

**Deutsches Herzzentrum Berlin**  
Stiftung des Bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

Tissue Engineering von Lungengewebe:  
Kultur von Alveolarepithelzellen in  
biokompatiblen Polymerkonstrukten mit  
integrierten Gefäßsystemen

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Clemens Fritsche  
aus Heidelberg

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. R. Hetzer  
                          2. Prof. Dr.-Ing. G. N. Duda  
                          3. Prof. Dr. med. G. Steinhoff

Datum der Promotion: 1. Juni 2008

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	VI
Abstract .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Organtransplantation.....	1
1.1.1 Lungentransplantation.....	1
1.2 Tissue Engineering.....	4
1.2.1 Organzüchtung.....	7
1.2.1.1 Angiogenetische Wachstumsfaktoren.....	9
1.2.1.2 Endothelzellen .....	11
1.2.1.3 Mikrosystemtechnik .....	13
1.3 Fragestellung .....	15
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Polymerkonstrukte.....	18
2.1.1 Vaskuläres Kompartiment .....	19
2.1.1.1 Mikrosystemtechnik .....	21
2.1.2 Parenchymales Kompartiment .....	25
2.2 Zellkultur.....	26
2.2.1 Zelllinien.....	27
2.2.2 Kryokonservierung .....	30
2.2.3 Grün fluoreszierendes Protein.....	31
2.3 Polymerversuche.....	32
2.4 Versuchsanordnung .....	33

2.5	Besiedelung .....	35
2.5.1	Mikroträger .....	35
2.6	Konditionierung .....	39
2.7	Evaluierung .....	39
2.7.1	DNS Messung .....	40
2.7.2	Vitalitätstest.....	41
2.7.3	Funktionelle Untersuchung .....	42
2.7.4	Rasterelektronenmikroskopie.....	43
2.8	Endothelialisierung der Gefäßsysteme.....	44
2.9	Statistik und Illustration .....	46
3	Ergebnisse .....	47
3.1	Polymerkonstrukte.....	47
3.2	Zellkultur.....	51
3.2.1	MLE-12 .....	51
3.2.2	HMECs.....	57
3.3	Polymerversuche.....	58
3.4	Mikroträger .....	72
3.5	Evaluation .....	74
3.5.1	DNS Messung .....	77
3.5.2	Vitalitätsbestimmung .....	80
3.5.3	Funktionelle Untersuchung .....	85
3.5.4	Rasterelektronenmikroskopie.....	87
3.6	Endothelialisierung der Gefäßsysteme.....	91
4	Diskussion .....	94
5	Schlussfolgerung .....	109

6	Literaturverzeichnis .....	110
7	Abbildungsverzeichnis.....	124
8	Anhang.....	127
8.1	Veröffentlichung .....	127

## Zusammenfassung

Der Verlust von Gewebe oder der Ausfall eines Organs und ein zunehmender Mangel an Spenderorganen für die Transplantation ist Motivation für die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Beim *tissue engineering* handelt es sich um einen interdisziplinären Ansatz, durch Imitation der Natur einen lebenden Gewebersatz aus autologen Zellen und biologischen oder synthetischen Polymeren herzustellen, der in den Organismus des Patienten integriert wird und die Funktion des ausgefallenen Gewebes ersetzt. Das *tissue engineering* von dreidimensionalen Geweben und komplexen Organen wird durch die fehlende Nährstoffversorgung im Inneren des Konstruktes limitiert.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem *tissue engineering* von funktionalem, biokompatiblen Lungengewebe. In einem ersten Schritt wird ein Polymerkonstrukt aus *polydimethylsiloxan* und *polycarbonate* entwickelt, in das ein kapilläres Gefäßsystem integriert ist, über welches die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff erfolgen soll. Dieses neue, zweischichtige Polymerkonstrukt besteht aus einer parenchymalen Kammer, die durch eine poröse Membran vom angrenzenden fein verzweigten Gefäßsystem getrennt ist. Das Design für das Gefäßsystem wurde mit einem speziellen Computerprogramm entworfen, das die Perfusion von Kapillaren mit Blut simuliert, und mit Hilfe softlithographischer Verfahren in das Polymer übertragen. Als Modell für Typ II Pneumozyten werden immortalisierte Alveolarepithelzellen der Maus (MLE-12) verwendet. Um die Zellen innerhalb der Polymerkonstrukte sichtbar zu machen, werden diese durch virale Transfektion mit einem grün fluoreszierenden Protein markiert. Die Zellen werden dynamisch auf der Oberfläche von Mikrosphären kultiviert und ohne die Verwendung von Trypsin in die parenchymale Kammer der Polymerkonstrukte überführt. Zur Konditionierung wird das Gefäßsystem während des

Versuchszeitraums von 7 Tagen kontinuierlich mit Zellkulturmedium perfundiert. Im Anschluss erfolgt die Analyse der Polymerkonstrukte.

Hierbei zeigt sich die Proliferation Zellen von der Oberfläche der Mikrosphären zu einem konfluenten Zellrasen innerhalb der Polymerkonstrukte. Die Vitalität der Zellen ist größer 95 %. Als charakteristische Marker für Typ II Zellen können die Surfactant assoziierten Proteine SP-B und SP-C nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann in dieser Arbeit die erfolgreiche Kultivierung funktionaler Alveolarepithelzellen in einem zweischichtigen Polymerkonstrukt gezeigt werden, in dem eine Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff über ein nach physiologischen Maßgaben entworfenes Gefäßsystem erfolgt. Mit der Verwendung von Mikrosphären für den Zelltransfer in die Polymerkonstrukte wurde eine einfache Besiedelungsmethode entwickelt, bei der anstelle einer Einzelzellsuspension fest adhären und organisierte Zellpopulationen *in toto* besiedelt werden. Diese Ergebnisse sind erste ermutigende Schritte auf dem Weg der Herstellung von funktionalem Lungengewebe durch *tissue engineering* und können auch bei der Entwicklung anderer komplexer Organe Anwendung finden.

**Abstract**

The increasing shortage of donor organs for transplantation illustrates the need for new strategies in organ replacement therapy. Tissue engineering represents an innovative approach to create a viable and functional tissue substitute from autologous tissue specific cells and biological or synthetic polymers that restores or improve tissue function. Satisfactory vascularization to meet the metabolic needs for oxygen, nutrients and waste removal remains the critical obstacle to overcome for the fabrication of three-dimensional tissue or complex vital organs.

This work focuses on tissue engineering of a functional biocompatible lung device. In a first step a microfabricated vascular supply in polydimethylsiloxane is developed, that allows to meet the metabolic requirements for tissue engineering of complex parenchymal organs. The novel dual-layered device provides a parenchymal compartment adjacent to a fractal microvascular network, separated by a porous polycarbonate membrane. The vasculature was designed with a computational algorithm for the simulation of blood flow in microvascular structures and transferred into polydimethylsiloxane by microfabrication technologies. Immortalized murine lung epithelial cells (MLE-12) are used as a model for type II pneumocytes. To visualize the cells within the dual-layered devices, they are transfected with a GFP virus. The cells are dynamically cultured on the surface of polystyrene microcarrier beads and injected into the parenchymal chamber of the dual-layered devices without the use of trypsin. A flow of cell culture medium is established through the vascular compartment and the constructs are maintained in culture for 1 week, after which time they were analyzed.

Consistent MLE-12 cell proliferation from the surface of the microcarriers onto the polycarbonate membrane can be shown, where they reach confluency in the greater



part of the compartment. A DNA assay is employed to evaluate the cell proliferation over the experimental period. Using a Live/Dead assay the cell viability is determined to be over 95 % at one week throughout the parenchymal compartment. Functional immunostaining shows the presence of the surfactant associated proteins SP-B and SP-C and scanning electron micrographs depict the cells on the surface of the microcarriers and the polycarbonate membrane.

In this work, the successful cultivation of functional cells derived from mouse alveolar epithelium is shown in microfabricated polymeric constructs that allow the exchange of nutrients, oxygen and waste through a microvascular network mimicking the physiological vascular structure of an organ. By using microcarrier beads for cell seeding, a novel and straightforward seeding procedure for tissue engineering was developed that allows the seeding of well attached cell clusters instead of single cell suspensions. These results represent encouraging steps toward the development of a functional tissue engineered lung and may also be applicable to further fabrication of complex parenchymal organs.

**Abkürzungsverzeichnis**

bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
DAPI	Diamidinophenylindiol-dihydrochlorid
DMEM	<i>dulbecco modified eagle medium</i>
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DRIE	<i>deep reactive ion etching</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
ECMO	<i>extracorporeal membrane oxygenation</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HLTx	Herz-Lungentransplantation
HMECs	<i>human microvascular endothelial cells</i>
LTx	Lungentransplantation
MEMS	<i>micro-electro-mechanical systems</i>
MLE	<i>murine lung epithelial</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>polycarbonate</i>
PDMS	<i>polydimethylsiloxane</i>
rPDMS	<i>polydimethylsiloxane mit aufgerauter Oberfläche</i>
PGA	<i>polyglycolic acid</i>
PGS	<i>polyglycerol sebacate</i>
PLGA	<i>polylactic-co-glycolic acid</i>
PLLA	<i>poly-L-lactide acid</i>

PS	<i>polystyrene</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SP-B	Surfactant assoziiertes Protein B
SP-C	Surfactant assoziiertes Protein C
TE	<i>tissue engineering</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	–	Tissue Engineering .....	5
Abbildung 2	–	Zweikammersystem (schematisch).....	18
Abbildung 3	–	Zweikammersystem aus PDMS.....	19
Abbildung 4	–	Design des Gefäßsystems.....	20
Abbildung 5	–	Design des Gefäßsystems (Ausschnitt).....	21
Abbildung 6	–	Photolithographie und DRIE .....	23
Abbildung 7	–	Silizium- <i>wafer</i> .....	24
Abbildung 8	–	Gefäßsystem in PDMS .....	24
Abbildung 9	–	Parenchymales Kompartiment.....	25
Abbildung 10	–	MLE-12 Zellen .....	28
Abbildung 11	–	Versuchsaufbau .....	34
Abbildung 12	–	Dynamische Zellkultur.....	37
Abbildung 13a	–	Beladener Mikroträger, Phasenkontrast.....	38
Abbildung 13b	–	Beladene Mikroträger, Fluoreszenzmikroskopie .....	38
Abbildung 14	–	Gefäßsystem (REM).....	47
Abbildung 15	–	Gefäßsystem (Fluoreszenzmikroskopie).....	48
Abbildung 16a	–	Fluss [ml/h] .....	49
Abbildung 16b	–	Druck [mmHg].....	49
Abbildung 16c	–	Scherspannung [dynes/cm <sup>2</sup> ] .....	50
Abbildung 17	–	Zellproliferation .....	51
Abbildung 18	–	Zellproliferation (logarithmisch).....	52
Abbildung 19	–	GFP-MLE-12.....	53

Abbildung 20	–	FACS Analyse .....	54
Abbildung 21	–	GFP-MLE-12.....	55
Abbildung 22	–	Zellproliferation .....	56
Tabelle 1	–	Zellproliferation nach GFP .....	57
Abbildung 23	–	HMEC .....	58
Tabelle 2	–	Polymer ohne Oberflächenbeschichtung .....	59
Tabelle 3	–	Polymerversuche: Zellzahl.....	60
Abbildung 24	–	Polymerversuche: Zellzahl.....	62
Tabelle 4	–	Polymerversuche: Vitalität .....	63
Abbildung 25	–	Polymerversuche: Vitalität .....	64
Abbildung 26	–	Polymerversuche: vitale Zellen .....	65
Tabelle 5	–	PDMS vs. rPDMS .....	66
Tabelle 6a	–	PDMS ohne vs. mit Oberflächenbeschichtung.....	67
Tabelle 6b	–	PS vs. PDMS .....	67
Tabelle 7a	–	PC ohne vs. mit Oberflächenbeschichtung .....	68
Tabelle 7b	–	PS vs. PC .....	69
Abbildung 27	–	Polymerversuche: Live/Dead.....	70
Tabelle 8a	–	PDMS: Kollagen IV vs. Laminin vs. Fibronectin.....	71
Tabelle 8b	–	PC: Kollagen IV vs. Laminin vs. Fibronectin .....	72
Abbildung 28	–	Mikroträger: Größentrennung .....	73
Abbildung 29	–	Besiedelung, t = 0 .....	74
Abbildung 30	–	Beurteilung nach 4 Tagen, t = 96.....	76
Abbildung 31	–	Beurteilung nach 7 Tagen, t = 168.....	77
Abbildung 32	–	DNS Standard, Quiagen DNeasy .....	78
Tabelle 9	–	Ergebnisse, Quiagen DNeasy.....	79

Abbildung 33	–	Ergebnisse, Quiagen DNeasy.....	80
Abbildung 34	–	Vitalitätsbestimmung.....	81
Abbildung 35	–	Vitalitätsbestimmung, Detail zentral.....	82
Abbildung 36	–	Vitalitätsbestimmung, Detail peripher.....	82
Abbildung 37	–	Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung.....	83
Abbildung 38	–	Vitalitätsbestimmung, statische Kontrolle.....	84
Abbildung 39	–	proSP-B.....	85
Abbildung 40	–	proSP-C.....	86
Abbildung 41	–	Positivkontrolle, Immunhistochemie.....	86
Abbildung 42	–	Negativkontrolle, Immunhistochemie.....	87
Abbildung 43	–	REM, direkte Aufsicht.....	88
Abbildung 44	–	REM, räumliche Projektion.....	88
Abbildung 45	–	REM, Detail.....	89
Abbildung 46	–	REM, Querschnitt.....	89
Abbildung 47	–	REM, statische Kontrolle.....	90
Abbildung 48	–	HMECs im kapillären Gefäßsystem, t = 6.....	91
Abbildung 49	–	HMECs im kapillären Gefäßsystem, t = 48.....	92
Abbildung 50	–	Vitalitätsfärbung der HMECs, t = 120.....	93

## 8 Anhang

### 8.1 Veröffentlichung

Eine Veröffentlichung der beschriebenen Ergebnisse erfolgte bei der *6<sup>th</sup> Annual International Conference & Exposition der Tissue Engineering Society International* vom 10. – 13. Dezember 2003 in Orlando, FL, USA.

Abstract:

#### **Lung Organ Fabrication: Supporting Lung Epithelium with Microfabricated Vascular Networks**

Clemens S Fritsche <sup>(1,2)</sup>, Oliver Simsch <sup>(1,2)</sup>, Alexander BG Sevy <sup>(1)</sup>, Mohammad R Kaazempur-Mofrad <sup>(3)</sup>, Jeffrey Borenstein <sup>(4)</sup>, Ralf Sodian <sup>(2)</sup>, Roland Hetzler <sup>(2)</sup>, Joseph P Vacanti <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Tissue Engineering and Organ Fabrication Laboratory, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, <sup>(2)</sup> Deutsches Herzzentrum Berlin, <sup>(3)</sup> Dept. of Mechanical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, <sup>(4)</sup> Charles Stark Draper Laboratory, Inc.

**Introduction:** Despite a vast shortage of donor organs, little research has concentrated on engineering functional lung tissue. Our laboratory has developed a microfabricated vascular supply that meets the requirements for the tissue engineering of complex

parenchymal organs. This current approach focuses on the development of a biocompatible tissue engineered lung device.

**Methods:** Immortalized mouse lung epithelium cells (MLE-12) were seeded on polystyrene micro-carrier beads and cultured under dynamic conditions. Subsequently, those beads were collected without trypsin and injected into the parenchymal compartment of a novel bi-layered construct (Polydimethyl-Siloxane, Polycarbonate). It provides a fractal microvascular network which was computationally designed using simulation of microfluidic blood flow and rheology. A cell culture medium flow-rate of 0.5 ml/hour was established through the vascular compartment for one week at which time the constructs were evaluated using a Live/Dead<sup>®</sup> assay, SEM and functional immunostaining for surfactant associated proteins. A DNA-assay was employed to track the cell proliferation over the experimental period.

**Results:** Integrated morphometric analysis with MetaMorph<sup>®</sup> of the parenchymal compartment showed consistent cell proliferation from the microcarriers onto the Polycarbonatemembrane where they reached confluency. A high cell viability at one week throughout the parenchymal compartment was shown using the Live/Dead<sup>®</sup> assay, whereas a controlgroup showed no cell survival. Expression of surfactant associated proteins was observed.

**Conclusion:** Proliferation and function of mouse alveolar epithelium cells was established in microfabricated polymeric constructs with computationally designed microvascular networks. A novel and straightforward seeding procedure for tissue engineering was developed by delivering healthy attached cells using microcarrier beads.



## Danksagung

Bei dieser Arbeit wurde ich von vielen Menschen unterstützt, denen ich hiermit meinen herzlichen Dank aussprechen möchte.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Dr. hc. mult. R. Hetzer für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung bei der Umsetzung des Forschungsvorhabens.

Ich danke Herrn Dr. med. R. Sodian, der in mir die Begeisterung für das Thema des *tissue engineering* weckte und durch den diese Forschungsarbeit erst möglich wurde. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. C. Stamm für die großzügige Hilfe bei der Aufarbeitung der Forschungsergebnisse und Korrektur der Dissertationsschrift.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr. J. P. Vacanti für den Forschungsaufenthalt im *Tissue Engineering and Organ Fabrication Laboratory, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA* und seine unerschöpfliche Unterstützung während und über diesen Forschungsaufenthalt hinaus.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. H. Stolte von der *International Academy of Life Sciences* und Frau B. Heller vom *Biomedical Sciences Exchange Program* für die außergewöhnliche Erfahrung des *Academic Year Program 2002 / 2003* in Boston. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Wauer vom Referat für Forschung der Charité für die Überlassung eines Stipendiums für das Forschungsvorhaben in Boston.

Besonders danken möchte ich Karoline Kiok und all meinen Freunden, insbesondere auch meinen geliebten Eltern, die mich immer unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

## **Erklärung an Eides Statt**

Ich, Clemens Fritsche erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Tissue Engineering von Lungengewebe: Kultur von Alveolarepithelzellen in biokompatiblen Polymerkonstrukten mit integrierten Gefäßsystemen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 17.09.2007

Clemens Fritsche

## **Lebenslauf**

*Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.*