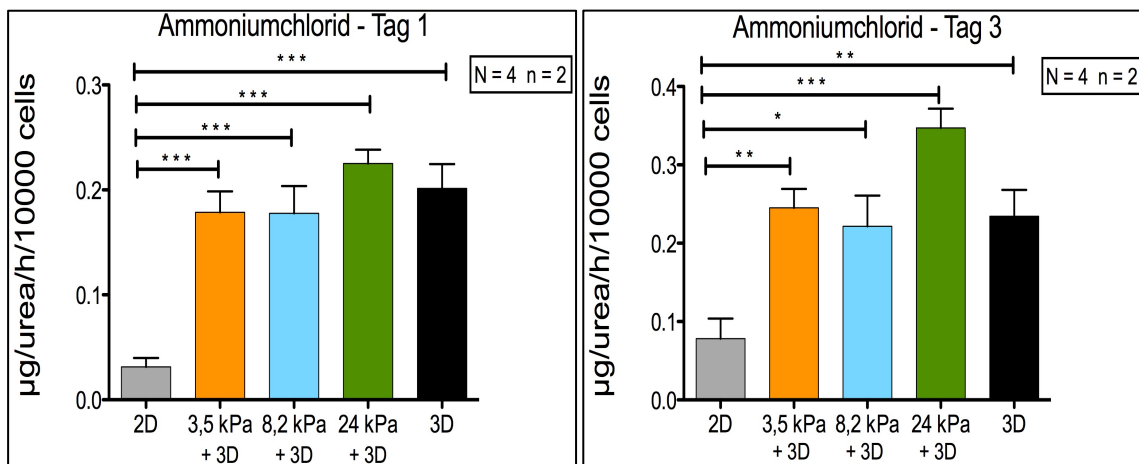


Abbildung 3.23: Gemessene Ammoniakmenge nach 5-stündiger Stimulation mit Reaktionslösung plus Ammoniumchlorid (siehe Kap. 2.4.2) an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von pHH, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die Ammoniumchlorid-Stimulation zeigt an Tag 1 einen deutlich signifikanten Unterschied zwischen dem 2D-Modell und den 3D-Modellen (Abb. 3.23). Damit produzieren alle vier 3D-Modelle mehr Harnstoff pro Stunde als das 2D-Modell. Die gemessene Ammoniakmenge ist an Tag 1 und Tag 3 sowohl bei der Basalstimulation (Abb. 3.22) als auch bei der Ammoniumchlorid-Stimulation (Abb. 2.23) ähnlich. Dennoch besteht ein Unterschied derart, dass alle 3D-Modelle an Tag 3 eine signifikant höhere Aktivität aufweisen als das 2D-Modell bei der Ammoniumchlorid Deammonisierung (Abb. 3.23 – Tag 3). Gemäß den Ergebnissen an vier verschiedenen humanen Spendern ist die Aktivität nach der Ammoniumchlorid-Stimulation sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 beim Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) am höchsten (Abb. 3.23).

Die dritte und letzte Untergruppe der Experimente besteht in der Erweiterung der Ammoniumchlorid-Stimulation mit Ornithin, was zu einer gesteigerten Harnstoffproduktion führen sollte.

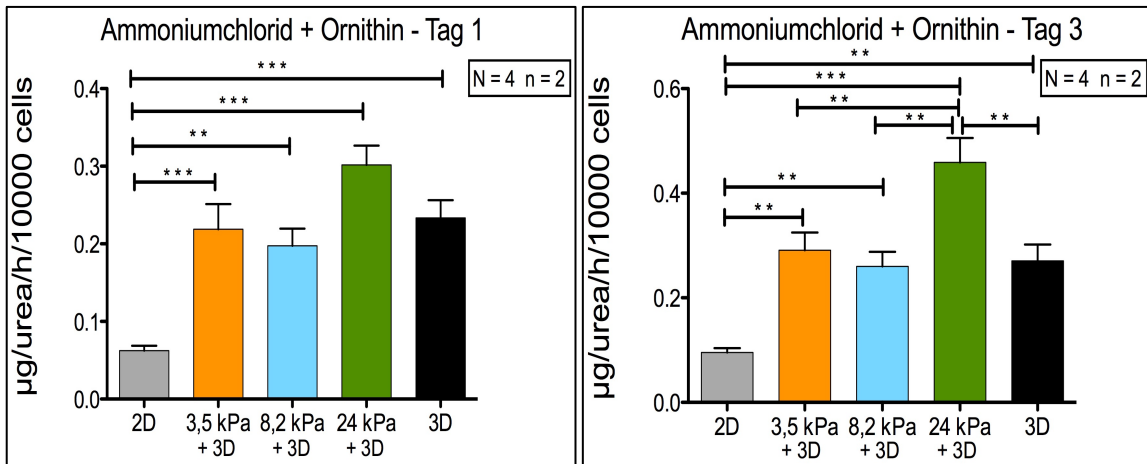


Abbildung 3.24: Gemessene Ammoniakmenge nach 5-stündiger Stimulation mit Reaktionslösung plus Ammoniumchlorid und Ornithin (siehe Kapitel 2.4.2) an Tag 1 (links) und Tag drei (rechts) von pHH, angegeben in Mikrogramm produziertem Harnstoff (Urea) pro Stunde und pro 10.000 Zellen. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

An Tag 1 und Tag 3 nach der Ammoniumchlorid plus Ornithin - Stimulation entspricht die Aktivitätsverteilung der nach der Basalstimulation (Abb. 3.22) sowie der reinen Ammoniumchlorid-Stimulation (Abb. 2.23). Jedoch bestätigen die Messwerte nicht die Erwartung, wonach die Aktivität bei der Unterstützung durch Ornithin höher sein sollte als bei den beiden vorherigen Stimulationen. Den Erwartungen hingegen entspricht die erhöhte Aktivität aller 3D-Modelle gegenüber dem Standardmodell 2D (Abb. 3.24).

Die Aktivität des 2D-Modells sinkt zunächst bei den Stimulationen proportional zur Stoffzunahme, steigt jedoch im Zeitverlauf an. Die beim Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) und dem reinen 3D-Modell gemessene Ammoniakmenge ist an beiden Messtagen ähnlich aber im Zeitverlauf zunehmend (Abb. 3.24). Das Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) weist auch bei der kombinierten Stimulation mit Ornithin an beiden Tagen (Abb. 3.24), ähnlich zur reinen Ammoniumchlorid-Stimulation (Abb. 3.23), den stärksten Umsatz auf.

3.4.3 Messung der Syntheseleistung der pHH mit Hilfe der Albuminkonzentration im Lysat

Albumin wird in der Leber synthetisiert und ist beteiligt an der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes (71).

Ist die Albuminkonzentration im Plasma vermindert, weist dies auf einen erhöhten Verlust über die Niere oder auf einen Leberschaden hin (71). Die Folge ist eine Umverteilung der Flüssigkeit mit Entstehung von Ödemen im Interstitium (71).

Die Albuminkonzentration wurde im Zellüberstand an fünf verschiedenen Spendern an Tag 1 und 3 gemessen.

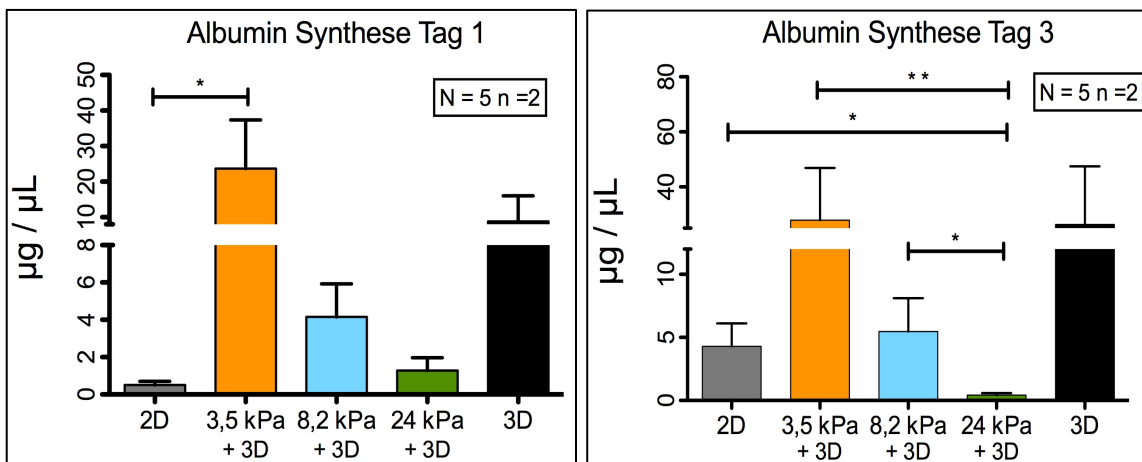


Abbildung 3.25: Gemessene Albuminkonzentration im Zellüberstand angegeben in Mikrogramm pro Mikroliter an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) an fünf verschiedenen Spendern (pHH). Gemessen mit Hilfe des ELISA-Quantitation-Set (siehe Kapitel 2.4.6). Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die Albumin-Synthese an Tag 1 und Tag 3 ist umgekehrt proportional zur Steifigkeit der PAA-Gele. Das bedeutet, dass die Albumin-Synthese-Leistung mit zunehmender Steifigkeit der Modelle abnimmt (Abb. 3.25). Die Albuminkonzentration ist an Tag 1 beim Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) im Vergleich zum Standard 2D-Modell signifikant erhöht. Außerdem ist im Modell der gesunden Leber die höchste Albuminkonzentration nachweisbar (Abb. 3.25 – Tag 1). Am dritten Tag liegt die Aktivität des reinen 3D-Modells auf dem gleichen Niveau wie beim Modell der gesunden Leber (3,5 kPa). Damit haben diese beiden Modelle an Tag 3 die höchste Aktivitätsrate (Abb. 3.25 – Tag 3).

Die Synthese nimmt von Tag 1 zu Tag 3 bei allen fünf Modellen zu (Abb. 3.25, Vergleich Tag 1 und Tag 3).

3.4.4 Überprüfung der Biotransformationsfähigkeit von pHH

Die PAA-Gele sollen eine bessere Abbildung des klinischen Zustandes einer *in vivo* Leber auf ein *in vitro* Modell ermöglichen. Fernziel der Modellbildung sind präklinische Medikamententests unter *in vivo* Bedingungen. Aus diesem Grund wurde im Weiteren die Biotransformationsfähigkeit der pHH überprüft.

Die Metabolisierung von Medikamenten hängt von der Aufnahme über Transporter und der Aktivität der Phase I und II Enzyme ab. Näheres zu den diesbezüglichen Abläufen ist jeweils den zugehörigen Ergebnissen vorangestellt.

Messung der Transporter-Aktivität

Es wurden der Multidrug-Resistance-1-Transporter (MDR1) und der Multidrug-Resistance-Related-1-Transporter (MRP1) überprüft (I). Beide gehören zur ABC-Familie und sind Transportproteine, die sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran der Hepatozyten vorkommen (70) und bei der Aufnahme und Abgabe von xenobiotischen und endobiotischen Substanzen (72) eine wichtige Rolle spielen. Zum Beispiel ist der MRP1 für den Transport von Acetaminophen in die Zelle verantwortlich (73). Die Aufnahme- und Abgabefunktion der Transportproteine MRP1 und MDR1 wird auch als sogenannte Phase III der Biotransformation bezeichnet. Sie spielt auch eine wichtige Rolle bei der Verstoffwechslung von Medikamenten (70). Die Phasen I und II sind im nächsten Abschnitt unter der Überschrift „Darstellung der Cytochrom P 450 Gen-Expression mit Hilfe von PCRs“ erläutert.

Zur Messung der Aktivität wurde der Umsatz beim MRP1-Transporter mit Hilfe des Farbstoffes CFDA und für den MDR1-Transporter mit Hilfe des Farbstoffes Rhodamine bestimmt (Kapitel 2.4.5).

In Abbildung 3.26 ist die Aufnahme (Uptake) durch den MRP1-Transporter des 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein-diacetat (5-CFDA) jeweils für Tag 1 und Tag 3 bei drei verschiedenen Spendern dargestellt. Die Aufnahmewerte sind in Nanomol pro 100 Mikroliter CFDA angegeben.

Das aufgenommene 5-CFDA wird in den Hepatozyten mit Hilfe einer Esterase in Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) umgewandelt (6).

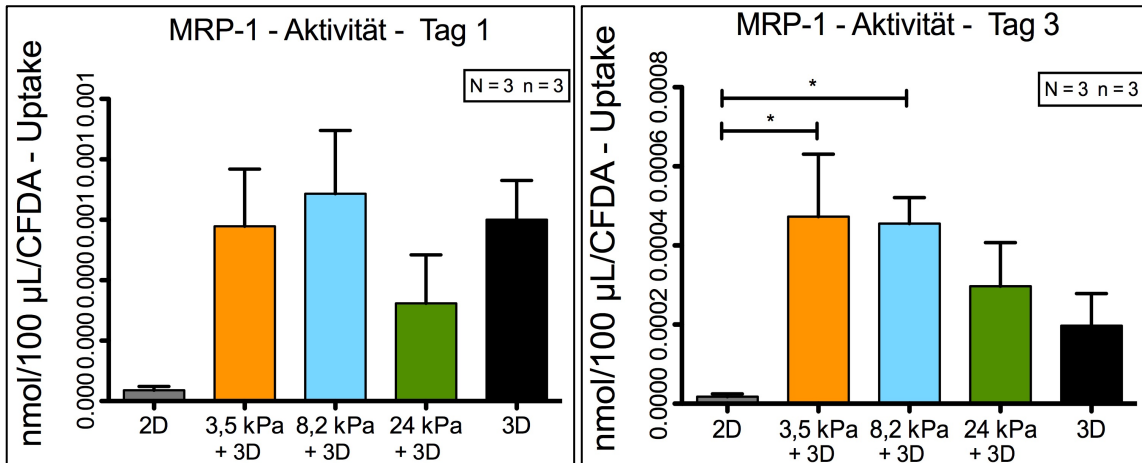


Abbildung 3.26: Gemessene Aufnahmemenge von 5-CFDA des MRP-1 Transporters in pHH an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) jeweils nach 30 Minuten Inkubation beim 2D-Modell und nach 60 Minuten Inkubation bei den 3D-Modellen mit dem Farbstoff 5-CFDA. Gemessene Menge ist in Nanomol pro 100 Mikroliter CFDA angegeben. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die Hepatozyten in den 3D-Modellen nehmen an Tag 1 deutlich mehr CFDA auf als das Standardmodell 2D (Abb. 3.26 – Tag 1). Das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) und das reine 3D-Modell zeigen eine gleich starke CFDA-Aufnahme. Die Hepatozyten auf dem zirrhotischen Modell (24 kPa) nehmen im Vergleich zu den restlichen 3D-Modellen am wenigsten CFDA auf. Das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) hat an Tag 1 die stärkste Aufnahme und damit auch die höchste MRP-1-Transporter-Aktivität. Im Vergleich dazu steigt an Tag 3 die Aktivität des Modells der gesunden Leber (3,5 kPa) auf die Höhe des 8,2 kPa-Modells (Abb. 3.26 – Tag 3). Die Aufnahmefähigkeit der anderen beiden 3D-Modelle sinkt stufenweise ab. Das 2D-Modell zeigt wie an Tag 1 eine sehr schwache Aufnahmeaktivität.

Nach seiner Umwandlung wird das CFSE durch den MRP1-Transporter wieder heraus transportiert, sogenanntes Eluted. Die gemessene Menge spiegelt den

Export durch den Transporter wider. Sie wurde zu drei fixen Zeitpunkten nach 15, 30 und 60 Minuten (Abb. 3.27) gemessen.

Die Exportrate ist in Nanomol pro 100 Mikroliter CFDA angegeben.

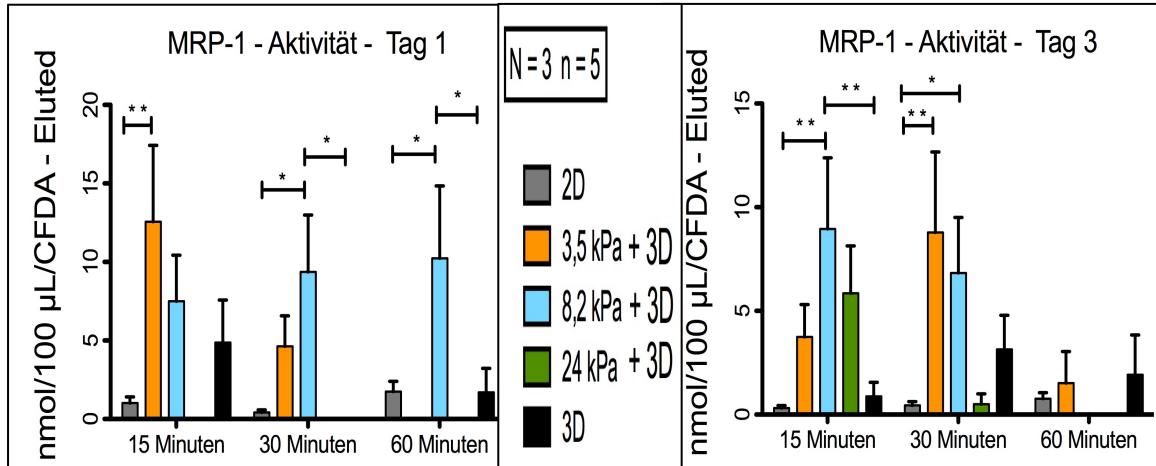


Abbildung 3.27: Gemessene Exportrate an CFSE in pHH des MRP-1-Transporters an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) jeweils zu drei fixen Zeitpunkten (15, 30 und 60 Minuten). Gemessene Menge ist in Nanomol pro 100 Mikroliter CFDA angegeben. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

An Tag 1 konnte in allen Modellen, außer beim Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa), ein Export über die Zeit gemessen werden (Abb. 3.27 – Tag 1). Im Zeitablauf ist beim 3,5 kPa- und 3D-Modell eine abnehmende und beim 8,2 kPa-Modell eine zunehmende Aktivität sichtbar. Das reine 3D-Modell gibt nach 15 Minuten und dann erst wieder nach 60 Minuten CFSE ab. Beim Vergleich Tag 1 und Tag 3 fällt zunächst auf, dass das Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) nach 15 Minuten eine starke Abgabeaktivität und nach 30 und 60 Minuten eine sehr geringe Aktivität aufweist (Abb. 3.27 – Tag 3). Das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) hat nach 15 Minuten seine größte Aktivität, die bis Minute 60 komplett absinkt. Dagegen haben die Hepatozyten auf dem Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) nach 15 und 60 Minuten eine geringere Aktivität, und bei Minute 30 die stärkste (Abb. 3.27 – Tag 3). Das Standardmodell 2D hat wie beim Uptake (Abb. 3.26) auch bei der Abgabe sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 eine sehr geringe Transporteraktivität (Abb. 3.27). Demgegenüber hat das reine 3D-Modell eine starke Aufnahme (Abb. 3.26), aber an beiden Tagen eine geringe Exportrate (Abb. 3.27).

Im nächsten Schritt wurde der MDR1-Transporter mit Hilfe des Farbstoffs Rhodamine auf seine Aufnahme- und Abgabefunktion hin überprüft.

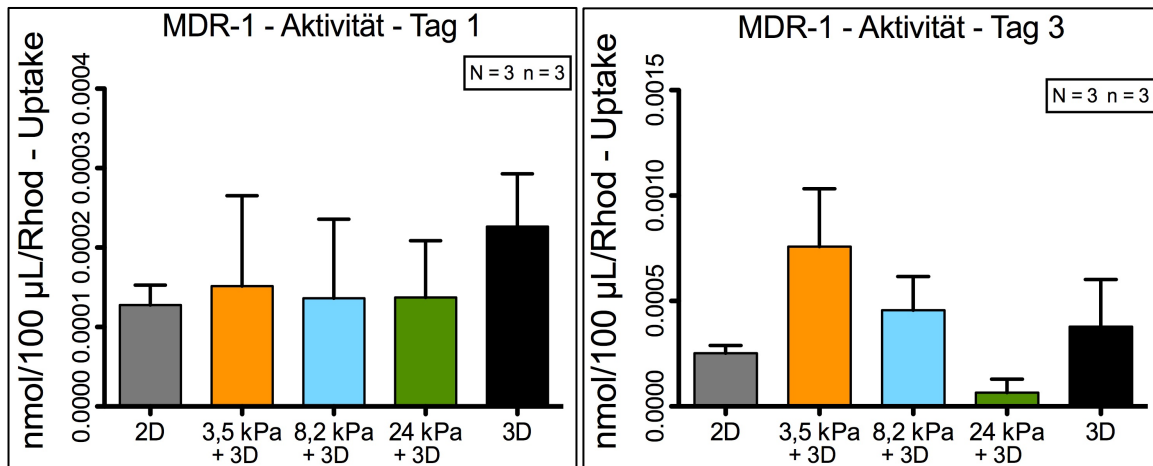


Abbildung 3.28: Gemessene Aufnahmemenge von Rhodamine des MDR1-Transporters in pHH an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) jeweils nach 30 Minuten Inkubation beim 2D-Modell und nach 60 Minuten Inkubation bei den 3D-Modellen. Gemessene Menge ist in Nanomol pro 100 µl Rhodamine angegeben. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

An Tag 1 ist die aufgenommene Menge an Rhodamine gemessen in Nanomol pro 100 Mikroliter beim reinen 3D-Modell am höchsten. Das 2D-Modell und die beiden Modelle der fibrotischen (8,2 kPa) und zirrhotischen (24 kPa) Leber weisen eine gleich hohe Aktivität auf (Abb. 3.28 – Tag 1). Das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) hat unter den PAA-Gelen die höchste Aktivität. An Tag 3 ist die Abnahme der MDR1-Transporter-Aktivität proportional zur Erhöhung der Steifigkeit in Kilopascal. Am schwächsten schneidet das 24 kPa-Modell ab. Im Zeitverlauf nehmen die Aktivitäten aller Modelle zu (Abb. 3.28, Vergleich Tag 1 und Tag 3). Die höchste Aufnahmeaktivität ist im Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) an Tag 3 sichtbar (Abb. 3.28 – Tag 3). Im Vergleich der MRP1- (Abb. 3.26) und MDR1- (Abb. 3.28) Transporter sind die Aufnahmeaktivitäten sehr ähnlich. Lediglich das Standardmodell 2D hat beim MDR1-Transporter (Abb. 3.28) eine höhere Aktivität als beim MRP1 (Abb. 3.26). Nach der Aufnahme von Rhodamin wurde die Exportrate des MDR1-Transporters ebenfalls überprüft (Abb. 3.29).

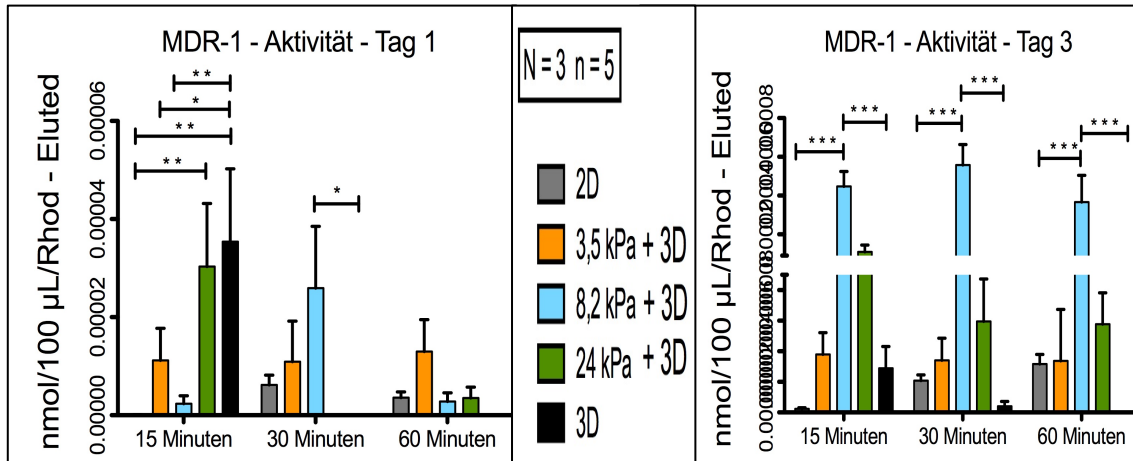


Abbildung 3.29: Gemessene Exportate des MDR-1-Transporters von Rhodamin in pHH an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) jeweils zu drei fixen Zeitpunkten (15, 30 und 60 Minuten). Gemessene Menge ist in Nanomol pro 100 Mikroliter Rhodamin angegeben. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die Rhodamin Abgabe und damit die Aktivität des MDR1-Transporterproteins wurde nach 15, 30 und 60 Minuten bestimmt. An Tag 1 (Abb. 3.29 – Tag 1) zeigt das 2D-Modell kaum Aktivität, wohingegen das reine 3D-Modell nach 15 Minuten die höchste, nach 30 und 60 Minuten jedoch keine messbare Aktivität mehr aufweist. Im Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) steigt die Aktivität in geringem Umfang über die gemessene Zeit. Sowohl das reine 3D-Modell als auch das der zirrhotischen Leber (24 kPa) haben im Vergleich zum 2D-Modell eine signifikant erhöhte Aktivität. Auch die beiden Modelle (3,5 kPa und 8,2 kPa) weisen einen signifikanten Aktivitätsunterschied zum reinen 3D-Modell auf (Abb. 3.29 – Tag 1). Dagegen wird beim Modell der fibrotischen Leber an Tag 3 zu allen drei Zeitpunkten die höchste Aktivität gemessen (Abb. 3.29 – Tag 3). Die Hepatozyten auf dem 3,5 kPa-Modell weisen eine nahezu konstante Aktivität auf. Dagegen nimmt die Aktivität auf dem 24 kPa-Modell über die Zeit ab. Beide Standardmodelle (2D und 3D) haben an Tag 3 eine sehr schwache Transporteraktivität, sowohl bei der Abgabeaktivität des MRP1-Transporters (Abb. 3.27) als auch beim MDR1-Transporter (Abb. 3.29). Von Tag 1 zu Tag 3 besteht in der Aktivität des fibrotischen und zirrhotischen Modells der größte Unterschied (Abb. 3.29 – Vergleich Tag 1 und Tag 3). Beide Modelle erhöhen ihre Aktivität.

Darstellung der Cytochrom P 450 - Genexpression mit Hilfe von PCRs

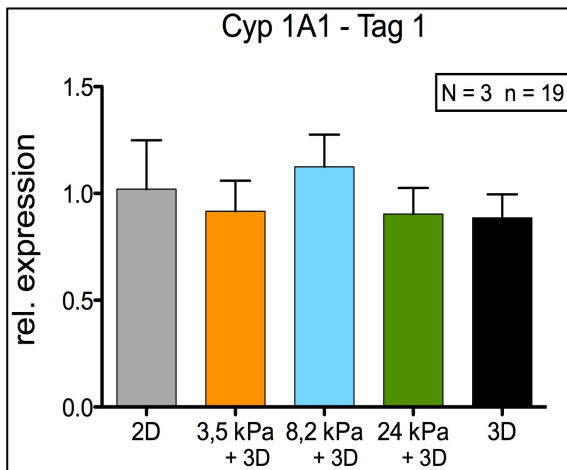
Neben der Phase III sind auch die Phasen I und II wichtige Biotransformationsschritte. Alle drei Phasen sind für die Verstoffwechslung u.a. von Medikamenten zuständig. Die Phase I besteht aus verschiedenen Reaktionen, der Hydrolyse, Reduktion und Oxidation (74), die zur Umwandlung der Stoffe in ausscheidbare Produkte führen und hauptsächlich von der Familie der Cytochrom P 450 - Enzyme durchgeführt werden (75). Zum Beispiel wird das Analgetikum Acetaminophen überwiegend vom Cytochrom P 450 - Enzym 2E1 und 1A2 in ausscheidbare Produkte umgewandelt (74).

In Phase II werden die umgewandelten Stoffe konjugiert, so dass sie in Wasser oder Fetten gelöst aus dem Körper ausgeschieden werden können (75). Phase III wurde bereits im vorherigen Abschnitt erläutert. Um zu untersuchen, welchen Effekt die Matrixsteifigkeit auf die Genexpression der CYPs hat, wurden folgende sieben verschiedene Cyps aus der Cytochrom P 450 - Enzym Familie mit Hilfe von PCRs überprüft:

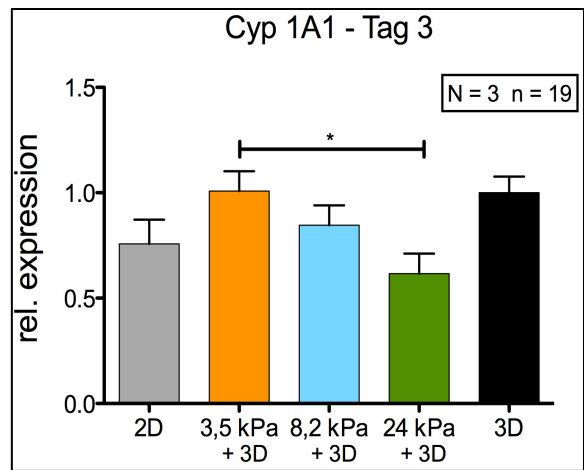
Cyp 1A1, Cyp 1A2, Cyp 3A4, Cyp 2B6, Cyp 2C8, Cyp 2C9, Cyp 2E1

Für die Untersuchung herangezogen wurden diese sieben Cyps, da sie prozentual am häufigsten in der Leber vorkommen und mit ihrer Hilfe die Mehrzahl an Stoffen metabolisiert werden kann. Zum Beispiel hat das Enzym Cytochrom P 450 3A4 einen Anteil von 50% in der Leber und ist damit das am häufigsten vorkommende CYP. Das Cyp 2C9 macht weitere 20% aus.

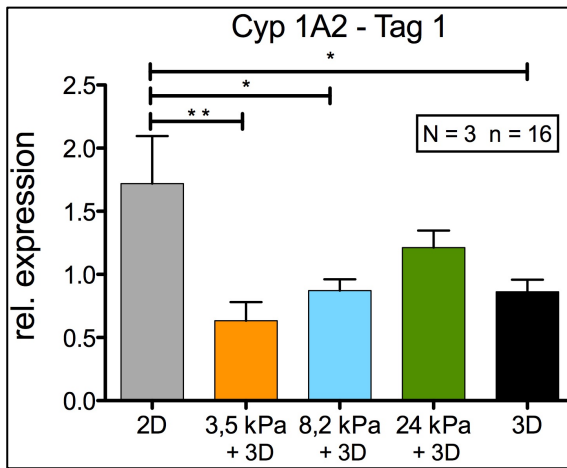
Zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Genexpression der verschiedenen CYPs wurde für alle fünf Modelle jeweils an drei verschiedenen Spendern für Tag 1 und Tag 3 untersucht. Die Ergebnisse wurden jeweils im Bezug gesetzt zum reinen 3D-Modell.



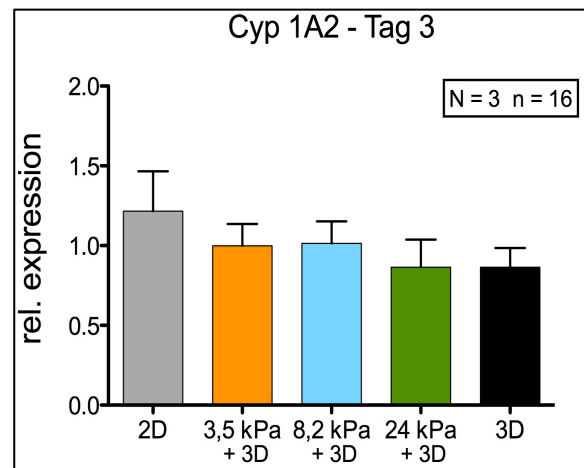
Cyp 1A1, Tag 1



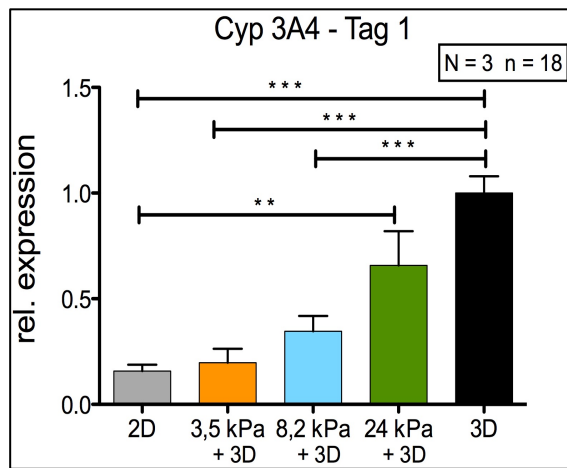
Cyp 1A1, Tag 3



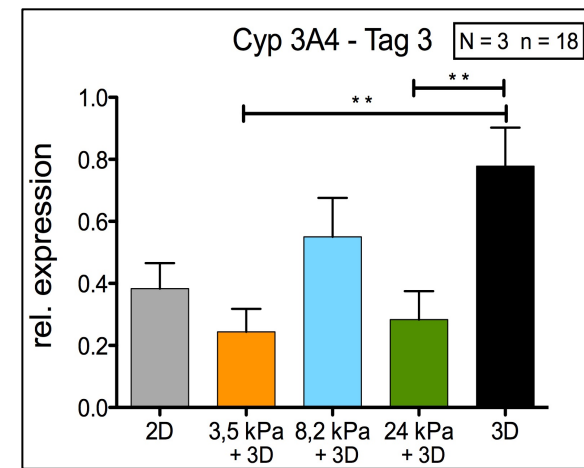
Cyp 1A2, Tag 1



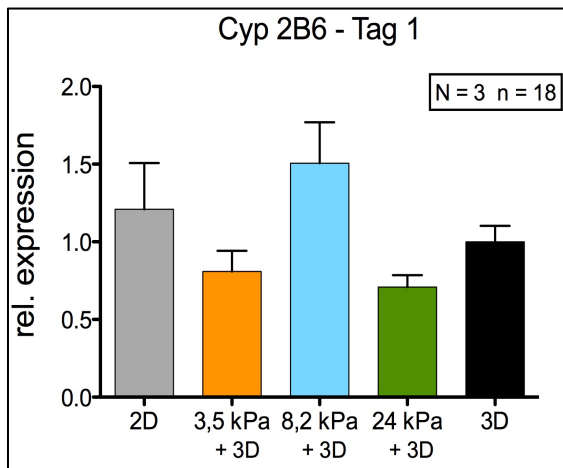
Cyp 1A2, Tag 3



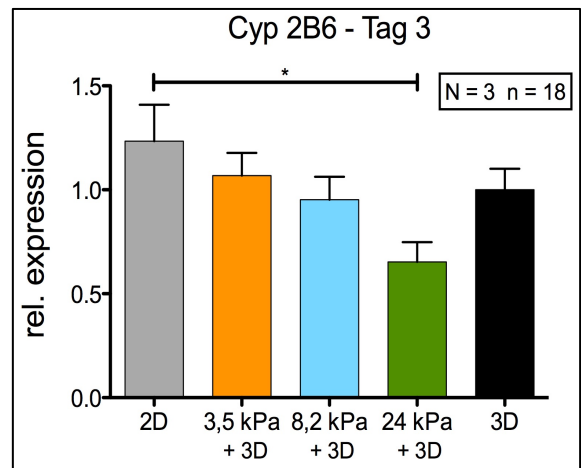
Cyp 3A4, Tag 1



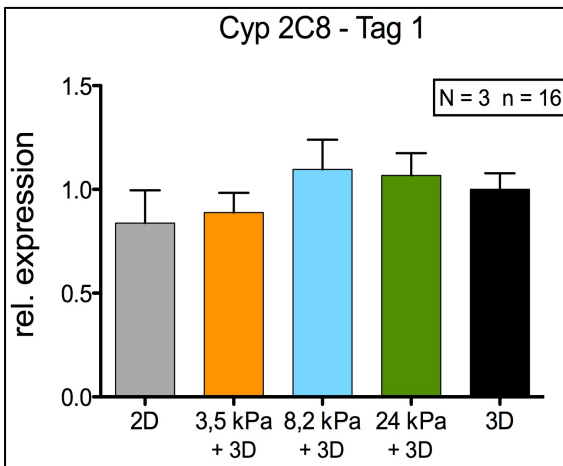
Cyp 3A4, Tag 3



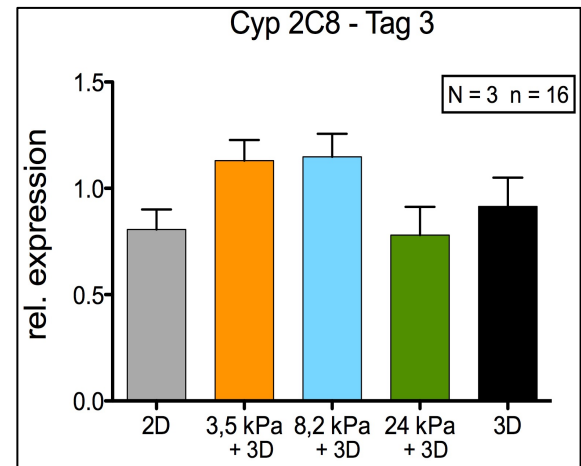
Cyp 2B6, Tag 1



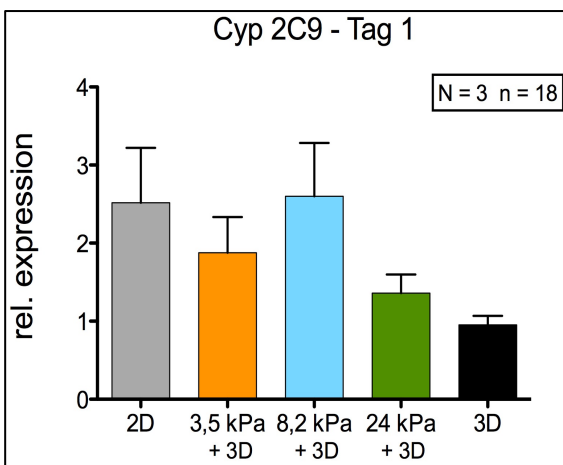
Cyp 2B6, Tag 3



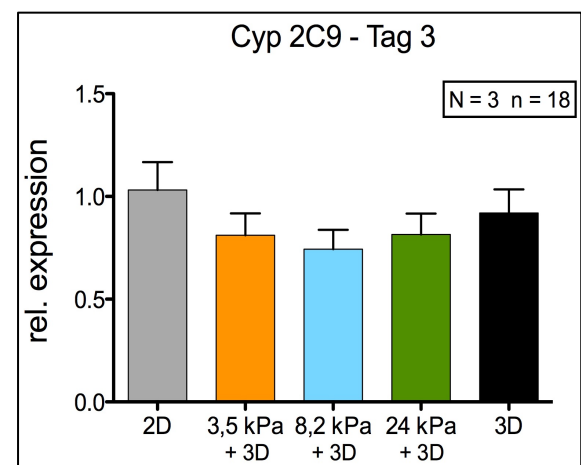
Cyp 2C8, Tag 1



Cyp 2C8, Tag 3



Cyp 2C9, Tag 1



Cyp 2C9, Tag 3

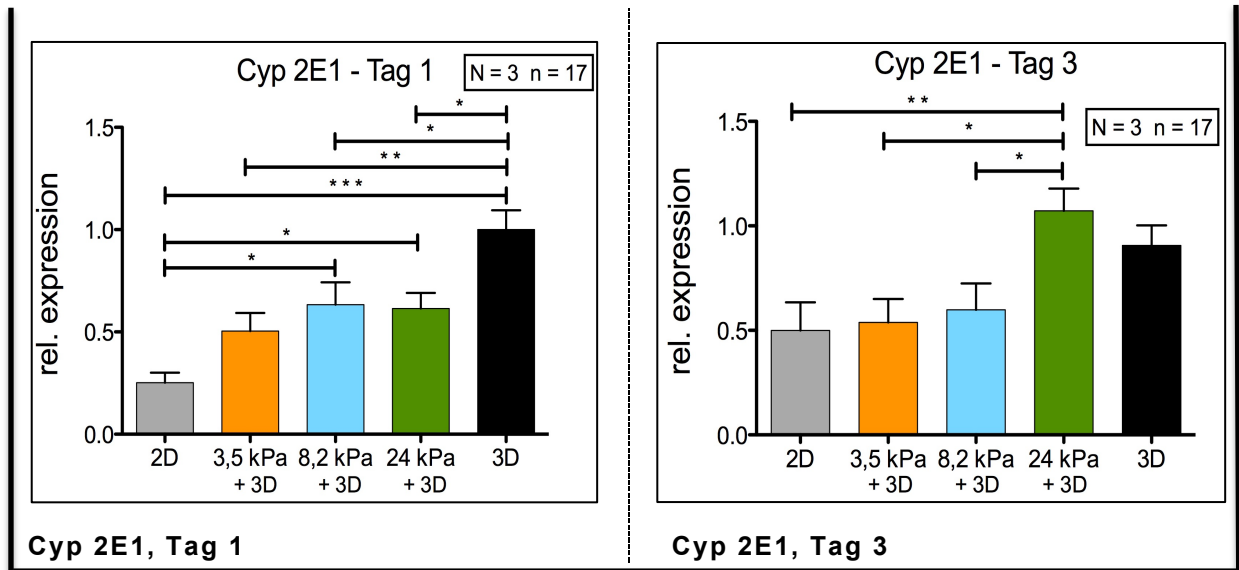


Abbildung 3.30: Gemessene Cytochrom P 450 Genexpression von pHH mit Hilfe von PCRs jeweils an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts). Normalisiert wurde auf das Housekeeping-Gen GAPDH. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Die Aktivität der Expressionen der Cytochrom P 450 - Enzyme unterscheidet sich sowohl zwischen den einzelnen Cyps als auch zwischen den Kultivierungsmodellen.

Beim Enzym Cyp 1A1 sind an Tag 1 alle fünf Modelle sehr ähnlich. Nur das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) und das Standardmodell 2D weisen eine höhere Aktivität auf. Diese beiden Modelle zeigen an Tag 1 auch die höchste Genexpression (Abb. 3.30 - Cyp1A1 – Tag 1). Im Vergleich hierzu haben an Tag 3 das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) und das reine 3D-Modell die höchste Expression (Abb. 3.30 – Cyp1A1 – Tag 3). Die Expression ist beim Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) gegenüber dem der zirrhotischen Leber (24 kPa) signifikant erhöht, wohingegen die Genexpression des 2D-Modells und das der zirrhotischen Leber (24 kPa) tendenziell gleich hoch sind (Abb. 3.30 – Cyp1A1 – Tag 3).

Sowohl am Expressionstag 1 als auch an Tag 3 ist beim Cyp 1A2 die Aktivität des 2D-Modells stärker als bei den 3D-Modellen (Abb. 3.30 – Cyp1A2, Vergleich Tag 1 und Tag 3). An Tag 1 sind die Unterschiede signifikant an Tag 3 bestehen keine Signifikanzen. Über die Zeit erhöht sich bei fast allen 3D-Modellen die Cyp 1A2 Genexpression. Lediglich beim Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) bleibt sie relativ konstant.

Bei einem der wichtigsten Cytochrom P 450 - Enzyme, dem Cyp 3A4, erfolgt an Tag 1 ein zur Gelsteifigkeit proportionaler Anstieg der Genexpression (Abb. 3.30 – Cyp 3A4 – Tag 1). Im Gegensatz hierzu zeigt das reine und erheblich weichere 3D-Modell (ca. 0,7 kPa) sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 die höchste Aktivität. Es bestehen an beiden Tagen (Tag 1 und 3) signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Modellen (Abb. 3.30 – Cyp 3A4).

Bei Cyp 2B6 weist das Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) an Tag 1 die höchste Aktivität auf (Abb. 3.30 – Cyp 2B6 – Tag 1). Das 2D-Modell hat bereits an Tag 1 eine höhere Aktivität als das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) und über die Zeit sinkt die Aktivität bei allen Modellen. Dabei besteht zwischen dem Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) und dem 2D-Modell ein deutlicher Unterschied, wohingegen das reine 3D-Modell über die Zeit konstant bleibt (Abb. 3.30 – Cyp 2B6).

Beim Enzym Cyp 2C8 bestehen sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 keine signifikanten Aktivitätsunterschiede. Jedoch verändern sich die Aktivitäten der PAA-Modelle über die Zeit (Abb. 3.30 – Cyp 2C8, Vergleich Tag 1 und Tag 3).

Beim Enzym Cyp 2C9 sinkt die Genexpression über die Zeit bei allen fünf Modellen um circa die Hälfte. Die Aktivität des 2D-Standardmodells und des Modells der fibrotischen Leber (8,2 kPa) ist an Tag 1 am stärksten ausgeprägt. Dagegen haben an Tag 3 die beiden Standardmodelle die höchste Genexpression. Die Hepatozyten auf den PAA-Gelen verschiedener Steifigkeit unterscheiden sich in Ihrer Aktivität kaum (Abb. 3.30 – Cyp 2C9).

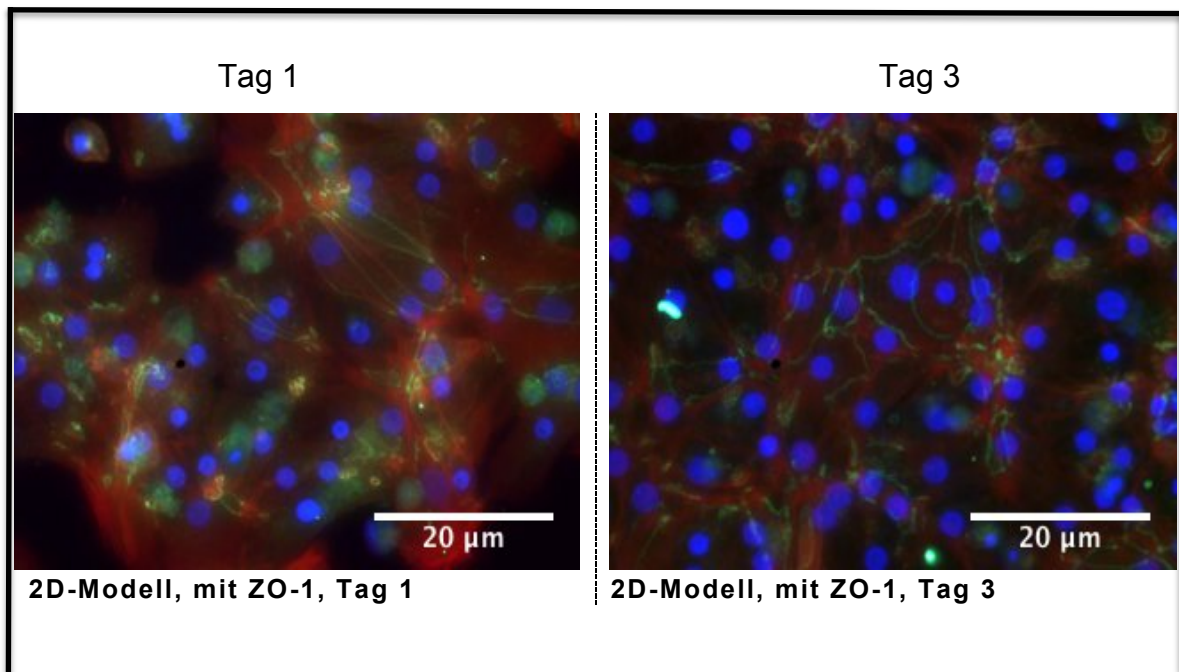
Beim Cytochrom P 450 – Enzym 2E1, das sowohl für den Stoffwechsel von Medikamenten als auch für die Verarbeitung von Ethanol zuständig ist, waren an Tag 1 signifikant erhöhte Unterschiede in der Genexpression zwischen dem reinen 3D-Modell und den anderen vier Modellen sichtbar. Die Modelle der fibrotischen- (8,2 kPa) und zirrhotischen (24 kPa) Leber haben eine zum 2D-Modell signifikant erhöhte Aktivität (Abb. 3.30 – Cyp 2E1). Interessanterweise bleiben über die Zeit die Aktivitäten der Modelle konstant.

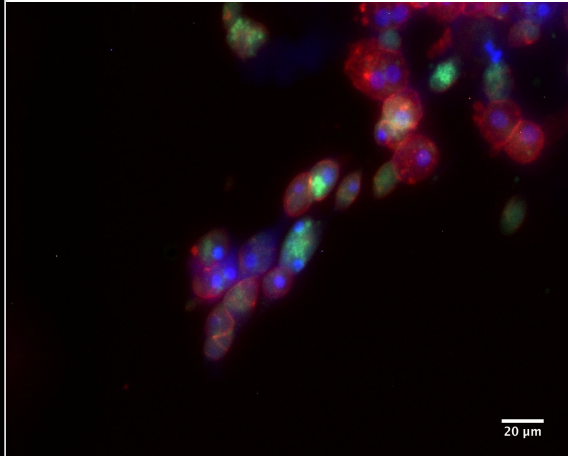
Lediglich das Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) erbringt eine deutlich erhöhte Cyp 2E1 Genexpression im Zeitablauf.

Die Messungen zeigen, dass auch Hepatozyten von Humanspendern auf den neuen Kultivierungsmodellen überleben und gut mit der Veränderung der ECM zurechtkommen. Sowohl die metabolischen als auch die biotransformellen Funktionen der humanen Hepatozyten werden auf den PAA-Gelen mit ihrem unterschiedlichen Untergrund erfüllt.

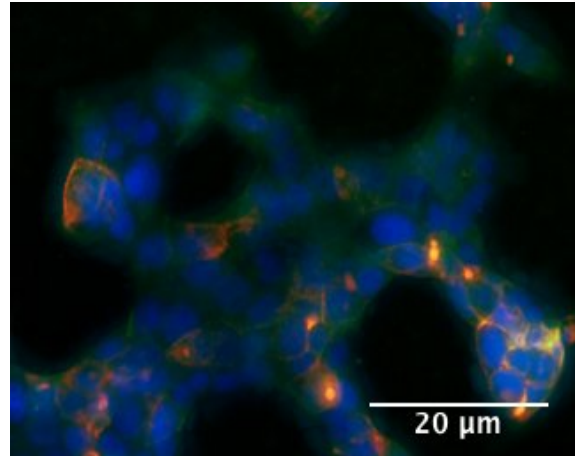
3.4.5 Darstellung der Morphologie von pHH

Nachdem die ersten Tests gezeigt hatten, dass die Kultivierung von pHH auf den PAA-Gelen hepatozytenkompatibel ist, wurden die morphologischen Veränderungen auf den Gelen unterschiedlicher Steifigkeit (2D, 3D, 3,5 kPa, 8,2 kPa und 24 kPa) untersucht. Es kamen Methoden und Antikörper zur Anwendung, wie sie bereits in Kapitel 2.6 und 3.2.3 beschrieben sind. Alle Abbildungen zeigen Überlagerungen von drei verschiedenen Färbungen, ZO-1, Hoechst und F-Aktin.

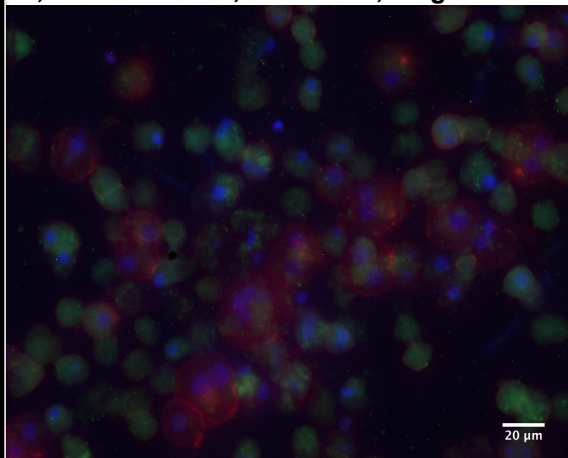




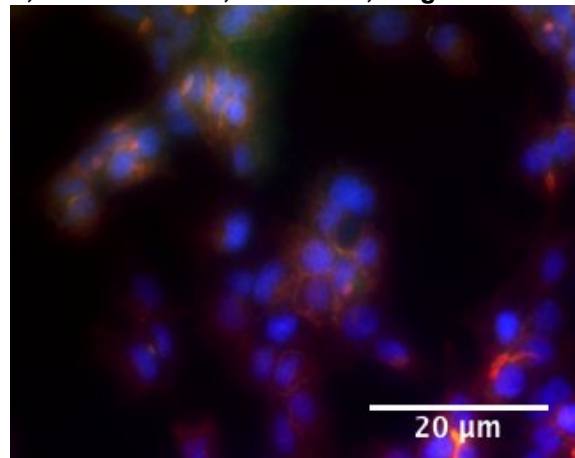
3,5-kPa Modell, mit ZO-1, Tag 1



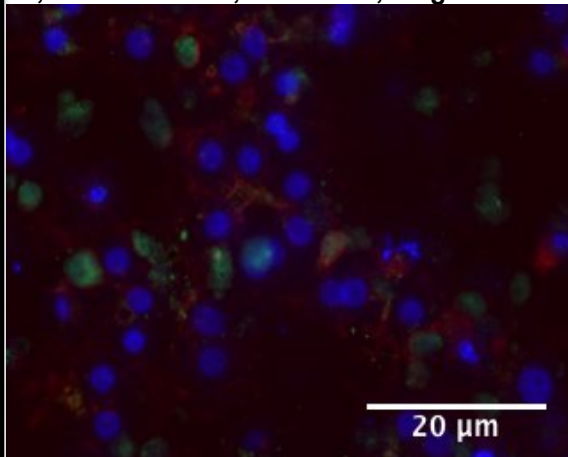
3,5-kPa Modell, mit ZO-1, Tag 3



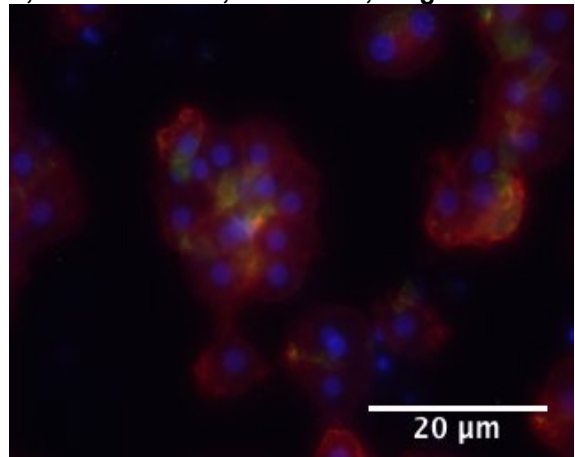
8,2-kPa Modell, mit ZO-1, Tag 1



8,2-kPa Modell, mit ZO-1, Tag 3



24-kPa Modell, mit ZO-1, Tag 1



24-kPa Modell, mit ZO-1, Tag 3

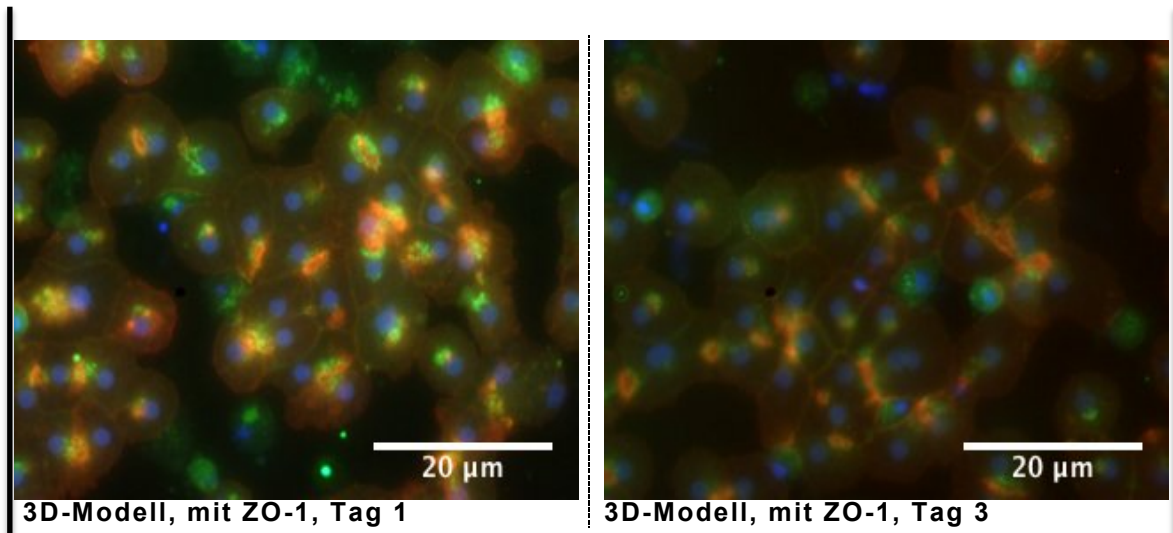


Abbildung 3.31: Immunfluoreszenz-Färbungen von pHH an Tag 1 und Tag 3 mit Hoechst, ZO-1 und F-Aktin. Hoechst markiert die Zellkerne blau, F-Aktin erscheint Rot und ZO-1 grün. Die Balkengröße ist 20µm und prozessiert wurden die Bilder mit dem Programm ImageJ. Standard 3D-Modell: ca. 0,7 kPa.

Bei Betrachtung der Morphologie des 2D-Modells wird deutlich sichtbar, dass sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 das ZO-1, welches die Tight Junctions an der apikalen und basolateralen Seite der Gallengangskanälchen markieren soll, an die Zell-Zell-Grenze dislokalisiert ist (Abb. 3.31 – 2D-Modell). Dagegen sind bei den 3D-Modellen die Gallengangskanälchen gut sichtbar (Abb. 3.31 – 3D-Modelle). Das F-Aktin, in den Bildern rot, markiert ebenfalls das Zytoskelett und die Steigerung der sogenannten Stressfasern, die durch das Wirken von Scherkräften auf die Hepatozyten entstehen. Diese Scherkräfte können entweder durch Ziehen an den Hepatozyten oder durch die veränderte Extrazelluläre-Matrix (ECM) entstehen. Beim 2D-Modell sind bereits an Tag 1 verstärkt Stressfasern vorhanden. Beim Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) hingegen sind keine erhöhten Stressfasern sichtbar. Im Verlauf der Versuche wird die Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen sowie von Gallengangskanälchen erkennbar. Sowohl beim Modell der fibrotischen (8,2 kPa) als auch dem der zirrhotischen (24 kPa) Leber erfolgt von Tag 1 bis Tag 3 ein deutlicher Anstieg der Stressfasern (Abb. 3.31 – 8,2 kPa- und 24 kPa-Modell, Tag 1 und Tag 3 im Vergleich) und zwar proportional zum Anstieg der Steifigkeit. Im Vergleich dazu sind die Stressfasern beim reinen und am wenigsten steifen 3D-Modell, circa 0,7 kPa (76) an beiden Tagen vermindert.

4. Diskussion

Ziel dieses Projektes war es, ein Modell zu entwickeln und zu validieren, das die Veränderung der Gewebesteifigkeit im Rahmen der Progression einer chronischen Lebererkrankung *in vitro* widerspiegelt.

Derzeitiger Goldstandard für die Kultivierung von Hepatozyten sind das 2D- (Collagen Monolayer) oder 3D- (Collagen Sandwich) Modell (33 / 34). Unter deren Kultivierungsbedingungen verändern die Hepatozyten ihre Zellmorphologie und verlieren neben ihrer Zellpolarität auch die spezifischen Leberfunktionen (34). Die Steifigkeit des 2D-Modells liegt in der Größenordnung von Giga Pascal und ist damit weit entfernt von der Steifigkeit einer gesunden Leber. Ein weiterer Nachteil des Collagen Monolayer Modells (2D) besteht in der maximalen Kultivierungsdauer von 72 Stunden bevor Dedifferenzierungsprozesse einsetzen (78).

Vom 3D-Modell (Collagen Sandwich) wird berichtet, dass die Hepatozyten die phänotypischen Funktionen bei der Kultivierung über einen längeren Zeitraum als in 2D-Kulturen aufrecht erhalten können (79 / 80 / 81 / 82 / 83 / 84). Die Steifigkeit des herkömmlichen 3D-Modells liegt bei circa 0.7 kPa (76). Zum Vergleich: Eine gesunde Leber hat eine Steifigkeit von 3-6 kPa (31). Da die beiden genannten Modelle in der momentanen Laborlandschaft etabliert sind und dort wichtige Resultate liefern, wurden sie in diesem Projekt als Vergleichsmodelle genutzt.

Der Verlust der Morphologie, der spezifischen Leberfunktionen und die im Vergleich zur gesunden Leber weit niedrigere Steifigkeit stellen aber deutliche Schwächen der beiden Modelle (2D bzw. 3D) im Hinblick auf das gewünschte Abbild der *in vivo* Leber dar (34). Daher wurden Modelle entwickelt, die wie das 3D-Modell die phänotypischen Leberfunktionen erfüllen (79-84) und zusätzlich durch variierte Steifigkeit (PAA-Gel), den gesunden und klinischen Zustand der Leber besser adaptieren. Mit diesen neuen 3D-Modellen sollen nicht nur die phänotypischen Funktionen einer gesunden, sondern auch die einer fibrotischen und zirrhotischen Leber abgebildet werden. Die neuen Modelle basieren u.a. aus einem Polyacrylamid (PAA) - Gel. Aufbau und Herstellung der

PAA-Gele sind in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Polyacrylamid kommt in flüssiger sowie unter Anwendung von Katalysatoren auch in fester Form vor. In flüssiger Form ist Polyacrylamid für die Zellen toxisch (85). Durch geeignete Katalysatoren polymerisiert das Polyacrylamid, so dass die PAA-Gele fest und damit nicht toxisch für die Hepatozyten sind (85).

Beningo et al. zeigten, dass durch Kultivierung der Zellen auf Polyacrylamid mechanisch entstehende Interaktionen zwischen den Zellen großen Einfluss auf das Zellverhalten hinsichtlich Proliferation, verschiedener Stoffwechselwege und Bewegung der Zellen haben (86). Dies untersuchten sie anhand von 3D-Kulturen (86).

Ein weiterer Grund dafür, dass Polyacrylamid verwendet wird, besteht darin, dass es einfach zu präparieren, sehr homogen und hinsichtlich der Darstellung der Extrazellulären Matrix (ECM) mit Hilfe des AFM bereits weitreichend überprüft ist (86 / 37). In der vorliegenden Arbeit wurden PAA - Gele hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf verschiedene Zellarten überprüft. Neben primären Rattenhepatozyten und einer Leberkrebszelllinie (HuH-7) wurden auch primär humane Hepatozyten (pHH) verwendet. Das Hauptaugenmerk lag auf den pHH, da diese den Goldstandard für *in vitro*-Toxizitätstests darstellen (34 / 78 / 87) und eine Übertragung auf den Menschen erlauben. In weiteren Projekten sind Toxizitätstest geplant, bei denen Acetaminophen eine wichtige Substanz darstellen wird, gegenüber der Rattenhepatozyten jedoch resistent sind. Dies ist einer der Gründe, warum das Hauptaugenmerk auf pHH gelegt wurde (88). Ein anderer Grund besteht darin, dass Enzymspiegel und Aktivitäten der Rattenhepatozyten nach ihrer Isolation deutlich absinken, wohingegen bei den pHH die Aktivitäten länger stabil bleiben (89 / 90). Beim Übergang auf pHH ist stets zu beachten, dass im Gegensatz zu den *in vivo* kontrolliert proliferierten Leberzellen, die Verfügbarkeit *in vitro* stark begrenzt und die Variationen sowie Ausprägungen der einzelnen Humanspender um ein Vielfaches zahlreicher sind als bei verschiedenen hepatischen Zelllinien (43 / 44).

Die PAA-Modelle sollen es auch ermöglichen, die Auswirkungen von Medikamenten und weiterer evtl. lebertoxischer Substanzen auf die pHH in einem *in vivo* ähnlichen Zustand zu testen. So haben Parmentier et al. gezeigt,

dass sich pHH bei der Stimulation mit toxischen Substanzen in 3D-Kulturen sowohl genetisch als auch morphologisch verändern (91).

Dadurch könnten die PAA-Gel-Modelle auch einen „wertvollen Beitrag zur Verbesserung, Verringerung oder sogar Vermeidung von Tierversuchen nach dem Prinzip der 3 „R“ (refine, reduce, replace / verbessern, verringern, ersetzen)“ liefern (92) und zudem ein Modell bilden, das dem klinischen Zustand näher kommt als die herkömmlichen Modelle.

In der nachfolgenden Diskussion werden die Ergebnisse des Projekts im Hinblick auf die Etablierung einer neuen Kultivierungsmethode sowie die Auswirkungen der ECM auf die Hepatozyten verglichen. Das Hauptaugenmerk beim vorliegenden Projektteil lag in der Überprüfung der Überlebensfähigkeit der Hepatozyten auf den Gelen, einiger physiologischer Grundfunktionen sowie der Möglichkeit einer Biotransformation toxischer Stoffe. In der Diskussion werden die verschiedenen Enzymaktivitäten einzeln betrachtet. Dabei erfolgt der Vergleich jeweils zwischen den unterschiedlichen Modellen sowie bezogen auf die drei verschiedenen Zellarten.

Biokompatibilität der Polyacrylamidgele

Im ersten Schritt wurde die Biokompatibilität der PAA-Gele auf die Hepatozyten getestet und zwar mit Hilfe des besonders gut für die Indikation von Zellschädigungen geeigneten Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) (89). Es bestehen deutliche Unterschiede zwischen den primären Rattenhepatozyten, den HuH-7 Zellen und den primären humanen Hepatozyten (pHH). Das 2D-Modell zeigt eine konstant niedrige Zellschädigung. Der geringe Zellschaden der HuH-7 Zellen beim 2D-Modell lässt sich dadurch erklären, dass die HuH-7 Zellen durch ihre Kultivierung in Zellkulturflaschen bereits an den harten Untergrund adaptiert sind. Bei den beiden primären Zellgruppen (rHeps / pHH) hingegen liegt die Zellschädigung auf den PAA-Gel-3D-Modellen und dem Standard 3D-Modell niedriger (I). Diese Beobachtung stimmt überein mit Daten von Tuschl et al. (83). Die Zellschädigung der primären Hepatozyten auf dem Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) ist wie bei den anderen 3D-Modellen an Tag 1 recht hoch, sinkt aber im Verlauf deutlich ab. Eine Erklärung hierfür

könnte die Adaptation der Hepatozyten an das Modell und die nicht vollständige Adaption der ausgesäten Hepatozyten auf der Kollagenschicht sein. Eine erhöhte Hepatozyten-Schädigung ist beim fibrotischen und zirrhotischen Modell zu erkennen. Dies spricht dafür, dass die Modelle geeignet sind, die Krankheitsentitäten mit der dazugehörigen Zellschädigung abzubilden. Zwar lässt sich durch LDH nicht beweisen, dass die beobachtete Zellschädigung rein spezifisch einer Hepatozyten-Schädigung entspricht, da LDH in Hepatozyten wie auch in vielen weiteren Zellen gebildet wird (93 / 94 / 95). Da jedoch in den PAA-Gel-3D-Modellen nur Hepatozyten kultiviert wurden, können diese Ergebnisse als erster Marker für die Biokompatibilität genutzt werden. Als weiterer, auch in der Klinik weithin akzeptierter Parameter wurde AST gemessen, ein spezifisches Enzym zur Detektion hepatozellulärer Schädigung. AST ist ein spezieller Marker für die Darstellung einer Hepatozyten-Schädigung. Es erlaubt aber keinen Rückschluss auf die Leberzellfunktion (96). Da die Zellkulturmodelle mit Hilfe der HuH-7 Zellreihe und der pHH weiterentwickelt werden sollen, erfolgte die experimentelle Validierung mit diesen Zellen. Die HuH-7 Zellen zeigen auf dem 2D-Modell an Tag 1 eine sehr geringe und an Tag 3 keinerlei hepatozelluläre Schädigung. Dagegen wird bei allen 3D-Modellen an Tag 1 eine hepatozelluläre Schädigung von 20% und an Tag 3 von unter 5% sichtbar. Bei den pHH zeigen die PAA-Modelle einen viel geringeren Zellschaden als die beiden Vergleichsstandardmodelle (I), das Modell der gesunden Leber einen von unter 5%. Hingegen ist die Schädigung beim 2D-Modell und bei den Modellen der fibrotischen und zirrhotischen Leber deutlich stärker ausgeprägt. Die Messungen der AST belegen, dass es sich um rein hepatozelluläre Schädigungen handelt. Und die HuH-7 Zellen zeigen durch die vorherige Kultivierung die gleiche Reaktion auf die gewohnte Umgebung wie unter der LDH-Messung. Bei allen 3D-Modellen ist hier die Gewöhnungsphase relevant. Für den in den 3D-Modellen erhöhten LDH- und AST-Wert ist folgende Erklärung möglich: Die Zellen sind zwischen zwei Kollagenschichten eingeschlossen. Deshalb können nicht alle apoptierten Zellen beim Mediumwechsel zwischen Tag 1 und 3 entfernt werden. Dies könnte die höheren Messwerte der hepatozellulären Schädigung bei 3D-Modellen

bewirken. Es ist bekannt, dass das 2D-Modell (gPa), die Modelle der fibrotischen (8,2 kPa) und zirrhotischen (24 kPa) Leber eine höhere Steifigkeit aufweisen. Diese Modelle lassen an Tag 3 im Vergleich zu den weicheren Modellen, reines 3D und dem Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) einen erhöhten primär humanen hepatozellulären Schaden erkennen. Dass eine durch Fibrose oder Zirrhose verursachte, erhöhte Umgebungssteifigkeit zu einem erhöhten Zellschaden führt, zeigen auch Koh et al. in ihren Studien mit Hilfe der Transelastographie, Leberbiopsie und der ALT-Messung (97).

Zu zeigen war, dass die Hepatozyten auf den neuen PAA-Modellen überleben können. Dies wurde mit Hilfe der Messung von LDH und AST nachgewiesen: trotz einer auf dem 2D-Modell geringeren Schädigung liegt die rein hepatozelluläre Schädigung, z.B. bei den PAA-Modellen, unter 20%. Anhand der beiden gemessenen Parameter wird sichtbar, dass die unterschiedlichen ECM-Steifigkeiten auch Auswirkungen auf die Hepatozyten haben und der klinische Zustand der Zellschädigung modelliert werden kann.

Um neben der Zellschädigung auch ein Maß für die Viabilität der pHH zu gewinnen, wurde mit Hilfe von Resazurin die mitochondriale Aktivität der Hepatozyten und damit indirekt die Zellviabilität gemessen. Der Fokus lag hierbei auf den pHH, da die HuH-7 Zellen proliferieren und dort die Werte verfälscht würden (39). Das durch die Reduktion aus Resazurin entstehende Resorufin, stieg bei allen Modellen über den betrachteten Zeitraum an (I). Jedoch unterscheiden sich die Aktivitäten zwischen Tag 1 und Tag 3 sowie zwischen den einzelnen Modellen deutlich. Beispielsweise weist das 2D-Modell eine höhere Viabilität auf als das Modell der gesunden Leber. Dies spiegelt irreführenderweise ein positives Ergebnis wider, denn vorherige Experimente mit Messungen von LDH und AST, hatten gezeigt, dass die Zellen des Modells der gesunden Leber (3,5 kPa) ‚viabler‘ waren als die pHH auf dem Standard-2D-Modell. Die restlichen PAA-Modelle und das Standard-3D-Modell liegen zwischen dem 2D- und 3,5 kPa-Modell. Diese Resultate berichten auch Bachmann et al. vom Vergleich zwischen 2D- und reinem 3D-Modell (Collagen Sandwich) (98). Eine mögliche Erklärung für den großen Unterschied der Resazurin Aktivität zwischen 2D-Modell und 3D-Modellen liegt darin, dass beim

2D-Modell die nicht vitalen Zellen vor der Aktivitätsmessung abpipettiert werden können. Dies ist bei den 3D-Modellen nicht möglich, da über den Zellen eine Kollagenschicht liegt, welche sowohl die vitalen als auch die nicht vitalen Zellen einschließt.

Der Resazurin Assay wurde auch gewählt, um neben der Vermessung der Viabilität einen Marker zu testen, der während einer längeren andauernden Kultivierung den Zustand der Zellen widerspiegelt. Hierfür eignet sich Resazurin gut, da es die Zellen nicht schädigt und nachfolgende Messungen ermöglicht werden (98 / 99).

Die höhere Viabilität der pHH auf den Matrizen der fibrotischen und zirrhotischen Leber, lässt sich durch die Modellierung der bekannten Umgebung erklären. Die isolierten Hepatozyten verweilen im Gegensatz zum unbekanntem gesunden Umfeld bereits einen vergleichsweise langen Zeitraum im Patienten in einer zur modellierten fibrotischen und zirrhotischen Leber ähnlichen Umgebung. Deshalb können sie die Umwandlung von Resazurin besser bewerkstelligen. Wegen der niedrigen Resazurin-Aktivität der 3D-Modelle ist zu diskutieren ob es eine Interaktion zwischen Resazurin und dem Polyacrylamid der neuen 3D-Modellen gibt. Wäre dies der Fall könnte damit der Widerspruch der Ergebnisse zwischen Resazurin und LDH/AST erklärt werden. Aus den oben genannten Resultaten kann zusammenfassend gefolgert werden, dass die Zellen auf allen vermessenen Modellen über einen Zeitraum von drei Tagen viabel sind und mit Hilfe von Resazurin die Möglichkeit besteht, eine längere Kultivierung zu überwachen (98 / 99).

Metabolisierungsfähigkeit der Hepatozyten

Im Anschluss an den erfolgreichen Nachweis, dass die Hepatozyten auf den neuen Kultivierungsmodellen überleben, wurde im nächsten Schritt die Metabolisierungsfähigkeit der Hepatozyten überprüft.

Die beiden Gruppen der primären Hepatozyten zeigen Gemeinsamkeiten, die bei den HuH-7 Zellen nicht festzustellen sind. Bei den primären Rattenhepatozyten und den pHH sind sowohl die Glykolyse- als auch die Gluconeogenese-Aktivitäten an Tag 1 und 3 bei allen Kultivierungsmodellen identisch. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität bei den HuH-7 Zellen zwischen

den 2D- und den 3D-Modellen signifikant verschieden. Die Glykolyse-Aktivität ist an Tag 1 und 3 beim Standard-2D-Modell sehr gering, dagegen sind die Aktivitäten bei den 3D-Modellen, insbesondere beim Modell der gesunden Leber (3,5 kPa), signifikant erhöht. Auch die Gluconeogenese-Aktivität ist bei den 3D-Modellen gegenüber dem 2D-Modell signifikant erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Studie von Okamoto et al. (100). Dort wurde die Glucoseverwertung von HuH-7 Zellen näher untersucht mit dem Ergebnis, dass der Glucoseverbrauch durch die Hochregulation des bcl-2-Gens bei HuH-7 Zellen und damit auch die Glykolyse- und die Gluconeogenese-Aktivität erhöht sind (100). Diese Versuche führte das Team um Okamoto mit 2D-Kulturen der HuH-7 Zellen durch.

Da das 2D-Modell bei der HuH-7 Zelllinie eine geringere Aktivität aufweist als die anderen Modelle, wäre es interessant zu testen, wie sich das bcl-2-Gen bei den PAA-Gel-Modellen und bei primären Hepatozyten verhält. Immerhin war es bei unseren Versuchen nicht möglich, einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Modellen bei den primären Rattenhepatozyten und den pHH nachzuweisen (I). Die leicht verminderte Glucose-Aktivität auf dem Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) entspricht den Ergebnissen der Studie von Kruszynska et al. (101). Diese Autoren konnten zeigen, dass zirrhotische Patienten eine Glucoseintoleranz aufweisen, die dazu führt, dass die nach einer definierten Zeiteinheit gemessenen Glucosewerte im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht waren. Dies spiegelt sich auch in unserem experimentellen Modell wider. Das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) zeigt im Vergleich zum Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) einen höheren Glucosemetabolismus. Neben der Glucose-Verstoffwechslung ist die Umsetzung des Harnstoffkreislaufs, mit der Detoxifikation von Ammoniak zu Harnstoff, eine elementare Funktion der Hepatozyten (102 / 103). Ammoniak ist hochtoxisch, speziell für Neuronen (102 / 103). Neben der Basisdeammonisierung wurden zwei erweiterte Stimulationen mit Ammoniumchlorid und Ammoniumchlorid plus Ornithin durchgeführt, um zu testen, ob eine Induktion möglich ist. Der Vergleich zeigte in drei Zellarten, dass sowohl zwischen primären Hepatozyten und HuH-7 Zellen als auch zwischen

2D- und 3D-Modellen große Aktivitätsunterschiede im Harnstoffkreislauf existieren. Dies widerspricht der Beobachtung beim Glucosemetabolismus, wo lediglich bei den HuH-7 Zellen ein Aktivitätsunterschied auftrat. Das könnte bedeuten, dass die erhöhte Aktivität des Glucosemetabolismus auf die HuH-7 Leberkrebszelllinie durch die bei Krebszellen gesteigerte Fähigkeit zum Glucosemetabolismus (100) beschränkt ist.

Bereits bei der Basisstimulation fallen bei allen drei Zellarten an Tag 1 und 3 signifikante Unterschiede zwischen dem 2D-Modell und den PAA- / 3D-Modellen auf. Bei den pHs besteht ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Modellen (I). Diese Beobachtung setzt sich bei den erweiterten Stimulationen mit Ammoniumchlorid und Ammoniumchlorid plus Ornithin fort. Hervorzuheben ist, dass das Modell der gesunden Leber mit zunehmender Stimulation höhere Aktivitäten aufweist. Farkas et al. berichten, dass die Harnstoff-Aktivität nach Toxingabe im reinen 3D-Modell (Collagen Sandwich) sinkt (88). Da die Aktivität in den Modellen mit zunehmender Stimulation steigt, ist die Annahme berechtigt, dass die Hepatozyten auf den PAA-Gelen Toxine besser verstoffwechseln können. Dies ist jedoch noch zu überprüfen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass viele Toxine über den Harnstoffkreislauf verstoffwechselt werden (102 / 103) und dadurch die Hepatozyten dies auf den PAA-Gel-Modellen besser bewerkstelligen können.

Sehr interessant ist auch die Tatsache, dass die höchste Aktivität aller PAA-Modelle beim vermeintlich ‚schwächsten‘ Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) gemessen wurde. Dies bedeutet einen Widerspruch zu unserer Annahme. Denn theoretisch müsste das Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) am besten mit der Detoxifikation von Harnstoff zu Recht kommen. Eine mögliche Erklärung für die gegensätzliche Beobachtung könnte darin liegen, dass die Zellen mehr Zeit benötigen um sich an die Umgebung einer gesunden Leber (3,5 kPa) zu gewöhnen und sich schneller an den Zustand einer zirrhotischen Leber (24 kPa) gewöhnen können. Parmentier et al. machten ähnliche Beobachtungen in ihren Versuchen mit 3D-Modellen, nämlich dass mit längerer Kultivierung die Aktivität der Zellen durch Umstrukturierung des Genoms anstieg (91). Dies gilt es bei den hier betrachteten neuen 3D-Modellen noch zu überprüfen.

Die in den 2D-Modellen verringerte Entgiftungsaktivität der Hepatozyten lässt sich durch den bereits beschriebenen Verlust physiologischer Leberfunktionen bei diesem Modell erklären (34). Gramignoli et al. nennen als möglichen Grund einen „Urea Cycle“-Defekt (102). Zusätzlich haben sie festgestellt, dass die Aktivität der Hepatozyten der Viabilität der Zellen unterworfen ist (102). Dies konnten die Autoren zeigen, indem sie eine Gruppe an Hepatozyten mit einer Viabilität von $< 60\%$ mit einer weiteren mit einer Viabilität von $> 60\%$ verglichen. Dabei zeigte sich, je viabler die Zellen desto höher ihre Aktivität beispielsweise beim Harnstoffkreislauf(102). In nachfolgenden Projekten wäre es von Interesse zu testen ob die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($<60\%$ und $>60\%$ Vitalität) auf den neuen PAA-Gel-Modellen geringer ausfallen.

Proteinsyntheseleistung der Hepatozyten

Ein weiterer sehr bedeutender Leberparameter, der sowohl experimentell als auch klinisch hohe Aussagekraft über den Zustand der Leber hat, ist das Protein Albumin (3). Abbildung 3.25 zeigt den umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen der Steifigkeit der ECM und der Albuminkonzentration im Zellkulturüberstand. Die beiden Standardmodelle, 2D und 3D (Collagen-Monolayer /-Sandwich), weisen an den Tagen 1 und 3 eine verminderte Albuminkonzentration auf. An Tag 1 besteht eine deutliche Signifikanz zwischen dem 2D-Modell und dem Modell der gesunden Leber. Dies und die umgekehrte Proportionalität der PAA-Modelle belegen, dass die veränderte ECM deutliche Auswirkungen auf die Hepatozyten hat. Ebenfalls gut erkennbar ist, dass Hepatozyten auf den Modellen der fibrotischen und zirrhotischen Leber ihre Proteinsynthese nur stark eingeschränkt durchführen können. Dies wird durch den signifikanten Unterschied zwischen dem 3,5 kPa-Modell (gesunde Leber) und dem 24 kPa-Modell (zirrhatische Leber) sowie auch durch den signifikanten Unterschied zwischen dem 8,2 kPa-Modell (fibrotische Leber) und 24 kPa-Modell an Tag 3, belegt.

Oberti et al. bestätigen, dass sich die Albuminkonzentration über die Zunahme der Krankheitsentität verändert und das Albumin neben anderen Parametern ein sehr guter Diagnostikmarker für Lebererkrankungen ist (103). Zaret et al. haben in ihren Studien gezeigt, dass Komponenten der Leber-Biomatrix eine

Erhöhung des mRNA-Levels für Albumin und anderer leberspezifischer Proteine im Modell bewirken (104). Diese bereits 1988 gewonnenen Erkenntnisse berechtigen zur Annahme, dass die ECM-Steifigkeit einen Einfluss bei der Proteinsynthese von Albumin hat (104). Dies spiegelt sich deutlich in unseren Ergebnissen (104). Bekannt ist auch, dass das Enzym Albumin ein sogenanntes „negativ-Akute-Phase-Protein“ ist und damit seine Konzentration bei Entzündungen sinkt (105). Dies lässt sich auf die im Projekt gemessenen Albuminkonzentrationen übertragen: mit geänderter Steifigkeit und damit geänderter „Krankheits-Umgebung“ erscheint es möglich, dass die Hepatozyten ihren Metabolismus der Situation einer ‚Entzündung‘ offenbar angleichen und es so zu einer verringerten Albuminkonzentration kommt (105).

Morphologische Veränderungen der Hepatozyten

Die bisherigen Untersuchungen zeigen eine Biokompatibilität, eine gute metabolische Fähigkeit sowie eine hohe Detoxifikation und Proteinsynthese auf den neuen PAA-Modellen. Um die Auswirkungen der veränderten ECM auf die Biotransformationsfähigkeit der Hepatozyten in diesen Modellen beurteilen zu können, wurden im nächsten Schritt die morphologischen Veränderungen der Hepatozyten untersucht. Anschließend wurden die Transporteraktivität und die Genexpression verschiedener Cytochrom P 450 Enzyme gemessen.

Die morphologischen Veränderungen wurden an den pHH und an der humanen Leberkrebszelllinie HuH-7 überprüft. Die Akkumulation von Stressfasern mit F-Aktin in den Modellen (2D, 8,2 kPa und 24 kPa) spricht für eine Reaktion der Hepatozyten (HuH-7 / pHH) auf den veränderten Untergrund (ECM). Eine mögliche Erklärung für die Hochregulation der Stressfasern ist die Rho-Kaskade, die durch Zell-Oberflächen-Proteine (Integrine) getriggert wird (106). Um dies zu evaluieren, erscheint eine Überprüfung der Integrine in den Modellen angezeigt. Untergruppen der Rho-Kaskade kontrollieren auch die Bewegung der Zellen durch Membran-Protrusion (106).

Sowohl beim Modell der fibrotischen als auch der zirrhotischen Leber kommt es zu einer Zell-Cluster-Bildung, die durch Retraktion und Spannung auf die Zellen erklärt werden könnte (106). Neben der Bewegungshemmung haben Tuschl et al. bei ihren Studien an Hepatozyten im reinen 3D-Modell (Collagen Sandwich)

auch eine erhöhte Zellapoptose durch verstärkte Zellspannung festgestellt (92). Diese Annahme erscheint bei einer rein visuellen Betrachtung der IF-Bilder von HuH-7 Zellen sowohl beim Modell der zirrhotischen Leber als auch beim reinen 3D-Modell (Collagen Sandwich) berechtigt.

Neben den allgemeinen morphologischen Veränderungen in den verschiedenen Modellen ist insbesondere auf die Ausprägungen der Gallengangskanälchen hinsichtlich der Biotransformation zu achten. Die Gallengangskanälchen wurden mit Hilfe einer Überlagerung von IF-Antikörpern, speziell F-Aktin, dargestellt. F-Aktin lagert sich insbesondere um die Grenzen der Gallengangskanälchen ab. In den IF-Abbildungen des 2D-Modells ist kein F-Aktin zu erkennen, denn im Standardkultivierungsmodell 2D können keine Gallengangskanälchen ausgebildet werden. Diese Beobachtung haben auch Murray et al. in ihren Ergebnissen beschrieben (107). Ganz anders hingegen stellt es sich bei den PAA-Modellen und dem reinen 3D-Modell (Collagen Sandwich) dar. Hier sind Gallengangskanälchen mit Hilfe von F-Aktin darstellbar.

Ein weiteres Indiz für das Fehlen der Gallengangskanälchen im 2D-Modell ist die Dislokation des IF-Antikörper ZO-1 (I). Beim 2D-Modell ist es nicht wie bei den 3D-Modellen an der Zell-Zell-Grenze lokalisiert. Eine Möglichkeit der erweiterten Überprüfung der PAA-Modelle, inwieweit neben dem visuellen Vorhandensein der Gallengangskanälchen auch eine Aktivität in den Kanälchen besteht, wäre die Messung des P-Glycoprotein (PGP). Das PGP ist bei der aktiven Gallen-Sekretion einiger lipophiler Substanzen und Medikamente involviert (108 / 109).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hepatozyten morphologisch auf die veränderte ECM reagieren und dass die Gallengangskanälchen sowohl im reinen 3D-Modell als auch auf den neuen Kultivierungsmodellen nachweisbar sind. Damit kommen die neuen Kultivierungsmodelle dem *in vivo* - Zustand der Leber mit ihrer Morphologie, speziell der Ausbildung der Gallengangskanälchen, erheblich näher. Diese Gallengangskanälchen gewährleisten den Abtransport der toxischen Stoffe nach einer erfolgreichen Biotransformation. Daher wurde im

nächsten Schritt die Phase I und III der Biotransformation an den pHH überprüft.

Genexpression der Phase I-Enzyme

In der Phase I der Biotransformation durch Cytochrom P 450 - Enzyme werden die zu metabolisierenden Substanzen durch Oxidation, Reduktion oder Hydroxilierung so umgewandelt, dass die Leber diese weiter verstoffwechseln und schließlich über die Galle ausscheiden kann (102). Dies wurde durch die Messung der Genexpression von sieben verschiedenen Cyp-Enzymen untersucht. Niemela et al. haben beschrieben, dass durch Lebererkrankungen (Fibrose und Zirrhose) die Cyp-Enzym-Genexpression induziert wird (110). Dies spiegelt sich in den Ergebnissen des fibrotischen- (8,2 kPa) und zirrhotischen- (24 kPa) Modells, bei einigen Cyps (3A4, 2B6, 2C8, usw.) wider.

Durch die Induktion von Cyp-Enzymen aufgrund einer Lebererkrankung (110), erscheint es möglich, mit den neuen PAA-Modellen auch Medikamentendosierungen für leberkranke Menschen am Modell vorab zu testen und so die wirkungsreichste therapeutische Breite des Medikaments zu finden. Dies könnte eine neue Möglichkeit der personalisierten Medizin mit Hilfe von Modellen bieten. Speziell das Cyp 3A4-Enzym, das die höchste Konzentration in der Leber hat und neben anderen Cyp-Enzymen von zentraler Bedeutung bei der Biotransformation von Medikamenten und xenobiotischen Stoffen ist (108 / 111), spielt eine wichtige Rolle. Acetaminophen ist einer der xenobiotischen Stoffe, die hauptsächlich vom Enzym Cyp 1A2 und vom Cyp 2E1 verstoffwechselt werden (70 / 112 / 113) und bei hohen Konzentrationen lebertoxisch wirken bis hin zu einem Leberversagen (114). Miyakawa et al. haben mit Hilfe von kultivierten Maus-Hepatozyten zeigen können, dass die durch Acetaminophen induzierte Leberschädigung bei niedrigen Acetaminophen-Konzentrationen von der Cyp-Aktivität abhängt und dass bei hohen Konzentrationen die Schädigung unabhängig von der Cyp-Aktivität stattfindet (115). Von Interesse und zu testen wäre weiter, ob sich dies bei den neuen PAA-Gel-Modellen ebenfalls zeigt oder ob es möglich ist, durch die veränderte ECM (PAA-Gel) eine Leberschädigung bei höheren Konzentrationen zu vermeiden.

Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass Ethanol die Cyp-Enzyme, wie z.B. Cyp 2E1, das dem für die Metabolisierung von Ethanol entscheidende Enzym, induziert (110 / 116). Dies passt zu den in diesem Projekt gemessenen Ergebnissen, da bis auf das Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) alle restlichen Modelle eine schwächere Cyp-Genexpression aufweisen. Dadurch lässt sich die Hypothese aufstellen, dass durch den veränderten und einer hauptsächlich durch Alkohol induzierten zirrhotischen Leber entsprechenden Untergrund (ECM) der Hepatozyten, die Cyp-2E1-Genexpression erhöht ist. Wang et al. konnten zeigen, dass bei einer Inhibition von Cyp 2E1, beispielweise durch Chlormethiazol, die Leberschädigung durch Ethanol ansteigt (116). Durch eine Inhibierung auf den PAA-Modellen wäre es möglich zu beobachten, ob die Hepatozyten durch die veränderte ECM (PAA-Gel) vor einer Schädigung zu schützen sind. Ebenfalls gilt es zu überprüfen, ob nach einer Stimulation mit Ethanol die Cyp-2E1-Expression auf den restlichen Modellen (bspw. 3,5 kPa-Modell) ansteigt oder ob eine Leberschädigung zunimmt.

Bei den Enzymen Cyp 2C8 und 2C9 weisen nur die PAA-Modelle eine geringfügig höhere Aktivität auf. Dies könnte mit der dort festgestellten Veränderung der ECM zusammenhängen, da durch die Polarisierung der Hepatozyten und durch die Integrität der Gap-Junctions und E-Cadherine die Cyp-Genexpression beeinflusst wird (24). In den neuen Kultivierungsmodellen werden diese anders als auf dem 2D- und reinen 3D-Modell (Collagen Sandwich) durch die Kopie der Lebermatrix ausgebildet, was wiederum die erhöhte Genexpression durch die Hepatozyten auf den PAA-Modellen erklären könnte (24). Ein allgemeines Problem bei *in vitro* Modellen besteht darin, dass die Cyp-Aktivität während den initialen 24-48 Stunden stark abnimmt. Dies haben LeCluyse et al., Akrawi et al. sowie Grant et al. in ihren Studien beschrieben (6 / 117 / 118). Interessant ist, dass dies bei den neu entwickelten PAA-Modellen nicht der Fall ist. Hier bleibt die Cyp-Genexpression über die Zeitdauer von drei Tagen nahezu konstant. Diese Konstanz der Cyp-Genexpression auf den PAA-Modellen könnte bedeuten, dass die Zellen auf diesen neuen *in vitro* Modellen den Zellen im *in vivo*

Zustand näherkommen und es damit möglich wird, Toxizitätstests über einen längeren Zeitraum durchzuführen.

Medikamente wie Rifampicin, Phenobarbital, usw. induzieren Cyp-Enzyme, wie bspw. Cyp 1A oder Cyp 3A4. Dies konnten unter anderem Runge et al. zeigen (119). In nachfolgenden Projekten wäre es von Interesse zu testen, wie die neuen PAA-Gel-Modelle mit der Cyp-Genexpression nach Stimulation mit Medikamenten, wie Rifampicin, reagieren. Denn dadurch könnte man Vorhersagen treffen, wie das Medikament bei Patienten mit Lebererkrankungen die Cyp-Aktivität verändert, um in der Folge Dosierungen anderer Medikamente der veränderten Cyp-Aktivität anzupassen.

Transporteraktivität der Hepatozyten (Phase III)

Nach der Überprüfung der Oxidierung, Reduzierung und Hydroxylierung der einzelnen Stoffe ging es im nächsten Schritt der Untersuchung um die Phase III, also den Export der Substanzen aus den Hepatozyten heraus. Diese Phase der Biotransformation wurde mit Hilfe der Aktivitätsmessung des MRP-1- und des MDR-1-Transporters getestet.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl beim MRP-1- als auch beim MDR-1-Transporter die Aufnahme- und dadurch auch die Abgabeaktivitäten beim Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) sowie dem der gesunden Leber (3,5 kPa) erhöht, beim zirrhotischen Modell (24 kPa) jedoch abgesenkt sind. Dies spricht für eine Überexpression der Transporter im Falle einer Leberfibrosierung und, bei Fortschreiten der Erkrankung hin zur Leberzirrhose, für eine Reduktion der Transporteraktivität. Hier gilt es zu diskutieren, ob die Transporter auf dem Modell der fibrotischen Leber (8,2 kPa) ähnlich der Überexpression und Fehllokalisierung der Transporter bei Tumorleiden, pathologisch erhöht sind (120 / 121). Dies hätte zur Folge, dass Medikamente ihre Wirkungs-dosis nicht erreichen oder Transporter sich beispielsweise auf Vakuolen setzen und dort Medikamente intrazellulär in Vakuolen einlagern (120 / 121). Im Widerspruch hierzu stünde aber, dass die Transporter-Aktivität im Modell der zirrhotischen Leber (24 kPa) schwächer wird. Der vorherigen Annahme entsprechend müsste die Aktivität mit fortschreitender Erkrankung ansteigen. Dass dies nicht der Fall ist, führt zur Schlussfolgerung, dass sich die Transporter Aktivität nicht, wie

beispielsweise die Cyps, durch Leberzirrhose induzieren lässt, siehe vorherigen Abschnitt. Dass Cyp-Enzyme durch Medikamente, wie Rifampicin oder Phenobarbital, induziert werden, wurde ebenfalls im vorherigen Abschnitt diskutiert. Runge et al. haben auch überprüft, ob MDR-1- und MRP-1-Transporter durch diese Medikamente induziert werden (119). Sie konnten keinen signifikanten Anstieg der Aktivität durch die Medikamente messen. Dies bedeutet, dass die Transporter nur durch Krankheiten induziert werden können. Im Umkehrschluss heißt dies, dass bei Patienten mit Lebererkrankungen die Medikamente durch die Krankheit aber nicht durch die Medikamenten-Induktion selbst höher dosiert werden müssen. Die notwendige Dosiserhöhung könnte demnach vorab an den neuen PAA-Gel-Modellen getestet werden.

Lee et al. haben beschrieben, dass die Aktivität der Transporter von Zytokinen, wie Interleukinen (IL) oder dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) abhängig ist (120). Beispielsweise ist bei einer Stimulation mit IL im Rahmen einer Entzündung, die Aktivität der Transporter herabgesetzt (120). Dies kann auf unsere Ergebnisse übertragen werden. Falls die Hepatozyten auf die Veränderung der ECM reagieren, müssten die Zellen sowohl auf dem fibrotischen- (8,2 kPa) als auch auf dem zirrhotischen (24 kPa) Modell die Aktivitäten einer Entzündung erfahren und dadurch IL freisetzen. Denn sowohl eine Fibrose als auch eine Zirrhose verursachen Entzündungen (122) und dies hätte eine Aktivitätsminderung der Transporter durch die IL zur Folge. Dies muss jedoch in nachfolgenden Projekten, beispielsweise durch Detektion der IL mit Hilfe einer FACS (Fluorescence activated cell sorting) – Analyse, noch überprüft werden (123).

Auf den neuen, klinisch näheren Modellen (PAA-Modellen) weisen die Hepatozyten eine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zum 2D-Modell auf (z.B. Abb. 3.27). Eine Erklärung für die geringe Aktivität der Hepatozyten auf dem 2D-Modell könnte sein, dass das Fehlen der 3D-Matrix zum Import der Transporter von der apikalen Seite führt und damit sowohl der Uptake, die Metabolisierung als auch der Efflux verringert sind (124). Eine weitere Erklärung für die geringe Aktivität auf den 2D-Modellen besteht, wie oben erklärt, darin dass die Hepatozyten auf dem 2D-Modell ihre Morphologie und dadurch auch

ihre Zellpolarität ändern. Durch den Polaritätsverlust sind die Transporter dislokalisiert und können nicht ihre Aufgabe erfüllen (125 / 126).

Diese Feststellung wird durch Ergebnisse gestützt, wonach es sowohl beim 2D- als auch beim 3D-Modell zu einer Akkumulation von CFDA kommt (107). Ein Beleg für die geringere Akkumulation bei den neuen PAA-Modellen ist die Differenz zwischen den gemessenen Aktivitäten bei den Modellen mit und ohne Zellen im Rahmen des Efflux. Es galt nachzuweisen, dass es nicht zu einer Akkumulation durch die oberste Kollagenschicht der 3D-Modelle kommt. Dies konnte durch den gemessenen Background, also den Anteil an CFDA, der ohne Zellen im Gel verbleibt, gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die Phasen der Biotransformation auf den neuen PAA-Modellen mindestens so gut funktionieren wie auf den beiden Standardkultivierungsmodellen. In manchen Punkten weisen die PAA-Modelle eine höhere und bessere Aktivität auf. Mit Hilfe der Messung dieser Leberfunktionen konnte deutlich gezeigt werden, dass die Hepatozyten positiv auf die Veränderung der ECM reagieren.

Limitierungen der neuen Kultivierungsmodelle

Nach Überprüfung der Verträglichkeit der PAA-Gele, der Messung einiger Leberparameter und durch die Tests der Biotransformation lässt sich zusammenfassend folgern, dass die neu entwickelten Modelle im Vergleich zu den beiden Standard-Kultivierungsmodellen 2D- und reinem 3D-Modell wohl eine verbesserte Kultivierungs-Alternative darstellen. Dies gilt insbesondere für die Kultivierung in der Umgebung einer fibrotischen oder zirrhotischen Leber sowie für physiologische Tests der Hepatozyten in einem *in vivo* - ähnlichen *in vitro* - Zustand. Es konnte gezeigt werden, dass die Hepatozyten nicht nur auf die Zugabe von Substanzen sondern bereits bei Veränderung der Umgebung reagieren. Dennoch gilt es auch zu diskutieren, in wie weit die neuen Modelle Schwachstellen aufweisen. Ein wichtiger Punkt hierbei ist die Tatsache, dass das PAA-Gel mit den verschiedenen Steifigkeiten lediglich von unten auf die Hepatozyten wirkt. Dadurch lassen sich evtl. einige widersprüchliche positive Ergebnisse erklären, beispielsweise die hohen Aktivitäten auf dem Modell der

zirrhotischen Leber bei dem Harnstoff-Assay. Um dies zu Erklären, fehlen noch Ideen. Eine mögliche Lösung könnte darin bestehen, die Zellen durch ein PAA-Gel mit entsprechender Steifigkeit von oben zu stimulieren. Denn Pham et al. konnten zeigen, dass der entscheidende Faktor für die Fähigkeit einer Zellbewegung die Schicht auf den Zellen ist (127). Eventuell ist dies auch der entscheidende Faktor für die Stimulierung der Hepatozyten. Lam et al. konnten feststellen, dass Zellen stärker in 3D-Modellen mit einer geringeren Steifigkeit infiltrieren als in 3D-Modellen mit einer höheren Steifigkeit (128). Dies könnte bedeuten, dass die Hepatozyten im reinen 3D-Modell (ca. 0,7 kPa) und im Modell der gesunden Leber (3,5 kPa) durch die stärkere Infiltration gehemmt werden. Durch das Collagen Sandwich könnten sowohl im reinen 3D-Modell als auch bei den neuen PAA-Modellen die Zellen zu dicht aneinander gelagert sein und dadurch sich selbst in ihrer Aktivität hemmen. Dies haben auch Ichihara et al. im Jahre 1991 beschrieben (129).

Insgesamt erbringen die Ergebnisse dieses Projektes aber gute Ansätze im Hinblick auf das Ziel, ein *in vitro* - Modell zu entwickeln, das die verschiedenen klinischen *in vivo* - Zustände der Leber hinreichend abbildet.

Ausblick

Zur weiteren Verfeinerung der Modelle erscheint es zunächst angezeigt, den Kultivierungszeitraum zu verlängern, um die einzelnen Funktionen über längere Zeiträume zu testen. Wang et al. sowie Le Cluyse et al. haben gezeigt, dass Hepatozyten ihre Morphologie und Funktionalität auf Collagen Typ I circa zwei Wochen und auf einer Biomatrix circa acht Wochen beibehalten (130 / 80). Anhand längerer Kultivierungsversuche wäre zu überprüfen, ob dies auch auf den PAA-Modellen möglich ist. Parallel hierzu sollte die Stimulation mit verschiedenen Toxinen erfolgen, um dem Ziel von Medikamententests mit Hilfe dieser Modelle näherzukommen. Die bereits getesteten Parameter LDH, Urea und Albumin eignen sich gut als Indikator für die Toxizitätsaktivität (88) und das getestete Resazurin zur Überprüfung des Zustands der Hepatozyten während der Stimulation.

Da die Umgebung der Hepatozyten nicht der einzige Faktor für die Entstehung einer Leberfibrose oder Leberzirrhose ist, bestehen verschiedene

Möglichkeiten, die beiden PAA-Modelle zu verbessern. Eine Option dürfte sein, die Hepatozyten auf den Modellen der fibrotischen und zirrhatischen Leber zusätzlich mit Zytokinen und Growth Factors (Wachstumsfaktoren) zu stimulieren. Ramadori et al. sowie Parola und Pinzani konnten zeigen, dass diese Faktoren eine Schlüsselrolle sowohl bei der Regulation des Leberwachstums als auch bei der Entwicklung entzündlicher fibrotischer Erkrankungen spielen (6 / 131 / 132). Eine andere Möglichkeit ist die sogenannte Cokultur oder Mischkultur, bei der neben Hepatozyten parallel Fibroblasten, Epithelzellen der Gallengänge (sog. Cholangiozyten) oder Kupfferzellen mit kultiviert werden. Es erscheint möglich, dass mit Hilfe von Fibroblasten und Epithelzellen die Kultivierung speziell beim Modell der fibrotischen Leber dem *in vivo* - Zustand näher kommt. LeCluyse et al. haben gezeigt, dass beispielsweise mit Hilfe einer Cokultur von Kupfferzellen die Leberphysiologie bei *in vitro* - Modellen aufrechterhalten werden kann (6).

Eine weitere Möglichkeit wäre, die PAA-Modelle mit einem kontinuierlichen Flowsystem zu perfundieren, wie es Gebhardt und Mecke und Gebhardt et al. beschrieben haben (133 / 134). Sie konnten belegen, dass die Cyp-Aktivität bei einem perfundierten System erhöht ist. Eine andere Möglichkeit besteht darin, neben Nährstoffen die zu testenden Medikamente mit einem Flowsystem, ähnlich dem *in vivo* - Flow durch die Leber, durch die PAA-Gele fließen zu lassen (6).

Ein von LeCluyse als elementar angesehener Hinweis besteht darin, dass bei der Entwicklung der *in vitro* - Modelle nicht unbeachtet bleiben darf, dass der *in vivo* - Zustand der Leber selbst noch nicht vollständig erforscht ist. Entsprechende Ergebnisse sind jedoch grundlegend für die Entwicklung klinischer *in vitro* - Modelle zur verbesserten Nachbildung verschiedener *in vivo* - Zustände.

5. Zusammenfassung

Erkrankungen der Leber sind, neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die häufigsten chronischen Erkrankungen älterer Menschen. Große Häufigkeiten haben speziell die beiden Krankheitsentitäten Leberfibrose und Leberzirrhose. Bis dato stellen 2D-Modelle den Goldstandard für *in vitro*-Toxizitätsstudien an primär humanen Hepatozyten (pHH) dar. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Untersuchung des Einflusses der Extrazellulären Matrixsteifigkeit (ECM) auf den Hepatozyten-Metabolismus. Ziel ist vor allem die Entwicklung eines Modells, das den *in vivo*-Zustand einer Leber besser abbildet. Das 2D-Modell entspricht nicht den *in vivo*-Bedingungen, da eine gesunde Leber eine Steifigkeit von 3-6 kPa, die 2D-Kultur hingegen eine solche im Bereich von Giga-Pascal aufweist. Bei chronischen Lebererkrankungen, wie der Leberfibrose und Leberzirrhose, steigt die Steifigkeit des Organs entsprechend der Krankheitsprogression an (gesunde Leber 3,5 kPa, fibrotische Leber 8,2 kPa, zirrhotische Leber 24 kPa). Um die Auswirkungen der ECM-Steifigkeit auf die Physiologie der pHH unter den Bedingungen einer gesunden, fibrotischen und zirrhotischen Leber zu untersuchen, wurde ein Kultivierungsmodell basierend auf Polyacrylamid (PAA) entwickelt. Als Vergleichsmodelle dienen das 2D- (Collagen Monolayer) und das herkömmliche 3D-Modell (Collagen Sandwich). Die Steifigkeit der PAA-Gele wurde mit Hilfe des Atomic-Force-Mikroskops validiert.

In einem weiteren Schritt wurde unter den neuen Bedingungen an der HuH-7 Leberkrebszelllinie die Biokompatibilität der PAA-Gele mit Hilfe von LDH und AST überprüft. Als zusätzliche Parameter wurden der Glukose- und der Harnstoffmetabolismus getestet, um eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit physiologische Funktionen der Hepatozyten erfüllt werden. Schließlich wurde an Tag 1 die morphologische Veränderung der HuH-7 Zellen mit Hilfe von IF-Farbstoffen dargestellt. Neben der Testung der PAA-Modelle an HuH-7 Zellen wurden die neuen Modelle auch anhand primärer Rattenhepatozyten und anschließend mit pHH getestet. Bei den primären Rattenhepatozyten wurden,

außer den morphologischen Veränderungen, die gleichen Parameter wie bei den HuH-7 Zellen überprüft. Bei den pHH erfolgte des Weiteren die Überprüfung der Parameter Albumin, Resazurin. Die Fähigkeit zur Biotransformationsfähigkeit wurde anhand der Transporteraktivitäten und Cytochrom P 450 - Genexpressionen überprüft.

Auf den PAA-Gelen zeigten alle drei Zellarten eine gute Zellviabilität und keinen erhöhten hepatozellulären Schaden gegenüber den Vergleichsmodellen, 2D- und reinem 3D-Modell. Bei der Metabolisierung von Glukose und Harnstoff wurden deutliche Unterschiede der primären Hepatozyten zu den HuH-7 Zellen sichtbar. Speziell bei den pHH konnte auf den PAA-Modellen eine erhöhte Harnstoff- und Albumin-Produktion beobachtet werden. Zudem sind die Transporter MRP-1 und MDR-1 aktiver und die Cytochrom P 450 - Enzyme zeigen auf den PAA-Gelen signifikante Expressionsunterschiede zum 2D-Modell. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen konnte in den HuH-7 Zellen und in den pHH eine proportionale Steigerung der Stressfasern verbunden mit der Erhöhung der Steifigkeiten nachgewiesen werden. Auch eine verstärkte Ausbildung von Gallengangskanälchen im 3D-Modell (Collagen Sandwich) und in den PAA-Modellen war signifikant.

Mit den Tests anhand der neu entwickelten PAA-Modelle konnte nachgewiesen werden, dass der Metabolismus der Hepatozyten bereits allein durch die Änderung der ECM-Steifigkeit beeinflussbar ist und dass es möglich ist, mit diesen neuen *in vitro* Modellen näher an den *in vivo* Zustand der Leber zu kommen. Dennoch gilt es, die Hepatozyten auf den neuen Modellen mit Hilfe von Toxizitätstests weiter zu überprüfen und die beiden Krankheitsentitäten nicht nur durch die veränderte Matrixsteifigkeit darzustellen, sondern beispielsweise durch Versuche unter Zugabe von Interleukinen / Zytokinen zu ergänzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Munding J, Tannapfel A. (2011) Anatomie der Leber – Was muss der Radiologe wissen?, Vol. 51, Issue 8, p. 655-660
2. Burt A, Portmann BC, Ferrell LD. (2006). MacSween's pathology of the liver, Elsevier, New York.
3. Rainer Klinke, (2009). Physiologie, 6. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart.
4. <http://www.wp12032345.server-he.de/webop/wp-content/uploads/123-1.jpg> (Zugriff 03.09.2015).
5. <http://www.tobias-schwarz.net/medizin/spezielle/leber.gif> (Zugriff 03.09.2015).
6. LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol.* 2012; 42(March): p. 501-548.
7. Bradley SE, Ingelfinger FJ. (1945). The estimation of hepatic blood flow in man. *J Clin Invest* 24: p. 890–897.
8. Bioulac-Sage P, Lebail B. Balabaud C. (2007). Liver and biliary tract histology. In: Rodés J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen J Rizzetto M (eds.) Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd edition. Malden: Wiley-Blackwell Publishing.
9. Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 161:III–XIII, p. 1–151.
10. Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. (2008). Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 1: p. 107–117.
11. DeLeve LD. (2007a). The hepatic sinusoidal endothelial cells. In: Aird W. (ed.) Endothelial biomedicine. Cambridge University Press.
12. DeLeve LD. (2007b). Hepatic microvasculature in liver injury. *Semin Liver Dis* 27: p. 390–400.
13. Hoebe KH, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, Van Miert AS, Monshouwer M. (2001). Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: p. G720–G728.
14. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. (2006). Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 12: p.7413–7420
15. Tietz PS, Larusso NF. (2006). Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol* 22: p. 279–287.
16. Martinez-Hernandez A. (1984). The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 51: p. 57–74.
17. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. (1993). The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423: p. 1–11.
18. Bissell DM, Arenson DM, Maher JJ, Roll FJ. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest* 79: p. 801–812.

19. Wolkoff AW , Novikoff PM. (2007). Cell Biology of the hepatocyte. In: Rodes J, Benhamou J, Blei A, Reichen J Rizzetto M. (eds.) Textbook of hepatology: from basic to clinical practice. Malden, MA: Wiley- Blackwell Publishing.
20. Rodés et al. (2007). Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice.
21. Moissoglu K, Schwartz MA. (2006). Integrin signalling in directed cell migration. *Biol Cell* 98: p. 547–555.
22. Decaens, C., Durand, M., Grosse, B., & Cassio, D. (2008). Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 100(7), p. 387–398. doi:10.1042/BC20070127.
23. Hughes RC, Stamatoglou SC. (1987). Adhesive interactions and the metabolic activity of hepatocytes. *J Cell Sci Suppl* 8: p. 273–291.
24. Hamilton, G. A., Jolley, S. L., Gilbert, D., Coon, D. J., Barros, S., and LeCluyse, E. L. (2001). Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res*. 306, p. 85–99.
25. Leibold E, Schwarz LR. (1993). Intercellular communication in primary cultures of putative preneoplastic and 'normal' hepatocytes. *Carcinogenesis* 14: p. 2127–2129.
26. Volberg T, Zick Y, Dror R, Sabanay I, Gilon C, Levitzki A, Geiger B. (1992). The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *EMBO J* 11: p. 1733–1742.
27. Mooney D, Hansen L, Vacanti J, Langer R, Farmer S, Ingber D. (1992). Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *J Cell Physiol* 151: p. 497–505.
28. Huang S, Ingber DE. (1999). The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* 1: p. E131–E138.
29. Siegmund-Schulze N. (2012) Wie sich Therapien fortentwickeln. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 109, Heft 17 p. 863.
30. www.genesis.destatis.de (Zugriff 25.03.2015).
31. Bataller R, Brenner D a. Science in medicine Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2): p. 209-218.
32. www.ag-bosserhoff.de/ty3temp/pics/ab69e69df4.jpg (Zugriff 05.01.2016)
33. Gomez-Lechon MJ, Castell JV et al (2008) An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4(7): p. 837–854.
34. Godoy P, Hengstler JG et al (2009) Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology* 49(6): p. 2031–2043.
35. Bucher N, Robinson G, Farmer S. (1990). Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury. *Semin Liver Dis* 10: p. 11–19.
36. <http://www.eurofinngenomics.eu/de.aspx> (Zugriff 05.01.2016)

37. Buxboim A, Rajagopal K, Brown AEX, Discher DE (2010). How deeply cells feel: methods for thin gels. *J Phys Condens Matter*.22(19):194116.
38. Carl Roth-informations about acrylamidgels.
39. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Chemically Defined Medium. 1982;42: p. 3858-3863.
40. Sabine Schmitz, Der Experimentator: Zellkultur 3. Auflage, Heidelberg 2011 p. 206.
41. Nakabayashi et al. (1985), *Cancer Res.*, 45: 6379-6383.
42. Krelle A, Okoli A, Mendz G. (2013). Huh-7 Human Liver Cancer Cells: A Model System to Understand Hepatocellular Carcinoma and Therapy. *J Cancer Ther*. 2013(April): p. 606-631.
43. Aldridge, J. E., Gibbons, J. A., Flaherty, M. M., Kreider, M. L., Romano, J. A., Levin, E. D. (2003). Heterogeneity of Toxicant Response: Sources of Human Variability. *Toxicol. Sci*. 76, p. 3-20.
44. Richert, L., Alexandre, E., Lloyd, T., Orr, S., Viollon-Abadie, C., Patel, R., Kingston, S., Berry, D., Dennison, A., Heyd, B., Manton, G., Jaeck, D. (2004). Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver Int* 24, p. 371-378.
45. Seki et al., (1999) *Hepatogastroenterology*, 46: p. 2812-2817.
46. Lohmann et al. (1999), *Science.*, 285: p. 110-113.
47. Damm G, Burkhardt B, Schelcher C, Thasler W, Nussler AK (2012). Human hepatocyte isolation, culture and transport as well as their limitations and pitfalls. *J. Archives of Toxicology*, in press.
48. Knobloch D, Ehnert S, Schyschka L, Buchler P, Schoenberg M, Kleeff J, Thasler W, Nussler NC, Godoy P, Hengstler JG, Nussler AK, Human Hepatocytes: Isolation, Culture, and Quality Procedures. In *Hepatocytes; Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2011; Volume 806, p. 99–120.
49. Guidotti G. et al. (1961) Enzymatic determination of glucose. *J. Anal chem*. 33, p. 151-153.
50. Zawada et al. (2009) Quantitative determination of urea concentrations in cell culture medium. *J. Biochem. cell biol*. 87,p.541-544.
51. User Manual, Fluitest® LDH-L (L-LACTATE DEHYDROGENASE), von der Firma Analyticon.
52. User Manual, Fluitest® GOT / AST (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE), von der Firma Analyticon.
53. Borra RC, Lotufo MA, Gagiotti SM, Barros FDM, Andrade PM. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res*. 2009;23(3): p. 255-262.
54. Mc Millian et al. (2002) An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *J. Cell Biology and Toxicology*.
55. Laupeze B, Amiot L et al (2001) Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leukocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood. *Life Sci* 68(11):p. 1323–1331.

56. User Manual, Human Albumin ELISA Quantitation Set, Cat. No. E80-129, von der Firma Bethyl Laboratories.
57. peqGOLD TriFast data sheet, von der Firma peqLab.
58. BMG Labtech Manual and personal introduction.
59. Sambrook & Russel (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Man. 3rd Ed.
60. User Manual, Thermo Scientific / RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621, #K1622.
61. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nphParser?Sect2=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearchbool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes&Query=PN%2F4683202> (Zugriff 20.04.2016).
62. https://www.unimarburg.de/fb20/cyto/lehre/praktikumsunterlagen/praktikum/Protokoll_Immunfluoreszenz_081202.pdf (Zugriff 20.04.2016).
63. Dr. Hüppe D., Dr. Mauss S. (2009) Nichtinvasive Bestimmung des Fibrosegrades der Leber durch Elastographiemessung mittels Fibroscan® – Erfahrungen im praktischen Alltag. HepNet Journal p. 12.
64. <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/g/LDH.htm>. (Zugriff 03.09.2015)
65. <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/g/GOT.htm>. (Zugriff 03.09.2015)
66. Florian Horn (2009). Biochemie des Menschen, 4. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart p. 82-90.
67. Godoy P, Hengstler J, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, Mueller A, Tuschl G, Mueller, S.(2009) Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor induced apoptosis. *Hepatology*, 49, p. 2031–2043.
68. Tsukada N, Ackerley C a, Phillips MJ (1995). The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. *Hepatology*. 1995;21(4): p. 1106-1113.
69. Harada, M., Sakisaka, S., Terada, K., Kimura, R., Kawaguchi, T., Koga, H., Taniguchi, E., Sasatomi, K., Miura, N., Suganuma, T. et al. (2000) Role of ATP7B in biliary copper excretion in a human hepatoma cell line and normal rat hepatocytes. *Gastroenterology* 118, p. 921–928.
70. L. Schyschka, J. J. Martínez Sánchez, Z. Wang, B. Burkhardt, U. Müller-Vieira, K. Zeilinger, A. Bachmann, S. Nadalin, G. Damm, A. K. Nussler (2013), Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Arch Toxicol.*;87: p. 1581–1593.
71. Rainer Klinke (2009). Physiologie, 6. Auflage, Thieme V. Stuttgart p. 226.
72. Eckl PM, Bresgen N (2003) The cultured primary hepatocyte and its application in toxicology. *J Appl Biomed* 1: p. 117–126.
73. Aleksunes LM, Augustine LM et al (2007) Influence of acetaminophen vehicle on regulation of transporter gene expression during hepatotoxicity. *J Toxicol Environ Health A* 70(21): p. 1870–1872.
74. J. Lin, L. Schyschka, R. Muhl-Benninghaus, J. Neumann, et al. (2012). Comparative Analysis of Phase I and II Enzyme Activities in 5 Hepatic Cell Lines Identifies Huh-7 and HCC-T Cells with the Highest Potential to Study Drug metabolism. *Arch. of Tox.* Vol. 86, No.1. p. 87-95.

75. Suzuki N, Higuchi T et al (2002) Multiple active intermediates in oxidation reaction catalyzed by synthetic heme-thiolate 1593 complex relevant to cytochrome p450. *J Am Chem Soc* 124(32): p. 9622–9628.
76. Fischer RS, Myers K a, Gardel ML, Waterman CM. Stiffness-controlled three-dimensional extracellular matrices for high-resolution imaging of cell behavior. *Nat Protoc.* 2012;7: p. 2056-2066.
77. Hewitt NJ, Lechon MJ et al (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39(1): p. 159–234.
78. Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., und Rogiers, V. (2006a). Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* 7, p. 629-660.
79. Dunn, J. C., M. L. Yarmush, H. G. Koebe, and R. G. Tompkins. (1989). Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J.* 3: p. 174–177.
80. LeCluyse, E. L., K. L. Audus, and J. H. Hochman. (1994). Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am. J. Physiol.* 266: p. C1764–C1774.
81. Swift B, N. Pfeifer, K. Brouwer. (2010). Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.*42: p. 446-471.
82. Bader, A., Fruhauf, N., Zech, K., Haverich, A., and Borlak, J. T. (1998). Development of a small-scale bioreactor for drug metabolism studies maintaining hepatospecific functions. *Xenobiotica* 28, p. 815–825.
83. Kern A., Bader A., Pichlmayr R., and Sewing, K. F. (1997). Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem. Pharmacol* 54, p. 761–772.
84. Rotem, A., Matthew, H. W. T., Hsiao, P. H., Toner, M., Tompkins, R. G., and Yarmush, M. L. (1995). The activity of cytochrome P4501a1 in stable cultured rat hepatocytes. *Toxicol. in Vitro* 9, p. 139–149.
85. (No authors listed), (2005). Amended final report on the safety assessment of polyacrylamide and acrylamide residues in cosmetics, *Int. J. of Toxicol.* 24 Suppl 2: p. 21-50.
86. Beningo K. A., Lo C., Wang Y. (2002). Flexible Polyacrylamid Substrata for the Analysis of Mechanical Interactions at cell-substratum adhesions, *J. Methods in Cell Biology* 69: p. 325-339.
87. Bessems, J. G., Vermeulen, N. P. (2001). Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, p. 55–138.
88. Farkas D, Tannenbaum SR (2005). Characterization of chemically induced hepatotoxicity in collagen sandwiches of rat hepatocytes. *Toxicol Sci.*;85(2): p. 927-934.

89. De Smet, K. Bruning, T., Blaszkewicz, M., Bolt, H. M., Vercruysse, A., and Rogiers, V. (2000). Biotransformation of trichloroethylene in collagen gel sandwich cultures of rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 74, p. 587–592.
90. Russell, W. M. S., und Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Reprinted by UFAW, England, 1992, London.
91. Parmentier C, Truisi G, Moenks K, Stanzel S, Lukas A, Kopp-Schneider A. (2013). Transcriptomic hepatotoxicity signature of chlorpromazine after short- and long-term exposure in primary human sandwich cultures. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(10), p.1835–1842.
92. Tuschl G. (2011), Serumfreie Collagen Monolayer- und Sandwich-Kulturen primärer Hepatozyten als ein wertvolles Modell zur Detektion von Toxizität und Arzneimittelwechselwirkungen *in vitro*. Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Mainz.
93. Kotoh K, Kato M, Kohjima M, et al. (2011). Lactate dehydrogenase production in hepatocytes is increased at an early stage of acute liver failure. *Exp Ther Med.* 2011;2(2): p. 195-199.
94. Rosalki SB and McIntyre N (1999): Biochemical investigations in the management of liver disease. In: Oxford Textbook of Clinical Hepatology. 2nd edition. Bircher J (ed). Oxford University Press, Oxford, p. 503-521.
95. Kaplan MM (1993): Laboratory tests. In: Diseases of the Liver. 7th edition. Shiff L (ed). J.B. Lippincott Company, Philadelphia, p. 108-144.
96. Kew et al. (2000), Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage, aus dem J. The Lancet, Volume 355, No. 9204, p. 591–592.
97. Koh C, Turner T, Zhao X, et al. Liver stiffness increases acutely during sickle cell vaso-occlusive crisis. *Am J Hematol.* 2013;88(11): p. 250-254.
98. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, et al (2015). 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays*;4(1): p. 64-83.
99. Mueller D, Tascher G, Damm G, Nüssler AK, Heinzle E, Noor F. Real-time in situ viability assessment in a 3D bioreactor with liver cells using resazurin assay. *Cytotechnology.* 2013;65(2): p. 297-305.
100. Okamoto K, Muraguchi T, Shidoji Y (2008). Enhanced Glucose Requirement in Human Hepatoma-derived HuH-7 Cells by Forced Expression of the bcl-2 Gene. *J Clin Biochem Nutr*;43: p. 101-108. (91)
101. Kruszynska YT, Meyer-Alber a., Darakhshan F, Home PD, McIntyre N (1993). Metabolic handling of orally administered glucose in cirrhosis. *J Clin Invest.*;91: p. 1057-1066.
102. Gramignoli R., Tahan V., Dorko K., Venkataramanan R., Fox I. J., Ellis E.C.S., Vosough M., Strom S.C. (2013). Rapid-and-Sensitive Assessment of Human Hepatocyte Functions. *J. Cell Transplantation*.
103. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, et al (1997). Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology.*;113(5): p. 1609-1616.
104. Zaret KS, DiPersio CM, Jackson DA, Montigny WJ, Weinstat DL. (1988). Conditional enhancement of liver-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: p. 9076–9080.
105. Kang, Y. H., Berthiaume, F., and Yarmush, M. L. (2002). Long-term stable cultures of rat hepatocytes: An in vitro model to study acute and chronic hepatic inflammation. *Tissue Eng.* 8, p. 681–693.

106. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003). Cell migration: Integrating signals from front to back. *J. Science* 302: p. 1704–1709.
107. John W. Murray, Dennis Han, Allan W. Wolkoff (2014) Hepatocytes maintain greater fluorescent bile acid accumulation and greater Sensitivity to drug induced cell death in three dimensional Matrix culture. *J. Physiological Reports*: p. 1-13.
108. Lum BL, Gosland MP. (1995). MDR expression in normal tissues. *Hematol Oncol Clin North Am* 9: p. 319.
109. Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, Sugimachi K, Kuwano M. (2000), Increased expression of an ABC superfamily transporter, MRP2, in human colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 6: p. 2401–2407.
110. Niemela O., Parkkila S., Juvonen R.O., Viitala K., Gelboin H.V., Pasanen M. (2000). Cytochromes P450 2A6,2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J. of Hepatology* 33: p. 893-901.
111. Kostrubsky VE, Strom SC, Wood SG, Wrighton SA, Sinclair PR, Sinclair JF (1995). Ethanol and isopentanol increase CYP3A and CYP2E in primary cultures of human hepatocytes. *J. Arch Biothem Biophys.*
112. Zaher H, Buters JT et al (1998). Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *J. Toxicol Appl Pharmacol* 152(1): p. 193–199.
113. Ullrich A, Berg C et al (2006). Use of a novel; standardized and validated human hepatocyte culture system for repetitive analyses of drugs: repeated administrations of acetaminophen reduces albumin and urea secretion. *Faseb Journal* 20(4): p. A630–A630.
114. Decaens, C., Durand, M., Grosse, B., & Cassio, D. (2008). Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 100(7), p. 387–98. doi:10.1042/BC20070127
115. Miyakawa K, Albee R, Letzig L, Lehner A, Scott M, Buchweitz J, James L, Ganey P, Roth R, (2015). A Cytochrome P450-Independent Mechanism of Acetaminophen-Induced Injury in Cultured Mouse Hepatocytes, *J Pharmacol Exp. Ther.* P. 230-7. doi: 10.1124/jpet
116. Wang, Y., Millonig, G., Nair, J., Patsenker, E., Stickel, F., Mueller, S., ... Seitz, H. K. (2009). Ethanol-induced cytochrome P4502E1 causes carcinogenic etheno-DNA lesions in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 50(2), p. 453–461. doi:10.1002/hep.22978
117. Akrawi M, Rogiers V, Vandenberghe Y (1993). Maintenance and induction in co-cultured rat hepatocytes of components of the cytochrome P450-mediated monooxygenase. *Biochem Pharmacol* 45: p. 1583–1591.
118. Grant M, Melvin MA (1985). Studies on the maintenance of cytochromes P-450 and b5, monooxygenases and cytochrome reductases in primary cultures of rat hepatocytes. *FEBS Lett* 190: p. 99–103.
119. Lean, M. M., Maves, S. Kara, E. W., & Sligar, S. G. (1998). Characterization of a Cytochrome P450 from the Acidothermophilic Archaea *Sulfolobus solfataricus*, 172(2), p. 166–172.

120. Lee G, Piquette-Miller M (2003). Cytokines Alter the Expression and Activity of the Multidrug Resistance Transporters in Human Hepatoma Cell Lines; Analysis Using RT-PCR and cDNA Microarrays. *J Pharm Sci.*;92(11): p. 2152-2163.
121. Rost D, Konig J, Weiss (2001). Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *J. Gastroenterology* 121: p. 1203–1208.
122. Martínez-Esparza M, Tristán-Manzano M, Ruiz-Alcaraz A, García-Peñarrubia, P. (2015). Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), p. 11522–11541.
123. http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000002337/03_Methoden.pdf;jsessionid=28EF0B6738A7FD9F8F30581B03D769BC?hosts=, (Zugriff am 28.04.2016).
124. Rost D, Kartenbeck J et al. (1999). Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin- induced cholestasis. *J. Hepatology* 29(3): p. 814–821.
125. Roelofsen H, Hooiveld GJ et al (1999). Glutathione S-conjugate transport in hepatocytes entering the cell cycle is preserved by a switch in expression from the apical MRP2 to the basolateral MRP1 transporting protein. *J Cell Sci* 112(Pt 9): p. 1395–1404.
126. Kullak-Ublick GA, Stieger B et al (2000). Hepatic transport of bile salts. *J. Semin Liver Dis* 20(3): p. 273–292.
127. Pham J, Xua L, Del Campo A, Salierno M, (2016). Guiding cell migration with microscale stiffness patterns and undulated surfaces. *Acta Biomater.*
128. Ren C, Lam I, Wong K, Nai S, Chua C, Tan S, & Tan L. (2014). A 3D Biomimetic Model of Tissue Stiffness Interface for Cancer Drug Testing.
129. A. Ichihara, (1991). *Dig. Dis. Sci.* 36(4), p. 489–493, BF01298881
130. Wang Y, Cui CB, Yamauchi M (2000). Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *J. Hepatology* 53: p. 293–305.
131. Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. (2008). Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 1: p. 107–117.
132. Parola M, Pinzani M. (2009). Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2:4.
133. Gebhardt R, Mecke D (1979) Perfused monolayer cultures of rat hepatocytes as an improved in vitro system for studies on ureogenesis. *Exp Cell Res* 124: p. 349–359.
134. Gebhardt R, Hengstler JG, Muller D, Glockner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koese T, Burger HJ, Maas J, Oesch F (2003) New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev* 35: p. 145–213.

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Bild A zeigt die acht Lebersegmente, Bild B den mikroskopischen Aufbau der Leber im Überblick.
- Abbildung 1.2 Blutfluss der Leber.
- Abbildung 1.3 Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes.
- Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Leberstrukturveränderung in Folge verschiedener Ursachen.
- Abbildung 2.1 Aufbau der UV-Aktivierung der PAA-Gele.
- Abbildung 2.2 PAA-Gele vor und nach der UV-Bestrahlung.
- Abbildung 2.3 Aufbau der PAA-Gel-Modelle mit Collagen Sandwich.
- Abbildung 2.4 Skizze des 2D-Modells (Collagen Monolayer).
- Abbildung 2.5 Skizze des 3D-Modells (Collagen Sandwich).
- Abbildung 2.6 LDH Katalisation mit Entstehung des detektierbaren $\text{NADH}+\text{H}^+$ und Strukturformel für Laktat und Pyruvat.
- Abbildung 2.7: Reduktion von Resazurin zu Resorufin plus Strukturformel.
- Abbildung 2.8: Cyclus-Grundschemata.
- Abbildung 3.1: Beispiel einer Micro-Fiber-Scan Messung.
- Abbildung 3.2: Messungen mit dem AFM.
- Abbildung 3.3 Gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen.
- Abbildung 3.4 Gemessene AST-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen.
- Abbildung 3.5: Gemessene Glykolyse an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen.
- Abbildung 3.6: Gemessene Gluconeogenese an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen.
- Abbildung 3.7: Gemessene Basalstimulation an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen.
- Abbildung 3.8: Gemessene Ammoniakmenge an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen.

- Abbildung 3.9: Gemessene Ammoniakmenge an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von HuH-7 Zellen.
- Abbildung 3.10: Immunfluoreszenz-Färbungen von HuH-7 Zellen an Tag 1.
- Abbildung 3.11: Gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten.
- Abbildung 3.12: Gemessene Glykolyse an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten.
- Abbildung 3.13: Gemessene Gluconeogenese an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten.
- Abbildung 3.14: Gemessene Basalstimulation an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten.
- Abbildung 3.15: Gemessene Ammoniakmenge an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten.
- Abbildung 3.16: Gemessene Ammoniakmenge an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären Rattenhepatozyten.
- Abbildung 3.17: Gemessene Resazurin Aktivität an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) an primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.18: Gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.19: Gemessene AST-Aktivität im Zellkulturüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.20: Gemessene Glykolyse an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.21: Gemessene Gluconeogenese an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.22: Gemessene Basalstimulation an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.23: Gemessene Ammoniakmenge an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.24: Gemessene Ammoniakmenge an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten. .

- Abbildung 3.25: Gemessene Albuminkonzentration im Zellüberstand an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts) von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.26: Gemessene Aufnahmemenge in primären humanen Hepatozyten von 5-CFDA des MRP-1 Transporters.
- Abbildung 3.27: Gemessene Exportrate an CFSE in primären humanen Hepatozyten des MRP-1 Transporter.
- Abbildung 3.28: Gemessene Aufnahmemenge in primären humanen Hepatozyten von Rhodamine des MDR-1 Transporters.
- Abbildung 3.29: Gemessene Exportrate an Rhodamine in primären humanen Hepatozyten des MDR-1 Transporters.
- Abbildung 3.30: Gemessene Cytochrom P 450 Genexpression von primären humanen Hepatozyten.
- Abbildung 3.31: Immunfluoreszenz-Färbungen von primären humanen Hepatozyten.

6.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 2.1: Geräteliste
- Tabelle 2.2: Chemikalien Liste
- Tabelle 2.3: Materialienliste
- Tabelle 2.4: Mischungsverhältnis der PAA-Gele.
- Tabelle 2.5: Zellkulturmedien HuH-7 Zellen und primärer Hepatozyten.
- Tabelle 2.6: Benötigte Lösungen für Aufarbeitung und Plattieren der verschiedenen Hepatozyten.
- Tabelle 2.7: Benötigte Lösungen zur Messung von Glykolyse und Gluconeogenese.
- Tabelle 2.8: Benötigte Lösungen zur Messung des Harnstoffumsatzes.
- Tabelle 2.9: Benötigte Lösungen zur Messung von LDH und AST.
- Tabelle 2.10: Mischung der Arbeitslösungen vom LDH- und AST - Assay.
- Tabelle 2.11: Benötigte Lösungen zur Messung der MDR-1 / MRP-1 Transporter Aktivität.

Tabelle 2.12:	Benötigte Lösungen zur Messung der Albumin Konzentration mit Hilfe des Elisa-Quantitation-Set.
Tabelle 2.13:	Benötigte Lösungen zur RNA-Isolierung aus pHH.
Tabelle 2.14:	Benötigte Lösungen zur Photometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.
Tabelle 2.15:	Benötigte Lösungen zur Agarosegelelektrophorese / RNA-Integrity-Check.
Tabelle 2.16:	Benötigte Lösungen für die c-DNA-Synthese.
Tabelle 2.17:	Benötigte Lösungen für die PCRs.
Tabelle 2.18:	PCR-Daten der getesteten Cytochrom P450 – Enzyme.
Tabelle 2.19:	Benötigte Lösungen zur Immunfluoreszenz-Färbung.

6.3 Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung der Gesamtzahl an Zellen und ihrer Viabilität.
Formel 2:	Gesamtvolumen der LDH- und AST- Messungen.
Formel 3:	Berechnung der Proben-Konzentration für die c-DNA-Synthese.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Siegfried-Weller-Institut Tübingen unter Betreuung von Herr Professor Dr. Nüssler durchgeführt. Sämtliche Versuche mit den zugehörigen statistischen Auswertungen, die in den Abbildungen 3.3 bis 3.31 dargestellt sind wurden von mir eigenständig durchgeführt. Ich war an der Konzeption der Studie beteiligt und habe die Dissertationsschrift selbständig verfasst.

Herr Professor Dr. Nüssler war an der Konzeption der Studie beteiligt, er hat die Arbeit betreut und die Dissertationsschrift korrigiert.

Frau Dr. Bachmann hat die Auswertung der Abbildung 3.2 zur Verfügung gestellt. Sie war an der Konzeption der Studie beteiligt, sie hat die Arbeit mit betreut und die Dissertationsschrift korrigiert.

Herr Professor Schäfer hat die Daten für Abbildung 3.2 zur Verfügung gestellt.

Die Isolation der primären humanen Hepatozyten wurde von verschiedenen Mitgliedern des Siegfried-Weller-Institutes durchgeführt. Primäre humane Hepatozyten wurden von Herrn Professor Nadalin vom Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden primäre humane Hepatozyten von Herrn Dr. Georg Damm aus der Universitätsmedizin Charité Berlin isoliert und zugesandt. Die Ratten-Hepatozyten wurden von der Firma Pharmacelsus GmbH in Saarbrücken isoliert und zugesandt.

Herr Professor Müller hat die Methodik der Zubereitung der Polyacrylamid-Gele zur Verfügung gestellt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 04.07.2017

Karsten Büringer

8. Veröffentlichungen

Die ersten Ergebnisse dieser Arbeit wurden von mir bereits im Rahmen eines Vortrags auf den 18. Chirurgischen Forschungstagen in Hannover (2014) und einer Postervorstellung bei der Südwestdeutschen Gastroenterologen Konferenz in Freiburg (2015) präsentiert.

Der Abstract zur Bewerbung auf den Vortrag bei den 18. Chirurgischen Forschungstagen in Hannover wurde im Langenbecks Arch. Surg. (2014) veröffentlicht. Textstellen, welche sich auf den Abstract beziehen sind im Text mit Hilfe eines I gekennzeichnet.

Abstract Quelle:

- I *Büringer K, Peccerella T, Oettinger S, Mueller S, Rheinlaender J, Schäffer T, Nussler A, Bachmann A. (2014). Evaluation of a cell culture system for primary human hepatocytes mimicking alterations in extracellular matrix stiffness in chronic liver diseases . Langenbecks Arch Surg 399:897-966: p. 931.*

9. Danksagungen

Bei Herrn Prof. Dr. A. K. Nüssler möchte ich mich bedanken für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung des Themas, die Möglichkeit, die Laborarbeiten in dem von ihm geführten Institut durchzuführen und für die in jedem Stadium der Arbeit zuverlässige Betreuung und positive Zusprache.

Weiter gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. A. Bachmann für die professionelle Einführung in die Arbeitstechniken des Labors, die stete Betreuung und Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. G. Damm für die Bereitstellung der Hepatozyten.

Darüber danke ich Herrn Prof. Dr. T. Schäffer und Herrn Dr. J. Rheinländer für die Vermessung der Polyacrylamid-Gele mit Hilfe des Atomic-Force-Mikroskop.

Ich danke dem gesamten Team des Siegfried-Weller-Instituts für die Hilfe und Unterstützung bei Fragen und Problemen, speziell Frau Dr. rer. nat. S. Ehnert und Frau A. Tschida.