Universiteit Leiden
The Netherlands

Microfluidic 3D cell culture for high throughput screening

Trietsch, S.J.

Citation
Trietsch, S. J. (2017, December 18). *Microfluidic 3D cell culture for high throughput screening*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/57795

Version:	Not Applicable (or Unknown)
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/57795

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page

Universiteit Leiden

Leiden University Repository

The handle http://hdl.handle.net/1887/57795 holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Trietsch S.J.
Title: Microfluidic 3D cell culture for high throughput screening
Date: 2017-12-18

Addendum

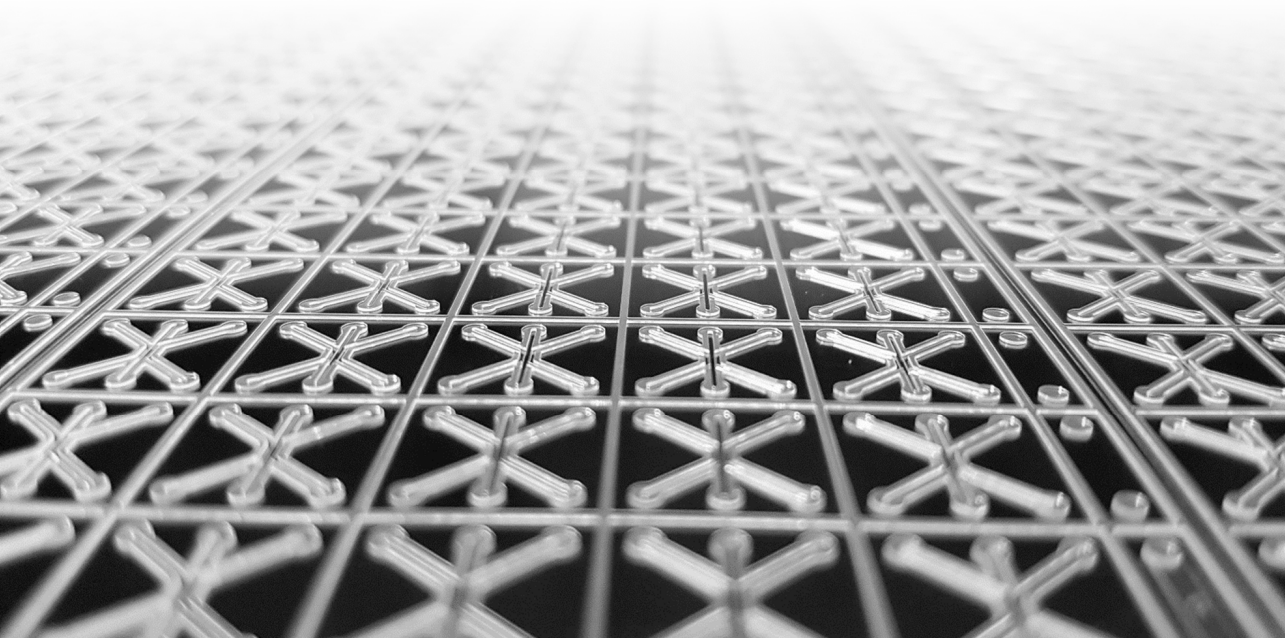
Summary

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitea

List of publications

Acknowledgements



Summary

In **Chapter 1**, the general introduction, an overview is given of the current drug delivery pipeline and the huge associated developmental cost per drug that reaches the market. The main method to reduce these costs is seen in better selection of drug candidates is early phases of the development, by using more physiologically relevant cell culture models.

Cells cultured in 3D have been recognized to more closely resemble the physiological situation, but widespread adoption in drug discovery is lacking due to limited compatibility and limited recapitulation of complex tissue aspects such as complex co-culture and perfusion.

The field of microfluidics offers tools to control liquid flows and patterns and is applied in the Organ-on-a-Chip field to build complex tissue models with tightly controlled microenvironments. An overview of the state of this field shows a focus on highly advances, but often complex and low throughput models systems.

The scope of the thesis is to develop a microfluidic platform that enables enhanced physiology in cell culture models including 3D cell culture, co-culture and perfusion flow, whilst maintaining throughput, compatibility and usability by end-users.

In **Chapter 2**, a review is performed of the state of the art in lab-on-a-chip (LOC) technology. The review is written to introduce the field of LOC to scientists from different disciplines, but was also used by the authors to understand the focus of the field and decide what technologies could be used to benefit the platform envisioned in this thesis.

Lab-on-a-chip (LOC) technology focusses on improving experimentation and analysis in the life sciences through miniaturization. The developments in the field have led to significant increases in analysis throughput, more than billion-fold sample volume reductions and increased separation efficiency. Despite this, the existence and the implications of LOCs are not widely known outside its community.

Some of the most important LOCs, their physical operating principles and the unique benefits that can be gained through miniaturization are discussed, and the chapter is concluded by a discussion of the potential of LOCs for massive parallel data generation and the life sciences.

After observing the focus of the LOC field it was realized that a platform needed to be developed that allowed for preprogrammed, stand-alone, easy operation. **Chapter 3** describes the development of the phaseguiding principle into a microfluidic passive valving platform with full control of the stability of each valve. Phaseguides, which are small ridges at the bottom of a channel acting as pinning barriers are used as burst valves with predetermined stability. The angle between the wall and a phaseguide is shown to determine its stability and this relationship is characterized numerically, analytically and experimentally. It is demonstrated that liquid routing can be performed by using multiple phaseguide with different stability values. Controlled filling of complex matrices of chambers is demonstrated leading up to the use of a 400-chamber network as a pixel array. The use of this elegant method for liquid routing shows its potential for implementation in microfluidic devices for the life sciences.

In **chapter 4**, the technology refined in chapter 3 is implemented for 3D cell culture. A stratified 3D cell culture platform, the OrganoPlate, is proposed that uses phaseguides to better recapitulate heterogeneity of human tissues and organs. Adjacent lanes of gels and liquids are patterned by phaseguides to capture the inherent heterogeneity of human tissues and organs. Membrane free stratification of 3D cell (co-)cultures under perfusion is used to mimic the interplay between different cell types in tissues, their secondary tissue architecture, vascular system and gradients of signaling molecules and metabolites. 3D cell culture of HepG2 hepatocytes under continuous perfusion is demonstrated as well as a rifampicin toxicity assay and co-culture with fibroblasts. 4T1 breast cancer cells are used to demonstrate invasion and aggregation models. The incorporation of the platform in a microtiter plate format ensures compatibility with automation and high-content screening equipment. The combination of functionality, ease of use and compatibility enable widespread adoption of this platform in academia as well as a screening setting.

Where chapter 4 focusses on embedded 3D cell culture, **chapter 5** extends the use of the OrganoPlate to perfused tubules. Perfused extracellular matrix-supported intestinal tubules, exhibiting tissue polarization and transporter expression are demonstrated. Forty leak tight tubules are cultured in parallel on a single plate and their response to pharmacological stimuli is recorded over 125 hours using automated imaging techniques. A study comprising 357 gut tubes is performed of which 93% are leak tight before exposure. EC50-time curves are extracted that provide insight in both concentration and exposure time response. The study in this chapter represents the largest organ-on-a-chip dataset known to the authors, demonstrating it scalability both in biological applications and in throughput.

In **Chapter 6**, the adoption of the developed platform for a wide range of applications is described. A brief overview of the research efforts in the field of organs-on-chips is provided showing a focus on impressively complex, but low throughput model systems. The applicability of a platform with more focus on ease of use, compatibility and throughput is demonstrated with examples of models developed on the OrganoPlate by different researchers. Models are described for a range of tissues or diseases including liver, neurons, cancer, endothelium, and kidney. Complex models including the use of organoids, and co-culture is described as well as the possibilities for developing complex assays and implementation of automation. Its wide adoption for across different tissue models as well as different users is possibly the most valid proof of the utility of the system.

In **Chapter 7**, the conclusion and outlook of the thesis, the initial design criteria of the platform are described to include both biological and usability aspects. The biological aspects focus on ECM embedded 3D co-culture, including perfused tubules, while the usability aspects focus on throughput, ease of use and compatibility. Throughout the thesis, these design criteria have been heeded, yielding a platform that is widely used and is on its way to become an industry standard in preclinical drug development.

Nederlandse Samenvatting

In **hoofdstuk 1**, de algemene introductie, wordt een overzicht gegeven van de huidige drug delivery pipeline en de enorme bijbehorende ontwikkelingskosten per geneesmiddel dat op de markt komt. Een van de meest veelbelovende manieren om deze kosten te verlagen, is een betere selectie van kandidaat-geneesmiddelen in vroege fase van de ontwikkeling, door meer fysiologisch relevante weefselkweek modellen te gebruiken.

Het is bekent dat 3D gekweekte weefsel meer representatief zijn voor de fysiologische situatie. Toch worden deze modellen niet veel gebruikt vanwege beperkte compatibiliteit met andere technieken en het deels ontbreken van complexe weefselaspecten zoals complexe co-cultuur en perfusie.

Het veld van de microfluidica biedt precieze controle over hoe vloeistoffen zich in chips gedragen. Dit wordt toegepast in zogenaamde Organs-on-Chips om complexe weefselmodellen met onder strak gedefinieerde omstandigheden te bouwen. Een overzicht van de status van dit veld toont een focus op zeer geavanceerde, maar vaak complexe systemen met een lage doorvoersnelheid.

Het doel van het proefschrift is om een microfluïdisch platform te ontwikkelen dat verbeterde fysiologie mogelijk maakt in weefselmodellen, inclusief 3D-celkweek, co-kweek en perfusie, terwijl de doorvoer, compatibiliteit en bruikbaarheid door eindgebruikers behouden blijven.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de nieuwste technieken in lab-on-a-chip (LOC) technologie. De review is geschreven om het veld van LOC te introduceren bij wetenschappers uit verschillende disciplines. Tegelijkertijd hebben de auteurs de focus van het veld bekeken om te zien welke technieken er toepasbaar zouden zijn in het beoogde 3D kweek platform.

Lab-on-a-chip technologie richt zich op het verbeteren van experimenten en analyses in de levenswetenschappen door middel van miniaturisatie. Ontwikkelingen in dit veld hebben geleid tot een aanzienlijke toename van de analyse-doorvoer, meer dan een miljardvoudige vermindering van benodigde monstervolumes en een verhoogde scheidingsefficiëntie. Desondanks krijgt het veld en zijn toepassingen weinig aandacht buiten de gemeenschap. Enkele van de belangrijkste labs-on-chips, hun werkingsprincipes en de voordelen die kunnen worden behaald via miniaturisatie worden besproken.

Het hoofdstuk wordt afgesloten met een bespreking van de potentie van LOC's voor het parallel genereren van grote hoeveelheden data en toepassingen voor de levenswetenschappen.

Na het observeren van de focus van het LOC-veld, werd het duidelijk dat er een platform moest worden ontwikkeld met de focus op bruikbaarheid door daadwerkelijke eindgebruikers.

Hoofdstuk 3 beschrijft de verdere ontwikkeling van phaseguides tot een platform waarin ze als voorgeprogrammeerde kleppen worden gebruikt om vloeistoffen te sturen. Phaseguides zijn ribbels op de bodem van een microfluidisch kanaal. Doormiddel van oppervlaktespannen kunnen ribbels vloeistoffen tegen houden. Het wordt aangetoond dat de hoek tussen de wand van het kanaal en de phaseguide de stabiliteit van de phaseguide bepaald. Deze relatie wordt numeriek, analytisch en experimenteel gekarakteriseerd.

Er wordt aangetoond dat het vulpatroon van een microfluidisch gestuurd kan worden met behulp van meerdere faseguide met verschillende stabiliteitswaarden. Een complexe matrix van kamers worden gecontroleerd gevuld. De ultieme demonstratie van de controle over het vulgedrag is het gebruik van een netwerk van 400 kamers als een pixel array.

Het gebruik van deze elegante methode om vloeistofstromen te sturen toont zijn potentieel voor implementatie in microfluïdische apparaten voor de levenswetenschappen.

In **hoofdstuk 4** wordt deze techniek geïmplementeerd voor 3D-celkweek in de OrganoPlate. In dit gelaagde 3D-celkweekplatform wordt gedemonstreerd dat met behulp van phaseguides de heterogeniteit van menselijke weefsels en organen beter na te bootsen valt. Met behulp van phaseguides worden laantjes van gels en vloeistoffen naast elkaar gepatroneerd om de inherente heterogeniteit van menselijke weefsels en organen te weerspiegelen. Op deze manier kunnen de aangrenzende laantjes zonder tussenliggende membranen met elkaar in verbinding staan en geperfundeerd worden.

HepG2-hepatocyten worden onder continue perfusie in 3D gekweekt. Een toxiciteitstest wordt gedemonstreerd aan de hand van rifampicine en co-kweek mogelijkheden in combinatie met fibroblasten. 4T1 borstkankercellen worden gebruikt om invasie- en aggregatiemodellen te demonstreren.

De integratie van het platform in het formaat van een standaard microtiterplaat zorgt voor compatibiliteit met automatisering en screeningapparatuur. De combinatie van functionaliteit, gebruiksgemak en compatibiliteit maakt wijdverspreide acceptatie van dit platform in de academische wereld en een screeningomgeving mogelijk.

Waar hoofdstuk 4 focust op ingebedde 3D-celculturen, breidt **hoofdstuk 5** het gebruik van de OrganoPlate uit naar geperfundeerde buizen. Extracellulaire matrix-ondersteunde darmbuisjes onder perfusie resulteert en gepolariseerde weefsels met de correcte transporter expressie.

Op een plaat kunnen tegelijkertijd veertig lekdichte buizen worden gekweekt. Gedurende 125 uur wordt hun respons op farmacologische stimuli geregistreerd met behulp van een geautomatiseerde microscoop. In dit experiment worden 357 buizen gekweekt waarvan 93% lekdicht was bij aanvang. Door te meten over de tijd kan er een curve worden gebouwd van de verandering van de EC50 door de tijd. Dit geeft in een keer inzicht in het effect van doses als blootstellingsduur.

Voor zover bekent bij de auteurs is dit de grootste gepubliceerde organ-on-a-chip dataset. Dit toont de schaalbaarheid in zowel de biologische toepassingen als in de doorvoer.

In **hoofdstuk 6** wordt de invoering van het ontwikkelde platform voor een breed scala van toepassingen beschreven. Een kort overzicht van de lopende onderzoeken op het gebied van organs-on-chips toont een focus op modellen met een indrukwekkende complexiteit, maar dit gaat vaak ten koste van de doorvoer en bruikbaarheid.

De potentie van een platform met meer focus op gebruiksgemak, compatibiliteit en verwerkingscapaciteit wordt aangetoond aan de hand van voorbeelden van modellen die door verschillende onderzoekers op de OrganoPlate zijn ontwikkeld.

Er wordt een overzicht gegeven van verschillende weefsels die op de OrganoPlate zijn gemodelleerd, waaronder lever, neuronen, kanker, endotheel en nier. Complexe modellen zoals het gebruik van organoïden en co-cultuur worden beschreven, evenals de mogelijkheden voor het ontwikkelen van complexe assays en implementatie van automatisering.

De brede acceptatie van dit systeem voor verschillende weefselmodellen door verschillende gebruikers is mogelijk het sterkste bewijs van het nut ervan.

In **Hoofdstuk 7**, de conclusie van het proefschrift, wordt beschreven dat de initiële ontwerpcriteria van het platform zowel biologische als bruikbaarheidaspecten omvatte. De biologische aspecten waren gericht op ECM-ondersteunde 3D-co-kweek, inclusief geperfundeerde buizen, terwijl de bruikbaarheidsaspecten zich richtten op doorvoer, gebruiksgemak en compatibiliteit. Gedurende het proefschrift zijn deze ontwerpcriteria opgevolgd, wat een platform heeft oplevert dat op grote schaal wordt gebruikt en op weg is om een industriestandaard te worden in de preklinische ontwikkeling van geneesmiddelen.

Curriculum Vitae

Sebastiaan Johannes Trietsch werd geboren op 9 augustus 1985 in Den Haag. In 2003 behaalde hij zijn VWO diploma op Dalton Den Haag, waarna hij zijn studie Biofarmaceutische wetenschappen in Leiden begon. Tijdens zijn studie was hij voorzitter van de L.P.S.V. „Aesculapius”. Voor zijn masterscriptie heeft hij 6 maanden onderzoek gedaan naar de invloeden van elektrostatische lading op de dosering van inhalatiemedicijnen aan de Faculty of Pharamcy van de University of Sydney. Na het afronden van zijn master is hij zijn promotieonderzoek bij prof. Dr. Thomas Hankemeier begonnen aan de divisie Analytical Biosciences van het Leiden Academic Center for Drug Research. Als onderdeel van het Netherlands Metabolomics Center heeft hij hier meerder microfabricage processen opgezet, waarvan een deel toegepast is in dit proefschrift. Het onderzoek dat hier is uitgevoerd in samenwerking met Paul Vulto heeft geleid tot de ontwikkeling van de OrganoPlate. Op basis van dit platform heeft hij samen met Paul Vulto, Jos Joore, Thomas Hankemeier en Herbert Heineker het bedrijf Mimetas opgericht. Mimetas is in korte tijd uitgegroeid tot een bloeiend bedrijf en hij is hier tot op heden werkzaam als head of research.

List of publications

In this thesis

Trietsch, S. J., Hankemeier, T., Van der Linden, H. J. Lab-on-a-chip technologies for massive parallel data generation in the life sciences: A review. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 108, 64–75 (2011).

Yildirim, E.*, **Trietsch, S. J.***, Joore, J., van den Berg, A., Hankemeier, T., Vulto, P. Phaseguides as tunable passive microvalves for liquid routing in complex microfluidic networks. *Lab Chip* 14, 3334–40 (2014).

Trietsch, S. J., Israëls, G. D., Joore, J., Hankemeier, T., Vulto, P. Microfluidic titer plate for stratified 3D cell culture. *Lab Chip* 13, 3548–54 (2013).

Trietsch, S. J., Naumovska, E., Kurek,D., Setyawati, M.C., Vormann, M.K., Wilschut, K.J., Lanz, H.L., Nicholas, A, Ng, C.P., Joore, J., Kustermann, S., Roth, A., Hankemeier, T, Moisan,A.*, Vulto,P.* Membrane-free culture and real-time barrier integrity assessment of perfused intestinal epithelium tubes, *Nature Communications* 262 (2017)

Other publications

Kwok, P. C. L., **Trietsch, S. J.**, Kumon, M., Chan, H.-K. Electrostatic charge characteristics of jet nebulized aerosols. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 23, 149–159 (2010).

Quist, J., **Trietsch, S. J.**, Vulto, P., Hankemeier, T. Elastomeric microvalves as tunable nanochannels for concentration polarization. *Lab Chip* 13, 4810–4815 (2013).

van der Maaden, K.*, **Trietsch, S. J.***, Kraan, H., Varypataki, E. M., Romeijn, S., Zwier, R., van der Linden, H. J., Kersten, G., Hankemeier, T., Jiskoot, W. Novel hollow microneedle technology for depth-controlled microinjection-mediated dermal vaccination: a study with polio vaccine in rats. *Pharm. Res.* 31, 1846 (2014).

Phurimsak, C., Yildirim, E., Tarn, M. D., **Trietsch, S. J.**, Hankemeier, T., Pamme, N., Vulto, P. Phaseguide assisted liquid lamination for magnetic particle-based assays. *Lab Chip* 14, 2334–2343 (2014).

Moreno, E. L., Hachi, S., Hemmer, K., **Trietsch, S. J.**, Baumuratov, A. S., Hankemeier, T., Vulto, P., Schwamborn, J. C., Fleming, R. M. T. Differentiation of neuroepithelial stem cells into functional dopaminergic neurons in 3D microfluidic cell culture. *Lab Chip* 15, 2419–28 (2015).

van Duinen, V., **Trietsch, S. J.**, Joore, J., Vulto, P., Hankemeier, T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr. Opin. Biotechnol.* 35, 118–126 (2015).

Wevers, N. R., van Vught, R., Wilschut, K. J., Nicolas, A., Chiang, C., Lanz, H. L., **Trietsch, S. J.**, Joore, J., Vulto, P. High-throughput compound evaluation on 3D networks of neurons and glia in a microfluidic platform. *Sci. Rep*. 6, 38856 (2016).

Lanz H. L., Saleh A., Kramer B., Cairns J., Ng C. P., Yu J,**Trietsch S. J.**, Hankemeier T., Joore J., Vulto P., Weinshilboum R., Wang L. Therapy response testing of breast cancer in a 3D high-throughput perfused microfluidic platform. *BMC Cancer* 17, 709 (2017)

*authors contributed equally

Patents

Vulto, P., **Trietsch, S.J.**, Arnaud, N., Michel, Y., Apparatus for inducing microfluidic flow (2017)

Vulto, P., **Trietsch, S.J.**, Lanz, H.L., Vormann, M.K. barrier function measurements (2017)

Vulto, P., **Trietsch, S.J.**, Yilderim, E. Improvements relating to capillary pressure barriers, (2015)

Vulto, P., **Trietsch, S.J.**, Microfluidic plate (2016)

Vulto, P., **Trietsch, S.J.**, Yilderim, E. Fluid Triggerable Valves (2015)

Vulto, P., **Trietsch, S.J.**, van der Linden, H.J., Joore, A.J., Hankemeier, T. Apparatuses for and methods of processing cells and related structures (2014)

van der Maaden, K., **Trietsch, S.J.**, van der Linden, H.J., Bouwstra, J.A., Hankemeier, H. Process and device for minimally invasive deep tissue probing (2014)

Trietsch, S.J., Quist, J., Vulto, P., Hankemeier, T. Method and apparatus for processing a liquid (2014)

Acknowledgements

I owe many people thanks for the completion of this thesis.

Thomas, for getting me back to Leiden and enabling everything there.

My colleagues and friends at ABS for setting a staged filled with science and good fun.

Collaborators in the early years, for chasing down many ideas, however farfetched.

Paul, for dropping by and changing the journey into the great adventure it has become.

The OrganoPlate early birds, for joining while we were still embryonic and nursing it into a great team.

The entire team at Mimetas, for taking this all the way and making it unforgettable.

Family and friends, old and new, who have made what is in this book possible, by keeping everything that is not in it interesting.

My paranymphs, for their support in the finale.

And, of course, Daphne.