

Isabella Hebeiß

Etablierung eines mikrofluidischen
3D-Bioreaktors
zur Untersuchung des
transendothelialen Transports *in vitro*



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Etablierung eines mikrofluidischen 3D-Bioreaktors
zur Untersuchung des transendothelialen Transports *in vitro*





Etablierung eines mikrofluidischen 3D-Bioreaktors
zur Untersuchung des transendothelialen Transports *in vitro*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-LMChem. Isabella Hebeiß

aus Heilbronn

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: PD Dr. Ute Schepers

Korreferent: Prof. Dr. Manfred Metzler

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2012



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, 2012

Zugl.: Karlsruhe (KIT), Univ., Diss., 2012

978-3-95404-200-5

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2012

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, 2012

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-95404-200-5



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau PD Dr. Ute Schepers vom 15. September 2009 bis zum 06. Juni 2012 am Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Manfred Metzler danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruhe Institut für Technologie (KIT)/Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Isabella Hebeiß





MEINEN ELTERN

Die Freude und das Lächeln
sind der Sommer des Lebens.

JEAN PAUL

1763 – 1825, deutscher Schriftsteller





INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	5
2 EINLEITUNG	7
2.1 Vaskuläres System	9
2.1.1 Aufbau des Endothels	9
2.1.2 Aufgaben des Endothels.....	11
2.1.3 Reaktion von Endothelzellen auf Scherstress	12
2.2 Endotheliale Aufnahme und transendothelialer Transport	14
2.2.1 Barrierefunktion des Endothels	14
2.2.2 Endozytose	14
2.2.3 Vesikulärer Transport	15
2.3 ‚Drug Delivery‘ Systeme.....	16
2.3.1 Zell-penetrierende Peptide	16
2.3.2 Peptoide	17
2.4 Mikrofluidische Systeme	18
2.5 Mikrothermoformen und SMART-Technologie.....	19
3 ZIEL DER ARBEIT.....	23
4 ERGEBNISSE.....	25
4.1 Entwicklung der porösen Mikrokanäle.....	25
4.2 Entwicklung des 3D-Boyden Chamber Systems	25
4.3 Einsatz als 3D-Boyden Chamber	31
4.3.1 Folien-Beschichtung	31
4.3.2 Kultivierung von Endothelzellen im porösen Mikrokanal.....	33
4.3.3 Dichtigkeitstest des Endothels	34
4.3.4 Wachstum von Endothelzellen auf flacher vs. gekrümmter Oberfläche.....	35
4.3.5 Transport polykationischer Peptoide.....	36
4.4 Entwicklung des mikrofluidischen Bioreaktors	39
4.5 Test der Einsetzbarkeit des mikrofluidischen Bioreaktors	43
4.5.1 Mikrofluidischer Bioreaktor	43



4.5.2	Einbringen der Endothelzellen	43
4.5.3	Flow Visualization und Simulierung	44
4.5.4	Permeabilitätstest mit dem mikrofluidischen Bioreaktor.....	46
4.5.5	Verhalten von Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen	47
4.5.5.1	Ausrichtung der Endothelzellen in Flussrichtung	47
4.5.5.2	Stress Fiber Bildung.....	49
4.5.5.3	Stickstoffmonoxid-Produktion unter fluidischen Bedingungen	51
4.5.6	Überprüfung der Konfluenz des Endothellayers im porösen Mikrokanal	52
4.5.7	Monozyten Adhäsion und Transmigration	58
4.5.7.1	Monozyten Adhäsion	59
4.5.7.2	Monozyten Transmigration	65
4.5.7.3	Direkte Visualisierung der Transmigration von Monozyten.....	69
4.5.7.4	Ausblick: Erzeugung von Proteinmustern im Mikrokanal	73
4.5.8	Besiedelung der unteren Kammer	74
4.5.8.1	Wachstumskurven verschiedener Zelllinien.....	74
4.5.8.2	Ko-Kultur im mikrofluidischen Bioreaktor	76
4.6	Endotheliale Aufnahme und transendothelialer Transport von Peptoiden	77
4.6.1	Peptoide allgemein.....	77
4.6.2	Zytotoxizitätstest.....	77
4.6.3	Qualitative Bestimmung der Peptoidaufnahme unter statischen Bedingungen...	80
4.6.4	Quantitative Bestimmung der Peptoidaufnahme unter statischen Bedingungen	83
4.6.4.1	LC-MS/MS Methode	83
4.6.4.2	Externe Kalibrierung	83
4.6.4.3	Endotheliale Aufnahme polykationischer Peptoide	86
4.6.5	Zeitabhängigkeit der Peptoidaufnahme unter statischen Bedingungen.....	89
4.6.6	Zeitabhängigkeit der Peptoidaufnahme unter fluidischen Bedingungen.....	90
4.6.7	Einsatz des mikrofluidischen 3D-Bioreaktors.....	93
4.6.7.1	Endotheliale Aufnahme	93
4.6.7.2	Transendothelialer Transport	96



4.6.7.3	Ausblick: Liposomale ‚Drug Delivery‘ Systeme	99
4.6.8	Mechanismus der zellulären Aufnahme polykationischer Peptoide	101
5	DISKUSSION.....	109
6	EXPERIMENTELLER TEIL.....	118
6.1	Allgemeines	118
6.1.1	Verwendete Geräte	118
6.1.2	Verwendete Software	119
6.1.3	Mikroskopiedaten (konfokale Mikroskopie)	119
6.1.4	Statistische Auswertung	119
6.2	Zellkultur	120
6.3	Test der Funktionalität des 3D-Boyden Chamber Systems	120
6.3.1	Test unterschiedlicher Behandlungen der Polycarbonat-Folie auf Zelladhäsion	120
6.3.1.1	UV-Bestrahlung	121
6.3.1.2	Fibronektin-Beschichtung	121
6.3.1.3	Kollagen-Beschichtung.....	121
6.3.2	Handhabung des 3D-Boyden Chambers	122
6.3.3	Dichtigkeitstest des Zellrasens im Boyden Chamber mit Fluorescein-Natrium.....	122
6.3.4	Transport von Peptoid-Transporter durch Endothellayer	123
6.3.5	REM-Aufnahmen	124
6.4	Test der Funktionalität des mikrofluidischen Bioreaktors	124
6.4.1	Einbringen der Zellen in den porösen Mikrokanal des Bioreaktors.....	124
6.4.2	Strömungsvisualisierung und Simulierung	125
6.4.3	Permeabilitätstest	126
6.4.4	Lebendfärbungen der Endothelzellen.....	127
6.4.5	Immunfärbung der Endothelzellen	128
6.4.6	NO-Färbung	128
6.4.7	Monozyten-Adhäsion und Transmigration	129
6.4.8	Ko-Kultur.....	129
6.4.8.1	Wachstumskurven	129



6.4.8.2	Ko-Kultur im mikrofluidischen Bioreaktor	130
6.5	Endotheliale Aufnahme und transendothelialer Transport von Peptoiden	130
6.5.1	MTT-Test.....	130
6.5.2	Qualitative Bestimmung der Peptoidaufnahme in HUVECs	131
6.5.3	Quantitative Bestimmung der Peptoidaufnahme mittels LC-MS/MS.....	132
6.5.3.1	Verwendete Methode.....	132
6.5.3.2	Herstellung von Zelllysaten.....	132
6.5.3.3	Auswertung.....	133
6.5.4	Peptoidaufnahme und -abgabe unter fluidischen Bedingungen.....	133
6.5.5	Einsatz des mikrofluidischen 3D-Bioreaktors.....	134
6.5.6	Mechanismus der zellulären Aufnahme polykationischer Peptoide	134
6.6	Materialien	136
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	139
8	LITERATUR	141
9	ANHANG.....	147
10	DANKSAGUNG	170



1 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt die erfolgreiche Entwicklung eines mikrofluidischen Bioreaktors zur Untersuchung des Blutgefäßsystems *in vitro*. Das zentrale Element des Bioreaktors ist ein gekrümmter, poröser Mikrokanal, der das künstliche Blutgefäß darstellt. Die zur Herstellung der Mikrokanäle eingesetzte SMART-Technologie ist ein Thermoformverfahren zur Bearbeitung dünner Polymerfolien, die das Thermoformen bereits modifizierter Folien ermöglicht.

Als Vorstufe zur Etablierung der Kultivierung von Endothelzellen in den porösen Mikrokanälen wurde ein neues Boyden Chamber System entwickelt, welches den transendothelialen Transport durch einen porösen, gekrümmten Halbkanal ermöglicht. Durch Darstellung der Krümmungsradien von Blutgefäßen in diesem Halbkanal können so *in vivo*-Bedingungen nachgeahmt werden. Humane Endothelzellen konnten erfolgreich zur Konfluenz kultiviert werden. Dabei zeigte sich ein Unterschied in der Morphologie zwischen Endothelzellen, die auf flachen Oberflächen kultiviert wurden, im Gegensatz zu Zellen auf gekrümmten Oberflächen.

Durch Schließen des porösen Halbkanals mittels thermischem Bonden, sowie Ausstattung des Mikrokanals mit Anschlüssen für ein Pumpsystem, konnte ein mikrofluidisches System entwickelt werden. Dieses erlaubt die Untersuchung des vaskulären Systems unter Scherstress-Bedingungen. Der Mikrokanal wird von einer zweiten Kammer umgeben, die zur Aufnahme transportierter Substanzen, aber auch zur Kultivierung einer Ko-Kultur eingesetzt werden kann. Erste Ko-Kultur-Experimente zeigten eine erfolgreiche Kultivierung von Fibroblasten und humanen Brustkrebszellen im angrenzenden Kompartiment. Verschiedene Reaktionen der Endothelzellen im Mikrokanal auf Scherstress-Bedingungen konnten mit Hilfe des mikrofluidischen Bioreaktors nachgewiesen werden. Unter anderem wurde die Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung sowie eine Veränderung im Aktin-Zytoskelett durch die Bildung von Stress Fibers und eine erhöhte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion gezeigt. Weiterhin konnte der Bioreaktor erfolgreich zur Simulierung einer Entzündungsreaktion und damit verbundenen Rekrutierungsprozessen von Immunzellen eingesetzt werden. Konfokale Spinning Disk Mikroskopie ermöglichte eine direkte Visualisierung des ‚Rollings‘, der Adhäsion und Transmigration der Monozyten. Einen weiteren Einsatz fand der Bioreaktor in der Untersuchung des transendothelialen Transports von polykationischen Peptoiden. Zur Bestätigung der Einsatzmöglichkeit dieser Peptide in Zellkultur-Experimenten wurde mit Hilfe eines Zytotoxizitätstest deren Einfluss auf die Zellaktivität untersucht. In den eingesetzten Konzentrationen zeigten die Peptide keine oder nur geringe Zytotoxizität. Mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte die erfolgreiche Aufnahme der Peptide in Endothelzellen nachgewiesen werden. Mechanistische Untersuchungen ergaben eine Beteiligung endozytotischer Wege bei der Aufnahme der Peptide. Die quantitative



Untersuchung der Peptoid-Aufnahme in Endothelzellen ergab eine erhöhte Aufnahme guanidinylierter Peptoide im Vergleich zu deren Amin-Analoga, sowohl bei Peptoiden mit aliphatischen als auch aromatischen Seitenketten.

Der neu entwickelt mikrofluidische Bioreaktor mit dem gekrümmten künstlichen Blutgefäß bietet somit eine Plattform für zahlreiche Untersuchungen, sowohl des Endothels in seiner natürlichen, gekrümmten Form unter fluidischen Bedingungen, als auch verschiedener transendothelialer Transportprozesse. Durch Variation der Kanalgeometrien oder der Poren kann der Bioreaktor optimal an die entsprechenden Voraussetzungen der Experimente angepasst werden.



2 EINLEITUNG

Trotz einer rasanten Entwicklung in der Synthese und Evaluierung neuer Wirkstoffe stellen deren gezielte Applikation immer noch große Herausforderungen für die Entwicklung von Wirkstoffen und auch ‚Drug Delivery‘ Systemen dar. Die Erhöhung der Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit im Blut, die Resorption im Darm oder die Aufnahme über die Blut-Hirnschranke stehen daher im Fokus vieler Forschergruppen.^[1] ‚Drug Delivery‘ Systeme dienen nicht nur der Verpackung von Wirkstoffen und damit dem Schutz vor vorzeitigem Abbau, sondern können auch mit Affinitätsliganden für eine Organ-spezifische Anwendung modifiziert werden. Dennoch sind viele Faktoren sowohl für die reinen Wirkstoffe als auch für die ‚Drug Delivery‘ Systeme, die den transendothelialen und die anderen transepithelialen Transportwege beeinflussen, noch nicht bekannt. Auch heute ist es noch nicht einfach, im Screening den transendothelialen Transport, die Verteilung im Interstitium und die weitere Aufnahme durch verschiedene Zellen zu visualisieren. Eine weitere Herausforderung ist es die Faktoren aus dem Blut zu bestimmen, die diesen Transport verzögern oder beschleunigen, ohne dabei den Blutfluss zu unterbinden.

Die überwiegenden Studien zur Untersuchung von Wirkstoffaufnahme, Akkumulation, Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit und Abbauweg werden im Tiermodell durchgeführt, da dieses die natürliche Umgebung widerspiegelt. Pharmakokinetische Aspekte wie Aufnahme, Verteilung, Abbau sowie Ausscheidung der Wirkstoffe (ADME, engl. absorption, distribution, metabolism, excretion) sind so in einem Modell beinhaltet. Nachteile der *in vivo*-Modelle sind beispielsweise, dass eine genaue Analyse der Bioverfügbarkeit durch Modulation der Blutfaktoren und Gewebe unter konstanten Flussbedingungen nicht möglich ist. Eine Modulation von Blutfaktoren könnte beispielsweise Aufschluss über deren Einfluss auf Aufnahmeprozesse geben. Schwierig ist hier auch die Visualisierung des interstitiellen Transports. Zudem sind Tiermodelle aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden oft nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Die meisten *in vitro*-Modelle beruhen auf Boyden Chambers oder Transwell-Kammern.^[2, 3] Dabei werden Blutgefäßendothelzellen in einer oberen Kammer als Monolayer auf einer porösen Membran ausplattiert und der Durchtritt des Wirkstoffs in die sich darunter befindende, mit Medium gefüllte Kammer gemessen. Dieses Modell erlaubt allerdings weder einen transendothelialen Wirkstofftransport bei konstanter Zirkulation noch repräsentiert es die Krümmung eines Blutgefäßes und die damit verbundene Dreidimensionalität des Gefäßes und des Gewebes, welches sich um das Blutgefäß formiert. Zudem verlieren viele Zellen unter konventionellen Zellkulturbedingungen (z.B. statische Monolayer-Kultur) ihre phenotypischen Eigenschaften.^[4] Es ist bekannt, dass Zellen, die in einer dreidimensionalen Umgebung kultiviert werden, viel näher die *in vivo*-Gegebenheiten widerspiegeln als Zellen in zweidimensionaler Zellkultur.^[5, 6] Weiterhin sekretiert 3D-Gewebe, welches in unmittelbarer Nachbarschaft des Blutgefäßes lokalisiert ist, Faktoren, die den transendothelialen Transport



verstärken können. Das ist besonders bei Tumorgewebe relevant, da diese Proteasen sekretieren bzw. rekrutieren, die eine kurzzeitige Auflösung der endothelialen Konnektivität durch Proteolyse der Tight Junctions fördern und somit das Blutgefäß für den Wirkstofftransport durchlässig machen.^[7-12] Auch für die Entwicklung neuer Wirkstoffe für kardiovaskuläre Krankheiten oder die Untersuchung der vaskulären Toxizität pharmakologischer Einheiten ist die Etablierung verlässlicher *in vitro*-Modelle für die Mikrozirkulation sehr wichtig.^[13]

Deshalb wurde ein mikrofluidischer Bioreaktor entwickelt, der aus einer dreidimensionalen Anordnung von artifiziellen Blutgefäßen umgeben von einem weiteren Kompartiment besteht. Dieses angrenzende Kompartiment kann zur Kultivierung einer Ko-Kultur, beispielsweise in Form eines organotypischen 3D-Zellverbandes, eingesetzt werden. Mit Hilfe der SMART-Technologie wurden gekrümmte, poröse Mikrokanäle als künstliche Blutgefäße hergestellt, die das Herzstück des Bioreaktors darstellten. Der Bioreaktor erlaubt *in vitro* die Visualisierung des transendothelialen Transports durch die porösen Mikrokanäle ins Interstitium unter konstanten Flussraten und unter Verwendung unterschiedlicher Medien. Das Promotionsvorhaben umfasste die Entwicklung des mikrofluidischen Bioreaktors und die Etablierung der Kultivierung von Endothelzellen im mikrofluidischen Kanal, sowie die Analyse der Zellkulturparameter, der Nährstoffzufuhr und der Verwendung der Medien. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Bioreaktors, wie beispielsweise Flussprofile, wurden durchgeführt.

Nach Etablierung des Bioreaktors wurde dessen Einsetzbarkeit als *in vitro*-Modell eines Blutgefäßes zur Untersuchung des vaskulären Systems getestet. Hierbei wurde die Reaktion der Endothelzellen auf angelegte Schwerkraft untersucht. Zudem wurde eine Entzündungsreaktion im mikrofluidischen Bioreaktor simuliert und die Rekrutierung von Immunzellen beobachtet. Eine weitere Anwendung des Bioreaktors war die Untersuchung der endothelialen Aufnahme, sowie des transendothelialen Transports von polykationischen Peptiden und deren Anreicherung im Gewebe mit Hilfe von 3D- und 4D-konfokaler Mikroskopie und HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie)-Analytik. Sowohl die qualitative als auch die quantitative endotheliale Aufnahme verschiedener polykationischer Peptide wurde unter normalen, statischen Zellkulturbedingungen untersucht.



2.1 Vaskuläres System

2.1.1 Aufbau des Endothels

Das Endothel ist eine dünne einschichtige Zellschicht, welche die gesamte innere Oberfläche von Blutgefäßen (Arterien, Venen und Kapillaren), des Herzens und somit des gesamten Herz-Kreislauf-Systems auskleidet (Abbildung 1). Es bildet die Schnittstelle zwischen dem Blut und dem darunter liegenden Gewebe.^[14] Man unterscheidet zwischen vaskulären Endothelzellen, die in direktem Kontakt mit dem Blut stehen und lymphatischen Endothelzellen, die in Kontakt mit der Lymphe stehen. Neben Blutzellen sind Endothelzellen der einzige Zellentyp, der in direktem Kontakt mit Blut bzw. Lympheflüssigkeit steht. Die luminalen Seite der Endothelzellen ist mit der sogenannten Glykokalyx ausgestattet; einer Schicht, bestehend aus Polysacchariden, die kovalent mit den Membranproteinen und -lipiden der Zellen verbunden sind.^[15]

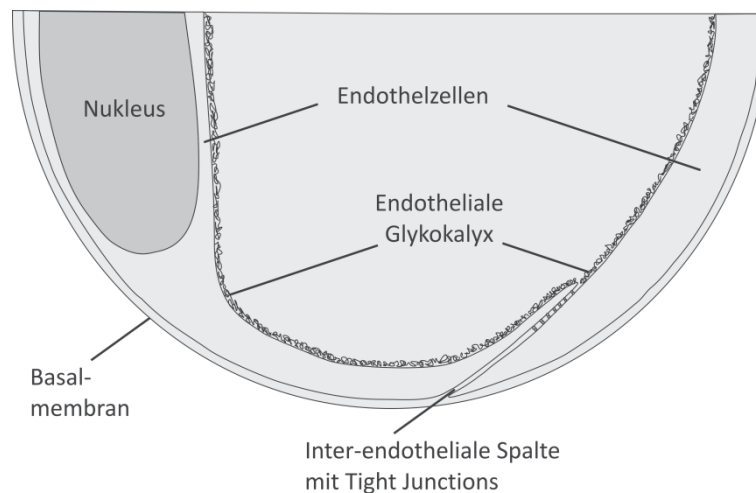


Abbildung 1: Querschnitt durch eine Blutkapillare. Gezeigt wird das Größenverhältnis der Glykokalyx auf der luminalen Seite der Endothelzellen zu den Endothelzellen selbst (modifiziert nach Flessner, 2008).^[15]

Der Aufbau von Blutgefäßen unterscheidet sich je nach Größe und Funktion. Die fünf wichtigsten Blutgefäße sind Arterien (Durchmesser größer als 1 cm bei elastischen Arterien, 0,1 – 10 mm bei muskulösen Arterien), Arteriolen (10 – 100 µm), Kapillaren (4 – 10 µm), Venolen (10 – 100 µm) und Venen (0,1 mm bis zu mehr als 1 mm).^[16] Die innerste Schicht einer Arterie (Tunica intima) besteht aus dem Endothel und der daran anschließenden Basalmembran (Abbildung 2). Im Anschluss daran findet sich elastisches Gewebe (Membrana elastica interna). Die mittlere Schicht (Tunica media) ist aus elastischen Fasern sowie glattem Muskelgewebe aufgebaut. Sie stellt die dickste Schicht dar. Die äußere Schicht (Tunica externa) besteht aus elastischen Fasern und Kollagenfasern (Abbildung 2). Die glatte Muskulatur der Tunica media ist mit sympathischen Neuronen des vegetativen Nervensystems ausgestattet und vermittelt dadurch bei einer Stimulierung die Kontraktion des Blutgefäßes (Vasokonstriktion). Eine Verringerung dieser Stimulierung oder die



Anwesenheit bestimmter Stoffe, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO), bewirken das Entspannen der glatten Muskelfasern (Vasodilatation).^[16]

Venen sind ebenfalls dreischichtig aufgebaut. Allerdings unterscheiden sich die relativen Dicken dieser Schichten im Gegensatz zu Arterien (Abbildung 2). Tunica intima und Tunica media sind in Venen sehr viel dünner. Durch die höhere elastische Dehnbarkeit der Gefäßwände können sich Venen an die fluiddynamischen Verhältnisse des Blutflusses, wie Scherkräfte und Drücke, anpassen.^[16] Die Wände von Kapillaren weisen hingegen nur eine Endothelschicht und die Basalmembran auf. Dadurch ermöglichen sie einen schnellen Substanztausch.^[16]

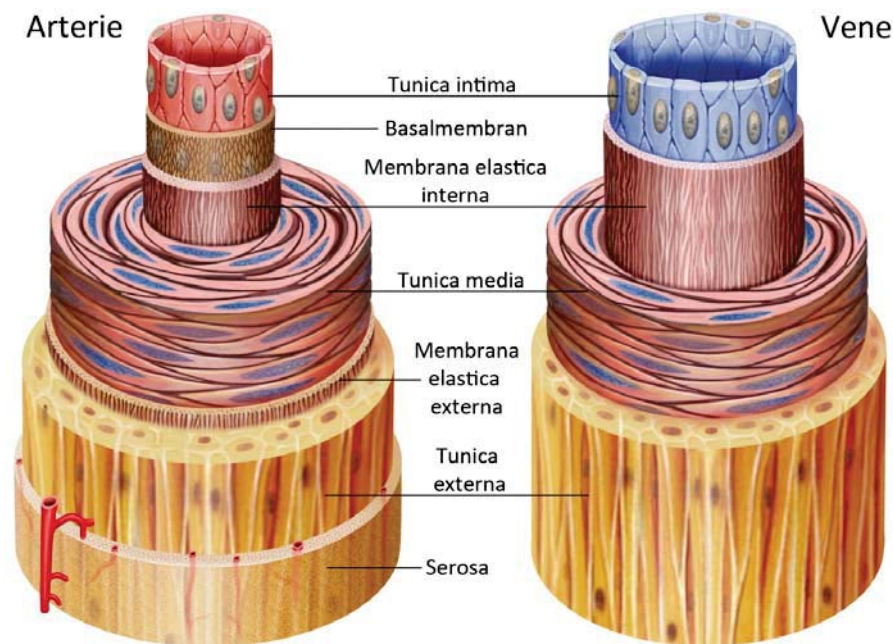


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von Arterien und Venen (modifiziert nach Geisler, 2012).^[17]

Je nach Gewebe bilden Endothelzellen in Kapillaren eine mehr oder weniger durchlässige Barriere. Das sogenannte „kontinuierliche“ Endothel, das im glatten Muskel, Herz- und Skelettmuskel, Bindegewebe, in Lungen und im ZNS vorkommt, lässt nur lipophile Stoffe penetrieren.^[16, 18] In Gehirn (Blut-Hirn-Schranke) und Rückenmark finden sich zusätzlich zum kontinuierlichen Endothel Gliazellen, die eine zusätzliche Barriere darstellen und nur noch hoch lipophile Stoffe passieren lassen. Andere Gewebe, wie im Magen-Darm-Trakt oder in der Niere, haben „fenestrierte“ Endothelien, bei denen die Endothelzellen Öffnungen („Fenestrationsen“) besitzen, sodass sie auch für weniger lipophile Stoffe permeabel sind.^[16, 18] Die dritte Gruppe ist das sogenannte „diskontinuierliche“ Endothel, welches in Blutgefäßen von Leber, Milz und rotem Knochenmark zu finden ist. Endothelzellen und Basalmembran zeigen hier offene Löcher, die auch einen Durchtritt von polaren Substanzen zulassen (Abbildung 3).^[16, 18]

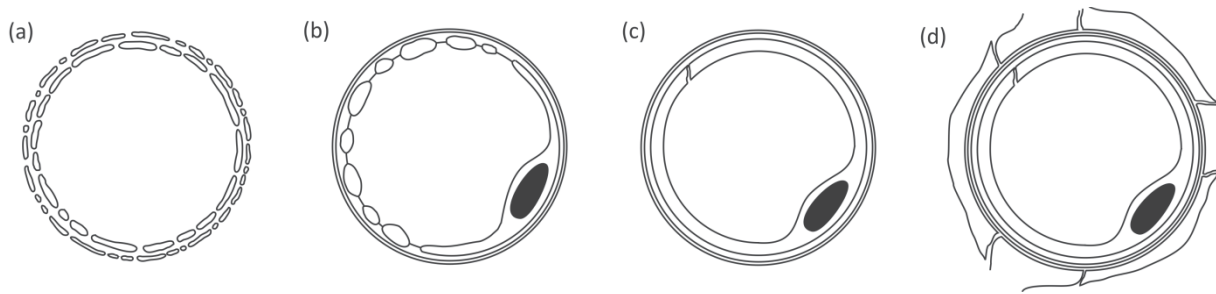


Abbildung 3: Darstellung unterschiedlicher Kapillartypen. (a) „diskontinuierlich“: Endothel und Basalmembran sind lückenhaft. (b) „fenestriert“: Endothel besitzt durch Membran verschlossene Öffnungen. (c) „kontinuierlich“: Endothel und Basalmembran sind lückenlos. (d) „kontinuierliches“ Endothel mit zusätzlich aufgelagerten Gliazellen. (modifiziert nach Tortora und Derrickson, 2006).^[16]

2.1.2 Aufgaben des Endothels

Das Endothel reguliert den Transport von löslichen Substanzen (Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Hormone) sowie Immunzellen und ist damit verantwortlich für den Stoffaustausch zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum.^[19] Verschiedene Mechanismen stehen hierzu zur Verfügung (siehe 2.2). Andererseits besitzt das Endothel aber auch eine Barrierefunktion gegenüber Substanzen, die nicht aufgenommen werden sollen.^[15] Hierbei spielen adhäsive Strukturen und Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions, Adherence Junctions und Gap Junctions) eine wichtige Rolle.^[12] Diese werden durch transmembrane Adhäsionsmoleküle gebildet, die mit einem Netzwerk von Proteinen des Zytoskeletts verbunden sind.^[20-22]

Eine weitere Aufgabe des Endothels ist die Aufrechterhaltung eines konstanten „inneren Milieus“, die sogenannte vaskuläre Homöostase.^[23, 24] Endothelzellen in einem gesunden Blutgefäß sekretieren verschiedene Faktoren, die unter anderem für ein antikoagulatives und antithrombogenes Milieu sorgen und somit die Adhäsion von Thrombozyten und die Bildung eines Thrombus verhindern. Beispiele solcher vasoprotektiver Faktoren sind Prostazyklin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO). Durch die Aktivität verschiedener antikoagulativer Signalwege sorgen Endothelzellen für die Aufrechterhaltung des Blutflusses. Im Fall einer Verletzung des Blutgefäßes können Endothelzellen die Blutgerinnung bzw. Thrombozytenaggregation erwirken.^[23, 25] Auch bei der Steuerung des Gefäßtonus, dem Blutdruck, ist das Endothel maßgeblich beteiligt. Die Produktion von NO, dem Endothelium-derived relaxing factor (EDRF), in den Endothelzellen führt zur Entspannung der glatten Muskulatur im Blutgefäß. Die Produktion ist konstitutiv, kann aber auch durch verschiedene Moleküle wie Acetylcholin oder Angiotensin verstärkt werden. Zudem wird die NO-Freisetzung auch durch Scherstress ausgelöst (siehe Abschnitt 2.1.3).^[23] Auch Prostazyklin (PGI_2), das ebenfalls im Endothel gebildet wird, führt zur Relaxation der angrenzenden glatten Muskelzellen. Im Gegensatz dazu können Endothelzellen unter bestimmten pathophysiologischen Umständen sogenannte vasokonstriktorische Faktoren freisetzen. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid Endothelin.^[23]



Auch bei der Immunabwehr spielt das Endothel eine wichtige Rolle. Endothelzellen regulieren die Rekrutierung von Immunzellen zur Entzündungsstelle in das Gewebe und setzen, stimuliert durch Faktoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Zytokine und Wachstumsfaktoren frei. An einer lokalen Verletzung oder Entzündung im Gewebe werden Zytokine gebildet. Auch diese stimulieren die angrenzenden Endothelzellen, welche auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle der Selektin- und Integrin-Familien ausbilden.^[26, 27] Die Selektine sorgen für das Anhaften von Immunzellen wie Lymphozyten und Monozyten an der Endotheloberfläche. Die Immunzellen rollen aufgrund der Selektin-vermittelten Bindung anschließend entlang der Gefäßwand. Durch Chemokine aktivierte Immunzellen binden an die Endothelzellen und transmigrieren schließlich in das verletzte oder entzündete Gewebe (Abbildung 4).^[26, 27] In stimulierten Endothelzellen finden sich hochregulierte pro-inflammatorische Gene wie Zytokine (IL-1 (Interleukin-1), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)), Chemokine (IL-8, MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1‘)) und Adhäsionsmoleküle ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1‘), VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1‘), PECAM-1 („platelet/endothelial cell adhesion molecule-1‘), E-Selektin, P-Selektin).^[23, 27-32]

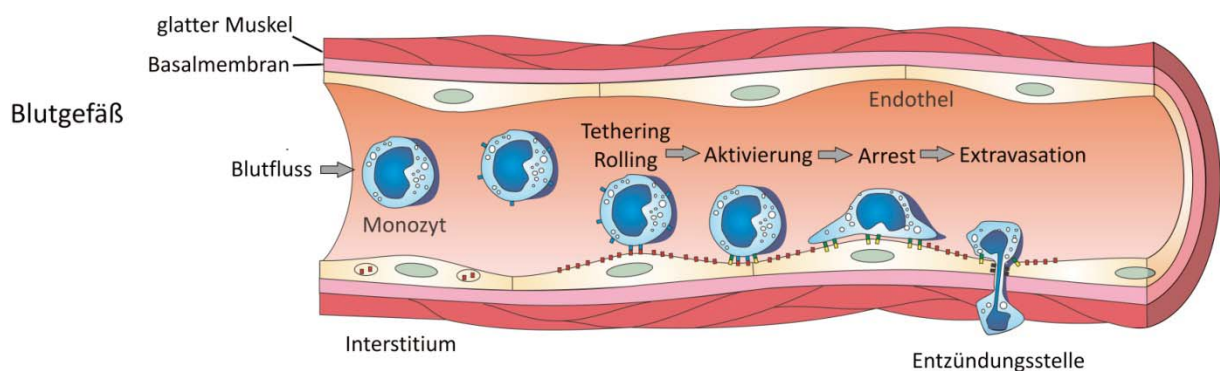


Abbildung 4: Rekrutierung von Immunzellen (Monozyten) im Blutgefäß zum Entzündungsherd im Gewebe. Aktiviertes Endothel bindet über Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche Monozyten („Tethering“) während der „Rolling“-Phase der Immunzellen. Durch Präsentation von Chemokinen werden die Immunzellen aktiviert und bewegen sich entlang der Gefäßwand zum Entzündungsherd. Nach festem Anhaften (Arrest) am aktivierten Endothel, transmigrieren die Immunzellen durch die Endothelschicht in das verletzte bzw. entzündete Gewebe (Extravasation).

2.1.3 Reaktion von Endothelzellen auf Scherstress

Die luminalen Oberfläche der Blutgefäße und deren endotheliale Oberfläche sind ständig dem Blutfluss und damit verbundenen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt.^[33]

Der Scherstress (engl. shear stress) ist die Zugkraft pro Fläche, die auf die Oberfläche des Endothels im Inneren eines Blutgefäßes in Richtung des Blutflusses wirkt. Die folgende Formel beschreibt nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille für laminare Strömungen die Scherkraft τ in einem zylinderförmigen Rohr mit dem Radius r , Volumenstrom Q und der Viskosität der Flüssigkeit μ .^[34]



$$\tau = \frac{4 \mu Q}{\pi r^3}$$

τ = Scherstress (dyn cm^{-2})

μ = Viskosität der Flüssigkeit ($0,01 \text{ dyn s cm}^{-2}$)

Q = Volumenstrom (ml s^{-1})

r = Innerer Radius des Blutgefäßes (cm)

Die Reynoldszahl (Re), eine dimensionslose Kenngröße, gibt an, ob eine Strömung laminar oder turbulent ist. Sie wird durch die nachfolgende Formel beschrieben.

$$Re = \frac{\rho v l}{\eta}$$

Re = Reynoldszahl

ρ = Dichte des Fluids (kg m^{-3})

v = Strömungsgeschwindigkeit (m s^{-1})

l = Länge (m)

η = dynamische Viskosität ($\text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

Die kritische Reynoldszahl (Re_{krit}) beschreibt den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung. Die Strömung in einem Rohr mit kreisförmigem Durchmesser ist laminar für $Re_{\text{krit}} < 2320$. Diese Rohrströmung stellt ein zwar vereinfachtes aber dennoch geeignetes Modell für die Strömung in Blutgefäßen dar. Je nach Lage im Gefäßsystem können unterschiedliche Strömungsformen vorliegen. In Arterien finden sich beispielsweise laminare Strömungsformen, in Gefäßgabelungen hingegen turbulente. Auch die Strömungsgeschwindigkeiten variieren stark in unterschiedlichen Blutgefäßen. Um die Scherkräfte möglichst konstant zu halten, können sich Blutgefäße bei erhöhter Flussrate erweitern. In Arterien finden sich Scherkräfte von $10-70 \text{ dyn cm}^{-2}$, in Venen $1-6 \text{ dyn cm}^{-2}$.^[35, 36] Lokale Veränderungen im Fließverhalten und Scherstress in arteriellen Verzweigungen werden häufig mit der Entstehung arteriosklerotischer Plaques in Verbindung gebracht.^[37, 38]

Endothelzellen sind in der Lage einwirkende Kräfte wahrzunehmen und darauf zu reagieren.^[14] Verschiedene Studien zeigten bereits eine Vielzahl zellulärer Reaktionen von Endothelzellen auf Scherstress im Gegensatz zu Zellen, die unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. Diese Reaktionen auf Scherstress umfassen neben einer Änderung der Zellmorphologie auch Veränderungen in der Genexpression.^[39] Unter fluidischen Bedingungen richten sich Endothelzellen in Flussrichtung des Blutes bzw. Mediums aus und zeigten eine langgestreckte Morphologie.^[40, 41] Damit verbunden war eine Modifikation des Zytoskeletts sowie der fokalen Adhäsionspunkte. Endothelzellen, die unter Scherstress-Bedingungen kultiviert wurden, zeigten eine vermehrte Bildung von Fibrillenbündeln, sogenannter Stress Fibers.^[42] Stress Fibers sind hoch geordnete Strukturen bestehend aus Aktin-Filamenten, vernetzenden Proteinen und Myosin II. Als kontraktile Aktomyosin-Bündel



spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, der Beweglichkeit und Morphogenese der Zelle. Stress Fibers sind die schnellsten Aktomyosin-basierten, kontraktile Elemente in Nicht-Muskelzellen.^[42] In Säugerzellen unterscheidet man zwischen ventralen, dorsalen und transversalen Stress Fibers.^[43, 44] Diese unterscheiden sich in der Zusammensetzung, Lokalisation in der Zelle, sowie deren Funktion bei zellulären Prozessen.^[44] Eine weitere Reaktion auf Scherstress ist eine erhöhte Produktion von NO. NO ist als intrazelluläres Schlüssel-Messenger-Molekül an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, beispielsweise an der Relaxation von Blutgefäßen und dadurch an der Regulation des Blutdrucks.^[45] Daneben konnten auch Änderungen in der Bildung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine beobachtet werden.^[39, 46]

2.2 Endotheliale Aufnahme und transendothelialer Transport

2.2.1 Barrierefunktion des Endothels

Die Austauschfläche zwischen Plasma und Gewebe, die durch die mikrovaskulären Wände der Arterien und Venen dargestellt wird, ist hoch durchlässig für kleine Moleküle wie Sauerstoff (O₂) oder Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser, die durch Diffusion aufgenommen bzw. abgegeben werden. Für größere Moleküle hingegen sind sie nahezu undurchlässig.^[16, 18] Dies ist wichtig, um ein gewisses Gleichgewicht zwischen Plasma und Interstitium aufrecht zu erhalten.^[23, 24] Dennoch ist es unerlässlich, dass auch große Moleküle diese Barriere überwinden, um das Gewebe mit Antikörpern, Protein-gebundenen Hormonen, Zytokinen, Chemokinen und weiteren hoch molekularen Substanzen zu versorgen.^[47, 48] Hierbei spielen nicht nur der passive Transport durch große Poren oder Kanäle sondern auch der vesikuläre Transport z.B. durch Endozytose eine wichtige Rolle.^[19, 49-51]

2.2.2 Endozytose

Gerade für die Internalisierung höher molekularer hydrophiler Moleküle ist aufgrund ihrer Polarität die Endozytose der einzige Weg, das Endothel zu passieren.^[52] Diese werden über Vesikel aus dem Extrazellulärraum durch die Plasmamembran ins Innere der Zelle geschleust. Hierbei erfolgt ein Abschnüren von Membranvesikeln ins Innere der Zelle. Abbildung 5 zeigt die verschiedenen Arten der Endozytose. Clathrin-abhängige bzw. Clathrin-unabhängige Endozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, Phagozytose sowie Makropinozytose unterscheiden sich dabei in Größe und Ausstattung der Vesikel.^[49, 51] Zellen nutzen diese Vielfalt an Mechanismen, um verschiedenste Aufgaben zu bewältigen. Dabei spielt auch die Größe der internalisierten Moleküle eine wichtige Rolle, die die Effizienz der zellulären Aufnahme stark beeinflussen kann.^[19, 47, 49, 53, 54]

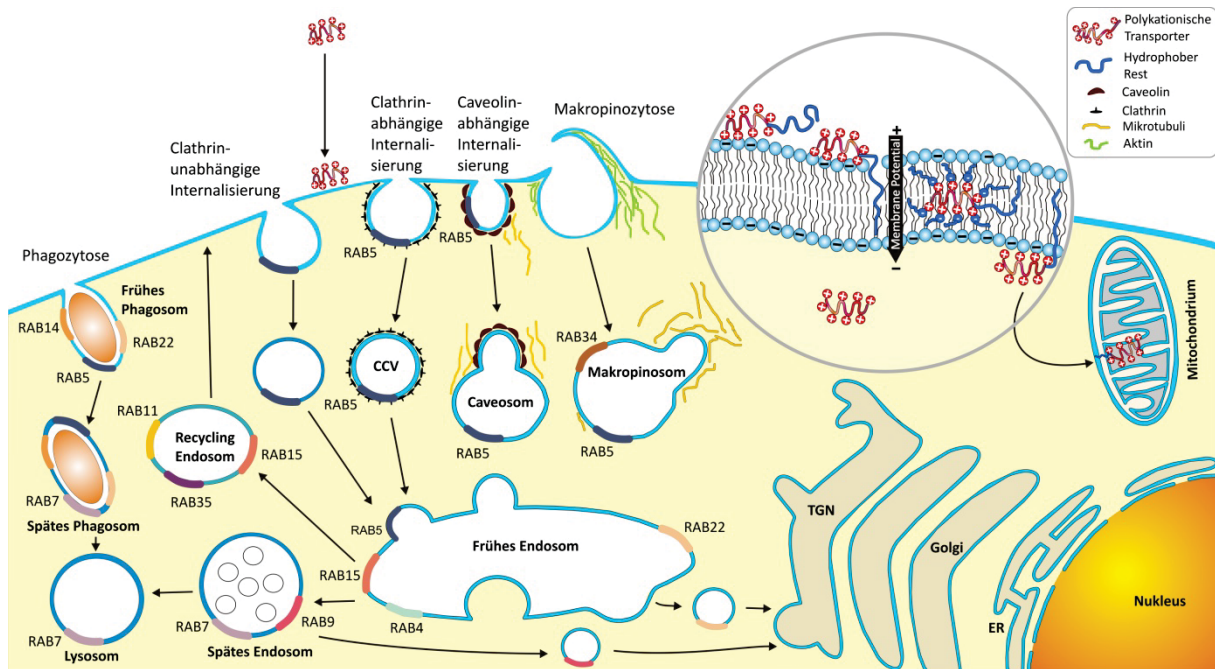


Abbildung 5: Lokalisierung und Funktion von Rab GTPasen. Ausschnitt einer Zelle mit vesikulären Transportwegen und der Lokalisation ausgewählter Rab GTPasen. Rab22 steuert den Transport zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und frühen Endosomen und umgekehrt. Rab5, das sich in frühen Endosomen, Phagosomen, Caveosomen und der Plasmamembran befindet, steuert Endozytose und endosomale Fusion Clathrin-gebundener Vesikel (clathrin-coated vesicles, CCVs), Makropinozytose (mit Rab34) und das Reifen von frühen Phagosomen (mit Rab14 und Rab22). Rab11 und Rab35 steuern das langsame endosomale Recycling über Recycling-Endosomen. Das mit späten Endosomen verbundene Rab7 steuert die Entwicklung von späten Endosomen und Phagosomen und deren Fusion mit Lysosomen. Rab9, eine weitere späte endosomale GTPase, steuert den Transport von späten Endosomen zum TGN (modifiziert nach Stenmark, 2009).^[49]

2.2.3 Vesikulärer Transport

Als vesikulärer Transport wird sowohl die Aufnahme größerer Moleküle über Endozytose (siehe 2.2.2) in die Zelle als auch deren Ausschleusen aus der Zelle (Exozytose) bezeichnet.^[51] Der spezifische Transport zwischen bestimmten Membran-umhüllten Organellen ist ein zentrales Element in eukaryotischen Zellen.^[49, 53] Durch Endozytose aufgenommene Substanzen gelangen in den gebildeten Transportvesikeln ins Innere der Zelle. Die Transportvesikel fusionieren dabei mit den Endosomen und bilden die sogenannten frühen (early) Endosomen.^[48, 55] Nach Reifen zu späten (late) Endosomen können Teile der endosomalen Membran mit den Lysosomen fusionieren, was zum Abbau bzw. zur Freisetzung der darin enthaltenen Substanzen führt. Auf der anderen Seite führen Recycling-Endosomen zu einem Recycling z.B. membranständiger Rezeptoren und damit zu einem direkten Rücktransport der internalisierten Substanzen an die Zelloberfläche.^[19, 53, 56] Endosomen sind an zahlreichen zellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion,^[50] Zellpolarität oder -migration beteiligt.^[57]



Eine wichtige Rolle beim Transfer von Substanzen zwischen bestimmten Membranumschlossenen Organellen spielen die Rab GTPasen („Ras-related in brain“).^[58] Diese gehören zur Ras Superfamilie und bilden die größte Familie unter den kleinen GTPasen.^[59] Sie dienen als molekulare Schalter, die zwischen zwei Konformationen, GTP-gebunden und GTP-ungebunden wechseln. Verschiedene Effektormoleküle wie ‚Sorting‘ Adaptoren, ‚Tethering‘ Faktoren, Kinasen, Phosphatasen und Motorproteine können durch GTP-gebundene Rabs aktiviert oder rekrutiert werden.^[49, 56] Im menschlichen Organismus finden sich über 60 verschiedene Rabs, die an bestimmten intrazellulären Membranen sitzen.^[60] Durch die indirekte Interaktion mit Mantel („Coat“)-Komponenten, Motorproteinen und SNAREs („soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors“) dienen sie als Organisatoren nahezu aller Membran-abhängige Transportprozesse.^[19, 49, 60] Abbildung 5 zeigt die Beteiligung verschiedener Rabs an der Endozytose.^[49] Welche Wege des vesikulären Transports genutzt werden hängt von der Struktur und den physikochemischen Eigenschaften der entsprechenden Substanzen ab. Bis heute ist das für viele Substanzen immer noch nicht vollständig geklärt.

2.3 ‚Drug Delivery‘ Systeme

2.3.1 Zell-penetrierende Peptide

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe stellt der Transport durch den Endothellayer in den Blutgefäßen und damit verbunden, eine erfolgreiche Aufnahme in das vaskuläre System immer noch eine große Herausforderung dar. Biologische Membranen sind in der Regel undurchlässig für große oder hochgeladene Moleküle.^[19] Viele hydrophile Substanzen wie Peptide, Proteine oder Oligonukleotide werden daher nur in einem geringen Umfang von Zellen aufgenommen, da sie die Lipidschicht der Plasmamembran weder durch Endozytose noch durch andere der oben erwähnten Transportwege überwinden können. Dadurch ist der Einsatz dieser Moleküle als therapeutische Wirkstoffe eingeschränkt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass kurze polykationische Peptidsequenzen mit einer Länge von 10 – 30 Aminosäuren die Aufnahme dieser Substanzen erhöhen können.^[52, 61, 62] Diese Peptide können die Membran Rezeptor-unabhängig und meist Energie-unabhängig passieren.^[62, 63] Grundlage dieser Zell-penetrierenden Peptide (cell-penetrating peptides, CPPs) sind RNA- oder DNA-bindende Proteine wie das Tat-Protein^[64] oder künstliche Peptide wie beispielsweise Transportan^[52] oder Penetratin.^[65-67] Die Aminosäurezusammensetzung der CPPs zeichnet sich häufig durch das Vorkommen vieler positiv geladener Aminosäuren wie Arginin und Lysin oder aber einer amphipathischen Struktur aus.^[68] Erstmals konnten Frankel und Pabo (1988) zeigen, dass das Tat-Protein aus dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) aus dem umgebenden Medium in verschiedenen Zellen aufgenommen wurde.^[69] CPPs sind somit wirksame Trägerstoffe, um kovalent oder nicht-kovalent gebundene Moleküle wie Fluoreszenz-Farbstoffe,^[61, 67] Wirkstoffe,^[61] Proteine,^[70-72] Nukleinsäuren,^[63, 73] Nanopartikel^[74, 75] oder Liposomen^[61] in Zellen zu schleusen.^[61, 63, 76] Heute sind bereits über hundert solcher CCP-Sequenzen bekannt.



2.3.2 Peptoide

Arginin-reiche Peptide wie die CPPs sind empfindlich gegenüber Oxidation und Degradation durch Proteasen. Diese Empfindlichkeit kann deren Bioverfügbarkeit und Blutzirkulationszeit *in vivo* herabsetzen. Dadurch steigt das Interesse an sogenannten Peptid-Mimetika, die diese Nachteile umgehen. Die Fähigkeit Wirkstoffe oder andere biologisch aktive Moleküle in Zellen zu transportieren wurde bei verschiedenen Peptid-Mimetika wie β -Peptiden^[77, 78] und Peptoiden nachgewiesen.^[79] Eine hohe Dichte an positiv geladenen Seitenketten scheint die Effizienz der zellulären Aufnahme maßgeblich zu erhöhen, sodass die Ausstattung der Peptid-Mimetika mit basischen funktionellen Gruppen, wie Amin- oder Guanidin-Gruppen, die Zell-penetrierenden Eigenschaften begünstigt.^[77, 80, 81]

Peptoide sind *N*-Alkylglyzine. Im Gegensatz zu Peptiden befinden sich bei Peptoiden die Aminosäureseitenketten am Stickstoffatom anstatt am Kohlenstoffatom (Abbildung 6). Dies macht Peptoide widerstandsfähiger gegen den enzymatischen Abbau durch Proteasen.^[82, 83] Es konnte gezeigt werden, dass Peptoide mit Guanidin-Gruppen an der Alkylkette in Säugetierzellen aufgenommen wurden.^[80, 81, 84] Peptoide könnten sich so als effektive Transporter erweisen, um Wirkstoffe oder andere Substanzen in Zellen zu schleusen. Weiterhin konnte Peptoiden eine enzyminhibitorische, antibiotische und peptidhormonelle Wirkung sowie ein Anbinden an Rezeptoren und Proteine nachgewiesen werden.^[85] Sie konnten erfolgreich als Mimetika von Peptid-Hormonen, Antibiotika und Rezeptor-Liganden eingesetzt werden.^[77, 80, 81, 85]

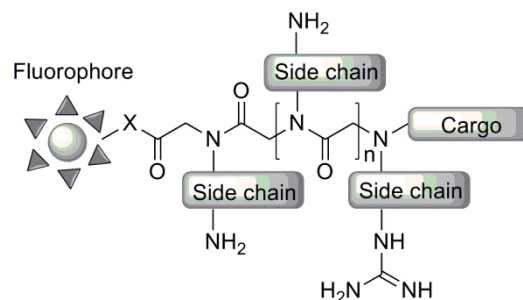


Abbildung 6: Allgemeine Strukturformel eines Fluorophor- und Wirkstoff-gekuppelten, polykationischen Peptoids.

Viele weitere ‚Drug Delivery‘ Systeme nutzen besonders polykationische Liganden und damit die positiven Ladungen, um mit den negativ geladenen Proteoglykanen der Plasmamembran, wie sie z.B. in Heparansulfaten auftreten, zu interagieren und somit in engen Kontakt mit der Plasmamembran z.B. von Endothelzellen zu treten. Meist werden sie mit den Proteoglykanen endozytiert oder tunneln in inversen Mizellen durch die Membran (Abbildung 5). Dabei sind heute insbesondere polykationische Liposomen, Polyethylenimin (PEI) Systeme, polykationische Dendrimere und weitere Blockcopolymere bereits im Einsatz. Obwohl bereits viel über die Aufnahme der polykationischen ‚Drug Delivery‘ Systeme im Tiermodell erforscht ist, ist über ihre Interaktion mit Komponenten des vaskulären Systems



wenig bekannt. Das Gleiche gilt für die Beeinflussung der Halbwertszeiten und der Bioverfügbarkeit der entsprechenden Moleküle. Das Tiermodell erlaubt keine Depletion der Blutfaktoren und somit auch kein einfaches Monitoring der entsprechenden Wirkstoff- bzw. ‚Drug Delivery‘ System Modulierung durch bestimmte Blutfaktoren. Daher gewannen mikrofluidische Systeme, die nicht nur Blutgefäße nachahmen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung.^[86-89]

2.4 Mikrofluidische Systeme

Im Gegensatz zu gängigen *in vitro*-Zellkultursystemen, in denen Zellen unter statischen Bedingungen kultiviert werden, spiegeln mikrofluidische Systeme^[86-89] eher die *in vivo*-Bedingungen wider.^[90] Dadurch können Zellen unter fluidischen Bedingungen kultiviert und deren Reaktion auf Scherstress-Bedingungen untersucht werden. Beobachtete Reaktionen von Endothelzellen auf Scherstress sind in Abschnitt 2.1.3 dargestellt. Mikrofluidische Systeme finden unter anderem einen weiten Einsatz in der regenerativen Medizin im Bereich Tissue Engineering zur Versorgung komplexer künstlicher Gewebe und Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen^[13, 87, 91-93] oder bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe.^[1] Hierzu ist es wichtig, funktionsfähige mikrovaskuläre Netzwerke, die die Physiologie des Blutgefäßsystems imitieren, zu entwickeln.^[13, 94]

Techniken zur Herstellung von Mikrokanälen sind: Lithografie (X-ray, UV, Laser, etc.), mechanische Mikrostrukturierung, Laserstrukturierung, Soft Lithografie, Mikro-Replikationsmethoden wie Spritzguss oder Heißprägen, Rapid Prototyping-Verfahren etc.^[87, 88, 95-97] Viele der mikrofluidischen Systeme wurden mit Hilfe von Soft Lithographie unter Verwendung von Poly-(dimethylsiloxan) (PDMS) hergestellt (siehe auch Abschnitt 5).^[96] Die Soft Lithographie, die in der Gruppe von Whitesides entwickelt wurde, verwendet strukturierte Elastomere, meist aus PDMS, um spezifische Strukturen auf ein Substrat zu überführen. Diese können in Form von Gussformen, aber auch Masken oder Stempel, verwendet werden. Dadurch können reproduzierbare Mikro- und Nanostrukturen, beispielsweise auch in Form von Mikrokanälen, hergestellt werden.^[98-100] Mit diesen Techniken wurden hauptsächlich Mikrokanäle mit rechteckigen Querschnitten hergestellt. Grund dafür ist, dass sich die Mikrostrukturtechnik aus der Halbleitertechnologie abgeleitet hat, bei der nur 2D-Strukturen erforderlich sind. So besitzen die meisten derzeit verwendeten mikrofluidischen Kanäle zur Untersuchung von Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen rechteckige Querschnitte.^[33, 101-103] Bei der *in vitro*-Darstellung des vaskulären Systems mit Hilfe dieser Strukturen wachsen Endothelzellen somit auf flachen Oberflächen, die nicht die *in vivo*-Gegebenheiten der gekrümmten inneren Oberflächen von Blutgefäßen widerspiegeln.

Es konnte gezeigt werden, dass sich beispielsweise die Flussprofile in rechteckigen Mikrokanälen von denen in Kanälen mit runden Querschnitten unterscheiden.^[104, 105] Diese Krümmung zeigte weiterhin einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion vorbeiströmender Zellen und Endothelzellen an der Gefäßwand.^[106] Zudem konnten Veränderungen in der



Ausbildung einer Plasma-reichen Schicht durch rote Blutzellen in Mikrokanälen verschiedener Geometrien beim Durchströmen der Kanäle beobachtet werden.^[107] Weitere Studien zeigten Unterschiede in der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts und der fokalen Adhäsionspunkte bei Endothelzellen, die auf gekrümmten Oberflächen kultiviert wurden im Gegensatz zu gewöhnlichen flachen Zellkulturoberflächen.^[108, 109] Dies konnten wir selbst in unserem neu entwickelten Boyden Chamber System mit gekrümmter Halbkanalstruktur bestätigen.^[110] Kanäle mit runden Querschnitten, die mit Hilfe mikrotechnischer Methoden hergestellt wurden, besaßen hingegen keine Porosität.^[13, 105, 109, 111] Poren in den Mikrokanälen sind wichtig, um die Versorgung der Zellen sowohl von der apikalen als auch der basolateralen Seite zu gewährleisten. Weiterhin ist die Porosität unerlässlich für transendotheliale Transportprozesse.

Zahlreiche Studien zeigten, dass Zellen, die in ihrer natürlichen, dreidimensionalen Umgebung kultiviert werden, die *in vivo*-Bedingungen besser nachahmen als Zellen auf flachen Oberflächen.^[6, 112, 113] Die dreidimensionale Zellkultur eröffnet somit zahlreiche Möglichkeiten Zell-basierter Untersuchungen *in vitro*.^[114, 115] Aufgrund der Komplexität des vaskulären Systems ist es wichtig, die natürlichen Gegebenheiten wie Krümmungsradien, Wechselwirkung mit Extrazellulärmatrixmolekülen und Zellen sowie Scherstress-Bedingungen in *in vitro*-Modellen darzustellen.^[113, 116, 117]

2.5 Mikrothermoformen und SMART-Technologie

Mikrothermoformen

Neben den oben genannten Verfahren gibt es zur Herstellung von künstlichen mikrofluidischen Kanälen auch das sogenannte Mikrothermoformen. Das Mikrothermoformen beruht auf einer Formänderung des zu bearbeitenden thermoplastischen Polymers im gummielastischen Zustand. In der vorliegenden Arbeit wurde das sogenannte Hochdruck-Mikrothermoformen mittels Gasdruck verwendet.^[118, 119] Abbildung 7 zeigt die einzelnen Schritte des Mikrothermoformens. Die zu formende dünne, freistehende Polymerfolie (hier Polycarbonat) wird in ein entsprechendes Messingformwerkzeug eingesetzt (a). Die Folie wird im Formwerkzeug zwischen die strukturierte Form und die Gegenplatte geklemmt (b). Das gesamte Formwerkzeug mit der darin enthaltenen Polymerfolie wird anschließend auf eine Temperatur im Bereich der Glasübergangstemperatur des eingesetzten Polymers erwärmt. Das Polymer befindet sich dann in einem gummielastischen Zustand (c). Durch Erzeugung eines Druckunterschiedes (1,5 – 5 MPa) wird die fixierte Folie in die entsprechende strukturierte Form dreidimensional versteckt (d, e). Unter Beibehalten des Drucks wird die Form deutlich unter den Glasübergangsbereich des Polymers abgekühlt, wobei die neue Form der Folie erhalten bleibt. Nach Wegnahme von Gasdruck und Kraft kann die Folie dem Formwerkzeug entnommen werden (f).^[118, 120]

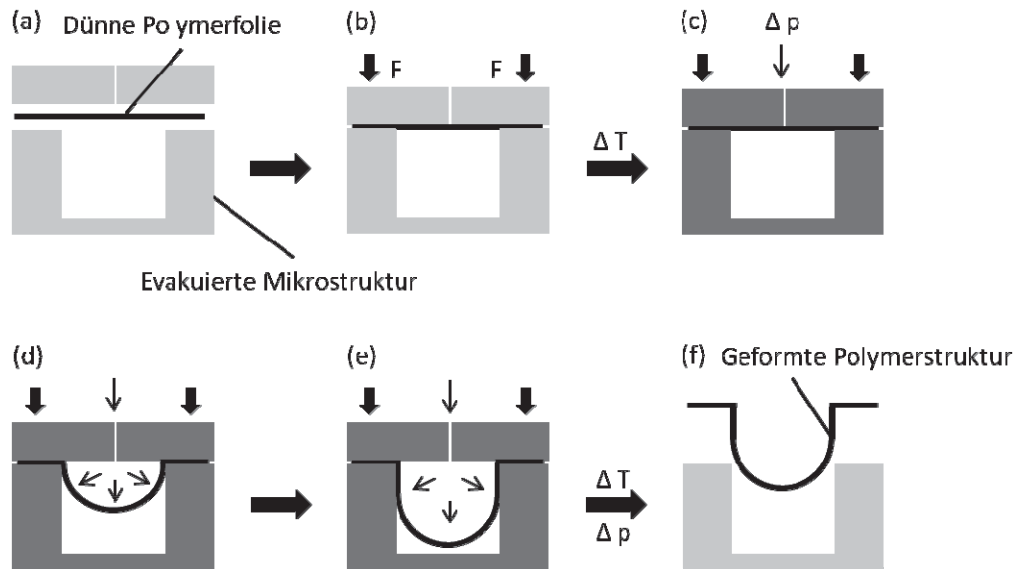


Abbildung 7: Abfolge der Prozessschritte des Thermoformens mittels Gasdruck (modifiziert nach Giselbrecht et al., 2008).^[121]

SMART-Technologie

Eine weitere Verbesserung des Mikrothermoformens, die eine Vielzahl verschiedener Strukturierungen der Produkte ermöglicht, ist die sogenannte SMART-Technologie (engl. Abkürzung für Substrate Modification and Replication by Thermoforming). Die SMART-Technologie ist ein dreistufiger Prozess, bestehend aus einer Vorbehandlung der Folie („pre-process“), dem bereits erwähnten Mikrothermoformen („core-process“) und einer möglichen Nachbehandlung der dünnwandigen Folienmikrostruktur nach dem Formschritt („post-process“).^[118, 119, 122] Das Formen erfolgt im thermoelastischen Zustand unter permanenter Materialkohäsion und damit der Erhaltung der durch die Vorbehandlung erzeugten Modifikationen des Polymers. Dies erlaubt das Thermoformen von bereits modifizierten Polymerfolien unter Erhaltung der vorangegangenen Prozessschritte (z.B. gemusterte Oberflächenmodifikationen). Beispiele für Modifikationen, die mit dem mikrotechnischen Thermoformen nach dem SMART-Prinzip kompatibel sind, sind in Abbildung 8 dargestellt. Es besteht zum einen die Möglichkeit, die gesamte Polymerfolie oder auch nur definierte Teilbereiche zu modifizieren. Weiterhin sind das Einbringen von Topographien und Musterungen oder das Beschichten der Oberfläche möglich.

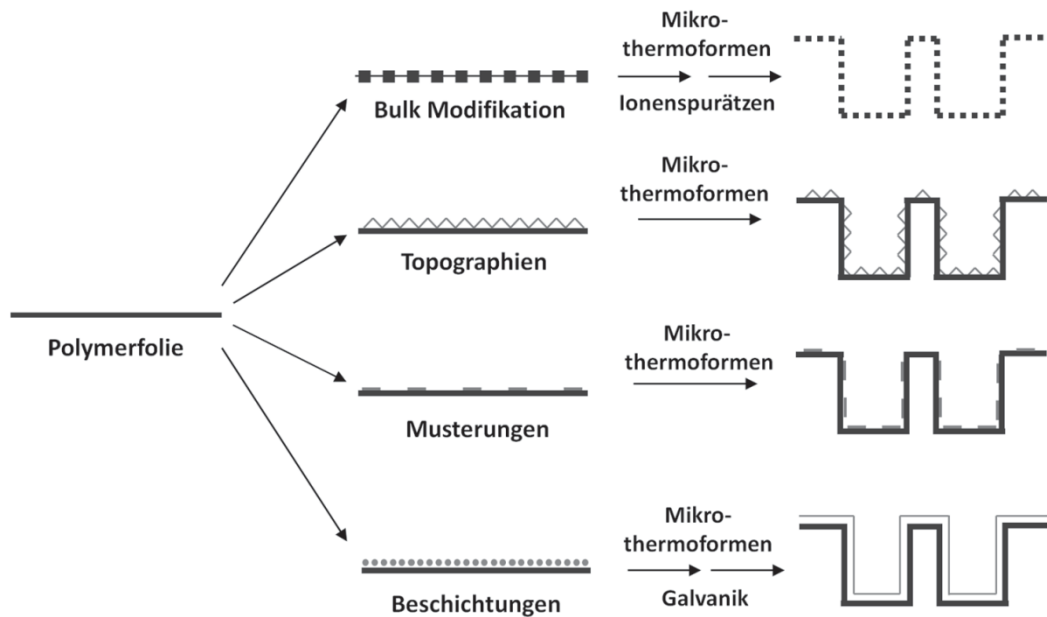


Abbildung 8: SMART-Technologie mit verschiedenen Möglichkeiten der Modifikation (modifiziert nach Giselbrecht et al., 2006).^[118]

Ein wichtiger und patentierter SMART-Prozess, der in dieser Arbeit von Bedeutung war, ist die Kombination aus Ionenspurtechnologie und Mikrothermoformen zur Erzeugung poröser, dünnwandiger Mikrostrukturen.^[118, 119, 123] Zur Erzeugung der Poren in der zu formenden Folie wird eine Schwerionenbestrahlung in hohen Energiebereichen (MeV – GeV) durchgeführt. Die Polymerketten werden an den entsprechenden Stellen entlang der Ionenspur zerstört bzw. physikochemisch abgebaut. Dadurch verändern sich lokal die chemischen und physikalischen Eigenschaften. Durch nasschemisches Ätzen mit Natronlauge werden die Poren dann an den Stellen dieser sogenannten latenten Ionenspuren geöffnet. Abhängig von Ätzzeit und -temperatur sowie Konzentration der Ätzlösung kann der Durchmesser der Poren variiert werden. Porendichte und -größe können damit individuell an Versuchsanordnungen angepasst werden.^[119] Durch das Vorhandensein von Poren auf der gesamten Struktur kann beispielsweise bei der Kultivierung von Zellen innerhalb der Versuchsanordnung die Versorgung der Zellen mit Medium von beiden Seiten der Folie (apikal und basolateral) gewährleistet werden.





3 ZIEL DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein neues mikrofluidisches Untersuchungssystem des vaskulären Systems in Form eines 3D-Bioreaktors zu entwickeln. Zentrales Element dieses Bioreaktors sollte ein gekrümmter, poröser Mikrokanal sein, der das artifizielle Blutgefäß darstellt. Die dünne, poröse Membran des Kanals trennt die apikale Seite des künstlichen Blutgefäßes von einem zweiten Kompartiment. Zwei unabhängige Kreisläufe, an denen Pumpen mit Medienreservoirs angeschlossen werden können, sollten der stetigen Versorgung der Zellen mit frischem Medium dienen sowie die Kultivierung der Zellen unter fluidischen Bedingungen ermöglichen (Abbildung 9).

Die dünnwandigen, porösen Mikrokanäle mit gekrümmter Oberfläche stellen die künstlichen Blutgefäße dar und spiegeln die Krümmungsradien von Blutgefäßen *in vivo* wider. Zur Herstellung der Mikrokanäle sollte die am Institut für Biologische Grenzflächen 1 des Karlsruher Instituts für Technologie entwickelte SMART-Technologie (Substrate Modification and Replication by Thermoforming), ein Verfahren zur Herstellung folienbasierter und funktionalisierter Mikrostrukturen, verwendet werden.

Die Arbeit hatte weiterhin die Kultivierung von Endothelzellen in den mikrofluidischen Kanälen des Bioreaktors über längere Zeiträume zum Ziel. Hierzu sollten Zellkulturparameter untersucht und die Nährstoffzufuhr der Zellen gewährleistet werden. Um die Funktionsfähigkeit des mikrofluidischen 3D-Bioreaktors zu bestätigen sollten dann verschiedene Experimente durchgeführt werden. Hierzu sollten beispielsweise die Reaktionen von Endothelzellen auf Scherstress-Bedingungen getestet werden. Weiterhin sollte der neue mikrofluidische Bioreaktor dazu genutzt werden, um eine Entzündungsreaktion zu simulieren und Rekrutierungsprozesse von Immunzellen zu beobachten. Mit Hilfe von polykationischen Peptoiden, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Bräse, Institut für Organische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie synthetisiert wurden, sollte der transendotheliale Transport mit Hilfe des neu entwickelten Bioreaktors untersucht werden.

Verschiedene Tests zur Zytotoxizität der Peptide sowie deren Aufnahme in Endothelzellen unter statischen Bedingungen sollten durchgeführt werden, um deren Verwendbarkeit als ‚Drug Delivery‘ Systeme zu bestätigen. Weiterhin sollte so eine Aussage über die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der endothelialen Aufnahme getroffen werden.

Durch die Biokompatibilität der Polymerfolie bzw. des Bioreaktors sollte eine Ko-Kultur von Endothelzellen auf der inneren Seite der Kanäle und einer organotypischen Zellkultur auf der äußeren Seite der Kanäle realisiert werden. Die äußere Kammer befindet sich in einem zweiten abgeschlossenen System (Abbildung 9), sodass eine Kanal-unabhängige Versorgung ermöglicht werden kann. Eine Matrix-unterstützte, organotypische Zellkultur könnte beispielsweise durch die Kultivierung von Zellen in einem bioabbaubaren Hydrogel erzielt



werden. Die Verwendung von Hydrogelen aus einem verzweigten azidmodifizierten Polyethylenglykol-Grundgerüst, dass über Click-Chemie mit Peptiden quervernetzt wird, um die Ausbildung der 3D-Struktur fördern, soll in weiterführenden Studien realisiert werden.

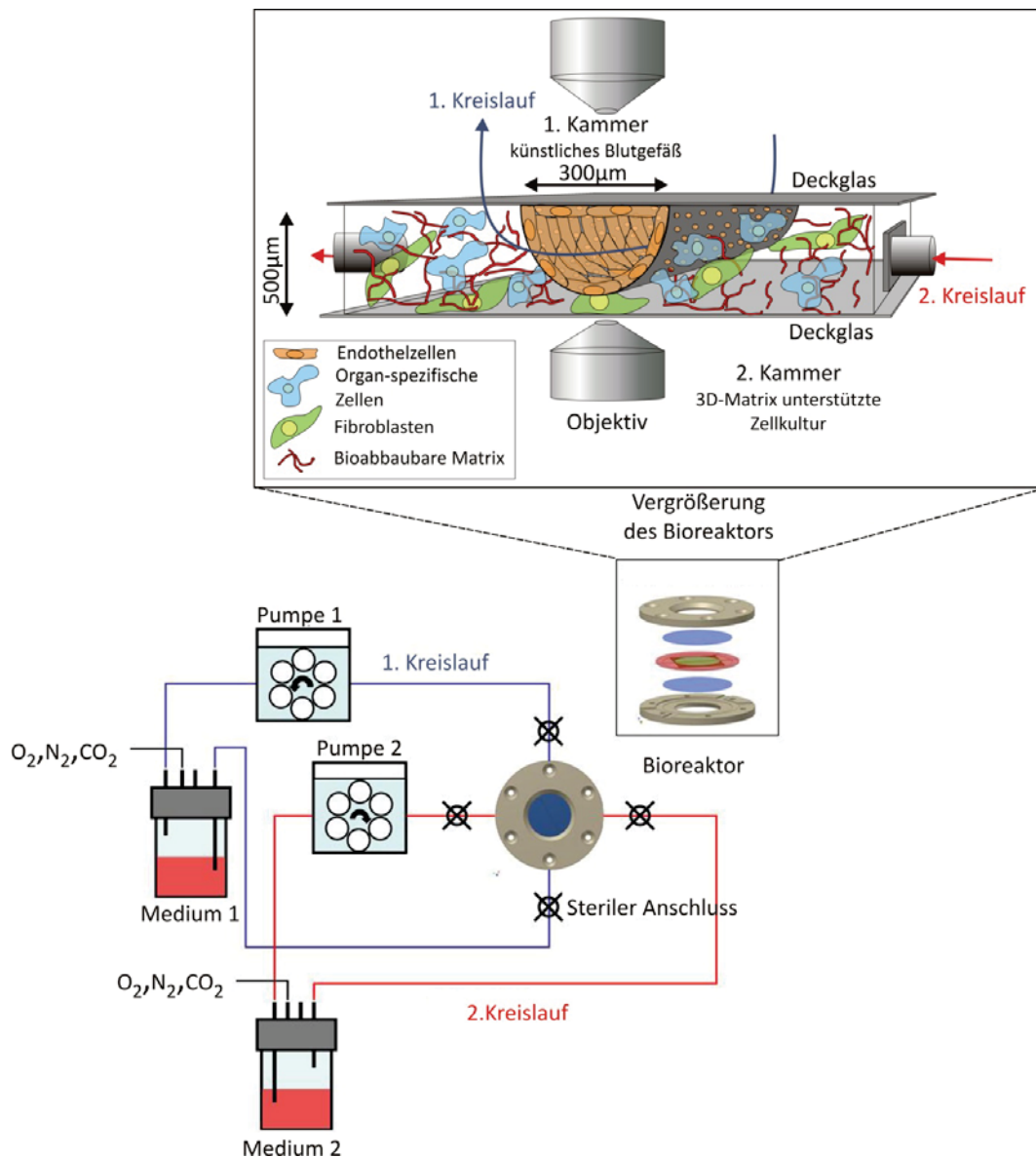


Abbildung 9: Schematische Darstellung des mikrofluidischen 3D-Bioreaktors. Der Bioreaktor besteht aus einem artifiziellem Blutgefäß umgeben von einem weiteren Kompartiment mit unabhängigen Kreisläufen. Erste schematische Skizze eines möglichen Aufbaus.



4 ERGEBNISSE

4.1 Entwicklung der porösen Mikrokanäle

SMART-Technologie

Die Entwicklung des mikrofluidischen Bioreaktors erfolgte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Giselbrecht am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG 1) am Karlsruher Institut für Technologie. Die mikrotechnischen Arbeiten wurden von Alexander Gerwald durchgeführt. Das Thermoformen der dünnen Polycarbonatfolien erfolgte an der Thermoformanlage des Instituts für Biologische Grenzflächen. Verwendet wurde das mikrotechnische Thermoformverfahren mittels Gasdruck, das in Abschnitt 2.5 beschrieben wurde. Abbildung 10 zeigt den patentierten Prozess zur Herstellung der porösen dünnwandigen Mikrokanäle.

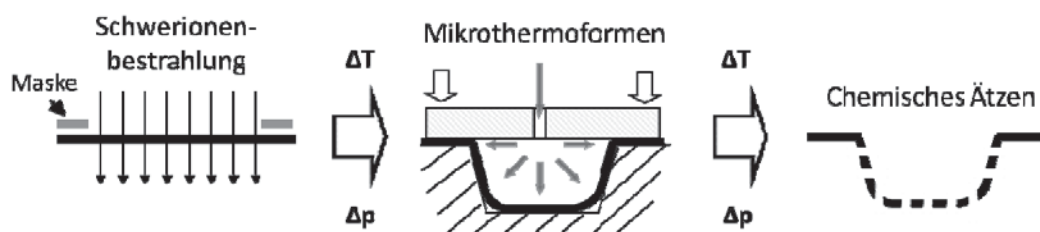


Abbildung 10: Prozessschema der Herstellung poröser Mikrokanäle. Mikrothermoformen einer zuvor mit Schwerionen bestrahlten Polymerfolie und anschließendem chemischen Ätzen (modifiziert nach Giselbrecht et al., 2008).^[121]

Die folgenden Abschnitte zeigen die Herstellung der thermogeformten, porösen Mikrokanäle, die die Hauptelemente des neu entwickelten Boyden Chambers sowie des Bioreaktors darstellten.

4.2 Entwicklung des 3D-Boyden Chamber Systems

Zur Etablierung der Kultivierung von Endothelzellen (ECs ‚endothelial cells‘) in den thermogeformten Halbkanälen wurden zunächst nicht-mikrofluidische, neuartige, dreidimensionale Boyden Chamber Systeme entwickelt. Boyden Chambers sind Transwellkammern, die zur Untersuchung von Zellmigration und Invasion von Zellen eingesetzt werden können.^[3, 124] Hierbei werden beispielsweise Endothelzellen auf einer flachen, porösen Membran in einem oberen Kompartiment ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend kann der Transport von Substanzen o.ä. durch das Endothel auf der porösen Membran in ein zweites darunterliegendes, mit Medium-gefülltes Kompartiment detektiert werden. Das Schlüsselement des neu entwickelten Boyden Chamber Systems stellte der poröse, gekrümmte Mikrokanal dar, der anstelle der flachen Membran mit



homogener Porenverteilung eingesetzt wurde. Dieser repräsentierte das künstliche Blutgefäß, durch welches der transendotheliale Transport untersucht werden konnte.

Die Mikrokanäle wurden aus einer kommerziell erhältlichen Schwerionen-behandelten Polycarbonat-Folie (PC, it4ip, Belgien, Dicke 65 μm , 10^6 Ionen/ cm^2) hergestellt (Abbildung 11 d). Hierzu wurden die Folien in einem verriegelbaren Werkzeug in der Mikrothermoformanlage nach dem Prinzip mit Kulissenmasken geformt.^[122, 123] Zunächst wurde die Folie zwischen die beiden Hälften des Formwerkzeuges geklemmt (Abbildung 11 e). Das kreisförmige Formwerkzeug wurde durch mechanische Mikrobearbeitung mit einem einzelnen, zentral gelegenen geraden Spalt (Länge 20 mm, Breite und Tiefe 300 μm) hergestellt. Die Formplatte wurde von einer porösen Metallfritte unterstützt, die in die untere Hälfte des Formwerkzeuges eingesetzt und mit einer Vakuumpumpe zur Evakuierung der Prägeform verbunden wurde. Während des Evakuierens wurde die geklemmte Polymerfolie soweit erhitzt bis sie weich genug war, um mit Hilfe der angelegten Druckdifferenz geformt werden zu können. Das Formen erfolgte in einem erweichten Zustand der Polymers, sodass die latenten Ionenspuren erhalten blieben.^[118] Die Tiefe des geformten Mikrokanals kann hierbei durch Formtemperatur und -druck kontrolliert werden. Um Kanäle mit einer halbrunden Form herzustellen, die die Krümmung eines Blutgefäßes darstellen, wurden die Folien mit einer Temperatur von 157°C und einem Druck von 2,6 MPa nur 250 μm tief eingepreßt. Während der Gasdruck aufrechterhalten wurde, wurde die Polymerfolie abgekühlt, um die neue dreidimensionale Form der Folie „einzufrieren“ (Abbildung 11 e). Bei einer Temperatur von etwa 50°C wurde der Gasdruck dann weggenommen und das Formwerkzeug für die manuelle Entnahme des geformten Mikrokanals geöffnet. Danach wurden die geformten Folien geätzt, um die latenten Ionenspuren zu Poren definierter Größe zu öffnen (Abbildung 11 f). Der Ätzprozess wurde bei 70°C für 3 h in Natronlauge (NaOH), dem ein Detergenz zugesetzt wurde, durchgeführt. Die Folien wurden dann zweimal gewaschen, indem sie in deionisiertes Wasser getaucht und zum Schluss mit Stickstoffgas getrocknet wurden.

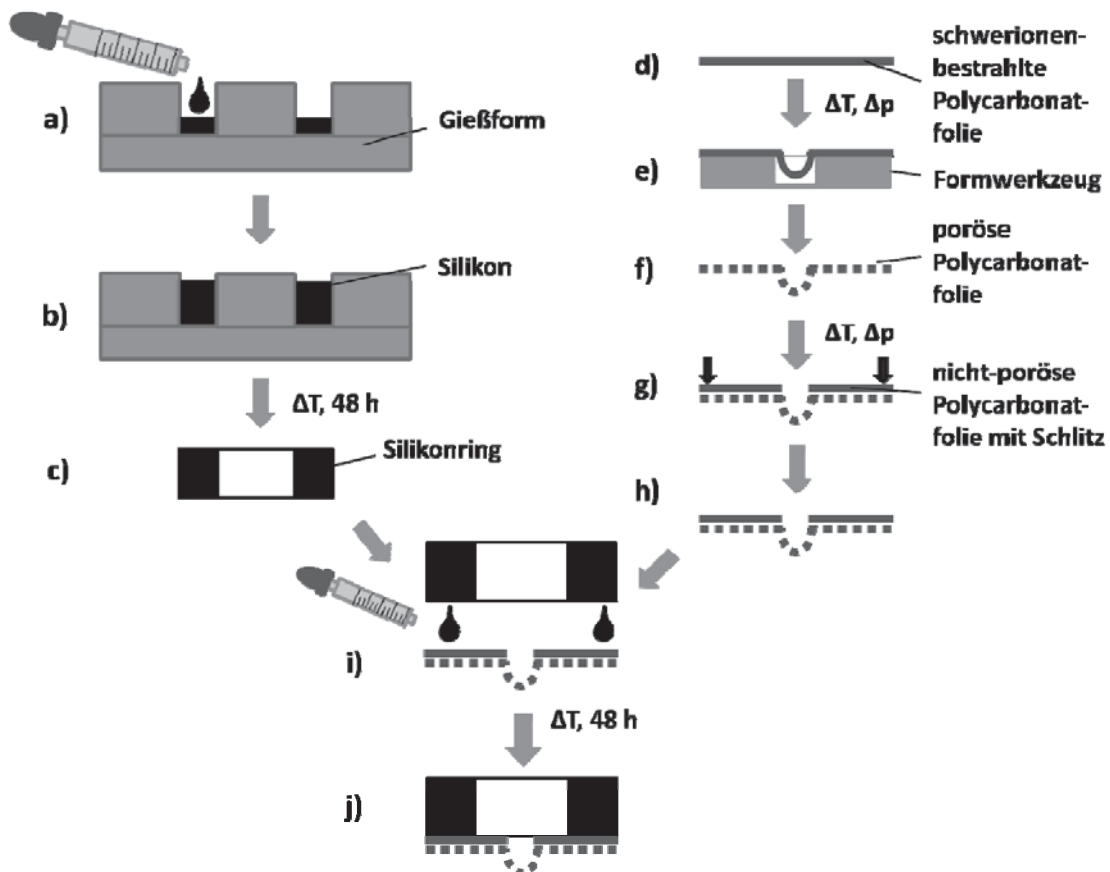


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses des Boyden Chamber Inserts.

Die Kombination aus mikrotechnischem Thermoformen und anschließendem Ätzen der zuvor eingebrachten latenten Ionenspuren ist ein sehr robuster Prozess. Um eine gleichbleibende Qualität der porösen Mikrokanäle zu gewährleisten und um sicherzustellen, dass die Poren zuverlässig geöffnet wurden, wurden sogenannte Druckabfalltests durchgeführt. Die Öffnung der Poren ist die wesentliche Grundvoraussetzung für nachfolgende Zellkulturversuche. Die geätzten Folien wurden zurück in das Thermoformwerkzeug eingesetzt und ein einseitiger Gasdruck von 1 MPa angelegt. Folien mit offenen Poren zeigten einen charakteristischen Druckabfall. Die angewendeten Ätzprotokolle wurden so entwickelt, dass sie eine spezifische Porengröße ergaben. Für die ersten verwendeten Halbkanalstrukturen, die dann in den neu entwickelten Boyden Chambers eingesetzt wurden (Abschnitt 4.2), wurden Poren mit einem Durchmesser von $4,10 \pm 0,08 \mu\text{m}$ erzeugt (Abbildung 12b). Die durch die SMART-Technologie hergestellten porösen Mikrokanäle wurden mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie (REM) charakterisiert (Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie). Verwendet wurde das SUPRA 60 VP Mikroskop von Carl Zeiss SMT, ausgestattet mit einem EDX-Detektor (XFlash 5010) der Firma Bruker. REM ist eine hochauflösende Mikroskopieform, bei der in der Elektronenquelle erzeugte Elektronenstrahl das abzubildende Objekt abstrahlt. Um Wechselwirkungen mit Molekülen in der Luft zu vermeiden, erfolgt die Messung im Hochvakuum. Damit bei der Untersuchung von

Polymeren ein Aufladen der Oberfläche durch die Elektronen vermieden werden kann, werden diese oft mit einer dünnen Edelmetallschicht (hier: Gold) überzogen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeichnen sich durch eine hohe Tiefenschärfe aus. Das verwendete Mikroskop ermöglicht eine Vergrößerung von 12 – 1.000.000 x.^[125]

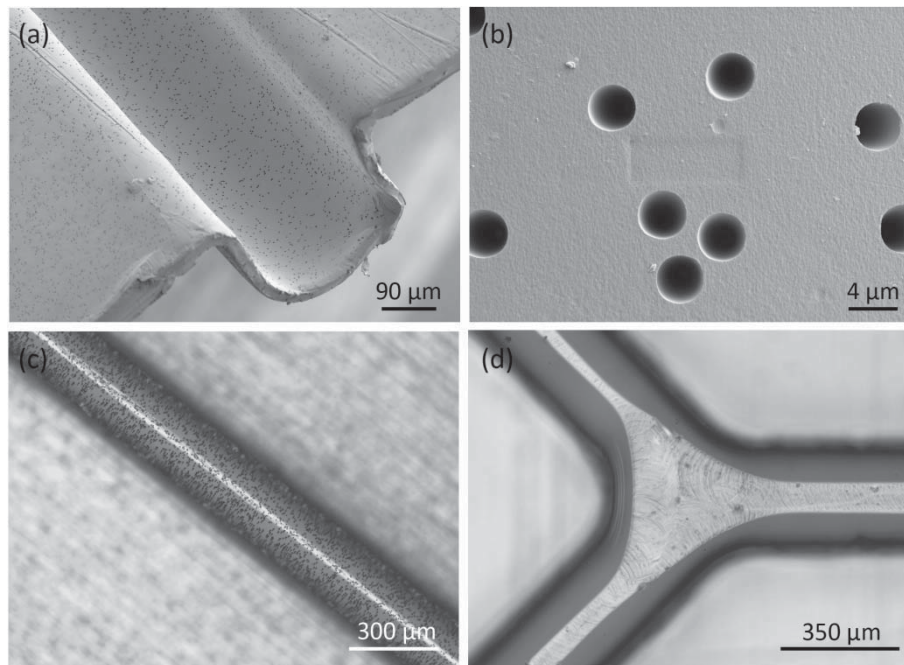


Abbildung 12: REM-Aufnahme des durch die SMART-Technologie hergestellten porösen Mikrokanals (Querschnitt, seitlich) (a) und Poren am Boden des Mikrokanals (b). Aufsicht auf den linearen, porösen (c) und den verzweigten (d) Mikrokanal (Zeiss Axioskop).

Abbildung 12a und Abbildung 13 zeigen den Querschnitt eines dünnwandigen, porösen Mikrokanals mit einem Durchmesser von ca. 300 µm. Die Polycarbonat (PC)-Membran wurde mit einer Fluenz von $10^6/\text{cm}^2$ bestrahlt, was nach dem Ätzen zu einer entsprechenden Porendichte führte (Abbildung 12b). Durch den Formprozess wurde die Polymerfolie dreidimensional in eine evakuierte Formkavität verstreckt. Die Membran besaß dadurch eine gewisse Verteilung der Dicke abhängig von dem lokalen Verstreckungsgrad. In dem hier gezeigten Beispiel konnte die geringste Dicke mit ca. 25 µm am Kanalboden nachgewiesen werden (Abbildung 13).

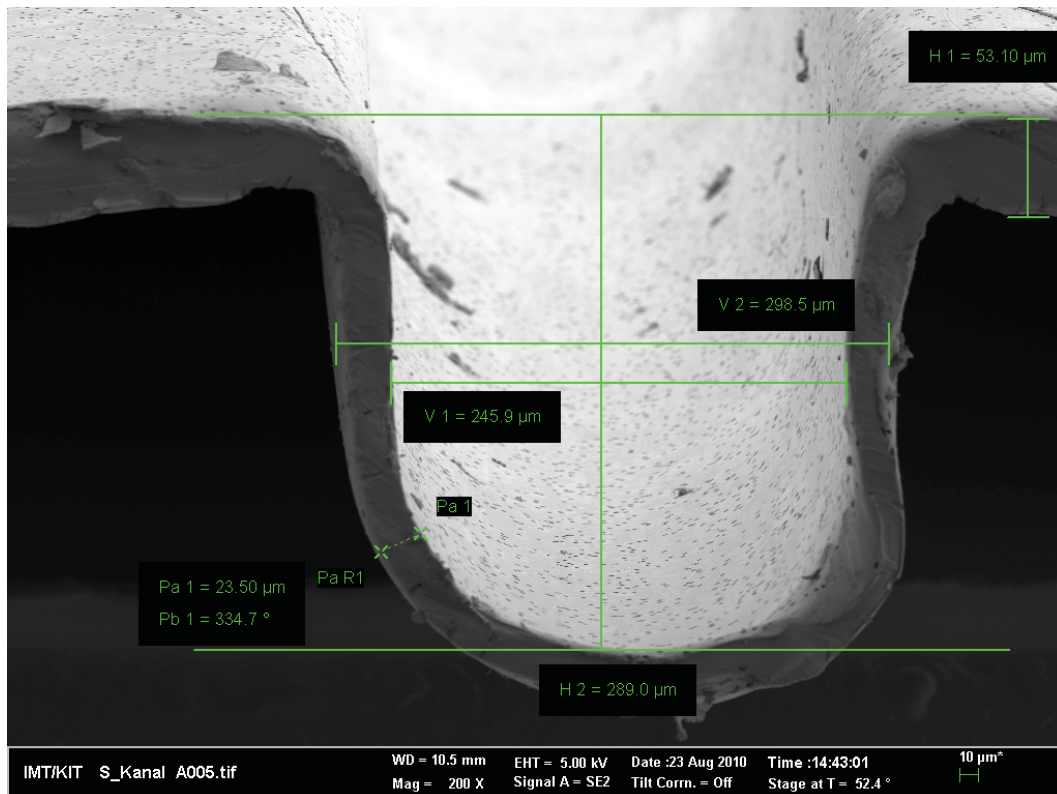


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme (REM) des durch die SMART-Technologie hergestellten porösen Mikrokanals (Querschnitt, frontal, mit Abmessungen). Scale bar = 10 µm.

Da der Transport von Substanzen durch den Endothellayer nur im thermogeformten Bereich, also durch den gekrümmten Halbkanal, stattfinden sollte, wurde eine zweite planare und nicht-poröse PC-Folie (it4ip) mit einem spaltförmigen, rechteckigen Durchbruch auf die thermogeformte Membran gesetzt, um alle Poren außerhalb des Kanals zu verschließen (Abbildung 11 g). Dies ermöglichte die Untersuchung des transendothelialen Transports lediglich durch die poröse Kanalstruktur. Die nicht-poröse Folie wurde bei einer Temperatur von 147°C und einem mechanischen Druck von etwa 20 MPa auf die nicht-geformte planare Ebene der thermogeformten Folie gebondet (Abbildung 11 h und Abbildung 14 c). Zuletzt wurde der Stapel aus den beiden gebondeten Membranen mit einem Durchmesser von 32 mm kreisförmig ausgestanzt. Auf der Oberseite des Membranstapels wurde im Anschluss ein Silikonring befestigt, um das Insert mit dem porösen Mikrokanal in eine 6-Well Platte einsetzen zu können (Abbildung 11 i und Abbildung 14 a, b). Dieser Silikonring besaß einen Außendurchmesser von 32 mm und einen Innendurchmesser von 24 mm und war mit zwei Paaren gegenüberliegender 1,5 mm dicken Vorsprünge ausgestattet, wodurch das Insert höhenvariabel in das Well eingesetzt werden konnte. Zur Fertigung dieses Rings wurde eine zweiteilige Gießform aus Polymethylmethacrylat (PMMA) maschinell hergestellt (Abbildung 11 a). Abbildung 14 d zeigt die Gießform dieser Silikonringe. In diese Gießform wurde entgastes Silikon (Vorstufe) (Sylgard 184, Dow Corning, nach Protokoll des Herstellers) gegeben und bei 60°C über Nacht quervernetzt (Abbildung 11 b). Der Ring wurde aus der Form herausgelöst und mit Hilfe einer weiteren dünnen Silikonschicht auf die den Mikrokanal enthaltene Folie geklebt (Abbildung 11 i, j und Abbildung 14 b).

Die Abbildung 14 d, e zeigen schematisch die Herstellung von Boyden Chambers mit der gekrümmten Kanalstruktur im 6-Well Format als eine Anwendungsmöglichkeit. Die hergestellten Inserts können in kommerziell erhältliche 6-Well Kammern eingesetzt werden. Für die Verwendung in High Throughput Screening (HTS) Experimenten wäre es möglich, die Inserts mit den gekrümmten Kanäle durch Einsatz entsprechender Formwerkzeuge in einem 96-Well Format herzustellen.

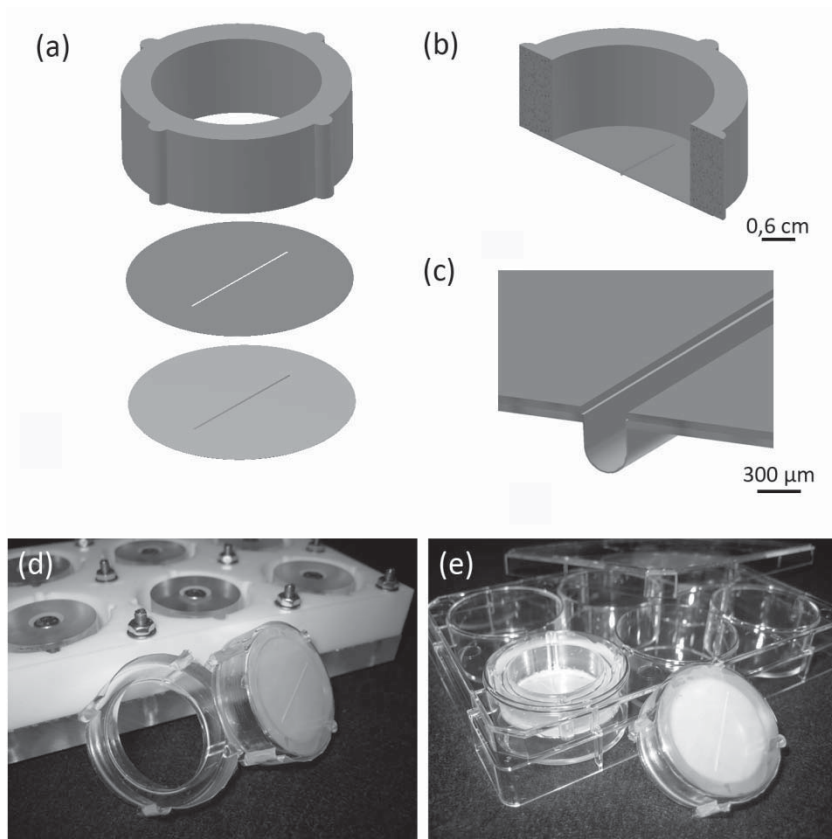


Abbildung 14: Schematische Darstellung des neu entwickelten Boyden Chamber Systems mit gekrümmtem Mikrokanal. (a) Die nicht-poröse PC-Folie (rot) wurde auf die poröse Folie (grau) neben den Mikrokanal gebondet. Der Folienstapel wurde dann an einem Silikonring (türkis) befestigt. (b) Schematischer Querschnitt des Silikoninserts mit porösem Mikrokanal. (c) Vergrößerte Darstellung des gebondeten Mikrokanals. (d) Gießkörper zur Herstellung der 6-Well Platten-basierten Inserts. (e) 6-Well Platte mit endgültigem Boyden Chamber mit gekrümmten Mikrokanal.^[110]

Durch die Entwicklung unterschiedlicher Formwerkzeuge war es möglich, Kanäle verschiedener Größen und Geometrien herzustellen. Dies ermöglicht eine optimale Anpassung der Kanalstrukturen an unterschiedliche Versuchsbedingungen. Es wurden Kanäle mit 300 μm und 1 mm Breite, sowohl gerade als auch verzweigt, geformt (Abbildung 12c, d). Die Variation von Formtemperatur und -druck beeinflusst die Formtiefe der Kanäle. Durch nicht vollständiges Einformen der Polymerfolie wurden halbkreisförmige, gekrümmte Kanal-Querschnitte erzeugt. Bei der Verwendung dieser Kanäle als künstliche Blutgefäße konnten dadurch Krümmungsradien besser angepasst werden.

Die Herstellung und die biologischen Untersuchungen wurden teilweise bereits in Hebeiss et al. (2012) veröffentlicht.^[110]

4.3 Einsatz als 3D-Boyden Chamber

4.3.1 Folien-Beschichtung

Um die Kultivierung der Endothelzellen auf den PC-Folien, die zur Herstellung der 3D-Boyden Chambers verwendet wurden, zu etablieren, wurden Tests an planaren PC-Folienstücken durchgeführt. Dazu wurden HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)-Zellen verwendet. Die PC-Folien wurden mit verschiedenen Reagenzien behandelt, um das bestmögliche Zellwachstum zu erzielen. Die Hälfte der Folienstücke wurde einer UV-Bestrahlung unterzogen. Zusätzlich wurden bestrahlte sowie nicht-bestrahlte Folien mit Fibronectin bzw. Kollagen beschichtet. Fibronectin und Kollagen sind Bestandteile der Extrazellulärmatrix (EZM) und stellen *in vivo* die Grundlage für das Wachstum der Endothelzellen dar.

Bereits 30 min nach Beginn der Kultivierung der HUVEC-Zellen auf den PC-Folien zeichnete sich ein deutliches Ergebnis ab. Auf der unbehandelten PC-Folie (nicht-porös Abbildung 15a und porös Abbildung 17a) wuchsen die Zellen nur sehr schlecht an, nur wenige Zellen begannen fokale Adhäsionspunkte zu bilden. Alle anderen Behandlungen, sowohl die UV-Bestrahlung als auch Fibronectin- und Kollagen-Beschichtung, erwiesen sich förderlich für das Anwachsen der Zellen. Nach 30 min zeigten sich hier deutlich adhärenente Zellrasen (Abbildung 15 – Abbildung 18). Nach 24 h waren konfluente Zellrasen erkennbar. Auf den unbehandelten Folien zeigten sich auch mehrere Stunden nach Beginn der Kultivierung nur wenige adhärenente Zellen (Abbildung 19).

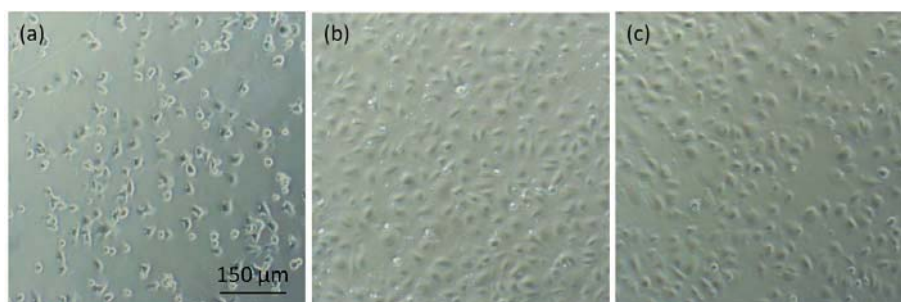


Abbildung 15: Kultivierung von HUVEC-Zellen auf nicht-poröser, nicht-bestrahlter PC-Folie. HUVEC-Zellen wurden auf unterschiedlich beschichteten nicht-porösen PC-Folien in einer 24-Well Platte bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Aufnahme ca. 30 min nach Ausplattieren. (a) nicht-poröse, unbehandelte PC-Folie. (b) nicht-poröse, Fibronectin-beschichtete PC-Folie. (c) nicht-poröse, Kollagen-beschichtete PC-Folie. Lichtmikroskopische Aufnahme.

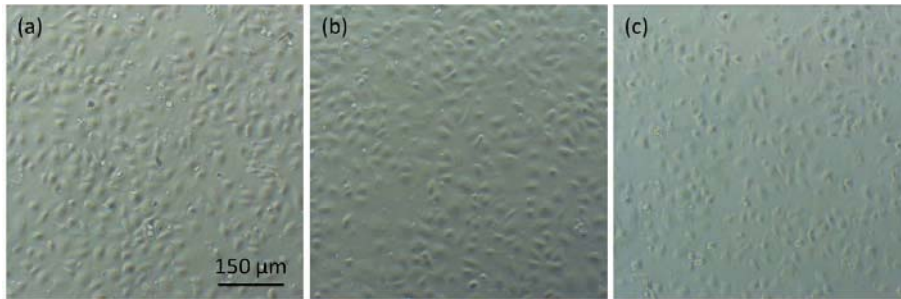


Abbildung 16: Kultivierung von HUVEC-Zellen auf nicht-poröser UV-bestrahlter PC-Folie. HUVEC-Zellen wurden auf unterschiedlich beschichteten nicht-porösen, UV-bestrahlten PC-Folien in einer 24-Well Platte bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Aufnahme ca. 30 min nach Ausplattieren. (a) nicht-poröse, UV-bestrahlte PC-Folie. (b) nicht-poröse, UV-bestrahlte, Fibronectin-beschichtete PC-Folie. (c) nicht-poröse, UV-bestrahlte, Kollagen-beschichtete PC-Folie. Lichtmikroskopische Aufnahme.

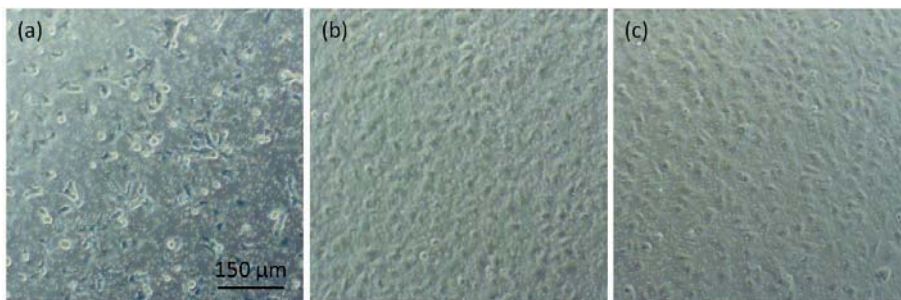


Abbildung 17: Kultivierung von HUVEC-Zellen auf poröser nicht-bestrahlter PC-Folie. HUVEC-Zellen wurden auf unterschiedlich beschichteten porösen PC-Folien in einer 24-Well Platte bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Aufnahme ca. 30 min nach Ausplattieren. (a) poröse, unbehandelte PC-Folie. (b) poröse, Fibronectin-beschichtete PC-Folie. (c) poröse, Kollagen-beschichtete PC-Folie. Lichtmikroskopische Aufnahme.

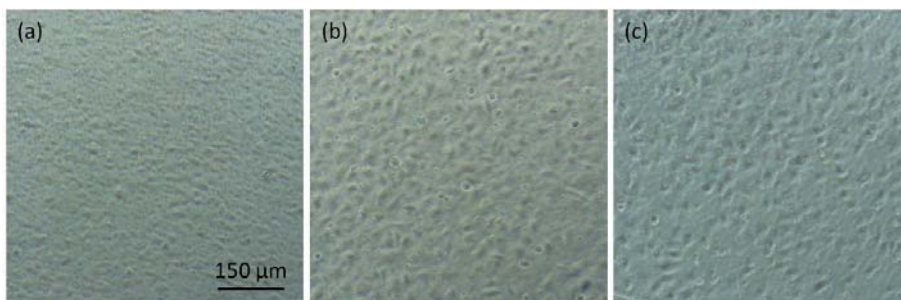


Abbildung 18: Kultivierung von HUVEC-Zellen auf poröser UV-bestrahlter PC-Folie. HUVEC-Zellen wurden auf unterschiedlich beschichteten porösen, UV-bestrahlten PC-Folien in einer 24-Well Platte bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Aufnahme ca. 30 min nach Ausplattieren. (a) poröse, UV-bestrahlte PC-Folie. (b) poröse, UV-bestrahlte, Fibronectin-beschichtete PC-Folie. (c) poröse, UV-bestrahlte, Kollagen-beschichtete PC-Folie. Lichtmikroskopische Aufnahme.

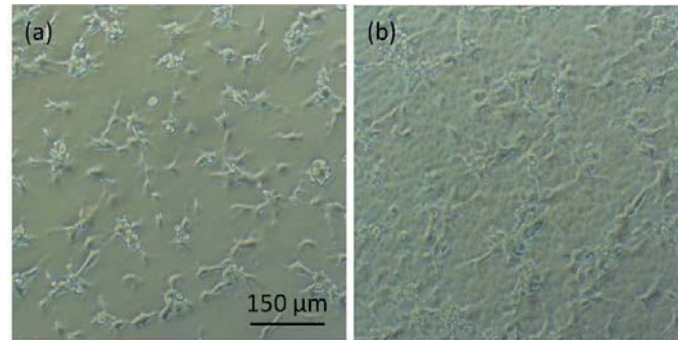


Abbildung 19: Kultivierung von HUVEC-Zellen auf nicht-poröser bzw. poröser unbeschichteter PC-Folie. HUVEC-Zellen wurden auf unbeschichteten nicht-porösen bzw. porösen PC-Folien in einer 24-Well Platte bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Aufnahme ca. 5 h nach Ausplattieren. (a) nicht-poröse, unbeschichtete PC-Folie. (b) poröse, unbeschichtete PC-Folie. Lichtmikroskopische Aufnahme.

Eine Behandlung der PC-Folie war somit notwendig für die Verwendung zur Kultivierung von HUVEC-Zellen. Eine Beschichtung mit Fibronectin oder Kollagen schien für die Behandlung der späteren Kanalstrukturen besser geeignet zu sein, da hierbei alle Stellen im Kanal gleichmäßig behandelt werden können. Bei der UV-Bestrahlung könnte die thermogeformte Folie durch die nur senkrechte Bestrahlung ungleichmäßig verändert werden. In der Literatur findet sich für die Kultivierung von Endothelzellen am häufigsten eine Beschichtung mit Fibronectin.^[33, 87, 105, 109] Deshalb wurde zur Kultivierung von Endothelzellen für die weitere Verwendung der geschlossenen Mikrokanäle eine Beschichtung mit Fibronectin gewählt. In den offenen Halbkanälen der Boyden Chambers wurde eine Kollagen-Beschichtung der Kanäle durchgeführt.

4.3.2 Kultivierung von Endothelzellen im porösen Mikrokanal

Erste biologische Experimente zeigten die Biokompatibilität des neu entwickelten 3D-Boyden Chamber Inserts. HUVECs konnten erfolgreich in der beschichteten porösen Halbkanalstruktur zur Konfluenz kultiviert werden (Abbildung 20). Mikroskopieaufnahmen verschiedener Bereiche im Kanal zeigten die vollständige Besiedelung der Kanalinnenwände mit Endothelzellen. Die konfluente Besiedelung der gekrümmten quasi-dreidimensionalen Geometrie („gekrümmte Konfluenz“) ist Voraussetzung für nachfolgende Experimente zur Untersuchung des transendothelialen Transports.

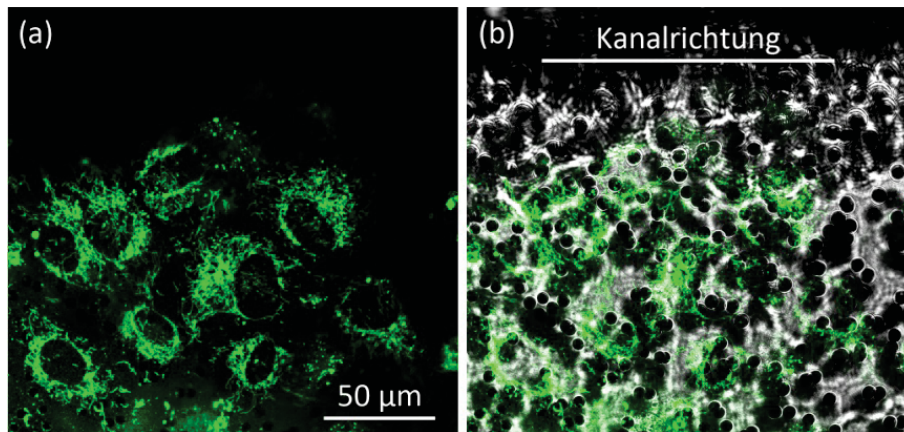


Abbildung 20: Konfluente Wachstum von Mitochondrien-markierten HUVECs im porösen, Kollagen-beschichteten Halbkanal. Zellen wurden mit MitoTracker® Green inkubiert. (a) Fluoreszenzaufnahme der Mitochondrien, grün. (b) Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

4.3.3 Dichtigkeitstest des Endothels

Neben der Bestimmung der Konfluenz des Zellrasens im porösen Halbkanal mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie in Live Cell Imaging Experimenten wurde die Dichtigkeit mit Hilfe des Markermoleküls Fluorescein-Natrium getestet. Unter den physiologischen Bedingungen befindet sich Fluorescein-Natrium in seiner geladenen Form. In diesem Zustand kann es den Zelllayer nur durch passive, parazelluläre Diffusion passieren und würde somit nicht durch einen intakten dichten Endothellayer transportiert.

Eine 4 mM Fluorescein-Natrium Lösung in EGM-2 (,Endothelial Cell Growth Medium-2') wurde in das obere Kompartiment gegeben. Das untere Kompartiment wurde mit EMG-2 befüllt und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden Aliquots aus beiden Kompartimenten entnommen und die Fluorescein-Natrium Konzentration bestimmt (FLUOstar Optima Multidetektion Microplate Reader, BMG Labtech, Anregung 485 nm, Emission 520 nm).

Die einstündige Inkubation mit Fluorescein-Natrium wird gewöhnlich für Fluorescein Leakage-Tests verwendet und wurde gewählt, um die Zellen nicht durch eine längere Inkubationszeit zu schädigen. Während einer Stunde konnte wegen der kleinen Austauschfläche durch den porösen Kanal kein Gleichgewicht in den Konzentrationen des oberen und des unteren Kompartiments erreicht werden. Dies konnte jedoch bei längeren Inkubationszeiten erzielt werden. Der konfluente Endothellayer im Mikrokanal verhinderte nahezu vollständig den Transport des Fluorescein-Natriums in das untere Kompartiment (etwa 2% verglichen mit der Kontrollmembran ohne Endothellayer) und konnte dadurch für Transportversuche verwendet werden (Abbildung 21). Die Ergebnisse des Fluoresceintests waren vergleichbar mit denen aus normalen Boyden Chambers mit über 96% bzw. 90% Inhibierung des Durchtritts.^[126, 127]

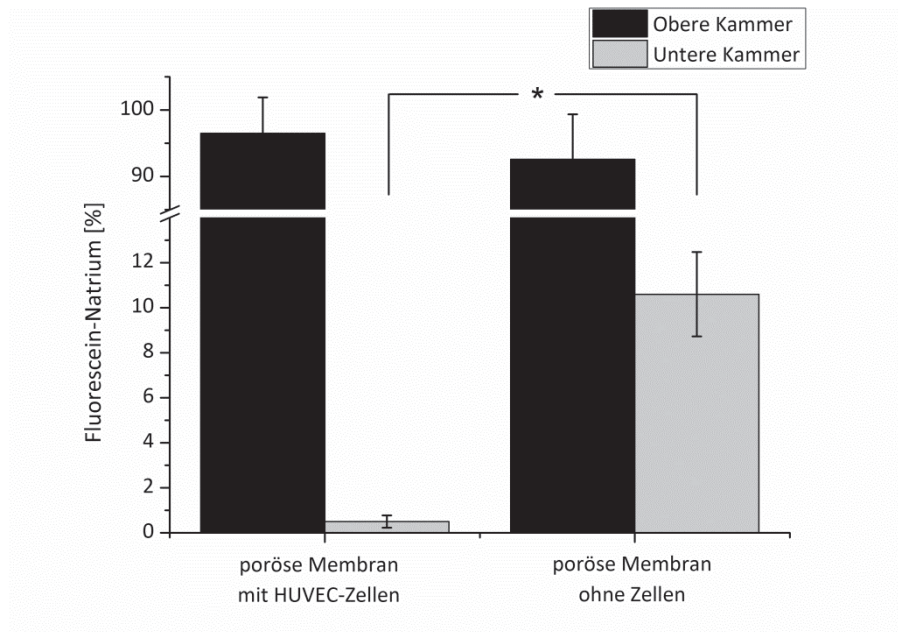


Abbildung 21: Dichtigkeitstest des Zellrasens mit Fluorescein-Natrium. Die Zellen im oberen Kompartiment wurden mit einer 4 μ M Fluorescein-Natrium Lösung in EGM-2 für 1 h inkubiert. Die Fluorescein-Natrium Konzentration wurde im oberen und unteren Kompartiment sowohl in der Kontrolle als auch in der Probe bestimmt. Die poröse Membran mit dem konfluenten Zellrasen zeigte einen signifikant geringeren Durchtritt von Fluorescein-Natrium im Vergleich zur Kontrollmembran. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung ($n = 6$), $*p < 0,05$.

4.3.4 Wachstum von Endothelzellen auf flacher vs. gekrümmter Oberfläche

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede in der Zellmorphologie von Endothelzellen bei der Kultivierung auf einer gekrümmten Oberfläche im Gegensatz zu einer flachen Oberfläche wurde die Verteilung von F-Aktin in HUVECs untersucht. Eine gekrümmte Oberfläche und das damit verbundene gekrümmte Wachstum der Endothelzellen spiegelt dabei besser die *in vivo*-Situation im Blutgefäß wider.^[108] HUVECs wurden auf kommerziell erhältlichen flachen Boyden Chamber Oberflächen sowie auf der gekrümmten Kanaloberfläche des neu entwickelten Boyden Chambers kultiviert. F-Aktin wurde mit Hilfe von Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Zur Markierung von fokalen Adhäsionen wurde ein humaner Anti-Vinculin Antikörper verwendet. Wie bereits Frame und Sarelius (2000) zeigen konnten, zeigte der konfluente Endothellayer innerhalb des porösen Mikrokanals und somit auf einer gekrümmten Oberfläche eine verringerte Ausbildung von Aktin-Fibrillenbündeln, sogenannter Stress Fibers, und fokalen Adhäsionspunkten im Vergleich zur flachen Oberfläche der kommerziell erhältlichen Boyden Chamber unter statischen Bedingungen.^[108] Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Stress Fibers hauptsächlich entlang der langen Achse der Endothelzellen orientiert zu sein schienen. Bei den Zellen auf der flachen Oberfläche zeigte sich keine solche Orientierung (Abbildung 22). Somit konnte ein deutlicher Unterschied in der Ausbildung zellulärer Strukturen beim Wachstum der Endothelzellen auf einer gekrümmten Oberfläche nachgewiesen werden. Eine *in vivo*-ähnlichere Darstellung der

Krümmungsradien der Zellen ist folglich wichtig für eine verlässliche Untersuchung zellulären Verhaltens.

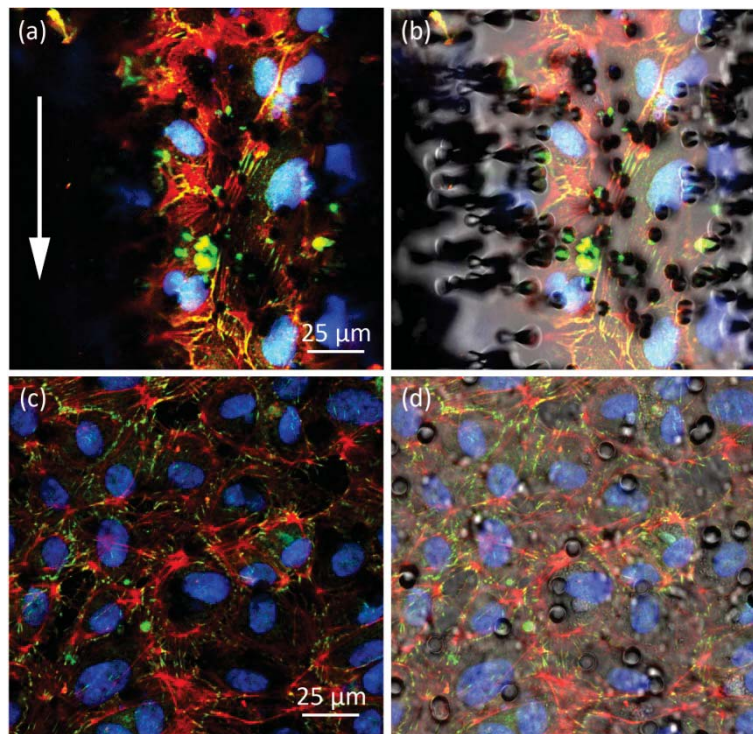


Abbildung 22: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von HUVECs im porösen, gekrümmten Halbkanal im Vergleich zu gewöhnlichen flachen Boyden Chambers. HUVECs wurden in beiden Einheiten für 3 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die Zellen mit Rhodamin-Phalloidin zur Markierung der Aktinfasern gefärbt. Eine Immunfärbung mit einem Anti-Vinculin Antikörper zeigte die fokalen Adhäsionen. Zellen auf der gekrümmten Oberfläche zeigten weniger fokale Adhäsionen und Aktin Stress Fibers. Die Aktin Stress Fibers der Zellen im gekrümmten Mikrokanal waren in Kanalrichtung ausgerichtet (Pfeil). (a) und (b) HUVECs im gekrümmten, porösen Mikrokanal. (c) und (d) HUVECs auf der flachen Membran eines gewöhnlichen Boyden Chambers. Überlagerung von Hoechst 33342 (blau), Rhodamin-Phalloidin (rot) und Vinculin (grün). (b) und (d) zeigen die Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

4.3.5 Transport polykationischer Peptide

Um die Einsetzbarkeit des neu entwickelten Boyden Chambers zur Untersuchung von transendothelialen Transportprozessen zu überprüfen, wurde der Transport polykationischer Peptide als ‚Drug Delivery‘ Systeme getestet (Erläuterungen zu den eingesetzten Peptiden siehe Abschnitt 4.6). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Rhodamin-markierte CPPos, die in das obere Kompartiment gegeben wurden, durch das Endothel in die untere Kammer transportiert wurden. In der unteren Kammer wurden die transportierten Peptide dann von den dort zuvor kultivierten HUVECs aufgenommen. Aufgrund der Rhodamin-Markierung der Peptide konnte diese mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Hierdurch konnte auch die Konfluenz des Zellrasens nochmals überprüft werden (Abbildung 23).

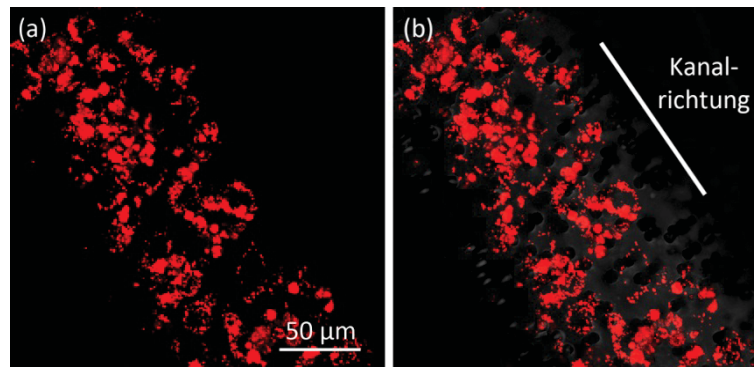


Abbildung 23: Wachstum von HUVEC-Zellen inkubiert mit einem Rhodamin-markierten Peptoid im porösen, Kollagen-beschichteten Mikrokanal. HUVECs wurden im Mikrokanal bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit Rhodamin-markiertem Peptoid über 3 Tage inkubiert. (a) Rhodamin-markiertes Peptoid, rot. (b) Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Im Vergleich zum Durchtritt von Peptoiden durch den Kontrollkanal ohne Endothellayer wurden beim Transport durch den konfluenten Endothellayer im porösen Mikrokanal weniger Peptide in den unten befindlichen HUVECs nachgewiesen (Abbildung 24). In diesem Fall mussten die Peptide zuerst von den Endothelzellen aufgenommen, durch das Endothel transportiert und auf der gegenüberliegenden Seite wieder entlassen werden. Dies bedeutete einen weiteren Hinweis für die Dichtigkeit des Endothels.

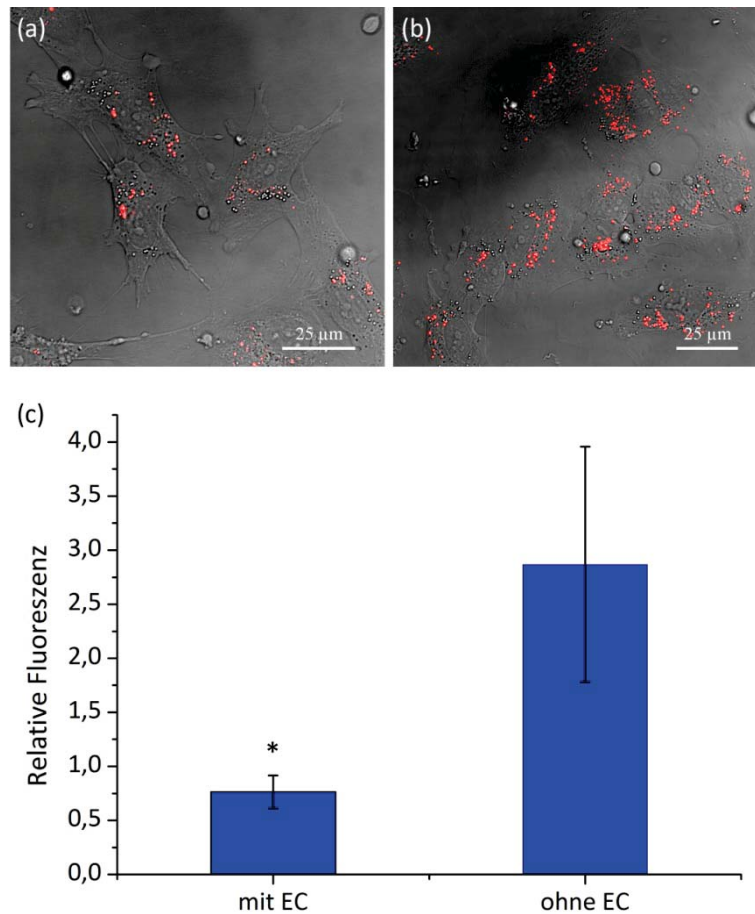


Abbildung 24: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der HUVEC-Zellen im unteren Kompartiment des 3D-Boyden Chambers nach Inkubation mit Rhodamin-markierten Peptoid. HUVEC wurden im porösen, Kollagen-beschichteten Mikrokanal über 8 Tage kultiviert. Dann wurden sie für 3 Tage mit einem Rhodamin-markierten Peptoid inkubiert. Zur Visualisierung des transendothelialen Transports der Peptide wurden zusätzlich HUVECs im unteren Kompartiment kultiviert. (a) HUVECs unter dem Mikrokanal mit konfluentem Endothellayer. (b) HUVECs unter dem Kontrollkanal ohne Endothel. Rhodamin-markierte Peptide, rot; Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). (c) Relative Fluoreszenz der Peptide in Endothelzellen im unteren Kompartiment unter dem Mikrokanal mit konfluentem Endothellayer im Vergleich zur Kontrolle ohne Endothelzellen (LAS AF Lite Software). Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung ($n = 7$), $*p < 0,05$.



4.4 Entwicklung des mikrofluidischen Bioreaktors

Nachdem bereits die HUVEC-Zellkultur in den nicht-mikrofluidischen Kanälen etabliert werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt die Herstellung des eigentlichen 3D-Bioreaktors weiter verfolgt. Abbildung 25 zeigt erneut die schematische Darstellung des mikrofluidischen Bioreaktors.

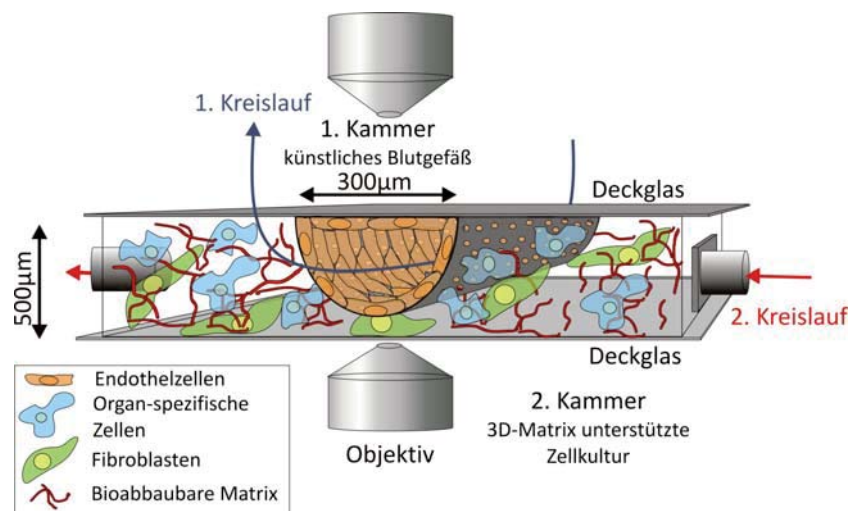


Abbildung 25: Schematische Darstellung des mikrofluidischen 3D-Bioreaktors. Der Bioreaktor besteht aus einem künstlichen Blutgefäß umgeben von einem weiteren Kompartiment. Erste schematische Skizze eines möglichen Aufbaus.

Zum Thermoformen der Kanalstrukturen für den mikrofluidischen Bioreaktor wurde eine Schwerionen-behandelte (10^6 Tracks/cm²) „belgische“ PC-Folie mit einer Dicke von 65 µm (LOT 241108/R/801) verwendet. Das Thermoformen erfolgte bei einem Druck von 26 bar und einer Temperatur von 157°C. Hierdurch wurden gerade oder verzweigte Halbkanalstrukturen geformt. Durch die Wahl unterschiedlicher Formwerkzeuge konnten die unterschiedlichsten Kanalgeometrien und -dimensionen erzeugt werden. Im offenen Kanalsystem wurden vorwiegend Kanäle mit einer Breite sowie Tiefe von 300 µm verwendet (4.2). Die Kanäle im mikrofluidischen Bioreaktor hatten vorwiegend folgende Dimensionen: Länge 20 mm, Breite 1 mm, Tiefe 250 µm. Um die Tiefe der geformten Kanäle zu kontrollieren, konnten Formtemperatur und -druck variiert werden. Um Kanäle mit einem gekrümmten bzw. halbkreisförmigen Querschnitt zu erzeugen, und damit die Krümmung von Blutgefäßen zu imitieren, wurden die Kanäle nicht vollständig in das rechteckige Formwerkzeug eingeformt. Die PC-Folien, die die geformten Halbkanalstrukturen enthielten, wurden mit Natronlauge unter Zusatz eines Detergenzes geätzt, um die Poren zu öffnen. Die Ätzdauer wurde der Kanalgeometrie angepasst, um eine vollständige Öffnung der Poren zu gewährleisten. Im Fall der 1 mm Kanäle betrug die Ätzdauer 4,5 h bei 70°C. Anschließend wurden sie mit einer nicht-porösen Membran thermisch gebondet (148°C, 20 MPa), um den Halbkanal zu einem Vollkanal zu schließen (Abbildung 26). Diese zweite Membran enthielt zwei Öffnungen, die zu den beiden Kanalenden führten, um den Anschluss eines

mikrofluidischen Systems zu gewährleisten. Um auch das untere Kompartiment des Bioreaktors über ein mikrofluidisches System mit frischem Medium versorgen zu können, wurden seitlich des Kanals zwei weitere Öffnungen mit einem Abstand von 20 mm in den Membranstapel gestanzt. Der Membranstapel wurde auf eine Größe von 32 mm im Durchmesser angepasst.

Abbildung 26 zeigt die frontale sowie die seitliche Ansicht des Querschnitts eines dünnwandigen, porösen Mikrokanals mit einem Durchmesser von etwa 300 μm . Die Fluenz bzw. Porendichte der PC-Membran beträgt $10^6/\text{cm}^2$.

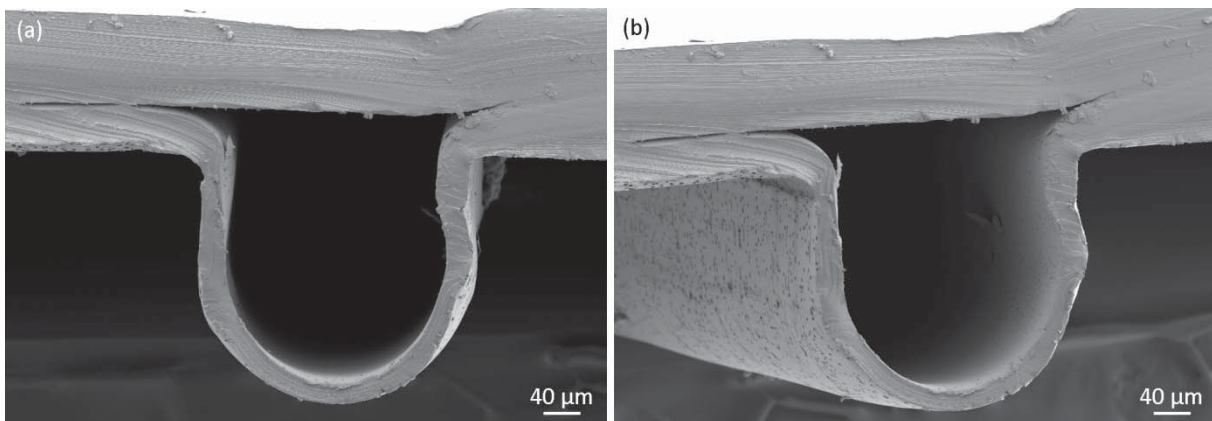


Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme der porösen, geschlossenen Kanalstruktur. Hergestellt wurde der Mikrokanal durch die SMART-Technologie, chemisches Ätzen und thermisches Bonden. (a) Frontalansicht. (b) seitliche Ansicht zur Verdeutlichung der Poren in der Kanalwand.

Dann wurde die Membran mit einem flachen Silikon-Zylinder mit einem Durchmesser von 35 mm und einer Höhe von etwa 5 mm verbunden. Diese Silikonplatte bildete den Körper des Bioreaktors. Im Silikon waren vier Anschlüsse (2-0950, neoLab) enthalten, die in den Kanal sowie in das untere Kompartiment führten und so das Anschließen eines Pumpensystems ermöglichten.

Die poröse Membran wurde danach auf der Unterseite mit einem Silikon-Ring mit einer Höhe von 500 μm , einem Innendurchmesser von 2,4 cm und einem äußeren Durchmesser von 35 mm verbunden, der die untere Kammer des Bioreaktors bildete. Zum Verschließen der unteren Kammer wurde ein Deckglas mit dem Silikon-Ring verklebt. Zum Aushärten des Silikons wurde der Bioreaktor für 2 h bei 60°C erhitzt. Mikrokanal und untere Kammer wurden durch Durchströmen mit Druckluft unter Wasser auf mögliche Risse oder Undichtigkeiten getestet.

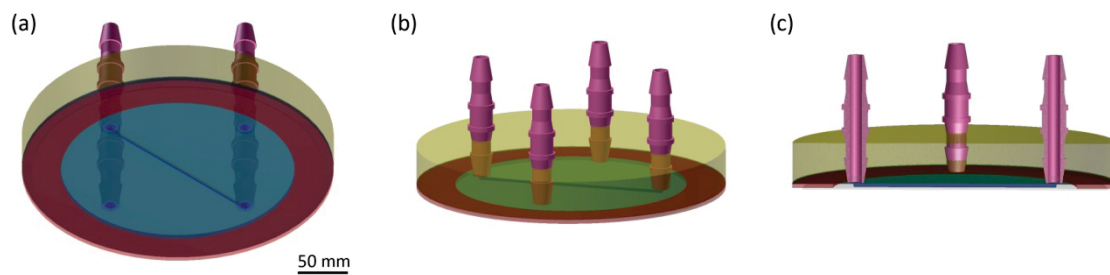


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Bioreaktors mit porösem Mikrokanal und angrenzendem unterem Kompartiment. (a) Die poröse gebundene Polycarbonatfolie (blau) mit thermogeformtem Mikrokanal wurde auf der Oberseite mit einer Silikonscheibe (grau) verbunden. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde ein Silikonring (rot) angeklebt, der das untere Kompartiment begrenzt. Dieses Kompartiment wurde mit einem Deckgläschen verschlossen. Beide Kompartimente sind mit jeweils zwei Schlauchverbindern (rosa) versehen, die den Anschluss an ein Pumpsystem ermöglichen. (b) Schematischer Querschnitt durch den Bioreaktor.

Mit Hilfe der SMART-Technologie konnten so folienbasierte Mikrokanäle verschiedener Größe, Form und Porosität hergestellt werden. Das Ätzen der geformten Kanalstrukturen in Natronlauge führte zum Öffnen der Poren innerhalb der geformten Polycarbonat (PC)-Folie. Die verwendete Folie besaß eine Porendichte von 10^6 Poren/cm². Durch eine Veränderung der Ätzdauer konnte die Porengröße für verschiedene Anwendungen variiert werden. Der poröse, gekrümmte Mikrokanal stellte das Hauptelement im mikrofluidischen Bioreaktor dar. Durch die Beschichtung der Kanalinnenseite mit verschiedenen Proteinen der Extrazellulärmatrix (EZM) wurde die natürliche Umgebung des Blutgefäßes dargestellt. Die Beschichtungen mit Fibronectin oder Kollagen zeigten hierbei die beste Wirkung (4.3.1). Die Transparenz aller Bauteile sowie die geringe Bauhöhe des Bioreaktors ermöglichte es, Zellen in beiden Kompartimenten, dem Mikrokanal sowie der unteren Kammer, mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie zu untersuchen.

Abbildung 28 zeigt den fertigen mikrofluidischen Bioreaktor, angeschlossen an ein Pumpsystem. Beim Durchströmen des porösen Mikrokanals mit einer Farblösung (hier: Kristallviolett) penetriert diese durch die Poren des Kanals in das untere Kompartiment. Dies war eine erste Bestätigung der Funktionalität des Bioreaktors.



Abbildung 28: Mikrofluidischer Bioreaktor mit gekrümmtem porösem Mikrokanal. Eine Farblösung (Kristallviolett) wurde über die Einlassöffnungen durch den porösen Mikrokanal gepumpt (Pumpsystem, Ibidi). Der Farbstoff gelangte durch die Poren im Kanal in das untere Kompartiment.

Zweite Generation

Zur Erleichterung der Handhabbarkeit des Bioreaktors wurde der oben beschriebene Aufbau modifiziert (Abbildung 29). Die Silikonscheibe als Basis des Bioreaktors wurde durch eine PMMA (Polymethylmethacrylat)-Platte ersetzt. In diese Platte wurden Luer-Anschlüsse gefräst, die genau in die Enden des Mikrokanals bzw. die untere Kammer führten. Diese ermöglichten eine leichtere und stabilere Verbindung mit den Schläuchen des Pumpsystems. Die Verklebung der thermogeformten Polycarbonatfolie mit der PMMA-Platte sowie dem Silikonring der unteren Kammer erfolgte mit einer Klebefolie (VHBTM, ScotchTM). Hierdurch verringerte sich die Produktionszeit, da keine Wartezeiten zur Aushärtung des Silikons mehr entstanden. Mit dem neu entwickelten Verfahren konnten sehr stabile und leichter handhabbare mikrofluidische Bioreaktoren hergestellt werden.

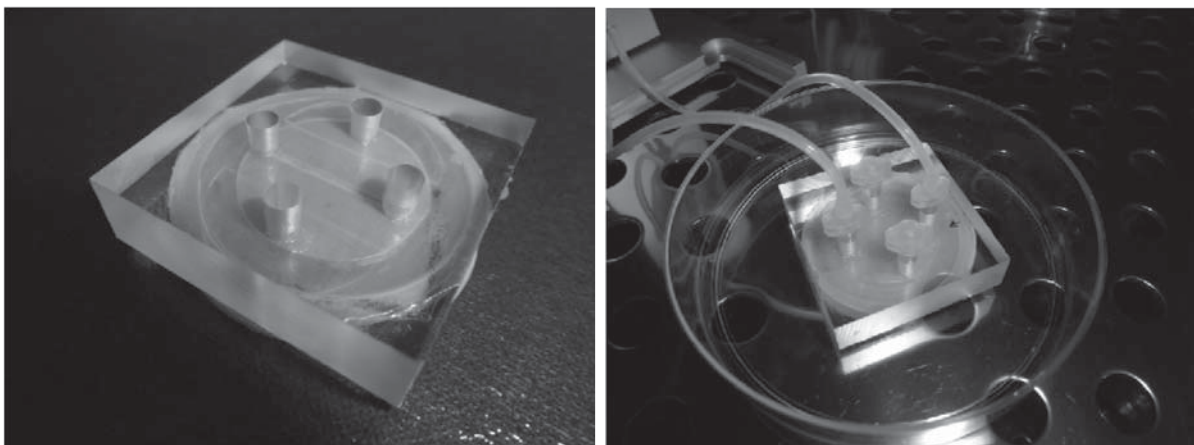


Abbildung 29: Mikrofluidischer Bioreaktor, zweite Generation. Links: Der durch Thermoformen hergestellte poröse, gekrümmte Mikrokanal wurde thermisch gebondet und mit einer PMMA-Platte verbunden. Diese enthielt vier Luer-Anschlüsse für die Verbindung mit dem Mikrokanal bzw. der unteren Kammer. Rechts: Bioreaktor angeschlossen an ibidi Pumpsystems.



Eine Patentanmeldung für die Entwicklung der mikrofluidischen Bioreaktoren erfolgte im Juni 2012. Die Herstellung und die biologischen Untersuchungen wurden teilweise als Manuskript in Nature Immunology eingereicht.^[128]

4.5 Test der Einsetzbarkeit des mikrofluidischen Bioreaktors

4.5.1 Mikrofluidischer Bioreaktor

Zur Etablierung der Kultivierung von HUVEC-Zellen in künstlichen Kapillaren unter fluidischen Bedingungen wurden mit der SMART-Technologie gerade Kanalstrukturen aus einer Polycarbonat (PC)-Folie (65 μm) hergestellt und geätzt. Die porösen Halbkanäle hatten eine Länge von 20 mm, eine Breite von 1 mm und eine Tiefe von ca. 250 μm .

Im Bioreaktor wurde der poröse Kanal mit einer nicht-porösen PC-Folie durch thermisches Bonden verschlossen und von einer unteren Kammer mit einer Höhe von 500 μm und einem Innendurchmesser von 2,4 cm begrenzt. Kanal und untere Kammer enthielten separate Anschlüsse, um eine Versorgung der Zellen mit Medium zu gewährleisten.

4.5.2 Einbringen der Endothelzellen

Zum Sterilisieren wurde der Bioreaktor mit Mikrokanal über Nacht in eine γ -Strahlungsquelle (Cobalt 60, Atomic Energy Ltd.) gegeben. Zur besseren Kultivierung der HUVEC-Zellen wurde die PC-Folie im Kanal mit Fibronektin beschichtet. 45 μl Fibronektinlösung (1 mg/ml; 33010-018, Life TechnologiesTM) wurden mit 5 μl PBS verdünnt und in den Kanal gegeben (4 μg Fibronektin/6 μl Kanalvolumen; Endkonzentration 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Kanal sowie die untere Kammer wurden anschließend mit PBS gewaschen. Um den porösen Kanal zu konditionieren und dadurch die spätere Luftblasenbildung durch Ausgasen aus den verwendeten Materialien zu verhindern, wurden Kanal und untere Kammer mit EGM-2 Medium befüllt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zur Besiedelung des Mikrokanals mit Endothelzellen wurde die Zellsuspension (direkt über die Anschlüsse) in den Kanal gegeben und für 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dann wurde erneut Zellsuspension in den Kanal gegeben, der Bioreaktor um 90° gedreht und wieder für 15 min inkubiert. Dies erfolgte noch zwei weitere Male, um eine vollständige Besiedelung des porösen Kanals mit Endothelzellen zu gewährleisten.^[105] Nach dem Einbringen der Zellen in den Kanal wurden diese für weitere 3 h kultiviert, um deren festes Anwachsen zu ermöglichen. Im Anschluss wurde der Kanal an ein Pumpensystem (ibidi) mit Mediumreservoir angeschlossen, um die Versorgung der Zellen mit frischem Medium zu gewährleisten. Die mit Medium gefüllte untere Kammer wurde mit kurzen Schlauchstücken verbunden und verschlossen (1. Generation) bzw. direkt mit Luer-Verschlusskappen verschlossen (2. Generation). Abbildung 30 zeigt den Aufbau des Bioreaktors mit Pumpensystem.

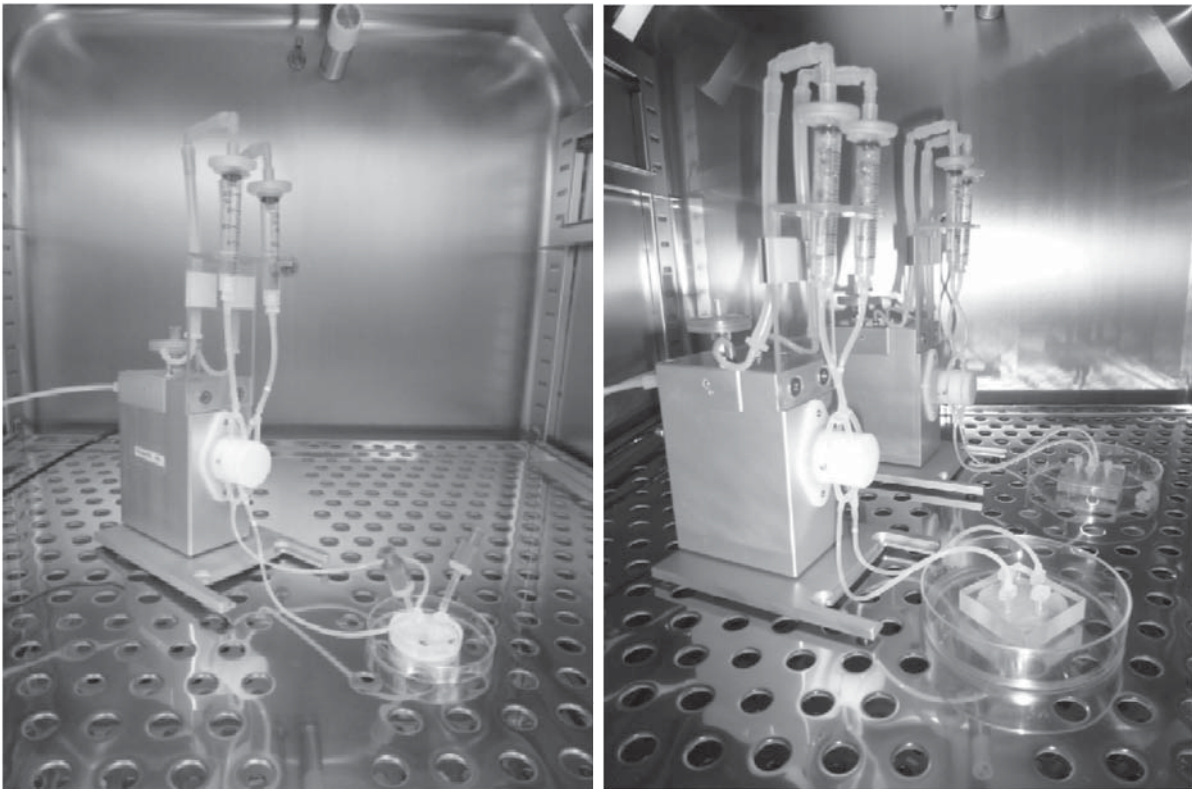


Abbildung 30: Bioreaktor-Aufbau mit mikrofluidischem Bioreaktor, der an ein Pumpsystem (ibidi) angeschlossen ist. Der gesamte Aufbau kann im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ betrieben werden. Links, Bioreaktor 1. Generation. Rechts, Bioreaktor 2. Generation.

Verschiedene spezifische Flussraten konnten durch das Pumpsystem erzeugt werden, um den Einfluss von Scherkräften auf Verhalten und Wachstum der Zellen zu untersuchen. Hierdurch konnten die *in vivo*-Bedingungen verschiedener Blutgefäße simuliert werden. Der eingesetzte 1 mm breite Mikrokanal wurde mit Fließgeschwindigkeiten bis zu 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit Medium durchströmt. Das Medium in den beiden Reservoirs der Pumpe wurde alle drei Tage erneuert. Die Endothelzellen konnten so über einen längeren Zeitraum (über eine Woche) unter fluidischen Bedingungen kultiviert werden.

4.5.3 Flow Visualization und Simulierung

Zur Untersuchung der Flussprofile durch die Mikrokanäle wurden Flow Visualization Experimente in Kollaboration mit Oleg Chebotarev und Lian Leng aus den Gruppen von Dr. Craig Simmons und Dr. Axel Günther an der Universität Toronto durchgeführt. Particle Image Velocimetry (PIV) ist ein optisches Verfahren, mit dem Geschwindigkeitsfelder in der Strömungsmechanik bestimmt werden können. Die zu untersuchenden thermogeformten Mikrokanäle wurden mit einer wässrigen Lösung mit fluoreszierenden Partikeln (FluoSpheres[®] carboxylate-modified microspheres, Molecular Probes[®], Life Technologies[™]) durchströmt. Zudem wurde Tween 20 zu der Lösung zugefügt, um das Anhaften der Partikel an den Kanalstrukturen zu verhindern.



Ein pulsierender Laserstrahl beleuchtete die Partikel im Kanal. Hierbei wurde versucht, die Ebene mit der höchsten Geschwindigkeit der Partikel zu beleuchten. Während eines Pulses wurden zwei Bilder kurz nacheinander aufgenommen. In der Zeit zwischen den beiden Bildaufnahmen bewegten sich die fluoreszierenden Partikel mit ihrer lokalen Strömungsgeschwindigkeit. Aus dem Abstand der Partikel, den sie innerhalb dieser Zeit zurücklegten, wurde die Geschwindigkeit berechnet.^[129-131]

Im Vergleich dazu wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Comsol) entsprechende Flussprofile in den Kanälen simuliert.

Die Flussprofile zweier verwendeter Kanalgeometrien wurden mit Hilfe von CFD (Computational Fluid Dynamics; Strömungsdynamik) berechnet. Die berechneten Höchstgeschwindigkeiten waren 34,1 mm/s für die 1 mm breiten Kanäle mit einer Eingangsflussrate von 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 85,9 mm/s für die 300 μm breiten Kanäle mit einer Eingangsflussrate von 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die berechneten Höchstgeschwindigkeiten befanden sich innerhalb 15% von den durch PIV gemessenen Daten: die maximalen gemessenen Geschwindigkeiten waren hier 40 mm/s und 80 mm/s in den 1 mm bzw. 300 μm breiten Mikrokanälen. Die durch CFD berechneten Scherstress-Raten variierten entlang der Oberfläche der Kanalwand in beiden Kanälen (Abbildung 31). Im 1 mm breiten Kanal, mit einer Eingangsflussrate von 250 $\mu\text{l}/\text{min}$, trat der größte Scherstress am Boden des Kanals mit 4,3 dyn/cm^2 auf. Im 300 μm breiten Kanal, mit einer Eingangsflussrate von 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, traten die höchsten Scherstress-Raten von 15 dyn/cm^2 an den Kanalwänden auf. In Zellkultur-Experimenten mit dem 1 mm breiten Kanal wurden Fließgeschwindigkeiten von bis zu 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingesetzt. Dadurch können Scherkräfte wie sie in Arterien (10 – 70 dyn cm^{-2}) und Venen (1 – 6 dyn cm^{-2}) vorkommen erzielt werden.^[35, 36]

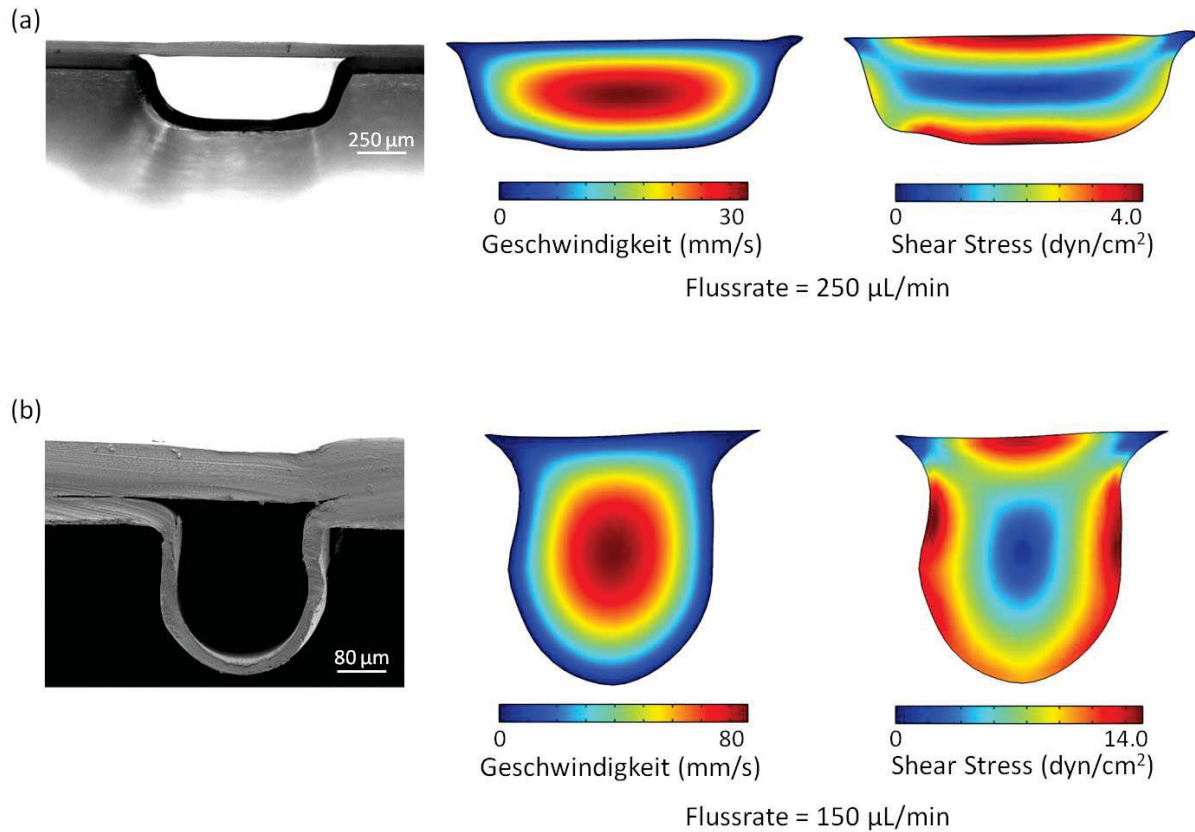


Abbildung 31: ‚Computational Fluid Dynamics‘ Untersuchung der Fließgeschwindigkeit und Scherstress-Profile. (a) 1 mm breite und (b) 300 µm breite Kanäle wurden modelliert, mit den auf den tatsächlichen Kanalgeometrien basierenden Querschnittsflächen (linke Spalte). Die durch CFD berechneten Höchstgeschwindigkeiten (mittlere Spalte) lagen innerhalb 15% der durch mikro-PIV gemessenen Daten. Die berechneten Scherstress-Raten variierten entlang der Oberfläche beider Kanäle (rechte Spalte).

4.5.4 Permeabilitätstest mit dem mikrofluidischen Bioreaktor

Die Permeabilität wurde in Kollaboration mit Michael W.L. Watson und Suthan Srigunapalan aus den Gruppen von Dr. Aaron Wheeler und Dr. Craig Simmons an der Universität Toronto mit Hilfe von FITC-BSA charakterisiert, welches durch die porösen Mikrokanäle geströmt und dessen Fluoreszenzintensität in einem der unteren Kammer nachgeschalteten Kanal gemessen wurde. Wie erwartet wurde die Membranpermeabilität durch die Beschichtung mit Fibronectin und weiter mit Zufügen der Endothelzellen deutlich verringert: verglichen mit den unbeschichteten Membranen wurde die Fluoreszenzintensität im unteren Kompartiment durch die Fibronectin-Beschichtung um 65% und durch die zusätzliche Besiedelung mit Endothelzellen um 71% verringert (Abbildung 32). Da die Experimente aus zeitlichen Gründen nur einmal pro Bedingung durchgeführt werden konnten, konnte keine Fehlerberechnung durchgeführt werden.

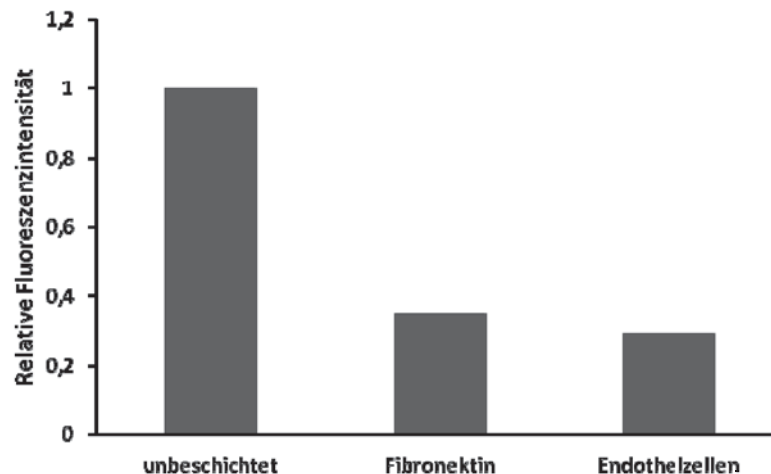


Abbildung 32: Relative Fluoreszenzintensität von FITC-BSA nach Durchtritt aus dem porösen Mikrokanal in das untere Kompartiment des mikrofluidischen Bioreaktors. Getestet wurde der Durchtritt durch die poröse Membran, die Fibronectin-Beschichtung und den Endothellayer. Die Detektion erfolgte mittels Laser-induzierter Fluoreszenz (LIF).

4.5.5 Verhalten von Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen

4.5.5.1 Ausrichtung der Endothelzellen in Flussrichtung

Zur Beurteilung des Wachstums der Endothelzellen im porösen Mikrokanal und der Konfluenz des Zellrasens wurden die über mehrere Tage unter fluidischen Bedingungen kultivierten Zellen mit CellTracker™ Green angefärbt. CellTracker™ färbt das Zytosol der Zellen. Im porösen Mikrokanal war ein konfluenter Endothellayer erkennbar. Die Endothelzellen zeigten eine deutliche Ausrichtung in Richtung des Mediumflusses. Zudem zeigten die Zellen eine langgestreckte Morphologie (Abbildung 33). Auch auf der Deckfolie, an der Oberseite des Kanals, war ein konfluenter Endothellayer erkennbar. Hier zeigten die HUVECs dieselbe langgestreckte Form sowie Ausrichtung in Richtung des Mediumflusses (Abbildung 34). Eine solche Ausrichtung der Endothelzellen in Fluss- bzw. Blutgefäßrichtung konnte bereits *in vivo* nachgewiesen werden.^[40, 41]

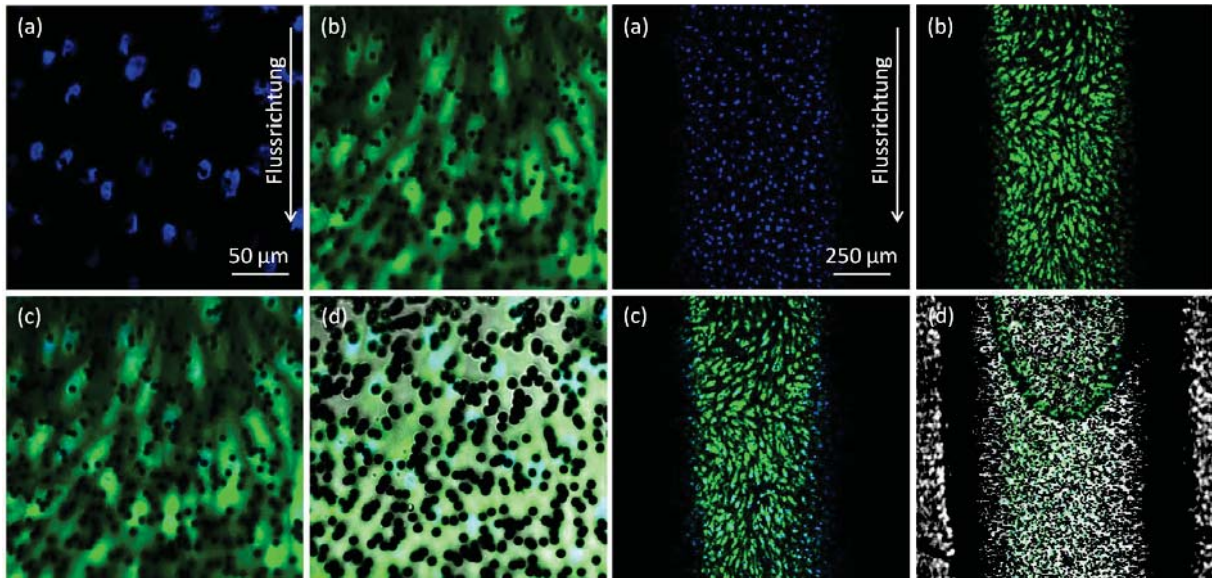


Abbildung 33: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen Mikrokanal (Kanalboden). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 μl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit CellTracker™ Green zur Markierung des Zytosols und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markiertes Zytosol, grün. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung von (a) und (b) mit der Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

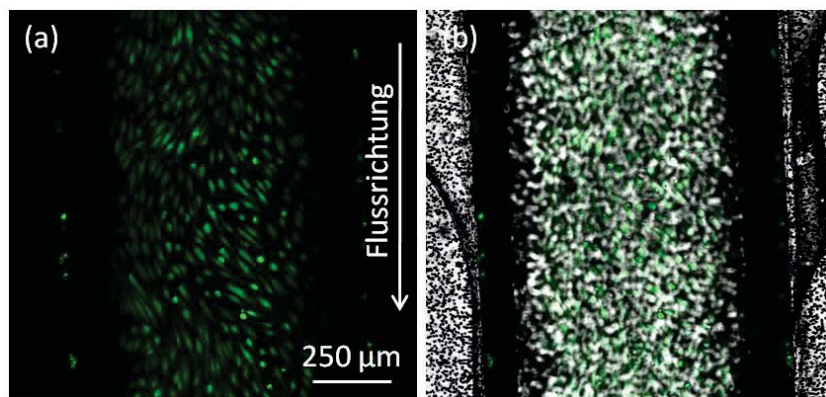


Abbildung 34: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal (Kanaldecke). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 μl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit CellTracker™ Green zur Markierung des Zytosols und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) GFP-markiertes Zytosol, grün. (b) Überlagerung von (a) mit der Hellfeld-Aufnahme des Kanals. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Aufnahmen über die gesamte z-Achse des porösen Kanals bestätigten die vollständige Besiedelung des Kanals mit Endothelzellen. Auch an den äußeren Kanalwänden waren durch diese Aufnahmen Zellen erkennbar (Abbildung 35).

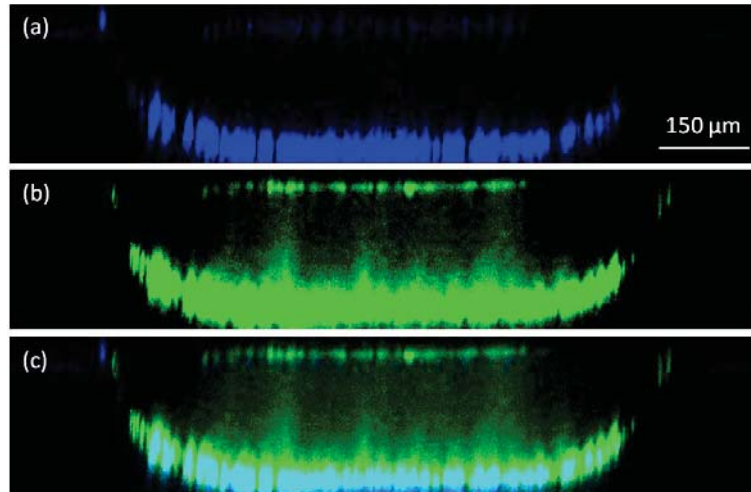


Abbildung 35: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal (z-Stapel). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit CellTracker™ Green zur Markierung des Zytosols und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Um die komplette Besiedelung im porösen Kanal zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 263,9 µm (132 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markiertes Zytosol, grün. (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Es war somit möglich, die *in vivo* vorkommende Ausrichtung der Endothelzellen in Richtung des Blutflusses mit dem mikrofluidischen 3D-Bioreaktor darzustellen. Um weiterhin die Verwendbarkeit dieses Bioreaktors als *in vitro*-Modell des Blutgefäßsystems zu bestätigen, wurden weitere Untersuchungen zur Reaktion der Endothelzellen auf die angelegten Scherkräfte vorgenommen.

4.5.5.2 Stress Fiber Bildung

HUVEC-Zellen wurden unter fluidischen Bedingungen (400 µl/min) über mehrere Tage in einem nicht-porösen bzw. porösen PC-Kanal kultiviert. Es zeigte sich eine deutliche Ausrichtung der Zellen im Kanal. Um zelluläre Strukturen in den Endothelzellen zu visualisieren und damit eine Beurteilung über die Beschaffenheit des Zellrasens sowie der Morphologie der Zellen geben zu können, wurden HUVECs einer Immunfluoreszenzfärbung für Aktin unterzogen. Mit Hilfe von fluoreszierendem Phallotoxin (Rhodamin Phalloidin, R415, Molecular Probes, Life Technologies™) wurde F-Aktin in den Zellen angefärbt. Phallotoxine sind Toxine des Knollenblätterpilzes, die Aktin-Filamente stabilisieren.

Die Mikroskopieaufnahmen zeigten eine erfolgreiche Färbung der Aktin-Filamente in den Zellen. Die unter fluidischen Bedingungen kultivierten HUVEC-Zellen zeigten im Gegensatz zu den unter statischen Bedingungen kultivierten Zellen eine deutliche Ausbildung sogenannter Stress Fibers (nicht-poröser Mikrokanal, Abbildung 36; poröser Mikrokanal, Abbildung 37). Stress Fibers sind hoch geordnete Strukturen bestehend aus Aktin-Filamenten, vernetzenden

Proteinen und Myosin II. Als kontraktile Aktomyosin-Bündel spielen sie eine wichtige Rolle in der Adhäsion, Beweglichkeit und Morphogenese der Zelle. Die Stress Fibers zeigten sich als dicke, gerade Stränge, die in die Richtung der Orientierung der Zellen im fluidischen System ausgerichtet waren. Somit zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Aktin-Gerüst zwischen statisch (Abbildung 38) und unter mikrofluidischen Bedingungen kultivierten Endothelzellen. Die statisch kultivierten Endothelzellen zeigten eine willkürliche Verteilung der Aktinfasern innerhalb der Zelle. Eine Ausbildung dicker Stress Fibers war hier nicht zu beobachten. Auch in der Literatur wird eine solche Ausbildung von parallel angeordneten Stress Fibers unter Scherstress-Bedingungen bestätigt.^[39, 42]

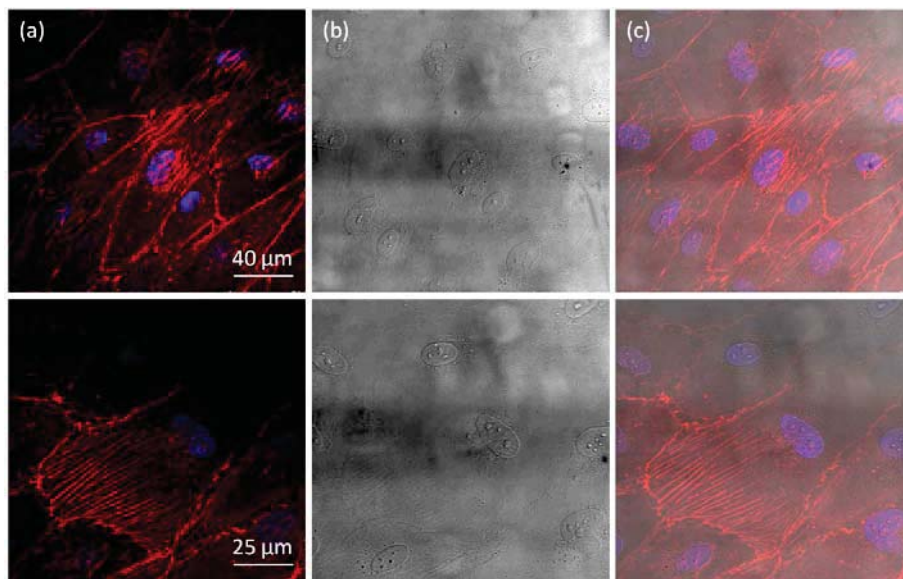


Abbildung 36: Aktin-Färbung mit Rhodamin-Phalloidin in HUVEC-Zellen nach mikrofluidischer Inkubation. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten nicht-porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. HUVEC-Zellen wurden zur Markierung des Aktins mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Zur Visualisierung weiterer zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) Rhodamin-markiertes F-Aktin (rot) und Hoechst 33342-gefärbte Zellkerne (blau). (b) Hellfeld-Aufnahme. (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

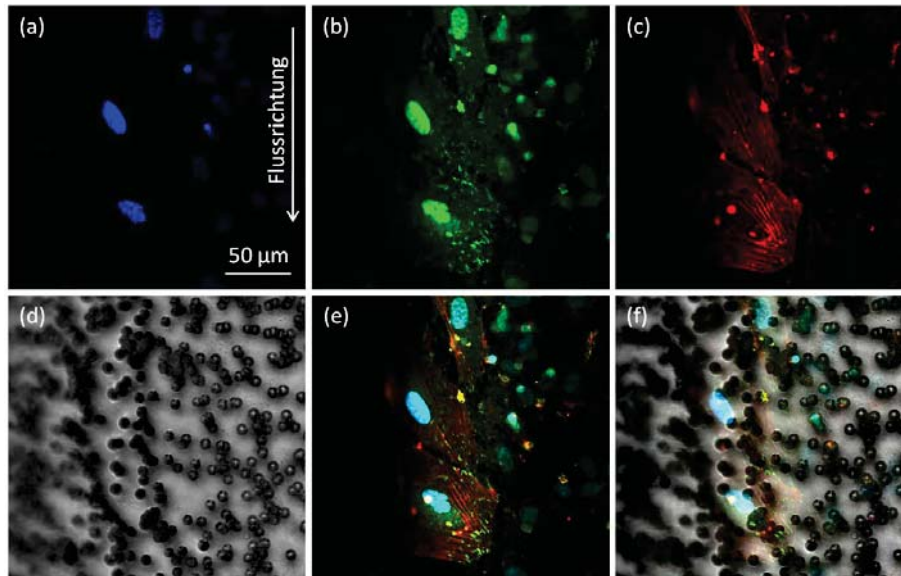


Abbildung 37: Aktin-Färbung mit Rhodamin-Phalloidin und Färbung fokaler Adhäsionspunkte in HUVEC-Zellen nach mikrofluidischer Inkubation. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal unter fluidischen Bedingungen (400 µl/min) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. HUVEC-Zellen wurden zur Markierung des Aktins mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Eine Immunfärbung mit einem Anti-Vinculin Antikörper zeigte die fokalen Adhäsionen. (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) Anti-Vinculin-markierte fokale Adhäsionen, grün. (c) Rhodamin-markiertes F-Aktin, rot. (d) Hellfeldaufnahme der Endothelzellen im porösen Mikrokanal. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

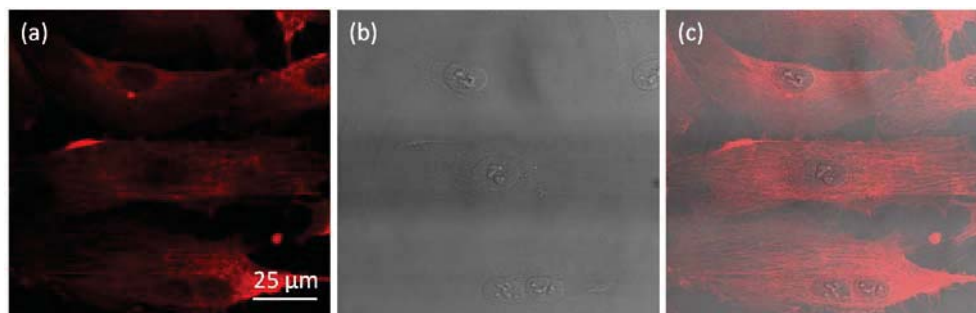


Abbildung 38: Aktin-Färbung mit Rhodamin-Phalloidin in HUVEC-Zellen unter statischen Bedingungen. HUVEC-Zellen wurden zur Markierung des Aktins mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. (a) Rhodamin-markiertes F-Aktin, rot. (b) Hellfeld-Aufnahme. (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

4.5.5.3 Stickstoffmonoxid-Produktion unter fluidischen Bedingungen

Zur weiteren Untersuchung einer Auswirkung von Scherstress auf die Endothelzellen wurde nach dem Kultivieren der Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal eine Färbung zur Überprüfung der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion durchgeführt. Diese Experimente wurden in Kollaboration mit Suthan Srigunapalan aus der Gruppe von Dr. Craig Simmons an der Universität Toronto durchgeführt.

In diesem Versuch wurde ein Kanal wie bereits beschrieben mit HUVEC-Zellen besiedelt und anschließend an ein Pumpensystem (Peristaltik-Pumpe) mit Mediumreservoir und Damper



angeschlossen, um die Versorgung der Zellen mit frischem Medium zu gewährleisten. Nach Kultivierung der Zellen über Nacht unter statischen Bedingungen (Mediumwechsel jede Stunde für eine Minute mit 100 µl Medium) wurde ein Kanal an die Peristaltik Pumpe angeschlossen und für 24 h mit einer Geschwindigkeit von 500 ml/min durchströmt. Der zweite Kanal wurde weiter unter statischen Bedingungen kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen in beiden Kanälen gefärbt, um die NO-Produktion zu bestimmen.

Die Mikroskopieaufnahmen verdeutlichten, dass die unter Scherstress kultivierten Endothelzellen eine erhöhte Fluoreszenz und somit eine gesteigerte NO-Produktion aufwiesen im Vergleich zu den unter statischen Bedingungen kultivierten Kontrollzellen. Eine signifikante Erhöhung der NO-Produktion in den einzelnen Endothelzellen unter Scherstress konnte somit mit Hilfe des mikrofluidischen Bioreaktors bestätigt werden (Abbildung 39).^[39, 45] Dies war ein weiterer Nachweis dafür, dass die Endothelzellen auf den im porösen Kanal angelegten Scherstress reagierten.

Weiterhin zeigte sich, dass im fluidischen Kanal mehr HUVEC-Zellen waren als im statischen. HUVECs schienen unter den natürlichen fluidischen Bedingungen konfluent zu wachsen als unter statischen. Eine solche Beobachtung konnten auch Esch. et al (2011) bestätigen. Hier zeigte sich eine vollständigere Besiedelung der eingesetzten Kanäle mit Endothelzellen über einem bestimmten Grenzwert des Scherstresses.^[109]

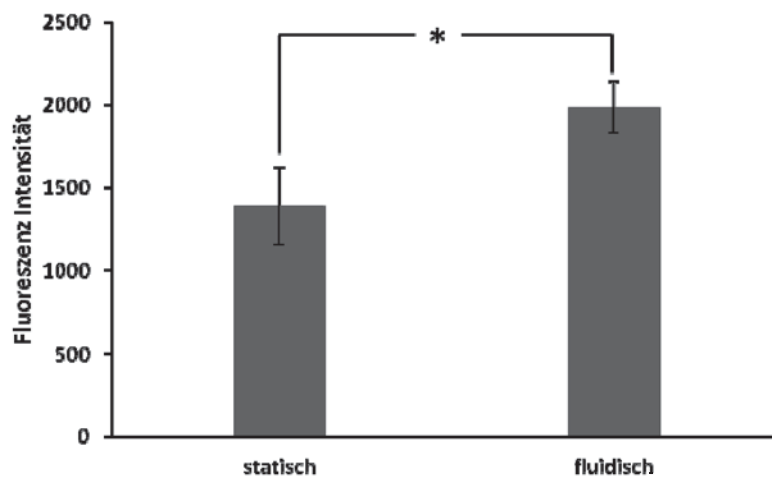


Abbildung 39: Scherstress induzierte NO-Produktion in HUVECs *in vitro*. HUVECs wurden im porösen PC-Kanal kultiviert und über 24 h einem Scherstress von 20 dyn/cm² ausgesetzt. Die Kontrollzellen wurden über den gleichen Zeitraum statisch kultiviert. Signifikante Erhöhung der NO-Produktion bei HUVECs unter Scherstress. Die Daten entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichung (n = 12), *p < 0,05.

4.5.6 Überprüfung der Konfluenz des Endothellayers im porösen Mikrokanal

Zur Überprüfung der Konfluenz des Endothels im porösen Mikrokanal wurde die Ausbildung von Adherence Junctions (Adhäsionsverbindungen) zwischen den einzelnen Zellen untersucht. Diese verbinden die Aktin-Filamente benachbarter Zellen und sorgen dadurch



für eine mechanische Stabilisierung des Endothels. VE-Cadherin spielt als Bestandteil der Adherence Junctions eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Endothels.^[20] Die Ausbildung dieser Adherence Junctions ist somit ein Nachweis für die Konfluenz des Zellrasens.^[109]

Die Adherence Junctions wurden mit einem Antikörper gegen VE-Cadherin markiert. Mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte eine deutliche Ausbildung dieser Verbindungen nachgewiesen werden. Im gesamten Kanal war ein konfluenter Endothellayer erkennbar (Abbildung 40). Nach zweitägiger Inkubation unter fluidischen Bedingungen war noch keine Ausrichtung der Zellen zu erkennen. Nur an vereinzelt Stellen zeigten die Zellen bereits eine etwas langgestreckte Morphologie (Abbildung 41). Dies zeigte, dass die Endothelzellen als Reaktion auf die Scherstress-Bedingungen erst nach einigen Tagen (2-3) begannen sich auszurichten.

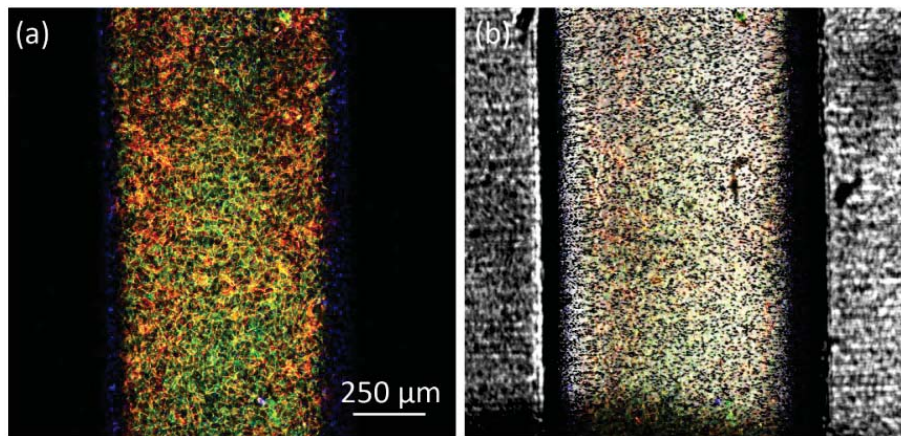


Abbildung 40: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal (Kanal), Tag 2. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 450 µl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Eine Phalloidin-Färbung markiert die Aktin-Fasern und eine Immunfärbung von VE-Cadherin die Adherence Junctions. (a) Überlagerung: Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau; GFP-markierte Adherence Junctions, grün; Rhodamin-markiertes Aktin, rot. (b) Überlagerung von (a) mit der Hellfeld-Aufnahme des Kanals. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

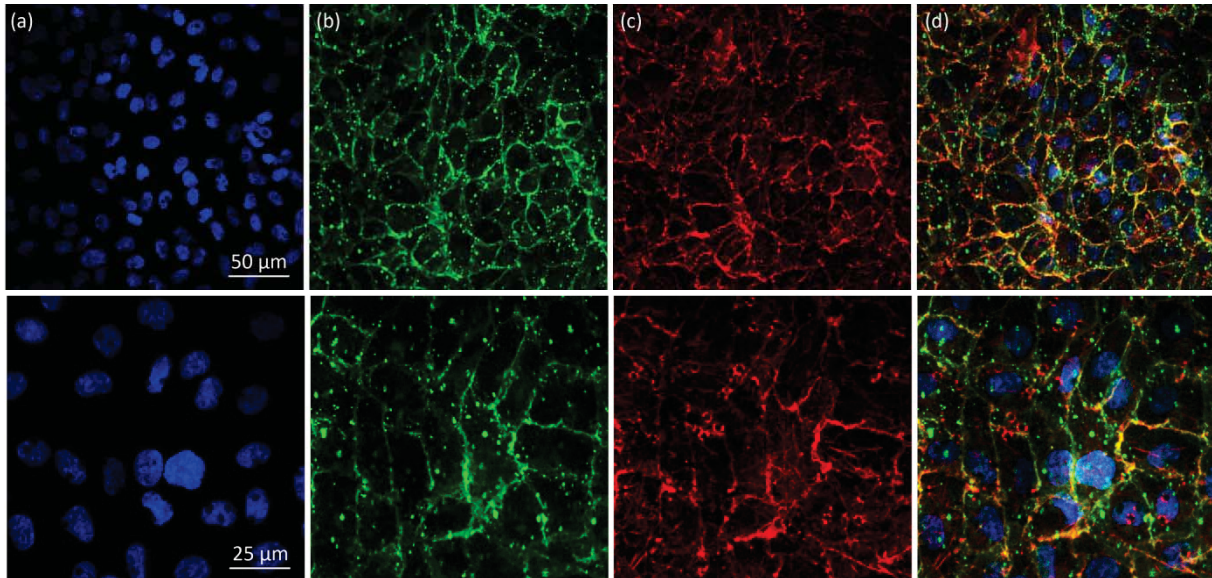


Abbildung 41: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal (Kanalboden), Tag 2. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 450 µl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Eine Phalloidin-Färbung markiert die Aktin-Fasern und eine Immunfärbung von VE-Cadherin die Adherence Junctions. (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Adherence Junctions, grün. (c) Rhodamin-markiertes Aktin, rot. (d) Überlagerung von (a), (b) und (c). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Nach fünftägiger Inkubation unter fluidischen Bedingungen zeigten die Endothelzellen eine deutliche langgestreckte Morphologie sowie eine Ausrichtung in Richtung des Mediumflusses (Abbildung 42 und Abbildung 43). Die Immunfärbung mit Phalloidin zeigte erneut, dass im Kanal unter fluidischen Bedingungen kultivierte Endothelzellen dicke, parallel angeordnete Stress Fibers ausbildeten (Abbildung 43; Abschnitt 4.5.5.2). Diese Stress Fibers zeigten ebenfalls eine Ausrichtung in Flussrichtung des Mediums. Im Gegensatz dazu waren diese Stress Fibers nach nur zweitägiger Inkubation unter Scherstress-Bedingungen noch nicht deutlich erkennbar (Abbildung 41). Abbildung 44 zeigt eine dreidimensionale Darstellung der Besiedelung des Kanalbodens des gekrümmten Mikrokanals mit Endothelzellen.

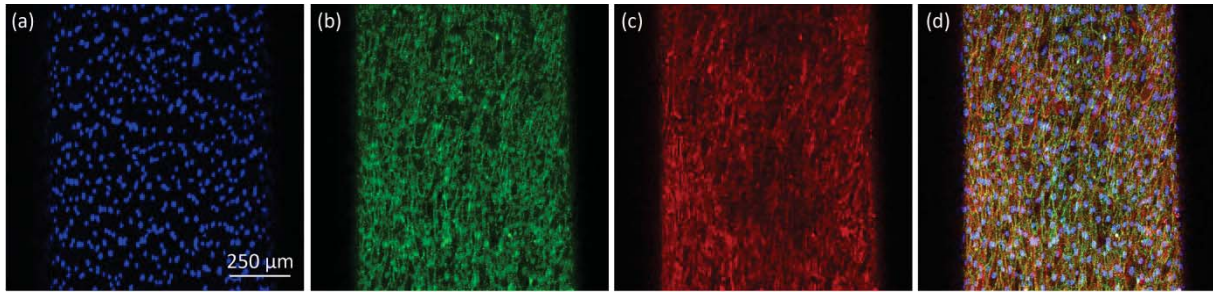


Abbildung 42: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal (Kanal, z-Stapel), Tag 5. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronektin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 450 µl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Eine Phalloidin-Färbung markiert die Aktin-Fasern und eine Immunfärbung von VE-Cadherin die Adherence Junctions. Um die komplette Besiedelung im Kanal zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 100,7 µm (51 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Adherence Junctions, grün. (c) Rhodamin-markiertes Aktin, rot. (d) Überlagerung von (a), (b) und (c). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

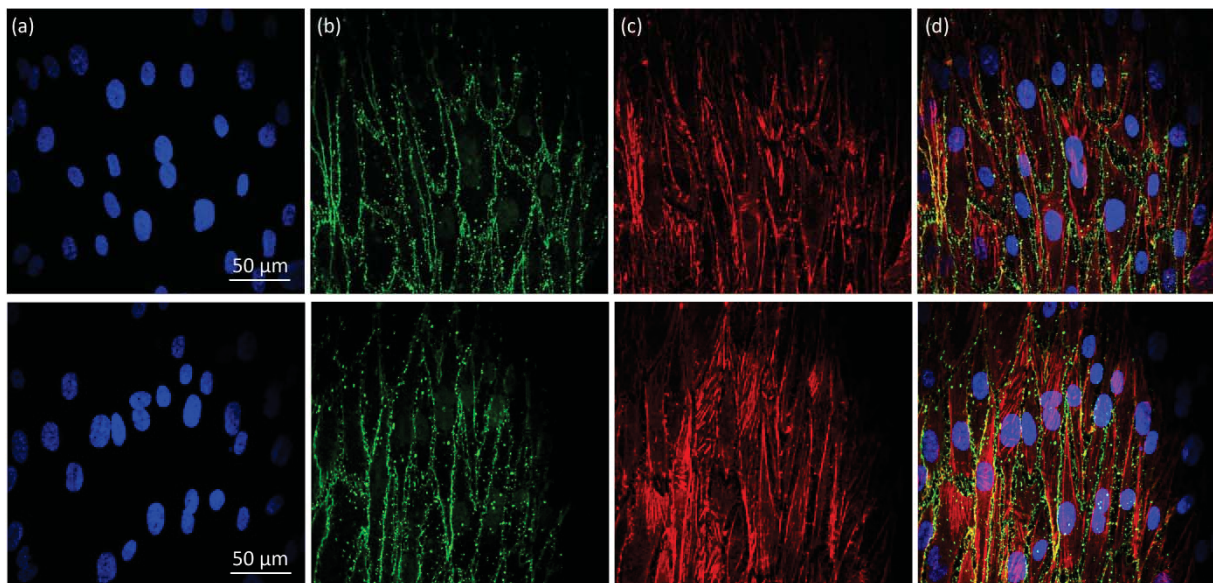


Abbildung 43: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal (Kanalboden), Tag 5. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronektin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 450 µl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Eine Phalloidin-Färbung markiert die Aktin-Fasern und eine Immunfärbung von VE-Cadherin die Adherence Junctions. (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Adherence Junctions, grün. (c) Rhodamin-markiertes Aktin, rot. (d) Überlagerung von (a), (b) und (c). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

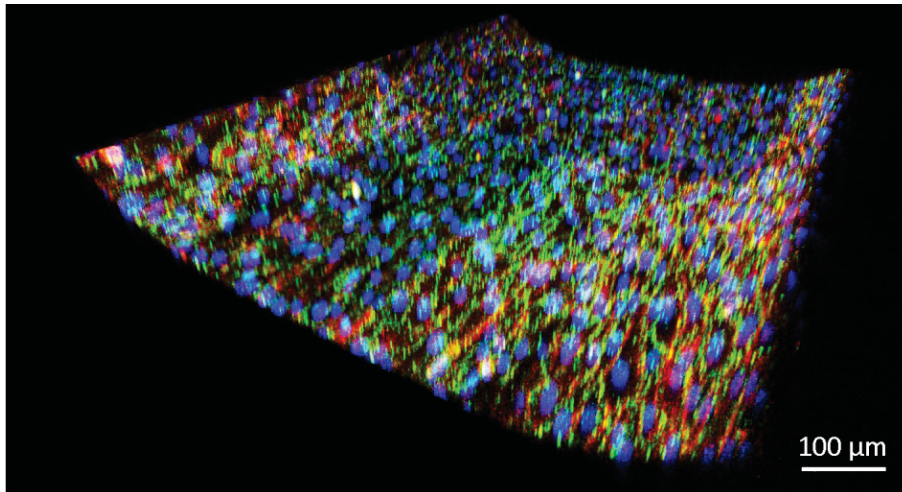


Abbildung 44: Dreidimensionale Ansicht des Kanalbodens des gekrümmten Mikrokanals besiedelt mit Endothelzellen (Angaben zu den Aufnahmen siehe Abbildung 42). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3), bearbeitet mit Imaris 7.4.2.

Auch auf der Deckfolie, an der Oberseite des Kanals, waren Endothelzellen erkennbar. Aufnahmen über die gesamte z-Achse des porösen Kanals bestätigten die vollständige Besiedelung des gekrümmten Kanals mit Endothelzellen. Auch an den äußeren Kanalwänden waren durch diese Aufnahmen Zellen erkennbar (Abbildung 45).

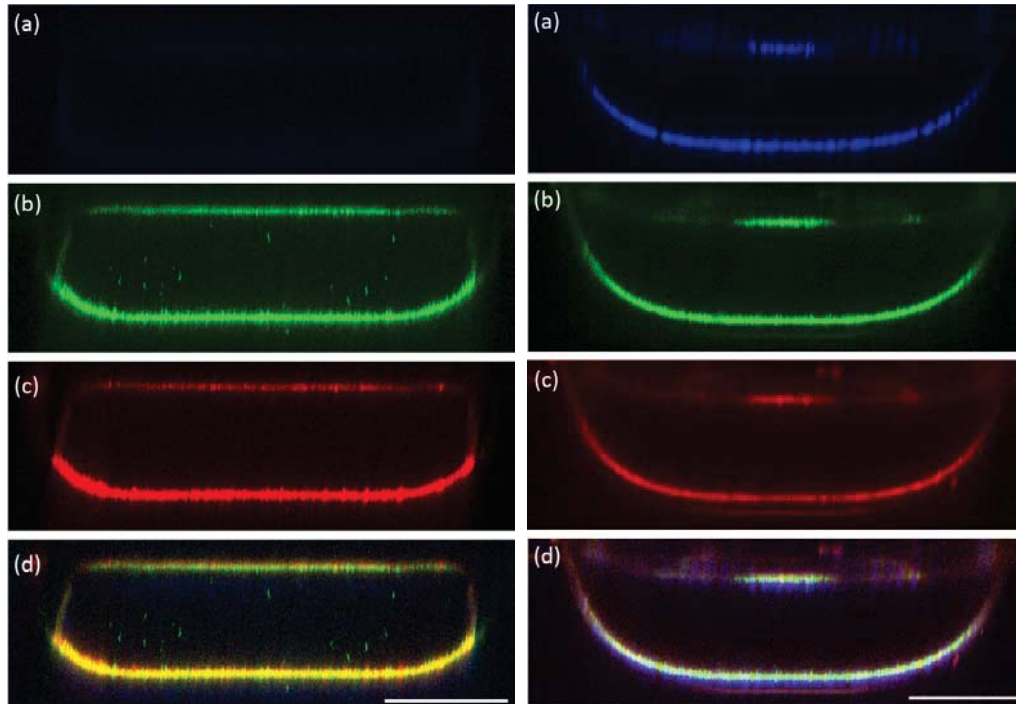


Abbildung 45: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal (z-Stapel), Tag 2 (links), Tag 5 (rechts). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronektin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ unter fluidischen Bedingungen (450 µl/min) kultiviert. Eine Phalloidin-Färbung markiert die Aktin-Fasern und eine Immunfärbung von VE-Cadherin die Adherence Junctions. Um die komplette Besiedelung im porösen Kanal zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 344,4 µm (172 Bilder) bzw. 374,0 µm (187 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Adherence Junctions, grün. (c) Rhodamin-markiertes Aktin, rot. (d) Überlagerung von (a), (b) und (c). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 250 µm.

Die Konfluenz des Endothels im gesamten porösen Mikrokanal ist eine wichtige Voraussetzung für nachfolgende transendotheliale Transport-Experimente aus dem künstlichen Blutgefäß in die angrenzende untere Kammer im Bioreaktor. Abbildung 46 zeigt eine dreidimensionale Darstellung der Besiedelung des gekrümmten Mikrokanals mit Endothelzellen. Weitere Abbildungen finden sich im Anhang dieser Arbeit (Abschnitt 9).

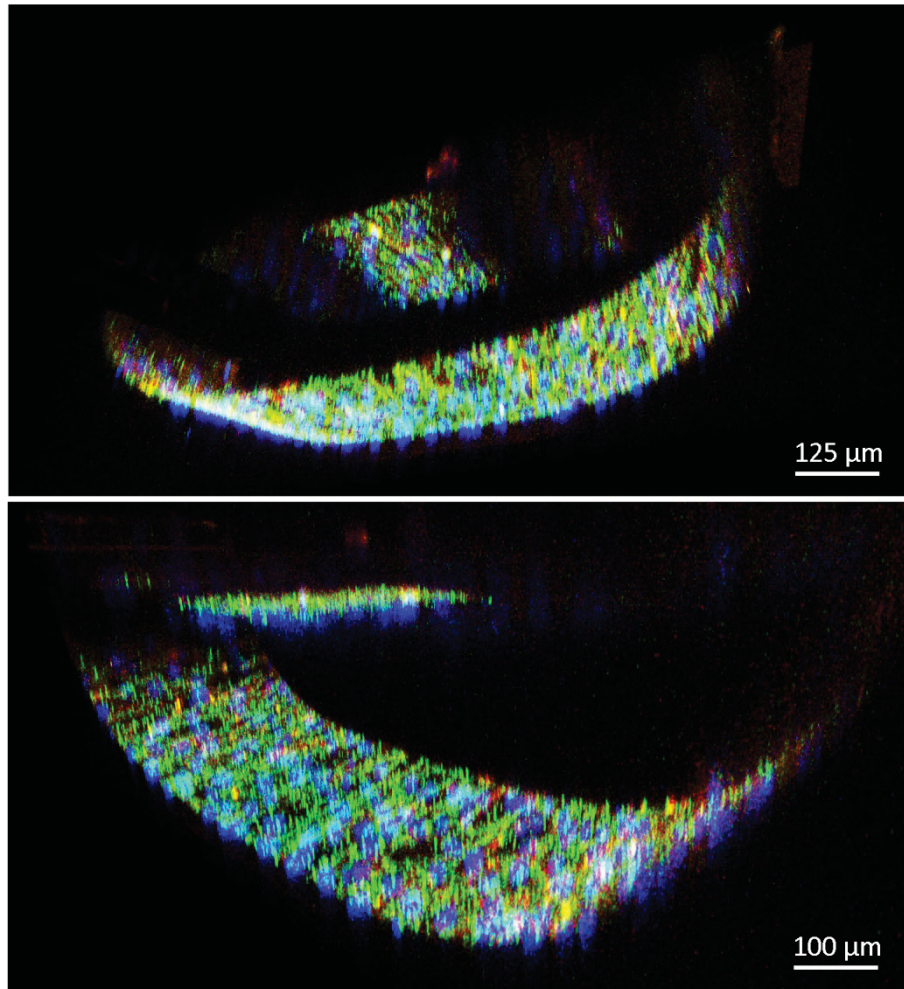


Abbildung 46: Dreidimensionale Ansicht des gekrümmten Mikrokanals besiedelt mit Endothelzellen (Angaben zu den Aufnahmen siehe Abbildung 45). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3), bearbeitet mit Imaris 7.4.2.

4.5.7 Monozyten Adhäsion und Transmigration

Treten Entzündungen oder Verletzungen im Gewebe auf, werden über das Blutgefäßsystem Immunzellen zur entsprechenden Stelle rekrutiert. Diese Immunzellen transmigrieren durch das Endothel, um zum Entzündungsherd zu gelangen (Abbildung 47; siehe auch Abschnitt 2.1.2). Um die Funktionalität des Blutgefäßsystems im Bioreaktor zu testen, wurden solche Entzündungsprozesse im Bioreaktor simuliert (Abbildung 47) und ‚Rolling‘ und ‚Tethering‘ sowie die Diapedese bzw. Transmigration von Immunzellen beobachtet.

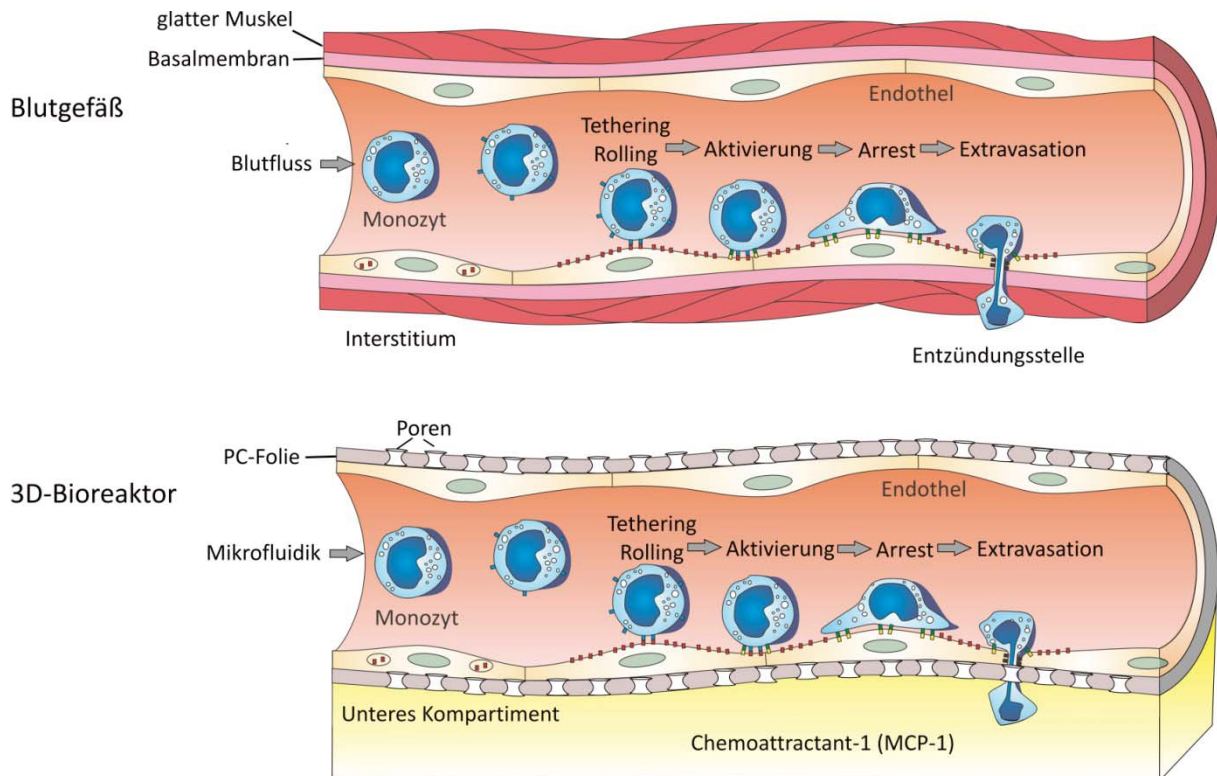


Abbildung 47: Monozyten ‚Rolling‘, Adhäsion und Transmigration im Blutgefäß nahe einer Entzündungsstelle bzw. im stimulierten mikrofluidischen 3D-Bioreaktor.

4.5.7.1 Monozyten Adhäsion

Nach Srigunapalan et al. (2011) wurde die Adhäsion von Monozyten (THP-1 Zellen) am Endothelium mit und ohne Behandlung der Zellen mit dem Tumornekrosefaktor $TNF-\alpha$ untersucht.^[33] $TNF-\alpha$ ist als Signalstoff des Immunsystems an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt. Hierbei reguliert es die Aktivität verschiedener Immunzellen, unter anderem auch der Monozyten. Monozyten haben im Immunsystem die Aufgabe körperfremde Strukturen durch Phagozytose zu zerstören und die erworbene Immunabwehr mittels Antigenpräsentation zu aktivieren. Ebenso stimuliert die Anwesenheit von Zytokinen, wie z.B. $TNF-\alpha$, die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. der P-Selektine und Integrine auf der endothelialen Membran.

Die konfluenten Endothelzellen (Abbildung 48), die über einige Tage unter Scherstress-Bedingungen im porösen Mikrokanal kultiviert wurden, wurden mit 25 ng/ml $TNF-\alpha$ unter fluidischen Bedingungen für 4 h inkubiert. Anschließend wurden Monozyten (THP-1-Zellen) in den mikrofluidischen Fluss eingebracht. Die Monozyten wurden zur besseren Visualisierung mit Hoechst 33342 gefärbt. Im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle erhöhte die vorherige $TNF-\alpha$ -Stimulierung die Adhäsion der Monozyten signifikant (Abbildung 49) und bestätigte damit die Ergebnisse aus der Literatur.^[29, 33] Die Mikroskopieaufnahmen zeigten deutlich das Anhaften der Hoechst-gefärbten Monozyten am Endothellayer (CellTracker™ gelabelt; Abbildung 50). Hierbei wurde auch der signifikante

Unterschied zwischen dem geringen Anhaften an den unbehandelten Endothelzellen im Gegensatz zur erhöhten Adhäsion der Monozyten nach TNF- α -Behandlung deutlich (Abbildung 51).

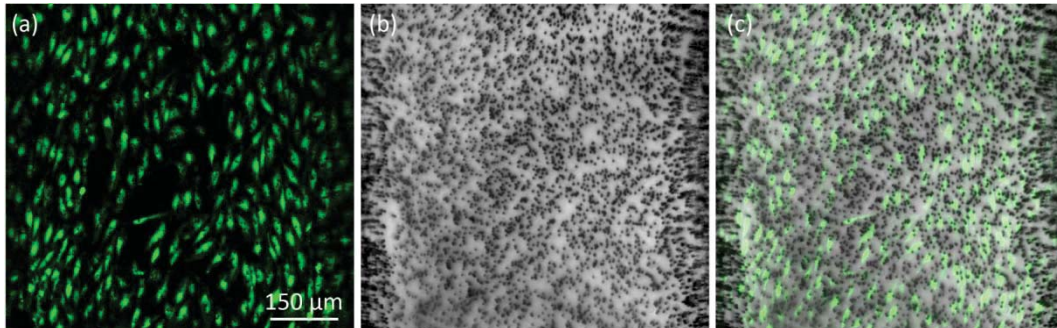


Abbildung 48: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 500 μ l/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit CellTracker™ Green zur Markierung des Zytoplasmas gefärbt. (a) CellTracker™ Green-markierte Zellkerne, grün. (b) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

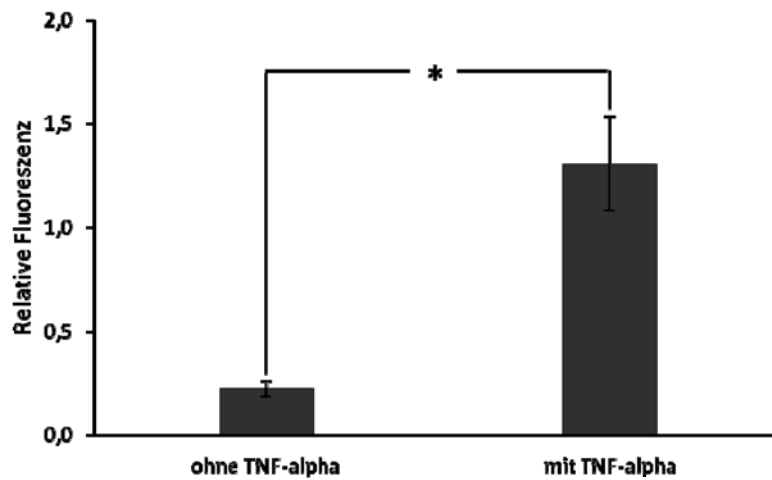


Abbildung 49: Monozyten Adhäsion an Endothelzellen im fluidischen Kanal mit und ohne Stimulierung durch TNF- α . Relative Fluoreszenz der Hoechst-markierten THP-1 Zellen, die am Endothellayer nach 1 h Inkubation unter Scherstress-Bedingungen anhafteten. Die Zahl der anhaftenden Monozyten war nach TNF- α Stimulierung des Endothellayers signifikant erhöht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung (n = 5), *p<0,05.

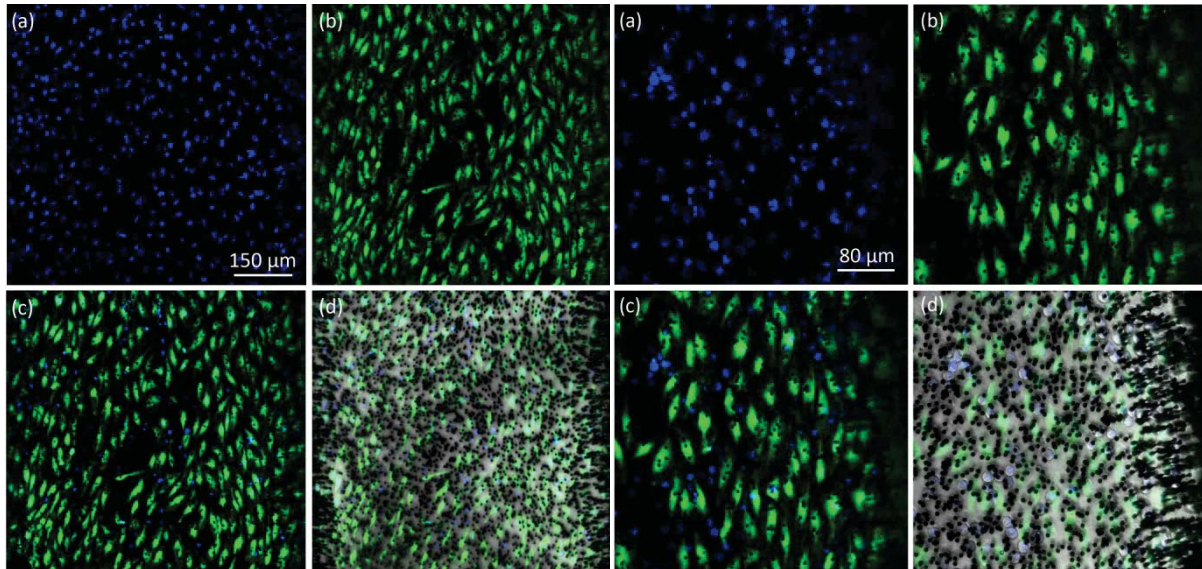


Abbildung 50: HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im porösen PC-Kanal, Inkubation mit Monozyten. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ unter fluidischen Bedingungen (500 μl/min) kultiviert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit CellTracker™ Green zur Markierung des Zytoplasmas gefärbt. 1×10⁷ Monozyten (THP-1) wurden nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF-α ins TNF-α-freie Medium gegeben und für 1 h unter fluidischen Bedingungen (20 dyn/cm²) inkubiert (a) Hoechst 33342-markierte Monozyten, blau. (b) CellTracker™ Green-markierte Zellkerne, grün. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme im porösen Kanal. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

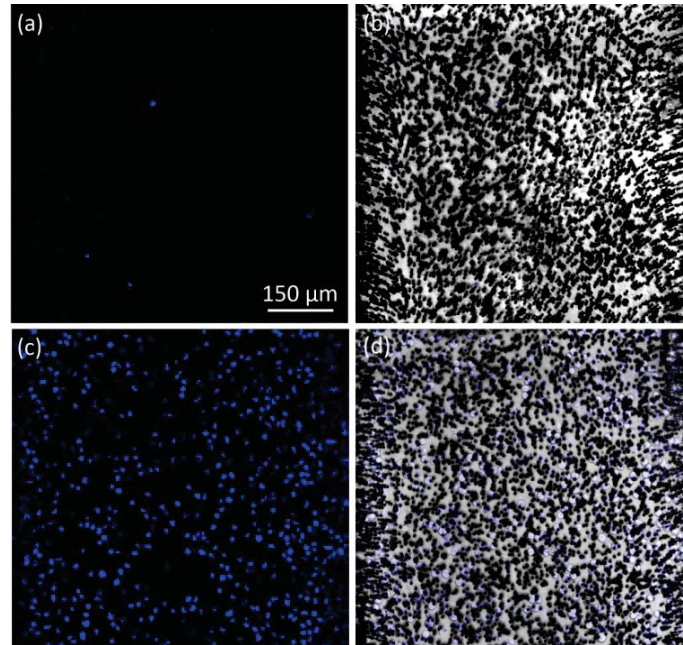


Abbildung 51: Monozyten-Adhäsion am Endothellayer im porösen PC-Kanal unter fluidischen Bedingungen. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ unter fluidischen Bedingungen (500 µl/min) kultiviert. 1×10^7 Monozyten (THP-1) wurden nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α ins TNF- α -freie Medium gegeben und für 1 h unter fluidischen Bedingungen (20 dyn/cm²) inkubiert. Als Kontrolle wurden Monozyten ohne vorherige Behandlung der Endothelzellen mit TNF- α für 1 h durch den porösen Kanal geströmt (20 dyn/cm²). (a) Hoechst 33342-markierte Monozyten, Kontrolle ohne TNF- α Inkubation, blau. (b) zu (a) zugehörige Hellfeld-Aufnahme im Kanal. (c) Hoechst 33342-markierte Monozyten, Probe mit 4-stündiger TNF- α Inkubation der Endothelzellen, blau. (d) zu (b) zugehörige Hellfeld-Aufnahme im Kanal. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Monozyten Adhäsion am Endothel zeigte, dass innerhalb der ersten drei Stunden eine deutliche Zunahme der Monozyten Adhäsion zu beobachten war. Nach weiteren Stunden konnte keine merkliche Steigerung der Adhäsion mehr nachgewiesen werden (Abbildung 52 & Abbildung 53). Die Mikroskopieaufnahmen verdeutlichen diese Ergebnisse (Abbildung 54). Zur besseren Visualisierung der Endothelzellen wurden deren Zellmembranen gefärbt (CellMask™ Deep Red, Life Technologies). Nach 3 h konnte bereits eine sehr dichte Besiedelung des Endothels mit Monozyten beobachtet werden. Dadurch war auch die geringe Zunahme des Anhaftens nach 3 h zu erklären.



Einzelbild

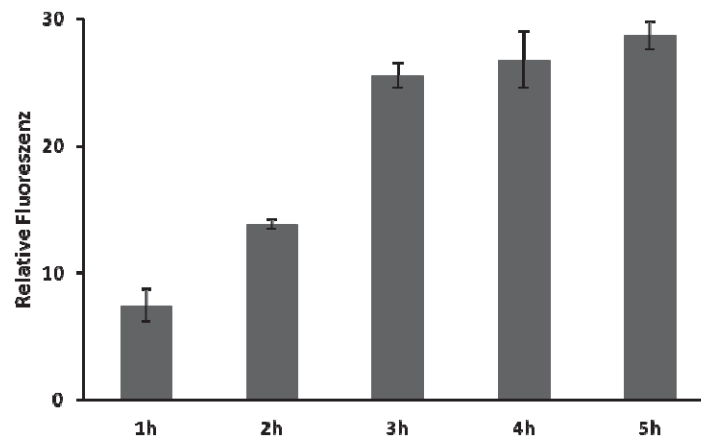


Abbildung 52: Relative Fluoreszenz der Monozyten Adhäsion an HUVEC-Zellen im Mikrokanal unter fluidischen Bedingungen (Einzelbild). HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Monozyten Adhäsion mit Hoechst-markierten Monozyten (THP-1) unter kontinuierlichem Durchströmen über 6 Stunden bei 37°C inkubiert und nach jeweils einer Stunde mikroskopiert. Die relative Fluoreszenz der Hoechst-gefärbten Zellkerne der Monozyten wurde mit Hilfe der LAS AF Lite Software bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten aus drei unterschiedlichen Stellen im Kanal mit Standardabweichung (n = 3).

z-Stapel

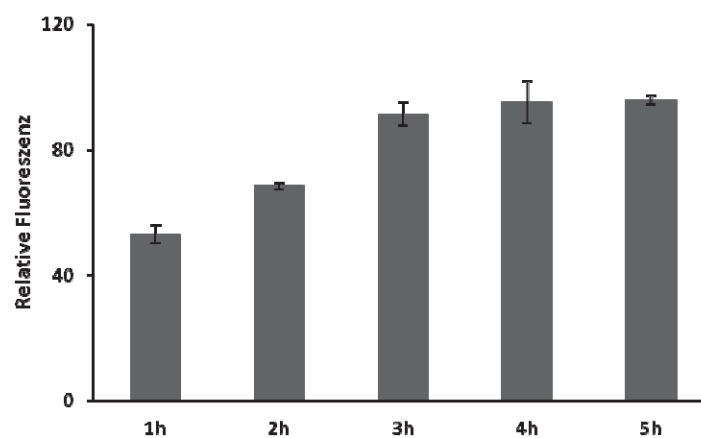


Abbildung 53: Relative Fluoreszenz der Monozyten Adhäsion an HUVEC-Zellen im Mikrokanal unter fluidischen Bedingungen (z-Stapel). HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Monozyten Adhäsion mit Hoechst-markierten Monozyten (THP-1) unter kontinuierlichem Durchströmen über 6 Stunden bei 37°C inkubiert und nach jeweils einer Stunde mikroskopiert. Z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 50 µm (27 Bilder) wurden mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen, die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection) und die relative Fluoreszenz der Hoechst-gefärbten Zellkerne der Monozyten mit Hilfe der LAS AF Lite Software bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten aus drei unterschiedlichen Stellen im Kanal mit Standardabweichung (n = 3).

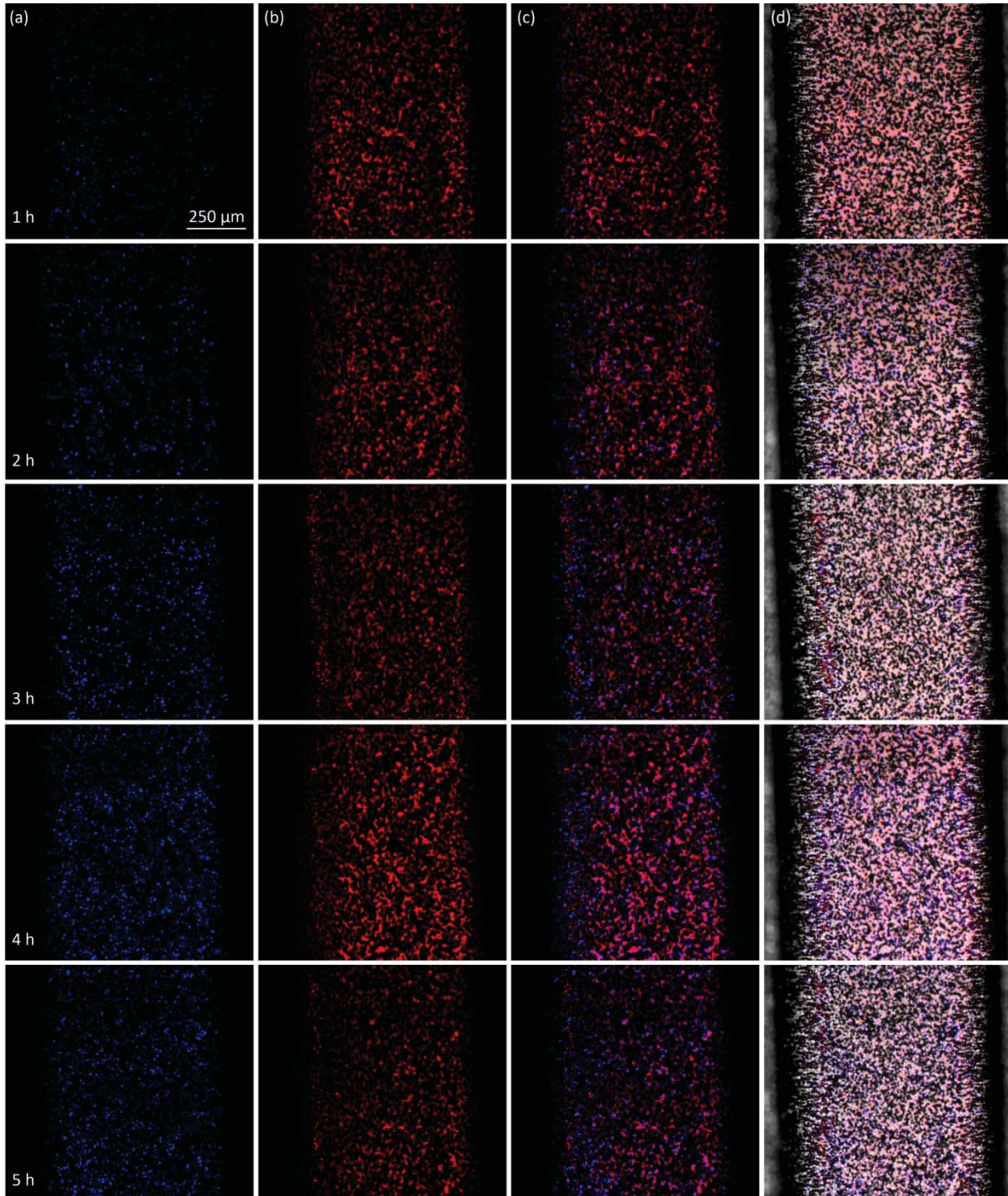


Abbildung 54: Monozyten Adhäsion an HUVEC-Zellen im porösen PC-Kanal unter fluidischen Bedingungen. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 μl/min durchströmt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit CellMask™ Deep Red zur Markierung der Zellmembran gefärbt. 1×10^7 Monozyten (THP-1) wurden nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α ins TNF- α -freie Medium gegeben und über 5 h unter fluidischen Bedingungen (10 dyn/cm²) inkubiert. (a) Hoechst 33342-markierte Monozyten, blau. (b) CellMask™ Deep Red-markierte Zellmembranen der Endothelzellen, rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme im porösen Kanal. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).



4.5.7.2 Monozyten Transmigration

Weiterhin wurde die Transmigration von Monozyten (THP-1 Zellen) durch das Endothel im porösen Kanal in die untere Kammer mit und ohne Stimulierung der Zellen untersucht. Zur Stimulierung wurden die Endothelzellen wie im Adhäsionsexperiment für 4 h mit dem Tumornekrosefaktor TNF- α behandelt. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inkubation der Endothelzellen mit 25 ng/ml TNF- α unter fluidischen Bedingungen die Adhäsion der Monozyten signifikant erhöhte.

Um die Monozyten zur Transmigration in die untere Kammer zu bewegen, wurde diese mit dem Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) in Endothelmedium befüllt.

MCP-1 gehört zur Familie der chemotaktischen Zytokine, auch Chemokine genannt. MCP-1 wird unter anderem von Monozyten, vaskulären Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen gebildet. MCP-1 rekrutiert Monozyten, T-Gedächtniszellen und dendritische Zellen zu Stellen mit verletztem, entzündetem oder infiziertem Gewebe.

Nach 4 und 24 h wurden die Hoechst-markierten, transmigrierten Monozyten im unteren Kompartiment mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant höhere Transmigration nach Stimulierung der Endothelzellen und Monozyten (Abbildung 55 und Abbildung 56). Auffällig dabei war, dass mehr Monozyten durch die Seitenwände zu transmigrieren schienen. Dies könnte möglicherweise durch eine unterschiedliche Porengröße innerhalb der Mikrokanäle hervorgerufen werden. Die Mikroskopieaufnahmen zeigten deutlich den signifikanten Unterschied zwischen der geringeren Transmigration durch die unbehandelten Endothelzellen im Gegensatz zur erhöhten Transmigration der Monozyten nach Stimulierung des Endothels mit TNF- α innerhalb des Mikrokanals und mit MCP-1 im unteren Kompartiment des Bioreaktors (Abbildung 57).

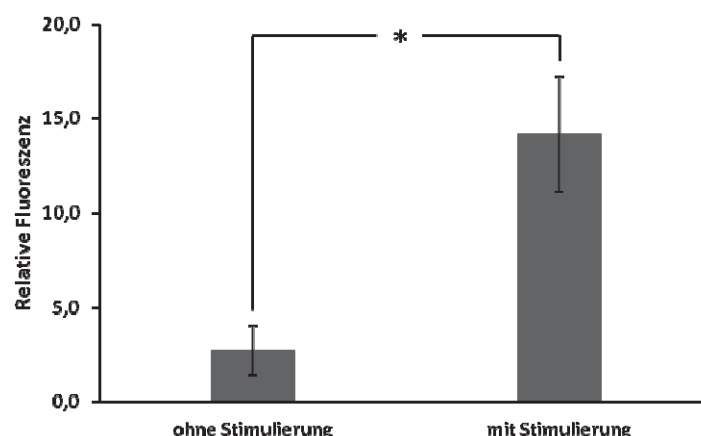


Abbildung 55: Relative Fluoreszenz der Monozyten Transmigration durch den Endothellayer im fluidischen Kanal mit und ohne Stimulierung durch TNF- α und MCP-1 (4 h). Relative Fluoreszenz der Hoechst-markierten THP-1 Zellen im unteren Kompartiment nach 4 h Inkubation unter Scherstress-Bedingungen. Die Zahl der anhaftenden Monozyten war nach Stimulierung mit TNF- α und MCP-1 signifikant erhöht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung (n = 5), *p<0,05.

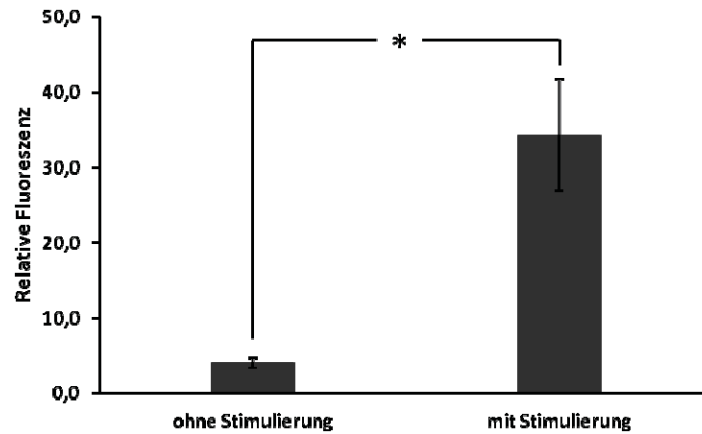


Abbildung 56: Relative Fluoreszenz der Monozyten Transmigration durch den Endothellayer im fluidischen Kanal mit und ohne Stimulierung durch TNF- α und MCP-1 (24 h). Relative Fluoreszenz der Hoechst-markierten THP-1 Zellen im unteren Kompartiment nach 24 h Inkubation unter Scherstress-Bedingungen. Die Zahl der anhaftenden Monozyten war nach Stimulierung mit TNF- α und MCP-1 signifikant erhöht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung (n = 5), *p<0,05.

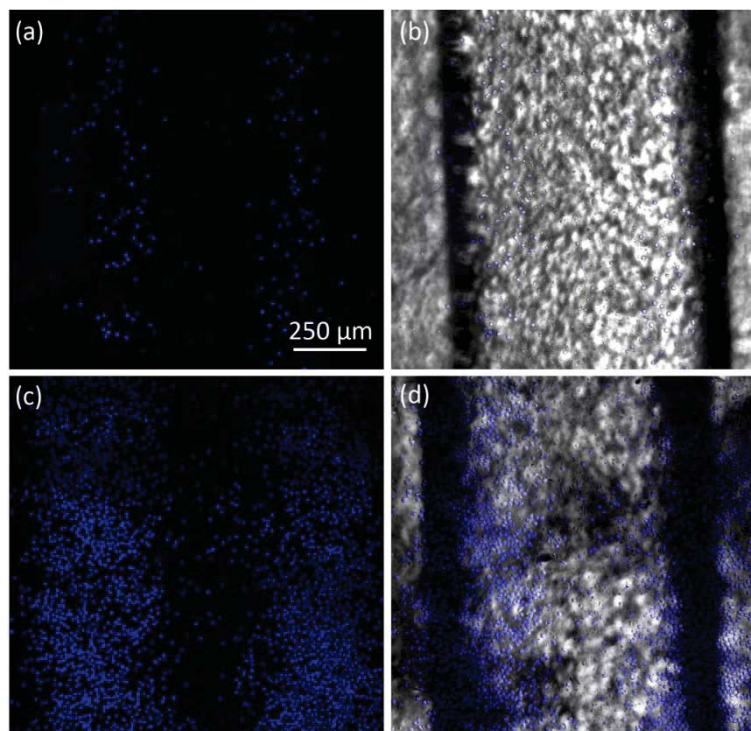


Abbildung 57: Monozyten-Transmigration durch den Endothellayer im porösen PC-Kanal unter fluidischen Bedingungen. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 500 μ l/min durchströmt. 1×10^7 Monozyten (THP-1) wurden nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α ins TNF- α -freie Medium gegeben und für 4 bzw. 24 h unter fluidischen Bedingungen (100 μ l/min) inkubiert. Zusätzlich wurde die untere Kammer mit MCP-1 (500 ng/ml) in EGM-2 befüllt. Als Kontrolle wurden Monozyten ohne vorherige Stimulierung durch den porösen Kanal geströmt. (a) Hoechst 33342-markierte Monozyten, Kontrolle ohne Stimulierung, blau. (b) zu (a) zugehörige Hellfeld-Aufnahme im Kanal. (c) Hoechst 33342-markierte Monozyten, Probe mit Stimulierung, blau. (d) zu (b) zugehörige Hellfeld-Aufnahme im Kanal. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).



Bei dem Versuch war es wichtig, die Unversehrtheit des Endothels sowohl vor als auch nach dem Experiment zu bestätigen. Dies erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

In dieser Versuchsanordnung konnte mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie der direkte Durchtritt der Hoechst-markierten Monozyten durch den Endothellayer (CellMask™ Deep Red-markiert) im porösen Mikrokanal beobachtet werden. Abbildung 58 und Abbildung 59 zeigen Hoechst-markierte Monozyten direkt nach dem Durchtritt durch die poröse Membran des Mikrokanals.

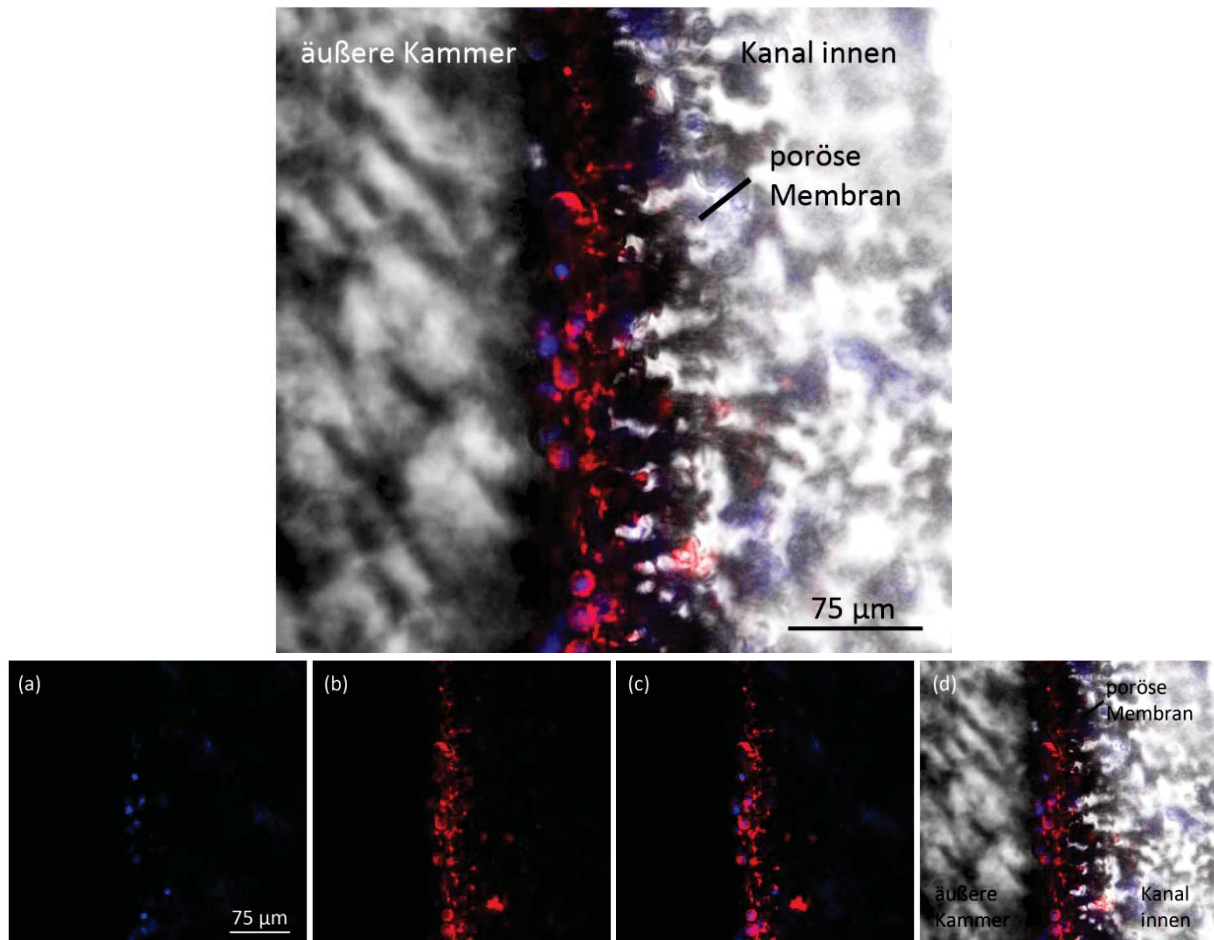


Abbildung 58: Transmigration von Monozyten durch Endothellayer im porösen Mikrokanal unter fluidischen Bedingungen I. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. 1×10⁷ Monozyten (THP-1) wurden nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF-α ins TNF-α-freie Medium gegeben und über mehrere Stunden unter fluidischen Bedingungen (100 µl/min) inkubiert. Zusätzlich wurde die untere Kammer mit MCP-1 (500 ng/ml) in EGM-2 befüllt. (a) Hoechst 33342-markierte Monozyten, blau. (b) CellMask™ Deep Red-markierte Zellmembranen, rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme an der porösen Kanalmembran. Oben: vergrößerte Darstellung von (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

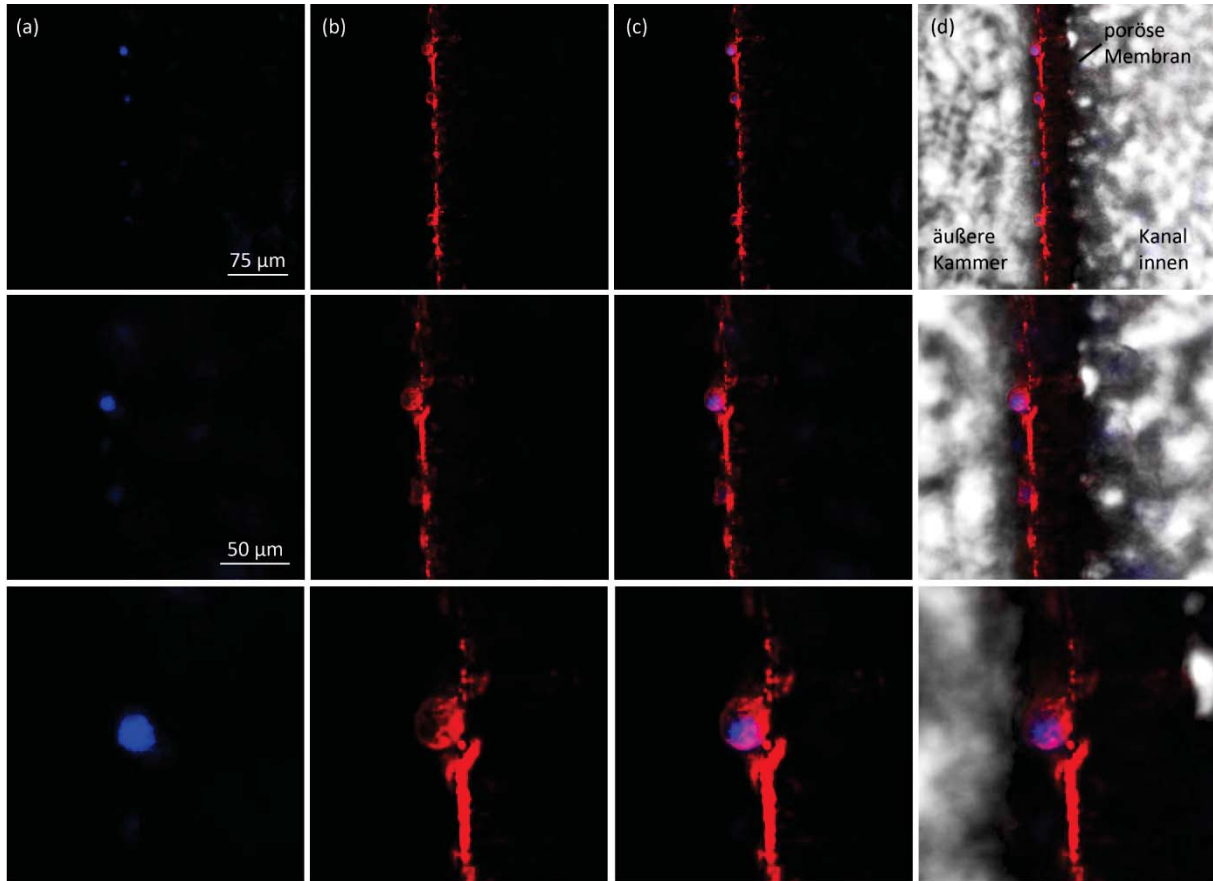


Abbildung 59: Transmigration von Monozyten durch Endothellayer im porösen Mikrokanal unter fluidischen Bedingungen II. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. 1×10⁷ Monozyten (THP-1) wurden nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF-α ins TNF-α-freie Medium gegeben und über mehrere Stunden unter fluidischen Bedingungen (100 µl/min) inkubiert. Zusätzlich wurde die untere Kammer mit MCP-1 (500 ng/ml) in EGM-2 befüllt. Die untere Bildreihe zeigt eine vergrößerte Ansicht der darüber liegenden. (a) Hoechst 33342-markierte Monozyten, blau. (b) CellMask™ Deep Red-markierte Zellmembranen, rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme an der porösen Kanalmembran. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Nach dem Durchtritt in die untere Kammer wiesen die Hoechst-gefärbten Monozyten ebenfalls eine Färbung der Membranen durch CellMask™ Deep Red auf. Es fand möglicherweise eine Interaktion der Monozyten mit den Membran-gefärbten Endothelzellen statt (Abbildung 60).

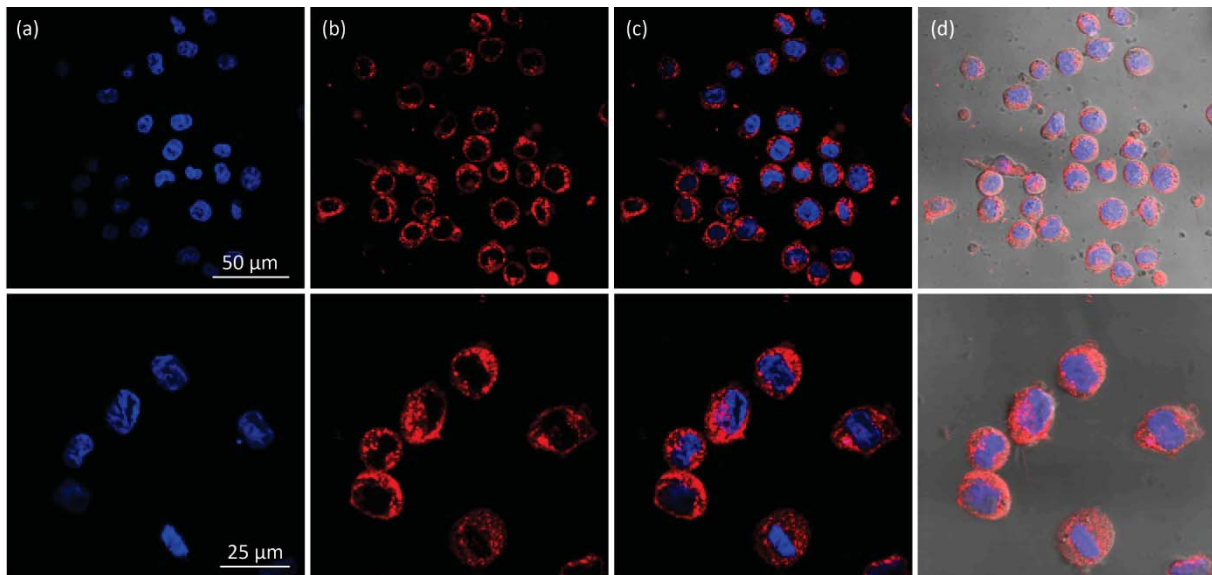


Abbildung 60: Transmigrierte Monozyten in der unteren Kammer des mikrofluidischen Bioreaktors. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. 1×10⁷ Monozyten (THP-1) wurden nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF-α ins TNF-α-freie Medium gegeben und über mehrere Stunden unter fluidischen Bedingungen (100 µl/min) inkubiert. Zusätzlich wurde die untere Kammer mit MCP-1 (500 ng/ml) in EGM-2 befüllt. (a) Hoechst 33342-markierte Monozyten, blau. (b) CellMask™ Deep Red-markierte Zellmembranen, rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme an der porösen Kanalmembran. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

4.5.7.3 Direkte Visualisierung der Transmigration von Monozyten

Um den direkten Durchtritt von Monozyten aus dem mikrofluidischen Kanal in das untere Kompartiment des Bioreaktor zu visualisieren, wurde in Kollaboration mit Yury Belyaev an der Advanced Light Microscopy Facility (ALMF), EMBL, Heidelberg ein Spinning Disk Konfokalmikroskop verwendet.

Spinning Disk Mikroskope zeichnen sich durch eine besonders schnelle Aufnahmezeit aus. Sie ermöglichen die Aufnahme von Bildern unter hoher Bildfrequenz und minimaler Beleuchtung der Probe, was die auftretende Phototoxizität durch erhöhte Lasereinstrahlung in den Proben verringert. Hierdurch wird die dreidimensionale Hochgeschwindigkeitsaufnahme lebender Systeme möglich. Ein Spinning Disk Konfokal-Scanner verwendet ein Paar rotierender Scheiben mit tausenden Lochblenden in einer spiralförmigen Anordnung. Wenn Licht auf die Platte projiziert wird, werden durch die Lochblenden konzentrische Lichtbögen über die Probe geworfen. Das fluoreszierende Licht gelangt dann durch Objektiv und Lochblende zurück zum Detektor. Das Mikroskop nimmt so gleichzeitig eine Vielzahl von Punkten auf, anstatt nur einen einzigen Punkt zu jedem Zeitpunkt zu messen. Dies macht die Technologie gleichzeitig schneller und die Probe wird mit einer geringeren Laserdosis belastet.^[132]

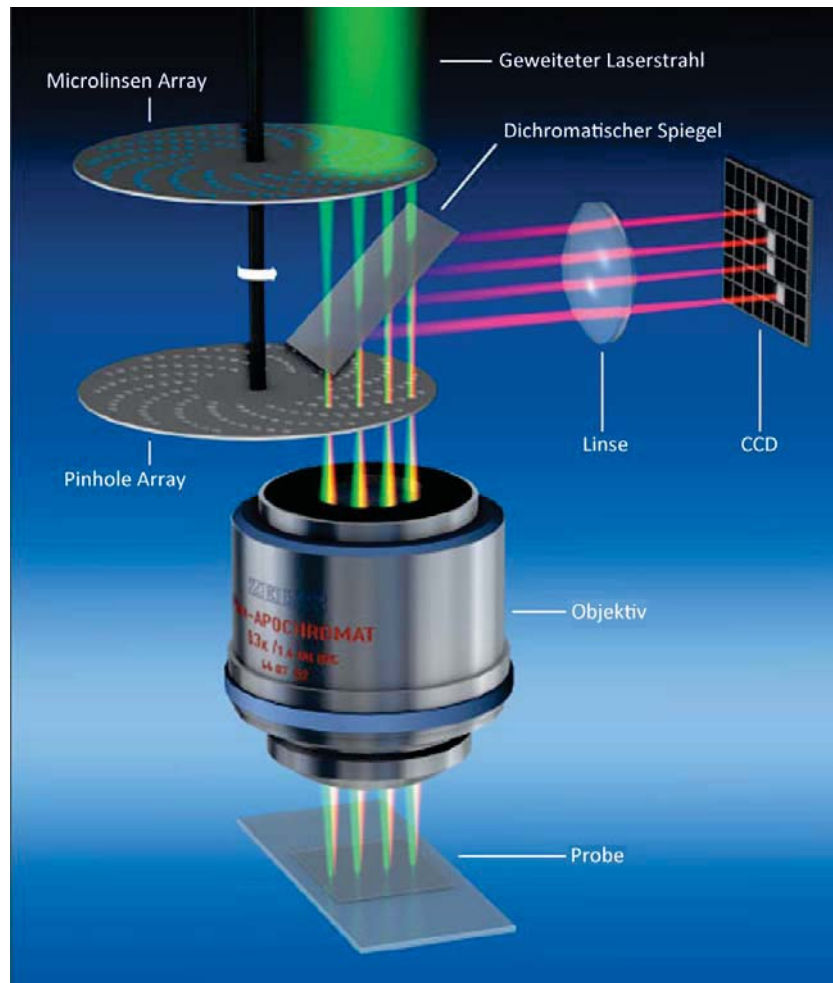


Abbildung 61: Funktionsprinzip einer Spinning Disk Einheit (Zeiss Cell Observer SD). Dargestellt ist der Strahlengang in der Yokogawa CSU-X1 Einheit (modifiziert nach Zeiss, 2012).^[132]

Das in diesem Versuch verwendete Gerät war das PerkinElmer Ultraview VoX Spinning Disk Confocal. Die Software Volocity 6.1.1 (PerkinElmer) wurde zur Auswertung der Daten verwendet. Die Versuchsanordnung wurde wie im vorherigen Abschnitt durchgeführt (4.5.7). Endothelzellen im porösen Mikrokanal wurden mit CellTracker™ Green zur Markierung des Zytosols bzw. CellMask™ Deep Red zur Markierung der Zellmembranen gefärbt. Monozyten wurden mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Nach Stimulierung der Endothelzellen mit TNF- α sowie des unteren Kompartiments mit MCP-1 wurden die Monozyten durch den Kanal gepumpt und das ‚Rolling‘ entlang des Endothels sowie die Transmigration in die untere Kammer beobachtet.

Die dargestellten Videosequenzen zeigen das ‚Rolling‘ von Monozyten entlang des Endothels im porösen Mikrokanal. In Videosequenz I ist das ‚Rolling‘ eines Monozyten (gelb markiert) auf dem Endothel im porösen Mikrokanal und nach kurzzeitigem Anhaften das Migrieren in das Endothel zu sehen (Abbildung 62). In Videosequenz II ist erneut das ‚Rolling‘ von Monozyten im fluidischen Mikrokanal auf der linken Bildseite in vertikale Richtung zu beobachten. Weiterhin zeigt diese Sequenz die Transmigration von zwei Monozyten (gelb markiert) in das untere Kompartiment (Abbildung 63). Weitere transmigrierte Monozyten

konnten nur in der Hellfeld-Aufnahme beobachtet werden, da es sich bei den weiteren Kanälen um konfokale Aufnahmen handelte und nur ein z-Stapel von 10 µm Höhe beobachtet wurde, was die Anzahl an möglichen migrierenden Monozyten stark begrenzte. Das Rendering der Monozyten mit Imaris 7.4.2 (Bitplane) ermöglichte eine bessere Visualisierung der Monozyten.

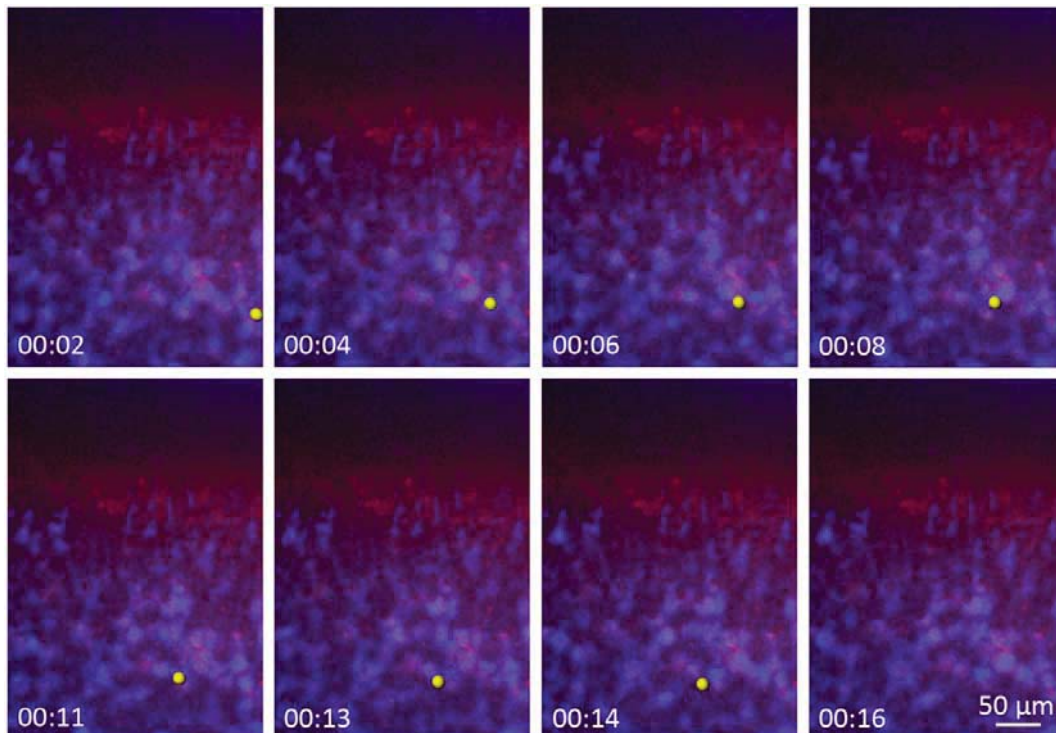


Abbildung 62: Videosequenz I. ‚Rolling‘ von Monozyten (blau) im porösen, mit Endothelzellen (rot) besiedelten Mikrokanal (unterer Bildbereich, Flussrichtung horizontal). Durchtritt eines Monozyten (gelb markiert) aus dem porösen Mikrokanal durch das Endothel. Spinning Disk Aufnahme, gerendert mit Imaris 7.4.2, Zeitangabe in s.

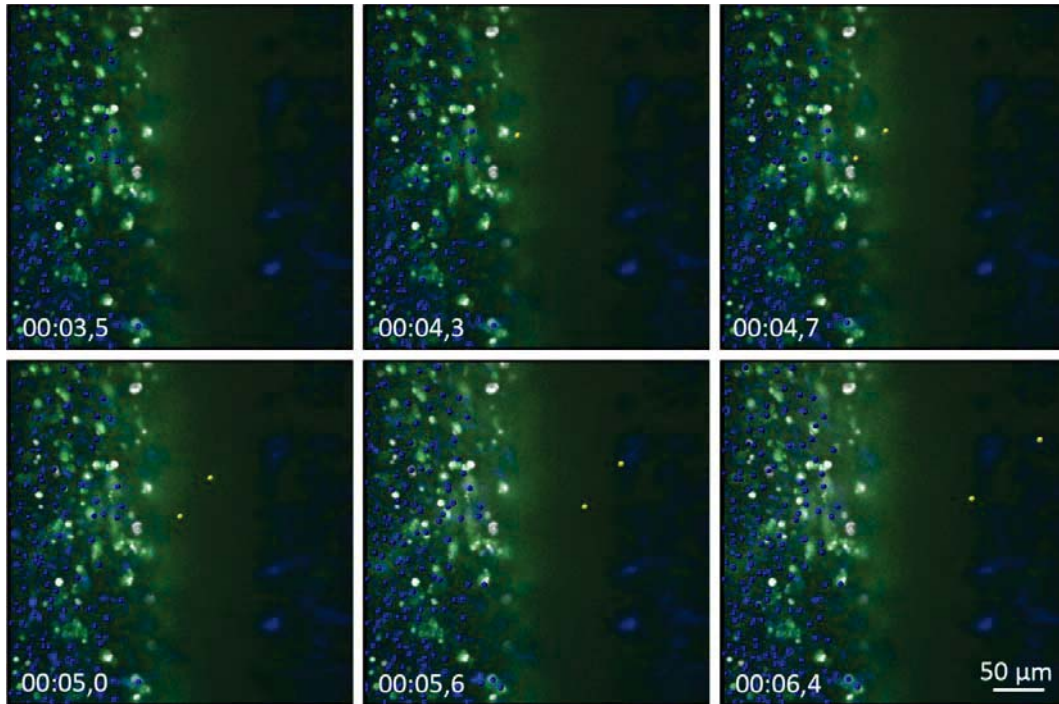


Abbildung 63: Videosequenz II. ‚Rolling‘ und ‚Tethering‘ von Monozyten (blau) im porösen, mit Endothelzellen (grün) besiedelten Mikrokanal (linke Seite, Flussrichtung vertikal). Durchtritt von Monozyten (gelb markiert) aus dem porösen Mikrokanal in die untere Kammer. Spinning Disk Aufnahme, gerendert mit Imaris 7.4.2, Zeitangabe in s.



Abbildung 64: Transmigrierte Monozyten an der Außenseite der porösen Membran des Mikrokanals (Videoausschnitt). Hoechst-markierte Monozyten (blau), CellMask™ Deep Red-markierte Endothelzellen im Mikrokanal (rot). Spinning Disk Aufnahme.

4.5.7.4 Ausblick: Erzeugung von Proteinmustern im Mikrokanal

In der Arbeitsgruppe von Dr. B. Rapp, Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Karlsruher Institut für Technologie, wurde eine Methode zur maskenlosen Lithographie entwickelt.^[133] Durch die beschriebene Methode ist es möglich, definierte Proteinmuster unterschiedlicher Form und Dichte auf Glasoberflächen herzustellen. Zur Erzeugung der Proteinmuster wurde Biotin-Fluorescein mittels eines Photobleichprozesses kovalent an eine BSA-beschichtete Glasoberfläche angekuppelt. Visualisiert wurde das Muster durch das Anbinden von Fluoreszenz-markiertem Streptavidin-Cy3. Solche Muster könnten für die Untersuchung von zellulärem Verhalten hilfreich sein. In Kollaboration mit Björn Waterkotte, Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) und Dr. Bastion Rapp, Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Karlsruher Institut für Technologie wurden erste Versuche zur Erzeugung von Proteinmustern in thermogeformten Mikrokanälen (SMART-Technologie) durchgeführt, die dann beispielsweise für Migrations- und Adhäsionsstudien verwendet werden könnten. Die Experimente sind Teil der Dissertation von Björn Waterkotte und werden daher hier nur als Ausblick zur möglichen Verwendung des mikrofluidischen Bioreaktors dargestellt.

Mit Hilfe der Methode war es möglich, definierte Strukturen (hier in Form eines Streifenmusters) auf den verwendeten Cycloolefin (COP)-Folien zu erzeugen, die nach dem Thermoformen (140°C, 10 bar) der Folien zu Mikrokanälen noch deutlich in den Kanälen erkennbar waren (Abbildung 65). Nach dem Einbau der Mikrokanäle in ein Bioreaktorsystem und Beschichtung mit Fibronectin konnten erfolgreich Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen in den Kanälen zur Konfluenz kultiviert werden. Abbildung 66 zeigt einen konfluenten Endothellayer im Mikrokanal mit Streifenmuster. Auch hier zeigten die Endothelzellen als Reaktion auf die Scherstress-Bedingungen eine deutliche Ausrichtung in Richtung des Mediumflusses (hier senkrecht) und eine langgestreckte Morphologie. Dies legt eine sehr gute Biokompatibilität der Strukturierung nahe.

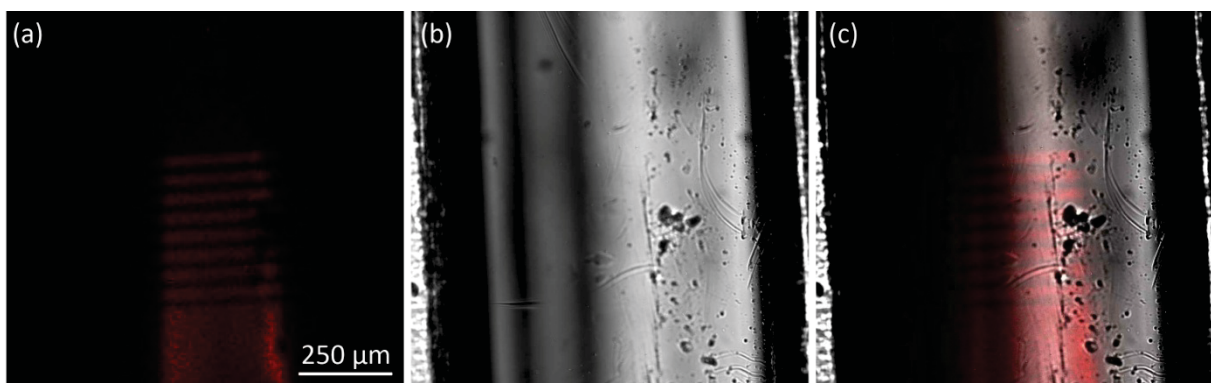


Abbildung 65: Protein-Muster in thermogeformtem Mikrokanal. Mit Hilfe einer maskenlosen Lithographie-Technik konnten Proteinmuster auf einer COP-Folie erzeugt werden. Die Herstellung des Musters erfolgte mit Hilfe von Biotin, das kovalent an die BSA-beschichtete Oberfläche gekuppelt wurde. Die Folien wurden dann durch Mikrothermoformen zu offenen Kanälen geformt. Mittels Fluoreszenz-markiertem Streptavidin-Cy3 wurde das Muster sichtbar gemacht.

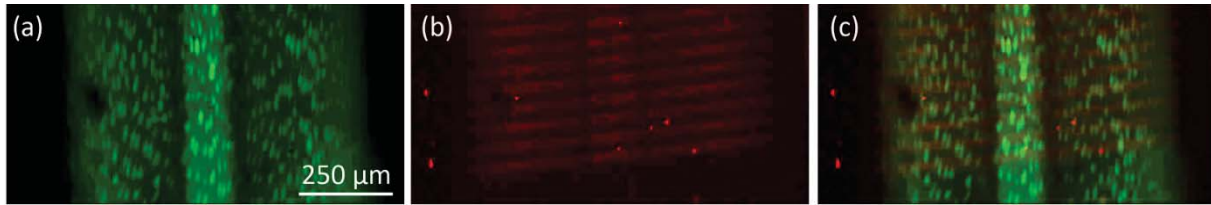


Abbildung 66: Kultivierung von HUVECs auf Protein-Mustern in thermogeformten Mikrokanälen. Mit Hilfe einer maskenlosen Lithographie-Technik konnten Proteinmuster auf einer COP-Folie erzeugt werden. Die Herstellung des Musters erfolgte mit Hilfe von Biotin, das kovalent an die BSA-beschichtete Oberfläche gekuppelt wurde. Die Folien wurden dann durch Mikrothermoformen zu Kanälen geformt, die in ein Bioreaktorsystem eingebaut wurden. Mittels Fluoreszenz-markiertem Streptavidin-Cy3 wurde das Muster sichtbar gemacht. HUVECs wurden auf der Fibronectin-beschichteten Oberfläche des Mikrokanals unter fluidischen Bedingungen über mehrere Tage kultiviert.

Verschiedene Zielmoleküle könnten über den Schritt der Biotinylierung mit dem Pattern verbunden werden. Durch das Anbinden von TNF- α könnte beispielsweise eine lokale Entzündung innerhalb des künstlichen Blutgefäßes simuliert werden. Weitere Versuche dazu werden derzeit durchgeführt.

4.5.8 Besiedelung der unteren Kammer

4.5.8.1 Wachstumskurven verschiedener Zelllinien

Zur Untersuchung des transendothelialen Transports im mikrofluidischen 3D-Bioreaktor sollte eine Ko-Kultur von Endothelzellen auf der inneren Seite der artifiziiellen Blutgefäße, die durch eine dünne, poröse Membran von einer organotypischen Zellkultur im angrenzenden Kompartiment getrennt sind, etabliert werden. Beide Kompartimente sollten dabei in zwei unabhängigen Kreisläufen mit Pumpen und Medienreservoirs zur kontinuierlichen Versorgung der Zellen verbunden sein.

Unterschiedliche Zelllinien benötigen unterschiedliche Medien zur Versorgung mit Nährstoffen. Um zu untersuchen, ob das Medium der Endothelzellen einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen der organotypischen Zellkultur (hier: HepG2, humane Leberkarzinom-Zellen, Fibroblasten, 91_23 bzw. MDA MB 231, humane Brustkrebszellen) hat, wurden Wachstumskurven der Zellen in deren normalem Zellkulturmedium (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium bzw. F12/DMEM) bzw. im Medium der Endothelzellen (EGM-2, Endothelial Growth Medium) erstellt.

Es zeigte sich, dass das Wachstum der HepG2-Zellen im Endothelmedium etwas reduziert war im Gegensatz zu DMEM (Abbildung 67). Die Kultivierung der HepG2-Zellen im Endothelmedium (EGM-2) war dennoch möglich und die Zellen sahen zu jedem Zeitpunkt morphologisch intakt aus.

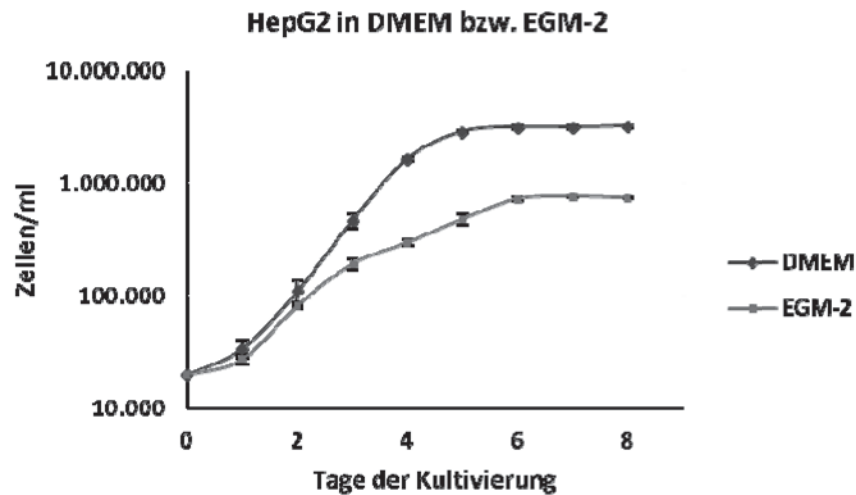


Abbildung 67: Wachstumskurven von HepG2 in DMEM bzw. EGM-2 Medium. HepG2-Zellen wurden zur Untersuchung der Wachstumsraten in DMEM bzw. EGM-2 Medium über 8 Tage kultiviert. In einem Abstand von je 24 h wurde die Zellzahl in den einzelnen Wells einer 24-Well Platte bestimmt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung ($n = 3$).

Das Wachstum der Fibroblasten wurde durch das Kultivieren im Endothelmedium im Vergleich zu DMEM nicht beeinträchtigt (Abbildung 68). Die Wachstumskurven der Fibroblasten befanden sich in beiden Medien in ähnlichen Größenbereichen. Zudem sahen die Zellen zu jedem Zeitpunkt morphologisch intakt aus. Die Kultivierung der Fibroblasten im Endothelmedium (EGM-2) war somit möglich. Durch die Größe der Fibroblasten war die maximale Zellzahl in den Wells der 24-Well Platte bereits nach wenigen Zellteilungen erreicht.

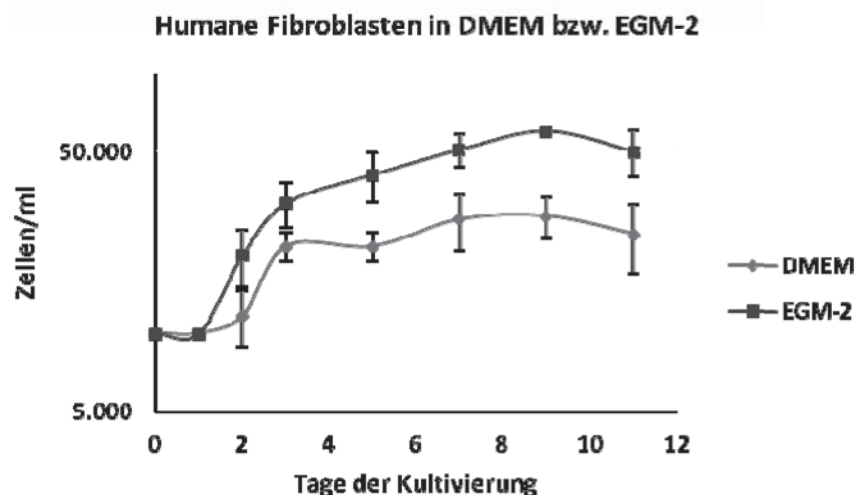


Abbildung 68: Wachstumskurven von humanen Fibroblasten in DMEM bzw. EGM-2 Medium. Humane Fibroblasten wurden zur Untersuchung der Wachstumsraten in DMEM bzw. EGM-2 Medium über Tage kultiviert. In einem Abstand von je 24 h bzw. ab Tag 3 von je 48 h wurde die Zellzahl in den einzelnen Wells einer 24-Well Platte bestimmt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung ($n = 3$).

Auch die Untersuchung des Wachstums von humanen Brustkrebszellen im Endothelmedium EGM-2 zeigte, dass auch diese Zellen im Endothelmedium kultiviert werden konnten. Im optimalen Zellkulturmedium F12/DMEM (1:1) zeigte sich allerdings eine etwas höhere Zellzahl im Laufe der Kultivierungszeit (Abbildung 69).

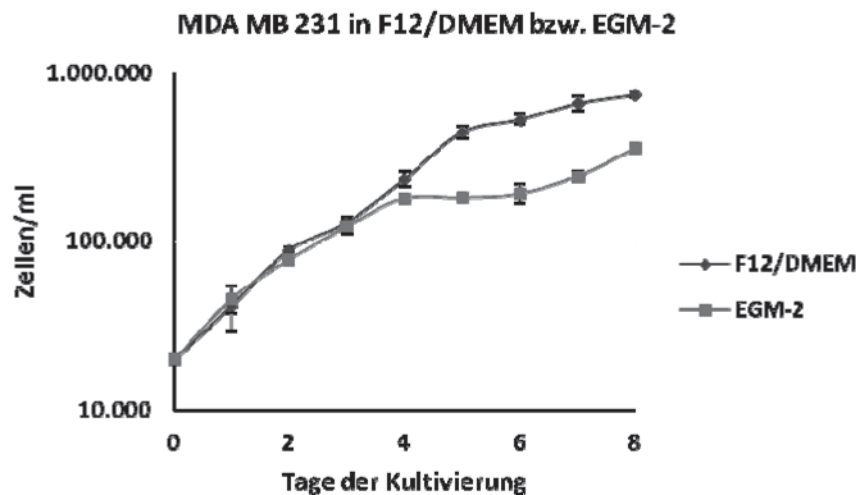


Abbildung 69: Wachstumskurven von humanen Brustkrebszellen in F12/DMEM bzw. EGM-2 Medium. Humane Brustkrebszellen (MDA MB 231) wurden zur Untersuchung der Wachstumsraten in F12/DMEM bzw. EGM-2 Medium über 8 Tage kultiviert. In einem Abstand von je 24 h wurde die Zellzahl in den einzelnen Wells einer 24-Well Platte bestimmt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung ($n = 3$).

4.5.8.2 Ko-Kultur im mikrofluidischen Bioreaktor

Die untere Kammer des mikrofluidischen Bioreaktors erlaubte die Ko-Kultivierung verschiedener Zelllinien nahe den Endothelzellen im porösen Mikrokanal. Die Porosität des Kanals ermöglichte einen Austausch zwischen beiden Kompartimenten. Zum besseren Anwachsen der Zellen im unteren Kompartiment auf dem Deckgläschen wurde ebenfalls wie im Mikrokanal je nach Zelltyp eine Beschichtung mit Fibronectin bzw. Kollagen vorgenommen. Über die mit der unteren Kammer verbundenen Anschlüsse konnte dann ein weiteres Pumpensystem angeschlossen werden. Die untere Kammer konnte somit sowohl statisch als auch fluidisch betrieben werden.

Abbildung 70 zeigt die Kultivierung von humanen Fibroblasten bzw. Brustkrebszellen (MDA MB 231) auf dem Deckglas (zweidimensionaler Monolayer), das die untere Kammer unter dem mikrofluidischen künstlichen Blutgefäß begrenzt. Eine Kultivierung der Zellen unter statischen Bedingungen war über mehrere Tage möglich.

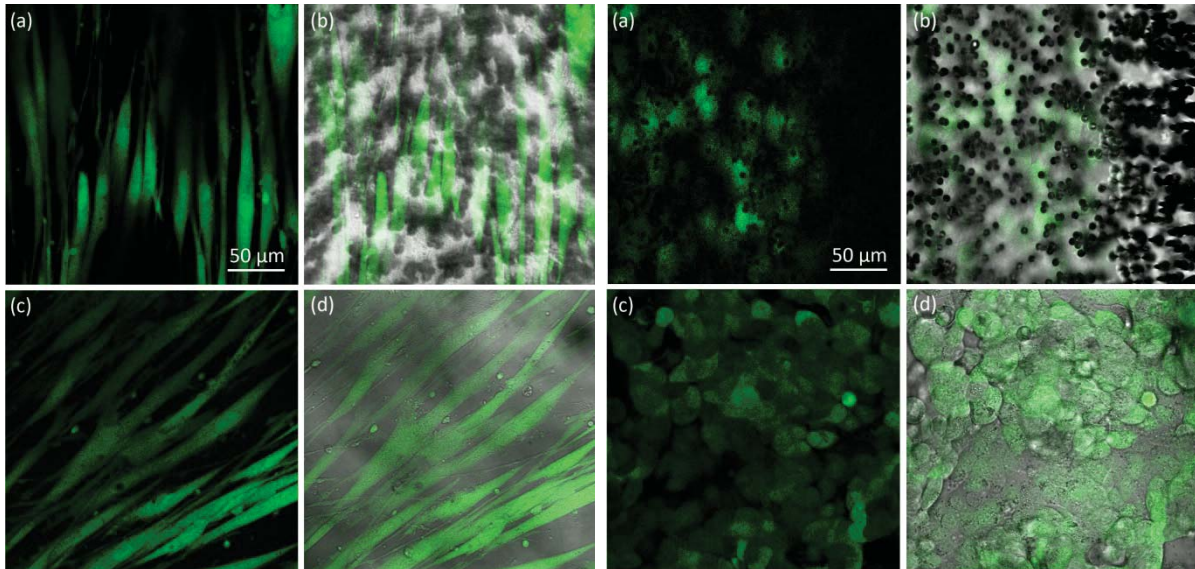


Abbildung 70: Ko-Kultur von Fibroblasten bzw. Brustkrebszellen im unteren Kompartiment des Bioreaktors. Fibroblasten bzw. Brustkrebszellen wurden in der Kollagen-beschichteten unteren Kammer des Bioreaktors bei 37°C und 5% CO₂ über mehrere Tage kultiviert. (a) und (b) zeigen jeweils die Zellen in der unteren Kammer direkt unter dem porösen Mikrokanal, (c) und (d) zeigen die Zellen in der unteren Kammer seitlich des Kanals. (a), (c) CellTracker™ Green markierte Fibroblasten (links) bzw. Brustkrebszellen (MDA MB 231, rechts), grün. (b), (d) Überlagerung von (a) bzw. (c) mit Hellfeld-Aufnahme. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

4.6 Endotheliale Aufnahme und transendothelialer Transport von Peptoiden

4.6.1 Peptoide allgemein

Zell-penetrierende Peptoide (CPPos) sind Mimetika Zell-penetrierender Peptide (CPPs) und werden als ‚Drug Delivery‘ Systeme für den Transport von Wirkstoffen, Fluorophoren oder Nanopartikeln in Zellen untersucht. Im Gegensatz zu Peptiden befinden sich die Seitenketten der Aminosäuren bei den Peptoiden an den Stickstoffatomen anstatt an den Kohlenstoffatomen. Dadurch sind Peptoide beständig gegen den Abbau durch Proteasen und deshalb interessante ‚Drug Delivery‘ Systeme (siehe auch Abschnitt 2.3.2).

4.6.2 Zytotoxizitätstest

Mit Hilfe eines mikrofluidischen 3D-Bioreaktors sollte die endotheliale Aufnahme sowie der transendotheliale Transport von fluoreszenzmarkierten, polykationischen Peptoide als ‚Drug Delivery‘ Systeme untersucht werden. Die verwendeten Peptoide wurden von Esther Birtalan, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Bräse, Institut für Organische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie synthetisiert und freundlicherweise für zelluläre Studien zur Verfügung gestellt.^[80, 84, 134-136]

Um zu untersuchen, ob die synthetisierten polykationischen Peptoide für diese Experimente geeignet sind, wurde ein Zytotoxizitätstest an Endothelzellen durchgeführt. Hierzu wurden



die Rhodamin-markierten Peptide $\{Rh\}\text{-}\{XYL\}_{A6}NH_2$ (EB876), $\{Rh\}\text{-}\{XYL\}_{G6}NH_2$ (EB879), $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{A6}NH_2$ (EB896) und $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{G6}NH_2$ (EB899) (Abbildung 71) verwendet.

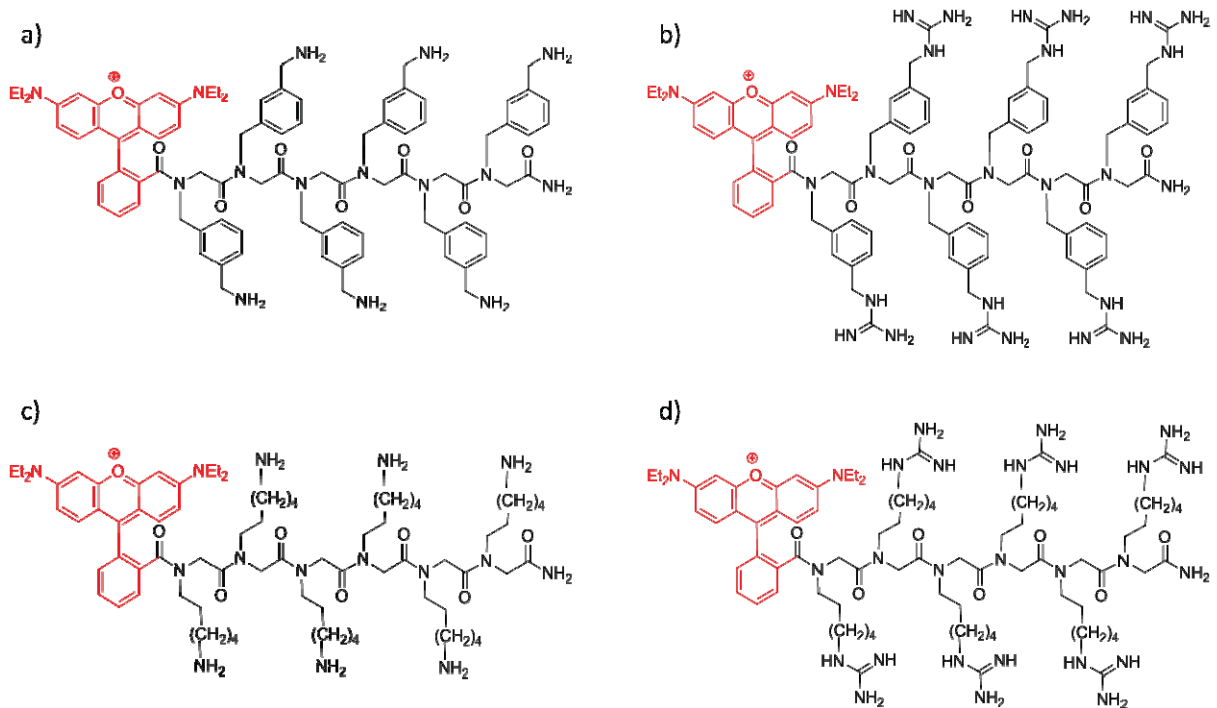


Abbildung 71: Rhodamin-markierte polykationische Peptide. a) $\{Rh\}\text{-}\{XYL\}_{A6}NH_2$ (EB876), b) $\{Rh\}\text{-}\{XYL\}_{G6}NH_2$ (EB879), c) $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{A6}NH_2$ (EB896) und d) $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{G6}NH_2$ (EB899).

Abbildung 72 - Abbildung 75 zeigen die Zellaktivitäten der Endothelzellen nach 24 bzw. 72-stündiger Inkubation mit den Peptoiden EB876, EB879, EB896 und EB899 in den Konzentrationen 2, 5, 10 und 20 μM .

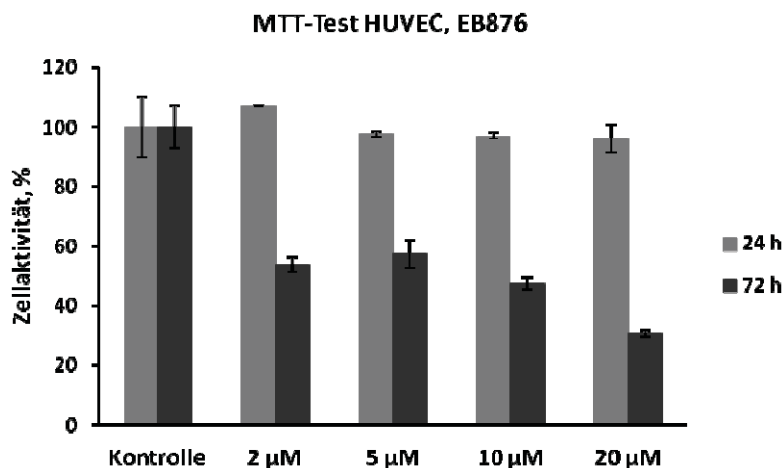


Abbildung 72: Zellaktivität von HUVEC-Zellen nach Inkubation mit EB876 für 24 bzw. 72 h. HUVEC-Zellen wurden in 96-Well Multiwellplatten kultiviert mit dem polykationischen Peptoid EB876 für 24 bzw. 72 h inkubiert. Danach wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Das Diagramm zeigt die entsprechenden Zellaktivitäten nach der Inkubation normiert auf die Zellaktivität nicht behandelter Kontrollzellen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung ($n = 4$).

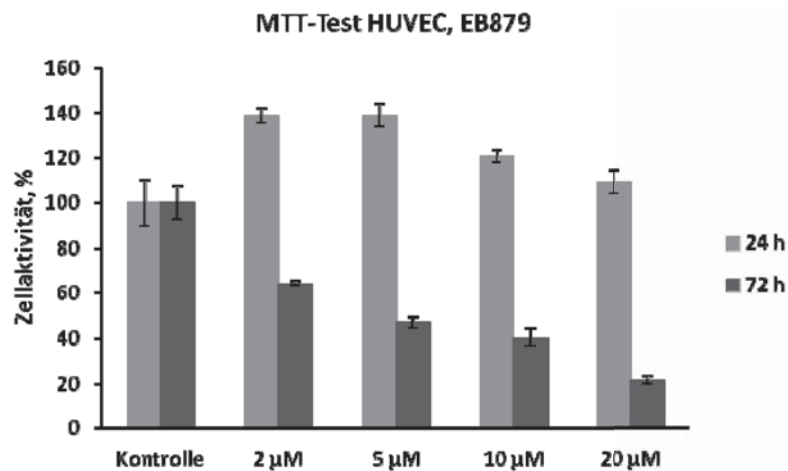


Abbildung 73: Zellaktivität von HUVEC-Zellen nach Inkubation mit EB879 für 24 bzw. 72 h. HUVEC-Zellen wurden in 96-Well Multiwellplatten kultiviert mit dem polykationischen Peptoid EB879 für 24 bzw. 72 h inkubiert. Danach wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Das Diagramm zeigt die entsprechenden Zellaktivitäten nach der Inkubation normiert auf die Zellaktivität nicht behandelter Kontrollzellen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung (n = 4).

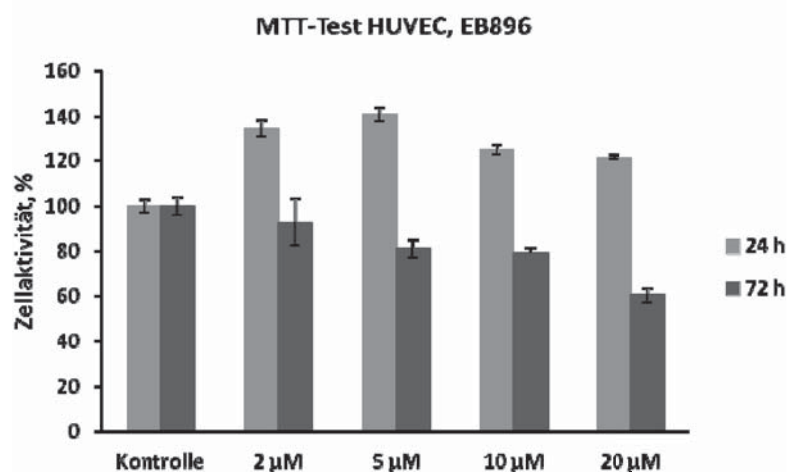


Abbildung 74: Zellaktivität von HUVEC-Zellen nach Inkubation mit EB896 für 24 bzw. 72 h. HUVEC-Zellen wurden in 96-Well Multiwellplatten kultiviert mit dem polykationischen Peptoid EB896 für 24 bzw. 72 h inkubiert. Danach wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Das Diagramm zeigt die entsprechenden Zellaktivitäten nach der Inkubation normiert auf die Zellaktivität nicht behandelter Kontrollzellen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung (n = 4).

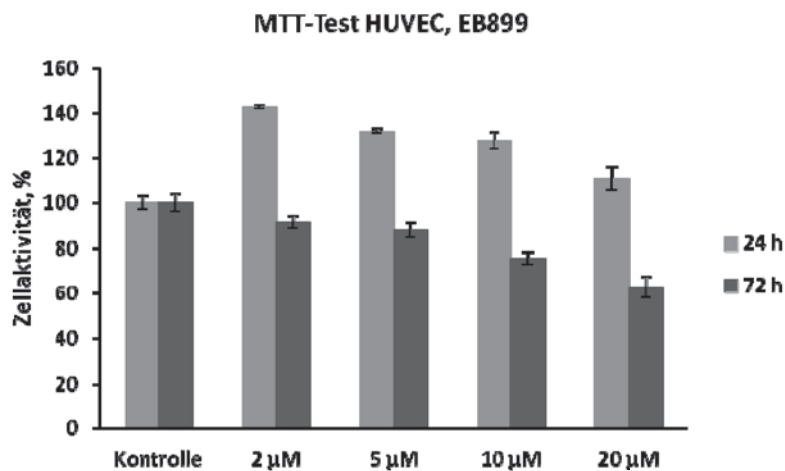


Abbildung 75: Zellaktivität von HUVEC-Zellen nach Inkubation mit EB899 für 24 bzw. 72 h. HUVEC-Zellen wurden in 96-Well Multiwellplatten kultiviert mit dem polykationischen Peptoid EB899 für 24 bzw. 72 h inkubiert. Danach wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Das Diagramm zeigt die entsprechenden Zellaktivitäten nach der Inkubation normiert auf die Zellaktivität nicht behandelter Kontrollzellen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung ($n = 4$).

Bei den 24 h Inkubationen wurden die Zellaktivitäten durch kein Peptoid beeinträchtigt. Die 72 h Inkubation zeigte hingegen eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellaktivität. Die Peptide EB876 und EB879 mit aromatischen Seitenketten zeigten hierbei eine größere Beeinträchtigung der Zellaktivität als die Peptide EB896 und EB899 mit aliphatischen Seitenketten. Die Amin- bzw. Guanidin-Reste an den Seitenketten schienen keinen merklichen Einfluss auf die Zytotoxizität zu haben.

In den für die Zellversuche verwendeten Konzentrationsbereichen 2 µM und 5 µM war nur eine geringe Zytotoxizität der Peptide zu beobachten. Daher konnten die untersuchten Peptide für Zellversuche eingesetzt werden, um deren Aufnahme- und Transportverhalten zu untersuchen.

4.6.3 Qualitative Bestimmung der Peptoidaufnahme unter statischen Bedingungen

Um die Aufnahme verschiedener polykationischer Peptide in Endothelzellen untersuchen zu können, wurden HUVECs 24 h mit Rhodamin-markierten Peptoiden (5 µM) inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs anschließend mit MitoTracker® zur Färbung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Färbung der Zellkerne inkubiert.

Die Mikroskopieaufnahmen zeigten eine erfolgreiche Aufnahme aller Peptide in HUVECs (Abbildung 76 – Abbildung 79). Die Peptide zeigten sich in den Zellen in vesikulären, möglicherweise endosomalen Strukturen. Es war zu beobachten, dass die Transporter EB879 (Abbildung 77) und EB899 (Abbildung 79), beides Transporter mit Guanidiniumgruppen, bei gleicher Konzentration schneller aufgenommen wurden als die entsprechenden Transporter mit Aminogruppen EB876 (Abbildung 76) und EB896 (Abbildung 78). Die Peptide zeigten

vorzugsweise eine Anlagerung im Bereich um den Zellkern. Weitere Mikroskopieaufnahmen befinden sich im Anhang dieser Arbeit (Abbildung 121 –Abbildung 124).

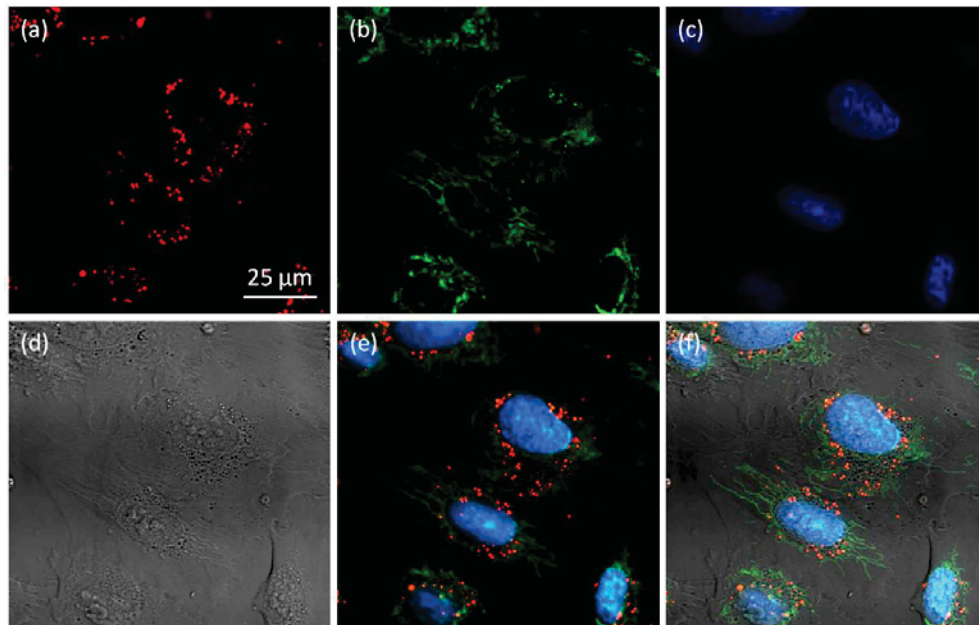


Abbildung 76: Peptoidaufnahme und -verteilung $\{Rh\}\text{-}\{XYL\}_{6A}NH_2$ (EB876) in HUVEC-Zellen I. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB876 ($5\ \mu M$) für 24 h bei $37^\circ C$ inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB876). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f), Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

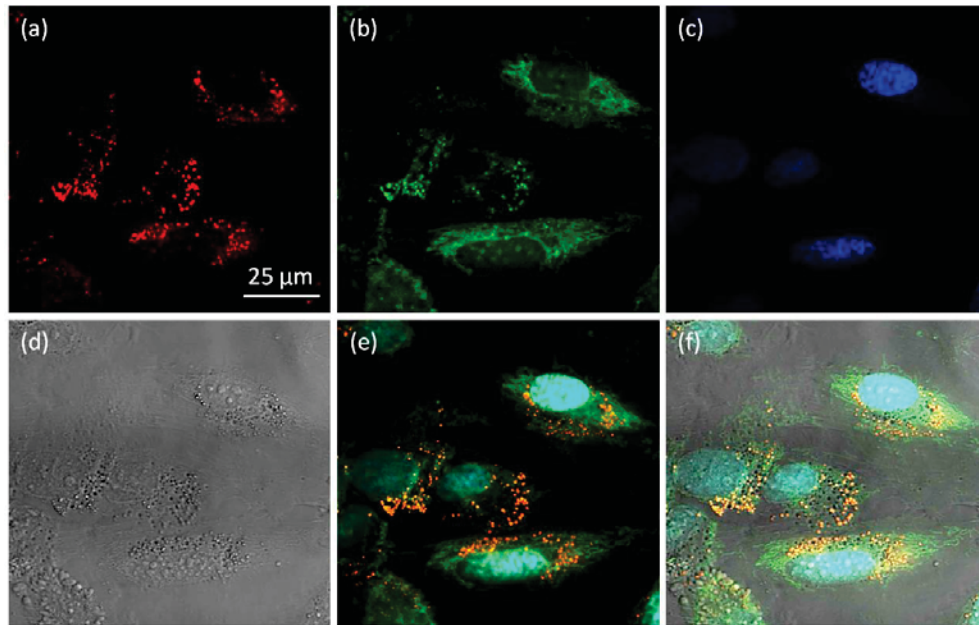


Abbildung 77: Peptidaufnahme und -verteilung $\{Rh\}\text{-}\{XYL\}_{6G}NH_2$ (EB879) in HUVEC-Zellen I. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB879 ($5\ \mu M$) für 24 h bei $37^\circ C$ inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB879). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f), Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

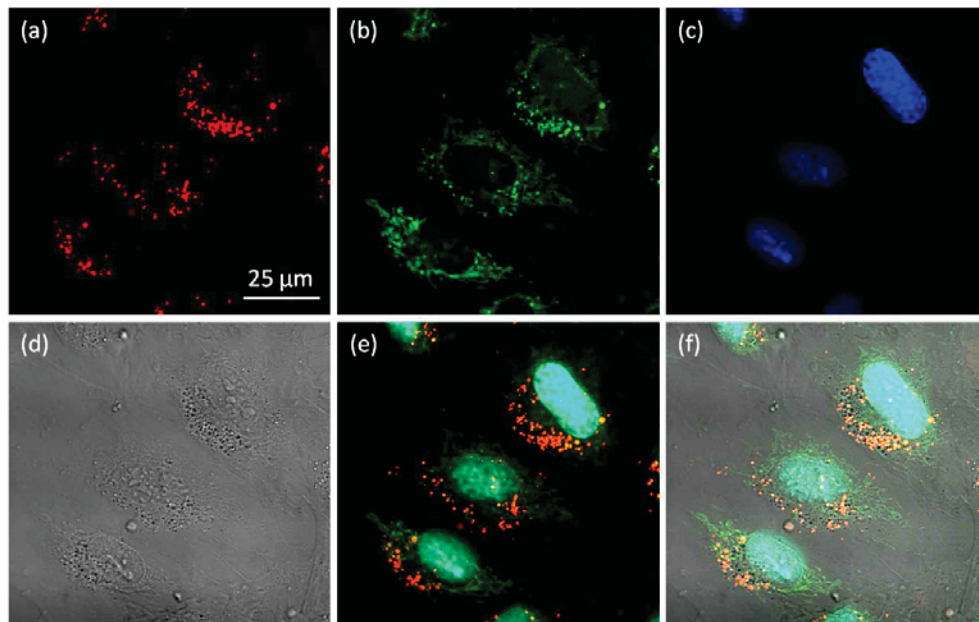


Abbildung 78: Peptidaufnahme und -verteilung $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{6A}NH_2$ (EB896) in HUVEC-Zellen I. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB896 ($5\ \mu M$) für 24 h bei $37^\circ C$ inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB896). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f), Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

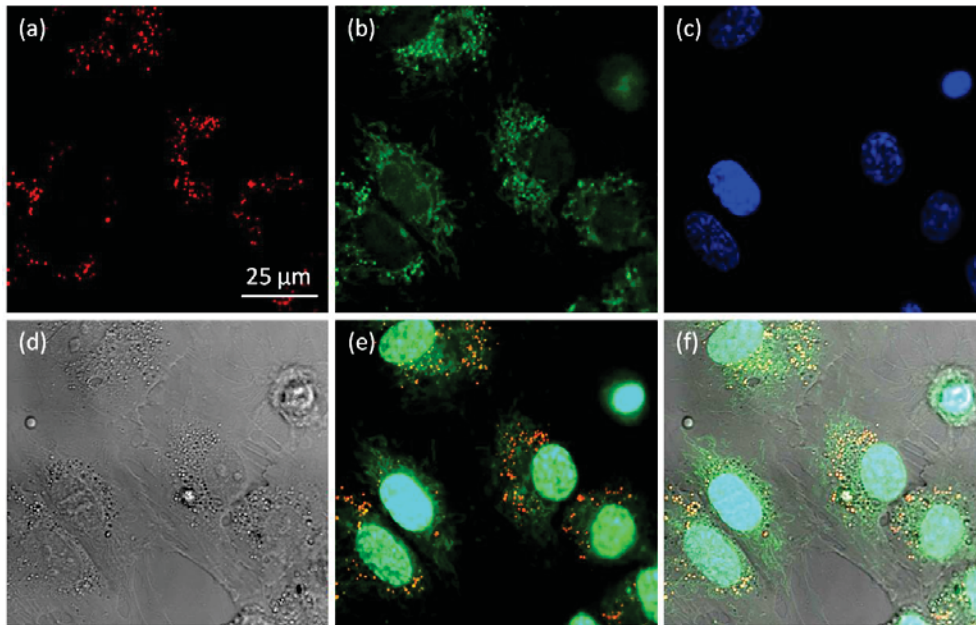


Abbildung 79: Peptoidaufnahme und -verteilung $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{6G}NH_2$ (EB899) in HUVEC-Zellen I. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB899 ($5\ \mu M$) für 24 h bei $37^\circ C$ inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB899). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f), Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

4.6.4 Quantitative Bestimmung der Peptoidaufnahme unter statischen Bedingungen

4.6.4.1 LC-MS/MS Methode

Zur quantitativen Untersuchung der endothelialen Aufnahme polykationischer Peptide in HUVEC-Zellen wurden LC-MS/MS (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie)- Methoden entwickelt. Diese Methoden lieferten hohe analytische Sensitivität und Spezifität. Eine Identifizierung der Verbindung erfolgte dabei durch die Fragmentierung des Vorläufer-Ions und der daraus entstehenden charakteristischen Produkt-Ionen.

4.6.4.2 Externe Kalibrierung

Um die endotheliale Aufnahme der polykationischen Peptide quantifizieren zu können, war eine externe Kalibrierung notwendig. Hierzu wurden HUVEC-Zellen über den entsprechenden Zeitraum kultiviert und nach dem Trypsinieren mit dem entsprechenden Peptoid in einer Verdünnungsreihe behandelt. Die Zellysate der anschließenden Aufnahmeversuche in ausplattierten Endothelzellen wurde mit derselben Aufarbeitungsmethode hergestellt. Dazu wurden Endothelzellen in verschiedenen Konzentrationen der unterschiedlichen Peptoiden behandelt.

Die Kalibrierungen zeigten, dass sich die entwickelten Methoden zur Quantifizierung der Peptide $\{Rh\}\text{-}\{YXL\}_{A6}NH_2$ (EB876), $\{Rh\}\text{-}\{XYL\}_{G6}NH_2$ (EB879), $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{A6}NH_2$ (EB896) und $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{G6}NH_2$ (EB899) eigneten. Die Detektion und Quantifizierung der Peptide erfolgte jeweils mithilfe der intensivsten Massenübergänge MRM1 (423,2/84,1) und MRM2 (423,2/112,0) für EB876, MRM1 (806,6/330,2) und MRM2 (806,6/376,1) für EB879, MRM1 (696,5/220,0) und MRM2 (696,5/376,1) für EB896 bzw. MRM1 (935,7/219,9) und MRM2 (935,7/376,2) für EB899. Abbildung 80 zeigt ein charakteristisches Chromatogramm der externen Kalibrierung von EB896 in Zelllysaten von HUVECs.

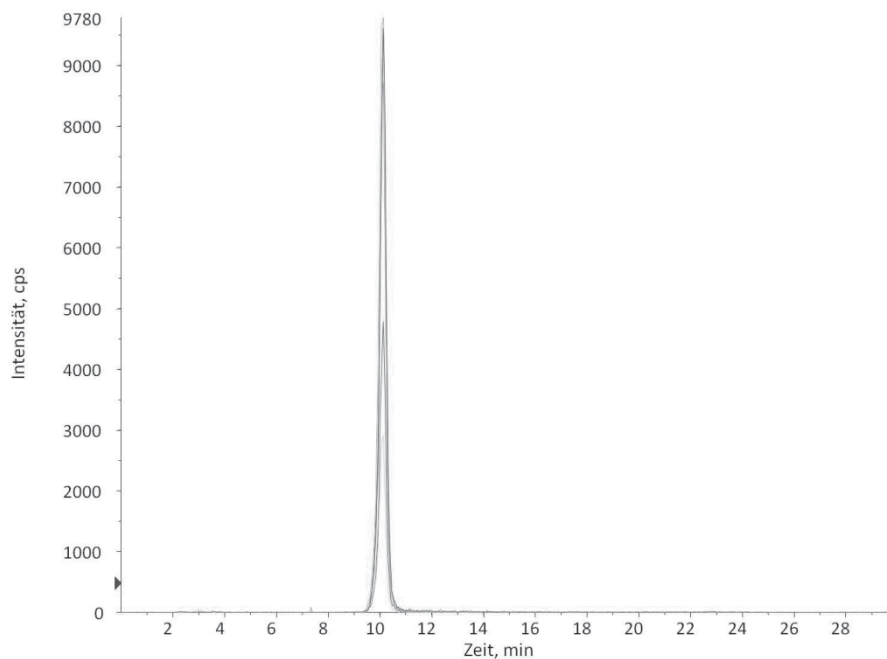


Abbildung 80: Charakteristisches Chromatogramm des Peptoids $\{Rh\}\text{-}\{HEX\}_{6A}NH_2$ (EB896). Externe Kalibrierung in Zelllysaten von HUVECs, Konzentration 10 nM.

Abbildung 81 bis Abbildung 84 zeigen die Kalibriergeraden der externen Kalibrierungen der Peptide in Zelllysaten. Aus mindestens zwei unterschiedlichen Experimenten wurden die Kalibriergeraden mit Standardabweichungen ermittelt. Die Methode schien über einen weiten Bereich linear zu sein. Lediglich in niedrigen Konzentrationsbereichen zeigten die Kalibrierungen eher polynomische Funktionen. In diesen Bereichen wurden die gemessenen Peptoid-Konzentrationen möglicherweise durch das Anhaften von Peptoiden an Zellbestandteilen beeinflusst.

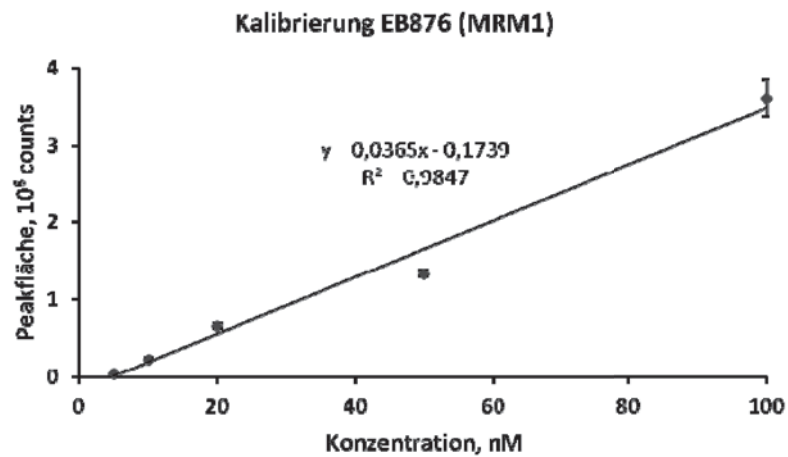


Abbildung 81: Externe Kalibrierung des Peptoids {Rh}-{XYL}_{6A}NH₂ (EB876) in Zelllysaten von HUVEC-Zellen. Das Peptoid wurde zu den trypsinisierten Zellen zugefügt und mit der Probe aufgearbeitet. Massenübergang (MRM1). Dargestellt sind die Mittelwert aus zwei unterschiedlichen Experimenten mit Standardabweichung (n = 2).

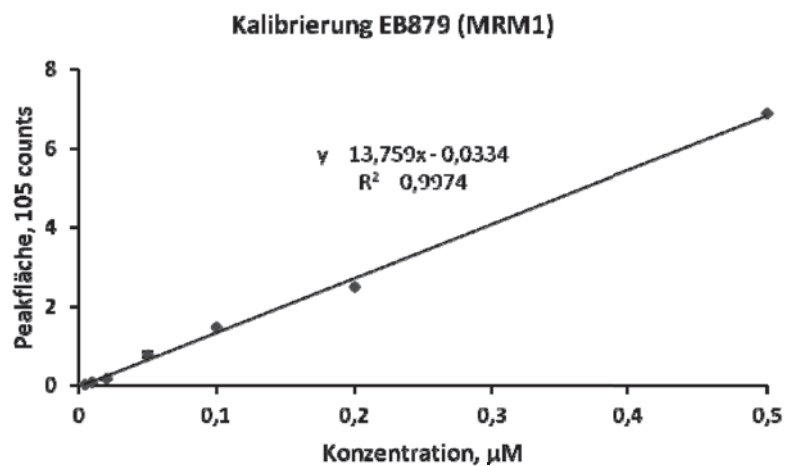


Abbildung 82: Externe Kalibrierung des Peptoids {Rh}-{XYL}_{6G}NH₂ (EB879) in Zelllysaten von HUVEC-Zellen. Das Peptoid wurde zu den trypsinisierten Zellen zugefügt und mit der Probe aufgearbeitet. Massenübergang (MRM1). Dargestellt sind die Mittelwert aus zwei unterschiedlichen Experimenten mit Standardabweichung (n = 2).

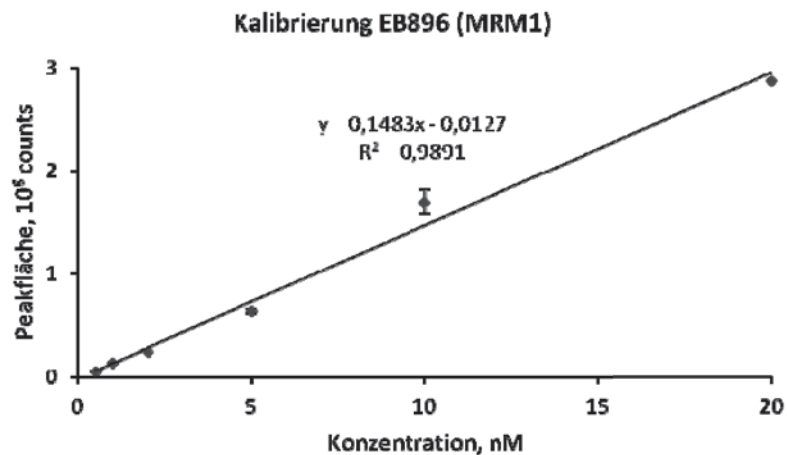


Abbildung 83: Externe Kalibrierung des Peptoids {Rh}-{HEX}_{6A}NH₂ (EB896) in Zelllysaten von HUVEC-Zellen. Das Peptoid wurde zu den trypsinisierten Zellen zugefügt und mit der Probe aufgearbeitet. Massenübergang (MRM1). Dargestellt sind die Mittelwert aus zwei unterschiedlichen Experimenten mit Standardabweichung (n = 2).

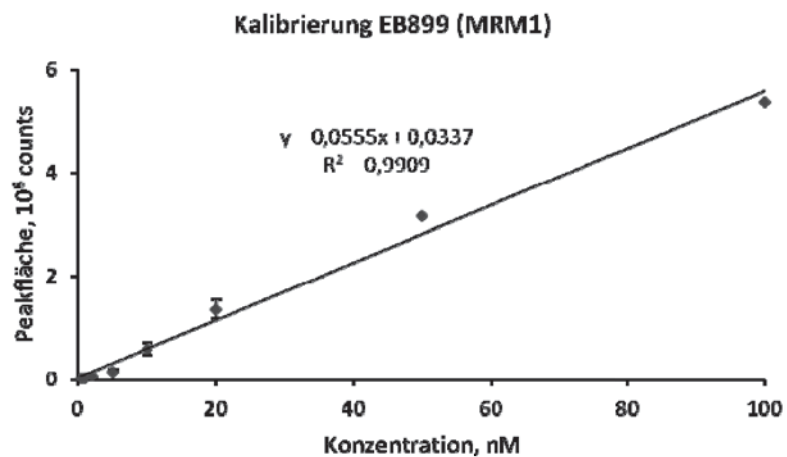


Abbildung 84: Externe Kalibrierung des Peptoids {Rh}-{HEX}_{6G}NH₂ (EB899) in Zelllysaten von HUVEC-Zellen. Das Peptoid wurde zu den trypsinisierten Zellen zugefügt und mit der Probe aufgearbeitet. Massenübergang (MRM1). Dargestellt sind die Mittelwert aus zwei unterschiedlichen Experimenten mit Standardabweichung (n = 2).

4.6.4.3 Endotheliale Aufnahme polykationischer Peptide

Um die endotheliale Aufnahme polykationischer Peptide untersuchen zu können, wurden HUVEC-Zellen in die Wells von 6-Well Multiwellplatten ausgesät und mit den Peptoiden {Rh}-{YXL}_{A6}NH₂ (EB876), {Rh}-{XYL}_{G6}NH₂ (EB879), {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) und {Rh}-{HEX}_{G6}NH₂ (EB899) in Konzentrationen von 2 μM und 5 μM für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Peptoidgehalte in den Zelllysaten mit Hilfe von LC-MS/MS bestimmt. Abbildung 85 zeigt ein charakteristisches Chromatogramm des Peptoids {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) in Zelllysaten von HUVECs nach Inkubation für 24 h mit einer Konzentration von 5 μM. Weitere Chromatogramme der Peptide {Rh}-{YXL}_{A6}NH₂ (EB876), {Rh}-{XYL}_{G6}NH₂ (EB879), {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) und {Rh}-{HEX}_{G6}NH₂ (EB899) in Zelllysaten von HUVECs



nach Inkubation für 24 h in den Konzentrationen 2 μM und 5 μM finden sich im Anhang dieser Arbeit.

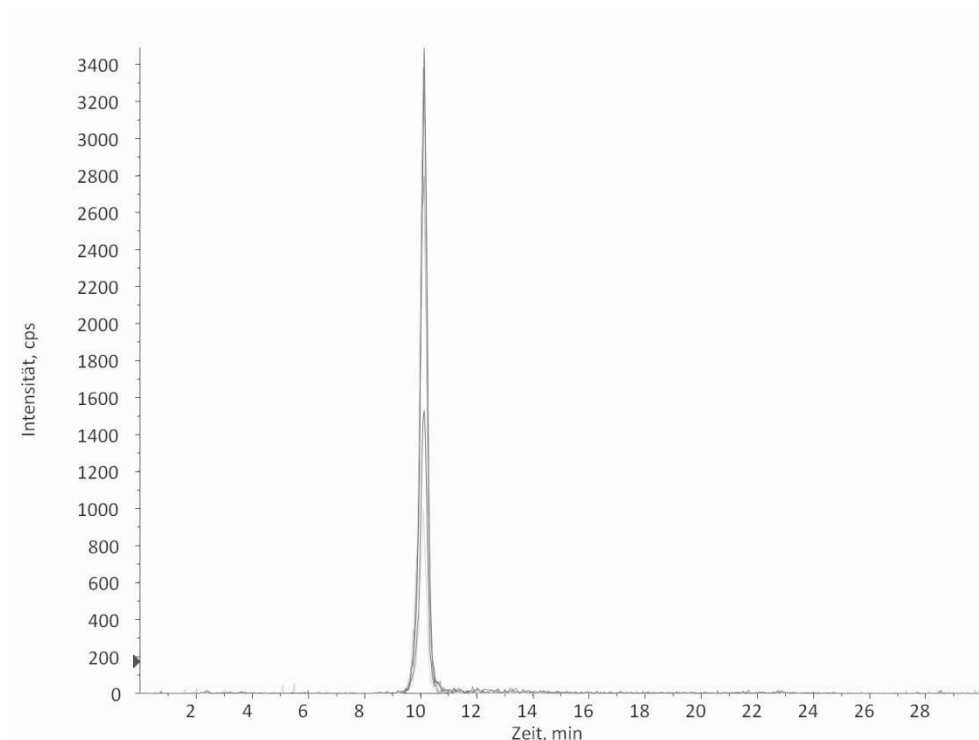


Abbildung 85: Charakteristisches Chromatogramm des Peptoids $\{\text{Rh}\}\text{-}\{\text{HEX}\}_6\text{A}\text{NH}_2$ (EB896). Inkubation von HUVEC-Zellen für 24 h mit einer Konzentration von 5 μM , Nachweis in Zelllysaten.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Peptide innerhalb des Inkubationszeitraums von 24 h von den Endothelzellen aufgenommen wurden und erfolgreich mit der entsprechenden LC-MS/MS Methode nachgewiesen werden konnten (Abbildung 86 und Abbildung 87).

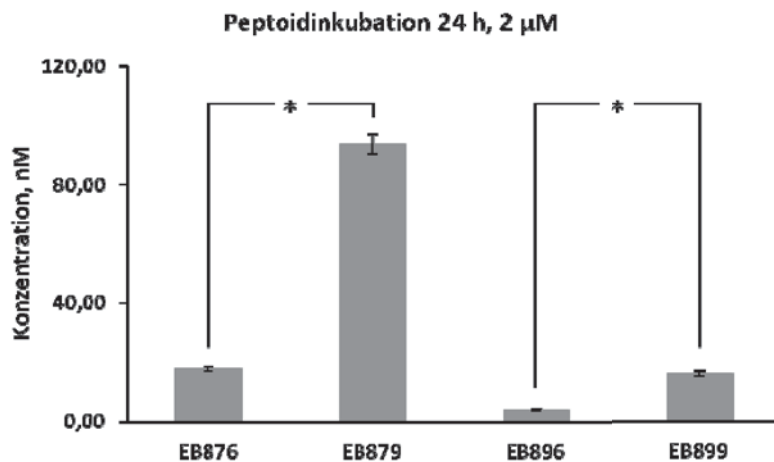


Abbildung 86: Peptoidinkubation von Endothelzellen (2 μ M). HUVEC-Zellen wurden mit den Peptoiden EB876, EB879, EB896 und EB899 in einer Konzentration von 2 μ M für 24 h inkubiert und lysiert. Die Peptoidkonzentration in den Zelllysaten wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Die guanidinylierten Peptide EB879 und EB899 zeigten im Vergleich zu den Amin-gekoppelten Analoga signifikant höhere Konzentrationen in den HUVEC-Zellen (* p <0,05). Dargestellt sind die Mittelwert aus drei unterschiedlichen Experimenten mit Standardabweichung (n = 3).

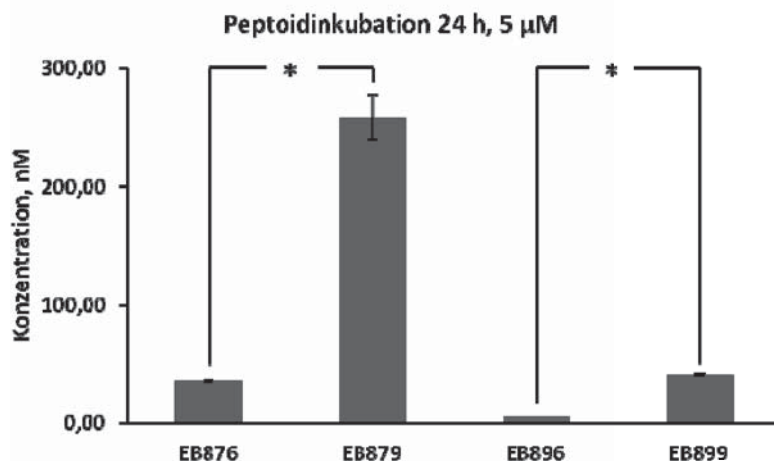


Abbildung 87: Peptoidinkubation von Endothelzellen (5 μ M). HUVEC-Zellen wurden mit den Peptoiden EB876, EB879, EB896 und EB899 in einer Konzentration von 5 μ M für 24 h inkubiert und lysiert. Die Peptoidkonzentration in den Zelllysaten wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Die guanidinylierten Peptide EB879 und EB899 zeigten im Vergleich zu den Amin-gekoppelten Analoga signifikant höhere Konzentrationen in den HUVEC-Zellen (* p <0,05). Dargestellt sind die Mittelwert aus drei unterschiedlichen Experimenten mit Standardabweichung (n = 3).

Es wurde deutlich, dass sowohl bei den aliphatischen als auch bei den aromatischen Peptoiden die guanidinylierten Peptide in signifikant höheren Konzentrationen aufgenommen wurden als die entsprechenden mit Aminogruppen gekoppelten Peptide. Der Oligoguanidin-gekoppelte aromatischen Peptoid-Transporter EB879 konnte mit 93,5 nM (2 μ M Inkubation) und 285,3 nM (5 μ M Inkubation) in den Zellen nachgewiesen werden, dies entsprach ungefähr 5% der eingesetzten Menge. Im Vergleich dazu wurde das entsprechende Oligoamin-Analogon EB876 mit 17,9 nM (2 μ M Inkubation) und 35,5 nM



(5 μM Inkubation) nachgewiesen, was etwa einem Prozent der eingesetzten Menge entsprach. Bei den aliphatischen Peptoiden wurde das Oligoguanidin-gekoppelte Peptoid EB899 mit 16,1 nM (2 h Inkubation) und 40,8 nM (5 h Inkubation), was ungefähr einem Prozent der eingesetzten Menge entsprach, schneller von den Endothelzellen aufgenommen als das entsprechende Oligoamin-gekoppelte Peptoid EB896 mit 3,9 nM (2 μM Inkubation) und 5,6 nM (5 μM Inkubation). Dies entsprach etwa 0,2 bzw. 0,1% der eingesetzten Menge.

Die Werte verdeutlichen weiterhin, dass die aromatischen Peptoide, hier EB876 und EB879, signifikant schneller aufgenommen wurden als die entsprechenden Peptoid-Analoga mit aromatischen Seitenketten (Abbildung 88).

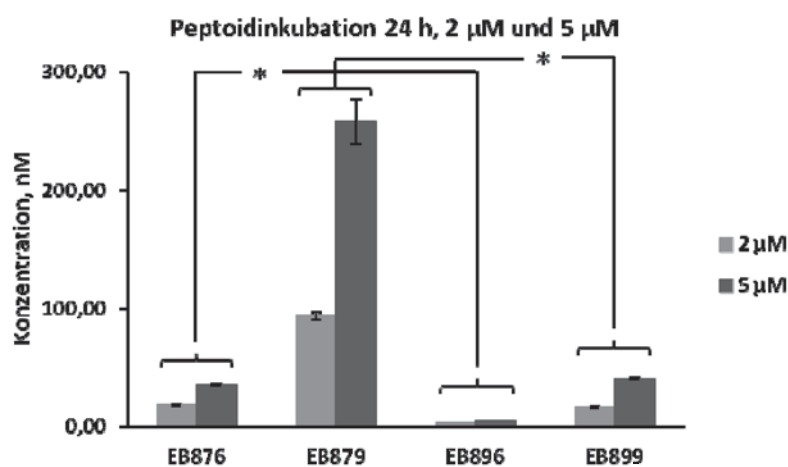


Abbildung 88: Peptoidinkubation von Endothelzellen (2 μM und 5 μM). HUVEC-Zellen wurden mit den Peptoiden EB876, EB879, EB896 und EB899 in einer Konzentration von 2 μM und 5 μM für 24 h inkubiert und lysiert. Die Peptoidkonzentration in den Zelllysaten wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwert aus drei unterschiedlichen Experimenten mit Standardabweichung ($n = 3$), * $p < 0,05$.

4.6.5 Zeitabhängigkeit der Peptoidaufnahme unter statischen Bedingungen

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der endothelialen Aufnahme polykationischer Peptide unter statischen Bedingungen wurde beispielhaft das Peptoid $\{\text{Rh}\}\text{-}\{\text{HEX}\}_{\text{A}6}\text{NH}_2$ (EB896) untersucht. Wie im vorangegangenen Versuch wurden die Endothelzellen in 6-Well Kammern kultiviert und mit dem Peptoid für spezifische Zeitpunkte (3, 6, 9, 12 und 24 h) inkubiert, lysiert und im Anschluss mittels LC-MS/MS die Konzentration der aufgenommenen Peptide bestimmt.

Abbildung 89 zeigt die zeitabhängige Aufnahme der Peptoide in den Endothelzellen. Bereits nach wenigen Stunden konnte eine deutliche Aufnahme der Peptoide beobachtet werden. Selbst nach 24 Stunden wurde noch weiteres Peptoid aufgenommen.

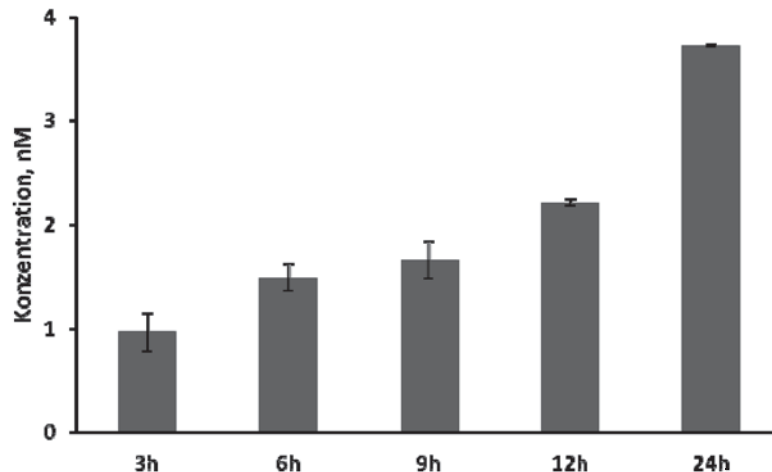


Abbildung 89: Zeitabhängige Peptoidinkubation von Endothelzellen ($2 \mu\text{M}$). HUVEC-Zellen wurden mit dem Peptoid-Transporter EB896 in einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ für 3, 6, 9, 12 und 24 h inkubiert und lysiert. Die Peptoidkonzentration in den Zellysaten wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwert aus zwei unterschiedlichen Experimenten mit Standardfehler ($n = 2$).

4.6.6 Zeitabhängigkeit der Peptoidaufnahme unter fluidischen Bedingungen

Zur Untersuchung des Wachstums von HUVEC-Zellen in einem durchströmten System wurden parallel zur Entwicklung des mikrofluidischen Bioreaktors μ -Slide-Kanäle (ibidi) als Kontrollsysteme verwendet. Nach dem Einbringen der Zellen in den Kanal wurden diese etwa 4 h inkubiert, um das Anwachsen zu gewährleisten. Im Anschluss wurde der Kanal an ein Pumpensystem (ibidi) mit Mediumreservoir angeschlossen und kontinuierlich mit Medium durchströmt.

Etwa 72 h nach Beginn des Durchströmens mit einer Geschwindigkeit von $15,19 \text{ ml/min}$ war eine Orientierung der Zellen in Fließrichtung des Mediums zu erkennen. Dies entsprach den Ergebnissen der Untersuchungen im mikrofluidischen Bioreaktor (siehe Abschnitt 4.5.5.1).

Die zeitabhängige Aufnahme der Peptide konnte mit Hilfe dieses Systems auch unter fluidischen Bedingungen beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass polykationische Peptide unter fluidischen Bedingungen zeitabhängig von den Endothelzellen aufgenommen wurden. Die über drei Tage unter fluidischen Bedingungen kultivierten Endothelzellen wurden mit einer $5 \mu\text{M}$ Peptoidlösung (EB896) in EGM-2 inkubiert und 3, 6, 9, 12 und 24 h nach Beginn der Inkubation mikroskopiert. Die Fließgeschwindigkeit von $15,19 \text{ ml/min}$ wurde beibehalten. Um die Peptoidaufnahme zu quantifizieren, wurden z-Stapel ($3,02 \mu\text{m}$) über verschiedene Bereiche des Kanals aufgenommen (Abbildung 90) und die mittlere, relative Fluoreszenzintensität berechnet. Abbildung 91 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung der Peptoidaufnahme.

Es wurde deutlich, dass innerhalb der ersten 12 h eine kontinuierliche Peptoidaufnahme erfolgte. Die Peptoidaufnahme war zu Beginn am höchsten und flachte mit zunehmender Zeit ab. 24 h nach Beginn der Inkubation konnte keine Zunahme der Peptoidaufnahme mehr



nachgewiesen werden (Abbildung 91). Es erfolgte somit eine Sättigung in der Peptoidaufnahme. Möglicherweise kam es hier zu einem Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Abgabe bzw. Verstoffwechslung der Peptide. Zudem verarmte die Inkubationslösung durch die Waschvorgänge vor dem Mikroskopieren zunehmend an Peptoiden.

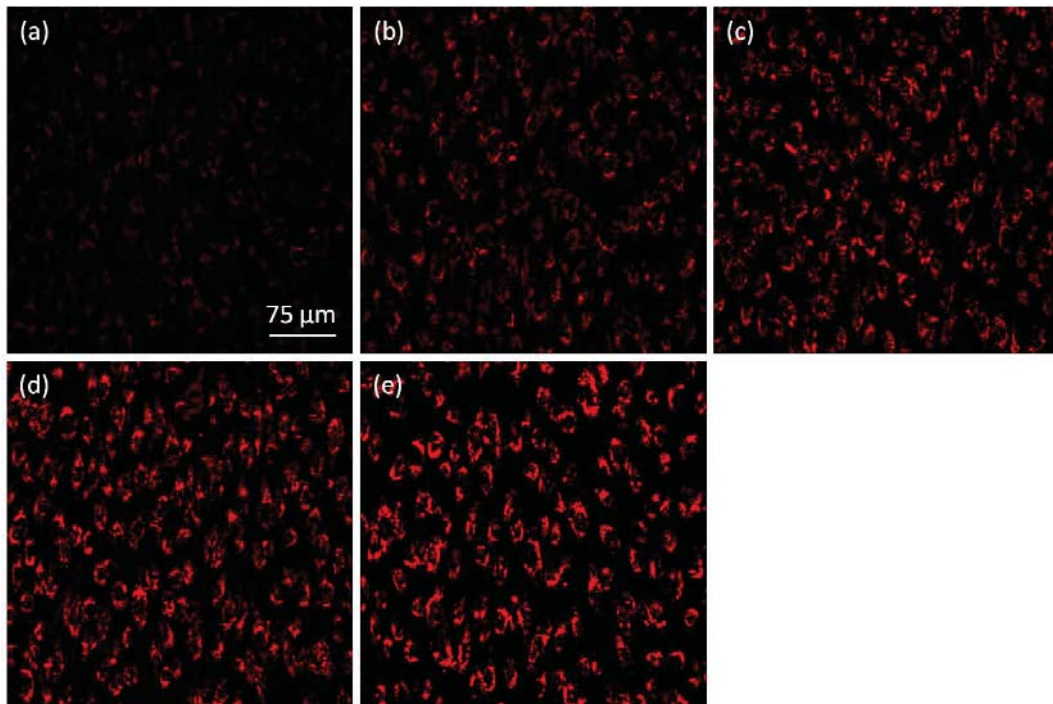


Abbildung 90: Peptoidaufnahme EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen, z-Stapel. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Rhodamin-markierten Peptoid-Transporter EB896 ($5 \mu\text{M}$ in EGM-2) unter kontinuierlichem Durchströmen ($15,19 \mu\text{l}/\text{min}$) über 24 h bei 37°C inkubiert. Z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von $3,02 \mu\text{m}$ (25 Bilder) wurden mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie über verschiedene Zeitpunkte aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Peptoidaufnahme nach 3 h. (b) Peptoidaufnahme nach 6 h. (c) Peptoidaufnahme nach 9 h. (d) Peptoidaufnahme nach 12 h. (e) Peptoidaufnahme nach 24 h. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

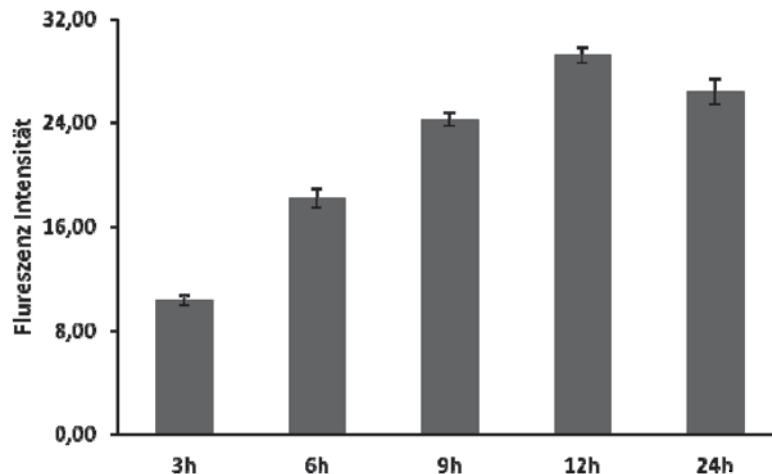


Abbildung 91: Fluoreszenzintensität der Peptoidaufnahme (EB896) in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 μ M in EGM-2) unter kontinuierlichem Durchströmen (15,19 μ l/min) für 24 h bei 37°C inkubiert und nach 3, 6, 9, 12 und 24 h mikroskopiert. Z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 3,02 μ m (25 Bilder) wurden mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen, die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection) und die relative Fluoreszenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten aus fünf unterschiedlichen Stellen im Kanal mit Standardabweichung (n = 5).

In einem weiteren Versuch wurde die Peptoidaufnahme 24, 48 und 72 h nach Beginn der Inkubation mikroskopisch untersucht. Hier konnte nach 48 h keine weitere Peptoidaufnahme mehr nachgewiesen werden. Die Aufnahmezeit war im Gegensatz zum vorherigen Versuch verlängert, da weniger Messschritte in den ersten Stunden erfolgten und somit das Verarmen der Lösung an Peptoid nicht so ausgeprägt war.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob nach Entfernen der Peptoidlösung die aufgenommenen Peptide wieder abgegeben oder abgebaut wurden. Hierzu wurde die Peptoidlösung nach 72 h Inkubation entfernt und mit frischem EGM-2 Medium über weitere 120 h durchströmt. Nach 24 h Inkubation der Zellen mit Medium ohne Peptoid unter Fluss zeigten sich immer noch Peptide in den Zellen. Innerhalb der folgenden 5 Tage konnte eine stetige Abnahme der Fluoreszenzintensität der Peptide beobachtet werden (Abbildung 92). Dies rührte zum einen daher, dass Peptide in den Zellen verstoffwechselt bzw. wieder ausgeschleust wurden. Zum anderen trat durch die Fluoreszenzmikroskopie ein gewisses Ausbleichen der Probe auf.

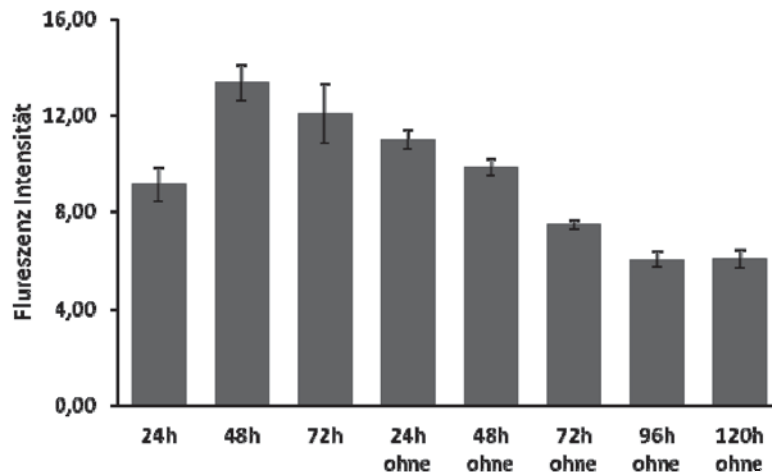


Abbildung 92: Fluoreszenzintensität der Peptoidaufnahme und -abgabe (EB896) in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 μM in EGM-2) unter kontinuierlichem Durchströmen (15,19 $\mu\text{l}/\text{min}$) für 72 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Peptoid aus dem Medium entfernt und für weitere 120 h durchströmt. Z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 3,02 μm (25 Bilder) wurden mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen, die einzelnen Bilder übereinandergelagert (Maximum Projection) und die relative Fluoreszenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten aus vier unterschiedlichen Stellen im Kanal mit Standardabweichung ($n = 4$).

4.6.7 Einsatz des mikrofluidischen 3D-Bioreaktors

Zur Bestätigung der Verwendbarkeit des neu entwickelten mikrofluidischen Bioreaktors als Untersuchungssystem für die endotheliale Aufnahme sowie des transendothelialen Transports wurden erneut polykationische Peptide als Transportmoleküle verwendet.

4.6.7.1 Endotheliale Aufnahme

In den vorangegangenen Versuchen mit kommerziell erhältlichen Kanälen konnte gezeigt werden, dass polykationische Peptide unter fluidischen Bedingungen zeitabhängig in Endothelzellen aufgenommen wurden (siehe Abschnitt 4.6.6). Daher wurde die Peptoidaufnahme in Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen auch im neu entwickelten fluidischen PC-Mikrokanal getestet. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die Zellen nach der Peptoid-Inkubation mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt.

Die Mikroskopieaufnahmen zeigten eine deutliche Aufnahme der Peptide in den Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen. Es konnte, wie bereits beschrieben, eine deutliche Konzentration der aufgenommenen Peptide in Vesikeln um den Zellkern beobachtet werden (Abschnitt 4.6.3). Im Vergleich zur Peptoidinkubation unter statischen Bedingungen schienen in einer vergleichbaren Zeit mehr Peptide in den Zellen aufgenommen zu werden. Bei gleicher Konzentration zeigten sich unter fluidischen Bedingungen deutlich mehr vesikuläre Strukturen mit Peptoiden in den Zellen. Weiterhin konnte durch die Färbung der Mitochondrien eine deutliche Ausrichtung der Zellen im Kanal nachgewiesen werden

(Abbildung 93 - Abbildung 95). Die Kanal- und Flussrichtung verlief bei den hier gezeigten konfokalen Mikroskopieaufnahmen von oben nach unten.

Zur Untersuchung der Verteilung der Zellen über den gekrümmten Kanalboden wurde ein z-Stapel aufgenommen. Die Mikroskopieaufnahmen zeigten eine vollständige Besiedelung des Kanalbodens mit HUVECs (Abbildung 96).

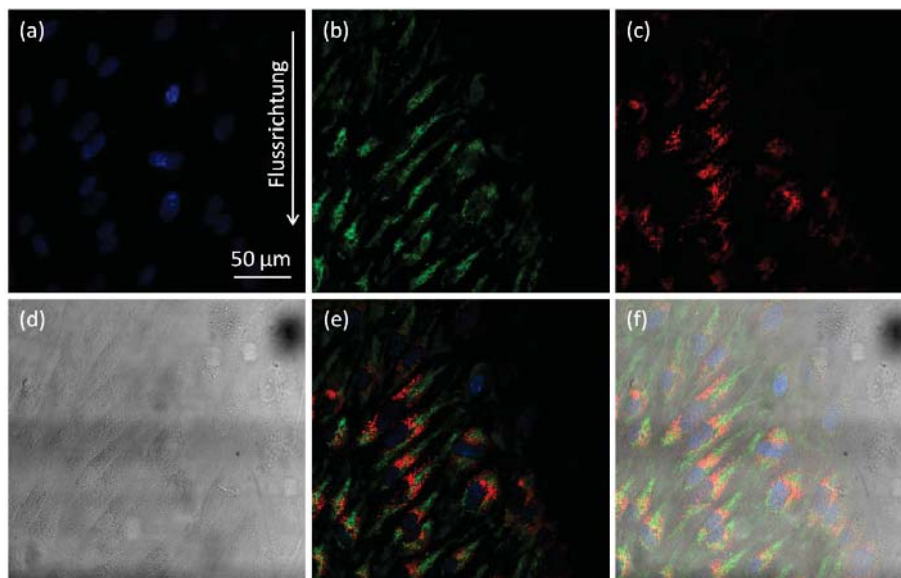


Abbildung 93: Peptoidaufnahme und -verteilung EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen I. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten nicht-porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. Zur Untersuchung der Peptoidaufnahme unter fluidischen Bedingungen wurden die Zellen mit dem Peptoid-Transporter EB896 (2 µM) für 16 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB896). (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

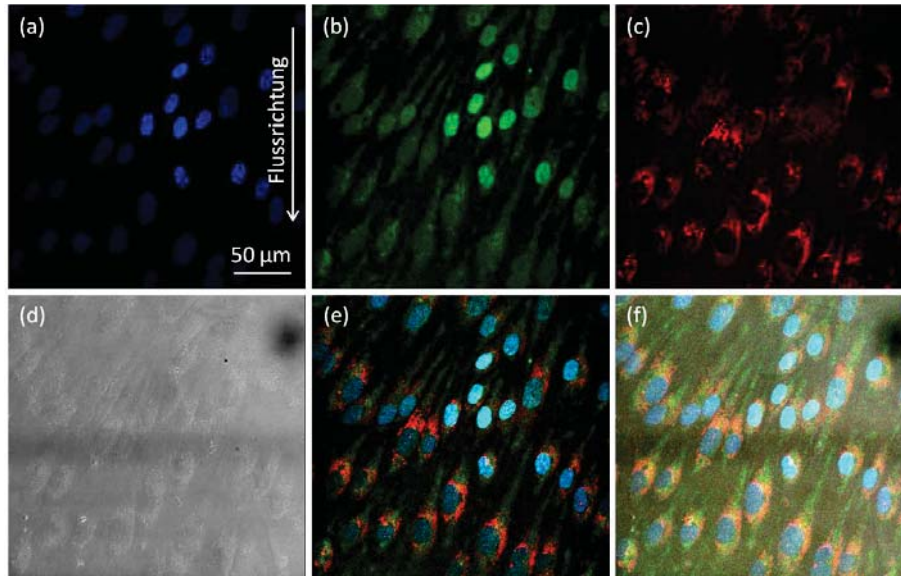


Abbildung 94: Peptidaufnahme und -verteilung EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen II. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten nicht-porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ unter fluidischen Bedingungen (400 μl/min) kultiviert. Zellen wurden mit dem Peptoid-Transporter EB896 (2 μM) für 16 h bei 37°C inkubiert. Um die komplette Besiedelung am gekrümmten Kanalboden zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 7,76 μm (38 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelagert (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB896). (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

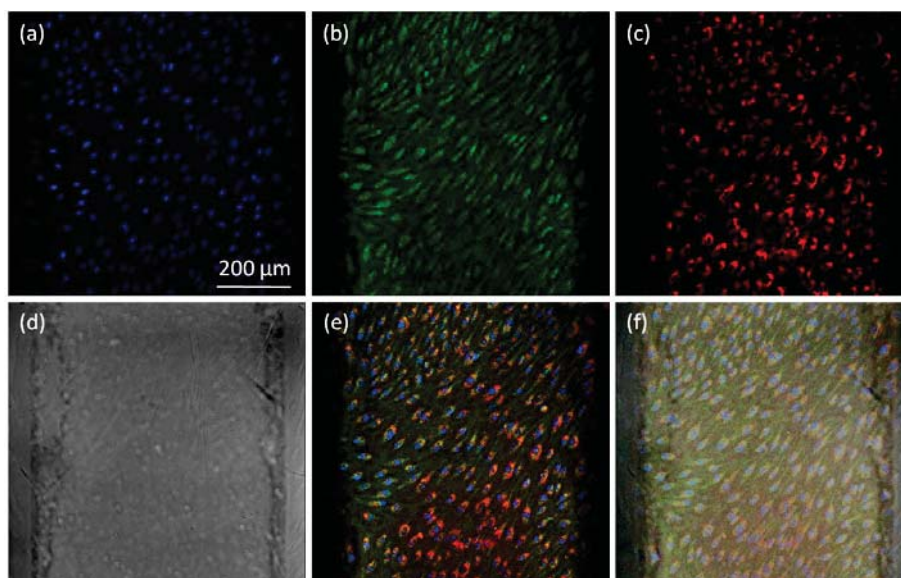


Abbildung 95: Peptidaufnahme und -verteilung EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen III. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten nicht-porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ unter fluidischen Bedingungen (400 μl/min) kultiviert. Zellen wurden mit dem Peptoid-Transporter EB896 (2 μM) für 16 h bei 37°C inkubiert. Z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 7,13 μm (35 Bilder), einzelne Bilder übereinandergelagert (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB896). (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

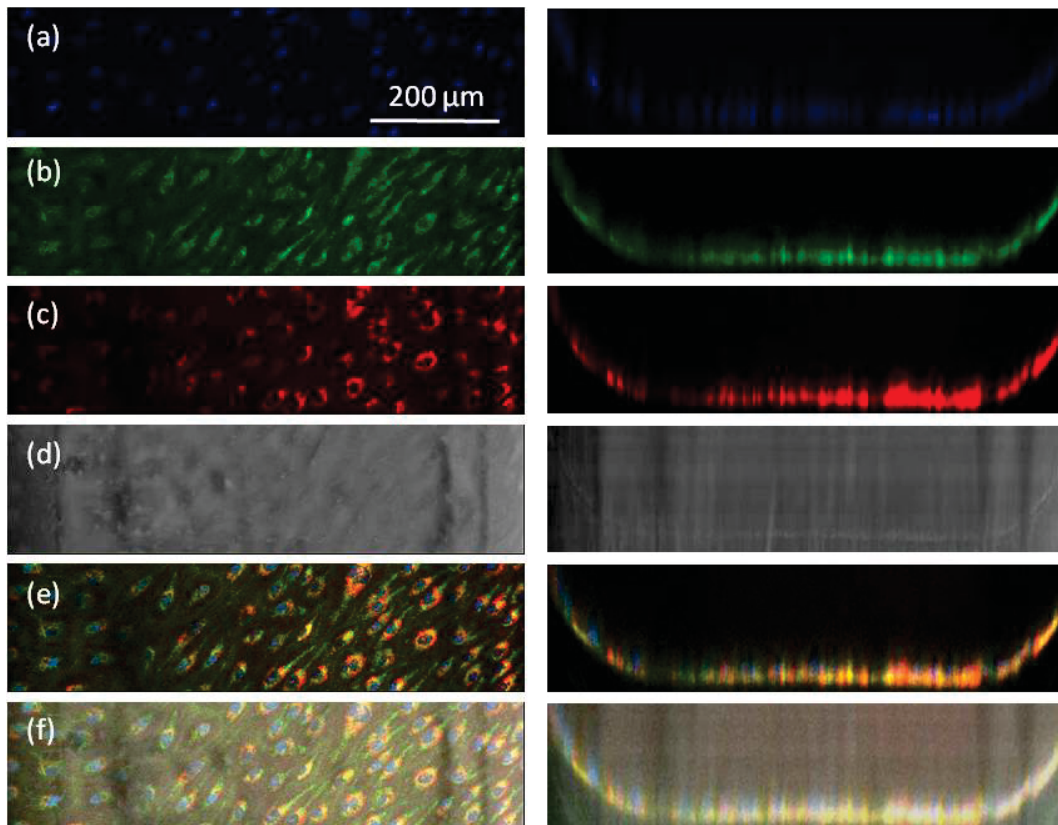


Abbildung 96: Peptoidaufnahme und -verteilung EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen IV. HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten nicht-porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. Zur Untersuchung der Peptoidaufnahme unter fluidischen Bedingungen wurden die Zellen mit dem Peptoid-Transporter EB896 (2 µM) für 16 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Um die komplette Besiedelung am gekrümmten Kanalboden zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 60,93 µm (122 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB896). (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Rechts, Projektion der Mikroskopieaufnahmen in z-Richtung.

4.6.7.2 Transendothelialer Transport

Der transendotheliale Transport der Peptide aus dem mikrofluidischen Kanal in das angrenzende untere Kompartiment wurde visualisiert, indem humane Fibroblasten in der unteren Kammer kultiviert wurden. Diese konnten die transportierten Peptide aufnehmen.

Die Ergebnisse zeigten erneut eine erfolgreiche Aufnahme der Peptide in den Endothelzellen im porösen Mikrokanal (Abbildung 97 und Abbildung 98). Mit Hilfe der Aufnahme eines z-Stapels konnte die Konfluenz des Endothels im gesamten gekrümmten Kanal bestätigt werden (Abbildung 99). Die Konfluenz ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung von Untersuchungen transendothelialer Transportprozesse.

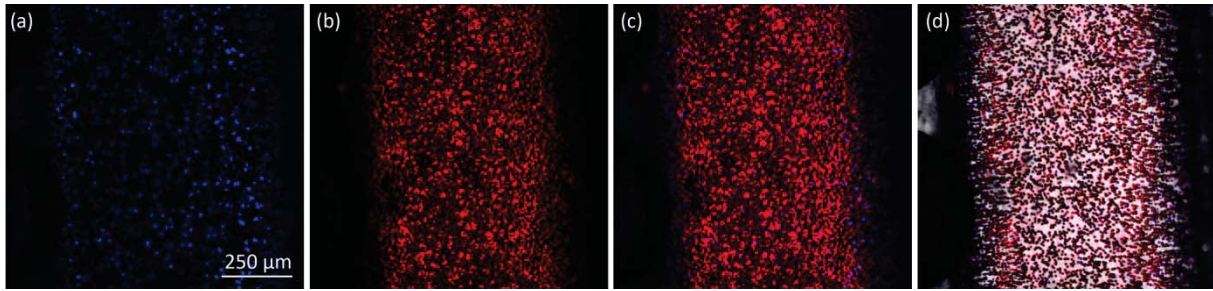


Abbildung 97: Peptoidaufnahme und transendothelialer Transport EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im mikrofluidischen Bioreaktor, 24 h (Kanalboden). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. Zur Untersuchung der Peptoidaufnahme und des transendothelialen Transports unter fluidischen Bedingungen wurden die Zellen mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 µM) für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) Peptoid-Transporter (EB896), rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung von (a) und (b) mit der Hellfeld-Aufnahme des Kanals. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

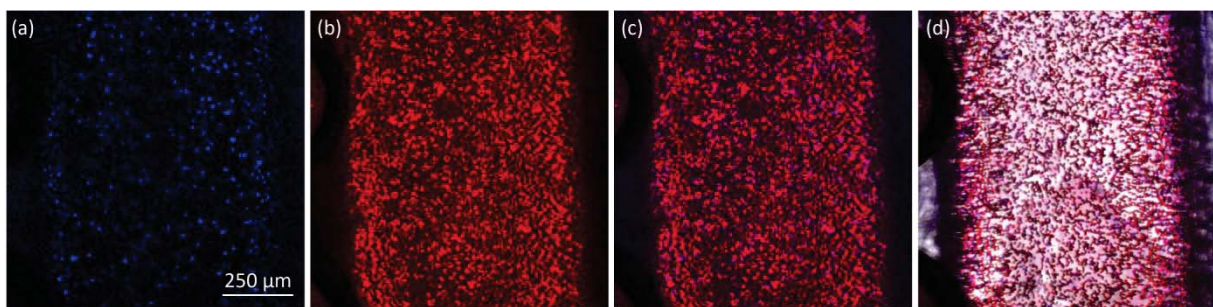


Abbildung 98: Peptoidaufnahme und transendothelialer Transport EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im mikrofluidischen Bioreaktor, 24 h (Kanal, z-Stapel). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit einem Pumpensystem (ibidi) mit einer Geschwindigkeit von 400 µl/min durchströmt. Zur Untersuchung der Peptoidaufnahme und des transendothelialen Transports unter fluidischen Bedingungen wurden die Zellen mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 µM) für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. Um die komplette Besiedelung im Kanal zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 93,28 µm (40 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) Peptoid-Transporter (EB896), rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung von (a) und (b) mit der Hellfeld-Aufnahme des Kanals. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

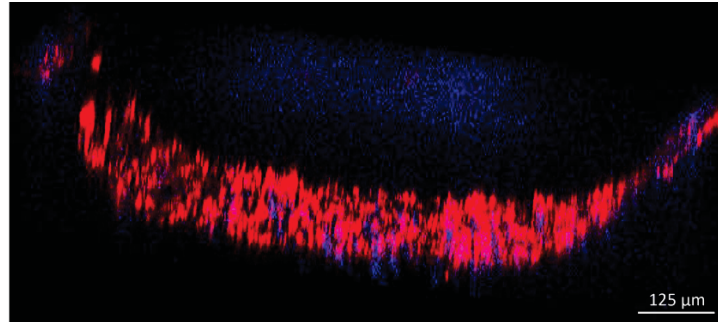


Abbildung 99: Peptoidaufnahme und transendothelialer Transport EB896 in HUVEC-Zellen unter fluidischen Bedingungen im mikrofluidischen Bioreaktor, 24 h (Kanal, z-Stapel). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ unter fluidischen Bedingungen (400 µl/min) kultiviert. Zur Untersuchung der Peptoidaufnahme und des transendothelialen Transports unter fluidischen Bedingungen wurden die Zellen mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 µM) für 24 h bei 37°C inkubiert. Um die komplette Besiedelung im Kanal zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 286 µm (97 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). Seitlicher Blick auf den konfluenten Zellschicht im porösen Mikrokanal. Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. Peptoid-Transporter (EB896), rot. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Innerhalb von 24 h wurden nur sehr wenige Peptide aus dem Mediumreservoir durch das konfluente Endothel in die untere Kammer transportiert und dort von den Fibroblasten aufgenommen. Erst nach mehrtägiger Inkubation konnte eine deutliche Aufnahme der Peptide in den Endothelzellen nachgewiesen werden (Abbildung 100).

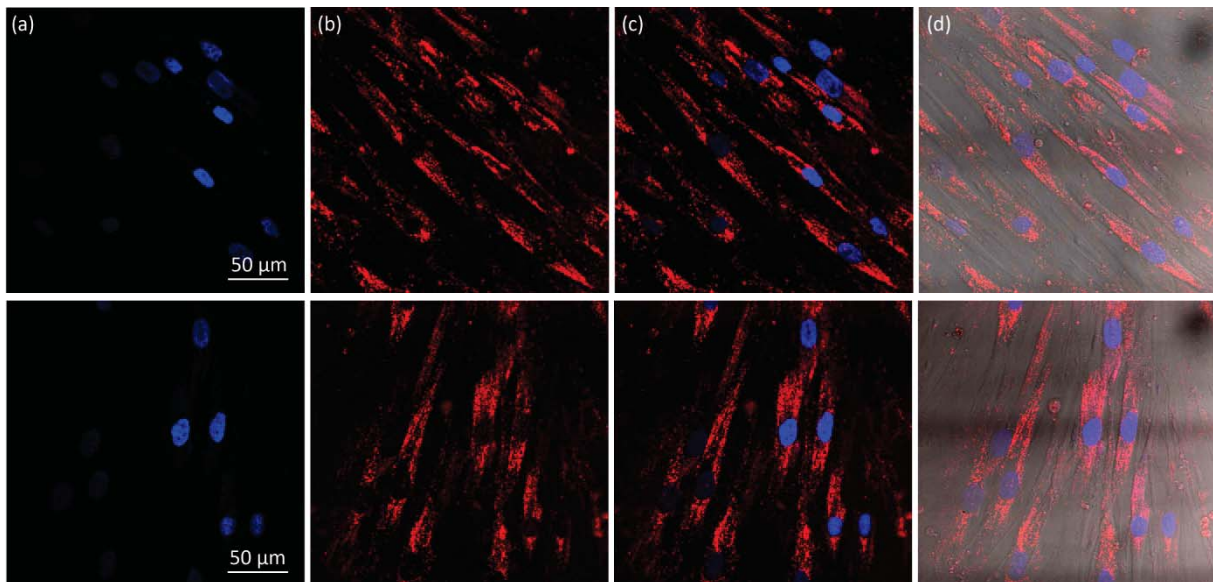


Abbildung 100: Transendothelialer Transport EB896 durch Endothellayer unter fluidischen Bedingungen im mikrofluidischen Bioreaktor, 4 Tage (unteres Kompartiment mit Fibroblasten). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ unter fluidischen Bedingungen (400 µl/min) kultiviert. Zur Untersuchung der Peptoidaufnahme und des transendothelialen Transports unter fluidischen Bedingungen wurden die Zellen mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 µM) über mehrere Tage bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung des transendothelialen Transports wurden humane Fibroblasten in der unteren Kammer kultiviert. (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) Peptoid-Transporter (EB896), rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) Überlagerung von (a) und (b) mit der Hellfeld-Aufnahme des Kanals. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).



Die polykationischen Peptide wurden aus dem durchströmenden Medium in die Endothelzellen aufgenommen, durch das Endothel transportiert und auf der gegenüberliegenden Seite in die untere Kammer freigesetzt. Aufgrund des Volumens der Medium-gefüllten unteren Kammer war die Anreicherung eines gewissen Schwellenwertes der Peptoidmenge nötig, die dann von den Fibroblasten aufgenommen und dadurch sichtbar gemacht werden konnte. Die Ergebnisse verdeutlichen die Zeitabhängigkeit des transendothelialen Transports (Abbildung 101).

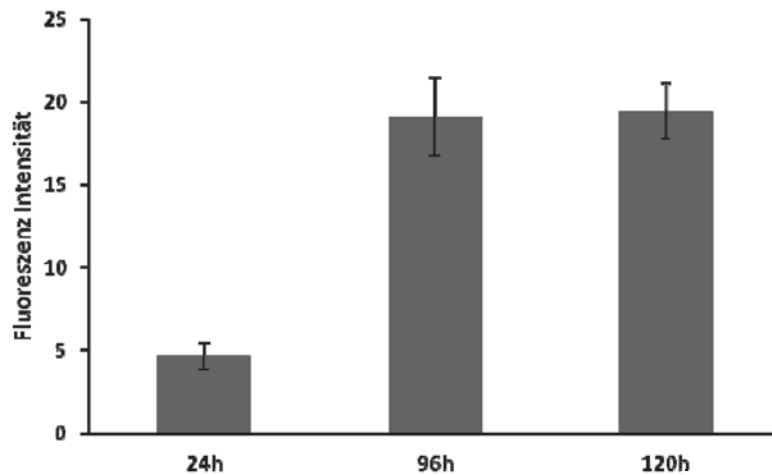


Abbildung 101: Fluoreszenzintensität der Peptoidaufnahme (EB896) in Fibroblasten im unteren Kompartiment des mikrofluidischen Bioreaktors. HUVEC-Zellen im porösen Mikrokanal wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme und des transendothelialen Transports mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 μ M in EGM-2) unter kontinuierlichem Durchströmen (400 μ l/min) über mehrere Tage inkubiert. Zur Visualisierung des transendothelialen Transports der Peptide wurden humane Fibroblasten in der unteren Kammer kultiviert. Nach jeweils 24, 96 und 120 h wurden Mikroskopieaufnahmen der Fibroblasten im unteren Kompartiment gemacht und die relative Fluoreszenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten aus vier unterschiedlichen Stellen im Kanal mit Standardabweichung (n = 4).

In diesem Experiment konnte weiterhin eine Reaktion der Fibroblasten im unteren Kompartiment auf den Mediumfluss im darüber liegenden Mikrokanal beobachtet werden (Abbildung 100). Die Zellen schienen sich auch in Richtung des Mediumflusses bzw. in bestimmte Strömungsrichtungen zu orientieren. Dies deutet auf einen indirekten Einfluss des Mediumflusses im Kanal auf das untere Kompartiment hin.

4.6.7.3 Ausblick: Liposomale ‚Drug Delivery‘ Systeme

Mit Hilfe des neu entwickelten mikrofluidischen Bioreaktors sollten in Kollaboration mit Christin Bednarek, Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie die endotheliale Aufnahme und der transendotheliale Transport von liposomalen ‚Drug Delivery‘ Systemen untersucht werden. Die Experimente sind Teil der Dissertation von Christin Bednarek und werden daher hier nur als Ausblick zur möglichen Verwendung des mikrofluidischen Bioreaktors dargestellt. Die ‚Drug Delivery‘ Systeme enthielten einen

Doxorubicin-Transporter (Polyamin-Derivat mit gekoppeltem Doxorubicin) als Chemotherapeutikum sowie Gold-Nanopartikel (2 nm Stearylamin-beschichtet, SA-Au-NP) als Radiosensitizer für die Strahlentherapie, die bei der Behandlung von Tumoren eingesetzt werden sollten. Doxorubicin besitzt fluoreszierende Eigenschaften, was ermöglicht die intrazelluläre Aufnahme des Systems konfokalmikroskopisch zu verfolgen.

Endothelzellen wurden im porösen Mikrokanal über mehrere Tage kultiviert. Nach Durchströmen des Mikrokanals mit dem zu untersuchenden liposomalen ‚Drug Delivery‘ System für 48 h, zeigte sich eine erfolgreiche Aufnahme der liposomalen Transporter in den Hoechst-markierten Endothelzellen (Abbildung 102). Eine Schädigung der Zellen durch den Doxorubicin-Transporter war nicht zu erkennen. Weiterhin konnte ein erfolgreicher transendothelialer Transport durch das Endothel in das untere Kompartiment und eine Anreicherung in den hier zuvor kultivierten Fibroblasten beobachtet werden. Auffällig war dabei, dass sich die Fibroblasten, möglicherweise durch einen toxischen Einfluss des Doxorubicin-Transporters, abrundeten und ablösten (Abbildung 103). Dies ermöglicht einen vorteilhaften Effekt. Nach dem transendothelialen Transport der ‚Drug Delivery‘ Systeme könnten diese ihre gewünschte toxische Wirkung lediglich im Zielgewebe entfalten, wodurch Nebenwirkungen reduziert werden würden. Eine solche Anreicherung, und damit verbunden eine erhöhte Wirkung im Zielgewebe mit Hilfe solcher liposomaler Systeme, wurde bereits beschrieben.^[137-140]

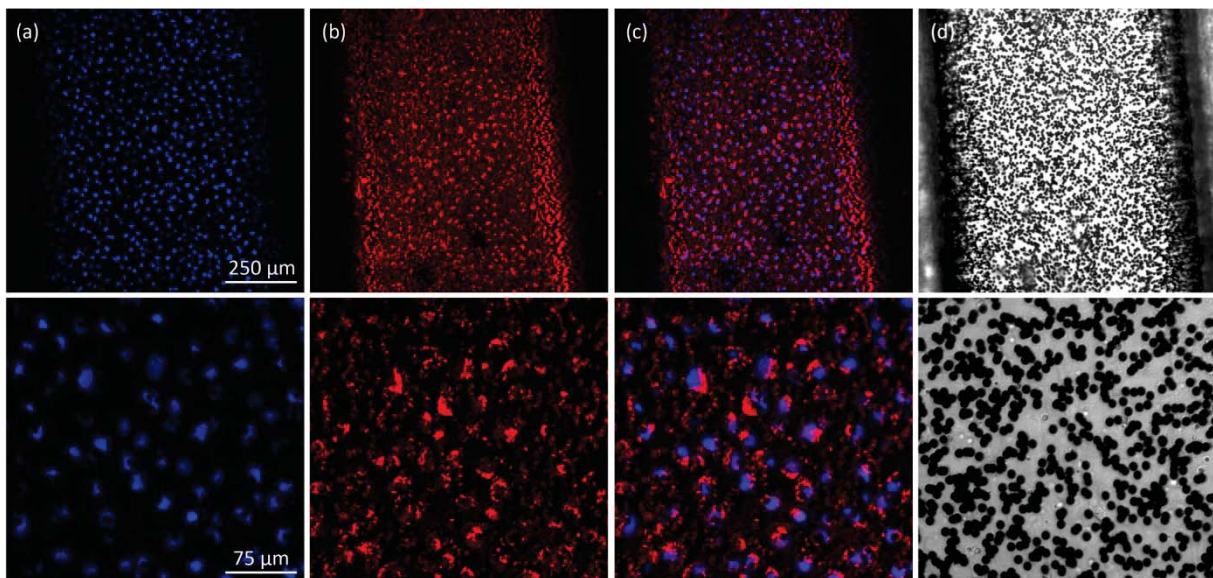


Abbildung 102: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Aufnahme des liposomalen ‚Drug Delivery‘ Systems (PC Egg (0,13 mM), Doxorubicin-Transporter (1 µM), 2 nm SA-Au-NP (8 nM)) in HUVECs im mikrofluidischen Bioreaktors zur *in vitro*-Untersuchung des transendothelialen Transports. (a) Hoechst-gefärbte HUVEC-Zellen, blau. (b) Liposomales ‚Drug Delivery System‘, rot. (c) Überlagerung von (a) und (b). (d) zugehörige Hellfeld-Aufnahme des porösen Mikrokanals. Homogene Verteilung und Aufnahme des liposomalen ‚Drug Delivery‘ Systems und keine toxischen Einflüsse auf die Endothelzellen erkennbar.

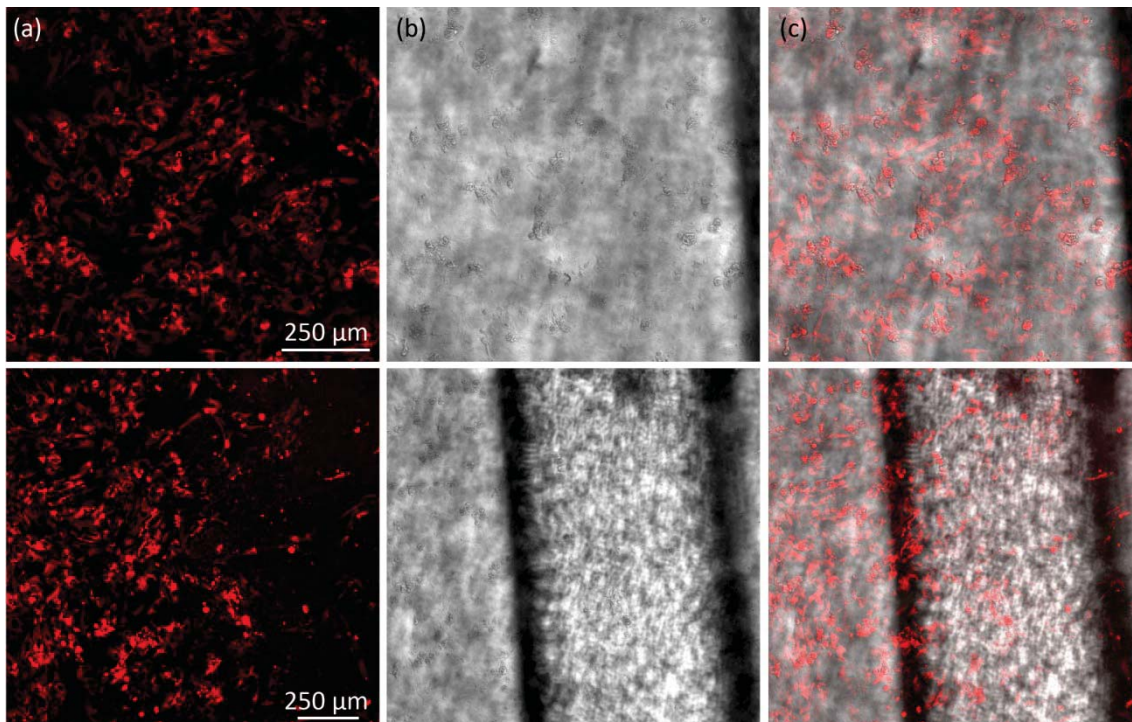


Abbildung 103: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Aufnahme des liposomalen ‚Drug Delivery‘ Systems (PC Egg (0,13 mM), Doxorubicin-Transporter (1 µM), 2 nm SA-Au-NP (8 nM)) in humane Fibroblasten nach transendotheliale Transport durch Endothelzellen (HUVEC) im mikrofluidischen Bioreaktor. (a) Liposomales ‚Drug Delivery‘ System, rot. (b) Zugehörige Hellfeld-Aufnahme des unteren Kompartiments. (c) Überlagerung von (a) und (b). Erfolgreicher transendothelialer Transporter und homogene Verteilung sowie Aufnahme des liposomalen ‚Drug Delivery‘ Systems in die humanen Fibroblasten erkennbar; toxischer Einfluss des liposomalen ‚Drug Delivery‘ Systems auf die humanen Fibroblasten deutet sich an.

4.6.8 Mechanismus der zellulären Aufnahme polykationischer Peptide

Um zu überprüfen, über welchen Weg die polykationischen Peptide in die Zelle aufgenommen werden, wurden in Kollaboration mit Olga Dürr, Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie HeLa-Zellen mit Vektoren transfiziert, die für GFP-Fusionsproteine kodieren, die für die Markierung verschiedener endosomaler Vesikel spezifisch sind. Untersuchte Marker für endosomale Vesikel waren Rab5a, Rab4a, Rab7a und Rab11a. Rab5 markiert frühe („early“) Endosomen, Phagosomen und Caveosomen. Rab4 vermittelt das schnelle endosomale Recycling („fast endocytic recycling“) direkt über die frühen („early“) Endosomen. Rab7 dient als Marker für späte („late“) Endosomen und vermittelt das Reifen von späten Endosomen und Phagosomen und deren Fusion mit Lysosomen. Rab11a vermittelt das langsame endosomale Recycling („slow endocytic recycling“) durch die Recycling-Endosomen (Abbildung 5).^[49, 60]

Um die genaue Lokalisierung der Peptide in der Zelle zu untersuchen, wurden die transfizierten HeLa-Zellen mit Peptoiden (EB899) kurzzeitig inkubiert, d.h. nach einer Inkubationszeit von 10 bzw. 15 min wurden die Zellen über einen Zeitraum von bis zu 60 min

mikroskopiert. Eine mögliche Kolokalisation der Peptide mit den entsprechenden endosomalen Vesikeln würde weiteren Aufschluss über die Aufnahme der Peptide in die Zelle geben. Zu frühen Zeitpunkten konnte eine teilweise Kolokalisation einzelner früher, Rab5a-markierter endosomaler Vesikel mit dem Peptoidtransporter beobachtet werden (Abbildung 104, Abbildung 105, Abbildung 106c). Eine vollständige Kolokalisation der Peptide mit Rab5a-markierten Vesikeln konnte allerdings nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Peptide über Endozytose bzw. Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden könnten. Möglicherweise fand die zelluläre Aufnahme der Peptoidtransporter bereits in den ersten Minuten der Inkubation statt und der Transport durch die Zelle war bei der Mikroskopie bereits weiter fortgeschritten. Zudem markiert Rab5a neben Early Endosomes auch frühe Phagosomen und Caveosomen. Zu späteren Zeitpunkten, 30 und 45 min nach Beginn der Inkubation, konnte keine Kolokalisation mehr beobachtet werden (Abbildung 106f, i).

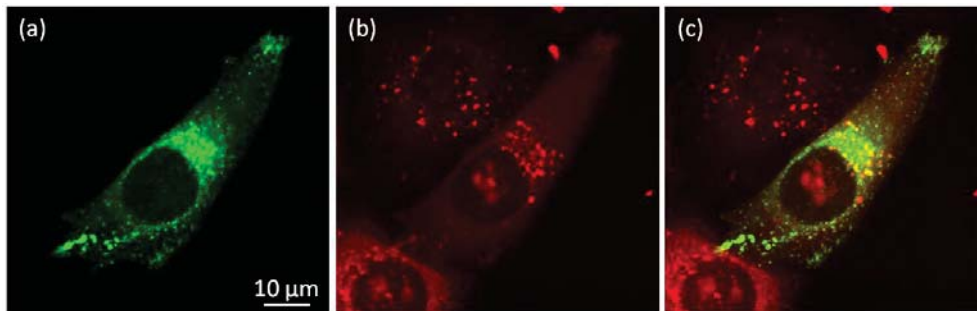


Abbildung 104: Peptoidaufnahme und -verteilung in Rab5-markierten HeLa-Zellen I. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Early Endosomes (Rab5a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μ M, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 10 min nach abgeschlossener Inkubation. (a) GFP-markierte Early Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

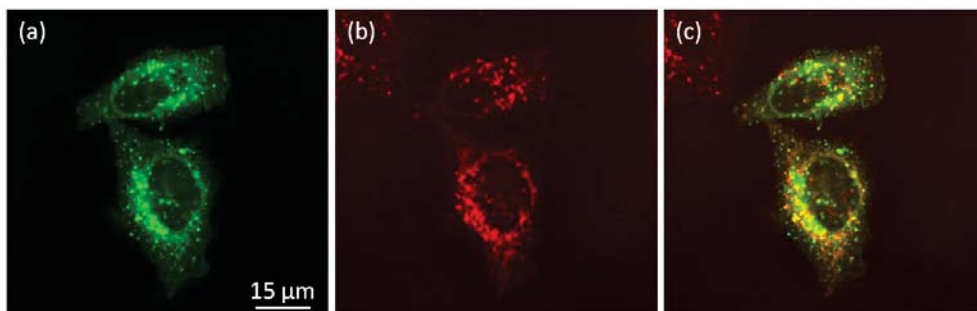


Abbildung 105: Peptoidaufnahme und -verteilung in Rab5-markierten HeLa-Zellen II. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Early Endosomes (Rab5a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μ M, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 15 min nach abgeschlossener Inkubation. (a) GFP-markierte Early Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

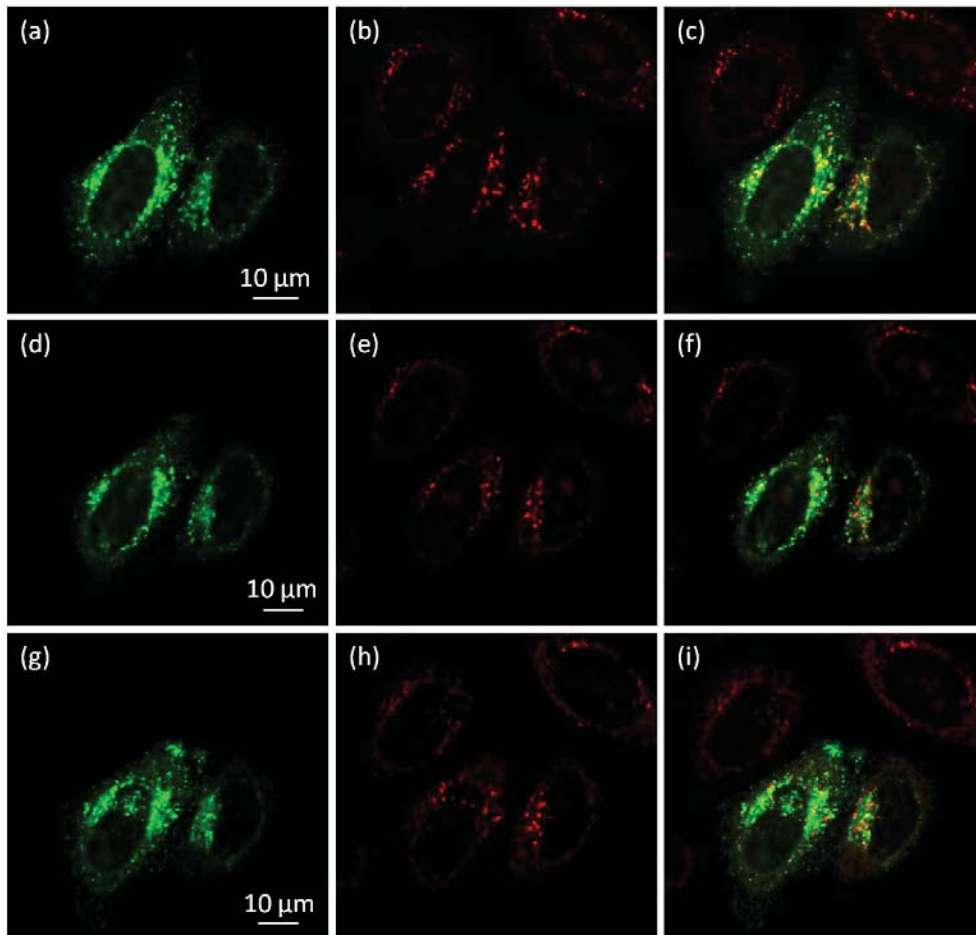


Abbildung 106: Peptoidaufnahme und -verteilung in Rab5-markierten HeLa-Zellen III. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Early Endosomes (Rab5a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 µM, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 15 min (a – c), 30 min (d – f) bzw. 45 min (g – i) nach abgeschlossener Inkubation. (a), (d), (g) GFP-markierte Early Endosomes, grün. (b), (e), (h) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c), (f), (i) Überlagerung von (a) und (b), (d) und (e), (g) und (h). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Die Untersuchung weiterer endosomaler Vesikel zeigte, dass 20 bzw. 30 min nach Inkubationsbeginn eine teilweise Kollokalisierung einzelner früher, Rab4a-markierter endosomaler Vesikel mit dem Peptoidtransporter auftrat (Abbildung 107 und Abbildung 108). Eine vollständige Kollokalisierung der Peptoide mit Rab4a-markierten Vesikeln konnte allerdings erneut nicht festgestellt werden. Spätere Aufnahmen zeigten hingegen keine Kollokalisierung (Abbildung 109). Im vorherigen Versuch konnte bereits gezeigt werden, dass der Peptoidtransporter zu vergleichbaren Zeitpunkten mit Rab5-markierten endosomalen Vesikeln (Early Endosomes) kollokalisierte. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Peptoide zumindest teilweise über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden könnten.

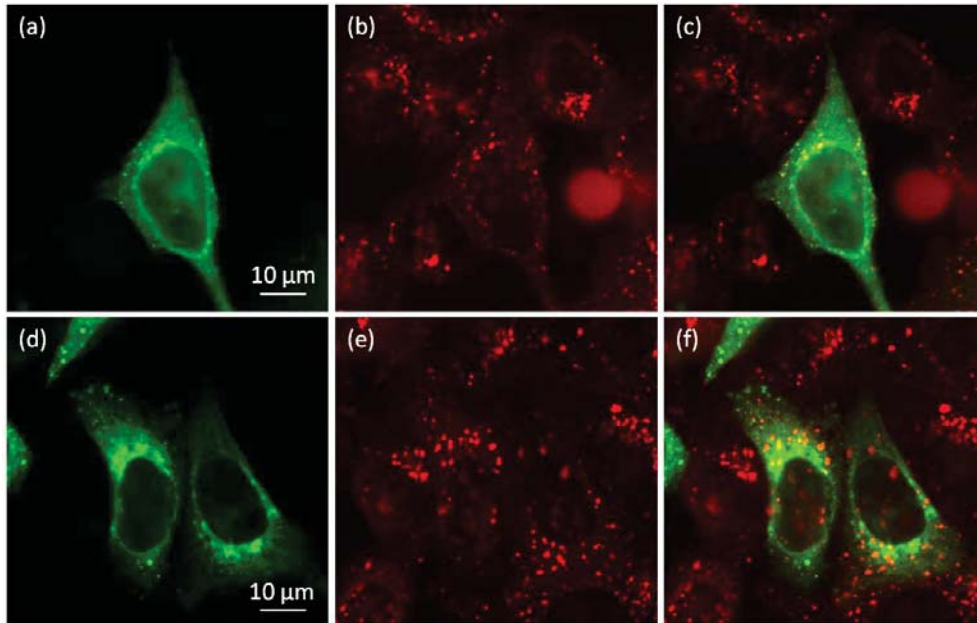


Abbildung 107: Peptoidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab4a) I. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Early Endosomes (Rab4a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μ M, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 5 min nach abgeschlossener Inkubation. (a), (d) GFP-markierte Early Endosomes, grün. (b), (e) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b), (f) Überlagerung von (d) und (e). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

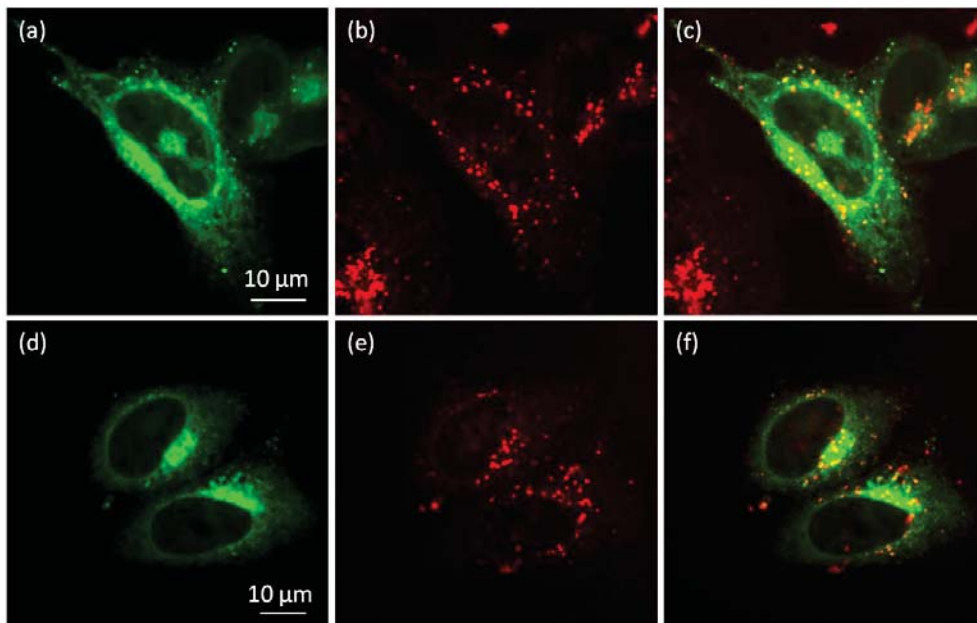


Abbildung 108: Peptoidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab4a) II. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Early Endosomes (Rab4a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μ M, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 15 min nach abgeschlossener Inkubation. (a), (d) GFP-markierte Early Endosomes, grün. (b), (e) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b), (f) Überlagerung von (d) und (e). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

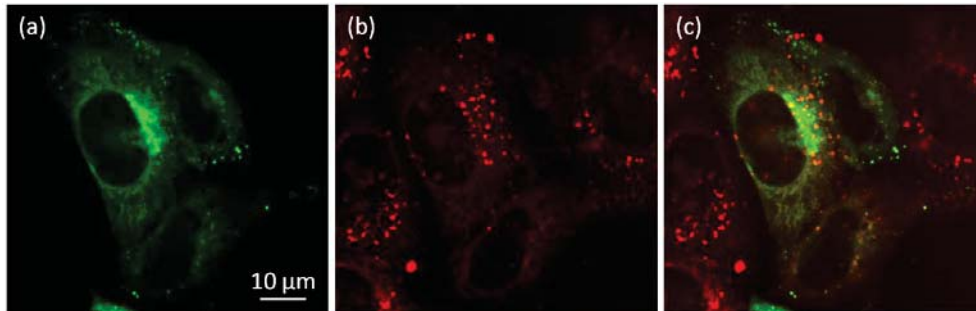


Abbildung 109: Peptoidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab4a) III. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Early Endosomes (Rab4a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μM , 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 25 min nach abgeschlossener Inkubation. (a) GFP-markierte Early Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Rab7a-markierte endosomale Vesikel zeigten innerhalb der ersten 40 min keine Kolokalisation mit dem Peptoidtransporter (Abbildung 110c, f, i). Etwa 50 min nach Inkubationsbeginn war eine teilweise Kolokalisation vereinzelter Rab7-markierter Vesikel erkennbar (Abbildung 110l). 60 min nach Inkubationsbeginn konnte dann eine deutliche Kolokalisation beobachtet werden (Abbildung 111). Da Rab7a Marker für Late Endosomes und Lysosomen ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Transport des Peptoids durch die Zelle vermutlich über den endosomalen Weg stattfand.

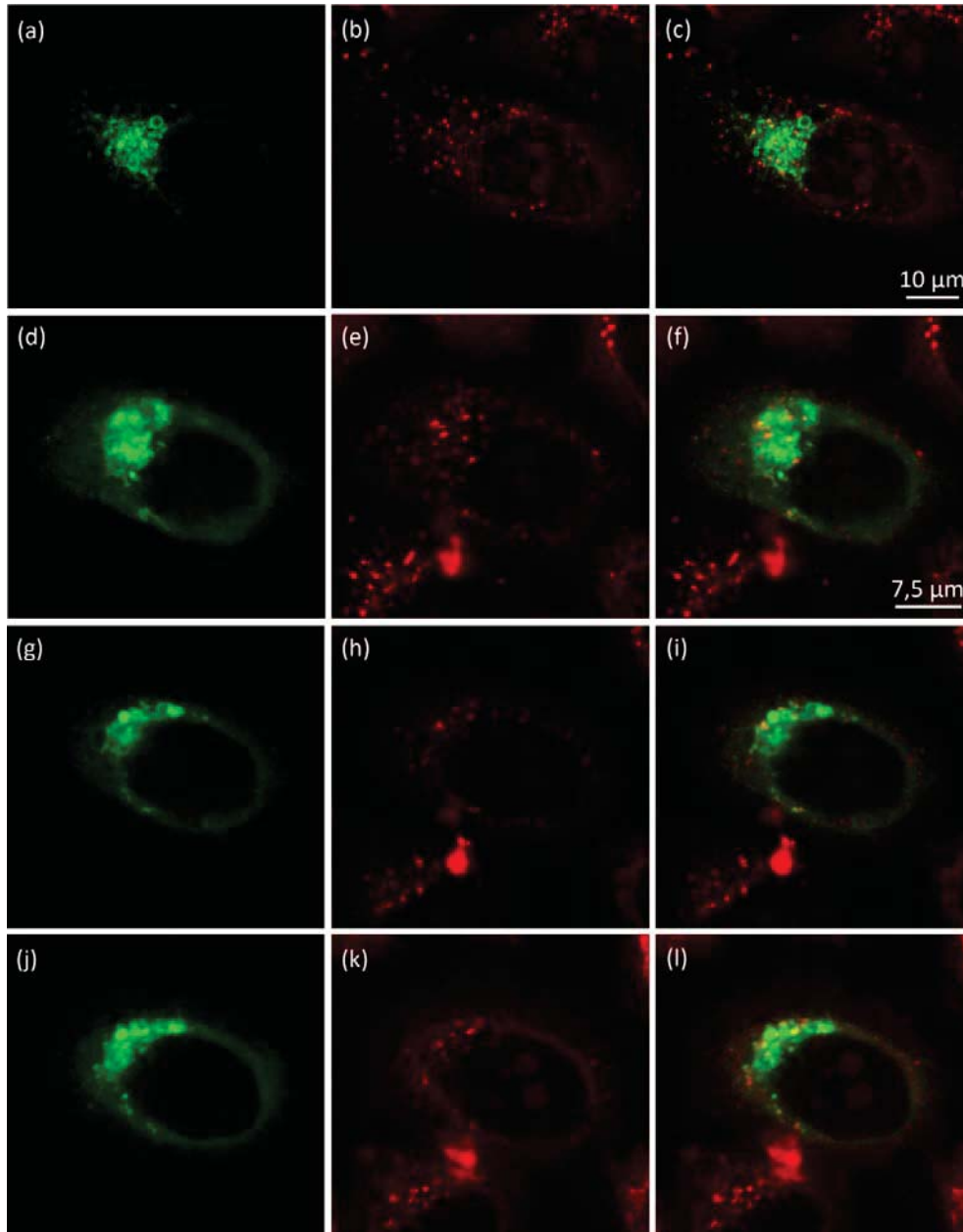


Abbildung 110: Peptoidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab7a) Zelle I. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Late Endosomes (Rab7a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 µM, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 5 min (a – c), 15 min (d – f), 25 min (g – i) und 35 min (j – l) nach abgeschlossener Inkubation. (a), (d), (g), (j) GFP-markierte Late Endosomes, grün. (b), (e), (h), (k) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b), (f) Überlagerung von (d) und (e), (i) Überlagerung von (g) und (h). (l) Überlagerung von (j) und (k). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

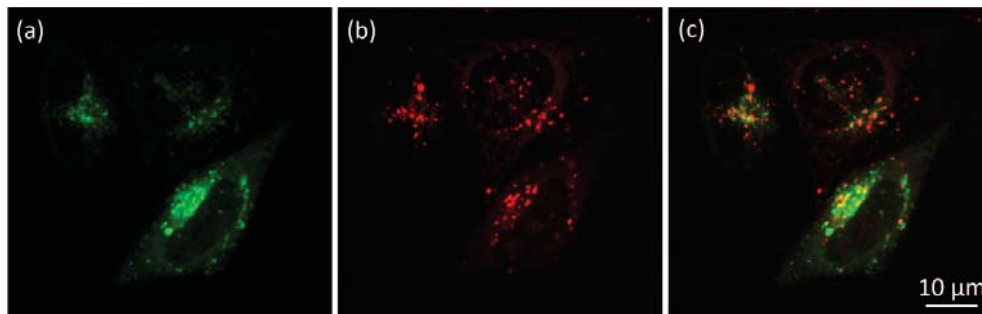


Abbildung 111: Peptoidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab7a) II. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Late Endosomes (Rab7a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μ M, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 45 min nach abgeschlossener Inkubation. (a) GFP-markierte Late Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Die mit Rab11a markierten endosomalen Vesikel (Recycling-Endosomen) wiesen erst 40 min nach Inkubationsbeginn vereinzelt Kollokalisierungen auf (Abbildung 112). Es wäre möglich, dass der Peptoidtransporter neben dem hauptsächlichsten Weg über die Late Endosomes und Lysosomen (Rab7-markiert) auch teilweise über Recycling-Endosomen (Rab11a-markiert) aus der Zelle transportiert wurde.

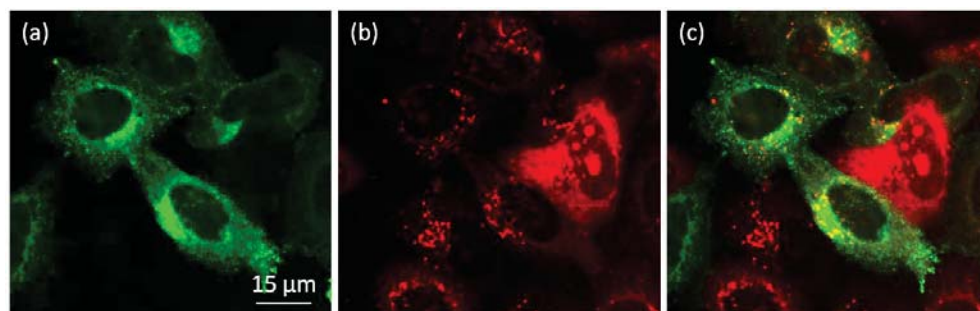


Abbildung 112: Peptoidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab11a) I. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Recycling-Endosomen (Rab11a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μ M, 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 25 min nach abgeschlossener Inkubation. (a) GFP-markierte Recycling-Endosomen, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

Bei der Zellteilung, also in späten Phasen nach Aufnahme der Peptide, konnte eine Kollokalisierung der Peptide mit Rab7a-markierten endosomalen Vesikel nachgewiesen werden (Abbildung 113 und Abbildung 114). Den Ergebnissen dieser Versuchsreihe zu Folge schienen sich die Peptide während der Zellteilung in den späten Endosomen oder Phagosomen bzw. in den Lysosomen aufzuhalten, ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung endozytotischer Wege bei der Aufnahme der Peptide. Weitere Mikroskopieaufnahmen befinden sich im Anhang (Abbildung 126 - Abbildung 128).

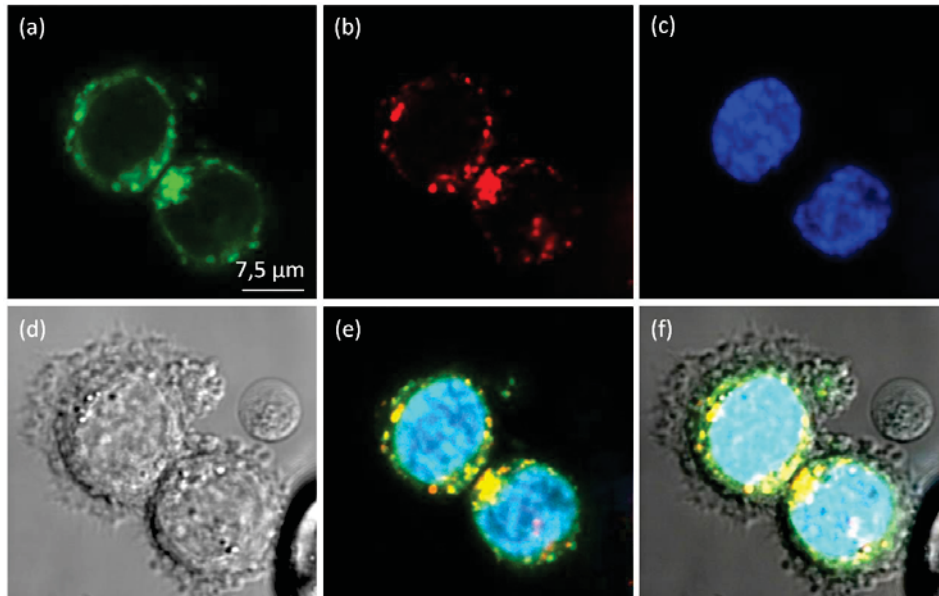


Abbildung 113: Peptoidverteilung in HeLa-Zellen während der Zellteilung, Rab7a I. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung während der Zellteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Late Endosomes, Phagosomes und der Lysosomen (Rab7a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 5 μ M, 24 h, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. (a) GFP-markierte Late Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HeLa-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 7,5 μ m.

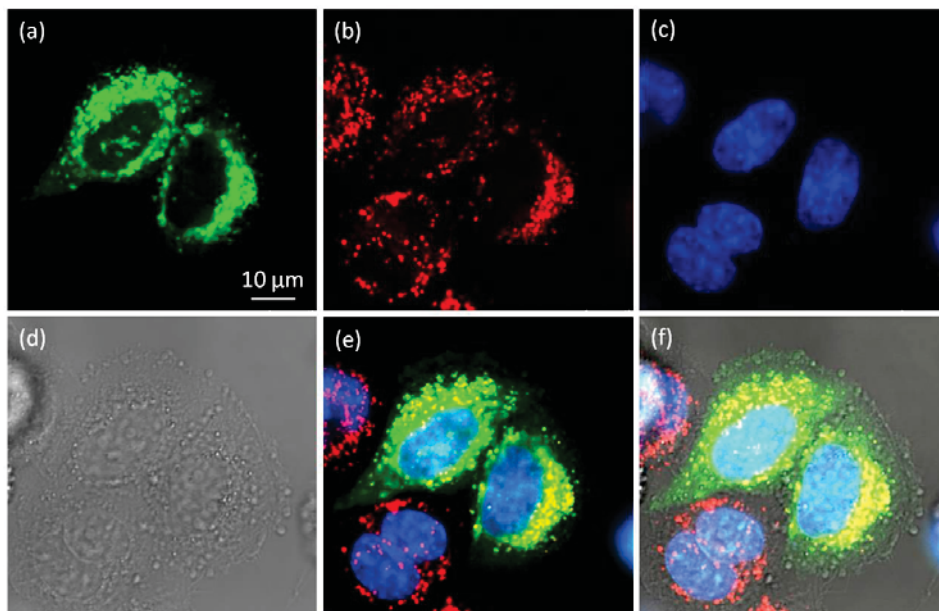


Abbildung 114: Peptoidverteilung in HeLa-Zellen während der Zellteilung, Rab7a, II. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung während der Zellteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Late Endosomes, Phagosomes und der Lysosomen (Rab7a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 5 μ M, 24 h, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. (a) GFP-markierte Late Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HeLa-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 10 μ m.



5 DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es, einen *in vivo*-ähnlichen mikrofluidischen 3D-Bioreaktor bestehend aus einem künstlichen Blutgefäß und einem umgebenden Kompartiment zu entwickeln, der zur *in vitro*-Untersuchung des Endothels und transendothelialer Transportprozesse eingesetzt werden kann.

Zahlreiche mikrofluidische Systeme wurden in den letzten Jahren entwickelt, die unter anderem Einsatz in den Bereichen Tissue Engineering zur Versorgung künstlicher Gewebe und Organe, aber auch bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe im kardiovaskulären Bereich finden sollen. Hierbei ist es wichtig, Zell-Kultur-Systeme zu entwickeln, die verlässlich die *in vivo*-Situation widerspiegeln. Wu et al. (2010) beschrieben in ihrem Review zahlreiche Vorteile mikrofluidischer Zellkultursysteme gegenüber konventioneller statischer, zweidimensionaler Zellkultur. Neben einer *in vivo*-ähnlicheren Darstellung wurden unter anderem auch eine gleichmäßige Temperaturverteilung sowie exakte Kontrolle der Temperatur in mikrofluidischen Systemen hervorgehoben.^[1] Fiddes et al. (2010) beschrieben die Herstellung eines mikrofluidischen Systems aus PDMS mit rundem Querschnitt zur Nachbildung kardiovaskulärer Flussbedingungen.^[105] Ein ähnliches System, hergestellt aus Polystyren, beschrieben Borenstein et al. (2010).^[13] Beide Arbeitsgruppen verdeutlichen mit ihren Arbeiten die Wichtigkeit von künstlichen Kapillaren mit runden Querschnitten zur *in vivo*-ähnlichen Darstellung des Blutgefäßsystems *in vitro*. Auch Esch et al. konnten einen Unterschied in der Ausbildung fokaler Adhäsionspunkte in Endothelzellen, kultiviert in Mikrokanälen mit rechteckiger und runder Querschnittsfläche, nachweisen.^[109] Diese Mikrokanäle konnten jedoch nicht für die Untersuchung von transendotheliale Transport verwendet werden, da es sich hierbei um vergrabene Kanäle handelte, also Kanäle, die sich im Bulkmaterial befanden. Die Porosität der Mikrokanäle ist neben der Ermöglichung von Transportprozessen wichtig für die Versorgung der kultivierten Zellen von sowohl der apikalen als auch der basolateralen Seite. Shao et al. (2009) beschrieben ebenfalls mikrofluidische Chips aus PDMS zur Untersuchung des Endothels. Hier wurden Endothelzellen auf einer flachen mikroporösen Membran kultiviert, die den Chip in zwei Kompartimente teilte, sodass Permeabilitätsmessungen und Untersuchungen der Barrierefunktion des Endothels durchgeführt werden konnten.^[101, 102] Ähnlich zu diesem Chip ist die mikrofluidische Membran-Einheit von Srigunapalan et al. (2011).^[33] Diese Systeme erzeugen durch die Kultivierung der Endothelzellen auf porösen Membranen unter fluidischen Bedingungen eine Zellkulturumgebung, die die *in vivo*-Situation näher widerspiegelt. Polarisierter Zellen werden hierbei auch von der basolateralen Seite versorgt und können metabolische Aktivitäten auf natürlicherem Weg ausführen. Wie in zuvor beschriebenen Systemen wurden die Endothelzellen allerdings auch hier auf flachen Oberflächen kultiviert, die nicht den *in vivo*-Gegebenheiten entsprachen. Ikeuchi und Ikuta (2007) entwickelten, ähnlich der in dieser Arbeit verwendeten Technik, ein System aus



porösen, dünnwandigen Kanälen zur Versorgung künstlich hergestellter Gewebe.^[92] In diesem System wurden die Kanäle allerdings nicht aktiv durchströmt. Die Kanäle dienten lediglich der Versorgung von Zellen in einem umgebenden Hydrogel durch Diffusion und nicht der aktiven Durchströmung. Günther et al. (2010) entwickelten eine Organ-basierte Plattform zur Untersuchung von Resistenzarterien. Resistenzarterien sind kleine, hochspezialisierte Arterien im Endbereich des Gefäßbaums. Arterienstücke, isoliert aus Mäusen, wurden dabei in eine mikrofluidische Struktur integriert. Dies ermöglichte eine direkte Untersuchung von Struktur und Funktion dieser Arteriensegmente unter physiologischen Bedingungen.^[141] Durch Spezies-spezifische Unterschiede können solche Ergebnisse allerdings nicht direkt auf den Menschen übertragen werden.

Es wird daher deutlich, dass bestehende Systeme nicht ausreichend funktional sind, um die *in vivo*-Bedingungen zu simulieren. Daher war es nötig ein neues mikrofluidisches System basierend auf dünnwandigen, porösen und gekrümmten Mikrokanälen zu entwickeln.

Mit Hilfe der SMART-Technologie,^[118, 119] einem Verfahren, das das Thermoformen bereits prozessierter Polymerfolien ermöglicht, konnten zum ersten Mal gekrümmte, dünnwandige und poröse Mikrokanäle hergestellt werden, die künstliche Blutgefäße darstellten.^[110, 123] Durch die Krümmung der Kanalwände, die den Krümmungsradien natürlicher Blutgefäße entsprachen, war somit eine *in vivo*-ähnlichere Darstellung künstlicher Blutgefäße möglich.^[16, 109] Die verwendete Technik erlaubte die Herstellung unterschiedlichster Kanalgeometrien (Durchmesser, Länge, Verzweigungen, Multikanäle), wodurch die Bioreaktoren an unterschiedliche Versuchsbedingungen angepasst werden konnten, beispielsweise die Darstellung unterschiedlicher Gefäße. Durch Veränderung der Ätzparameter konnte zudem die Porengröße variiert und damit ebenfalls an bestimmte Anforderungen, zum Beispiel den Transport einzelner Moleküle oder aber ganzer Zellen, angepasst werden. Weitere wichtige Eigenschaften der thermogeformten Strukturen waren deren Transparenz und geringe Eigenfluoreszenz, welche eine bedeutende Rolle in der mikroskopischen Auswertung der Versuche spielten. Ein weiteres wichtiges Merkmal der thermogeformten Mikrostrukturen waren die dünnen Wandungen. Diese hebt die Technik von anderen gängigen Verfahren zur Herstellung von Mikrostrukturen, wie dem Heißprägen und dem Mikrospritzgussverfahren, ab. Dünne Wände sind beispielsweise eine Voraussetzung für Migrationsstudien.

In einem ersten Zwischenschritt bei der Entwicklung des mikrofluidischen Bioreaktors wurde ein neues Boyden Chamber Insert entwickelt, das eine offene Kanalstruktur mit gekrümmter Oberfläche enthielt. Diese Kanalstruktur mit einem Durchmesser von ca. 300 μm wies die Krümmung eines Blutgefäßes auf und ermöglichte dadurch eine *in vivo*-nähere Kultivierung der Endothelzellen.^[106] Beispielsweise liegen Arterien mit Durchmessern zwischen 0,1 und 10 μm und Venen mit Durchmessern zwischen 0,1 und mehr als 1 mm in diesem Bereich.^[16] Die Transparenz und Biokompatibilität der Inserts ermöglichte die Untersuchung des



Endothels sowie der Aufnahme von Substanzen und des transendothelialen Transports durch ein natürlicheres Endothel auf einer gekrümmten Oberfläche mittels konfokaler Mikroskopie. Humane Endothelzellen (HUVECs) konnten auf der gekrümmten Oberfläche erfolgreich zur Konfluenz kultiviert werden. Die Konfluenz des Zelllayers wurde zum einen mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Zum anderen wurde zur Bestätigung der Konfluenz das Marker-Molekül Fluorescein-Natrium verwendet. In seiner vorliegenden, geladenen Form konnte Fluorescein-Natrium den Zelllayer lediglich durch passive, parazelluläre Diffusion durchqueren und ist damit ein Marker für die Konfluenz eines Zelllayers.^[126, 127] Die Konfluenz des Endothels war eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von transendothelialen Transportversuchen. Wie bereits in der Literatur beschrieben, verhielten sich Zellen, die in ihrer natürlichen, dreidimensionalen Umgebung kultiviert wurden anders als Zellen, die in herkömmlichen, flachen Zellkulturschalen kultiviert wurden.^[5, 6, 112, 113, 142, 143] Auch mit Hilfe des neu entwickelten, dreidimensionalen Boyden Chambers konnte ein deutlicher Unterschied in der Morphologie der Zellen und zwar bei der Ausbildung von Aktin-Fasern und fokalen Adhäsionspunkten nachgewiesen werden. In Endothelzellen auf der gekrümmten Kanaloberfläche richteten sich die Aktin-Fasern bereits unter statischen Bedingungen in Kanalrichtung aus. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen auf flachen Oberflächen keine solche Ausrichtung der Aktin-Fasern. Zudem zeigten diese Endothelzellen weniger fokale Adhäsionspunkte als Zellen auf flachen Membranen. Frame und Sarelius (2000) bestätigten diese Ergebnisse.^[108] Erste Tests bestätigten zudem eine erfolgreiche endotheliale Aufnahme sowie den transendothelialen Transport polykationischer Peptide durch das gekrümmte Endothel mit Hilfe des Boyden Chambers.^[110]

Durch Schließen der porösen Halbkanalstruktur mittels thermischem Bonden und der Verbindung des Mikrokanals mit einem mikrofluidischen Pumpsystem wurde der neue mikrofluidische 3D-Bioreaktor hergestellt. Mit Hilfe der Mikrofluidik ist es möglich, Zellen innerhalb des Bioreaktors kontinuierlich mit Medium und Sauerstoff zu versorgen, während Abbauprodukte in einer Art Lymphe abtransportiert werden könnten.^[1, 87, 144-146] Auch innerhalb des gesamten porösen Mikrokanals war es möglich, einen konfluenten Endothellayer über einen längeren Zeitraum unter fluidischen Bedingungen zu kultivieren. Zur Besiedlung des gesamten Kanals wurde ein schrittweises Einbringen der Zellsuspension unter Drehen des Bioreaktors durchgeführt.^[105] Dadurch konnte die Besiedelung aller Bereiche des Kanals gewährleistet werden. Ein an den Kanal angrenzendes, zweites Kompartiment sorgte hierbei für die Nährstoffversorgung der Endothelzellen zusätzlich von der basolateralen Seite. Weiterhin konnte dieses zweite Kompartiment erfolgreich für die Kultivierung einer Ko-Kultur genutzt werden. In ersten Experimenten konnte die Ko-Kultur von Endothelzellen im porösen Mikrokanal und humanen Fibroblasten oder humanen Brustkrebszellen im angrenzenden Kompartiment erzielt werden. Somit könnte ein lokaler Tumor dargestellt und dessen Wirkung auf das Blutgefäßsystem und ein möglicher Einfluss



auf den transendothelialen Transport untersucht werden. Song et al. (2009) untersuchten mit Hilfe eines mikrofluidischen Systems beispielsweise die Adhäsion zirkulierender metastatischer Brustkrebszellen am Endothel. Auch in dieser Studie wurde die Wichtigkeit des Einsatzes mikrofluidischer Systeme zur verlässlichen Untersuchung intravaskulärer Schritte in der Metastase *in vitro* verdeutlicht.^[103] Eine weitere Ko-Kultur zwischen Endothelzellen und Astrozyten zur Darstellung der Blut-Hirn-Schranke wurde in der Literatur beschrieben.^[147] Allerdings fand die Kultivierung der Endothelzellen hier auf einer planaren Oberfläche statt. Durch die Verwendung thermogeformter, dünnwandiger und poröser Mikrokanäle wird ein direkter Kontakt zwischen den Endothelzellen im Mikrokanal und der Ko-Kultur in der umgebenden Kammer erzielt, was die Untersuchung von Wechselwirkungen ermöglicht. Durch die Krümmung der Folien können Krümmungsradien von Blutgefäßen imitiert werden. Die Architektur und geometrische Aspekte der Mikroumgebung der Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Zellmorphologie und -funktion, beispielsweise bei der Polarität der Zellen oder der Ausbildung von Tight und Adherence Junctions zwischen einzelnen Zellen.^[86, 97, 144, 148-150] In weiteren Experimenten soll in dem unteren Kompartiment des Bioreaktors eine dreidimensionale Zellkultur erzielt werden. Dies würde die *in vivo*-Situation noch näher widerspiegeln und eine direkte Wechselwirkung zwischen verschiedenen Zelltypen könnte damit untersucht werden.^[1, 4] Eine solche 3D-Zellkultur könnte beispielsweise durch den Einsatz bioabbaubarer Hydrogele realisiert werden.^[151-154] Solche Hydrogele bestehen beispielsweise aus einem verzweigten azidmodifizierten Polyethylenglykol-Grundgerüst, das über Click-Chemie^[155] mit Peptiden quervernetzt wird, die eine Ausbildung der 3D-Struktur fördern. Eine Kollaboration zur Herstellung solcher Hydrogele besteht mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Lahann, Institut für Funktionale Grenzflächen (IFG), Karlsruher Institut für Technologie. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese Peptide mit zunehmender Besiedelung durch die Zellen durch sekretierte Proteasen abgebaut werden und eine 3D-Kultur entsteht.^[151, 152] Weitere Möglichkeiten zur Erzeugung einer dreidimensionalen Zellkultur im angrenzenden Kompartiment wären beispielsweise die Verwendung von (elektrogesponnenen) Fasern, Vliesen oder textilen Strukturen.^[156-158]

Zur Überprüfung der Einsetzbarkeit des Bioreaktors als neues *in vitro*-Modell zur Untersuchung des Endothels wurde die Reaktion der Endothelzellen auf angelegte Scherstress-Bedingungen untersucht. Hierbei konnte die Ausrichtung der Endothelzellen in Richtung des Mediumflusses und somit in Kanalrichtung gezeigt werden.^[159] Die Zellen zeigten eine lang gestreckte Morphologie, welche auch *in vivo* beobachtet werden konnte.^[40, 41] Im Gegensatz dazu zeigten Endothelzellen unter statischen Bedingungen eine kopfsteinpflasterartige Morphologie. Weiterhin konnte die Ausbildung dicker Aktin-Bündel, sogenannter Stress Fibers, nachgewiesen werden. Diese zeigten ebenfalls eine deutliche Orientierung in Flussrichtung, was wiederum der *in vivo*-Situation entsprach.^[42, 160] Stress Fibers spielen eine wichtige Rolle in der Adhäsion, Morphogenese und Beweglichkeit der



Zellen. Die langgestreckte Form der Zellen und deren Ausrichtung in Flussrichtung bei der Kultivierung unter fluidischen Bedingungen schien demzufolge in direktem Kontakt mit einer Neuorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der Ausbildung der Stress Fibers zu stehen.^[39, 161] Eine weitere Reaktion von Endothelzellen auf die Kultivierung unter fluidischen Bedingungen war die signifikant erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen.^[39] NO ist an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Als Vasodilator sorgt NO unter anderem für die Entspannung glatter Muskelfasern. Dadurch kann das Blutgefäß auf einen erhöhten Blutfluss reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass Scherstress eine stimulierende Wirkung auf die NO-Produktion durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) hat.^[162, 163] Weiterhin ist NO als vasoprotektiver Faktor an der Aufrechterhaltung eines antikoagulativen und antithrombogenen Milieus im Blutgefäßsystem beteiligt.^[23, 25, 39, 45] In der Literatur werden weitere Reaktionen von Endothelzellen auf Scherstress beschrieben, wie beispielsweise Änderungen in der Bildung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine oder auch Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).^[39, 46] All diese Ergebnisse zeigten die Bedeutung mikrofluidischer Systeme zur Untersuchung des vaskulären Systems *in vitro*. Das in dieser Arbeit entwickelte mikrofluidische System beweist dessen Einsetzbarkeit als *in vitro*-Modell des vaskulären Systems.

Ein weiterer Nachweis der Funktion des mikrofluidischen Bioreaktors war die Simulierung einer Entzündungsreaktion in dem künstlichen Blutgefäßsystem. Hierbei wurde die Wechselwirkung von Monozyten (Immunzellen) mit den TNF- α -stimulierten Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen untersucht. TNF- α ist ein Signalstoff des Immunsystems, welches die Aktivität verschiedener Immunzellen, unter anderem von Monozyten, reguliert. Gemäß der Literatur^[14, 29] konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Endothelzellen mit TNF- α die Adhäsion der Monozyten am Endothel signifikant erhöhte. Eine zeitabhängige Adhäsion der Monozyten am Endothel konnte mittels konfokaler Mikroskopie beobachtet werden. Weiterhin konnte auch eine Stimulierung der unteren angrenzenden Kammer mit MCP-1 die Transmigration der Monozyten durch das Endothel im porösen Mikrokanal signifikant erhöhen. MCP-1 ist ein Chemokin, das in entzündetem oder verletztem Gewebe von Monozyten, vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebildet wird, um Monozyten, T-Gedächtniszellen und dendritische Zellen zu rekrutieren.^[164] Mit Hilfe von konfokaler Spinning Disk Mikroskopie war es möglich, das ‚Rolling‘ der Monozyten am Endothel sowie den direkten Durchtritt in das angrenzende Kompartiment zu beobachten. Mit dieser Anordnung konnte somit eine Entzündungsreaktion *in vitro* nachgestellt werden. Woodfin et al. (2011) zeigten in ihrer Studie die Migration von Neutrophilen in entzündetes Gewebe mit Hilfe von intravitaler 2-Photon Mikroskopie im Mausmodell.^[165] Ein solches *in vivo*-Modell ermöglicht allerdings keine Variation von Blutparametern zur Untersuchung des Einflusses auf Migrationsprozesse.



Während dieser Studie konnte eine Färbung der Monozyten nach der Diapedese bzw. Transmigration mit dem endothelialen Membranmarker festgestellt werden. Möglicherweise fand ein Membranaustausch zwischen Endothelzellen und Monozyten statt. Zwei unterschiedliche Wege werden bei der Transmigration der Immunzellen durch das Endothel diskutiert: zum einen über Verbindungen zwischen benachbarten Endothelzellen, welcher durch Verbindungsmoleküle unterstützt wird (parazellulär). Auf der anderen Seite besteht auch die Möglichkeit einer transzellulären Migration durch den Körper der Endothelzellen.^[32, 165, 166] Nourshargh et al. (2005) beschrieben einen Austausch von Membranproteinen von Endothelzellen zu migrierenden Immunzellen (Leukozyten).^[167] Auch Mamdouh et al. (2008) diskutierten eine intensive Wechselwirkung des Adhäsionsmoleküls PECAM-1 zwischen Endothelzellen und migrierenden Leukozyten als kritischen Schritt in der Transmigration der Immunzellen. Dabei wurde auch das gezielte Recycling von Membranen beschrieben.^[31] Ein möglicher Mechanismus, der beim Transfer von Membranmolekülen beschrieben wurde, ist die Freisetzung kleiner Membranvesikel, sogenannter Mikropartikel. Diese konnten auch in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden und zeigten eine unterstützende Rolle in der Adhäsion und transendothelialen Migration von Monozyten.^[168, 169] Um auszuschließen, dass es sich lediglich um ein Abfärben von überschüssigem Farbstoff an den Membranen handelte, könnten beispielsweise genetisch veränderten HUVECs, die stabil markierte Membranen besitzen, verwendet werden. Hierbei könnte eine Übertragung von Farbstoffmolekülen ausgeschlossen werden. Weiterhin könnten zusätzlich Zellen in der unteren Kammer kultiviert werden. Bei einem Überschuss an Farbstoff müssten die Zellen in der unteren Kammer ebenfalls gefärbt werden.

Parallel zu den Migrationsversuchen wurde in der vorliegenden Arbeit die zelluläre Aufnahme Rhodamin-markierter, polykationischer Peptide untersucht. Zell-penetrierende Peptide sind Mimetika Zell-penetrierender Peptide. Durch die Beständigkeit der Peptide gegenüber dem Abbau durch Proteasen sind sie interessante ‚Drug Delivery‘ Systeme für den möglichen Transport von Wirkstoffen, Fluorophoren oder Nanopartikeln in Zellen. Die hier verwendeten Peptide wurden mittels Festphasensynthese in der Gruppe von Prof. Dr. Stefan Bräse, Institut für Organische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie, synthetisiert.^[80, 84, 134] In der Literatur wurden weitere Methoden zur Funktionalisierung von Peptiden, beispielsweise mit Hilfe von Click-Chemie, beschrieben.^[170] Folgende Rhodamin-markierten Peptide wurden für die Untersuchungen verwendet {Rh}-{XYL}_{A6}NH₂ (EB876), {Rh}-{XYL}_{G6}NH₂ (EB879), {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) und {Rh}-{HEX}_{G6}NH₂ (EB899).^[134] Zur Bestätigung der Einsetzbarkeit dieser Peptide in Zellversuchen wurde zunächst deren Zytotoxizität in den verwendeten Zellen (HUVECs) ermittelt. Die Untersuchung der Zytotoxizität der verwendeten polykationischen Peptide zeigte, dass diese in den verwendeten Konzentrationen von 2 und 5 µM keine oder nur geringe zytotoxischen Eigenschaften innerhalb der Inkubationszeiten bis zu 72 h zeigten.



Die Inkubation der Endothelzellen mit unterschiedlichen Peptoiden zeigte eine schnelle zelluläre Aufnahme. In den Zellen fanden sich die Peptide in vesikulären Kompartimenten wieder,^[80, 134] was auch bei polykationischen Zell-penetrierenden Peptiden beobachtet werden konnte.^[52] Auffällig war dabei, dass sich diese Vesikel vornehmlich in der Nähe des Zellkerns befanden. Die Untersuchung der Aufnahmewege der Peptide zeigte, dass diese zumindest teilweise über endozytotische Wege in die Zellen gelangten. Hierbei konnte eine teilweise Kolokalisation der aufgenommenen Peptide mit verschiedenen Rab-markierten Vesikeln beobachtet werden. Rab-GTPasen sind molekulare Schalter, die verschiedene Effektormoleküle aktivieren oder rekrutieren können. Sie markieren spezifisch endozytotische Vesikel. Nach kurzer Inkubationszeit zeigten die Peptide eine Kolokalisation mit Rab4- bzw. Rab5-markierten Vesikeln, welche frühe (early) Endosomen markieren. Zu späteren Zeitpunkten konnte hingegen eine Kolokalisation mit Rab7-markierten Vesikeln, also späten (late) Endosomen bzw. Lysosomen nachgewiesen werden. Da allerdings keine vollständige Kolokalisation der Peptide mit den entsprechenden endozytotischen Vesikeln gezeigt werden konnte, wäre es möglich, dass weitere Wege bei der Internalisierung der Peptide eine Rolle spielen, beispielsweise auch über Caveosomen. Auch bei Zell-penetrierenden Peptiden wurde die Rezeptor-vermittelte Endozytose als Hauptaufnahmemechanismus diskutiert.^[52, 171] Duchardt et al. (2007) beschrieben in ihrer Studie Makropinozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose und Caveolin/Lipid-Raft-vermittelte Endozytose als parallele Aufnahmewege der untersuchten Peptide.^[172] Eine weitere Möglichkeit stellt die direkte Penetration, möglicherweise über die vorübergehende Bildung von Poren, dar. Der vollständige Aufnahmemechanismus konnte allerdings auch hier nicht geklärt werden.^[62, 63, 173]

Bei der Untersuchung der endothelialen Aufnahme der vier Rhodamin-markierten, polykationischen Peptide {Rh}-{XYL}_{A6}NH₂ (EB876), {Rh}-{XYL}_{G6}NH₂ (EB879), {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) und {Rh}-{HEX}_{G6}NH₂ (EB899) mit unterschiedlichen Seitenketten zeigte sich bereits bei der qualitativen Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie tendenziell eine schnellere Aufnahme der Peptide mit guanidinylierten Seitengruppen, sowohl bei den Peptoiden mit aliphatischen, als auch bei denen mit aromatischen Resten. Diese Ergebnisse bestätigten sich bei den quantitativen Untersuchungen mittels LC-MS/MS, wobei ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration an guanidinylierten Peptoiden im Gegensatz zu Amin-gekuppelten Peptoiden in den Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Die aromatischen guanidinylierten Peptide konnten mit einer Aufnahmerate von 5% in den Endothelzellen nachgewiesen werden, die Amin-gekuppelten hingegen nur mit 1%. Bei den aliphatischen Peptoiden zeigten sich die guanidinylierten mit einer Aufnahmerate von ca. 1%, die Amin-gekuppelten hingegen nur mit etwa 0,2 bzw. 0,1% der eingesetzten Menge. Weiterhin zeigten diese Ergebnisse auch einen Unterschied zwischen aliphatischen und aromatischen Seitenketten. So konnten die aromatischen Peptide EB876 und EB879 schneller in die Endothelzellen aufgenommen werden als die entsprechenden Analoga mit



aliphatischen Seitenketten. Diese beiden aromatischen Peptoide zeigten im MTT-Test eine höhere Zytotoxizität nach 72-stündiger Inkubation. Bei einem Vergleich der Zeitabhängigkeit der Aufnahme des Peptoids {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) unter statischen sowie unter fluidischen Bedingungen schienen Peptoide unter fluidischen Bedingungen schneller von den Endothelzellen aufgenommen zu werden. Eine Sättigung in der Peptoidaufnahme wurde dabei schneller erzielt. Dies könnte mit einer höheren Wechselwirkung der Zellen mit der Inkubationslösung zusammenhängen. Ein solcher Aspekt sollte bei der Untersuchung von Aufnahmeprozessen beachtet und weiter beobachtet werden. Eine Überprüfung der endothelialen Aufnahme anderer ‚Drug Delivery‘ Systeme unter statischen und fluidischen Bedingungen wäre sehr interessant. In den Aufnahmeversuchen zeigte sich somit eine konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme der polykationischen Peptoide in Endothelzellen.^[80] Eine konzentrationsabhängige Aufnahme konnte auch bei verschiedenen Zell-penetrierenden Peptiden gezeigt werden. Es wurde vermutet, dass unterschiedliche Peptide auf sehr ähnlichem Weg in Zellen aufgenommen werden. Der genaue Aufnahmemechanismus konnte allerdings, wie bereits beschrieben, noch nicht vollständig geklärt werden.

Auch mit Hilfe des mikrofluidischen Bioreaktors wurden erste Tests zur Untersuchung des transendothelialen Transports der polykationischen Peptoide unter fluidischen Bedingungen durchgeführt. Beispielhaft wurde das Peptoid {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) eingesetzt. Es zeigten sich eine erfolgreiche Aufnahme des Peptoids in den Endothelzellen im porösen Mikrokanal sowie ein erfolgreicher Transport durch das Endothel in das angrenzende Kompartiment, wo die Peptoide in den zuvor kultivierten humanen Fibroblasten aufgenommen wurden. Auch hier konnten die Peptoide in vesikulären Strukturen innerhalb der Zellen nachgewiesen werden. Nach 24 h konnte nur eine sehr geringe Menge an transportiertem Peptoid nachgewiesen werden. Ein deutlicher Transport war nach 4 bzw. 5 Tagen zu sehen. Zur quantitativen Bestimmung von transendothelialen Transportprozessen oder auch metabolischen Vorgängen könnte die untere Kammer direkt mit einem analytischen System, wie beispielsweise mittels einer vor- und/oder nachgeschalteten Durchflusszelle für IR-Spektroskopie, Raman-Spektroskopie etc. verbunden werden. Über ein zweites Pumpsystem würden die transportierten Substanzen durch aktives Durchströmen direkt der Analytik zugeführt werden.

Mit Hilfe der porösen Kanalstrukturen im mikrofluidischen Bioreaktor könnten unterschiedlichste Untersuchungen des transendothelialen Transports, des Transports von Signal- und Botenstoffen, Wirkstoffen, Viren und Bakterien oder auch die Migration von Zellen realisiert werden. Abhängig von der Porengröße könnte dabei zwischen einem direkten Kontakt der Zellen im Lumen des Mikrokanals und den Zellen im angrenzenden Kompartiment oder aber lediglich einem Austausch von löslichen Faktoren unterschieden werden. Weiterhin wäre es möglich, physikalische oder chemische Gradienten zwischen dem



Kanallumen und dem umgebenden Kompartiment über die Poren zu erzeugen.^[1] Somit wird deutlich, dass dem neuartigen mikrofluidischen Bioreaktor zahlreiche neue, bisher nicht mögliche Anwendungsmöglichkeiten offen stehen. Abschließend kann gesagt werden, dass der hier beschriebene Bioreaktor zur Simulation verschiedener transendothelialer Prozesse geeignet ist und soweit das erste mikrofluidische Kapillarmodell darstellt, dass auch einen transendothelialen Transport durch dünne Membranen in runden Geometrien erlaubt. Das hier beschriebene System ist im Patentprozess und soll zeitnah als Einmalartikel in verschiedenen Anordnungen und Geometrien für die weitere wissenschaftliche Forschung sowie für die Anwendung in der Toxikologie von Wirkstoffen z.B. unter Verwendung von organotypischen 3D-Kulturen in der unteren Kammer weiterentwickelt und bereitgestellt werden.



6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Allgemeines

6.1.1 Verwendete Geräte

Thermoformanlage

Verwendet wurde die Thermoformanlage am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1), Karlsruher Institut für Technologie.

Mikroskope

Axioskop SNT 12V/100W (Zeiss)

Konfokalmikroskop I: Leica TCS SP5 (DMI 6000)

Konfokalmikroskop II: Leica TCS SP5 Tandem (DM 6000)

Lichtmikroskop (Olympus)

Rasterelektronenmikroskop: SUPRA 60 VP (Carl Zeiss SMT), EDX-Detektor (XFlash 5010, Bruker)

Spinning disk Konfokalmikroskop: Ultraview VoX (PerkinElmer)

LC-MS/MS

API 4000, Tandemquadrupol-Massenspektrometer, Elektrospray-Ionisation, LC/MS/MS System, MDS SCIEX

HPLC Agilent 1100 Series mit Autosampler (ALS G1313A), Pumpensystem (Bin Pump G1312A)

UV-Detektor (VND G1314A)

Degaser, ERC-3415a, ERC INC.

LiChrospher 100 RP 18-5 μ EC (endcapped) Säule (5 μ m, 125 mm \times 4 mm) (7.584046, Ziemer Chromatographie)

Weitere Geräte

FLUOstar Optima Multidetektion Microplate Reader (BMG Labtech)

MyCycler Thermal CYcler (Bio-Rad, Hercules)

Pumpe (IPC, ISMATEC)

Pump System (10902, ibidi)

Sterilbank, LaminAir[®], HB 2448 (Heraeus GmbH)

Ultraschallbad, Bioruptor[®] Sonication System (Diagenode)

UV-Quelle, UV/Ozone ProCleaner[™] Plus (Bioforce Nanoscience)

γ -Strahlungsquelle, Cobalt 60 (Atomic Energy Ltd.)



6.1.2 Verwendete Software

Analyst 1.4 (LC-MS)

ImageJ 1.45s (Bildbearbeitungsprogramm)

Imaris 7.4.2 (Auswertung von konfokalen Bildern)

LAS AF Version: 2.1.2 build 4530 (Konfokalmikroskop)

LAS AF Version: 2.0.2 build 2038 (Konfokalmikroskop – Auswertung)

Volocity 6.0.1, PerkinElmer (Spinning Disk Mikroskopie – Auswertung)

6.1.3 Mikroskopiedaten (konfokale Mikroskopie)

Mikroskop	Leica SP5 (DMI6000 inverses Mikroskop) bzw. Leica SP5 Tandem (DM6000)
Software	Leica Application Suite 2.0.2 (LAS-AF)
Pinhole	1 Airy (111,5 μm)
Resolution	8 bit
Format	1024 \times 1024 pixels (200 Hz) 1024 \times 256 pixels (400 Hz)

Laser

Argon (488 nm) (30% Vorlage)

HeNe (633 nm)

DPSS (561 nm)

UV (351 nm)

Objektive

HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV

HCX APO L U-V-I 63.0x0.90 WATER UV

HCX PL APO CS 20.0x0.7 DRY

HCX PL APO CS 10.0x0.7 DRY

Emission

Bandwidth PMT1 (Argon) 509 nm – 552 nm

Bandwidth PMT2 (HeNe) 643 nm – 724 nm

Bandwidth PMT3 (DPSS) 600 nm – 692 nm

Bandwidth PMT4 (UV) 417 nm – 468 nm

6.1.4 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test bestimmt. Statistisch signifikant waren alle Ergebnisse mit $p < 0,05$.



6.2 Zellkultur

Am Beispiel der Zelllinie: HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

HUVEC-Zellen wurden in EGM[®]-2 (Endothelial Cell Growth Medium-2, Lonza) unter Zusatz von EGM[®]-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (Lonza) bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert (Zellkulturschalen, Greiner). Um die Zellen zu passagieren wurden diese zweimal mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (10 ml 0,25%ige Trypsinlösung, 10 ml EDTA 5 mM und 30 ml PBS) benetzt und im Brutschrank für 5 bis 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde nach vollständigem Ablösen der Zellen mit mindestens einem Volumen eines Trypsininhibitors (10% FKS in PBS) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 x g für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet im entsprechenden Volumen Medium resuspendiert.

Weitere verwendete Zelllinien waren THP-1 Zellen (Monozyten, kultiviert in RPMI 1640 Medium, Gibco[®], Life TechnologiesTM), humane Fibroblasten (kultiviert in DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco[®], Life TechnologiesTM), MDA MB 231 (humane Brustkrebskarzinom Zellen, kultiviert in DMEM/F12, Gibco[®], Life TechnologiesTM), HepG2 (humane Leberkarzinomzellen, kultiviert in DMEM), HeLa Zellen (humane Gebärmutterhalskrebszellen, kultiviert in DMEM).

6.3 Test der Funktionalität des 3D-Boyden Chamber Systems

6.3.1 Test unterschiedlicher Behandlungen der Polycarbonat-Folie auf Zelladhäsion

Folie: „belgische“ PC-Folie, 65 µm, LOT 241108/R/801, Schwerionen-behandelt, 10⁶ Tracks/cm².

Eine Folie wurde mit 5 N NaOH + 1‰ DF bei 70°C für 2 h geätzt, um die Poren zu öffnen (10⁶ Poren/cm²).

Aus beiden Folien wurden dann Kreise mit einem Durchmesser von 14 mm, die in die Wells einer 24-Well Platte passen, ausgestanzt. Zur Fixierung der Folienstücke am Boden der Wells wurden passende Silikonringe mit einem Innendurchmesser von 1 cm (Fläche 0,8 cm²) verwendet. Zum Sterilisieren wurden die nicht UV-behandelten Folienstücke durch Isopropanol (70%) gezogen und unter sterilen Bedingungen an der Luft trocknen gelassen. UV-bestrahlte Folien wurden nicht mehr zusätzlich sterilisiert. Die Wells der 24-Well Platte wurden wie folgt bestückt:



unbehandelt -	unbehandelt + Fibronektin	unbehandelt + Kollagen	unbehandelt -	unbehandelt + Fibronektin	unbehandelt + Kollagen
unbehandelt -	unbehandelt + Fibronektin	unbehandelt + Kollagen	unbehandelt -	Unbehandelt + Fibronektin	unbehandelt + Kollagen
UV-bestrahlt -	UV-bestrahlt + Fibronektin	UV-bestrahlt + Kollagen	UV-bestrahlt -	UV-bestrahlt + Fibronektin	UV-bestrahlt + Kollagen
UV-bestrahlt -	UV-bestrahlt + Fibronektin	UV-bestrahlt + Kollagen	UV-bestrahlt -	UV-bestrahlt + Fibronektin	UV-bestrahlt + Kollagen

Für das Experiment wurde eine Zellsuspension mit 4×10^5 Zellen/ml verwendet. Jeweils 200 μ l der Zellsuspension wurden auf alle Folienstücke innerhalb des Silikonrings pipettiert (8×10^4 Zellen/cm²) und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank für 30 min inkubiert. Dann wurden je 500 μ l EGM-2 in die Wells pipettiert, um eine ausreichende Versorgung der Zellen zu gewährleisten.

Das Wachstum der Zellen wurde lichtmikroskopisch beobachtet.

6.3.1.1 UV-Bestrahlung

Die Hälfte der Folienstücke (nicht-porös und porös) wurde in einer Petrischale offen in eine UV-Quelle (UV/Ozone ProCleaner™ Plus, Bioforce Nanoscience) geschoben und für 20 min bestrahlt.

6.3.1.2 Fibronektin-Beschichtung

Jeweils zwei Proben der nicht-porösen und porösen, UV-bestrahlten und nicht bestrahlten PC-Folie wurden einer Beschichtung mit Fibronektin unterzogen.

Je 200 μ l einer Fibronektin-Lösung (50 μ g/ml verdünnt in PBS) wurden auf die PC-Folienstücke innerhalb des Silikonrings pipettiert (ca. 10 μ g/cm²) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde bei Raumtemperatur zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit der Zellsuspension befüllt.

6.3.1.3 Kollagen-Beschichtung

Jeweils zwei Proben der nicht-porösen und porösen, UV-bestrahlten und nicht bestrahlten PC-Folie wurden einer Beschichtung mit Kollagen unterzogen.



Je 200 μl einer Kollagen-Lösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt in ddH_2O) wurden auf die PC-Folienstücke innerhalb des Silikonrings pipettiert (ca. 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde bei Raumtemperatur zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit der Zellsuspension befüllt.

6.3.2 Handhabung des 3D-Boyden Chambers

Zur Sterilisierung wurde der Boyden Chamber Einsatz für 10 min in 100% Isopropanol eingelegt. Um die porösen Membranen zu entgasen und dadurch die Luftblasenbildung in der Halbkanalstruktur beim Befüllen mit Medium zu verhindern, wurden die Membranen mit Silikon-Ring durch eine Isopropanol-Reihe absteigender Konzentration gezogen (100% Isopropanol, 90% Isopropanol, 70% Isopropanol, 50% Isopropanol, 3 x ddH_2O). Das an der Membran anhaftende Wasser wurde danach vorsichtig abgesaugt, die Membran aber nicht getrocknet. Um die Luftblasenbildung zu verhindern, darf die Membran nach dem Entgasen nicht mehr getrocknet werden.

Die Silikon-Ringe mit den für 3 h geätzten Membranen bzw. der ungeätzten Kontrollmembran wurden in die Kammern einer 6-Well Platte (Multiwellplatte) eingesetzt und bis zum Boden nach unten geschoben.

Die Folien (Durchmesser 2,5 cm, Wachstumsfläche 4,9 cm^2) wurden mit Kollagen (Ratte) beschichtet. Hierzu wurden 25 μl einer Kollagenlösung (2 mg/ml) mit ddH_2O auf 1,5 ml verdünnt und auf die poröse Folie pipettiert. Die Kollagenlösung blieb über Nacht bei 4°C auf der porösen Membran. Die Endkonzentration an Kollagen betrug 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Vor dem Gebrauch wurde die überstehende Kollagen-Lösung entfernt und die Membranen mit PBS gewaschen. Die Kollagen-beschichteten Membranen können auch in PBS bei 4°C aufbewahrt werden.

6.3.3 Dichtigkeitstest des Zellrasens im Boyden Chamber mit Fluorescein-Natrium

Für das Experiment wurden 3×10^5 Zellen in die Kammern einer 6-Well Platte, die die porösen Halbkanalstrukturen an Silikon-Ringen enthielten, in 5 ml EGM[®]-2 (2 ml oberes Kompartiment, 3 ml unteres Kompartiment) ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden für eine Woche kultiviert mit einem Mediumwechsel nach jeweils drei Tagen.

Die Bestimmung der Dichtigkeit des Zelllayers erfolgte mit Hilfe des Markermoleküls Fluorescein-Na. Fluorescein-Na liegt bei den vorliegenden Versuchsbedingungen (pH-Wert 7,4) in der deprotonierten, geladenen Form vor. Dadurch kann es die Zellmembran lediglich durch passive, parazelluläre Diffusion durchqueren. Es spiegelt demzufolge die Dichtigkeit des Zelllayers wider.

Hierzu wurde eine 4 μM Fluorescein-Lösung in EGM-2 auf den Zellrasen im oberen Kompartiment pipettiert. Das untere Kompartiment wurde mit EGM-2 befüllt. Nach einer



Inkubationszeit von 60 min im Brutschrank (37°C) wurde die Fluorescein-Konzentration in beiden Kompartimenten mit Hilfe einer Standardkurve (Abbildung 115) über Messung der Fluoreszenz (FLUOstar Optima, BMG) bestimmt (Excitation 485 nm, Emission 520 nm).

Zur Kontrolle wurde der gleiche Test mit einer identischen Membran ohne Zellrasen durchgeführt. Als weitere Kontrollmembran diente eine nicht poröse Membran. Hierbei sollten sich die Fluorescein-Na-Konzentrationen im unteren Kompartiment deutlich unterscheiden.

Standardkurve Fluorescein:

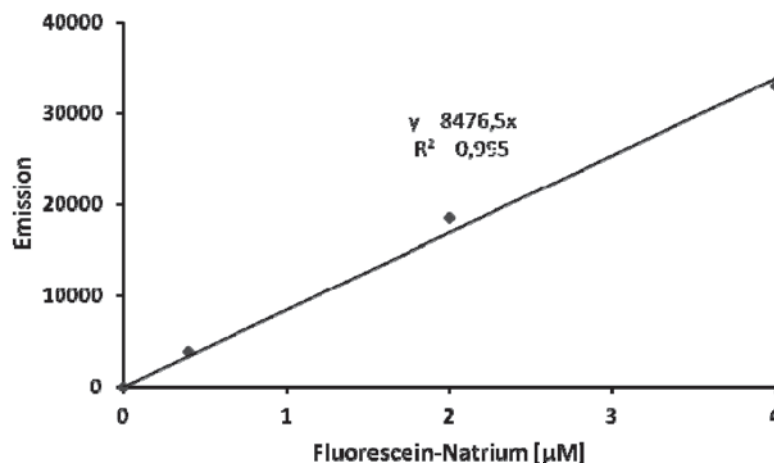


Abbildung 115: Standardkurve von Fluorescein-Natrium.

6.3.4 Transport von Peptoid-Transporter durch Endothellayer

Zur Untersuchung des Transports des Peptoid-Transporters {Rh}-{XYL}_{15A}NH₂ (BG 98) durch den Endothellayer in der porösen Halbkanalstruktur wurde der entsprechende Transporter in einer Konzentration von 2 µM in EGM-2 auf den Zellrasen in der für 3 h geätzten Halbkanalstruktur gegeben und über 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Transporter-Konzentration auf die entsprechenden Membranen ohne Besiedelung mit Zellen gegeben.

Um den Durchtritt des Transporters durch den Endothellayer zu visualisieren wurden vor der Inkubation mit dem Peptoid-Transporter HUVEC-Zellen in die jeweils unteren Kompartimente ausgesät (1×10^5 Zellen). Diese sollten die durch den Endothellayer in der Halbkanalstruktur transportierten Peptoid-Transporter aufnehmen. Durch die Rhodamin-Markierung der Transporter konnten diese mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Die HUVEC-Zellen aus dem unteren Kompartiment wurden hierzu nach der Inkubationszeit abtrypsinisiert, in die Wells von 8-Well Chamber Slides (µ Slide 8 well ibiTreat, ibidi) in EGM-2-Medium ausgestreut und mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 561 nm (DPSS-Laser) sowie im Hellfeld mikroskopiert.



Um die Zeitabhängigkeit des Transports der Peptide durch den Endothellayer zu untersuchen, wurde die Membran nach der ersten Messung erneut in die Kammer gesetzt und für weitere 2 Tage kultiviert. Im unteren Kompartiment befanden sich wieder die HUVECs, die bereits Transporter aufgenommen hatten. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Zellen im unteren Kompartiment erneut abtrypsiniert und mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Weiterhin wurde die Vollständigkeit des Zelllayers in der porösen Halbkanalstruktur direkt mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie unter den oben genannten Bedingungen überprüft.

6.3.5 REM-Aufnahmen

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden die Kanalstrukturen nach Überziehen mit einer Goldschicht mikroskopiert.

Fixieren der Zellen für REM-Aufnahmen:

Die Zellen wurden zweimal mit PBS (++) gewaschen und die Inserts in eine Petrischale gesetzt. Die Zellen aus Probe 1 wurden anschließend mit 500 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (++) überschichtet und das Ganze für 20 min inkubiert. Dann erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBS. Danach wurde der Zellrasen mit 500 µl Methanol überschichtet und für 30 min inkubiert. Das Methanol wird abgeschüttet und die Membran an der Luft getrocknet.

Die Zellen aus Probe 2 wurden direkt nach dem Waschen mit Methanol überschichtet, für 30 min inkubiert und an der Luft trocknen gelassen.

6.4 Test der Funktionalität des mikrofluidischen Bioreaktors

6.4.1 Einbringen der Zellen in den porösen Mikrokanal des Bioreaktors

Zum Sterilisieren wurde der Kanal über Nacht in die γ -Strahlungsquelle (Cobalt 60, Atomic Energy Ltd.) gegeben. Zur besseren Kultivierung der HUVEC-Zellen wurde die PC-Folie im Kanal mit Fibronectin beschichtet. 45 µl Fibronectinlösung (1 mg/ml; 33010-018, Life Technologies™) wurden mit 5 µl PBS verdünnt und in den Kanal gegeben (4 µg Fibronectin/6 µl Kanalvolumen; 10 µg/cm²) und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Kanal sowie die untere Kammer wurden anschließend mit PBS gewaschen. Um den porösen Kanal zu Konditionieren und dadurch die spätere Luftblasenbildung zu verhindern, wurden Kanal und untere Kammer mit EGM-2 Medium befüllt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.



Der Kanal wurde mit der Zellsuspension beimpft (5×10^6 Zellen/ml). Hierzu wurde die Zellsuspension in einen Kanalanschluss pipettiert und die überschüssige Lösung auf der anderen Seite abgenommen. Es ist wichtig, dass der komplette Kanal und Anschlüsse immer mit Flüssigkeit gefüllt sind. Die Zellen wurden für 10 min im Brutschrank inkubiert. Es wurde erneut Zellsuspension in den Kanal gegeben, der Kanal um 90° gedreht und für weitere 10 min inkubiert. Dies erfolgte noch zwei weitere Male. Im Anschluss wurden die Zellen für ca. 3 h inkubiert, um deren Anwachsen zu gewährleisten.

Mit Hilfe von Hellfeld-Mikroskopie konnte die Besiedelung der Kanäle mit den HUVECs beobachtet werden.

Der mit Zellen besiedelte Kanal wurde nach Anwachsen der Zellen wieder an das ibidi-Pumpensystem mit Mediumreservoir angeschlossen. Die Schläuche wurden hierbei direkt mit den Kanalanschlüssen luftblasenfrei verbunden. Es ist wichtig, dass Medium und Pumpensystem zuvor im Brutschrank inkubiert werden, um das Auftreten von Luftblasen im System zu vermeiden.

Der angeschlossene Kanal wurde zu Beginn für etwa 1 h unter statischen Bedingungen kultiviert, damit sich die Zellen regenerieren konnten. Dann wurde mit einer Geschwindigkeit von ca. $150 \mu\text{l}/\text{min}$, was einem Scherstress von ca. $5 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ entsprach, durchströmt. Nach einigen Stunden wurde die Geschwindigkeit auf $250 \mu\text{l}/\text{min}$ (-10 mbar , $10 \text{ dyn}/\text{cm}^2$) erhöht. Nach Durchströmen über Nacht wurde die Geschwindigkeit nochmals auf etwa $400 \mu\text{l}/\text{min}$ (-18 mbar , $15 \text{ dyn}/\text{cm}^2$) erhöht. Mit dieser Geschwindigkeit wurde dann über mehrere Tage durchströmt.

6.4.2 Strömungsvisualisierung und Simulation

Die Strömungsprofile innerhalb der Mikrokanäle wurden durch ‚Computational Fluid Dynamics‘ (CFD) vorausberechnet und durch ‚micro-Particle Image Velocimetry‘ (micro-PIV) bestätigt.

Geschwindigkeit (velocity) und Scherstress-Profile wurden mit Hilfe von COMSOL Multiphysics (COMSOL, Stockholm, Schweden) Software simuliert. Zwei typische Kanalquerschnitte (1 mm und $300 \mu\text{m}$ breite Kanäle ohne Poren) wurden abgebildet/mikroskopiert und mittels AutoCAD (Autodesk San Rafael, Kalifornien, USA) maßstabsgetreu übertragen (Abbildung 31). Die Querschnitte wurden in COMSOL importiert und daraus dreidimensionale 3 mm gerade Abschnitte der mikrofluidischen Kanäle modelliert. Die Simulationen erfolgten mit folgenden Einstellungen: stationär, einphasig, laminare Strömung, mit vollständiger Wandhaftbedingung (‚stationary, single phase, laminar fluid flow physics, no-slip boundary‘). Die Eingangsflussraten wurden mit $250 \mu\text{l}/\text{min}$ für den 1 mm breiten Kanal und $150 \mu\text{l}/\text{min}$ für den $300 \mu\text{m}$ breiten Kanal festgesetzt. Der Druck der Ausgänge wurde auf Null gesetzt. Die Fluidmerkmale wurden auf die Standardwerte von Wasser definiert in der COMSOL Software (dynamische Viskosität = $1.009 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, Dichte = $999.6 \text{ kg}/\text{m}^3$, Temperatur = 293.15 K) festgesetzt. Die resultierenden Geschwindigkeiten und



Scherstress-Querschnittsprofile wurden an einem Punkt der halben Weglänge des Kanals bestimmt. Die maximalen Flüssigkeitsgeschwindigkeitswerte wurden aus den zweidimensionalen Querschnitten der Geschwindigkeitsprofile ermittelt. Die maximalen Scherkräfte an den Wänden der Kanäle wurden am Boden der Kanäle (wo die Endothelzellen wachsen) in den Querschnittsprofilen bestimmt.

Die Geschwindigkeitsprofile wurden in den 1 mm und 300 µm Kanälen ohne Poren mittels micro-PIV gemessen. Der experimentelle Aufbau beinhaltete ein inverses Mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-5, Japan), eine gekühlte CCD Kamera (PCO Sensicam, QE Double Shutter, Deutschland) und einen gepulsten Nd:YAG Laser (New Wave, Oregon, USA) mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm. Durch die Aufnahme einer Serie von zwei aufeinanderfolgenden Bildern und anschließende Auswertung des Abstands der fluoreszierenden Marker, die der Lösung zugesetzt wurden, wurden die Geschwindigkeitsprofile ermittelt. Es wurde eine kommerziell erhältliche Software verwendet (DaVis 7.2, Lavisision, Deutschland). Die Tracer/Marker waren fluoreszierende Mikrokugeln (F8819, Invitrogen, Kanada), die deionisiertem Wasser in einer Konzentration von 1:100 zugefügt wurden. Zusätzlich wurde 0,05% v/v der oberflächenaktiven Substanz/Tensid Tween 20 (Sigma-Aldrich, Kanada) der Lösung hinzugefügt, um die Aggregation der Partikel und das Anhaften an die Kanäle zu verhindern. Bei jeder Messung wurde die Ebene mit der größten Dislokation/Verschiebung der Partikel fokussiert, welche proportional zur Partikelgeschwindigkeit ist. Die Zeitspanne zwischen zwei Laserpulsen wurde so gewählt, dass die Dislokation/Verschiebung einzelner Partikel von einem Bildfeld zum nächsten ungefähr 6 Pixel betrug. Im Ergebnisteil ist die maximale Geschwindigkeit dargestellt und wurde mit der durch CFD berechneten maximalen Geschwindigkeit für gleichen Eingangsflussraten verglichen.

Untersuchte Flussraten:

1 mm Kanal, gerade: 250 µl/min, 500 µl/min

300 µm Kanal, gerade: 75 µl/min, 100 µl/min, 150 µl/min

350 µm Kanal, verzweigt: 75 µl/min, 150 µl/min, 300 µl/min

6.4.3 Permeabilitätstest

Die Permeabilität durch die poröse Membran, die Fibronectin-Beschichtung und den Endothellayer wurde, wie in Young et al. (2010)^[174] beschrieben, gemessen. Fluorescein-Isothiocyanat-markiertes BSA (FITC-BSA, 2 µg/ml in Puffer) wurde durch das Kanallumen geströmt, sodass das FITC-BSA durch die Membran in das untere Kompartiment des Bioreaktors gelangen konnte. Von dort wurde es in einen weiteren Kanal außerhalb des Bioreaktors geleitet. Mikrokanal und untere Kammer wurden über Polyethylenschläuche mit Spritzenpumpen verbunden (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) wurde dazu verwendet, um das FITC-BSA im nachgeschalteten Kanal zu



detektieren. Die 488 nm-Linie des Argon Lasers (Melles Griot, Carlsbad, CA, USA) wurde auf das Lumen des nachgeschalteten Kanals fokussiert. Es wurde ein 10× Objektiv eines inversen Mikroskops (Olympus IX-71) verwendet. Die Fluoreszenz wurde mit demselben Objektiv, sowohl optisch (536/40 nm Bandpass- und 488 nm Sperrfilter) als auch räumlich (500 µm Pinhole), eingefangen und auf eine Photomultiplier-Röhre (PMT, Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA) abgebildet. Der PMT-Strom wurde mit Hilfe eines Picoamperemeters (Keithley Instruments, Cleveland, OH, USA) in Spannung umgewandelt. Die analog-zu-digital-Umwandlung wurde mittels eines Datenerfassungspads (National Instruments, Austin, TX, USA), das mit der Software LabView (National Instruments) verbunden war, durchgeführt.

Drei verschiedene Bedingungen wurden getestet: unbeschichtete Membran, Fibronectin-beschichtete Membran und Fibronectin-beschichtete Membran besiedelt mit Endothelzellen und mit PFA fixiert. Die Permeabilität wurde mit Hilfe der Fluoreszenzintensität für ein konstantes bottom-to-top Flussratenverhältnis gemessen.^[174]

6.4.4 Lebendfärbungen der Endothelzellen

Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die entsprechenden Zellen vor der Mikroskopie mit verschiedenen Farbstoffen zur Markierung unterschiedlicher Kompartimente gefärbt. Zur Markierung des Zytosols wurden die Zellen mit CellTracker™ Green (Molecular Probes®, Life Technologies™) mit einer Endkonzentration von 20 µM in EGM-2 für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 × vorsichtig mit PBS gewaschen und mit frischem EGM®-2 Medium versetzt.

Zur Visualisierung der Mitochondrien wurden die Zellen mit einem Organellenmarker für Mitochondrien markiert. Hierbei wurden die Zellen mit MitoTracker® Green (Molecular Probes®, Life Technologies™) mit einer Endkonzentration von 250 nM in EGM-2 für 15 min bei 37°C inkubiert. Der Zell-durchdringende MitoTracker® enthält einen Thiol-reaktiven Chloromethylrest zur Markierung der Mitochondrien.

Zur Färbung der Zellkerne der Endothelzellen im Kanal wurde das Medium im Kanal mit frischem Medium, das den Farbstoff Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 2 µg/ml enthielt, ausgetauscht. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C konnte direkt mikroskopiert werden. Um die Lösungen im Kanal auszutauschen, wurden neue Lösungen immer von einer Seite hinzugefügt und von der anderen Seite wieder abgenommen. Es war dabei wichtig, dass der Kanal immer mit Flüssigkeit gefüllt blieb.

Die Färbung der Zellmembranen in lebenden Zellen wurde mit dem Farbstoff CellMask™ Deep Red (Molecular Probes®, Life Technologies™) ermöglicht. Zellen wurden mit dem Farbstoff in einer Konzentration von 8 µg/ml in EGM-2 Medium für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Medium gewaschen.

6.4.5 Immunfärbung der Endothelzellen

Die Zellen wurden nach der Kultivierung unter fluidischen Bedingungen und nach dem Färben der Zellkerne mit PBS gewaschen und 15 min mit 2% Paraformaldehyd in PBS ($2 \times 50 \mu\text{l}$) auf Eis fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X 100 in PBS ($2 \times 50 \mu\text{l}$) für 5 min permeabilisiert und danach wieder mit PBS gewaschen. Nach dem Blockieren mit 1% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS für 30 min wurde die Färbelösung auf die Zellen im Kanal gegeben und 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach Experiment enthielt diese Lösung Rhodamin Phalloidin (1:100-Verdünnung der methanolischen Stocklösung (300 Units) in PBS mit 1% BSA; Molecular Probes®, Life Technologies™) zur Färbung der Aktin-Fasern bzw. Stress Fibers, sowie die Primärantikörper Anti-Vinculin (1:200 Verdünnung, Maus Anti-Vinculin-Antikörper, Sigma) zur Visualisierung der Fokalen Adhäsionen oder Anti-VE-Cadherin (1:50 Verdünnung, Goat Anti-human VE-Cadherin, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA) zur Markierung der Adherence Junctions. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurde der entsprechende Alexa488 gefärbte Sekundärantikörper (Anti-Maus bzw. Anti-Ziege) in einer Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$ in PBS mit 1% BSA in den Kanal gegeben und erneut für 40 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die gefärbten Zellen in PBS bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen bei einer Wellenlänge von 351 nm (Hoechst 33342, UV-Laser), 488 nm (Alexa488, Argon-Laser), 561 nm (Rhodamin, DPSS-Laser) sowie im Hellfeld mikroskopiert.

6.4.6 NO-Färbung

Stickstoffmonoxid (NO) ist mit sehr vielen biologischen Prozessen verbunden. Aromatische ortho-Diamin-Derivate werden für das Fluoreszenz Imaging von NO in lebenden Zellen verwendet. Sie reagieren mit NO in oxidiertem Medium und bilden Triazol (TZ)-Derivate (Abbildung 116). 1,2-Diaminoanthraquinon (DAA) ist eine solche Verbindung und kann als nicht-toxisches Reagenz für die Bestimmung von NO in lebendem Gewebe und Zellen verwendet werden ^[45, 175].

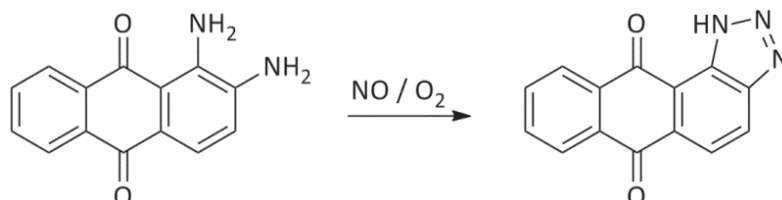


Abbildung 116: Reaktion von DAA mit NO in Gegenwart von O_2 zum Triazol-Derivat DAA-TZ.

Die Zellen im fluidischen sowie im statischen Kanal wurden mit einer Lösung von ($100 \mu\text{M}$ in EGM-2) für 30 min inkubiert. Danach wurden Kanal und unteres Kompartiment mit EGM-2 gewaschen.



Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie konnte die NO-Produktion in den Endothelzellen bestimmt werden.

6.4.7 Monozyten-Adhäsion und Transmigration

Zur Färbung der Zellkerne der Monozyten wurden diese in Suspension mit frischem RPMI-Medium, das den Farbstoff Hoechst 33342 in einer Konzentration von 2 µg/ml enthielt, für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Endothelmedium EGM-2 resuspendiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs vor der Mikroskopie mit einem Marker für das Zytosol bzw. für die Zellmembranen markiert. Hierbei wurden die Zellen mit CellTrackerTM Green bzw. CellMaskTM Deep Red (Life TechnologiesTM) mit einer Endkonzentration von 20 µM bzw. 8 µg/ml in EGM-2 für 15 bzw. 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 × vorsichtig mit Medium gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

Die Endothelzellen im fluidischen Kanal wurden für 4 h mit TNF-α in einer Konzentration von 25 ng/ml unter einem Scherstress von 20 dyn/cm² behandelt. Danach wurde das Medium ausgetauscht und die Hoechst-markierten THP-1 Zellen in einer Zelldichte von 1 × 10⁷ Zellen/2 ml in die Mediumreservoirs der ibidi-Pumpe eingebracht und mit einem Scherstress von ca. 20 dyn/cm² durch den Kanal gepumpt. Nach einer Stunde wurde der Kanal mit PBS gewaschen und die Zellen im Kanal mikroskopiert.

Als Kontrolle wurden die Hoechst-markierten THP-1 Zellen in derselben Zelldichte in das System eingebracht und ebenfalls mit einem Scherstress von ca. 20 dyn/cm² durch den Kanal gepumpt, allerdings ohne vorherige Stimulierung der Endothelzellen mit TNF-α. Nach einer Stunde wurde der Kanal mit PBS gewaschen und die Zellen im Kanal mikroskopiert.

Für die Transmigrationsversuche der Monozyten wurde zusätzlich in die untere Kammer 500 ng/ml MCP-1 in RPMI1640 Medium gegeben. Nach 4 bzw. 24 h wurde der Kanal mit PBS gewaschen und die Zellen im Kanal und der unteren Kammer mikroskopiert. Auch hier wurde eine Kontrolle mitgeführt.

Mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen bei einer Wellenlänge von 351 nm (Hoechst 33342, UV-Laser), 488 nm (Alexa488, Argon-Laser), 633 nm (Deep Red, HeNe-Laser) sowie im Hellfeld mikroskopiert.

6.4.8 Ko-Kultur

6.4.8.1 Wachstumskurven

Für die Ermittlung der Wachstumskurven der Fibroblasten, HepG2 und MDA MB 231 in dem jeweiligen optimalen Medium sowie Endothelmedium wurden 1 × 10⁴ Zellen in die Kammern von 24-Well Platten in 1 ml Medium (Platte 1: DMEM bzw. F12/DMEM, Platte 2: EGM-2) ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wurde langsam von der



Mitte des Wells zugefügt, sodass die Zellen nicht umher wirbelten und eine gleichmäßige Verteilung erzielt werden konnte.

Nach 24 h wurden die Zellen in je drei Wells einer Platte gezählt. Hierzu wurde 1 ml Trypsin/EDTA zugefügt und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden im Trypsin/EDTA resuspendiert und somit vollständig von der Oberfläche abgelöst. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die jeweilige Zellzahl bestimmt.

Dieser Prozess wurde nach weiteren 24 h usw. über einen gesamten Zeitraum von 8 Tagen wiederholt. Nach 72 h und nach jeden weiteren 24 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei den Fibroblasten wurde ab Tag 3 die Zellzahl aufgrund der geringen Teilungsrate in einem Abstand von 48 h bestimmt. Dies erfolgte über einen gesamten Zeitraum von 11 Tagen.

6.4.8.2 Ko-Kultur im mikrofluidischen Bioreaktor

Zur Etablierung einer Ko-Kultur im unteren Kompartiment des Bioreaktors wurde die Kultivierung verschiedener Zelllinien getestet. Um das Wachstum der Zellen in der unteren Kammer zu verbessern, wurde diese mit Kollagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet. Die Kollagenlösung (in PBS verdünnt) wurde in das untere Kompartiment gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde mit PBS gewaschen. Die gesamte untere Kammer sollte dabei immer mit Flüssigkeit gefüllt bleiben, um das Auftreten von Luftblasen zu verhindern. Der mit Medium befüllte Bioreaktor wurde im Brutschrank konditioniert. Eventuell auftretende Luftblasen konnten vor dem Einbringen der Zellsuspension entfernt werden.

Es wurden humane Fibroblasten (91_23), 5×10^5 Zellen/ml EGM-2 (1×10^5 Zellen/Kammer) verwendet. Die Zellsuspension wurde in die untere Kammer gegeben ($4 \times 200 \mu\text{l}$) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Anschlüsse wurden mit Schläuchen mit Verschlusskappen verschlossen.

Weiterhin wurden auch humane Brustkrebszellen (MCF-7), 10×10^5 Zellen/ml EGM-2 (2×10^5 Zellen/Kammer) eingesetzt. Die Zellsuspension wurde in die untere Kammer gegeben ($4 \times 200 \mu\text{l}$) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Anschlüsse wurden mit Schläuchen mit Verschlusskappen verschlossen.

6.5 Endotheliale Aufnahme und transendothelialer Transport von Peptoiden

6.5.1 MTT-Test

Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit von 24 bzw. 72 h mit PBS gewaschen und frisches Medium hinzugefügt. Die Totkontrollen wurden mit jeweils $5 \mu\text{l}$ Triton X-100 versetzt und einige Minuten inkubiert. Danach wurden jeweils $15 \mu\text{l}$ MTT-Reagenz zugefügt und für 2 bis 3 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die



Reaktionslösung abgesaugt und die Zellen mit je 100 μl Isopropanol versetzt. Nach Schwenken der Probe zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Intensität in den einzelnen Wells mit Hilfe eines Microplate Readers bei 595 nm photometrisch bestimmt.

Der MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserunlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in das violette, wasserunlösliche Formazan (Abbildung 117).

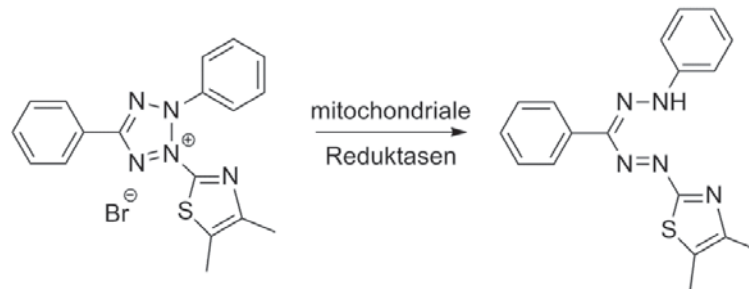


Abbildung 117: Reaktionsgleichung der Reduktion des gelben, wasserunlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT, links) in das violette, wasserunlösliche Formazan (rechts).

Die mitochondrialen Dehydrogenasen der Zellen sind in der Lage, das in die Zelle aufgenommene gelbe Tetrazoliumsalz in ein violettes Formazan umzuwandeln. Dieses kann mit geeigneten Detergentien aus den Zellen herausgelöst und photometrisch bestimmt werden. Dabei korreliert die gemessene Konzentration an Formazan mit dem Proliferationsverhalten und somit der Zellvitalität der Zellen.^[176, 177]

6.5.2 Qualitative Bestimmung der Peptoidaufnahme in HUVECs

Für Live Imaging Experimente wurden 4×10^4 Zellen in die Kammern eines ibidi μ -Slide 8 well (ibidi) in je 200 μl EGM-2 ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Etwa 30 min nach dem Ausstreuen der Zellen wurden diese mit den unterschiedlichen Peptoid-Transportern (siehe Tabelle; Strukturformeln siehe Abschnitt 4.6.2) in einer Konzentration von 5 μM für 24 h inkubiert.

EB876:	{Rh}-{XYL} _{A6} NH ₂
EB879:	{Rh}-{XYL} _{G6} NH ₂
EB896:	{Rh}-{HEX} _{A6} NH ₂
EB899:	{Rh}-{HEX} _{G6} NH ₂

Die Visualisierung zellulärer Strukturen erfolgte wie in Abschnitt 6.4.4 beschrieben.

6.5.3 Quantitative Bestimmung der Peptidaufnahme mittels LC-MS/MS

6.5.3.1 Verwendete Methode

Detektion und Quantifizierung der polykationischen Peptoid-Transporter wurde mithilfe einer Umkehrphasen Flüssigchromatographie – Elektrospray Ionisation – Tandem Massenspektrometrie Methode (reversed phase liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometric method, RP-LC-ESI-MS/MS) durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer LiChrospher RP C18 EC (endcapped) Säule (5 μm , 125 mm \times 4 mm). Als mobile Phase diente ein Wasser/Acetonitril (ACN)-Gradient (Fließmittel A 5% ACN, 0,1% TFA (Trifluoressigsäure) in ddH₂O, Fließmittel B 95% ACN, 0,1% TFA in ddH₂O). Abbildung 118 zeigt die graphische Darstellung des verwendeten Gradienten. Die Analysen wurden bei einer Flussrate von 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ sowie ein Injektionsvolumen von 10 μl durchgeführt. Die HPLC-chromatographischen Trennungen fanden bei Raumtemperatur statt. Die Massendetektion wurde im positiven Modus des Monomer-Ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ durchgeführt.

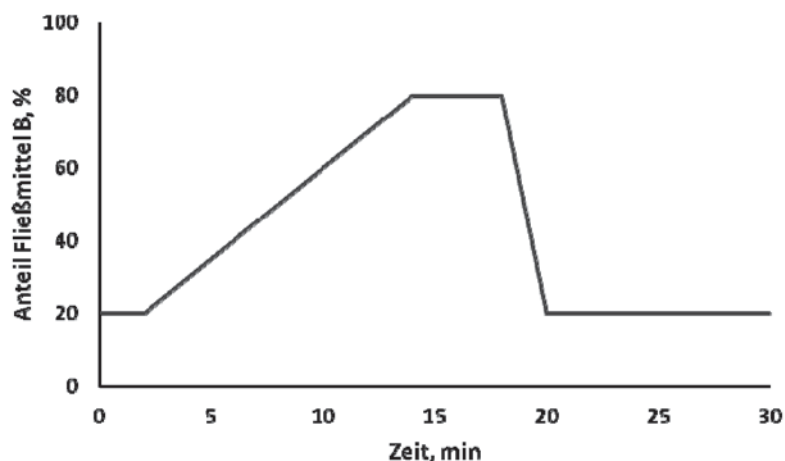


Abbildung 118: Graphische Darstellung der Gradientenmethode. Fließmittel A 5% ACN, 0,1% TFA in ddH₂O, Fließmittel B 95% ACN, 0,1% TFA in ddH₂O.

6.5.3.2 Herstellung von Zelllysaten

2×10^5 Zellen wurden in Wells von 6-Well Multiwellplatten ausgestreut und einige Stunden bis zum Anwachsen der Zellen kultiviert. Dann wurden die Zellen mit den entsprechenden Peptoiden (EB876, EB879, EB896, EB899) mit einer Konzentration von 2 μM und 5 μM für 24 h bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert und zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Um die Peptide aus den Zellen freizusetzen, mussten diese lysiert werden. Hierzu wurden die eingefrorenen Zellpellets (-80°C) in drei Zyklen jeweils 15 min in flüssigem



Stickstoff eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut. Im Anschluss daran erfolgte eine zweimal 5 minütige Behandlung im Ultraschallbad. Die Zellsuspension mit den aufgebrochenen Zellen wurde dann in 100 µl Puffer A (5% ACN, 0,1% TFA in ddH₂O) resuspendiert und bei 12.000 rpm und 8°C für 25 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und Überstand sowie Zellpellet bei -20°C bis zur Analyse eingefroren.

6.5.3.3 Auswertung

Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Analyst 1.4. Zur Berechnung der entsprechenden Peptoid-Konzentrationen wurden Kalibrierungskurven von Standardlösungen verwendet, die denselben Prozessschritten unterworfen wurden.

6.5.4 Peptoidaufnahme und -abgabe unter fluidischen Bedingungen

Diese Versuche wurden mit µ-Slide-Kanälen (Länge 50 mm, Breite 5 mm, Höhe 400 µm; ibidi) durchgeführt.

Der ibidi µ-Slide I^{0.4}-Kanal wurde zur besseren Kultivierung der HUVEC-Zellen mit Fibronectin beschichtet. Die Fibronectin-Lösung (10 µg/ml PBS) wurde in den Kanal gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Kanäle bei Raumtemperatur zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit der Zellsuspension befüllt.

Für das Experiment wurde eine Zellsuspension mit $1,8 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet. Die µ-Slide-Kanäle wurden mit 100 µl der Zellsuspension beimpft und für 30 min inkubiert. Danach wurden die Anschlüsse mit 120 µl Medium befüllt und für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe von Hellfeld-Mikroskopie konnte die Besiedelung der Kanäle mit den HUVECs beobachtet werden.

Der mit Zellen besiedelte Kanal wurde nach Anwachsen der Zellen an ein ibidi-Pumpensystem angeschlossen. Die beiden Spritzen wurden mit 8 ml Medium befüllt und das System zur Befreiung von Luftblasen durchpumpt. Es war wichtig, dass Medium und Pumpensystem am vorherigen Tag im Brutschrank inkubiert wurden, um das Auftreten von Luftblasen im System zu vermeiden.

Dann wurde der µ-Slide-Kanal angeschlossen und zu Beginn mit einer Geschwindigkeit von 3,8 ml/min (5 dyn/cm²) durchströmt. Nach etwa einer Stunde wurde die Geschwindigkeit auf 7,6 ml/min (10 dyn/cm²) erhöht, nach einer weiteren Stunde auf 15,19 ml/min (20 dyn/cm²). Mit dieser Geschwindigkeit wurde über die folgenden Tage durchströmt.

Die HUVECs im Kanal wurden mit dem Peptoid-Transporter {Rh}-{HEX}_{AG}NH₂ (EB896) in einer Konzentration von 5 µM (15 µl einer 2 mM-Lösung in 6 ml EGM-2) über 24 h unter kontinuierlichem Durchströmen (15,19 ml/min) inkubiert. Innerhalb dieser 24 h konnte die Peptoidaufnahme in den Zellen nach Waschen mit PBS mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei 561 nm beobachtet werden.



Weiterhin sollte untersucht werden, ob nach Entfernen der Peptoidlösung, die aufgenommenen Peptide wieder abgegeben oder abgebaut werden. Hierzu wurde die Peptoidlösung entfernt und mit frischem EGM-2 Medium über weitere 120 h durchströmt.

6.5.5 Einsatz des mikrofluidischen 3D-Bioreaktors

Zur Untersuchung der Peptoidaufnahme unter fluidischen Bedingungen im mikrofluidischen PC-Kanal wurden die HUVECs im Kanal wie in 6.4.1 beschrieben kultiviert. Anschließend wurde mit dem Peptoid-Transporter {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) in einer Konzentration von 2 µM (2 µl einer 2 mM-Lösung in 2 ml EGM-2) über 16 h unter kontinuierlichem Durchströmen (400 µl/min) inkubiert. Nach 16 h konnte die Peptoidaufnahme in den Zellen nach Waschen mit PBS mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei 561 nm beobachtet werden. Die Visualisierung zellulärer Strukturen (Zellkerne und Mitochondrien) erfolgte wie in 6.4.4 beschrieben.

Zur Visualisierung des transendothelialen Transports der durch das Endothel transportierten Peptide wurden humane Fibroblasten von Beginn an im unteren Kompartiment in Ko-Kultur zu den Endothelzellen im Kanal kultiviert (6.4.8.2). Im vorliegenden Experiment wurde der Peptoid-Transporter {Rh}-{HEX}_{A6}NH₂ (EB896) in einer Konzentration von 5 µM (5 µl einer 2 mM-Lösung in 2 ml EGM-2) verwendet.

6.5.6 Mechanismus der zellulären Aufnahme polykationischer Peptide

Plasmid Konstruktion

DH5α Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zufügen des pEGFP-C1 Vektors (Clontech Laboratories) wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert, bei 42°C für 1 min Hitze geschockt und erneut für 2 min auf Eis inkubiert. 1 ml LB Medium (10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton/Pepton in Wasser) wurde zu den transformierten Zellen hinzugefügt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann zu 20 ml LB Medium mit 50 µg/ml Kanamycin (Sigma) gegeben und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Plasmid-DNA der Bakterien wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) isoliert. Durch restriktiven Verdau mit den Enzymen BglII und EcoRI in Eco-Puffer (Fermentas) für 2 h bei 37°C wurde der Vektor linearisiert. Die mRNA aus U2OS Zellen (humane Osteosarkom Zellen) wurde laut Herstellerangaben mit dem RNeasy Kit (Qiagen) isoliert. Durch RT-PCR, unter Verwendung von zufälligen Primern und Taq DNA Polymerase (Fermentas), wurde die cDNA vervielfältigt. Die PCR wurde gemäß den Herstellerangaben (Fermentas) und unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initialisierungsschritt bei 95°C für 2 min; 30 Zyklen: 95°C für 30 s, 55°C für 40 s, 72°C für 45 s; finaler Elongationsschritt bei 72°C für 5 min (MyCycler Thermal CYcler, Bio-Rad, Hercules).



Folgende Primer wurden verwendet, um die Rab-codierende cDNA Fragmente zu vervielfältigen:

Rab4a:	forward	5'-AATCTCGGATCCATGTCGCAGACGGCCATGTC-3'
	reverse	5'-AATCTCGAATTCCTAACCAACCACACTCCTGAGC-3'
Rab5a:	forward	5'-AATA AGATCT ATGGCTAGTCGAGGCGCAACA-3'
	reverse	5'-TTATGAATTCGATTAGTTACTACAACACTGATT-3'
Rab7a:	forward	5'-AATCTCGGATCCATGACCTCTAGGAAGAAAGT-3'
	reverse	5'-AATCTCGAATTCTCAGCAACTGCAGCTTTCTGCCG-3'
Rab11a:	forward	5'-AATCTCGGATCCATGGGCACCCGCGACGACGA-3'
	reverse	5'-AATCTCGAATTCTTAGATGTTCTGACAGCACT-3'

Die cDNA wurde nach Verdau mit BglII und EcoRI (Fermentas) gemäß den Herstellerangaben in den pEGFP-C1 Vektor (Clontech Laboratories) subkloniert, unter Verwendung der T4 DNA Ligase (Fermentas). Alle Konstrukte wurden durch restriktiven Verdau mit BglII und EcoRI und Sequenzierung überprüft. Die resultierenden Plasmide wurden zur Transformation DH5 α kompetenter Zellen verwendet. DH5 α Zellen wurden hierzu auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Plasmids wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert, für 1 min bei 42°C Hitze geschockt und schließlich für 2 min auf Eis inkubiert. 1 ml LB Medium wurde zu den transformierten Zellen hinzugefügt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100 μ l der Zellsuspension wurde auf LB Platten mit 50 μ g/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transfektion

Um das Plasmid in HeLa Zellen zu überführen, wurde das Effectene Transfection Reagent Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben verwendet. 4×10^6 HeLa Zellen wurden in 6-Well Multiwell Platten (Greiner) ausgesät und über Nacht kultiviert. Das Hinzufügen der Enhancers zur DNA in einem definierten Puffer führt zur Kondensierung der DNA. Im nächsten Schritt wurde Effectene Reagenz zur DNA-Lösung hinzugefügt, um den kondensierten Effectene-DNA-Komplex zu bilden. Diese Lösung wurde direkt zu den in DMEM kultivierten Zellen hinzugefügt. 18 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert. 1×10^4 Zellen wurden in die Wells von 8-Well Chamber Slides (Ibidi) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden mit dem Peptoid-Transporter {Rh}-{HEX}_{6G}NH₂ (20 μ M) für 15 min inkubiert. Um die direkte Lokalisierung der Peptoide nach der Aufnahme in die Zellen zu bestimmen, wurden einzelne Zellen nach Waschen mit PBS mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie über eine Zeitspanne von 1 h beobachtet.



6.6 Materialien

Zelllinien

DH5 α (E coli-Stamm)

HeLa (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, Gebärmutterhalskrebs)

HepG2 (humane Leberkarzinomzellen)

Humane Fibroblasten (91_23)

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, humane Nabelschnurendothelzellen)

MDA MB 231 (humane Brustkrebszellen)

THP-1 (Human acute monocytic leukemia cell line, humane Monozyten)

U2OS (humane Osteosarkomazellen)

Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, 30 mm #1, 34 mm #2 (Menzel-Gläser)

Klebefolie, VHBTM, (ScotchTM)

Parafilm[®] „M“, 4 in. x 125 ft (P7793, Sigma-Aldrich[®])

Perfusion Set red, 15 cm, ID 1.6 mm, 10 ml (10962, ibidi)

Perfusion Set yellow, 15 cm, ID 0.5 mm, 2 ml (10965, ibidi)

Perfusion Set black, 50 cm, ID 0.5 mm, 2 ml (10966, ibidi)

Polycarbonatfolie PC, Belgium, Fluenz 10⁶ Ionen/cm² (it4ip)

Schlauchverbinder, gerade, PP, beidseitig für 1,6 – 2,6 mm (2-0950, neoLab)

Sterilfilter, 0,2 μ m (FP 30/0,2, Whatman Schleicher & Schuell)

Sticky-Slide I^{0.6} Luer, steril (80188, Ibidi, Martinsried)

Verschluss Luer-Konus, männlich, PP (2-1894, neoLab)

μ -Slide 8 well ibiTreat, steril (80826, Ibidi)

μ -Slide I^{0.4} Luer ibiTreat, steril (80176, Ibidi)

μ -Slide I^{0.6} Luer ibiTreat, steril (80186, Ibidi)

μ -Slide I^{0.8} Luer ibiTreat, steril (80196, Ibidi)

μ -Slide III^{0.1} uncoated, steril (80331, Ibidi)

Zellkultur Flaschen, PS, steril (CELLSTAR[®], Greiner Bio-One), 550 ml, 175 cm² (660160), 250 ml, 75 cm² (658170), 50 ml, 25 cm² (690160)

Zellkulturschalen (CELLSTAR[®], Greiner Bio-One), 145 x 20 mm (639160), 100 x 20 mm (664160), 60 x 15 mm (628160), 35 x 10 mm (627160)

Zellkultur Multiwellplatten, PS, glasklar, mit Abdeckplatte, steril (CELLSTAR[®], Greiner, Bio-One), 6-Well (657160), 12-Well (665180), 24-Well (662160), 96-Well (655180)

Chemikalien

1,2-Diaminoanthraquinone (D11582, Sigma)

Acetonitril, Chromasolv (34851, Sigma-Aldrich[®])

Araldit[®] AV 138 M/Härter HV 998 (97930, Kremer Pigmente)

BSA, Bovine Serum Albumin, Fraction V (K41-001, PAA)

CellTrackerTM Green CFDA, 1 mg (C2925, Life TechnologiesTM)



DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (41966-029, Gibco®, Life Technologies™)
DMSO, Dimethylsulfoxid (41640, Fluka)
DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-CaCl₂, -MgCl₂) (14190-094, Gibco®, Life Technologies™)
Eco Puffer (Fermantas)
EGM®-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 (CC-3156, Lonza)
EGM®-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (CC-4176, Lonza)
Essigsäure (Eisessig), 100%, 1 l (1.00063.1011, Merck)
F12, Ham's F-12 Nutrient Mix, L-Glutamine (21765-029, Gibco®, Life Technologies™)
Fibronektin, Bovine Plasma (33010-018, Life Technologies™)
Fluorescein-Natrium Salz (F6377-100G, Sigma-Aldrich)
FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres, 1 µm, Nile red fluorescent (535/575) (Molecular Probes®, F-8819, Life Technologies™)
FKS, Newborn Calf Serum, Heat-inactivated, 500 ml (26010-074, Gibco®, Life Technologies™)
Hefeextrakt (2363.2, Roth)
Hoechst 33342, bisBenzimidazole H 33342 Trihydrochloride (B2261, Sigma-Aldrich)
Isopropanol, (2-Propanol), zur Analyse, 1 l (1.09634.1011, Merck)
Kanamycin-Sulfat (K1377, Sigma)
Kollagen (Ratte), Lyophilisat, steril (11179179001, Roche Applied Science)
LysoSensor™ Green DND-153 (L7534, Life Technologies™)
Methanol, 1 l (106035, Merck)
MitoTracker® Green FM (M-7514, Life Technologies™)
Natriumchlorid (3957.1, Roth)
Penicillin-Streptomycin, liquid (10,000 units of penicillin/ml, 10,000 µg of streptomycin/ml) (15140-122, Gibco®, Life Technologies™)
Rhodamin Phalloidin (R415, Molecular Probes®, Life Technologies™)
RPMI 1640 Medium (1x), liquid (21875-034, Gibco®, Life Technologies™)
Silikon Sylgard® 184 Silikon Elastomer Kit (Dow Corning)
TNF-α, human, recombinant (C-63719, Promokine)
Trifluoressigsäure (91699, Fluka)
Triton X-100 (37240, Serva)
Trypsin-EDTA, 0,25% (25200-056, Gibco®, Life Technologies™)
Trypton/Pepton (8952.2, Roth)
Tween 20 viscous liquid (P1379, Sigma)

Antikörper

Anti-Vinculin-Antikörper, monoklonal, produziert in Maus (V9131, Sigma)
Anti-VE-Cadherin (C-19), polyklonal IgG, produziert in Ziege (SC-6458, Santa Cruz Biotechnology)
Anti-Maus Alexa488, IgG, produziert in Ziege (A11017, Life Technologies™)
Anti-Ziege Alexa488, IgG, produziert in Kaninchen (A11078, Life Technologies™)



Enzyme

BglIII (Fermentas)

EcoRI Enzym (Fermentas)

T4 DNA Ligase (Fermentas)

Taq DNA Polymerase (Fermentas)

Kits

Effectene Transfection Reagent Kit (Qiagen)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

RNeasy Kit (Qiagen)

Plasmide

pEGFP-C1 Vektor (Clontech Laboratories)



7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion (Aufnahme, Verteilung, Abbau, Ausscheidung)
ALMF	Advanced Light Microscopy Facility
BSA	Bovine Serum Albumin
CCV	Clathrin-coated vesicles (Clathrin-gebundene Vesikel)
CFD	Computational fluid dynamics (numerische Strömungsmechanik)
CPP	Cell-Penetrating Peptide (Zell-penetrierendes Peptid)
CPPo	Cell-Penetrating Peptoid (Zell-penetrierendes Peptoid)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COP	Cycloolefin
DAA	1,2-Diaminoanthraquinon
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelial Cells (Endothelzellen)
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor (von dem Endothel stammender, Gefäßmuskulatur-erschaffender Faktor)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGM-2	Endothelial Cell Growth Medium-2
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ESI	Electrospray Ionization (Elektrospray Ionisation)
EZM	Extrazellulärmatrix
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GFP	Green Fluorescent Protein (Grün Fluoreszierendes Protein)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HTS	High Throughput Screen (Hochdurchsatz-Screening)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (humane Nabelschnurendothelzellen)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IL-1	Interleukin-1
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids



NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PC	Polycarbonat
PCAM-1	Platelet/endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (Blutplättchen/Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1)
PDMS	Poly-(dimethylsiloxan)
PFA	Paraformaldehyd
PGI ₂	Prostazyklin
PIV	Particle Image Velocimetry
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	Photomultiplier Tube (Photomultiplier-Röhre)
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAB	Ras-related in brain
RE	Reynoldszahl
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reverse Phase (Umkehrphase)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SMART	Substrate Modification And Replication by Thermoforming
SNARE	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (löslicher <i>N</i> -Ethylmaleimid-sensitiver-Faktor Bindungsrezeptor)
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TZ	Triazol
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
VE	Vascular Endothelium (vaskuläres Endothel)

8 LITERATUR

- [1] M. H. Wu, S. B. Huang, G. B. Lee, *Lab Chip* **2010**, *10*, 939.
- [2] C. J. Evans, R. M. Phillips, P. F. Jones, P. M. Loadman, B. D. Sleeman, C. J. Twelves, S. W. Smye, *Journal of Theoretical Biology* **2009**, *257*, 598.
- [3] A. Chandra, S. Barillas, A. Suliman, N. Angle, *J Biochem Biophys Methods* **2007**, *70*, 329.
- [4] P. D. Benya, J. D. Shaffer, *Cell* **1982**, *30*, 215.
- [5] B. Altmann, S. Giselbrecht, K. F. Weibezahn, A. Welle, E. Gottwald, *Biomed Mater* **2008**, *3*, 034120.
- [6] J. Deutsch, D. Motlagh, B. Russell, T. A. Desai, *J Biomed Mater Res* **2000**, *53*, 267.
- [7] R. K. Jain, *Cancer Metastasis Rev* **1987**, *6*, 559.
- [8] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J Control Release* **2000**, *65*, 271.
- [9] A. John, G. Tuszyński, *Pathol Oncol Res* **2001**, *7*, 14.
- [10] M. Schmitt, A. Horbach, R. Kubitz, A. Frilling, D. Haussinger, *J Hepatol* **2004**, *41*, 274.
- [11] C. T. Mierke, *Mol Biosyst* **2012**, *8*, 1639.
- [12] J. M. Lewalle, K. Bajou, J. Desreux, M. Mareel, E. Dejana, A. Noel, J. M. Foidart, *Experimental Cell Research* **1997**, *237*, 347.
- [13] J. T. Borenstein, M. M. Tupper, P. J. Mack, E. J. Weinberg, A. S. Khalil, J. Hsiao, G. Garcia-Cardena, *Biomed Microdevices* **2010**, *12*, 71.
- [14] S. Sheikh, G. E. Rainger, Z. Gale, M. Rahman, G. B. Nash, *Blood* **2003**, *102*, 2828.
- [15] M. F. Flessner, *Perit Dial Int* **2008**, *28*, 6.
- [16] G. J. Tortora, B. H. Derrickson, *Anatomie und Physiologie*, WILEY-VCH Verlag GmbH & CO. KGaA, Weinheim, **2006**.
- [17] F. Geisler, DocCheck Pictures, **2012**.
- [18] G. Eisenbrand, M. Metzler, F. J. Hennecke, *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**.
- [19] B. Rippe, B. I. Rosengren, O. Carlsson, D. Venturoli, *J Vasc Res* **2002**, *39*, 375.
- [20] Y. Wallez, P. Huber, *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 794.
- [21] L. Leach, *J Anat* **2002**, *200*, 599.
- [22] J. F. Lee, Q. Zeng, H. Ozaki, L. C. Wang, A. R. Hand, T. Hla, E. Wang, M. J. Lee, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 29190.
- [23] C. Michiels, *J Cell Physiol* **2003**, *196*, 430.
- [24] D. C. Felmeden, G. Y. Lip, *Expert Opin Investig Drugs* **2005**, *14*, 1319.
- [25] D. B. Cines, E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A. M. Schmidt, D. M. Stern, *Blood* **1998**, *91*, 3527.
- [26] Z. Shulman, V. Shinder, E. Klein, V. Grabovsky, O. Yeger, E. Geron, A. Montresor, M. Bolomini-Vittori, S. W. Feigelson, T. Kirchhausen, C. Laudanna, G. Shakhar, R. Alon, *Immunity* **2009**, *30*, 384.
- [27] J. S. Pober, W. C. Sessa, *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 803.
- [28] J. M. Harlan, R. K. Winn, *Critical Care Medicine* **2002**, *30*, S214.
- [29] T. Carlos, N. Kovach, B. Schwartz, M. Rosa, B. Newman, E. Wayner, C. Benjamin, L. Osborn, R. Lobb, J. Harlan, *Blood* **1991**, *77*, 2266.
- [30] J. M. Harlan, *Blood* **1985**, *65*, 513.
- [31] Z. Mamdouh, G. E. Kreitzer, W. A. Muller, *J Exp Med* **2008**, *205*, 951.
- [32] B. Engelhardt, H. Wolburg, *Eur J Immunol* **2004**, *34*, 2955.



- [33] S. Srigunapalan, C. Lam, A. R. Wheeler, C. A. Simmons, *Biomicrofluidics* **2011**, *5*, 13409.
- [34] A. M. Malek, G. H. Gibbons, V. J. Dzau, S. Izumo, *J Clin Invest* **1993**, *92*, 2013.
- [35] A. M. Malek, S. L. Alper, S. Izumo, *JAMA* **1999**, *282*, 2035.
- [36] J. J. Paszkowiak, A. Dardik, *Vasc Endovascular Surg* **2003**, *37*, 47.
- [37] R. Ross, *Annu Rev Physiol* **1995**, *57*, 791.
- [38] R. W. Wissler, D. Vesselinovitch, *Am J Cardiol* **1983**, *52*, 2A.
- [39] J. Ando, K. Yamamoto, *Circ J* **2009**, *73*, 1983.
- [40] B. Langille, S. Adamson, *Circulation Research* **1981**, *48*, 481.
- [41] R. M. Nerem, M. J. Levesque, J. F. Cornhill, *J Biomech Eng* **1981**, *103*, 172.
- [42] K. Katoh, Y. Kano, S. Ookawara, *Vasc Health Risk Manag* **2008**, *4*, 1273.
- [43] P. Naumanen, P. Lappalainen, P. Hotulainen, *J Microsc* **2008**, *231*, 446.
- [44] P. Hotulainen, P. Lappalainen, *J Cell Biol* **2006**, *173*, 383.
- [45] H. Wessells, T. H. Teal, K. Engel, C. J. Sullivan, B. Gallis, K. B. Tran, K. Chitale, *BJU Int* **2006**, *97*, 1047.
- [46] L. K. Chin, J. Q. Yu, Y. Fu, T. Yu, A. Q. Liu, K. Q. Luo, *Lab Chip* **2011**, *11*, 1856.
- [47] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochem J* **2004**, *377*, 159.
- [48] A. Spang, *Biol Chem* **2009**, *390*, 753.
- [49] H. Stenmark, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10*, 513.
- [50] A. Benmerah, *Curr Biol* **2004**, *14*, R314.
- [51] G. J. Doherty, H. T. McMahon, *Annu Rev Biochem* **2009**, *78*, 857.
- [52] G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees, J. Temsamani, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 31192.
- [53] T. Soldati, M. Schliwa, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 897.
- [54] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochemical Journal* **2004**, *377*, 159.
- [55] M. Jovic, M. Sharma, J. Rahajeng, S. Caplan, *Histol Histopathol* **2010**, *25*, 99.
- [56] M. R. Schmidt, V. Haucke, *Biol Cell* **2007**, *99*, 333.
- [57] G. W. Gould, J. Lippincott-Schwartz, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10*, 287.
- [58] N. Touchot, P. Chardin, A. Tavitian, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 8210.
- [59] H. Stenmark, V. M. Olkkonen, *Genome Biol* **2001**, *2*, REVIEWS3007.
- [60] M. Zerial, H. McBride, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**, *2*, 107.
- [61] S. Afonin, A. Frey, S. Bayerl, D. Fischer, P. Wadhvani, S. Weinkauf, A. S. Ulrich, *Chemphyschem* **2006**, *7*, 2134.
- [62] F. Madani, S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki, A. Graslund, *J Biophys*, **2011**, 414729.
- [63] T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 2437.
- [64] S. R. Schwarze, S. F. Dowdy, *Trends in Pharmacological Sciences* **2000**, *21*, 45.
- [65] P. Wadhvani, J. Reichert, J. Burck, A. S. Ulrich, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2012**, *41*, 177.
- [66] J. S. Wadia, S. F. Dowdy, *Curr Opin Biotechnol* **2002**, *13*, 52.
- [67] B. Christiaens, S. Symoens, S. Verheyden, Y. Engelborghs, A. Joliot, A. Prochiantz, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, B. Vanloo, *Eur J Biochem* **2002**, *269*, 2918.
- [68] N. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai, G. C. Wong, *FEBS Lett* **2010**, *584*, 1806.
- [69] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *53*, 675.
- [70] C. Palm-Apergi, P. Lonn, S. F. Dowdy, *Molecular Therapy* **2012**, *20*, 695.
- [71] G. P. H. Dietz, M. Bahr, *Molecular and Cellular Neuroscience* **2004**, *27*, 85.
- [72] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat Biotechnol* **2001**, *19*, 1173.
- [73] J. P. Gratton, J. Yu, J. W. Griffith, R. W. Babbitt, R. S. Scotland, R. Hickey, F. J. Giordano, W. C. Sessa, *Nat Med* **2003**, *9*, 357.



- [74] B. Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 637.
- [75] P. Wunderbaldinger, L. Josephson, R. Weissleder, *Bioconjug Chem* **2002**, *13*, 264.
- [76] Ü. Langel, *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*, Springer-Verlag GmbH, **2010**.
- [77] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 13003.
- [78] N. Umezawa, M. A. Gelman, M. C. Haigis, R. T. Raines, S. H. Gellman, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 368.
- [79] K. Eggenberger, E. Birtalan, T. Schroder, S. Brase, P. Nick, *Chembiochem* **2009**, *10*, 2504.
- [80] T. Schroder, K. Schmitz, N. Niemeier, T. S. Balaban, H. F. Krug, U. Schepers, S. Brase, *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 342.
- [81] E. A. Goun, T. H. Pillow, L. R. Jones, J. B. Rothbard, P. A. Wender, *Chembiochem* **2006**, *7*, 1497.
- [82] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 2657.
- [83] R. N. Zuckermann, T. Kodadek, *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **2009**, *11*, 299.
- [84] T. Schroder, N. Niemeier, S. Afonin, A. S. Ulrich, H. F. Krug, S. Brase, *J Med Chem* **2008**, *51*, 376.
- [85] T. Uno, E. Beausoleil, R. A. Goldsmith, B. H. Levine, R. N. Zuckermann, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 1475.
- [86] H. Andersson, A. van den Berg, *Lab Chip* **2004**, *4*, 98.
- [87] A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, J. P. Vacanti, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 2480.
- [88] J. T. Borenstein, H. Terai, K. R. King, E. J. Weinberg, M. R. Kaazempur-Mofrad, J. P. Vacanti, *Biomedical Microdevices* **2002**, *4*, 167.
- [89] P. S. Dittrich, A. Manz, *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5*, 210.
- [90] J. H. Yeon, J. K. Park, *Biochip Journal* **2007**, *1*, 17.
- [91] R. Portner, S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz, N. M. Meenen, *J Biosci Bioeng* **2005**, *100*, 235.
- [92] M. Ikeuchi, K. Ikuta, in *Transducers & Eurosensors '07*, Lyon, France, **2007**, pp. 1337.
- [93] L. G. Griffith, G. Naughton, *Science* **2002**, *295*, 1009.
- [94] J. P. Vacanti, R. Langer, *Lancet* **1999**, *354 Suppl 1*, S132.
- [95] S. N. Bhatia, M. L. Yarmush, M. Toner, *Methods Mol Med* **1999**, *18*, 349.
- [96] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. Schueller, G. M. Whitesides, *Anal Chem* **1998**, *70*, 4974.
- [97] B. J. Papenburg, L. Vogelaar, L. A. Bolhuis-Versteeg, R. G. Lammertink, D. Stamatialis, M. Wessling, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1998.
- [98] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Y. Jiang, D. E. Ingber, *Annual Review of Biomedical Engineering* **2001**, *3*, 335.
- [99] Y. N. Xia, G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie-International Edition* **1998**, *37*, 551.
- [100] Y. N. Xia, G. M. Whitesides, *Annual Review of Materials Science* **1998**, *28*, 153.
- [101] J. Shao, L. Wu, J. Wu, Y. Zheng, H. Zhao, X. Lou, Q. Jin, J. Zhao, *Biomed Microdevices* **2009**.
- [102] J. Shao, L. Wu, J. Wu, Y. Zheng, H. Zhao, Q. Jin, J. Zhao, *Lab Chip* **2009**, *9*, 3118.



- [103] J. W. Song, S. P. Cavnar, A. C. Walker, K. E. Luker, M. Gupta, Y. C. Tung, G. D. Luker, S. Takayama, *PLoS One* **2009**, *4*, e5756.
- [104] R. Lima, S. Wada, S. Tanaka, M. Takeda, K. Tsubota, T. Ishikawa, T. Yamaguchi, *World congress on medical physics and biomedical engineering. Berlin Heidelberg: Springer* **2006**, 283.
- [105] L. K. Fiddes, N. Raz, S. Srigunapalan, E. Tumarkan, C. A. Simmons, A. R. Wheeler, E. Kumacheva, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3459.
- [106] W. W. Yan, Y. Liu, B. M. Fu, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **2010**, *9*, 629.
- [107] R. Lima, S. Wada, S. Tanaka, M. Takeda, T. Ishikawa, K. Tsubota, Y. Imai, T. Yamaguchi, *Biomed Microdevices* **2008**, *10*, 153.
- [108] M. D. Frame, I. H. Sarelius, *Microcirculation* **2000**, *7*, 419.
- [109] M. B. Esch, D. J. Post, M. L. Shuler, T. Stokol, *Tissue Eng Part A* **2011**.
- [110] I. Hebeiss, R. Truckenmuller, S. Giselbrecht, U. Schepers, *Lab Chip* **2012**, *12*, 829.
- [111] K. R. King, C. C. J. Wang, M. R. Kaazempur-Mofrad, J. P. Vacanti, J. T. Borenstein, *Advanced Materials* **2004**, *16*, 2007.
- [112] A. Abbott, *Nature* **2003**, *424*, 870.
- [113] N. Sadr, M. Zhu, T. Osaki, T. Kakegawa, Y. Yang, M. Moretti, J. Fukuda, A. Khademhosseini, *Biomaterials* **2011**, *32*, 7479.
- [114] B. A. Justice, N. A. Badr, R. A. Felder, *Drug Discov Today* **2009**, *14*, 102.
- [115] G. D. Prestwich, *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 139.
- [116] A. D. van der Meer, A. A. Poot, M. H. Duits, J. Feijen, I. Vermes, *J Biomed Biotechnol* **2009**, *2009*, 823148.
- [117] G. Benton, J. George, H. K. Kleinman, I. P. Arnaoutova, *J Cell Physiol* **2009**, *221*, 18.
- [118] S. Giselbrecht, T. Gietzelt, E. Gottwald, C. Trautmann, R. Truckenmuller, K. F. Weibezahn, A. Welle, *Biomed Microdevices* **2006**, *8*, 191.
- [119] R. Truckenmuller, S. Giselbrecht, C. van Blitterswijk, N. Dambrowsky, E. Gottwald, T. Mappes, A. Rolletschek, V. Saile, C. Trautmann, K. F. Weibezahn, A. Welle, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1570.
- [120] R. Truckenmuller, Z. Rummeler, T. Schaller, K. Schomburg, *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2002**, *12*, 375.
- [121] S. Giselbrecht, E. Gottwald, R. Truckenmueller, C. Trautmann, A. Welle, A. Guber, V. Saile, T. Gietzelt, K. F. Weibezahn, *J Vis Exp* **2008**.
- [122] R. Truckenmuller, S. Giselbrecht, M. Escalante-Marun, M. Groenendijk, B. Papenburg, N. Rivron, H. Unadkat, V. Saile, V. Subramaniam, A. van den Berg, C. van Blitterswijk, M. Wessling, J. de Boer, D. Stamatialis, *Biomed Microdevices* **2011**.
- [123] R. Truckenmuller, S. Giselbrecht, N. Rivron, E. Gottwald, V. Saile, A. van den Berg, M. Wessling, C. van Blitterswijk, *Adv Mater* **2011**, *23*, 1311.
- [124] C. J. Evans, R. M. Phillips, P. F. Jones, P. M. Loadman, B. D. Sleeman, C. J. Twelves, S. W. Smye, *J Theor Biol* **2009**, *257*, 598.
- [125] C. Colliex, *Elektronenmikroskopie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2008**.
- [126] R. K. Ward, S. Mungall, J. Carter, R. H. Clothier, *Toxicol In Vitro* **1997**, *11*, 761.
- [127] J. Martin, P. Malreddy, T. Iwamoto, L. C. Freeman, H. J. Davidson, J. M. Tomich, B. D. Schultz, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2009**, *50*, 3337.
- [128] I. Hebeiss, S. Srigunapalan, O. Chebotarev, L. Leng, M. W. L. Watson, R. Truckenmueller, A. R. Wheeler, A. Guenther, C. A. Simmons, S. Giselbrecht, U. Schepers, *Nature Immunology* **2012**, submitted.



- [129] R. D. Keane, R. J. Adrian, *Applied Scientific Research* **1992**, *49*, 191.
- [130] R. J. Adrian, *Annual Review of Fluid Mechanics* **1991**, *23*, 261.
- [131] P. Hochareon, K. B. Manning, A. A. Fontaine, J. M. Tarbell, S. Deutsch, *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* **2004**, *126*, 430.
- [132] Zeiss, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, **2012**.
- [133] A. Waldbaur, B. Waterkotte, K. Schmitz, B. E. Rapp, *Small* **2012**, *8*, 1570.
- [134] E. Birtalan, *Chemische Biologie von Molekularen Transportern auf Peptoid-Basis*, Logos Berlin, **2010**.
- [135] E. Birtalan, B. Rudat, D. K. Kolmel, D. Fritz, S. B. Vollrath, U. Schepers, S. Brase, *Biopolymers* **2011**, *96*, 694.
- [136] B. Rudat, E. Birtalan, S. B. Vollrath, D. Fritz, D. K. Kolmel, M. Nieger, U. Schepers, K. Mullen, H. J. Eisler, U. Lemmer, S. Brase, *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 4457.
- [137] R. Duncan, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 347.
- [138] H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, *J Control Release* **2001**, *74*, 47.
- [139] Y. Matsumura, K. Kataoka, *Cancer Sci* **2009**, *100*, 572.
- [140] M. J. Vicent, R. Duncan, *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*, 39.
- [141] A. Gunther, S. Yasotharan, A. Vagaon, C. Lochovsky, S. Pinto, J. Yang, C. Lau, J. Voigtlaender-Bolz, S. S. Bolz, *Lab Chip* **2010**, *10*, 2341.
- [142] A. Shamloo, N. Ma, M. M. Poo, L. L. Sohn, S. C. Heilshorn, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1292.
- [143] M. Lovett, K. Lee, A. Edwards, D. L. Kaplan, *Tissue Eng Part B Rev* **2009**, *15*, 353.
- [144] J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *Nature* **2006**, *442*, 403.
- [145] P. J. Hung, P. J. Lee, P. Sabounchi, N. Aghdam, R. Lin, L. P. Lee, *Lab Chip* **2005**, *5*, 44.
- [146] D. B. Weibel, P. Garstecki, G. M. Whitesides, *Curr Opin Neurobiol* **2005**, *15*, 560.
- [147] S. H. Ma, L. A. Lepak, R. J. Hussain, W. Shain, M. L. Shuler, *Lab Chip* **2005**, *5*, 74.
- [148] J. G. Fernandez, C. A. Mills, J. Samitier, *Small* **2009**, *5*, 614.
- [149] M. They, A. Jimenez-Dalmaroni, V. Racine, M. Bornens, F. Julicher, *Nature* **2007**, *447*, 493.
- [150] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Science* **1997**, *276*, 1425.
- [151] M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, *Biotechnol Bioeng* **2009**, *103*, 655.
- [152] A. M. Kloxin, A. M. Kasko, C. N. Salinas, K. S. Anseth, *Science* **2009**, *324*, 59.
- [153] C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nat Mater* **2009**, *8*, 659.
- [154] R. C. Dutta, A. K. Dutta, *Biotechnol Adv* **2009**, *27*, 334.
- [155] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 2004.
- [156] H. Hosseinkhani, M. Hosseinkhani, S. Hattori, R. Matsuoka, N. Kawaguchi, *J Biomed Mater Res A* **2010**, *94*, 1.
- [157] M. Ikeuchi, R. Tane, K. Ikuta, *Biomed Microdevices* **2012**, *14*, 35.
- [158] A. Subramanian, U. M. Krishnan, S. Sethuraman, *Biomed Mater* **2011**, *6*, 025004.
- [159] C. F. Dewey, S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, P. F. Davies, *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* **1981**, *103*, 177.
- [160] A. J. Wong, T. D. Pollard, I. M. Herman, *Science* **1983**, *219*, 867.
- [161] A. R. Wechezak, R. F. Viggers, L. R. Sauvage, *Laboratory Investigation* **1985**, *53*, 639.
- [162] G. M. Buga, M. E. Gold, J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, *Hypertension* **1991**, *17*, 187.
- [163] R. Korenaga, J. Ando, H. Tsuboi, W. D. Yang, I. Sakuma, T. Toyooka, A. Kamiya, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, *198*, 213.
- [164] R. E. Gerszten, E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. Gimbrone, Jr., A. D. Luster, F. W. Lusinskas, A. Rosenzweig, *Nature* **1999**, *398*, 718.



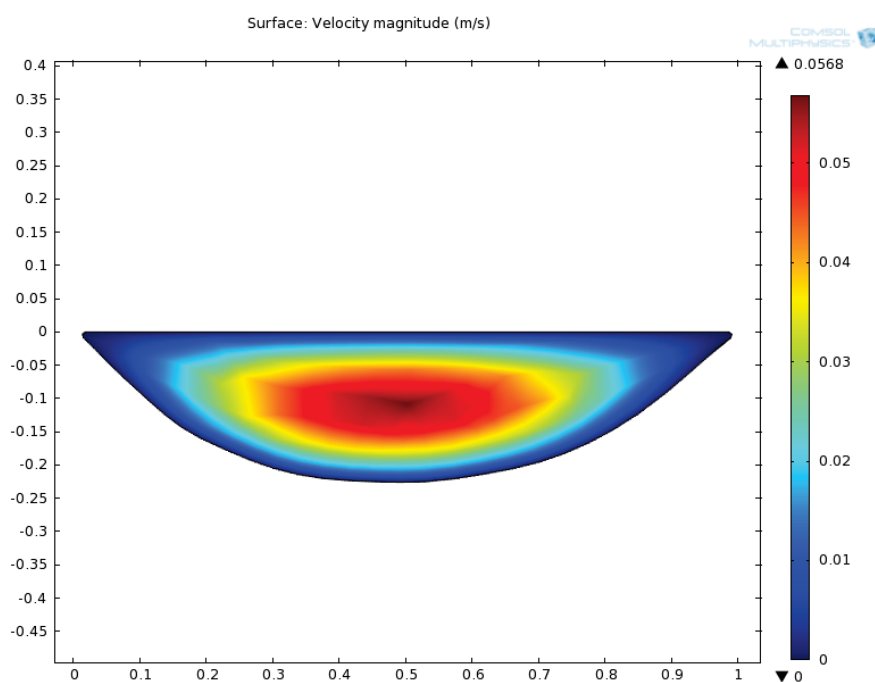
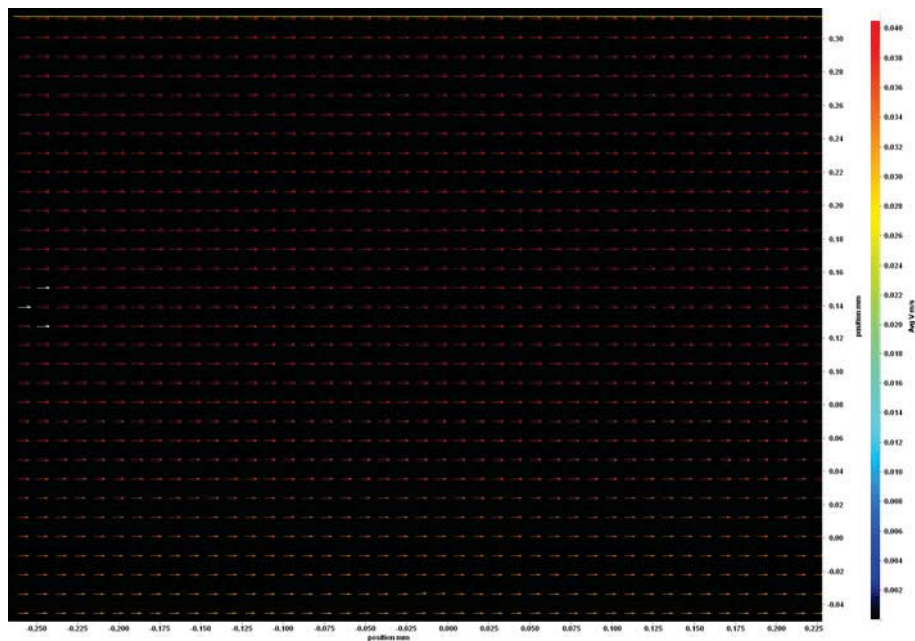
- [165] A. Woodfin, M. B. Voisin, M. Beyrau, B. Colom, D. Caille, F. M. Diapouli, G. B. Nash, T. Chavakis, S. M. Albelda, G. E. Rainger, P. Meda, B. A. Imhof, S. Nourshargh, *Nat Immunol* **2011**, *12*, 761.
- [166] C. V. Carman, T. A. Springer, *J Cell Biol* **2004**, *167*, 377.
- [167] S. Nourshargh, F. M. Marelli-Berg, *Trends in Immunology* **2005**, *26*, 157.
- [168] P. E. Rautou, A. S. Leroyer, B. Ramkhelawon, C. Devue, D. Duflaut, A. C. Vion, G. Nalbone, Y. Castier, G. Leseche, S. Lehoux, A. Tedgui, C. M. Boulanger, *Circ Res* **2011**, *108*, 335.
- [169] M. J. VanWijk, E. VanBavel, A. Sturk, R. Nieuwland, *Cardiovascular Research* **2003**, *59*, 277.
- [170] J. M. Holub, H. Jang, K. Kirshenbaum, *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 1497.
- [171] S. W. Jones, R. Christison, K. Bundell, C. J. Voyce, S. M. V. Brockbank, P. Newham, M. A. Lindsay, *British Journal of Pharmacology* **2005**, *145*, 1093.
- [172] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, *Traffic* **2007**, *8*, 848.
- [173] M. Lindgren, U. Langel, *Methods Mol Biol* **2011**, *683*, 3.
- [174] E. W. Young, M. W. Watson, S. Srigunapalan, A. R. Wheeler, C. A. Simmons, *Anal Chem* **2010**, *82*, 808.
- [175] M. J. Marin, P. Thomas, V. Fabregat, S. V. Luis, D. A. Russell, F. Galindo, *Chembiochem*, *12*, 2471.
- [176] T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55.
- [177] M. V. Berridge, A. S. Tan, *Arch Biochem Biophys* **1993**, *303*, 474.

9 ANHANG

I. PIV-, COMSOL-Daten (Abschnitt 4.5.3)

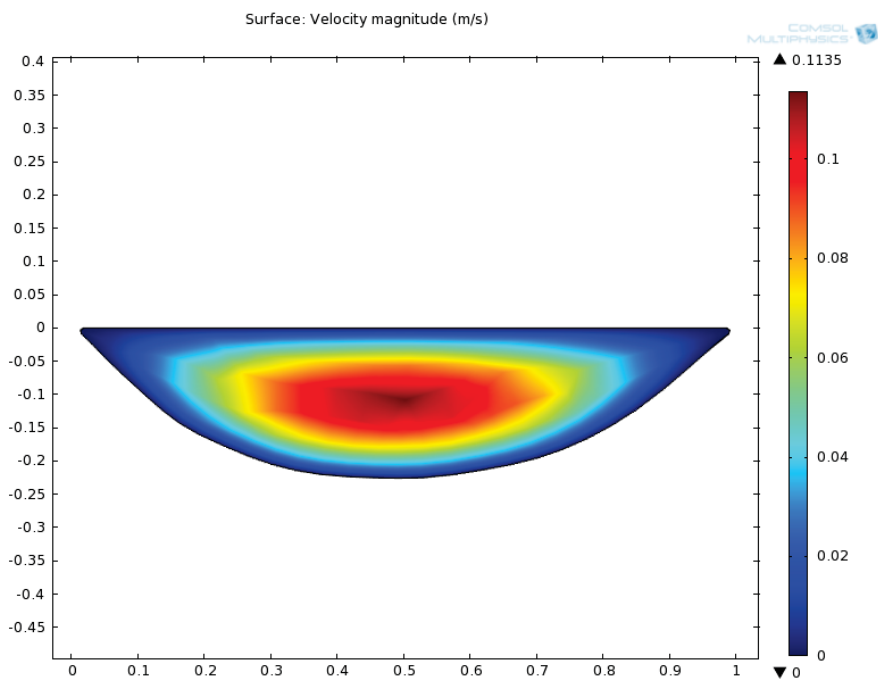
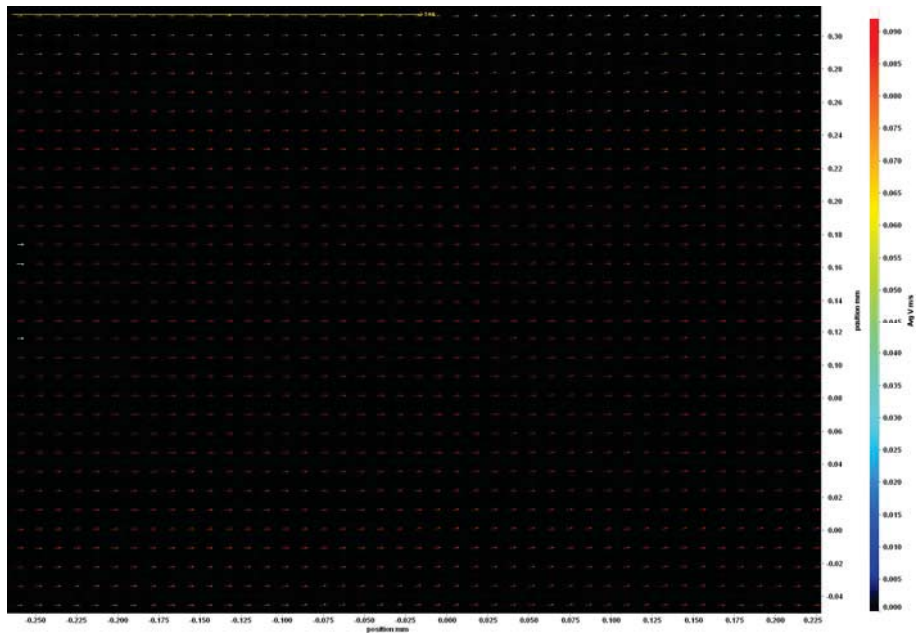
Beispielhaft sind die Flussprofile der verschiedenen Kanalgeometrien bei der jeweils höchsten gemessenen Geschwindigkeit dargestellt (oben PIV, unten Simulation COMSOL):

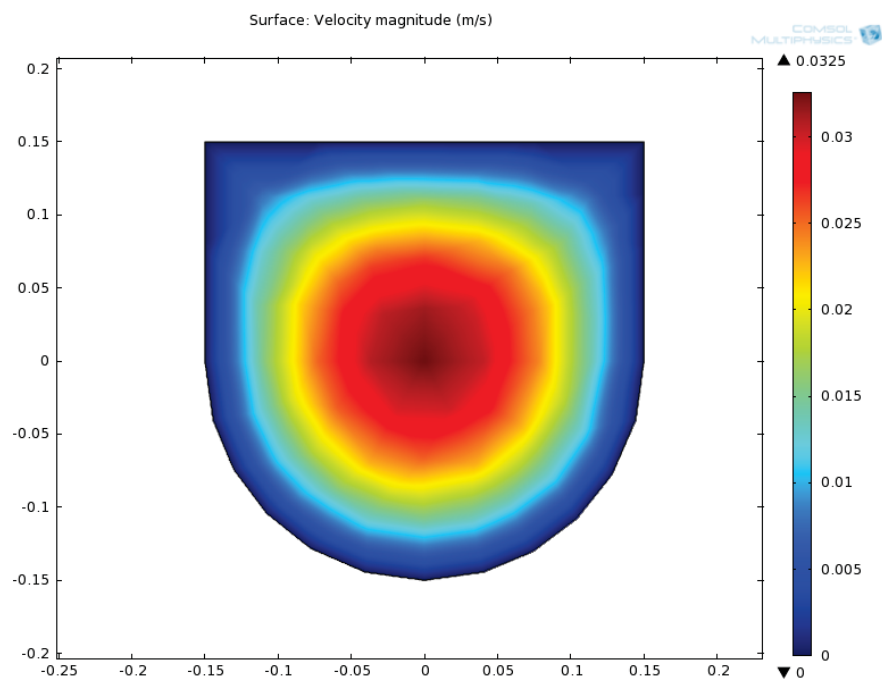
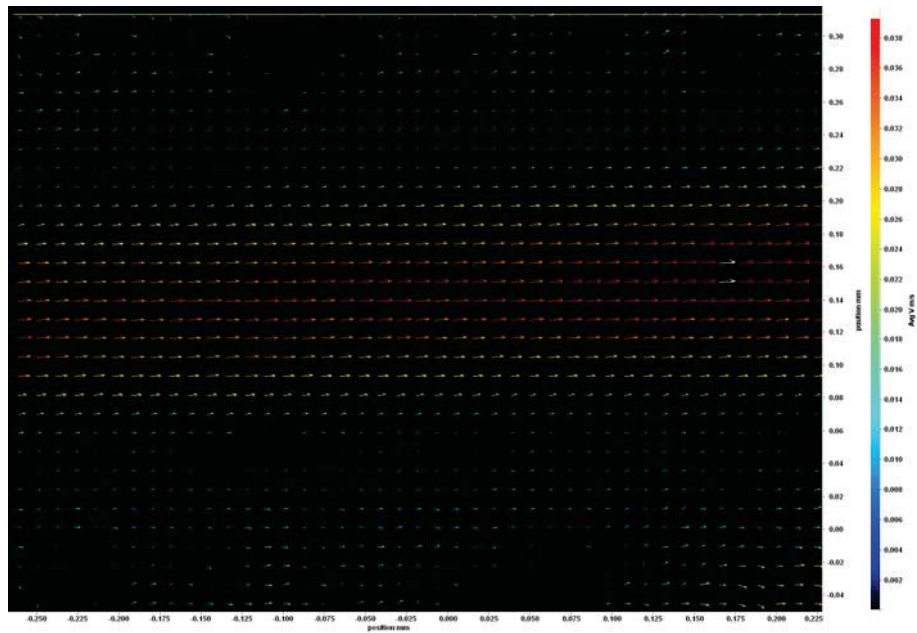
1 mm Kanal, gerade, 250 $\mu\text{l}/\text{min}$





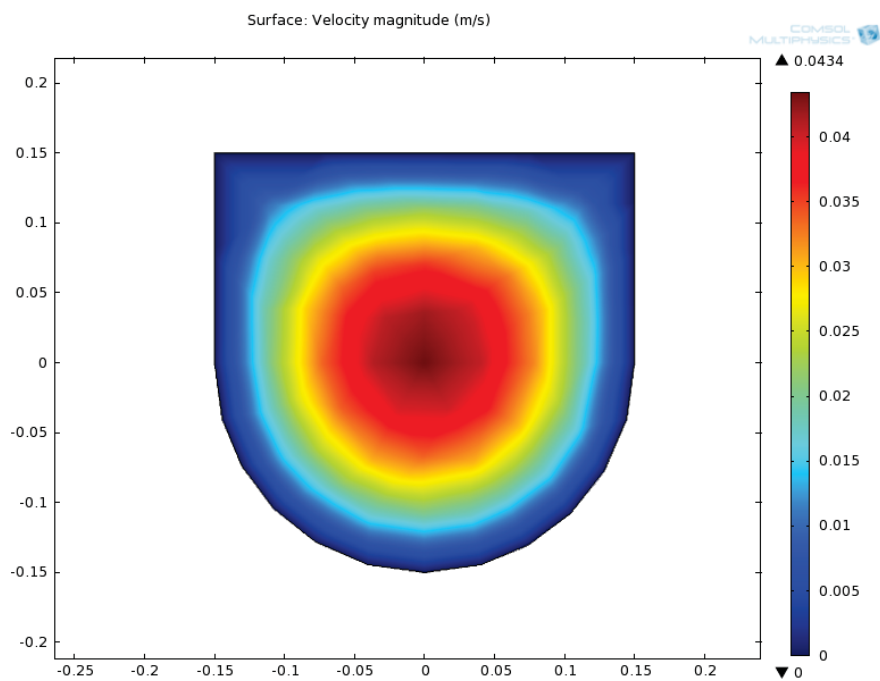
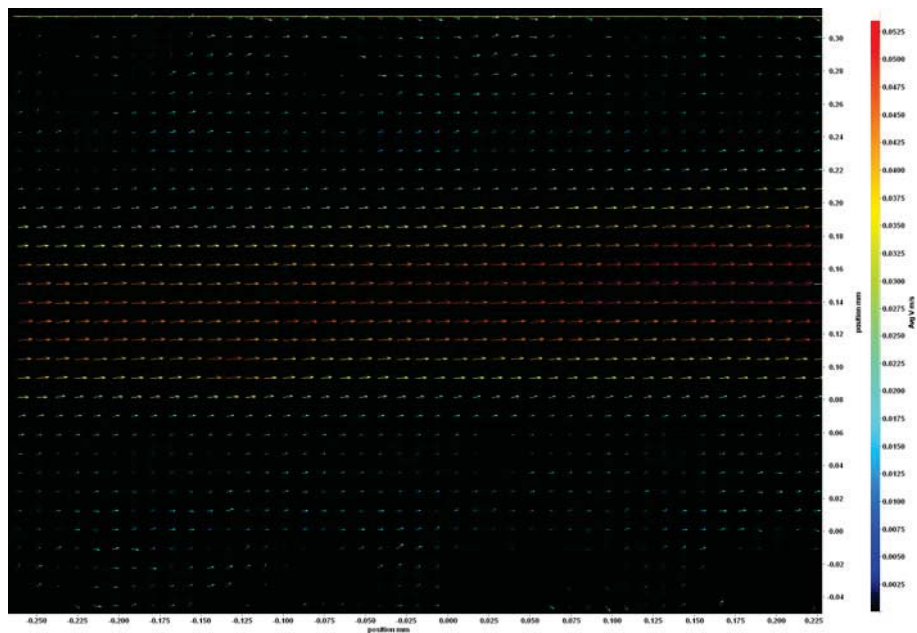
1 mm Kanal, gerade, 500 $\mu\text{l}/\text{min}$

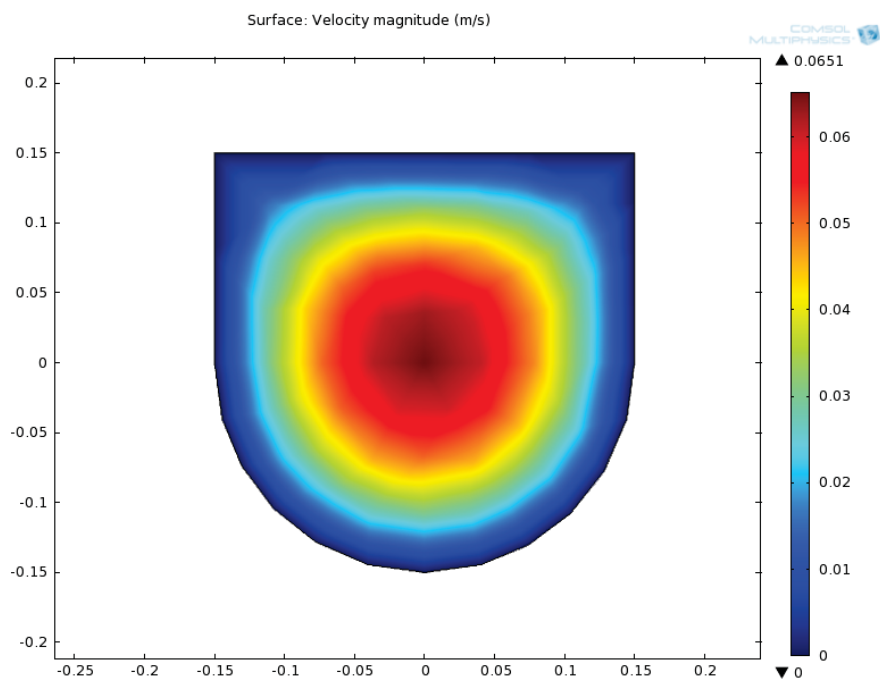
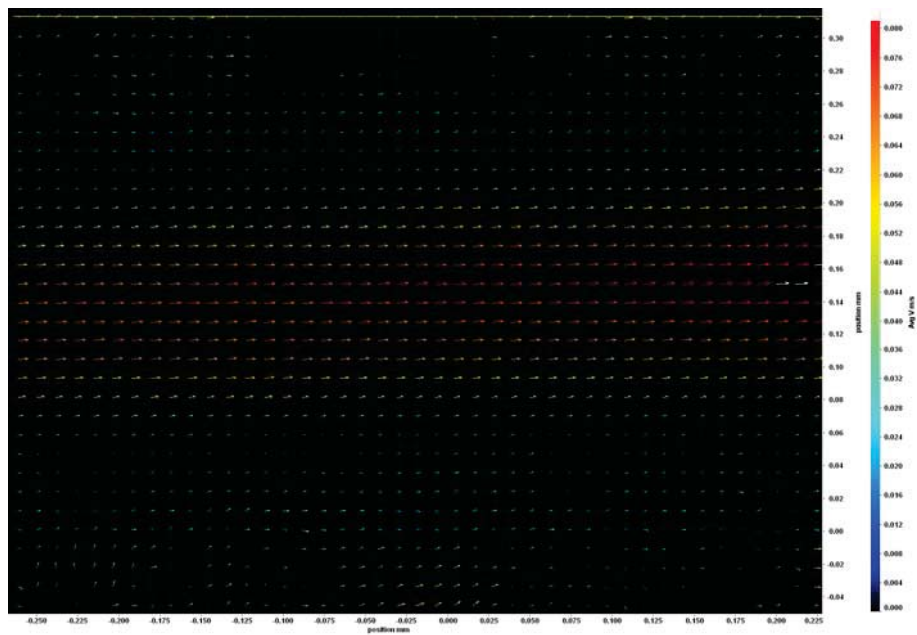


300 μm Kanal, gerade, 75 $\mu\text{l}/\text{min}$ 



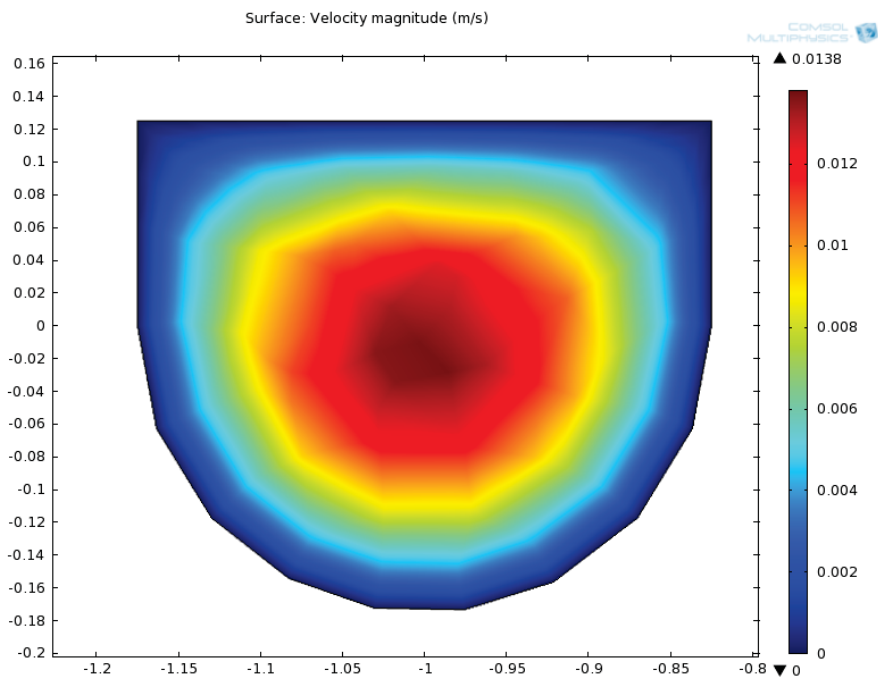
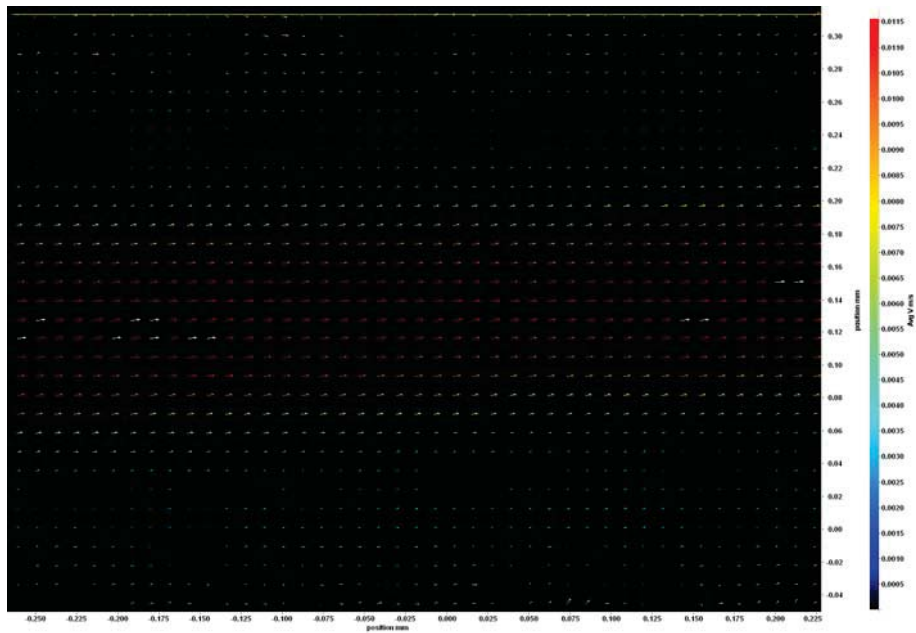
300 µm Kanal, gerade, 100 µl/min



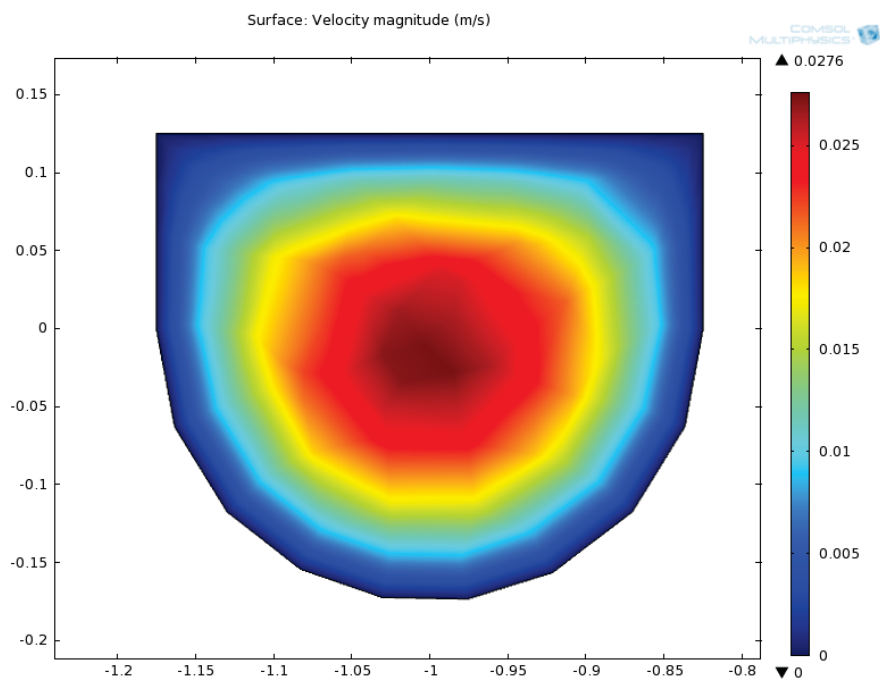
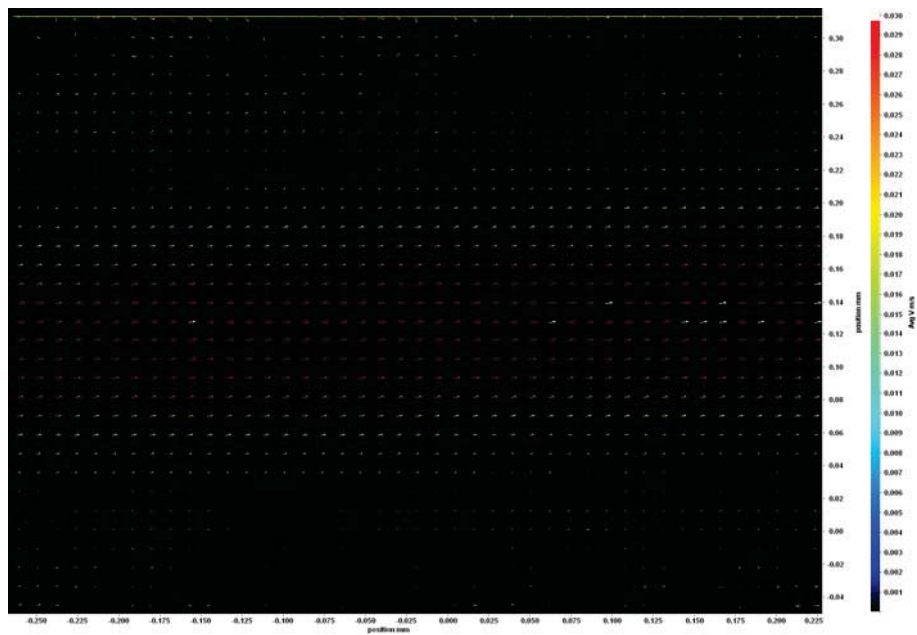
300 μm Kanal, gerade, 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ 



350 µm Kanal, verzweigt, 75 µl/min

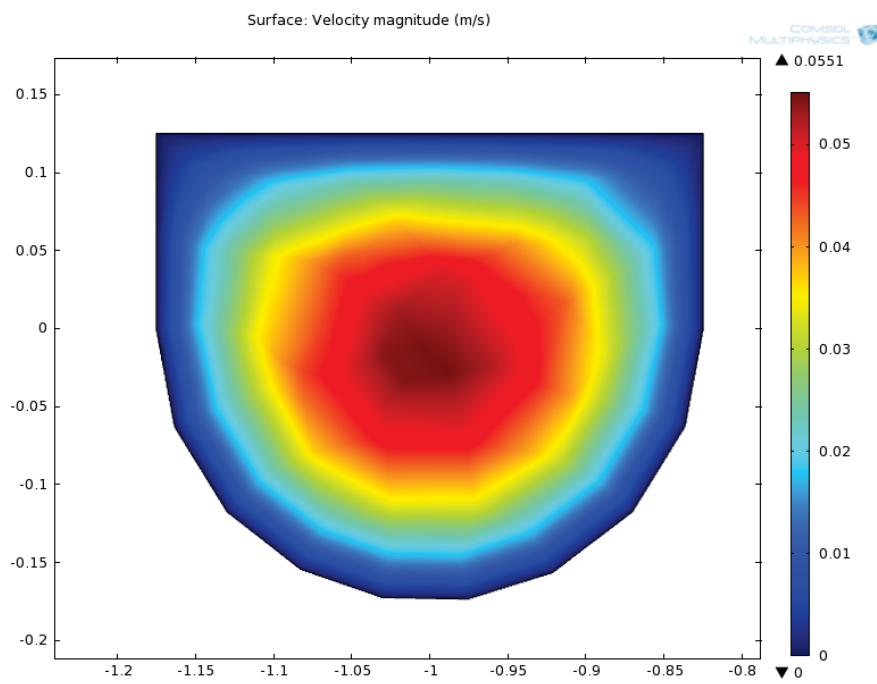
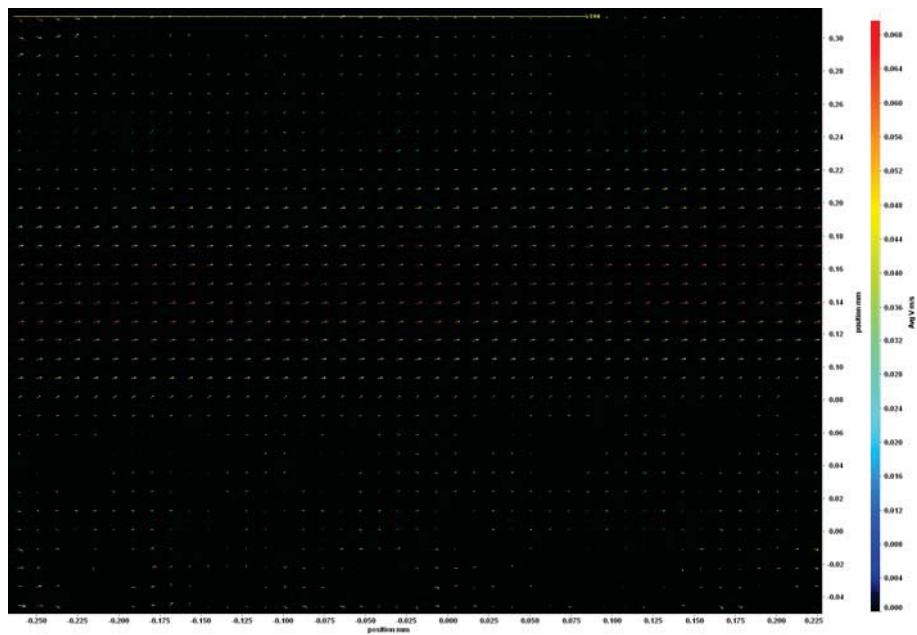


350 μm Kanal, verzweigt, 150 $\mu\text{l}/\text{min}$





350 µm Kanal, verzweigt, 300 µl/min



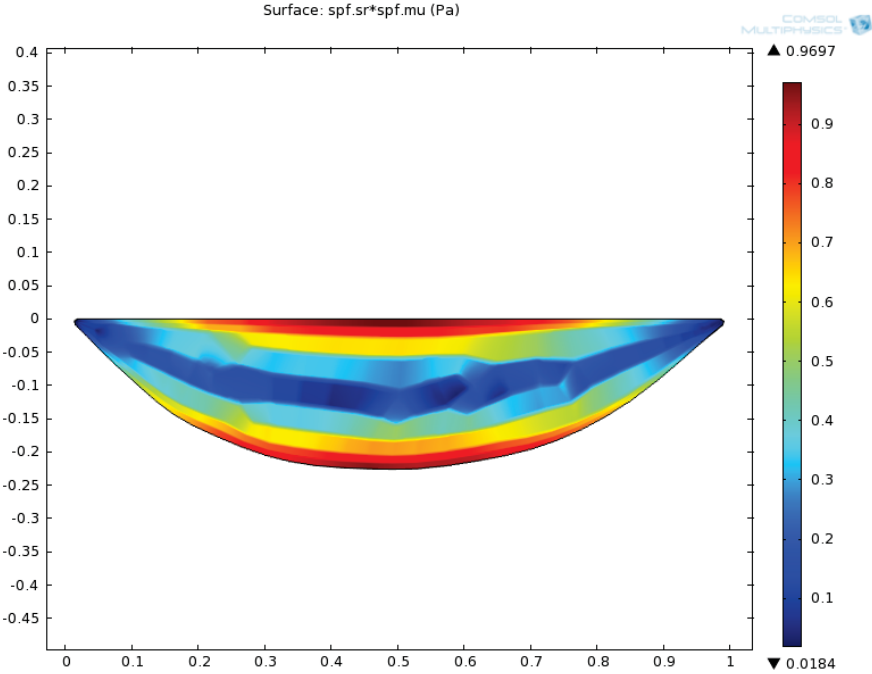


Zusammenfassung

	Flussgeschwindigkeit ($\mu\text{l}/\text{min}$)	max. Velocity (m/s)	
		PIV-Messung	Simulation COMSOL
1 mm, gerade	250	0,0400	0,0568
	500	0,0900	0,1135
300 μm , gerade	75	0,0380	0,0325
	100	0,0525	0,0434
	150	0,0800	0,0651
350 μm , verzweigt	75	0,0115	0,0138
	150	0,0300	0,0276
	300	0,0680	0,0551

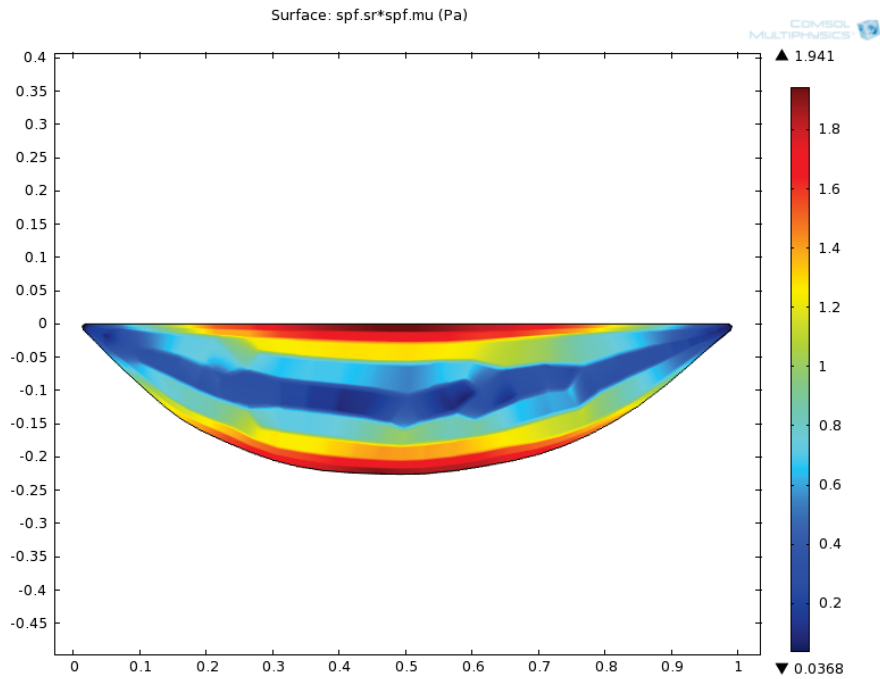
Beispielhaft sind die Scherstress-Darstellungen der drei verschiedenen Geometrien bei der höchsten untersuchten Geschwindigkeit dargestellt.

1 mm Kanal, gerade, 250 $\mu\text{l}/\text{min}$

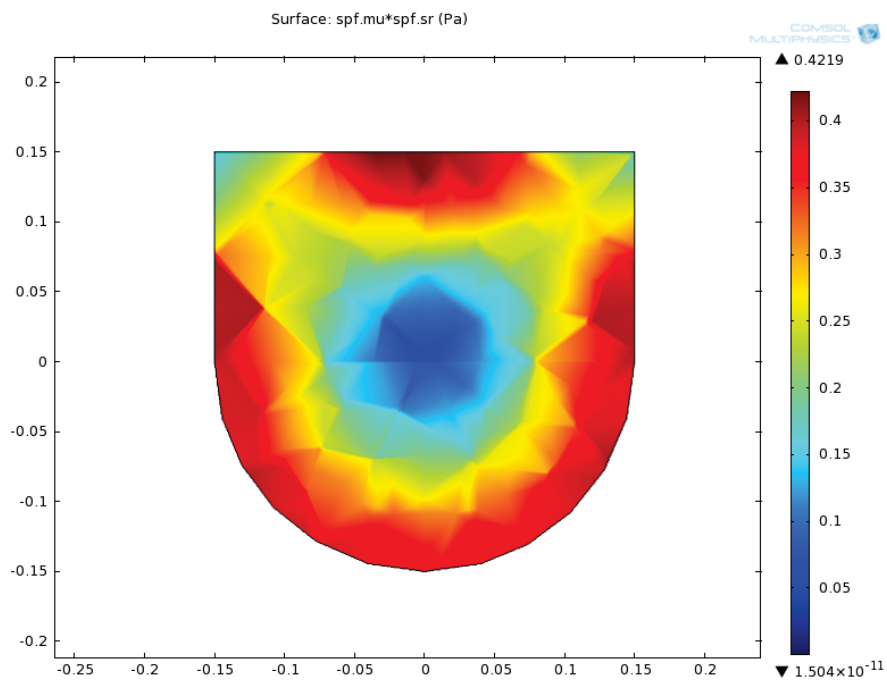




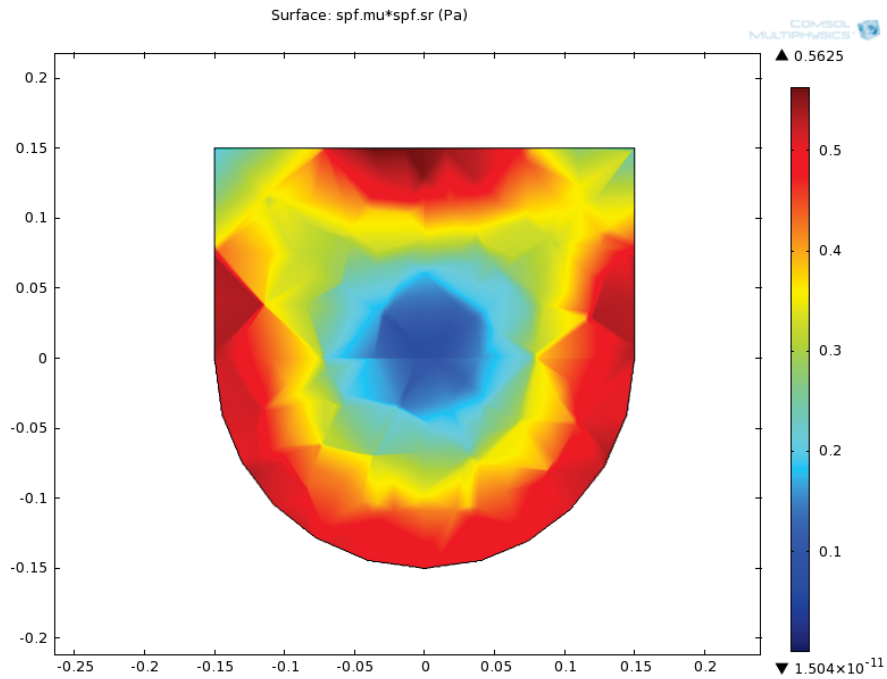
1 mm Kanal, gerade, 500 $\mu\text{l}/\text{min}$



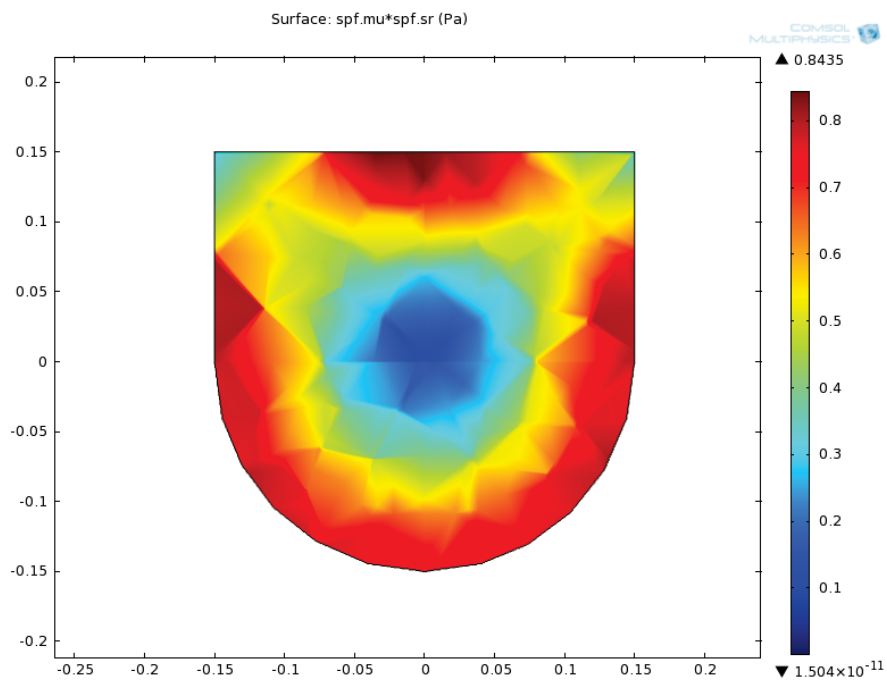
300 μm Kanal, gerade, 75 $\mu\text{l}/\text{min}$



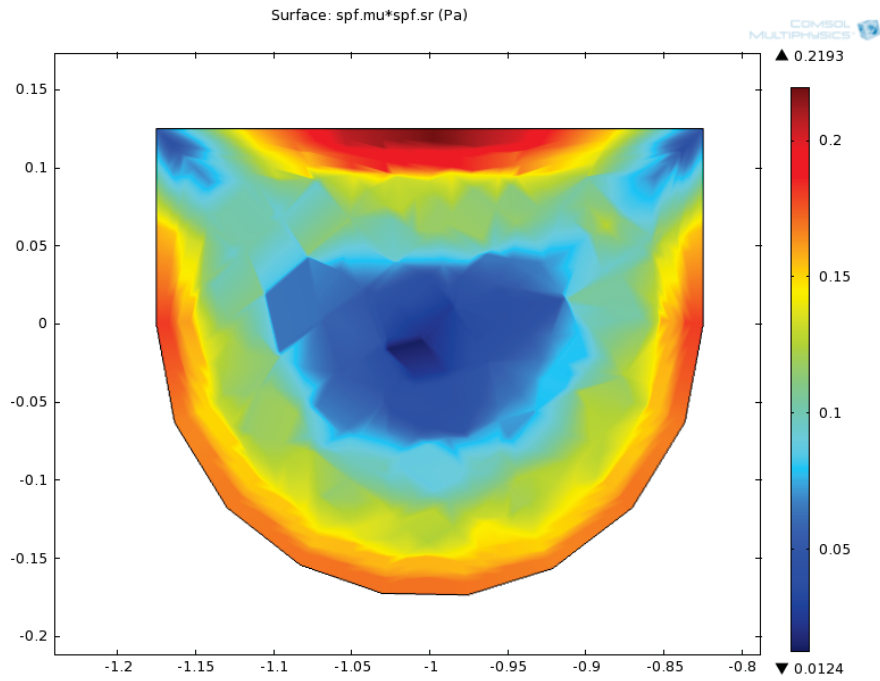
300 μm Kanal, gerade, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$



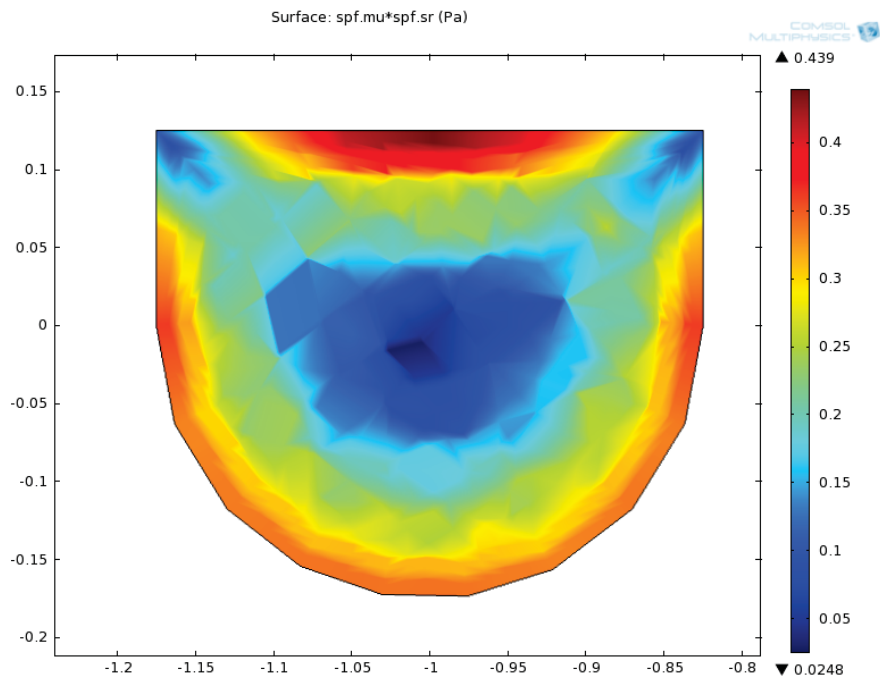
300 μm Kanal, gerade, 150 $\mu\text{l}/\text{min}$



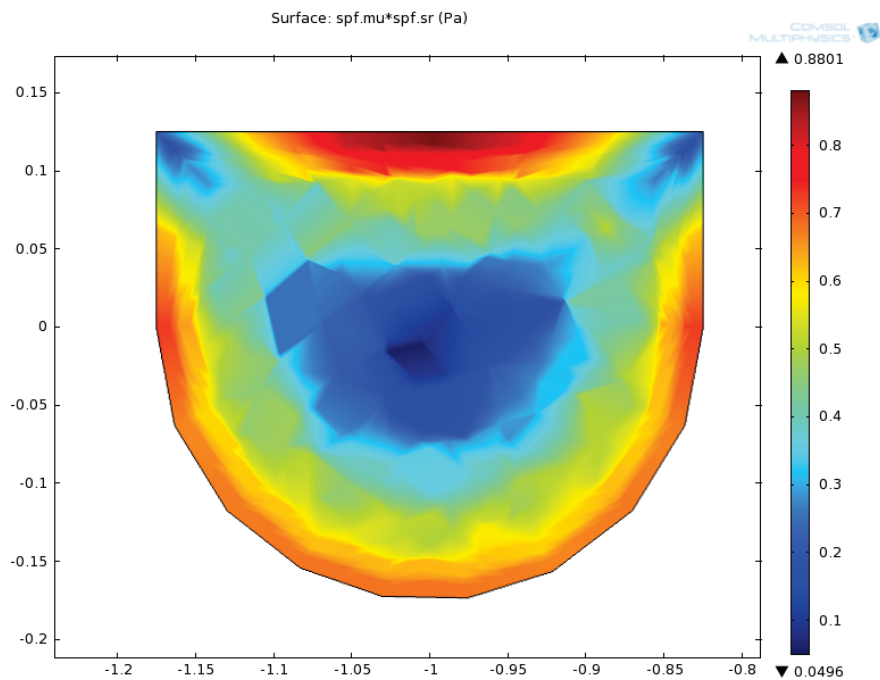
350 µm Kanal, verzweigt, 75 µl/min



350 µm Kanal, verzweigt, 150 µl/min



350 μm Kanal, verzweigt, 300 $\mu\text{l}/\text{min}$



Zusammenfassung

	Flussgeschwindigkeit ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Scherstress (Pa)	Scherstress (dyn/cm^2)
1 mm, gerade	250	0,9697	9,697
	500	1,9410	19,41
300 μm , gerade	75	0,4219	4,219
	100	0,5625	5,625
	150	0,8435	8,435
350 μm , verzweigt	75	0,2193	2,193
	150	0,4390	4,39
	300	0,8801	8,801

II. Dreidimensionale Darstellung des gekrümmten Mikrokanals besiedelt mit Endothelzellen (Abschnitt 4.5.6)

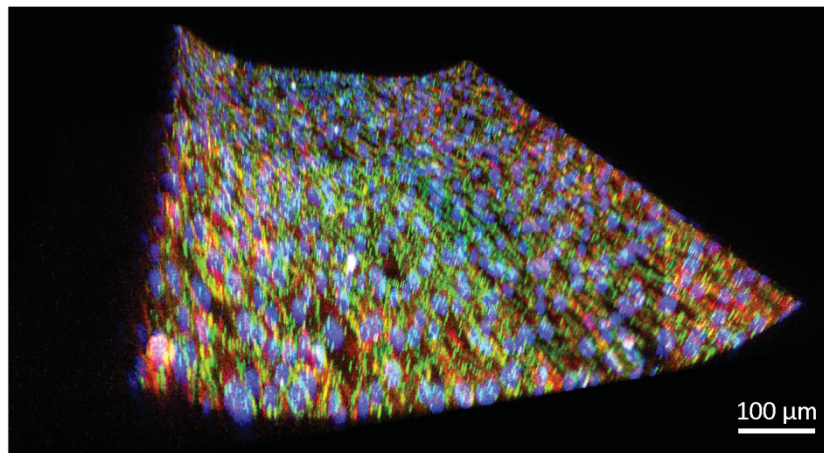


Abbildung 119: Dreidimensionale Ansicht des Kanalbodens des gekrümmten Mikrokanals besiedelt mit Endothelzellen (Angaben zu den Aufnahmen siehe Abbildung 42). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ über 5 Tage unter fluidischen Bedingungen (450 µl/min) kultiviert. Eine Phalloidin-Färbung markiert die Aktin-Fasern und eine Immunfärbung von VE-Cadherin die Adherence Junctions. Um die komplette Besiedelung im Kanal zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 100,7 µm (51 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Adherence Junctions, grün. (c) Rhodamin-markiertes Aktin, rot. (d) Überlagerung von (a), (b) und (c). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3), bearbeitet mit Imaris 7.4.2.

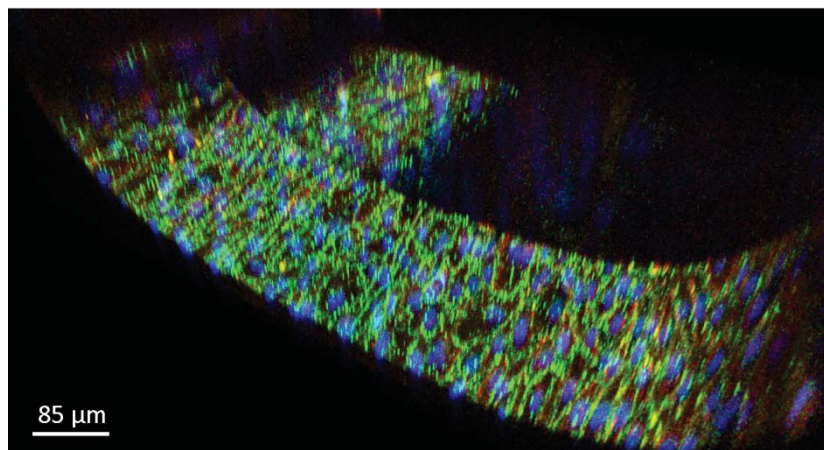


Abbildung 120: Dreidimensionale Ansicht des gekrümmten Mikrokanals besiedelt mit Endothelzellen (Angaben zu den Aufnahmen siehe Abbildung 45). HUVEC-Zellen wurden in einem Fibronectin-beschichteten porösen PC-Kanal bei 37°C und 5% CO₂ über 5 Tage unter fluidischen Bedingungen (450 µl/min) kultiviert. Eine Phalloidin-Färbung markiert die Aktin-Fasern und eine Immunfärbung von VE-Cadherin die Adherence Junctions. Um die komplette Besiedelung im porösen Kanal zu verdeutlichen, wurde ein z-Stapel mit einem Gesamthöhenunterschied von 374,0 µm (187 Bilder) mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die einzelnen Bilder übereinandergelegt (Maximum Projection). (a) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (b) GFP-markierte Adherence Junctions, grün. (c) Rhodamin-markiertes Aktin, rot. (d) Überlagerung von (a), (b) und (c). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 250 µm. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3), bearbeitet mit Imaris 7.4.2.



III. Mikroskopieaufnahmen zur qualitativen Bestimmung der Peptoidaufnahme unter statischen Bedingungen (Abschnitt 4.6.3)

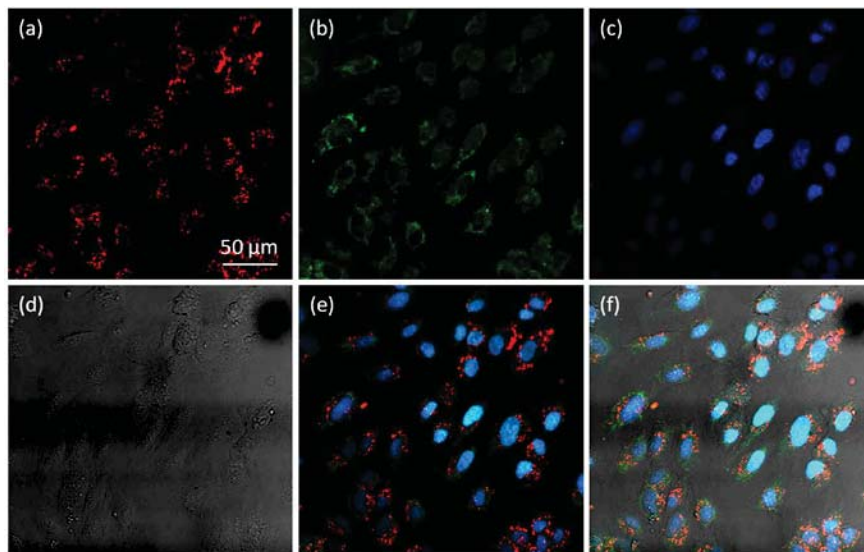


Abbildung 121: Peptoidaufnahme und -verteilung EB876 in HUVEC-Zellen II. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB876 (5 μM) für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB876). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 50 μm .

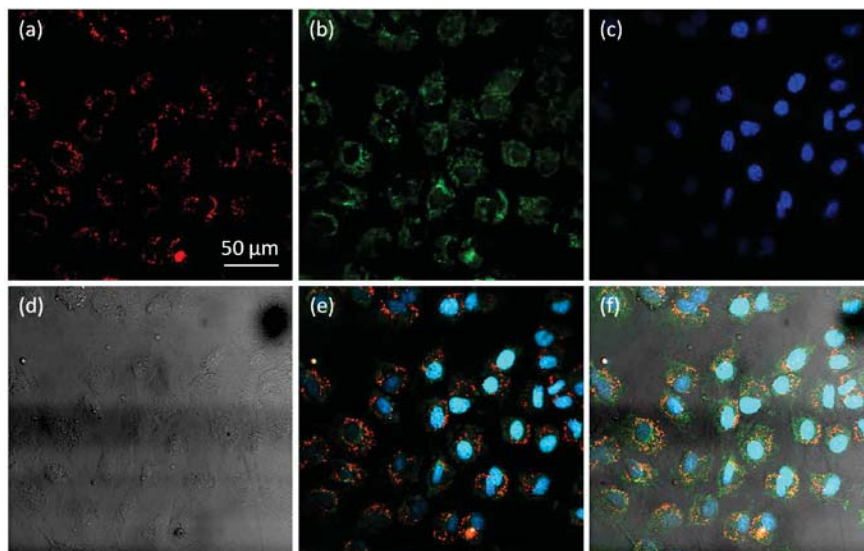


Abbildung 122: Peptoidaufnahme und -verteilung EB879 in HUVEC-Zellen II. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB879 (5 μM) für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB879). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 50 μm .

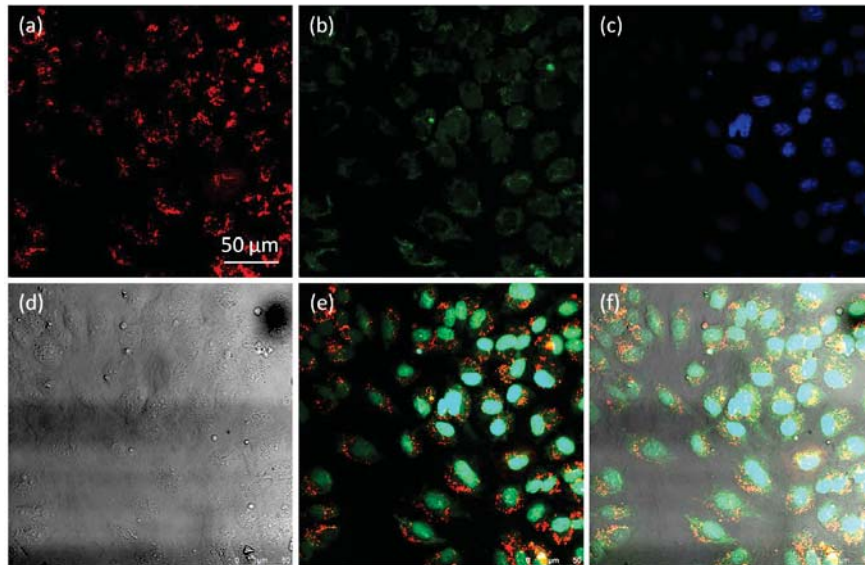


Abbildung 123: Peptoidaufnahme und -verteilung EB896 in HUVEC-Zellen II. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB896 (5 μ M) für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB896). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f), Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 50 μ m.

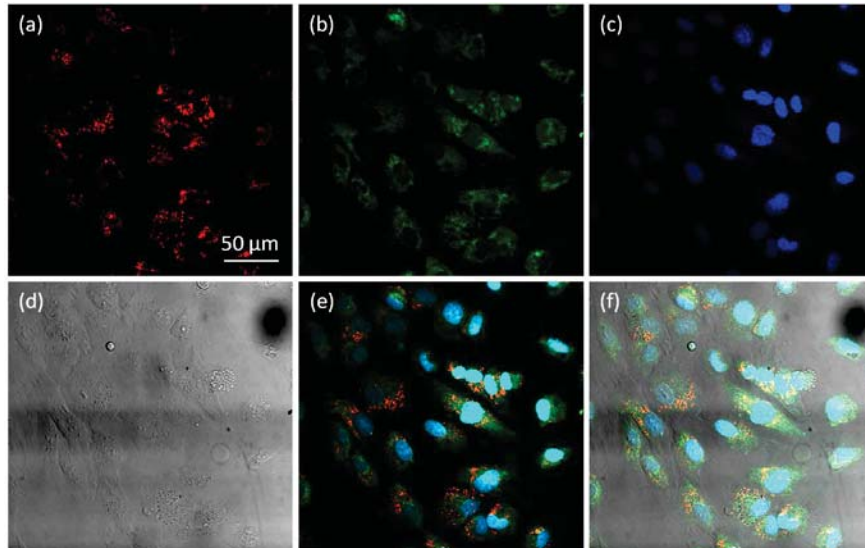
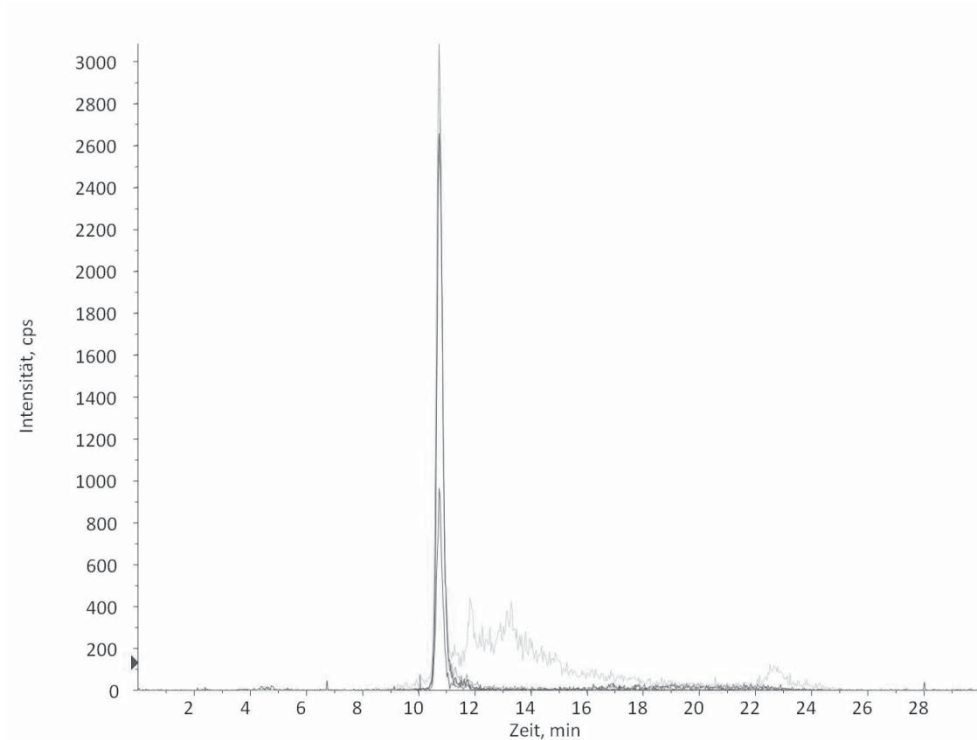


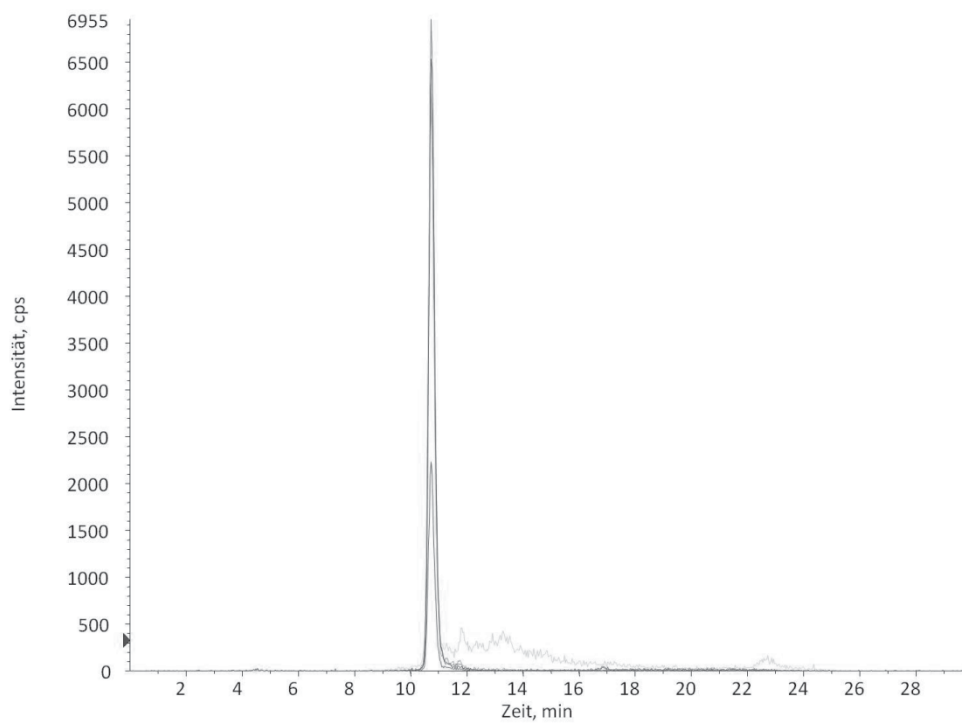
Abbildung 124: Peptoidaufnahme und -verteilung EB899 in HUVEC-Zellen II. HUVEC-Zellen wurden zur Untersuchung der Peptoidaufnahme mit dem Peptoid-Transporter EB899 (5 μ M) für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die HUVECs mit MitoTracker® Green zur Markierung der Mitochondrien und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne gefärbt. (a) rot-fluoreszierender Peptoid-Transporter (EB899). (b) GFP-markierte Mitochondrien, grün. (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HUVEC-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f), Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 50 μ m.

IV. Chromatogramme der polykationischen Peptide (endotheliale Aufnahme; Abschnitt 4.6.4.3)

EB876, 2 μ M

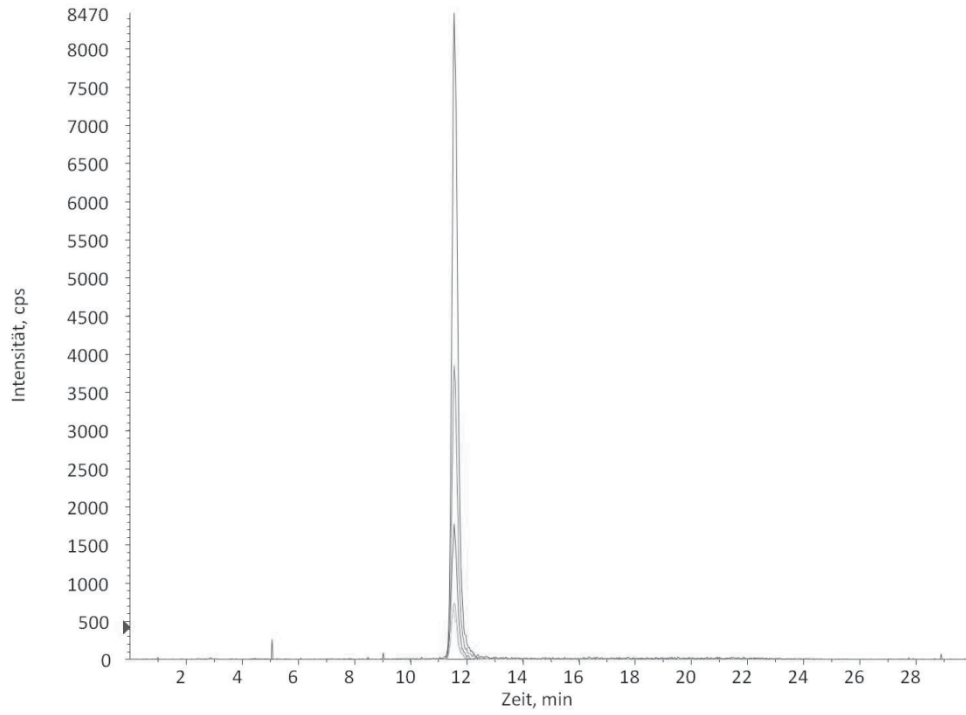


EB876, 5 μ M

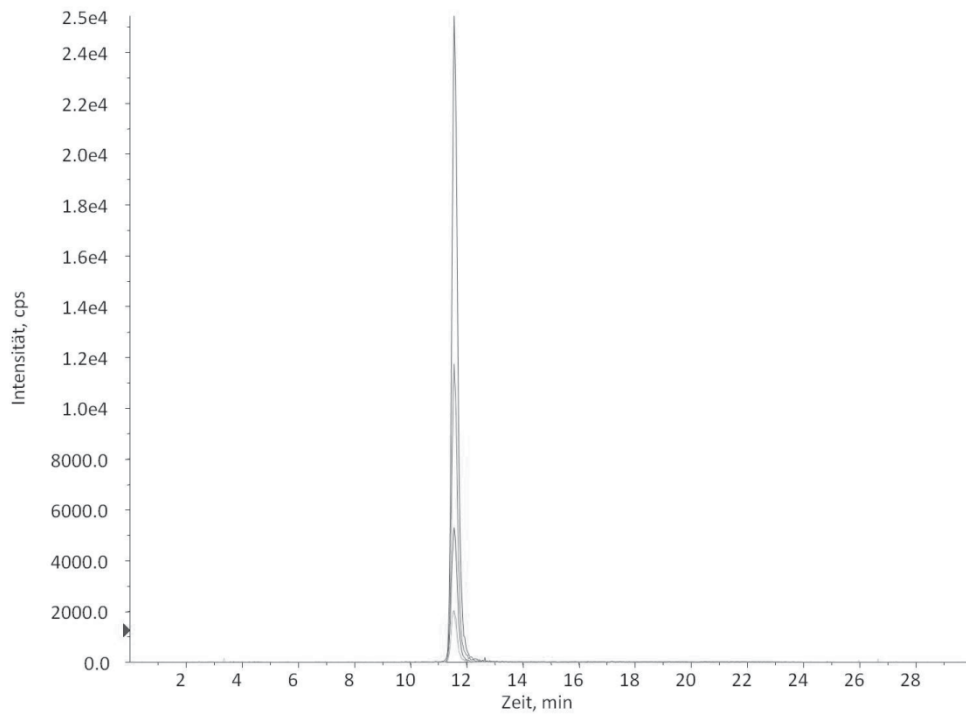




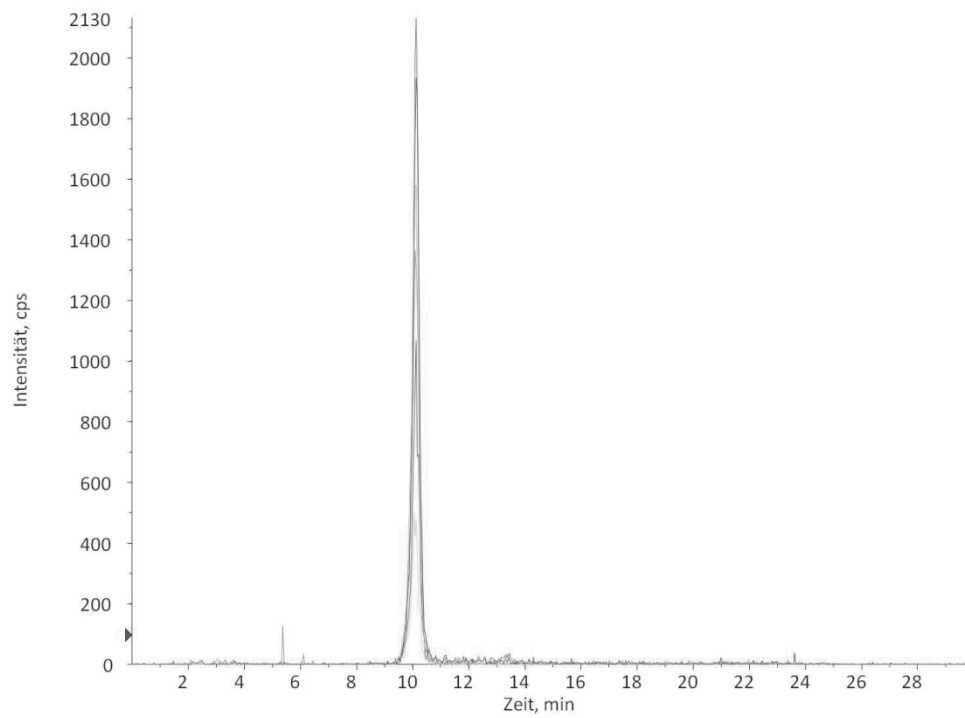
EB879, 2 μ M



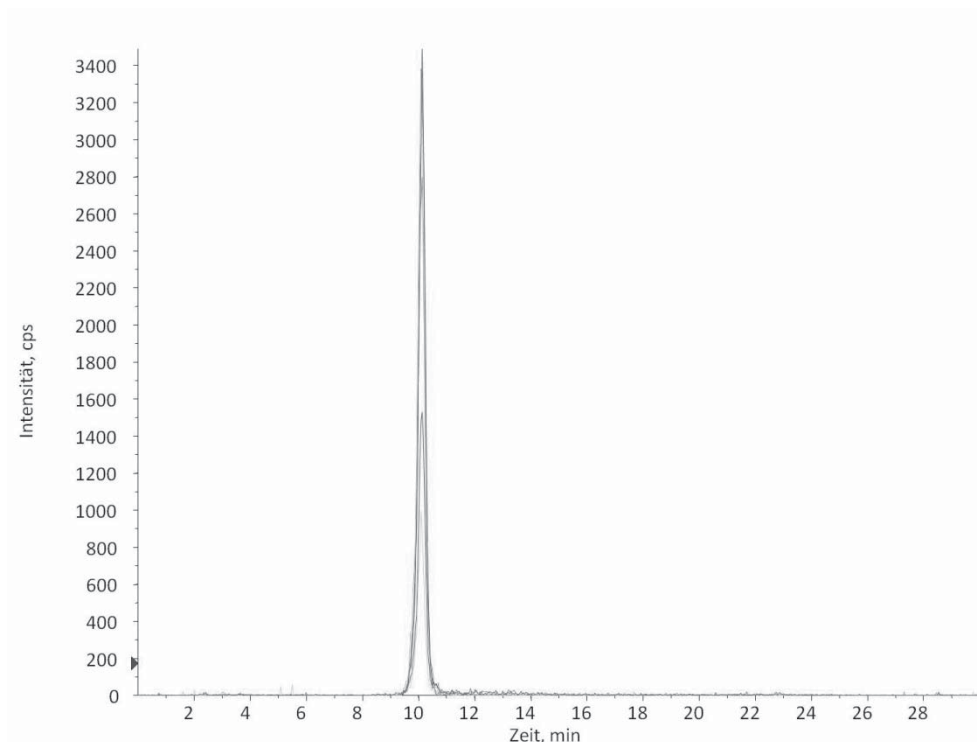
EB879, 5 μ M

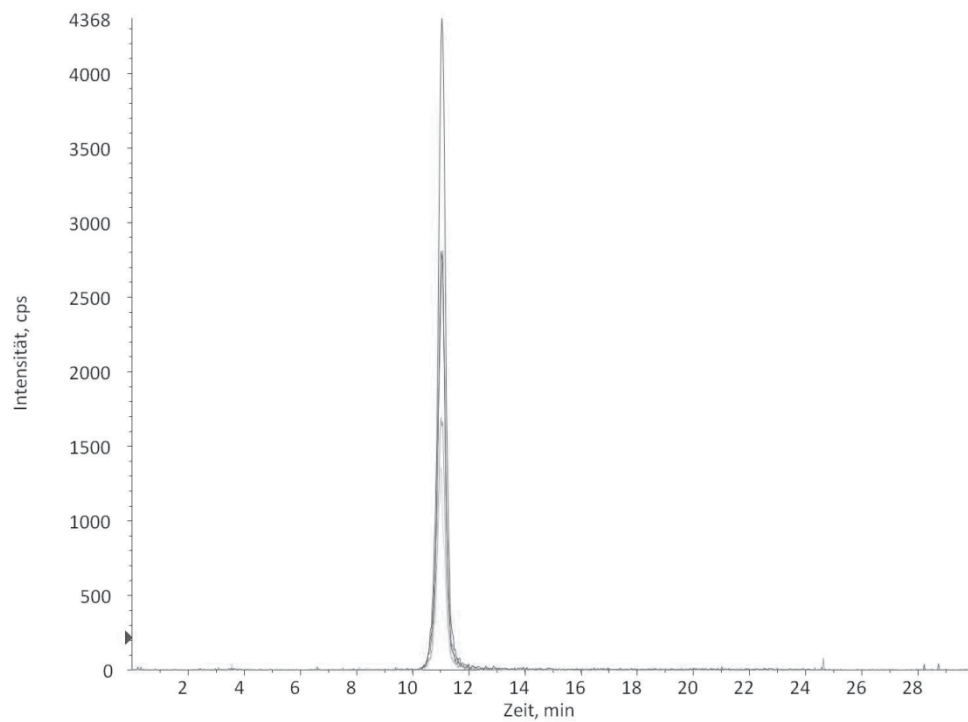
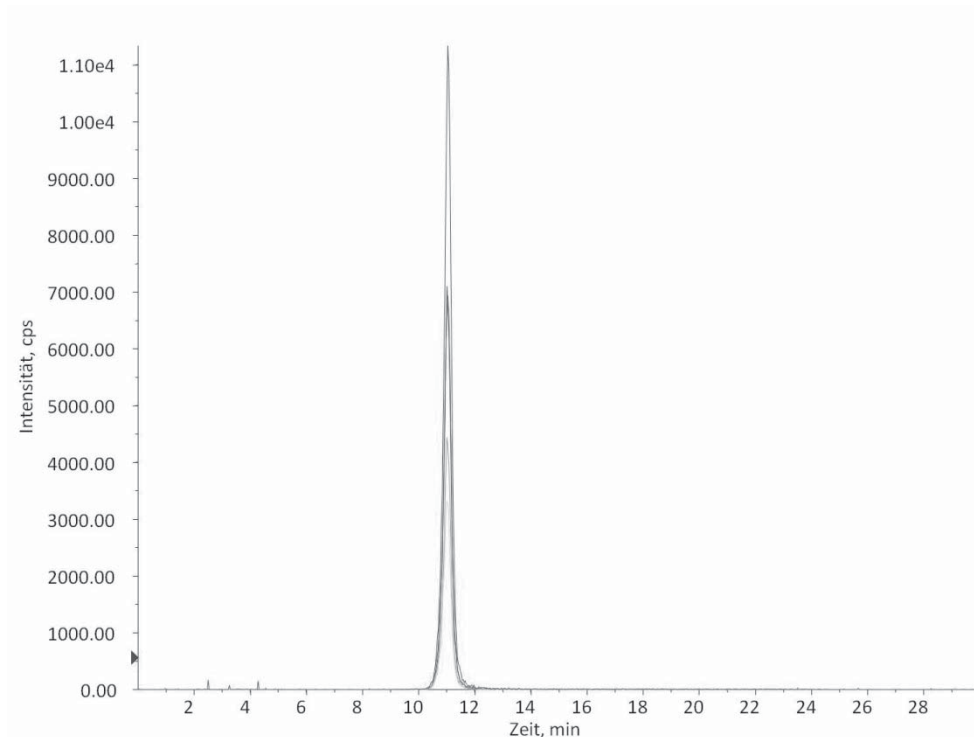


EB896, 2 μ M



EB896, 5 μ M



EB899, 2 μ MEB899, 5 μ M



V. Mechanismus der zellulären Aufnahme polykationischer Peptide (Abschnitt 4.6.8)

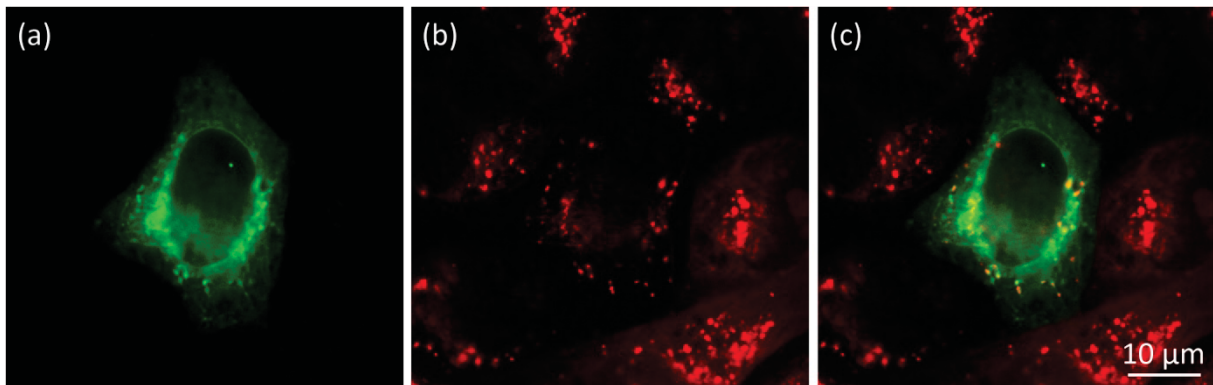


Abbildung 125: Peptidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab7a) III. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Late Endosomes (Rab7a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μM , 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 45 min nach abgeschlossener Inkubation. (a) GFP-markierte Late Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3).

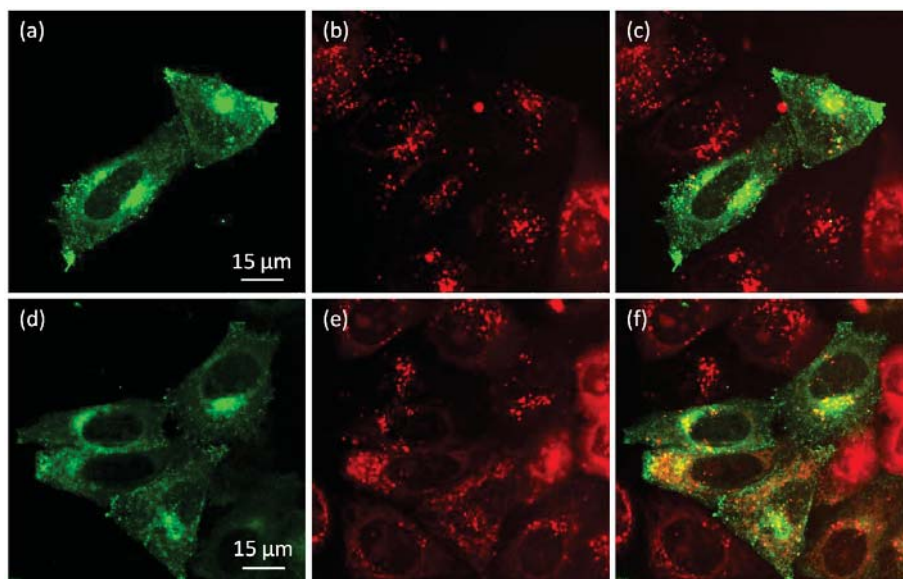


Abbildung 126: Peptidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab11a) II. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Recycling-Endosomes (Rab11a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μM , 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 35 min nach abgeschlossener Inkubation. (a), (d) GFP-markierte Recycling-Endosomes, grün. (b), (e) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Überlagerung von (a) und (b). (f) Überlagerung von (d) und (e). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale bar = 15 μm .

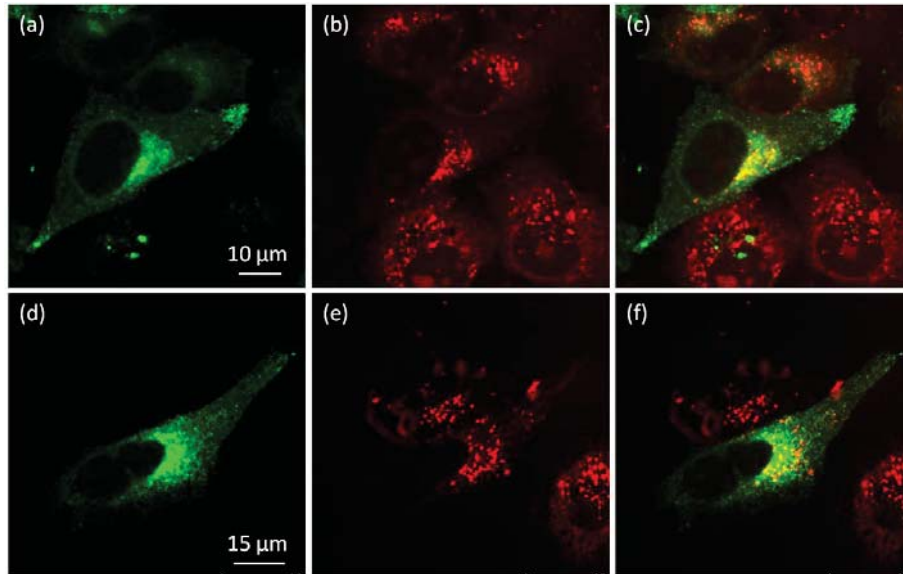


Abbildung 127: Peptoidaufnahme und -verteilung in HeLa-Zellen (Rab11a) III. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Recycling-Endosomen (Rab11a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 20 μM , 15 min, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. Mikroskopieaufnahme 45 min nach abgeschlossener Inkubation. (a), (d) GFP-markierte Recycling-Endosomen, grün. (b), (e) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c), Überlagerung von (a) und (b), (f) Überlagerung von (d) und (e). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale bar = 10 bzw. 15 μm .

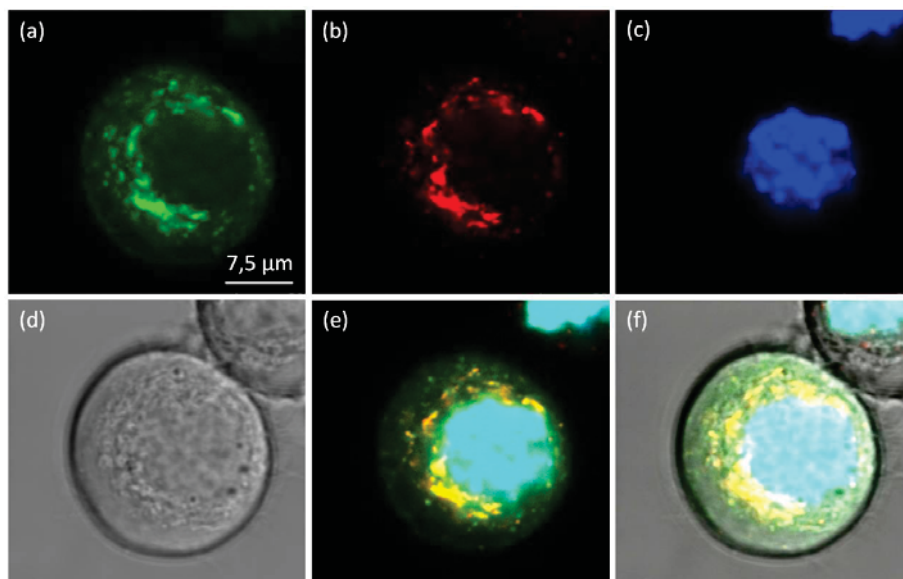


Abbildung 128: Peptoidverteilung in HeLa-Zellen während der Zellteilung, Rab7a III. Zur Visualisierung der Peptoid-Verteilung während der Zellteilung wurden HeLa-Zellen zur GFP-Markierung der Late Endosomes, Phagosomes und der Lysosomen (Rab7a) transfiziert. Die Verteilung des Peptoid-Transporters EB899 (Inkubation der Zellen mit 5 μM , 24 h, bei 37°C) wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar. (a) GFP-markierte Late Endosomes, grün. (b) rot-fluoreszierende Peptoid-Transporter (EB899). (c) Hoechst 33342-markierte Zellkerne, blau. (d) Hellfeld-Aufnahme der HeLa-Zellen. (e) Überlagerung von (a), (b) und (c). (f) Überlagerung von (a), (b), (c) und (d). Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Spezifikationen siehe 6.1.3). Scale Bar = 7,5 μm .





10 DANKSAGUNG

Nicht die Glücklichen sind dankbar. Es sind die Dankbaren, die glücklich sind.

Francis Bacon

Zuerst möchte ich mich bei meiner FAMILIE, vor allem bei meinen ELTERN bedanken. Ihr habt mir diesen Weg ermöglicht und mich immer unterstützt. Auf euch konnte ich mich stets verlassen. Vielen Dank dafür!

UTE SCHEPERS gilt mein ganz besonderer Dank. Du hast mir die Möglichkeit gegeben an diesem interessanten Projekt zu arbeiten, mir alle Freiheiten und jede Unterstützung gegeben, die zum Erfolg meiner Arbeit geführt haben. Vielen Dank!

MANFRED METZLER danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und die hervorragende Ausbildung während meines Studiums.

STEFAN BRÄSE möchte ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die gute Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Promotion danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt STEFAN GISELBRECHT für die gute Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit. Durch deine Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit hast du mir sehr geholfen und damit einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke auch der gesamten Arbeitsgruppe Schepers, vor allem CHRISTOPH GRÜN, KONSTANTIN DEMIR, JUDITH BENDER, LARISSA KAUFMANN, CHRISTIN BEDNAREK und OLGA DÜRR für die tolle Zusammenarbeit im Labor und die Unterstützung meiner Arbeit.

ALEXANDER GERWALD danke ich für alle mikrotechnischen Arbeiten, vor allem für die unermüdliche Produktion von Bioreaktoren und die Hilfe bei technischen Fragen.

PAVEL NIKOLOV möchte ich für die Unterstützung in der Endphase meiner Doktorarbeit danken.

Bei ROMAN TRUCKENMÜLLER möchte ich mich für die Unterstützung bei meinen Publikationen sowie meiner Dissertation und viele wertvolle Tipps bedanken.

Allen Mitarbeitern des IBG-1, vor allem ERIK GOTTWALD, TIM SCHARNWEBER, ANKE DECH, DAVID THIELE, CORDULA NIES, RABEA PETERMANN und CORNELIA ZIEGLER möchte ich für die freundliche Aufnahme und die stete Hilfsbereitschaft danken.



Allen Mitarbeiter des Instituts für Toxikologie und Genetik danke ich für die schöne Zeit.

CRAIG SIMMONS gilt mein ganz besonderer Dank. Du hast mich so herzlich in deine Arbeitsgruppe aufgenommen und mich während meines gesamten Forschungsaufenthalts stets unterstützt. Der gesamten Arbeitsgruppe von Craig Simmons möchte ich für die wunderschöne und ereignisreiche Zeit in Toronto danken. You're simply the best!

Weiterhin gilt mein Dank meinen kanadischen Kollaborationspartnern SUTHAN SRIGUNAPALAN, OLEG CHEBOTAREV, LIAN LENG, MICHAEL W.L. WATSON, AARON WHEELER, AXEL GÜNTHER und CRAIG SIMMONS.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch ESTHER BIRTALAN für die Synthese und freundliche Bereitstellung der Peptide, aber auch für ihre gute Beratung und unermüdliche Hilfe in allen Lebenslagen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen anderen Kollaborationspartnern bedanken:

MICHAEL NUSSER, FRANK KIRSCHHÖFER, BORIS KÜHL, und GERALD BRENNER-WEIß möchte ich für die gute Zusammenarbeit in der Analytik danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei MICHAEL NUSSER und FRANK KIRSCHHÖFER für die Unterstützung bei allen analytischen Fragestellungen und ihre unglaubliche Einsatzbereitschaft in der Analytik.

YURY BELYAEV möchte ich für die Ermöglichung der Spinning Disk Aufnahmen, sowie die Hilfe bei der Auswertung der großen Datenmengen danken.

JOCHEN GEHRIG und URBAN LIEBEL danke ich für die Hilfe bei mikroskopischen Untersuchungen.

PAUL ABAFFY möchte ich für die Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der Mikrokanäle danken.

BJÖRN WATERKOTTE und KATJA SCHMITZ danke ich für die Zusammenarbeit in einem Projekt zum Einsatz thermogeformter Mikrokanäle.

Der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg und der Carl Zeiss Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

Ich danke meinen engagierten Korrekturlesern JUDITH BENDER, DOROTHEA HELMER, MARCEL BREUNINGER, CHRISTEL HEBEISS und CHRISTIANE THANISCH. Für verbleibende Fehler sind nicht die Korrekturleser verantwortlich.

All meinen Mitstreitern aus dem Doktorandenzimmer OLIVER DAHLEY, MARK SCHMITT, DIETER MAHLINGER, ARUL SAKKARAVARTHI, MANUELA RITZ, OLGA DÜRR, JUDITH BENDER, STEFANIE BORMANN, KATJA JEHLE, KATHARINA FUCHS, CHRISTIANE THANISCH, ANJA SCHMAUS und JOCHEN BAUR möchte ich für die gute Unterhaltung und die lustige und abwechslungsreiche Zeit danken.



Von ganzem Herzen danke ich CHRISTIN BEDNAREK und OLGA DÜRR. Ihr habt mein Studium und meine Promotion zu etwas ganz Besonderem gemacht. Gemeinsam haben wir es geschafft! Vielen Dank für die schöne Zeit!

DOROTHEA HELMER, der tollsten Mitbewohnerin und Freundin der Welt möchte ich für die schöne Zeit, für lustige, ernste und unterhaltsame Gespräche, einfach für alles danken.

Zum Schluss möchte ich nochmals allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke für die grenzenlose Unterstützung und die wunderschöne Zeit!



