



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Maskless photolithography for rapid Organ-on-a-Chip prototyping and microvascular engineering

Kasi, D.G.

Citation

Kasi, D. G. (2025, December 11). *Maskless photolithography for rapid Organ-on-a-Chip prototyping and microvascular engineering*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4285618>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4285618>

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

Nederlandse samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift draaide primair om de ontwikkeling en implementatie van eenvoudig uitvoerbare en interdisciplinaire biofabricatiemethoden, die de fabricatie van op menselijke stamcellen gebaseerde Organ-on-a-Chip (OoC) en andere typen (microvasculaire) *in vitro* modellen ondersteunen. Deze methoden zijn gebaseerd op een commercieel verkrijgbaar systeem voor ‘maskless’ fotolithografie (de Alvéole PRIMO) dat een ‘digital micromirror device’ gebruikt om UV-licht te moduleren en te projecteren. Het systeem is verbonden met een conventionele geïnverteerde microscoop en geautomatiseerd sample platform. De resulterende ‘benchtop’-opstelling kan via de microscopieoptiek willekeurige 2D-patronen met hoge resolutie projecteren (beter bekend als digitale fotomaskers). De methoden zoals in dit proefschrift gepresenteerd, maken het mogelijk om snel OoCs, microvasculaire modellen en cellulaire micropatronen te prototypen en te fabriceren die compatibel zijn met gedifferentieerde derivaten van menselijke geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs).

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 1**, wordt de behoefte aan dergelijke methoden veroorzaakt door translationele moeilijkheden in biomedisch onderzoek die verband houden met beperkingen van diermodellen, waaronder hun onvermogen om bepaalde aspecten van de menselijke fysiologie en anatomie vast te leggen, evenals het onvermogen om menselijke reacties op geneesmiddelen nauwkeurig te kunnen voorspellen. Bovendien zijn ethische bezwaren en regeldruk toegenomen, zodat er een voortdurende zoektocht is naar alternatieven voor diermodellen. Wanneer de fabricatiemethoden worden gecombineerd met van de patiënt afgeleide hiPSCs en genmodificatie, zijn het krachtige hulpmiddelen voor modelontwikkeling omdat ze een holistische benadering mogelijk maken voor OoC-prototyping, (vasculaire) ziektemodellering en geneesmiddelenontwikkeling.

In **Hoofdstuk 2** gebruikte ik het PRIMO systeem om een ‘cleanroom’-vrije workflow te ontwikkelen voor het snel prototypen van OoCs in standaard biochemielaboratoria. Deze aanpak kan worden gecombineerd met conventionele ‘photoresists’ en glazen microscopie dekglasjes en heeft een doorlooptijd van slechts één werkdag. Deze aanpak is geschikt voor eenvoudige ‘in-house’ fabricage van op polydimethylsiloxaan gebaseerde microfluidische chips, die compatibel zijn met celkweek (oftewel OoCs). Vervolgens heb ik deze aanpak in **Hoofdstuk 3** gebruikt om microfluidische chips te produceren die een centraal compartiment bevatten om hydrogel fabricage op de chip zelf uit te voeren. Samen stelde dit me in staat om een Vessel-on-Chip (VoC) te ontwikkelen die perfuseerbare menselijke microvasculatuur bevat, om compartimentering uit te voeren voor co-kweek en om geavanceerde functionele structuren, zoals microscopische kleppen, te fabriceren. De integrale aanpak van **Hoofdstukken 2 en 3** is daarom van toepassing op zowel het snel prototypen als de fabricage van OoCs en verschillende typen microvasculatuur.

Vervolgens heb ik het PRIMO systeem in **Hoofdstuk 4** gebruikt voor verschillende manieren van

‘photopatterning’ die de basis vormen voor een “referentievrije traction force microscopy” contractie assay. Deze assay kan in de toekomst gebruikt worden om de contractiliteit van cellen met een vooraf bepaalde en manipuleerbare morfologie te bestuderen. Zulke relatief eenvoudige *in vitro* modellen zijn compatibel met ‘high-throughput’ screening en zijn nuttig om reacties op geneesmiddelen en contractiele dysfunctie te bestuderen, zoals het geval is bij veel cardiovasculaire aandoeningen. De ontwikkelde ‘photopatterning’ methoden zijn daarnaast van toepassing op meerdere onderzoeksgebieden waar gecontroleerde plaatsing en morfologie van cellen is vereist.

In **Hoofdstuk 5** werden de eerste stappen gezet richting de ontwikkeling van een ziektemodel door hiPSCs te genereren en te karakteriseren van een patiënt die lijdt aan “retinale vasculopathie met cerebrale leukoencefalopathie en systemische manifestaties” (RVCL-S), een zeldzame autosomaal dominante kleine-vatenziekte, die wordt veroorzaakt door C-terminale truncerende mutaties in het *TREX1* gen. We hebben eerst een genetische correctie van de mutatie uitgevoerd om isogene gezonde controle hiPSCs te verkrijgen. Om de rol van endotheelcellen (ECs) bij deze ziekte te onderzoeken hebben we vervolgens ECs afgeleid van het isogene hiPSC paar. Ondanks het feit dat we over deze isogene paren beschikten, bleek het een uitdaging om een ziektefenotype of verschillen te vinden die overtuigend konden worden gemeten met behulp van 2D-assays. Dit illustreert één van de belangrijkste beperkingen van deze modellen op dit moment, namelijk wat de ideale omstandigheden zijn die ziektefenotypes kunnen onthullen. Verder onderzoek met behulp van complexere modellen is nodig om de verschillen tussen gezonde en RVCL-S ECs beter te begrijpen.

Tenslotte bespreek ik in **Hoofdstuk 6** de resultaten die in dit proefschrift worden gepresenteerd, de beperkingen, suggesties voor verbetering en een aantal toekomstperspectieven.