

Bianka Großhäuser

Engineered Three Dimensional Neuro-Environment for Organ-On-Chip Applications



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Engineered Three Dimensional Neuro-Environment for Organ-On-Chip Applications





Engineered Three Dimensional Neuro-Environment for Organ-On-Chip Applications

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Bianka Beate Großhäuser

aus

München

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem M. Klopper

Referent: Prof. Dr. Ute Schepers

Korreferent: Prof. Dr. Frank Breitling

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2016



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2017

Zugl.: Karlsruhe (KIT), Univ., Diss., 2016

Die vor liegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ute Schepers vom 15. November 2013 bis zum 7. September 2016 am Institut für Toxikologie und Genetik am Karlsruher Institut für Technologie angefertigt.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9504-8

eISBN 978-3-7369-8504-9



To the things that haven't happened yet
and the people who are about to dream them up



Acknowledgements

I am grateful to so many people for so many different reasons. Without any of you, I would not be where I am today and would not have enjoyed the ride as much as I did.

My supervisor, Ute Schepers – thank you for your guidance, patience and understanding. For the fruitful discussions, laughs, and bringing me back to Germany.

A special thank you to Prof. Utkan Demirci – thank you for the possibility to conduct exciting research in your lab and all the scientific discussions. Thomas Nieland, who has been a partner in crime. Thank you for all the brainwork! A big thank you to Stefan Giselbrecht and Roman Truckenmüller who have invited and supervised me in Maastricht. Working in such a unique environment was very special.

Thank you to all my lab members, past and present, named and unnamed. I much enjoyed the work and coffee breaks at Schepers lab together with Bettina Fleck, Bettina Olshausen, Carmen Seidl, Christoph Grün, Darja Ivannikov, Eva Zittel, Franziska Rönicke, Ilona Wehl, Manuela Wallesch, Vanessa Kappings. A special thank you also to Alessandro Tocchio, Mehmet Ozen, Onur Mutlu, Rex Mei, and Vigneshwaran Mani.

I would like to thank Stefan Bräse for his support in finding a PhD project as a first contact at KIT and way before I thought I would return to Germany.

Thank you, Prof. Breitling for being the co-referee of my PhD thesis.

I would also like to thank KHYS for supporting me during my research visit in Maastricht. I am very grateful for the support of FAZIT Stiftung. You enabled my conference visit in Singapore and made my research stay at Stanford University possible.

A very special thank you to my family and extended family: Thank you to Konny and Alex for making me the person I am today. Thank you for raising me to always believe that limits exist only in the mind. Thank you to Bettina, Matthias and Selina for walking beside me through life! Thank you to the Tippels who have always welcomed me – with you hours seem like minutes. Thank you Elisabeth for the long evenings and discussions, I hope many more will follow.

Thank you Marco – for everything.



Zusammenfassung

Das Gehirn ist eines der komplexesten und filigransten Organe unseres Körpers. Die Verwobenheit und Komplexität des Netzwerks führt dazu, dass eine Verletzung im Gehirn zu unterschiedlichen Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer führen kann. Um geeignete Medikamentenstoffe zur Behandlung von Gehirnerkrankungen zu entwickeln, sind Tierversuche unabdingbar. Dem Tissue Engineering als Ersatzverfahren für Tierversuche wird derzeit große Beachtung geschenkt. Das Ziel ist es, biologische Ersatzgewebe zu entwickeln, um organspezifische Experimente *in vitro* durchzuführen. Die Nachbildung einer möglichst körperähnlichen Mikroumgebung ermöglicht es, neuronale Netzwerke *in vitro* zu erforschen sowie Medikamentenstoffe an diesen Konstrukten testen zu können. Das ermöglicht ein potenziell effizienteres und kostengünstigeres Testverfahren von Wirkstoffen auf ihre Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit, Resorption und Aufnahme.

Das Ziel dieser Arbeit war es zum einen dreidimensionale (3D), mikro-physiologische neuronale Netzwerke zu erstellen, die auf einfache Art repliziert werden können und gleichzeitig langfristig neuronale Aktivität zeigen. Um das Wachstum von funktionalen, neuronalen 3D Geweben mit konfigurierbarer Steifheit und Porosität herzustellen, wurde methacrylierte Gelatine (GelMA) als semi-synthetisches Polymer ausgewählt und synthetisiert. Die Methacrylierung von Gelatine ermöglicht somit die Konfigurierbarkeit des Hydrogels einerseits mit den biokompatiblen Eigenschaften eines natürlichen Polymers und andererseits mit der Reproduzierbarkeit und Regulierbarkeit eines synthetischen Polymers. Das führt zu einer hohen Lebensfähigkeit der Neuronen im Gel sowie einer hohen Replizierbarkeit des Gels. In dieser Arbeit konnte ein Protokoll entwickelt werden, das es ermöglicht, GelMA zuverlässig in gleichbleibend guter Qualität zu synthetisieren. Dies wurde im Syntheseprozess besonders durch eine regulierte Methacrylat Anhydrit (MA) Beigabe zur gelösten Gelatine ermöglicht. Die Quervernetzung erfolgte mit Irgacure 2959 und ermöglichte durch die gute Funktionalität von GelMA eine niedrige UV-Bestrahlungszeit (1 W/cm² für 25 Sekunden). Das schaffte die Basis dafür,

Neuronen in Langzeitkultur zu einem funktionalen 3D Gehirngewebe Modell zu kultivieren. Um die Funktionalität des 3D neuronalen Gewebes zu untersuchen wurden beispielsweise die Kalziumsignale und die Synapsen Formierung untersucht.

In einem zweiten Schritt wurde ein 3D organotypisches, vaskuläres System weiterentwickelt. Der sogenannte $\mu 3DVasc\ 2.0$ ist ein Chip, der mit Mikrofluidiktechnik auf Basis des Thermoformens entwickelt wurde. Er besteht aus einem artifiziellen Mikrokanalsystem, das durch eine dünne, poröse Membran von einer 3D-Zellkultur getrennt ist. Die Weiterentwicklung bestand darin, die äußere Kammer so zu verkleinern, dass ein eingebrachtes 3D-Gewebe durch einen mikrofluidischen Fluss durch den inneren Kanal ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Das liefert die Basis für die Entwicklung einer 3D neuronalen Struktur im $\mu 3DVasc\ 2.0$ Chip mit einer integrierten Blut-Hirn Schranke, die somit das Hirnmodell nachahmt.

Diese 3D funktionalen, neuronalen Netzwerkgewebe können einen Beitrag dazu leisten, die molekulare Basis von Erkrankungen des Gehirns besser zu verstehen und Biomarker für Krankheiten wie Alzheimer zu finden. Sie können als Instrument zum Testen von Medikamentenstoffen dienen. Durch die simple Herstellung des Hydrogels und einfache Modifizierbarkeit der physikalischen Eigenschaften von GelMA können die künstlich hergestellten Gewebe des Weiteren dazu genutzt werden, weitere Organe *in vitro* nachzuahmen. Somit hat diese Methode das Potenzial, die Forschung unserer Zukunft grundlegend zu verändern, indem sie eine Basis für wissenschaftliche Forschung schafft, die besonders klinische Lösungen ermöglicht.

Abstract

The brain is the most complex organ of the body, allowing humans to achieve a unique consciousness. The intertwined and complex network explains why damage to the circuit may manifest itself in various forms of developmental diseases, psychiatric disorders, or neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

In order to study defined molecular pathways, *in vitro* studies are indispensable. In order to create *in vitro* models, bioengineering tools can be leveraged to accelerate our understanding of for example neural circuits that may lead to faster and less expensive development of new drugs, drug targets, and therapies.

The first goal of this thesis was to create 3D microphysiological neuronal networks that are easily replicated and show long-term activity. The synthesis of gelatin methacryloyl (GelMA), a semi-synthetic polymer that can be polymerized into hydrogels, is a robust way to allow the growth of functional neuronal tissues in 3D with tunable stiffness and porosity. The methacrylation of GelMA allowed the formation of a tunable hydrogel with the biocompatible properties of natural polymers and the reproducibility and controllable characteristics of synthetic polymers, resulting in high viability of cells and replicability of gels. This work was able to develop a protocol that reliably yields a methacrylated GelMA to create hydrogels enabled by careful monitoring of methacrylic anhydride (MA) addition to heated and dissolved gelatin solution during the synthesis process. The reproducibility and good functionality of GelMA allows the use of very low irradiation (1 W/cm^2 for 25 seconds) of the cell-encapsulated pre-GelMA solution thus minimizing the impact on the cells in the 3D tissue. In this study, Irgacure 2959 was utilized as a photoinitiator to crosslink gelatin with UV-light as a means to polymerize the GelMA solution into a hydrogel. This resulted in an innovative tool to grow neurons long term in 3D functional tissues to build a brain surrogate model. The 3D bio-fidelity and neuronal network formation was for instance assessed in the form of calcium signaling and synapse formation.

In a second step, an organ-on-chip microfluidic device structure, $\mu 3DVasc$ 2.0, was refined to allow an incorporation of a 3D matrix adjacent to an artificial microfluidic blood vessel. The refined structure was validated for its barrier functionality and has the potential to implement the functional neuronal network into the outer channel of the microfluidic device, thus mimicking a brain-on-chip environment. Therefore, the next step would be to join the previously established blood-brain barrier in the $\mu 3DVasc$ 2.0 with the 3D neuronal tissue developed in this work.

These functional 3D neuronal network tissue constructs can be used to model brain illness and identify disease mechanisms and biomarkers of for instance Alzheimer's disease thus serving as a tool to facilitate the testing of chemicals for drugs. These engineered tissues could further be used to engineer other organs *in vitro* due to its facile hydrogel creation and easily adjustable gel stiffness and composition. This has the potential to shape our future of creating broadly applicable platforms for scientific discovery, providing clinical solutions.







Table of contents

List of Tables.....	iv
List of Figures.....	v
List of Abbreviations	viii
1 Introduction	1
1.1 Strategies for Drug Discovery.....	1
1.2 The Central Nervous System	3
1.2.1 Neurons and Synapses.....	3
1.2.2 Alzheimer's disease – an example of neurological disorders	7
1.3 Organ mimicking systems	9
1.3.1 <i>In vitro</i> Neuronal Networks.....	9
1.3.2 2D vs. 3D and Encapsulation	10
1.4 Extracellular Matrix Mimics	11
1.4.1 Hydrogels.....	12
1.4.2 Gelatin methacryloyl – a semi-synthetic polymer	13
2 Results and Discussion.....	15
2.1 Gelatin Methacryloyl Synthesis	15
2.2 Gelatin Methacryloyl Quality.....	21
2.2.1 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.....	21
2.2.2 TNBSA	26
2.3 Cultured Biological Neuronal Networks	32
2.3.1 3D Neuronal Tissue Engineering Optimization.....	32
2.4 Engineered 3D Neuronal Networks	38
2.4.1 Live-dead analysis	38



Table of Contents

2.4.2 Immunohistochemistry	44
2.4.2.1 Axon and dendrite length development over time	46
2.4.2.2 Synaptic vesicle quantification	50
2.4.2.3 The neuronal network	54
2.4.3 Calcium activity	61
2.4.3.1 Neuro-Pharmacological activation	62
2.4.3.2 Signal amplitude	69
2.4.3.3 Signal frequency	73
2.5 μ 3DVasc 2.0	78
2.5.1 Cultivation of co-cultures in the μ 3DVasc 2.0	82
3 Materials and Methods	87
3.1 Materials	87
3.1.1 Antibodies	87
3.1.1.1 Primary Antibodies	87
3.1.1.2 Secondary Antibodies	87
3.1.1 Cells	87
3.1.2 Materials	87
3.1.3 Equipment	89
3.1.4 Software	91
3.2 Methods	91
3.2.1 Gelatin methacryloyl synthesis	91
3.2.1.1 ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopy	92
3.2.1.2 TNBSA	93
3.2.1.3 TNBSA analysis	94