

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Bioreaktorsystem zur videomikroskopischen  
Langzeituntersuchung von Zellen in Mono- und Kokultur“

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nils Billecke

aus Witten

Gutachter:       1. Priv.-Doz. Dr. med. I. M. Sauer  
                      2. Prof. Dr. rer. nat. K. Kotsch  
                      3. Prof. R. Chamuleau

Datum der Promotion: 22.03.2013

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung, Zielsetzung</b>	<b>7</b>
<b>2. Methodik, Ergebnisse, Diskussion</b>	<b>8</b>
2.1 Bioreaktor- und Systemaufbau	8
2.2 Charakterisierung des Perfusionssystems	10
2.3 Charakterisierung des Multikompartiment Bioreaktor	11
2.4 Mikroskopische Zeitrafferanalyse markierter Zellen	13
2.5 Direkte Kokultur von Endothelialzellen und Monozyten	14
2.6 Kontrollierte Hypothermie zur Analyse von Endothelialschichtmorphologie	14
2.7 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf primäre Hepatozyten	15
<b>Anteilerklärung</b>	<b>17</b>
<b>Publikationen</b>	<b>19</b>
N. Billecke, N. Raschzok, et al. (2012). "An operational concept for long-term cinemicrography of cells in mono- and co-culture under highly controlled conditions- the SlideObserver." <u>Journal of Biotechnology</u> <b>159</b> (1-2): 83-89.	<b>19</b>
A. Diestel, N. Billecke, et al. (2009). "Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction." <u>Journal of Heart and Lung Transplantation</u> <b>28</b> (7): 718-724.	<b>26</b>
N. Raschzok, U. Teichgräber, et al. (2010). "Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging." <u>Cell Medicine</u> <b>1</b> (3): 123-135.	<b>33</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>47</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>51</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>53</b>
<b>Danksagung</b>	<b>55</b>



## Abstract

Die Erfassung von Morphologie und Bewegung sowie mono- und heterotypischer Interaktionen kultivierter Zellen stellt einen wichtigen Aspekt der medizinischen Forschung dar. Mikroskopische Zeitrafferaufnahmen können Aufschluss über das Verhalten von Zellen *in vitro* geben, und werden insbesondere bei Fragestellungen zur Zellmotilität und Zell-Zell-Interaktion herangezogen. Eine parallele mikroskopische Beobachtung mehrerer Zellpopulationen bei gleichzeitiger Kontrolle der Versuchsparameter stellt allerdings weiterhin eine Herausforderung dar. Besonders kontinuierlich betriebene Bioreaktoren erfüllen die dafür nötigen Voraussetzungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden hohlfaserbasierte, mikroskopierbare Bioreaktoren in ein System zur Langzeitkultivierung von Zellen eingebunden. Durch Einsatz bezüglich Temperatur, pH und  $pO_2$  getrennt regelbarer Perfusionskreisläufe sowie der Kombination eines piezoelektrischen Mikroskoptischs mit einer steuerbaren Kamera können die Bioreaktoren einzeln adressiert werden. Dies ermöglicht die cinemikrographische Analyse von Zellen unter variierbaren Bedingungen. Das System wurde auf Robustheit getestet und im Folgenden in Experimenten zu Zellverhalten und -interaktion angewendet.

Die parallele Analyse von beliebig wählbaren Bereichen in einem oder mehreren Reaktoren ermöglicht die Anwendung in Kokultorexperimenten. Das Reaktordesign wurde angepasst, um Ziel- und Feederzellen in indirekter Kokultur zu beobachten und mit der Monokultur zu vergleichen. Das Konzept der „connected co-culture“ wurde anhand von primären parenchymalen und nicht-parenchymalen Leberzellen überprüft.



# Zusammenfassung

## 1. Einleitung, Zielsetzung

Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen sind die Grundlagen der Entwicklung und des Erhalts eines jeden Organismus. Störungen dieser Funktionen sind ursächlich für Genese und Progression vieler Krankheiten. Die genaue mikroskopische Beobachtung von Geweben und Zellen *in vitro* in Raum und Zeit ist somit wichtige Methode sowie Gegenstand biowissenschaftlicher Forschung. Eine Vielzahl der Methoden für eine solche cinemikrographische Analyse haben Nachteile. Am gängigsten ist die Verwendung herkömmlicher Zellkulturplatten in einer Inkubator- Mikroskopeinheit. Der hierbei erforderliche Wechsel des Kulturmediums erschwert allerdings eine kontinuierliche Beobachtung über längere Zeiträume (>3 Tage). Mit Medium perfundierte makro- oder mikrofluidische Systeme eignen sich für eine stabile Langzeitkultur zur zeitaufgelösten mikroskopischen Beobachtung, setzen die Zellen aber hohen Scherkräften aus. Besonders aus Gewebe isolierte, primäre Zellen, welche *in vivo* keinerlei Fluss ausgesetzt sind, tolerieren dies nicht. Durch die indirekte, membrangestützte Funktionsweise des hier eingesetzten Bioreaktors entstehen keine Scherkräfte. Austausch zwischen Zellkompartiment und Kreislauf findet nur durch Diffusion und Konvektion entlang der Hohlfasern statt.

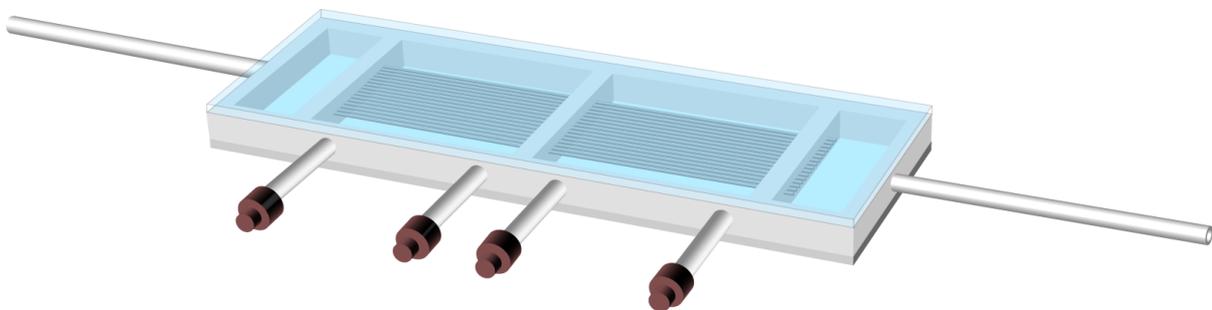
Ziel des Promotionsvorhaben ist die Entwicklung eines Systemaufbaus, welcher mikroskopische Aufnahmen beliebiger Bereiche im Inneren mehrerer Hohlfasermembran-basierter Bioreaktoren ermöglicht. Dies ist Voraussetzung für den ebenfalls zu entwickelnden Parallelbetrieb von Bioreaktoren unter Experimental- und Kontrollbedingungen. Das System soll in jedem der betriebenen Reaktoren sämtliche Prozessparameter zu jeder Zeit regeln können. Die mikroskopisch erfassten, definierten Bereiche im Bioreaktor werden zur Auswertung in Zeitraffervideos zusammengefasst und analysiert. Das System soll hinsichtlich steuerbarer Prozessparameter validiert werden und zur morphologischen Einschätzung mit Eisenoxidpartikeln markierter Zellen verwendet werden. Weiterhin soll ein neues Reaktordesign erarbeitet werden, welches sowohl direkte als auch indirekte, membrangesteuerte Kokultur erlaubt. Das System soll anhand Analyse heterotypischer Interaktionen zwischen parenchymalen und nicht- parenchymalen Leberzellen getestet werden.

## 2. Methodik, Ergebnisse, Diskussion

### 2.1 Bioreaktor- und Systemaufbau

In dieser Arbeit wurden speziell für die Anwendung hergestellte, membranbasierter Bioreaktoren für lichtmikroskopische Untersuchung verwendet. Bei der Herstellung werden Rahmen aus Silikon auf einen Objektträger aus herkömmlichem Polystyrol für die Zellkultur aufgetragen. Dabei werden Mediumkompartimente von jeweils 0.25 mL vom Zellkompartiment mit 2.5 mL getrennt. 16 Hohlfasermembranen (HF) mit einem Durchmesser von jeweils 500  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 52 mm durchziehen das Zellkompartiment und verbinden so die Medienkompartimente. Geschlossen wird das System durch Kalknatronglas. Zu- bzw. Ablauf des Mediums während der Perfusion erfolgt durch in die Medienkompartimente eingelassene Silikonschläuche mit Luer-Lock Adaptern. Die Inokulation sowie akute Exposition der Zellen kann über zwei direkt in das Zellkompartiment eingelassene Schläuche realisiert werden.

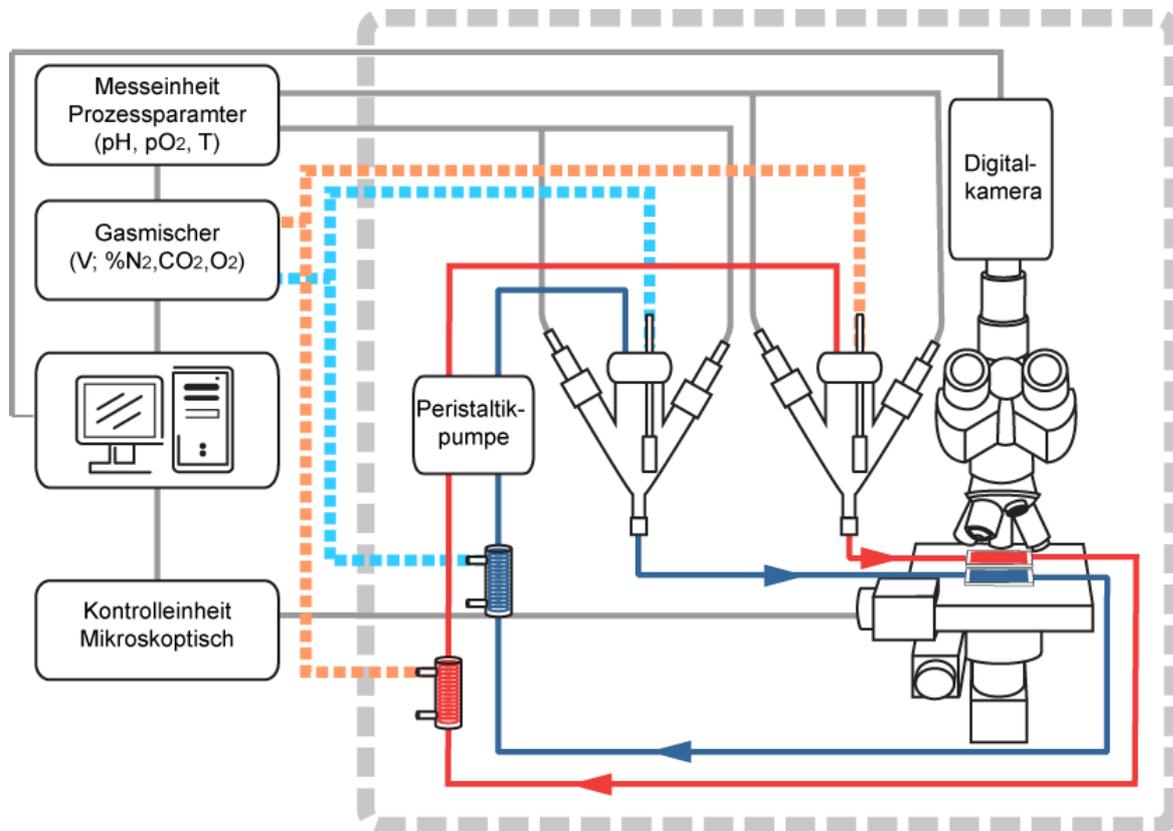
Um indirekte Kokulturen zweier Zelltypen zu ermöglichen wurde das Zellkompartiment mit einer weiteren Silikonbrücke geteilt, in der die HF ebenfalls eingebettet sind (Abb.1). Ein Austausch von Metaboliten von vor- zu nachgelagertem Kompartiment soll ausschließlich über die Membranen erfolgen.



**Abb. 1:** Aufbau des Multikompartiment Bioreaktors.

Alle hergestellten Bioreaktoren wurden im Weiteren auf Hüllenintegrität getestet. Dazu wurde ein Drucksensor mit dem Luer-Lock Adapter eines Perfusionsports und eine 5 mL Spritze an einem der Inokulationsports. Alle weiteren Ports wurden verschlossen. Mittels der Spritze wurde nun ein Unterdruck von 80 mmHg angelegt. Wurde dieser Wert für  $>1$  min gehalten wurde von Integrität der Hülle ausgegangen. Um beliebig wählbare Bereiche in den verschiedenen Kompartimenten eines Bioreaktors sowie mehrere, voneinander unabhängige Bioreaktoren adressieren zu können wurde ein entsprechendes Setup entwickelt. Dies umfasst ein Mikroskop für

die Bildaufnahme, Geräte für die Kontrolle von Prozessparametern und Datenspeicherung und -analyse sowie Perfusionskreisläufe für den kontinuierlichen Betrieb der Bioreaktoren Einheiten (Abb.2).



**Abb. 2:** Schematischer Aufbau des Setups mit zwei Perfusionskreisläufen

Eine einzelner Perfusionskreislauf besteht aus vier Hauptkomponenten, welche über Polyethylenschläuche (*Braun Melsungen AG*, Außendurchmesser: 2,35 mm, Innendurchmesser: 0,5 mm) verbunden sind: dem Bioreaktor, einer Oxygenatoreinheit, einer peristaltischen Pumpe zur Rückführung des Mediums (IPC 12 Schlauchpumpe, *Ismatec, Wertheim, Deutschland*) und einem Mediumreservoir, in dem ein kombinierter pO<sub>2</sub> und Temperaturfühler (*D100OxyProbe, Broadley James, Irvine, USA*), eine pH-Sonde (*SteamLine SL 80-120pH, SCHOTT Instruments, Mainz, Deutschland*) und ein Gasverteiler eingefügt sind.

Für den Betrieb mehrerer paralleler Kreisläufe werden die Bioreaktoren auf einem Mikroskop (*Axiostar plus, Zeiss, Jena, Deutschland*) mit einem angepassten piezoelektrischen Mikroskoptisch sowie Feinfokussierung (*Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland*) positioniert. Mikrographische Bilder werden mit einer digitalen Kamera

(*SPOT Insight Farbmosaik, Diagnostic Instruments Inc., Michigan, USA*) aufgenommen, welche über ein angepasstes Implement der *VisiView Software* (*Visitron Systems, Puchheim, Deutschland*) gesteuert und mit dem Mikroskopisch synchronisiert wird. Bioreaktoren und die entsprechenden Perfusionskreisläufe werden auf dem Mikroskop in einen temperierten Inkubator (*720 KB, Binder, Tuttlingen, Deutschland*) platziert. pH-Wert sowie  $pO_2$  des zirkulierten Mediums wird durch das Mischverhältnis von  $CO_2$ ,  $N_2$  und  $O_2$  im Prozessgas kontrolliert, welches direkt über die Gasverteiler ins Medium eingebracht wird oder indirekt über die Schlauchoxygeneratoren diffundiert. Zusammen mit einem Sensor-Modul kann jeder Kreislauf separat gesteuert werden (*pH4pO4, MX4/4, beides DASGIP, Jülich, Deutschland*). Kamera, Mikroskopisch, Inkubator, Gasmischer und Sensor-Modul werden durch einen Standard- PC mit zusätzlichen COM-Ports gesteuert.

## 2.2 Charakterisierung des Perfusionssystems

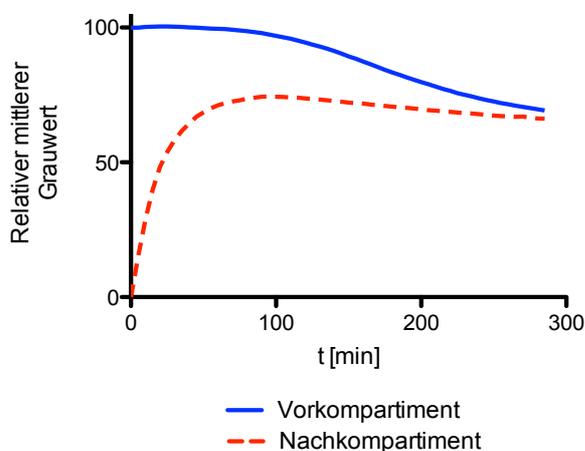
Um gleiche Bedingungen in den Bioreaktoren zu gewährleisten wurde die Steuerung der Prozessparameter überprüft. Dazu wurden 30 mL Dubelcos Modified Eagle Medium (DMEM) in jedem Kreislauf mit einer Pumprate von 0,4 mL/min zirkuliert und das gesamte System wurde auf 37°C vorgewärmt. Sobald pH und  $pO_2$  stabile Werte in beiden Kreisläufen zeigten wurden zwei unterschiedliche Begasungsprotokolle durchgeführt. Um die Reaktionszeit zu ermitteln und Abweichungen zwischen den Kreisläufen auszuschließen wurde das zunächst das Mischverhältnis für Standardzellkultur appliziert (4,8%  $CO_2$ , 22%  $O_2$ , 73,2%  $N_2$ ), bis der pH in beiden Kreisläufen 7,4 erreichte. Nun wurde mit einem hohen  $CO_2$  Gehalt begast (78%  $CO_2$ , 22%  $O_2$ ). Der pH fiel daraufhin auf 6,30 ( $\pm 0,03$ ) und 6,29 ( $\pm 0,02$ ) innerhalb von 23,2 ( $\pm 1,3$ ) und 24,4 ( $\pm 1,5$ ) Minuten in den jeweiligen Kreisläufen. Eine  $CO_2$ -freie Begasung (22%  $O_2$ , 78%  $N_2$ ) steigerte die pH-Werte gleichmäßig. In beiden Kreisläufen erreichten die pH-Werte ein physiologisches Niveau (7,4) nach 26,4 ( $\pm 2,5$ ) bzw. 29,2 ( $\pm 2,8$ ) Minuten.

Bei sauerstofffreiem Mischverhältnis (4,8%  $CO_2$  , 95,2%  $N_2$ ) fiel der  $pO_2$  unter 1% nach 40,3 ( $\pm 2,1$ ) bzw. 45,0 ( $\pm 1,8$ ) Minuten. Zur Sättigung mit  $O_2$  wurde das Medium mit 4,8%  $CO_2$  und 95,2%  $O_2$  begast. Eine Sättigung wurde nach 22,5 ( $\pm 1,3$ ) bzw. 20,75 ( $\pm 6,7$ ) Minuten erreicht [*Billecke, N., N. Raschzok, et al. (2012). "An*

operational concept for long-term cinemicrography of cells in mono- and co-culture under highly controlled conditions-the SlideObserver." *J Biotechnol* **159**(1-2): 83-89]. Die Versuche zeigen, dass eine genaue Kontrolle von pH und pO<sub>2</sub> möglich ist. Auch ist die Abweichung der Reaktionszeiten sowie der erreichten Werte zwischen den beiden kontrollierten Perfusionskreisläufen minimal. Bei herkömmlichen Zellkulturverfahren ist der pH-Wert des Mediums in hohem Maße von der Pufferzusammensetzung sowie den kultivierten Zellen und zu evaluierenden Additiva (Pharmazeutika, Zytokine) abhängig. Das Setup ermöglicht eine einfache, kontinuierliche Messung und Überwachung von Kulturbedingungen.

### 2.3 Charakterisierung des Multikompartiment Bioreaktor

Für die Charakterisierung des Multikompartiment Bioreaktor wurde zunächst das mittlere Volumen der Zellkompartimente ermittelt. Hierzu wurden die Perfusionsports der Bioreaktoren verschlossen und die Zellkompartimente nacheinander über die Inokulationsports mit Wasser gefüllt und das Füllvolumen bestimmt. Es ergab sich ein mittleres Volumen von 1,29 of ± 0,12 mL (n = 44).



**Abb. 3:** Dispersionsverhalten von niedermolekularem Farbstoff (Trypan-Blau)

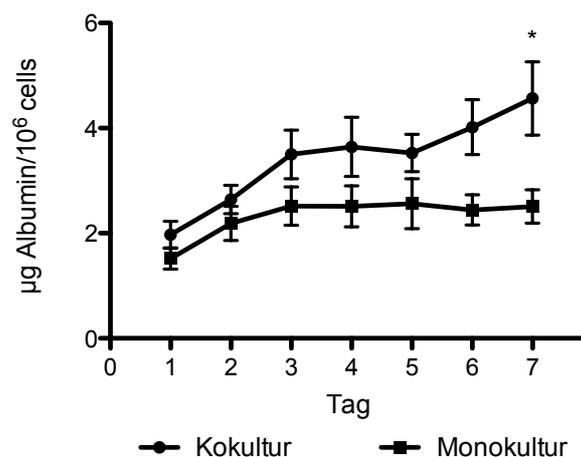
Weiterhin wurde das Dispersionsverhalten löslicher Bestandteile zwischen den Zellkammern über die HF's untersucht. Dazu wurden Perfusionssysteme mit PBS gefüllt und bis zur Stabilisierung aller Parameter im Inkubator mit einer Pumprate von 0,4 mL/min zirkuliert. Der niedermolekulare Farbstoff Trypan-Blau wurde nun in das vorgelagerte Kompartiment injiziert. Pro

Kompartiment wurden nun vier Bereiche gewählt und mittels Mikroskopisch und Z-Hub periodisch alle 5 Minuten im Objektiv (10x) fokussiert. Die Pixelhelligkeit der Aufnahmen wurden mit ImageJ analysiert und für die vier Bereiche zum jeweiligen Zeitpunkt als relative Farbstoffverteilung aufgefasst. Das Verfahren wurde viermalig mit jeweils neuen Reaktoren durchgeführt und die Werte für Vor- bzw. Nach-

Kompartiment gemittelt. Der Farbstoff wurde zunächst stark im Nach- Kompartiment angereichert. Nach 95 Minuten war der Maximalwert erreicht (Abb.3). Das Vor-Kompartiment klärte sich mit einem sigmoiden Kurvenverlauf von Farbstoff. Nach 300 min näherten sich die Pixelhelligkeiten in beiden Kompartimenten an, da der Farbstoff sich gleichmäßig im Prozessfluid verteilte. Der Vorversuch zeigt, dass im vorgelagerten Kompartiment produzierte Stoffe über die verbindenden Hohlfasern zunächst verstärkt in das nachgelagerte Kompartiment geführt werden, bevor sie im gesamten Prozessfluid verdünnt werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für eine membrangestützte Kokultur, da somit Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche von Feederzellen sezerniert werden, ggf. Effekte auf die im Nach- Kompartiment kultivierten Zellen haben.

Um dies zu überprüfen wurden parenchymale und nicht-parenchymale Leberzellen in Multikompartiment Bioreaktoren kultiviert. Die Leberzellen wurden in einem Perfusionsverfahren mit Kollagenase aus Rattenlebern gewonnen. Durch Pelletierung wurden in einem ersten Schritt parenchymale von nicht-parenchymalen Zellen getrennt. Nicht-parenchymale Zellen wurden im Weiteren mittels Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt. Die Inokulation erfolgte direkt nach Isolierung und Aufreinigung; parenchymale Zellen wurden in das Nach- und nicht-parenchymale Zellen als Feederzellen in das Vor- Kompartiment geladen. Als Kontrolle diente ein Bioreaktor ohne Feederzellen im Nach- Kompartiment. Für jedes mit Zellen beladenen Kompartiment wurden nun 20 repräsentative Bereiche ausgewählt und alle 10 Minuten automatisiert im Objektiv (20x) fokussiert und aufgenommen. An jedem Kulturtag wurde ein Aliquot aus den Medienreservoirs entnommen und zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden über 7 Tage unter kontinuierlicher Beobachtung kultiviert und die Aufnahmen für den jeweiligen Bereich zu Zeitrafferfilmen prozessiert. Die Medienproben wurden in einem ELISA- Test auf die Albuminproduktion hin untersucht.

Der Versuch wurde mit Lebern aus vier Versuchstieren wiederholt.



**Abb. 4:** Albuminproduktion von Hepatozyten in Monokultur und indirekter Kokultur. (\* = p<0.01)

Die Zeitrafferaufnahmen ließen eine gute Charakterisierung der morphologischen Veränderungen in den Bioreaktoren zu. Die Proliferation und Bewegung der Feederzellen konnte über den Kulturverlauf beobachtet werden. Nach der Inokulation war der Adhäsionsprozess der parenchymalen Zellen innerhalb der ersten 24 Std. zu erkennen. Im Folgenden zeigten diese Zellen die für Hepatozyten typische Struktur und schlossen Lücken in der Zellschicht durch Expansion des Zytoplasmas. Proliferation konnte nicht beobachtet werden. Die Morphologie der Hepatozyten zeigte keine Abweichungen zwischen Mono- und Kokultur. Die Albuminproduktion, welche als eine Kenngröße der Funktionalität von Hepatozyten *in vitro* angesehen wird, stieg in beiden Bioreaktoren im Laufe der Zellkultur stetig an. Hierbei war ein Trend zu verbesserter Albuminproduktion in Kokultursystemen zu erkennen. Eine Überprüfung mittel two-way ANOVA zeigte allerdings, dass dieser Trend erst am siebten Kulturtag statistische Signifikanz erreichte (Abb. 4). Grund hierfür kann eine zu starke Verdünnung der von den Feederzellen sezernierte Faktoren im gesamten Prozessfluid sein.

#### 2.4 Mikroskopische Zeitrafferanalyse markierter Zellen

Um gezielte morphologische Veränderungen zu beobachten wurden Zellen der hepatozellulären Karzinomzelllinie HuH7 kultiviert und in zwei parallelen Systemen analysiert. In einem Bioreaktor wurden die Zellen für 4 Std. mit mikroskaligen Eisenoxidpartikeln inkubiert. Diese Partikel dienen u.A. als zelluläres Kontrastmittel für MRT-gestützte, nicht-invasive Visualisierung bei der experimentellen Zelltransplantation. Zeitrafferaufnahmen über 24 Std. von markierten vs. unmarkierten Zellen zeigten, dass Partikel bei Mitose nahezu gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Dieses Verfahren der Überprüfung der Zellmorphologie und Partikelbeladung wurde weiterhin im Rahmen einer Großtierstudie im Schwein angewendet. Hierbei wurde markierte und nicht markierte primäre porcine Hepatozyten über 7 Tage in zwei separaten Bioreaktoren kultiviert und beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Partikel über den gesamten Zeitraum im Zytoplasma der nicht proliferierenden Hepatozyten bleiben. Ein negativer Effekt auf die Zellen konnte nicht beobachtet werden [Raschzok, N., Teichgr, et al. (2010).

"Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging." *Cell Medicine* 1(3): 123-135].

## 2.5 Direkte Kokultur von Endothelialzellen und Monozyten

Um die Möglichkeit einer Unterscheidung anhand morphologischer Eigenschaften sowie Motilität zu überprüfen wurde primäre HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) in Kokultur mit der Monozyten-Zelllinie THP-1 kultiviert. Ebenfalls erfasst werden sollten heterotypische Zell-Zell Interaktionen, welche in diesem Zellmodell Aufschluss geben können über Migration von Monozyten in extravaskuläres Gewebe. Die Störung physiologischer Transmigration von Monozyten spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von vaskulären Erkrankungen. Die Reaktorversuche zeigten, dass sich THP-1 Zellen gut anhand ihrer Motilität sowie Morphologie identifizieren lassen. Zell-Zell Wechselwirkungen wie Transmigration konnten durch die Zeitrafferaufnahmen gut beobachtet und Zellbewegung sowie -größe zeitlich aufgelöst analysiert werden.

## 2.6 Kontrollierte Hypothermie zur Analyse von Endothelialschichtmorphologie

Die Möglichkeiten des Setups zur kontrollierten Veränderung der Kulturbedingungen fanden weiterhin Anwendung in einer Studie zu endothelialer Dysfunktion unter hypothermen Bedingungen. Hierbei wurden konfluente HUVEC Monolayer nach einem Hypothermieprotokoll ausgesetzt und die morphologischen Veränderungen beobachtet. Dabei wurde das Setup von 37°C auf 17°C gekühlt, Hypothermie für 20 min gehalten und dann wieder erwärmt. Die Zeitrafferaufnahmen zeigten, dass die Endothelzellschicht bereits bei einer Temperatur von 32°C beginnt Lücken zu formen. Dieser Prozess verstärkte sich bei 17°C deutlich und war bei Wiedererwärmung auf 37°C völlig reversibel. Zugabe der Immunsuppressiva Tacrolimus (TAC) und Methylprednisolon (MP) in einen der Perfusionskreisläufe konnte diesen Effekt völlig unterdrücken. Die zeitaufgelöste Analyse der morphologischen Veränderung der Endothelzellschicht konnte somit die Hypothese untermauern, dass Hypothermie endotheliale Dysfunktion auslöst und dieser Effekt

durch die Gabe von TAC und MP möglicherweise abgemildert werden kann [Diestel, A., N. Billecke, et al. (2009). "Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction." *J Heart Lung Transplant* **28**(7): 718-724].

## 2.7 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf primäre Hepatozyten

Um die Anwendbarkeit des Systems bezüglich der Zugabe von Substanzen in die Perfusionskreisläufe und deren Effekt auf Zellen über längere Zeiträume zu bestimmen wurden primäre Ratten-Hepatozyten für eine Woche in Anwesenheit von *Epithelial Growth Factor* (EGF) und *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) kultiviert. Die Kombination von HGF und EGF soll einen merklichen Wirkung auf frisch isolierte Ratten-Hepatozyten hinsichtlich ihrer Beweglichkeit, Morphologie und DNA-Synthese *in vitro* haben. Als Kontrolle dienten Hepatozyten, welche parallel unter exakt gleichen Bedingungen ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Effekte von EGF und HGF konnten innerhalb der ersten 24 Std. der Kultur nach Inokulation der Zellen gesehen werden. In Gegenwart von HGF und EGF adhärten primäre Hepatozyten deutlich schneller als Kontrollzellen und bildeten eine konfluente Zellschicht. Die Kontrollzellen zeigten eine verminderte Fähigkeit sich auszubreiten und bildeten eher Zellkolonien. Darüber hinaus zeigte mit HGF und EGF stimulierte Hepatozyten in der Langzeitkultur extensive Bildung von abgeflachten Lamellopodia und gruppieren sich, wobei die kompakte Zellschicht aufbrach. Beide Effekte wurden in früheren Studien mit der Transformation adulter Hepatozyten zu auf biliären Epithelzellen assoziiert. Nach einer Woche in Kultur lösten sich Hepatozyten ohne Wachstumsfaktoren von dem Substrat während stimulierten Hepatozyten bis zum Ende der Kulturzeit adhärten und vital blieben. Cinemicrographie primärer Ratten-Hepatozyten erlaubt die genaue Beobachtung der Wirkung von Wachstumsfaktoren auf das Zellverhalten.

Die Hauptziele des Promotionsvorhabens wurden entsprechend der Planung erreicht. Es wurde ein System entwickelt, welches den Parallelbetrieb mehrerer Bioreaktoren unter exakt kontrollierten Bedingungen erlaubt. Gleichzeitig wurde das System für die zeitaufgelöste mikroskopische Analyse beliebiger Bereiche in den

Bioreaktoren optimiert. Die Kultur anspruchsvoller Zelltypen sowie die Anpassung der Kulturbedingungen wurden getestet. Weiterhin wurde das Bioreaktordesign angepasst um eine indirekte Kokultur zu ermöglichen. Die Funktionalität des neuen Multikompartiment- Bioreaktor wurde im Sinne eines „*Proof of Concept*“ evaluiert. Das System war wichtiger Bestandteil von Studien mit zellmorphologischen Fragestellungen.

## Anteilerklärung

Nils Billecke hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Autoren: Nils Billecke, Nathanael Raschzok, Susanne Rohn, Mehmet H. Morgül, Ruth Schwartländer, Martina Mogl, Sonja Wollersheim, Katharina R. Schmitt und Igor M. Sauer

Titel: „An operational concept for long-term cinemicrography of cells in mono- and co-culture under highly controlled conditions--the SlideObserver“

Zeitschrift: Journal of Biotechnology

Erscheinungsjahr: 2012

90 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Konzeptentwicklung
- Versuchsplanung und –durchführung
- Datensammlung
- Auswertung
- Publikation

Publikation 2:

Autoren: Antje Diestel, Nils Billecke, Jörg Rössler, Boris Schmitt, Felix Berger, Igor M. Sauer und Katharina R. Schmitt

Titel: „Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction“

Zeitschrift: Journal of Heart and Lung Transplantation

Erscheinungsjahr: 2009

30 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Versuchsdurchführung Zeitrafferaufnahmen
- Analyse
- Datenaufbereitung zur Publikation

Publikation 3:

Autoren: Nathanael Raschzok, Ulf Teichgräber, Nils Billecke, Anja Zielinski, Kirsten Steinz, Nora N. Kammer, Mehmet H. Morgül, Sandra Schmeisser, Michaela K. Adonopoulou, Lars Morawietz, Bernhard Hiebl, Ruth Schwartländer, Wolfgang Rüdinger, Bernd Hamm, Peter Neuhaus und Igor M. Sauer

Titel: „Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging“

Zeitschrift: Cell Medicine

Erscheinungsjahr: 2010

30 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Konzeptentwicklung
- Methodenetablierung: Zellmarkierung, Histologie
- Durchführung: Zellmarkierung, Probennahme
- Analyse: Histologie
- Dateninterpretation
- Datenaufbereitung zur Publikation

Nils Billecke

N. Billecke, N. Raschzok, et al. (2012). "An operational concept for long-term cinemicrography of cells in mono- and co-culture under highly controlled conditions- the SlideObserver."

Journal of Biotechnology **159**(1-2): 83-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.01.033>

A. Diestel, N. Billecke, et al. (2009). "Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction."

Journal of Heart and Lung Transplantation **28**(7): 718-724.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2009.04.003>

N. Raschzok, U. Teichgräber, et al. (2010). "Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging."

Cell Medicine **1**(3): 123-135.

<http://dx.doi.org/10.3727/215517910X551053>

# Lebenslauf

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

## Publikationsliste

Billecke, N., Raschzok, N., Rohn, S., Morgul, M.H., Schwartlander, R., Mogl, M., Wollersheim, S., Schmitt, K.R., Sauer, I.M., (2012)

*An operational concept for long-term cinemicrography of cells in mono- and co-culture under highly controlled conditions--the SlideObserver.*

Journal of Biotechnology 159, 83-89.

Raschzok, N., Pinkernelle, J., Billecke, N., Nehls, K., Powerski, M., Sauer, I.M., Teichgraber, U., (2012)

*Feasibility of fast dynamic MRI for noninvasive monitoring during ectopic liver cell transplantation to the spleen in a porcine model.*

AJR. American journal of Roentgenology 198, 1417-1423.

Raschzok, N., Werner, W., Sallmon, H., Billecke, N., Dame, C., Neuhaus, P., Sauer, I.M., (2011)

*Temporal expression profiles indicate a primary function for microRNA during the peak of DNA replication after rat partial hepatectomy.*

American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 300, R1363-1372.

Kammer, N.N., Billecke, N., Morgul, M.H., Adonopoulou, M.K., Mogl, M., Huang, M.D., Florek, S., Schmitt, K.R., Raschzok, N., Sauer, I.M., (2011)

*Labeling of primary human hepatocytes with micron-sized iron oxide particles in suspension culture suitable for large-scale preparation.*

Artificial Organs 35, E91-100.

Diestel, A., Troeller, S., Billecke, N., Sauer, I.M., Berger, F., Schmitt, K.R., (2010)

*Mechanisms of hypothermia-induced cell protection mediated by microglial cells in vitro.*

The European Journal of Neuroscience 31, 779-787.

Raschzok, N., Teichgräber, U., Billecke, N., Zielinski, A., Steinz, K., Kammer, N.N., Morgul, M.H., Schmeisser, S., Adonopoulou, M.K., Morawietz, L., Hiebl, B., Schwartlander, R., dinger, W., Hamm, B., Neuhaus, P., Sauer, I.M., (2010)  
*Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging.*  
Cell Medicine 1, 123-135.

Raschzok, N., Muecke, D.A., Adonopoulou, M., Billecke, N., Zielinski, A., Werner, W., Teichgraeber, U., Sauer, I.M., (2010)  
*In Vitro Evaluation of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Labeling of Human Liver Cells.*  
International Journal of Artificial Organs 33, 435-435.

Diestel, A., Billecke, N., Roessler, J., Schmitt, B., Troeller, S., Schwartlander, R., Berger, F., Sauer, I.M., Schmitt, K.R., (2009)  
*Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction.*  
The Journal of Heart and Lung Transplantation 28, 718-724.

Raschzok, N., Billecke, N., Kammer, N.N., Morgul, M.H., Adonopoulou, M.K., Sauer, I.M., Florek, S., Becker-Ross, H., Huang, M.D., (2009)  
*Quantification of cell labeling with micron-sized iron oxide particles using continuum source atomic absorption spectrometry.*  
Tissue Engineering Part C Methods 15, 681-686.

Raschzok, N., Morgul, M.H., Pinkernelle, J., Vondran, F.W., Billecke, N., Kammer, N.N., Pless, G., Adonopoulou, M.K., Leist, C., Stelter, L., Teichgraber, U., Schwartlander, R., Sauer, I.M., (2008)  
*Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography.*  
Journal of Cellular and Molecular Medicine 12, 1384-1394.

## Erklärung

„Ich, Nils Billecke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Bioreaktorsystem zur videomikroskopischen Langzeituntersuchung von Zellen in Mono- und Kokultur*“ 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.“

Datum

Unterschrift



# Danksagung

Ich danke meinen Eltern.