

Organs-on-Chip

Ein biologisches Lungenmodell mit Forschungspotenzial

OLIVIER GUENAT, PAULINE ZAMPROGNO

ARTORG CENTER FOR BIOMEDICAL ENGINEERING RESEARCH, UNIVERSITÄT BERN, SCHWEIZ

Standard *in vitro* models fail to reproduce the complex cellular microenvironment of the human lung, whereas lung animal models poorly predict drug response in humans. A powerful alternative to model various aspects of the air-blood barrier is lung-on-chips using a thin and porous polymeric membrane. Researchers from the University of Bern have developed a new generation lung-on-chip that mimics an array of alveoli based on a biological membrane, on which patient cells are cultured, opening new potentials for lung research, drug screening and personalized medicine.

DOI: 10.1007/s12268-022-1731-8

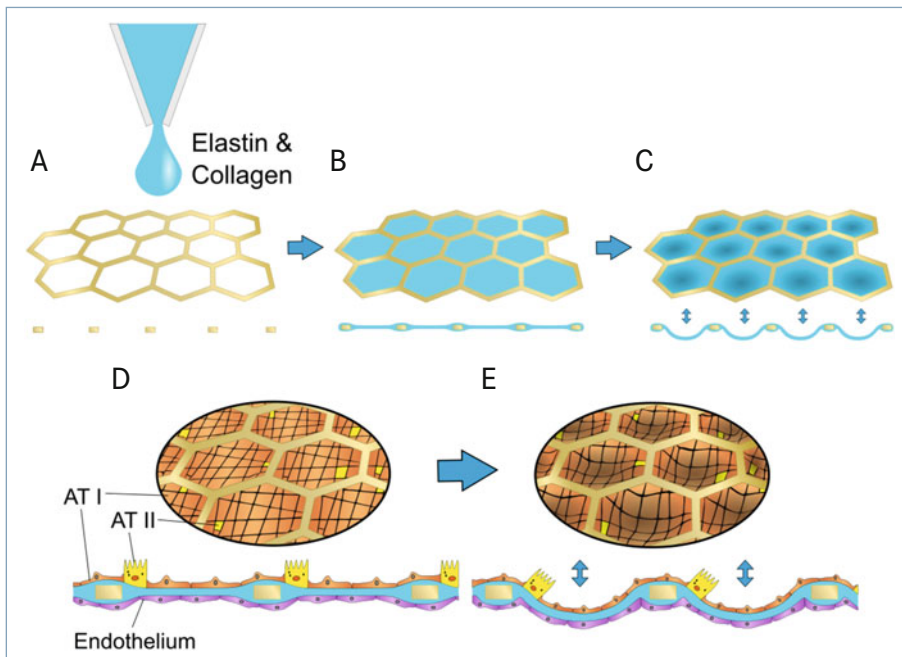
© Die Autorinnen und Autoren 2022

Die Lunge ist ein komplexes Organ, dessen Hauptfunktion der Gasaustausch ist. Sie ist das größte Organ des menschlichen Kör-

pers und spielt eine Schlüsselrolle für die Sauerstoffversorgung des Körpers. Beim Atmen diffundiert der Sauerstoff aus der ein-

geatmeten Luft in das Blut und Kohlendioxid wird aus dem Körper freigesetzt. Dieses Phänomen findet in der kleinsten funktionellen Einheit der Lunge statt: der Blut-Luft-Schranke [1]. Sie besteht aus einer ultradünnen Membran, an der Epithel- und Endothelzellen befestigt sind [2]. Diese Komponenten werden durch die Atembewegung ständig einer dreidimensionalen Verformung unterworfen. Der Grad der linearen Dehnung während der normalen Atmung in den Lungenbläschen schwankt im Schnitt zwischen vier und zwölf Prozent [3]. Aufgrund ihrer Struktur, ihrer komplexen zellulären Zusammensetzung und ihrer dynamischen Mikroumgebung lässt sich die Lunge *in vitro* nur schwer nachbilden. Denn eine realistische Nachbildung muss Atembewegungen, den Gasaustausch an der ultradünnen Blut-Luft-Schranke sowie die extrazelluläre Matrix (ECM), an der die Zellen befestigt sind, beinhalten.

In den letzten Jahrzehnten wurde in mehreren Berichten auf die mangelnde Effizienz der Arzneimittelforschung und die damit verbundenen höheren Kosten hingewiesen [4]. Eine der größten Herausforderungen ist die Extrapolation von Stoffwechselfdaten aus *in vitro*- und Tiersystemen auf den Menschen [5]. Zellkulturmodelle und Tiermodelle haben demnach klare Limitierungen, da sie die Wirkung neuer Arzneimittel auf den Menschen nicht genau voraussagen. Einerseits können *in vitro*-Standardmodelle die komplexe Architektur und einige der Schlüsselemente menschlicher Organe nicht reproduzieren. Andererseits gelten Tiermodelle aufgrund der Unterschiede zwischen den Spezies als unvollkommener Ersatz für menschliche Modelle, was sich in der schlechten Übertragbarkeit von Medikamentenwirkungen bei Nagetieren auf die Lunge des Menschen gezeigt hat [6, 7]. Außerdem sind sie zeitaufwändig, teuer und ethisch fragwürdig. So werden etwa vermehrt Stimmen laut, die alternative Forschungsmethoden fordern. Daher besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung relevanter Modelle, um die der Pathogenese von Lungenkrankheiten zugrunde liegenden Schlüsselmechanismen zu



▲ **Abb. 1:** Herstellung der Kollagen-Elastin-Membran für die Lunge-auf-Chip der zweiten Generation. **A**, Auf ein dünnes Goldnetz mit hexagonalen Poren von etwa 260 µm wird ein Tropfen Kollagen-Elastin-Lösung pipettiert und **B**, bildet dort durch die Oberflächenspannung eine dünne Membran, **C**, die durch Unterdruck gedehnt werden kann. **D**, Humane Lungen-Alveolarepithelzellen können darauf zusammen mit Endothelzellen ko-kultiviert und **E**, gedehnt werden. Aus: Zamprogno P et al., *Common Biol* (2021) 4:168, [13].

untersuchen und potenzielle therapeutische Ziele zu identifizieren, die später in personalisierte Therapieansätze einfließen können.

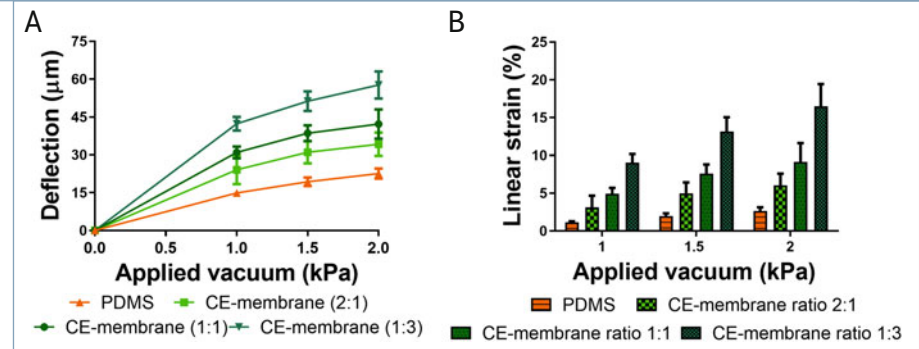
Lungen-auf-Chip als hochkomplexe *in vitro*-Simulationen der Lunge

Ein seit einer Dekade praktizierter Ansatz ist die Lunge-auf-Chip [8, 9, 10]. Diese komplexen *in vitro*-Modelle werden insbesondere im Bereich der pharmakologischen Forschung zur Entdeckung neuer Wirkstoffe eingesetzt [11, 12]. Die erste Generation solcher Lungen-auf-Chip wurde mit einer dünnen, polymeren und porösen Membran entwickelt. Ein früher, aus Bern stammender Ansatz, war hier ein Lunge-auf-Chip-Array, das die Umgebung des Lungenparenchyms einschließlich Alveolarbarriere und der dreidimensionalen zyklischen Belastung durch Atembewegungen nachahmte [9, 10]. Das Mikro-Diaphragma zur Dehnung der Alveolarbarriere wurde dabei dem Zwerchfell nachempfunden, welches die Inspiration verantwortet. Das Design sollte dabei die *in vivo*-Bedingungen im Lungenparenchym bestmöglich reproduzieren.

Doch mit diesem Schritt waren die Möglichkeiten einer naturalistischen Lunge-auf-Chip noch nicht ausgereizt. Denn um die Wirkstoffforschung effizient zu unterstützen und eine viable Alternative zu bisherigen Forschungsmodellen zu sein, müssen Organs-auf-Chip möglichst nah an die *in vivo*-Verhältnisse herankommen. Daher folgte sechs Jahre später die Entwicklung einer Lunge-auf-Chip der zweiten Generation durch das ARTORG OOC-Labor. Dabei wird a) die polymere (PDMS) Membran durch eine rein biologische Membran aus Proteinen der extrazellulären Lungenmatrix ersetzt, b) ein Gefüge mehrerer Alveolen in realistischen Dimensionen erzeugt, anstelle einer bisher einzelnen großen Oberfläche, welche lediglich eine Alveole nachahmt, sowie c) eine Membran erzeugt, die sich der natürlichen Oberflächenspannung bedient und daher einfach herzustellen ist [13].

Eine biologisch abbaubare Blut-Luft-Schranke in Lebensgröße

Die Lungenbläschen, die wabenförmig auf dem Chip angeordnet sind, haben etwa lebensgroße Dimensionen. Das System besteht aus einer dünnen, dehnbaren Membran, die erstmals aus natürlichen Lungenmolekülen – Kollagen und Elastin – hergestellt ist. Die Auswahl dieser beiden Proteine erfolgte aufgrund ihrer komplementären Rolle für das biomechanische Verhalten von



▲ **Abb. 2:** Eigenschaften von CE-Membranen. **A**, Durchbiegung von CE-Membranen und **B**, die entsprechende lineare Dehnung bei verschiedenen Zusammensetzungen in Abhängigkeit von einem angelegten Vakuum ($n=6$ für CE-Membran 1:1 und 2:1 und $n=4$ für CE-Membran 1:3). Eine $10\ \mu\text{m}$ dünne Polydimethylsiloxan (PDMS)-Membran diente als Referenz ($n=6$). Aus: Zamprogno P et al., *Common Biol* (2021) 4:168, [13].

gesundem Lungengewebe. Die stabile Membran ermöglicht das Simulieren von Atembewegungen durch mechanisches Dehnen der Zellen über einen längeren Zeitraum.

Die Herstellung (**Abb. 1**) der Lunge-auf-Chip der zweiten Generation ist weniger aufwändig als die von Vorgängermodellen und erfolgt in drei Schritten: Zunächst wird auf ein dünnes Goldnetz aus hexagonalen Poren von etwa $260\ \mu\text{m}$ ein Tropfen Kollagen-Elastin-Lösung pipettiert, welche dort durch die Oberflächenspannung eine dünne Membran bildet. Im zweiten Schritt kann diese Membran auf Alveolarebene gedehnt werden, indem ein negativer Druck auf die basolaterale Seite der Membran ausgeübt wird. Schließlich ist es möglich, primäre humane Lungen-Alveolarepithelzellen vom Typ I (ATI) und Typ II (ATII) in Ko-Kultur mit Lungenendothelzellen auf der dünnen Kollagen-Elastin-Membran zu kultivieren, welche die Blut-Luft-Schranke nachbilden [13].

Die erhaltene Membran ist dünn, porös, flexibel und biologisch abbaubar. Sie kann über mehrere Monate sowohl in trockenem als auch in feuchtem Zustand aufrechterhalten werden, was eine langfristige Zellkultur ermöglicht. Darüber hinaus können ihre mechanischen Eigenschaften durch Änderung der Zusammensetzung oder des Herstellungsverfahrens leicht angepasst werden [14]. Wird die Kollagenkonzentration verringert, wird die Membran weicher, was zu einer größeren Durchbiegung und damit zu größeren linearen Dehnungen führt (**Abb. 2**). Die Membran übertrifft PDMS (die Lunge-auf-Chip der ersten Generation) in vielerlei Hinsicht: Sie absorbiert kein Rhodamin-B, ist biologisch abbaubar, ahmt die extrazelluläre Matrix der Lunge nach und lässt sich mit einer einfachen Methode herstellen.

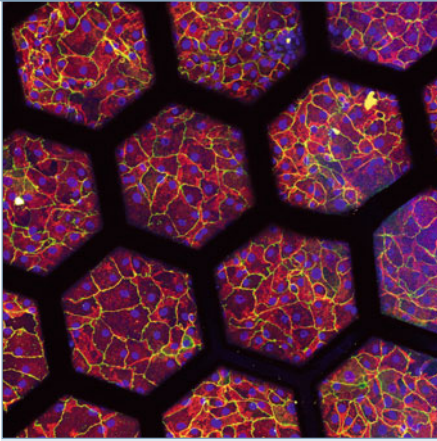
In einem Studienaufbau [13] wurde die Blut-Luft-Schranke mit primären Lungen-Alveolarepithelzellen von Patientinnen und

Patienten und primären Lungenendothelzellen rekonstruiert. Primäre Zellen bieten im Vergleich zu Zelllinien eine Reihe von Vorteilen, darunter einen Phänotyp, der dem ursprünglichen Gewebe nahekommt, die Fähigkeit zur Differenzierung in ein *in vivo*-ähnliches Gewebe und eine größere Spendervielfalt, die die natürliche Vielfalt der menschlichen Bevölkerung widerspiegelt. Die Epithelzellen konnten am Leben erhalten werden und bildeten mehrere Tage lang eine dichte Barriere an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, während sie von dem auf der basolateralen Seite der Membran befindlichen Medium genährt wurden (**Abb. 3**). Dieser Befund zeigt, dass die biologische Membran für Zellnährstoffe porös ist. Es wurden typische Marker für Alveolarepithelzellen beobachtet, während die Barriereigenschaften bis zu drei Wochen lang erhalten blieben.

Besiedlung mit menschlichen Zellen bahnt Weg für personalisierte Medizin

Die weiterentwickelte biologische Lunge-auf-Chip der zweiten Generation (**Abb. 3**) reproduziert einige wichtige Merkmale der Lungenalveole in Bezug auf Struktur (Anordnung der Lungenbläschen und Faserstruktur), extrazelluläre Matrixzusammensetzung, Barrierefunktionen und dynamische Mikroumgebung. Sie ermöglicht die Nachbildung einer Blut-Luft-Schranke, ohne eine künstliche Schicht zwischen den Epithel- und den Endothelzellen – ein wichtiger Aspekt zur Untersuchung veränderter Blut-Luft-Schranke bei Lungenerkrankungen wie der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) oder der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD).

Die Membran reproduziert wichtige Aspekte der extrazellulären Lungenmatrix, also dem Gewebeanteil, der zwischen den Zellen liegt, und eröffnet den Weg zur Nach-



▲ **Abb. 3:** Eingefärbte primäre Lungen-Alveolarepithelzellen von Patienten, die auf einer Lunge-auf-Chip der zweiten Generation kultiviert wurden. Skala: hexagonale Poren: ca. 260 µm. Aus: Zamprogno P et al., *Common Biol* (2021) 4:168, [13].

bildung biologischer Barrieren auf einem neuen Komplexitätsniveau. Neben der Blut-Luft-Schranke kann die Membran verschiedene *in vitro*-Barrieren nachbilden. Die Modifizierung der MembranstEIFheit durch Abstimmung der Hydrogelzusammensetzung, der Proteinkonzentration und des Herstellungsverfahrens ermöglicht es, die mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix einer Vielzahl von Geweben zu reproduzieren.

Durch die Besiedlung der Lunge-auf-Chip der zweiten Generation mit primären Alveolarepithelzellen von Patienten eröffnen sich zudem neue Möglichkeiten der personalisierten Medizin. Das System kann sowohl gesunde Lungenbläschenzellen als auch Zellen von Erkrankten kultivieren und erlaubt es, diese in ihrer natürlichen Umgebung zu studieren. Dies trägt zu einem klinisch verbesserten Verständnis der Lungenphysiologie im Gesundheits- sowie im Krankheitszustand bei. Zudem kann das biologische Modell ein wertvolles Werkzeug für das Screening neuer Wirkstoffe im Sinne einer Präzisionsmedizin werden, da hier direkt die Reaktion der menschlichen Lunge auf Pathologien und Therapieansätze erforscht werden kann. Langfristig haben solche Ansätze das Potenzial, Tierversuche in der pneumologischen Grundlagen- und Translationsforschung zu reduzieren. Gleichzeitig bieten sie patientenrelevantere Ergebnisse in der Wirkstoffforschung, mit der Möglichkeit, diese sogar für einzelne Patientinnen und Patienten maßzuschneidern, also genau die Therapie zu identifizieren, die diesem Patienten am besten hilft.

Danksagung

Die Entwicklung eines naturgetreuen *in vitro*-Lungenmodells ist nur durch enge interdis-

Organs-on-Chip Technologies Lab

Die spezialisierte Gruppe des ARTORG Center for Biomedical Engineering Research der Universität Bern entwickelt in Zusammenarbeit mit den Universitätskliniken für Pneumologie und Thoraxchirurgie des Inselspitals Organe-auf-Chip mit dem Schwerpunkt Lunge und deren Erkrankungen. Die Gruppe kombiniert Ingenieurwissenschaften, Zellbiologie, Materialwissenschaften und Medizin. Ihre erste Entwicklung einer atmenden Lunge-auf-Chip wird in Zusam-

menarbeit mit dem Start-up AlveoliX weiterentwickelt, mit dem Ziel, die präklinische Forschung zu revolutionieren. Die zweite Generation wird im Rahmen eines vom 3RCC Kompetenzzentrum Schweiz geförderten Forschungsprojekts fortentwickelt, um den fibrotischen Prozess bei idiopathischer Lungenfibrose besser zu verstehen und potenzielle Wirkstoffkandidaten zur therapeutischen Eindämmung der Erkrankung zu testen.

ziplinären Forschungsarbeit zwischen Medizintechnik, Zellbiologie und Medizin möglich. Das ARTORG Center dankt seinen klinischen Partnern am Inselspital, Universitäts-spital Bern sowie dem Helmholtz-Zentrum (Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, HIPS) und dem Herzzentrum Völklingen.

Literatur

- [1] Knudsen L, Ochs M (2018) The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem. Cell Biol* 150: 661–676
- [2] Weibel ER (2015) On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung. *Am J Respir Crit Care Med* 191: 504–513
- [3] Roan E, Waters CM (2011) What do we know about mechanical strain in lung alveoli? *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 301: 625–635
- [4] Scannell JW, Blanckley A, Boldon H, Warrington B (2012) Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat Publ Gr* 11: 191–200
- [5] Barnes PJ, Bonini S, Seeger W et al. (2012) Barriers to new drug development in respiratory diseases. *Eur Respir J* 45: 1197–1207
- [6] Pound P, Ritskes-Hoitinga M (2018) Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med* 16: 304
- [7] Carrington R, Jordan S, Pitchford SC, Page CP (2018) Use of animal models in IPF research. *Pulm Pharmacol Ther* 51: 73–78
- [8] Huh D, Matthews BD, Mammoto A et al. (2010) Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328: 1662–1668
- [9] Stucki AO, Stucki JD, Hall SRR et al. (2015) A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab Chip* 15: 1302–1310

- [10] Stucki JD, Hobi N, Galimov A et al. (2018) Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model. *Sci Rep* 8: 1–13
- [11] Clapp N, Amour A, Rowan WC, Candarlioglu PL (2021) Organ-on-chip applications in drug discovery: an end user perspective. *Biochemical Society Transactions* 49: 1881–1890
- [12] Vulto P, Joore J (2021) Adoption of organ-on-chip platforms by the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov* 20: 961–962
- [13] Zamprogno P, Wüthrich S, Achenbach S et al. (2021) Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Commun Biol* 4: 168
- [14] Zamprogno P, Thoma G, Cencen V et al. (2021) Mechanical properties of soft biological membranes for organ-on-a-chip assessed by bulge test and AFM. *ACS Biomater Sci Eng* 7: 2990–2997

Funding note: Open Access funding enabled and organized by University of Bern.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Olivier Guenat
Leiter Organs-on-Chip Technologies (OOC)
ARTORG Center for Biomedical Engineering
Research
Universität Bern
Murtenstraße 50
CH-3008 Bern
olivier.guenat@unibe.ch
www.artorg.unibe.ch/research/ooc/research/lung_on_chip
www.alveolix.com

AUTORINNEN UND AUTOREN



Olivier T. Guenat

1994–2000 Studium Elektrotechnik und Physik am Institut für Mikrotechnik (heute Teil EPFL), Universität Neuchâtel, Schweiz inkl. Doktorat. 2005–2006 Postdoktorat Harvard Medical School, MA, USA. 2006–2009 Assistant Professor Ecole Polytechnique Montréal, Kanada. Seit 2015 Professor an der Universität Bern. Seit 2010 Leiter der Forschungsgruppe Organs-on-Chip Technologies (OOC) des ARTORG Center. 2015 Gründung des Start-Ups AlveoliX.



Pauline Zamprogno

Biomedizinische Ingenieurin mit Abschluss an der Telecom Physique Strasbourg, Frankreich. Mitarbeiterin bei MIMETAS und ab 2016 bei der OOC-Gruppe des ARTORG Center. Seit 2016 Forschung im OOC-Labor zu hochentwickelten *in vitro*-Modellen zur Nachahmung der menschlichen Lunge und ihrer Funktionen. 2021 Promotion zur Lunge-auf-Chip der zweiten Generation des ARTORG Center.