

Abstract

Until now, efficacy and toxicity of newly developed drugs are analyzed in preclinical studies with the help of animal testing and static cell culture studies. However, animal models are known not to adequately represent the human organism. Moreover, static cell culture experiments are not complex enough to represent important physiological interactions between the human organs. Due to these limitations along with the high failure rates and development costs, the drug development pipeline needs to adapt to a more efficient, cost-effective, animal-free process that applies human cells under physiological conditions.

An alternative to the traditional models are microphysiological systems. These enable the combination of human-derived miniaturized tissues cultivated in physiological communication with each other and allow for complex tissue-tissue communication as present in the human body. The Multi-Organ-Chip is such a microphysiological system which currently combines the culture of up to four human organ models. A cell culture medium is circulated within the channel system which supplies the organ models with nutrients and oxygen and assures their communication via messenger metabolites.

So far, predominantly cell lines or primary tissues from different donors have been used for the co-cultivation in microphysiological systems. However, the different genetic background of the tissues during the co-cultivation is a drawback. In this thesis, this problem was solved by generating several organ models with the same genetic background using induced pluripotent stem cells from a single donor.

Blood and skin cells from nine different human donors were isolated, purified and reprogrammed into induced pluripotent stem cells. These stem cell lines were characterized precisely for pluripotency markers and their differentiation capacities. Subsequently, three-dimensional heterogenous tissue models for the small intestine, liver, kidney, heart, connective tissue and endothelial cells were generated from induced pluripotent stem cells using several differentiation protocols. The morphology of these organ models and the gene and protein expression of relevant tissue markers were analyzed extensively.

Subsequently, a successful co-cultivation combining a small intestine, liver, kidney and brain model was achieved in a 4-Organ-Chip. All four tissue models were pre-differentiated from induced pluripotent stem cells from a single healthy donor. A further differentiation into the organ models was achieved by utilizing the technological advantages of the 4-Organ-Chip. The medium circulation through the microfluidic channel system enabled a cross talk between the tissues. This organ cross talk led to further differentiation of the tissues over a 14-day co-cultivation, despite the fact that all tissues were cultured in one common medium in the absence of any growth factors. This maturation could be conclusively detected by qPCR, immunofluorescence and RNA sequencing endpoint analyzes.

The autologous 4-Organ-Chip is the first step towards the development of a Patient-on-a-Chip. Genome editing or the usage of blood donations from patients can help to generate disease models on the 4-Organ-Chip in the future. The Patient-on-a-Chip provides the unique opportunity to accelerate the drug development and to intensify the research of individualized therapies. As a result, most laboratory animals, as well as healthy volunteers in Phase I clinical trials, could be replaced by the Patient-on-a-Chip.

Zusammenfassung

Die Wirksamkeit und Toxizität neu entwickelter Medikamente wird derzeit in vorklinischen Studien mit Hilfe von Tierversuchen sowie mittels statischer Zellkulturversuche erforscht. Dabei ist bekannt, dass Tiermodelle den menschlichen Organismus nicht ausreichend repräsentieren und statische Zellkulturversuche wiederum nicht komplex genug sind, um wichtige physiologische Interaktionen zwischen den menschlichen Organen abzubilden.

Diese Einschränkungen, zusammen mit den hohen Kosten und Durchfallquoten bei der Entwicklung von Medikamenten, müssen zu einem Umdenken führen. Eine effiziente und kostengünstige Entwicklung, ohne Tierversuche aber dafür mit menschlichen Zellen, die unter humanen physiologischen Bedingungen kultiviert werden, muss in den Vordergrund rücken.

Eine Alternative zu den konventionellen Modellen stellen mikrophysiologische Systeme dar. Diese ermöglichen es, menschliche miniaturisierte Organmodelle in physiologischer Kommunikation miteinander zu kultivieren und bilden somit einen Teil des menschlichen Organismus ab. Der Multi-Organ-Chip ist ein mikrophysiologisches System und ermöglicht die Kultivierung von bis zu vier menschlichen Organmodellen. Ein Kanalsystem innerhalb des Multi-Organ-Chips ermöglicht die Zirkulation eines Nährmediums, sodass die Organmodelle ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden, sowie über Botenstoffe miteinander kommunizieren können.

Bisher wurden für die Ko-Kultivierungen in den mikrophysiologischen Systemen meist Zelllinien oder primäre Zellen unterschiedlicher Spender verwendet. Bei einer Interaktion der Organmodelle in einem mikrophysiologischen System ist es jedoch von Nachteil, dass die Gewebetypen einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen. Um dieses Problem zu lösen, wurden in dieser Arbeit induzierte pluripotente Stammzellen verwendet und damit sichergestellt, dass alle Organmodelle von einem einzigen menschlichen Spender stammen und somit den selben genetischen Hintergrund haben.

Blut- und Hautzellen aus neun verschiedenen menschlichen Spendern wurden isoliert, aufgereinigt und mittels Reprogrammierung in induzierte pluripotente Stammzellen umgewandelt. Diese Stammzellen wurden präzise auf Pluripotenzmarker sowie auf ihre Differenzierungskapazitäten geprüft und anschließend mit Hilfe von verschiedenen Differenzierungsprotokollen in 3D heterogene Gewebemodelle für den Dünndarm, Leber, Niere, Herz, Bindegewebe und Endothelzellen differenziert. Die Morphologie der Organmodelle sowie die Gen- und Proteinexpression der relevanten Gewebemarker wurden ebenfalls umfassend analysiert.

Anschließend gelang eine erfolgreiche Ko-Kultivierung mit Dünndarm-, Leber-, Niere- und Gehirn-Organmodellen in einem 4-Organ-Chip. Hervorzuheben ist hierbei, dass alle vier Organmodelle aus derselben induzierten pluripotenten Stammzelllinie eines einzigen gesunden Spenders differenziert wurden. Durch das mikrofluidische Kanalsystem auf dem 4-Organ-Chip konnten die Organmodelle miteinander kommunizieren. Über 14 Tage wurde eine weitere Ausreifung zu den gewünschten Gewebetypen beobachtet, obwohl keine zusätzlichen Wachstumsfaktoren im Medium eingesetzt worden sind. Die Ausreifung konnte abschließend durch qPCR, Immunfluoreszenz und RNA Sequenzierung Endpunktanalysen nachgewiesen werden.

Der autologe 4-Organ-Chip ist somit der erste Schritt zur Entwicklung des Patienten-auf-dem-Chip. In Zukunft kann die Genomeditierung oder die Verwendung von Blutspenden erkrankter Menschen dazu führen, dass der 4-Organ-Chip zum modellbasierten Abbilden von Krankheiten genutzt werden kann. Der Patient-auf-dem-Chip bietet somit die einzigartige Möglichkeit die Medikamenten-entwicklung zu beschleunigen und die Erforschung von individuellen Therapien zu verstärken. Folglich könnte die Mehrheit der Tierversuche, sowie Versuche an freiwilligen gesunden Menschen, die für die klinischen Studien der Phase I notwendig waren, durch den Patienten-auf-dem-Chip ersetzt werden.