

# Abstract

Human and animal health has been exposed to endocrine disruptors (EDs) which are chemicals found in pesticides, food or personal care products. They enter our organism via ingestion of food, drinking water, skin contact or inhalation of polluted air. The main concern about these disruptors is caused by their interference with the endocrine system causing adverse effects, such as altered reproduction, abnormal neurological development in newborns and children or an elevated susceptibility to hormone-related cancers. The thyroid gland and its hormones belong to major targets that are primarily affected by EDs. Studies on endocrine disrupting effects as well as general endocrine research has been primarily conducted in animal studies due to the lack of representative human models.

The importance of the thyroid gland accentuates its role during embryonic development and organogenesis by secreting thyroid hormones T3 and T4. It further controls the metabolism of various adult organs, the well-being, and the cardiovascular system. Mechanisms that drive thyroid organogenesis, especially in the human, have not been fully elucidated. Nevertheless, it is known that the architecture of the characteristic units of the thyroid gland, the thyroid follicles, is a prerequisite for its functionality. These follicles consist of a monolayer of thyrocytes enclosing a acidophilic lumen and are responsible for the secretion of thyroid hormones.

A human thyroid test system is needed to evaluate the effects of new substances on endocrine organs. This thyroid model should compose of human cells only and mimic the 3D structure as close as possible.

Therefore, the aim of this work was dedicated to advance the field of *in vitro* three dimensional (3D) thyroid research using primary human adult thyrocytes. The working hypothesis of this project was based on the importance of a 3D environment and the concomitant cell-cell/cell-matrix interactions to mimic *in vitro* thyroid follicles. Therefore, two approaches were conducted: The maintenance of isolated thyroid follicles in culture and the 3D development of a new 3D model built from isolated and cultured thyrocytes. The isolated human thyroid follicles were cultured for two weeks on a microfluidic multi-organ-chip platform under dynamic conditions to assess the applicability of the isolated follicles as a human test system for *in vitro* research. The *in vitro* expanded adult thyrocytes, derived from macroscopically normal tissue, were cultured as single 3D culture or in co-culture with thyroid derived fibroblastoid cells (TdFs) or endothelial cells (ECs). Adult human thyrocytes dedifferentiated in longterm *in vitro* culture and lost their transcriptional thyroid-phenotype. The results of 3D cultures, independent from the co-culture with another cell type, demonstrate that the 3D environment exerted a beneficial effect on the transcriptional status of thyrocytes by upregulating thyroid-specific markers. It became obvious that all 3D culture approaches without supplying additional extracellular matrix organized into inverted 3D spheroids. A reorganization of thyrocytes was finally induced by the co-culture of thyrocytes with ECs in the presence of Matrigel™, a basement membrane extract, in the culture medium. These 3D constructs showed follicular-like structures and are a promising culture strategy for *in-vitro* test systems of endocrine disruptors.

All in all, this study presents for the first time in thyroid research, the successful co-culture of adult human thyrocytes with ECs that induces a reorganization to follicle-like structures *in vitro*.

# Zusammenfassung

Endokrine Disruptoren (EDs) sind chemische Substanzen, denen Menschen und Tiere permanent ausgesetzt sind. Sie kommen vor allem in Pestiziden, Nahrungsmitteln und Körperpflegeprodukten vor. Durch Nahrungsmittelaufnahme, Trinkwasser, Hautkontakt oder Einatmung belasteter Luft gelangen die Disruptoren in den Organismus und greifen in die Wirkungsachse des endokrinen Systems ein. Diese Interferenz äußert sich als Nebenwirkungen, wie z. B. in Form von veränderter Reproduktionsfähigkeit, abnormaler neurologischer Entwicklung oder der Entwicklung von Hormon-assoziierten Tumoren. Die Schilddrüse und ihre Hormone gehören hierbei zu den endokrinen Organen, die von EDs primär beeinflusst werden. Studien bezüglich der Unbedenklichkeit dieser Substanzen, aber auch allgemeiner endokriner Forschung, basiert aufgrund von fehlenden adäquaten humanen *in vitro* Modellen vorwiegend auf Tierexperimenten.

Die Schilddrüse spielt nicht nur während der Entwicklung des Embryos eine Rolle, sondern auch im adulten Organismus. Sie kontrolliert wichtige Prozesse wie den Metabolismus, den Gemütszustand und das kardiovaskuläre System, indem sie die Schilddrüsenhormone T3 und T4 sekretiert. Der komplette Mechanismus der humanen Schilddrüsenentwicklung ist noch nicht ganzheitlich aufgeklärt. Ihre typische Architektur bestehend aus sogenannten Schilddrüsenfollikeln ist eine Grundvoraussetzung für die Funktionalität der Drüse. In diesen Follikeln umschließen die Schilddrüsenzellen, Thyreozyten, einschichtig das saure Kolloid, welches für die Produktion von T3 und T4 wichtig ist.

Der Fokus dieser Arbeit ist dem Fortschritt im Bereich der *in vitro* 3D Kultur mit primären humanen Thyreozyten gewidmet. Das Ziel war es, durch die Wiederherstellung der 3D Umgebung und der Zell-Zell/Zell-Matrix Interaktion, Schilddrüsenfollikel *in vitro* zu generieren bzw. zu halten. Zwei Vorgehensweisen wurden dafür durchgeführt: die Aufrechterhaltung isolierter Follikel und die Entwicklung follikulärer Strukturen aus isolierten und kultivierten Thyreozyten.

Die isolierten und intakten Follikel wurden in Matrigel™ eingebettet und für zwei Wochen in einem mikrofluidischen System kultiviert. Auf Basis dessen wurde die Anwendbarkeit von Schilddrüsenfollikeln als humanes Testsystem unter dynamischen Bedingungen in Langzeitkulturen getestet.

Für das 3D *in vitro* Model wurden expandierte Thyreozyten entweder alleine oder in Co-Kultur mit fibroblastoiden Zellen aus der Schilddrüse oder mit Endothelzellen verwendet. Expandierte adulte Thyreozyten dedifferenzierten in Kultur, welches durch die Herunterregulation der schilddrüsenspezifischen Gene gezeigt wurde. Sobald Thyreozyten jedoch in 3D kultiviert wurden, konnte durch die Steigerung der Genexpression ermittelt werden, dass alleine schon die 3D Umgebung einen positiven Einfluss auf den transkriptionellen Phänotyp der Thyreozyten ausgeübt hat. Überraschenderweise haben die 3D Kulturen eine invertierte Organisation der Spheroidstrukturen aufgewiesen. Erst durch die Co-Kultur mit ECs und der simultanen Kultur in Matrigel™-haltigem Medium wurde die Reorganisation zu Follikel-ähnlichen Strukturen induziert.

Zusammenfassend ist herauszustellen, dass die Besonderheit dieser Arbeit auf der Entwicklung eines Co-Kultur Ansatzes und deren Einfluss auf die Redifferenzierung der Thyreozyten lag. Diese Arbeit zeigt die Etablierung einer soweit einzigartigen Co-Kultur aus Thyreozyten und Endothelzellen. Diese Forschung hat vielversprechende follikuläre Strukturen generiert und somit neue Wege in der 3D Schilddrüsenforschung *in vitro* zur Anwendung als mögliches Testsystem geebnet.