

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

DISSERTATION

Untersuchung des Einflusses der extrazellulären Matrix auf die
Ausbildung von Gallenkanaliculi und den biliären Transport in
dreidimensional kultivierten Hepatozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Deharde

aus Oldenburg (Oldenburg)

Datum der Promotion: 02. März 2018

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (deutsch)	3
Abstract (english)	5
Eidesstattliche Versicherung	7
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	8
Auszug aus der Journal Summary List	9
Ausgewählte Publikation	10
Lebenslauf	25
Publikationsliste	29
Danksagung	30

Abstrakt (deutsch)

Primäre humane Hepatozyten (PHH) bilden den Goldstandard für *in vitro*-Untersuchungen des hepatischen Metabolismus und der Hepatotoxizität.

Es ist bekannt, dass die Kultivierung von PHH in einer Sandwich-Konfiguration zwischen zwei Schichten einer extrazellulären Matrix (EZM) dazu führt, dass die PHH dreidimensional anwachsen können. Dies ermöglicht die Ausbildung von *in vivo*-ähnlichen Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Interaktionen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener EZM-Kombinationen in Sandwichkulturen von PHH auf die Morphologie, die zelluläre Anordnung und die Ausbildung von Gallenkanalikuli sowie die Galleexkretion systematisch zu untersuchen.

PHH wurden aus humanen Lebergewebeproben isoliert und anschließend für sechs Tage in Sandwich-Konfiguration zwischen zwei EZM-Schichten, bestehend aus Kollagen und/oder Matrigel, kultiviert. Diese Sandwichkulturen wurden mittels Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopie im Hinblick auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und Gallenkanalikuli sowie auf die Repolarisierung der PHH untersucht. Der Einfluss der jeweiligen EZM-Kombination auf die Zellaktivität und –viabilität wurde mit Hilfe des XTT-Assays und mittels eines fluoreszenzbasierten Tod/Lebend Assays analysiert. Zusätzlich wurde der biliäre Transport der Substanz CDF sowie ihre Akkumulation unter Verwendung des Live Cell Imagings untersucht.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wahl der EZM-Komposition einen Einfluss auf die Morphologie, die zelluläre Anordnung und die Zellaktivität in Sandwichkulturen von PHH hat. Wurde als untere EZM-Schicht Kollagen verwendet, so zeigten die PHH eine *in vivo*-ähnliche Gewebearchitektur. Handelte es sich bei der oberen EZM um Kollagen, so kam es zur Formierung zahlreicher Gallenkanalikuli, wohingegen Sandwichkulturen mit einer unteren Schicht aus Matrigel und einer oberen Schicht aus Kollagen das am meisten verzweigte und stabilste Gallengangnetzwerk zeigten. In allen Sandwichkulturen konnte eine zeitabhängige CDF-Leckage aus den Gallenkanalikuli in den Zellkulturüberstand beobachtet werden, die ebenfalls eine Abhängigkeit von der EZM-Kombination zeigte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Wahl der EZM einen Einfluss auf die Morphologie, Zellanordnung und die Ausbildung von Gallenkanalikuli in Sandwichkulturen von PHH hat. Die Morphologie und die multizelluläre Anordnung werden stark von der unteren EZM beeinflusst. Im Gegensatz dazu werden die

Galleexkretion sowie Leckage hauptsächlich von der oberen EZM bestimmt. Undichte und beschädigte Gallenkanalikuli könnten vor allem in Langzeitstudien eine Limitation dieses Sandwichkulturmodells darstellen.

Abstract (english)

Primary human hepatocytes (PHH) are still considered as gold standard for investigation of *in vitro* metabolism and hepatotoxicity in pharmaceutical research. It has been shown that the three-dimensional (3D) cultivation of PHH in a sandwich configuration between two layers of extracellular matrix (ECM) enables the hepatocytes to adhere three-dimensionally leading to formation of *in vivo* like cell-cell contacts and cell-matrix interactions. The aim of the present study was to investigate the influence of different ECM compositions on morphology, cellular arrangement and bile canaliculi formation as well as bile excretion processes in PHH sandwich cultures systematically. Freshly isolated PHH were cultured for 6 days between two ECM layers made of collagen and/or Matrigel in four different combinations. The cultures were investigated by phase contrast microscopy and immunofluorescence analysis with respect to cell-cell connections, repolarization as well as bile canaliculi formation. The influence of the ECM composition on cell activity and viability was measured using the XTT-assay and a fluorescent dead or alive assay. Finally, the bile canalicular transport was analyzed by live cell imaging to monitor the secretion and accumulation of the fluorescent substance CDF in bile canaliculi.

Using collagen and Matrigel in different compositions in sandwich cultures of hepatocytes, we observed differences in morphology, cellular arrangement and cell activity of PHH in dependence of the ECM composition. Sandwich cultured hepatocytes with an underlay of collagen seem to represent the best *in vivo* tissue architecture in terms of formation of trabecular cell arrangement. Cultures overlaid with collagen were characterized by the formation of abundant bile canaliculi, while the bile canaliculi network in hepatocytes cultured on a layer of Matrigel and overlaid with collagen showed the most branched and stable canalicular network. All cultures showed a time-dependent leakage of CDF from the bile canaliculi into the culture supernatant with variations in dependence on the used matrix combination.

In conclusion, the results of this study show that the choice of ECM has an impact on the morphology, cell assembly and bile canaliculi formation in PHH sandwich cultures. The morphology and the multicellular arrangement were essentially influenced by the underlying matrix, while bile excretion and leakage of sandwich cultured hepatocytes were mainly influenced by the overlay matrix. Leaking and damaged bile canaliculi

could be a limitation of the investigated sandwich culture models in long-term excretion studies.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Daniela Deharde, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung des Einflusses der extrazellulären Matrix auf die Ausbildung von Gallenkanaliculi und den biliären Transport in dreidimensional kultivierten Hepatozyten

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation : **Daniela Deharde**, Christin Schneider, Thomas Hiller, Nicolas Fischer, Victoria Kegel, Marc Lübberstedt, Nora Freyer, Jan G. Hengstler, Tommy G. Anderson, Daniel Seehofer, Johann Pratschke, Katrin Zeilinger und Georg Damm, Bile canaliculi formation and biliary transport in 3D sandwich cultured hepatocytes in dependence of the extracellular matrix composition, Archives of Toxicology, 2016, 90(10):2497-2511

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei der Planung der experimentellen Arbeiten
- Etablierung der dreidimensionalen Kultur von Leberzellen
- Koordination, Durchführung und Auswertung der experimentellen Arbeiten
- Mitarbeit bei der Literaturrecherche
- Verfassen des Artikels

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

JCR-Web 4.5 Journal Summary List

http://admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR?RQ=LIST...

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]

WELCOME HELP

2015 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: subject categories TOXICOLOGY [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: Impact Factor [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 90)

Navigation icons

Page 1 of 5

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ⁱ						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
	1	ANNU REV PHARMACOL	0362-1642	7434	14.769	18.088	4.871	31	>10.0	0.01087	6.362
	2	PART FIBRE TOXICOL	1743-8977	3245	8.649	9.618	0.312	32	4.3	0.00914	2.408
	3	ENVIRON HEALTH PERSP	0091-6765	34909	8.443	9.098	2.258	186	8.9	0.05355	2.905
	4	NANOTOXICOLOGY	1743-5390	3466	7.913	8.137	1.814	113	3.3	0.00950	1.870
	5	ARCH TOXICOL	0340-5761	6827	6.637	5.574	1.512	168	4.7	0.01222	1.234
	6	J TOXICOL ENV HEAL B	1093-7404	1473	5.552	5.948	0.250	12	7.0	0.00254	1.746
	7	CRIT REV TOXICOL	1040-8444	3529	5.422	5.948	1.069	29	9.1	0.00504	1.727
	8	MUTAT RES-REV MUTAT	1383-5742	2882	5.261	5.956	1.027	37	7.9	0.00381	1.852
	9	DRUGS	0012-6667	9141	4.883	4.299	1.047	169	8.9	0.01381	1.238
	10	DNA REPAIR	1568-7864	5133	3.929	3.445	0.682	148	6.6	0.01579	1.646
	11	TOXICOL SCI	1096-6080	15817	3.880	4.307	0.903	248	7.6	0.02428	1.180
	12	TOXICOL APPL PHARM	0041-008X	17689	3.847	4.010	0.735	275	7.9	0.02387	1.007
	13	TOXICOLOGY	0300-483X	12870	3.817	3.967	0.912	147	9.0	0.01462	0.999
	14	J ENVIRON SCI HEAL C	1059-0501	646	3.667	3.726	1.000	14	6.6	0.00078	0.834
	15	FOOD CHEM TOXICOL	0278-6915	20398	3.584	3.440	0.636	275	6.0	0.03257	0.733
	16	TOXINS	2072-6651	2929	3.571	3.942	0.581	322	3.0	0.01001	0.964
	17	AQUAT TOXICOL	0166-445X	12343	3.557	4.056	0.716	257	7.0	0.01829	0.941
	18	TOXICOL LETT	0378-4274	13230	3.522	3.571	0.625	232	7.0	0.02027	0.879
	19	TOXICOL IN VITRO	0887-2333	7660	3.338	3.285	0.715	295	5.8	0.01261	0.730
	20	ENVIRON MOL MUTAGEN	0893-6692	3419	3.326	3.249	1.188	64	8.6	0.00516	0.922

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 90)

Navigation icons

Page 1 of 5

[Acceptable Use Policy](#)
Copyright © 2017 Thomson Reuters.



Ausgewählte Publikation

Daniela Deharde, Christin Schneider, Thomas Hiller, Nicolas Fischer, Victoria Kegel, Marc Lübberstedt, Nora Freyer, Jan G. Hengstler, Tommy G. Anderson, Daniel Seehofer, Johann Pratschke, Katrin Zeilinger und Georg Damm, Bile canaliculi formation and biliary transport in 3D sandwich cultured hepatocytes in dependence of the extracellular matrix composition, Archives of Toxicology, 2016, 90(10):2497-2511

<http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1758-z>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Deharde D., Schneider C., Hiller T., Fischer N., Kegel V., Lübberstedt M., Freyer N., Hengstler J.G., Anderson T., Seehofer D., Pratschke J., Zeilinger K., Damm G., *Bile canaliculi formation and biliary transport in 3D sandwich cultured hepatocytes in dependence of the extracellular matrix composition.*, Archives of Toxicology, 2016, 90(10):2497-2511, IF: 6,64

Kegel V.*, **Deharde D.***, Pfeiffer E., Seehofer D., Damm G., *Simplified simultaneous isolation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells.*, The Journal of Visualized Experiments (JoVE), 2016, (109):e53069, IF: 1,19

*geteilte Erstautorenschaft

Iwamoto N., D'Alessandro L.A., Depner S., Hahn B., Kramer B.A., Lucarelli P., Vlasov A., Stepath M., Böhm M.E., **Deharde D.**, Damm G., Seehofer D., Lehmann W.D., Klingmüller U., Schilling M., *Context-dependent regulatory mechanisms control site-specific information processing within the MEK/ERK module.*, Science Signaling, 2016, 9(413):ra13, IF: 7,36

Submitted: Lucarelli P., Schilling M., Kreutz C., Vlasov A., Böhm M.E., Iwamoto N., Steiert B., Lattermann S., Wäsch M., Stepath M., **Deharde D.**, Damm G., Seehofer D., Muciek M., Gretz N., Lehmann W.D., Timmer J., Klingmüller U., *The complex life of Smad isoforms determines gene expression.*, Molecular Cell, submitted 11/2016, IF: 13,96

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht, sie vorangetrieben und mich unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Daniel Seehofer, meinen Doktorvater, für die Überlassung dieses sehr spannenden Forschungsthemas, die hilfreichen und kritischen Diskussionen und die gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Ein großes Danke an Dr. Georg Damm, dessen Tür immer offen stand und der mir, egal um was für ein Problem es sich handelte, stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich konnte sehr viel von ihm lernen und bin sehr dankbar für die vielen Möglichkeiten, die er mir in den letzten Jahren eröffnet hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Melanie Kießig für die sehr gelungene Zusammenarbeit und die vielgestaltige Unterstützung.

Danke an Victoria Kegel, mit der ich oft und viel diskutiert und in sehr schönen Projekten eng zusammengearbeitet habe.

Vielen Dank an Dr. Katrin Zeilinger, Christin Schneider und Thomas Hiller für die enge und sehr gute Kooperation und Danke auch an Dr. Fanny Knöspel und Dr. Nora Freyer für die Unterstützung.

Zu Guter Letzt möchte ich mich bei meinem Partner Kevin Willy für die liebevolle Unterstützung, Zuwendung und das Verständnis bedanken und bei meiner Familie, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

Danke!