

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Alternativmethoden zum Tierversuch .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Biologische Barrieren .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Blut-Hirn-Schranke .....	6
2.2.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke .....	6
2.2.1.2 Hirnendothel .....	7
2.2.1.3 Astrozyten .....	9
2.2.1.4 Perizyten .....	9
2.2.1.5 Efflux-Pumpen .....	10
2.2.1.6 Scherkräfte .....	12
2.2.1.7 <i>In vitro</i> Rekonstruktion der BBB .....	13
2.2.2 Darm .....	14
2.2.3 Leber .....	16
2.2.3.1 Stammzellen der Leber .....	17
<b>3. ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>17</b>
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>18</b>
4.1 Aufbau des $\mu$ 3D Vasc Biorektors .....	18
4.2 SMART-Technologie .....	19
4.3 Herstellung des $\mu$ 3D Vasc Biorektors .....	20
4.4 Biologische Validierung des endothelialen Zelllayers .....	23
4.4.1 Langzeitkultivierung .....	23
4.4.2 Konfluenztest .....	23
4.4.3 Proliferationstest .....	25
4.4.4 Funktionstests .....	29
4.4.4.1 Transmigration von Blutzellen .....	29
4.4.4.2 Permeabilitätsmessungen .....	32
4.4.5 Versorgung des unteren Kompartiments .....	44
4.5 Blut-Hirn-Schranke .....	46
4.5.1 Bestimmung geeigneter Nährmedien .....	46
4.5.1.1 Konditioniertes Nährmedium .....	46
4.5.1.2 Wachstumskurven .....	47
4.5.2 Kokultur aus Endothelzellen und Perizyten .....	49
4.5.3 Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten .....	50
4.5.3.1 Kokultur aus Perizyten und Astrozyten in 2D .....	50

4.5.3.2	Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor.....	51
4.5.4	Nachweis zellspezifischer Marker .....	53
4.5.5	Proliferationstest.....	56
4.5.6	Test der metabolischen Zellaktivität .....	59
4.5.7	Lebend/tot-Nachweis.....	61
4.5.8	Untersuchung der Hypoxie.....	62
4.5.9	Etablierung mikrovaskulärer Endothelzellen .....	66
4.5.10	P-gp Transport Assay .....	69
4.6	Darm.....	72
4.6.1	Nachweis der Schleimbildung .....	73
4.6.2	Nachweis von Tight Junctions .....	74
4.6.3	Nachweis der Zotten-ähnlichen Strukturen .....	75
4.7	Leber.....	76
4.7.1	Isolation von fetalen, murinen Leber-Vorläuferzellen .....	77
4.7.2	Ausdifferenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen .....	77
4.7.3	Generierung von HPPL-Zellen .....	82
4.7.4	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen .....	83
4.7.5	Ausdifferenzierung zu Cholangiozyten.....	84
4.7.6	Ausdifferenzierung im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor .....	87
4.7.7	Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten .....	88
5.	DISKUSSION .....	90
6.	MATERIAL UND METHODEN .....	102
6.1	Material .....	102
6.2	Methoden.....	112
6.2.1	Herstellung von $\mu 3D Vasc$ Bioreaktoren .....	112
6.2.2	Zellkultivierung.....	113
6.2.2.1	Beschichtung der Kultivierungsmaterialien.....	113
6.2.2.2	Passagieren der Zellen.....	113
6.2.3	Handhabung des mikrofluidischen $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors .....	114
6.2.3.1	Beschichtung des PC-Mikrokanals.....	114
6.2.3.2	Beschichtung des unteren Kompartiments .....	114
6.2.3.3	Einbringen der Endothelzellen in den PC-Mikrokanal.....	115
6.2.3.4	Einbringen der Zellen in das untere Kompartiment.....	116
6.2.4	Visualisierung von Zellen.....	116
6.2.4.1	Vitale Zellen.....	116
6.2.4.2	Fixierte Zellen .....	117
6.2.5	EdU Nachweis.....	117
6.2.6	Adhäsion und Migration von Blutzellen.....	118
6.2.7	Permeabilitätsassay .....	118
6.2.7.1	Standardkurven .....	118
6.2.7.2	Widerstandseinheiten .....	118
6.2.7.3	Permeabilitätsassay in Transwell-Systemen.....	119

6.2.7.4	Einfluss der Beschichtung .....	119
6.2.7.5	Permeabilitätsassay im $\mu$ 3D Vasc Bioreaktor .....	119
6.2.8	Versorgung des unteren Kompartiments .....	120
6.2.9	Etablierung der Kokultur aus Perizyten und Astrozyten .....	120
6.2.10	Präparation des Astrozyten-konditionierten Mediums .....	120
6.2.10.1	Untersuchung der Expression von Tight Junctions .....	120
6.2.10.2	Wachstumskurven .....	121
6.2.11	XTT Nachweis .....	121
6.2.12	Lebend/tot-Nachweis .....	121
6.2.13	Nachweis der Hypoxie .....	122
6.2.14	P-gp Transport Assay .....	122
6.2.15	REM .....	122
6.2.16	Isolierung der fetalen, murinen Leberzellen .....	122
6.2.16.1	Isolierung der DLK <sup>+</sup> Hepatoblasten .....	124
6.2.16.2	Generierung von HPPL-Zellen aus DLK <sup>+</sup> Hepatoblasten .....	124
6.2.16.3	Ausdifferenzierung von DLK <sup>+</sup> Hepatoblasten zu HLC .....	124
6.2.16.4	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu HLC .....	126
6.2.16.5	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Cholangiozyten .....	127
6.2.16.6	Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten .....	128
6.2.17	Statistische Auswertung .....	129
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>130</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>134</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>145</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>157</b>
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>161</b>