

Eva Zittel

**Evaluierung neuartiger *in vitro*-Modelle  
zur Untersuchung von Wirkstoffen und  
therapeutisch aktiven Nanopartikeln**



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Evaluierung neuartiger *in vitro*-Modelle zur Untersuchung von Wirkstoffen und  
therapeutisch aktiven Nanopartikeln





# **Evaluierung neuartiger *in vitro*-Modelle zur Untersuchung von Wirkstoffen und therapeutisch aktiven Nanopartikeln**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**M.Sc. Eva Zittel**

aus Karlsruhe

1. Referent: Prof. Dr. Ute Schepers
  2. Referent: Prof. Dr. Claus Feldmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 07. Februar 2018



### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

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

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2019

Zugl.: Karlsruhe (KIT), Univ., Diss., 2018

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2019

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://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, 2019

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9958-9

eISBN 978-3-7369-8958-0



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers von November 2014 bis Dezember 2017 am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT, Campus Nord) angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Claus Feldmann möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

#### Eidesstattliche Erklärung

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





IF YOU CAN DREAM IT,  
YOU CAN DO IT.  
- WALT DISNEY







## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	5
2.1. 2D und 3D Zellkultur .....	7
2.2. 3D Zellkultur Modelle .....	8
2.3. <i>Organ-on-a-Chip</i> -Systeme .....	9
2.4. Tumorthherapie.....	13
2.5. Gezielter Transport von Wirkstoffen.....	14
2.6. Photodynamische Therapie .....	16
3. Zielsetzung .....	18
4. Ergebnisse .....	19
4.1. Dox@AIO(OH) Nanopartikel .....	19
4.1.1. Zelluläre Aufnahme und <i>in vitro</i> -Toxizität.....	20
4.1.2. <i>In vivo</i> -Studie .....	23
4.1.3. Sphäroide als <i>in vitro</i> -Tumormodell.....	24
4.1.4. Transportstudie im mikrofluidischen Modell <i>vasQchip</i> .....	26
4.1.5. Viabilitätsstudie im mikrofluidischen Modell <i>vasQchip</i> .....	31
4.2. Gd <sub>4</sub> <sup>3+</sup> [AIPCS <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> <sup>4-</sup> Nanopartikel .....	35
4.2.1. Zelluläre Aufnahme und Photoaktivierung .....	37
4.2.2. Biokompatibilität und Phototoxizität .....	38
4.2.3. Sphäroide als <i>in vitro</i> -Tumormodell.....	39
4.2.4. <i>In vitro</i> -Studie zur Angiogenese .....	41
4.3. Entwicklung des <i>vasQchip</i> Tumormodells .....	45
4.3.1. Gemeinsames Medium für Ko-Kultivierung.....	47
4.3.2. Ko-Kultur mit Endothelzellen .....	51
4.3.3. Ko-Kulturen mit Sphäroiden.....	54
4.4. Modell der Kleinen Atemwege in der Lunge .....	57
4.4.1. Analyse der exosomalen RNA während der Differenzierung .....	60
4.4.2. Analyse der exosomalen RNA während einer Wundheilung .....	65
4.4.3. Analyse der exosomalen RNA im <i>Organ-on-a-Chip</i> -Modell.....	67
4.4.4. Modell für eine Influenza-Infektion .....	68
4.4.5. Phagen Display .....	70
5. Diskussion .....	75



6.	Methoden .....	80
6.1.	Zellkultur .....	80
6.1.1.	Untersuchung zur Angiogenese .....	82
6.1.2.	Sphäroide .....	83
6.1.3.	Zytotoxizitätsstudie mit MTT .....	83
6.1.4.	Wachstumskurve.....	84
6.2.	Konfokalmikroskopie .....	85
6.3.	Der <i>vasQchip</i> .....	87
6.3.1.	Herstellung des <i>vasQchips</i> .....	87
6.3.2.	Besiedelung und Kultivierung von Zellen im <i>vasQchip</i> .....	88
6.3.3.	Zytotoxizitätsstudie mit XTT .....	91
6.3.4.	3D Kultur in Fibrinigel.....	93
6.3.5.	Fixierung und Färbung der Zellen.....	93
6.4.	Modell der Kleinen Atemwege .....	94
6.4.1.	Transwell®-System mit HSAEpC .....	94
6.4.2.	Fluidisches Modell der Kleinen Atemwege mit HSAEpC.....	94
6.4.3.	Analyse der exosomalen RNA .....	95
6.4.3.1.	RNA Isolation.....	95
6.4.3.2.	cDNA Synthese und „halb-verschachtelte“ qPCR .....	96
6.4.3.3.	Behandlung differenzierter Zellen auf Transwell®-Filtern.....	97
6.5.	Phagen Display.....	97
6.5.1.	Verifizierung des Zielproteins.....	97
6.5.2.	Phagen Display .....	98
6.6.	Synthese der Nanopartikel .....	99
6.6.1.	Dox@AlO(OH) Nanopartikel.....	99
6.6.2.	Gd <sub>4</sub> <sup>3+</sup> [AlPCS <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> <sup>4-</sup> Nanopartikel.....	100
6.7.	Materialien .....	101
7.	Abkürzungen .....	106
8.	Anhang .....	108
	Literatur .....	117
	Lebenslauf .....	126
	Danksagung .....	129



## 1. Zusammenfassung

Trotz vielerlei Fortschritte in der medizinischen Forschung und der Fülle an neu entwickelten Substanzen als potentielle Wirkstoffe, gibt es noch immer Erkrankungen, die nicht ausreichend effizient behandelt werden können. Eine der größten Herausforderungen besteht hierbei in der Untersuchung und Evaluierung der Wirkstoffkandidaten, was ein sehr zeit- und kostenintensiver Prozess ist. Gleichzeitig ergibt sich auch noch in späten Phasen der Medikamentenentwicklung eine hohe Misserfolgsquote der Testsubstanzen, da die Ergebnisse der verschiedenen Testmodelle oft nur schwer aufeinander zu übertragen sind. Auf Hochdurchsatz-Selektionen in *in vitro*-Systemen mit einfachen Zellkulturen folgen *in vivo*-Versuche in verschiedenen Tiermodellen, bevor schließlich erste Studien an einer kleinen humanen Probandengruppe durchgeführt werden. Dabei ist allerdings weder die Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus der Zellkultur auf den tierischen Organismus, noch die Relevanz eben dieser Tiermodelle für die humane Physiologie gewährleistet. Daher beschäftigt sich ein weites und aufstrebendes Forschungsfeld mit dem sogenannten *Tissue Engineering*, der Entwicklung neuartiger *in vitro*-Modelle zur Nachbildung organspezifischer, humaner Gewebe. Die entwickelten Systeme sollen spezifischere Experimente und somit zuverlässigere Prognosen ermöglichen. Vielversprechend sind dabei Methoden der dreidimensionalen (3D) Zellkultur sowie die sogenannten *Organ-on-a-Chip*-Systeme, die durch ihre komplexere Anordnung und Zusammenstellung die Umgebung des menschlichen Organismus besser widerspiegeln und damit ein natürlicheres Verhalten der Zellen *in vitro* erlangen können.

Zu diesem Zweck wurde auch am KIT ein mikrofluidisches *Organ-on-a-Chip*-Modell, der *vasQchip*, entwickelt, das aus einem künstlichen Blutgefäßsystem und einer umgebenden Kammer für organotypische 3D Zellkulturen aufgebaut ist. Im Gegensatz zu vielen anderen Modellen wird hier die physiologische runde Form des Blutgefäßes durch eine poröse, halbrunde Membran abgebildet, die mit Endothelzellen ausgekleidet wird. Damit erlaubt der *vasQchip* die Untersuchung endothelialer Wirkstoffaufnahme sowie transendothelialer Transportvorgänge. Es lassen sich Spezifitäten von Substanzen oder (Wirkstoff-) Transportern bezüglich bestimmter Gewebe feststellen, was in *in vitro*-Modellen bisher kaum möglich ist. Gerade bei komplexen Wirkstoffen und gewebespezifischer Ansteuerung mit Wirkstofftransportern ist es extrem wichtig, ein entsprechend komplexes *in vitro*-Modell für die Evaluierung nutzen zu können.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *in vitro*-Systeme inklusive des *vasQchips* ausgewählt und für die Charakterisierung von therapeutisch einsetzbaren Nanopartikeln angepasst bzw. bezüglich der Testung von chemotherapeutischen Wirkstoffen weiterentwickelt. So konnte für den Wirkstofftransporter Dox@AIO(OH) - mit Doxorubicin gefüllte, nanoskalige Hohlkugeln aus Aluminiumoxid-Hydroxid - unter anderem mit Versuchen im *vasQchip* eine Verbesserung des Wirkmechanismus gegenüber dem freien Wirkstoff gezeigt werden, was auch im Tiermodell so nachgewiesen wurde, aus klassischen Zellkultur-Versuchen aber nicht hervorgeht. Ebenso wurden Nanopartikel aus dem photoaktiven, anorganisch-organischen Hybridmaterial  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  (aus Gadolinium-Ionen und dem Phthalocyanin AIPCS<sub>4</sub><sup>4-</sup>) in



verschiedenen *in vitro*-Systemen auf ihre Eignung als Substrat in der „Photodynamischen Therapie“ getestet. In verschiedenen Modellen konnten die zelluläre Aufnahme, die Biokompatibilität mit und ohne Bestrahlung sowie die Photoaktivierbarkeit in biologischen Systemen untersucht und mit dem reinen Phthalocyanin verglichen werden. Induziert durch eine Bestrahlung zeigten die Nanopartikel einen deutlicheren Effekt bei der Auflösung kanzerogener Zellverbände sowie der Unterdrückung von Angiogenese, während ohne die Bestrahlung eine gute Verträglichkeit zu erkennen war. Somit ließ sich durch die umfassende *in vitro*-Testung bereits eine gute Einordnung über das therapeutische Potential der Hybrid-Nanopartikel vornehmen.

Neben dem Einsatz zur Wirkstofftestung eignen sich fortschrittliche *in vitro*-Systeme auch zur Untersuchung von Krankheitsverläufen oder der gezielten Entwicklung von Wirkstoffen. Diese Ziele wurden während eines Forschungsaufenthaltes am *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering* mit den dort entwickelten Modellen der Kleinen Atemwege als Testsystemen verfolgt. Hier wurde einerseits ein Verfahren evaluiert, das durch die Auswertung der aus dem Zellkultur-Medium gewonnenen exosomalen RNA eine nicht-invasive Methode bietet, den Zustand der in Kultur befindlichen Zellen und Gewebe zu ermitteln. So lässt sich beispielsweise die Differenzierung oder ein Heilungsprozess von *in vitro*-Systemen über verschiedene Zeitpunkte verfolgen. Mit den dabei gewonnenen Erkenntnissen ließe sich zum Beispiel die spezifische Auswertung von Biomarkern aus Körperflüssigkeiten als medizinische Anwendung etablieren. Andererseits wurde das Modell der Kleinen Atemwege als Plattform für eine Influenza-Infektion genutzt. Diese konnte anhand der viralen RNA ausgewertet und der Einfluss von Testsubstanzen auf das Ausmaß der Infektion ermittelt werden. Mittels Phagen-Display wurde außerdem ein Peptid zur Blockierung des Proteins DESC-1, das in den Infektionsprozess involviert ist, gesucht. Ein solches Peptid kann als aussichtsreicher Kandidat für die Entwicklung eines Influenza-Wirkstoffes dienen. Nach einer erfolgreichen Selektion könnte dieses im *in vitro*-Modell getestet und weiterentwickelt werden.

Insgesamt werden in der vorliegenden Arbeit somit zum einen zwei therapeutische Ansätze mit nanoskaligen Strukturen (gefüllte Hohlkugeln als Transporter sowie photoaktive Hybridmaterialien) vorgestellt und getestet. Zum anderen werden verschiedene *in vitro*-Systeme aus dem Gebiet des *Tissue Engineering* zur Testung der Nanopartikel und weiteren therapeutisch relevanten Studien angewandt und damit deren Relevanz in der Untersuchung und Bewertung von Wirkstoffen aufgezeigt.



## Abstract

Despite a lot of progress in medical research and the abundance of newly developed substances as potential drugs, there are still diseases which cannot be treated efficiently enough. One of the major challenges emerging here is the appropriate investigation and evaluation of the drug candidates being both a time-consuming and cost-intensive process. At the same time, due to difficult transferability of the outcomes between various test models, a high failure rate of the tested substances can be observed, even in the late stages of drug development. As standard, high-throughput screenings in *in vitro* systems with ordinary cell cultures are followed by *in vivo* experiments with different animal models before finally performing initial studies with a small group of human subjects. However, neither the transfer of findings from cell culture to the animal organism nor the relevance of just these animal models for human physiology can be guaranteed. Therefore, the so-called research field of *tissue engineering* – a broad and upcoming scientific branch – deals with the development of novel *in vitro* models emulating organ-specific, human tissues. These engineered systems are to allow more specific experiments and thus, more reliable projections. At this, methods of three dimensional (3D) cell culture as well as so-called *organ-on-a-chip* systems are promising. Due to their more complex setup and composition, they resemble the surroundings of a human organism more closely and hence, enable a more natural behaviour of the cells *in vitro*.

With this in mind, a microfluidic *organ-on-a-chip* model was developed at KIT, called the *vasQchip*. It consists of an artificial blood vessel system and a surrounding chamber to incorporate organotypic 3D cell cultures. In contrast to many others, this model provides the physiological round shape of the blood vessel by a porous semicircular membrane lined with endothelial cells. Thus, the *vasQchip* allows the investigation of endothelial uptake of drugs as well as transendothelial transport processes. Being so far hardly achievable *in vitro*, it is possible to assess specificities of substances or (drug) carriers with respect to certain tissues. Especially, when it comes to complex drugs and targeted drug delivery with tissue-specific carriers, it is extremely important to have a correspondingly complex *in vitro* model available for evaluation.

Therefore, in the course of this thesis, several *in vitro* systems including the *vasQchip* were selected and adapted for the characterization of therapeutically applicable nanoparticles or refined for the testing of chemotherapeutic agents. Thus, for the drug carrier Dox@AlO(OH) – nanoscale hollow spheres of aluminium oxide hydroxide filled with Doxorubicin – an improved mode of action compared to the free drug could be shown among others via experiments in the *vasQchip*, which was also attested in the animal model, but which does not result from conventional cell culture experiments. Similarly, nanoparticles made of the photoactive inorganic-organic hybrid material  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  (consisting of gadolinium ions and the phthalocyanine  $AIPCS_4^{4-}$ ) were tested in various *in vitro* systems for their suitability as substrate in the “photodynamic therapy”. In different models, cellular uptake, biocompatibility with and without illumination as well as photo activation in biological systems could be investigated and compared with pure phthalocyanine. Induced by illumination, the



nanoparticles showed a more distinct effect concerning the dissolution of cancerogenous cell aggregates and the suppression of angiogenesis, whereas without illumination a good compatibility was perceived. Hence, the broad *in vitro* testing already enabled a profound placement of the nanoparticle's therapeutic potential.

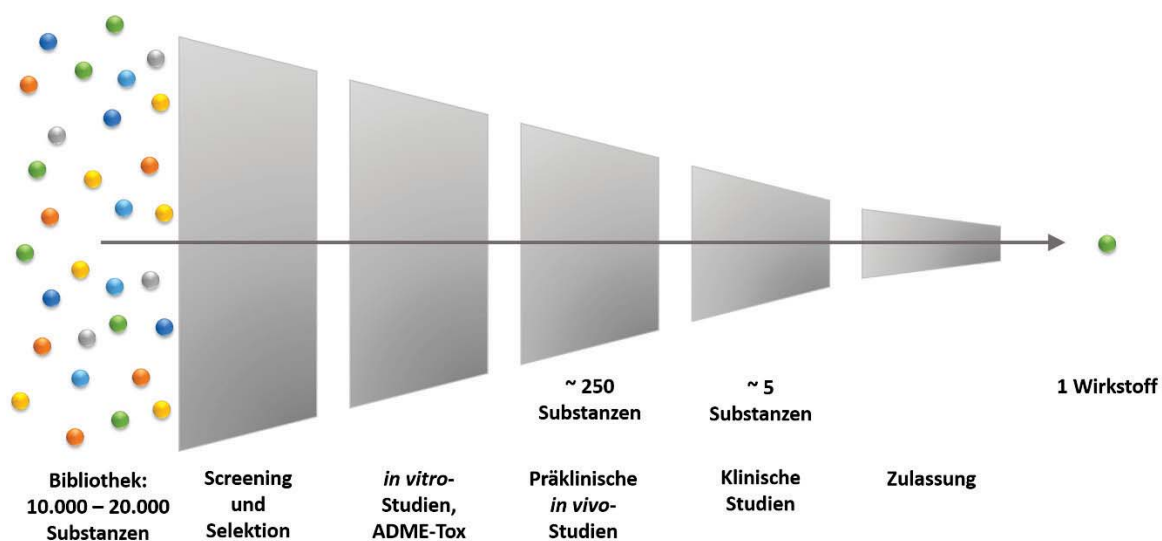
Besides their application in drug testing, advanced *in vitro* systems also qualify for the investigation of disease processes or the directed development of drugs. Such aims were pursued during a research stay at the *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering* using their own devised small airway models as test systems. On the one hand, a procedure was evaluated offering a non-invasive method by analysis of the exosomal RNA obtained from the cell culture medium to determine the state of the cells or tissues in culture. Thus, differentiation or a healing process of *in vitro* systems, for example, can be tracked at several times. With the acquired findings, for instance, a specific appraisal of biomarkers from body fluids could be established as potential medical application. On the other hand, the small airway model was used as a platform for an influenza infection. This enabled both the evaluation of the infection via the viral RNA and the determination of some test substances' influence on the degree of the infection. In addition, a phage display was performed in order to find a peptide blocking the protein DESC-1 involved in the infection process. Such a peptide could prove a promising candidate in the development of influenza medication. After a successful selection, it could be tested in the *in vitro* model and be further refined.

So all in all, the present thesis deals on the one hand with the introduction and evaluation of two therapeutic approaches with nanoscale structures (filled hollow spheres as carriers as well as photoactive hybrid materials). On the other hand, different *in vitro* systems from the research field of *tissue engineering* were used to test these nanoparticles and perform further therapeutically relevant studies, thus, demonstrating their impact in the investigation and evaluation of drugs.



## 2. Einleitung

Obwohl sich die Wissenschaft und Forschung heutzutage wahrscheinlich schneller entwickelt als jemals zuvor und kontinuierlich Errungenschaften leistet, steht sie weiterhin vor großen Herausforderungen, vor allem im Bereich der Gesundheitsversorgung.<sup>1</sup> Denn trotz vielerlei technischer Fortschritte, beispielsweise in der chemischen Synthese oder bei Computersimulationen von Biomolekülen, gibt es noch immer zahlreiche Erkrankungen, für die es keine ausreichend effizienten Medikamente gibt, darunter weit verbreitete Krankheiten wie Parkinson<sup>2</sup>, Alzheimer<sup>3</sup>, HIV<sup>4</sup> und Krebs<sup>5</sup>. Zwar können die Symptome teilweise behandelt oder der Krankheitsverlauf verzögert werden, jedoch stehen keine Therapien für eine vollständige Heilung zur Verfügung. Hinzu kommen immer wieder neue Krankheitsbilder wie beispielsweise erst kürzlich ausgelöst durch das Zika-Virus<sup>6,7</sup> oder durch multiresistente Bakterien.<sup>8-10</sup> Bei der großen Fülle an neu entwickelten Substanzen und Wirkstoffsystemen besteht eine der größten Herausforderungen in deren Untersuchung und Evaluierung. Dieser Prozess von den ersten Synthesen über zahlreiche Studien bis hin zur Markteinführung dauert heutzutage 12 - 15 Jahre und verschlingt mehrere Milliarden Euro.<sup>11,12</sup> Riesige Substanzbibliotheken, sowohl synthetischer Materialien als auch von Naturstoffen sowie deren Derivaten, werden auf ihre Affinität gegenüber (potentieller) Zielstrukturen, meist Enzymen oder Proteinen, hin analysiert und eingestuft. Leitstrukturen werden ausgewählt und weiter modifiziert, um in der Auslese möglichst gute, eindeutige Treffer zu erzielen.<sup>13,14</sup> Anschließend folgen *in vitro*-Experimente auf vereinzelt Zellen oder Zellschichten.<sup>15,16</sup> (Abb. 1) Bei der Beschleunigung dieser Prozeduren wird hauptsächlich auf einen möglichst hohen Durchsatz gesetzt: immer kleinere Probevolumen und immer mehr Automatisierung. Das 100 µl-Volumen einer 96er-Zellkulturplatte konnte man inzwischen auf Systeme im Nanoliter-Bereich reduzieren.<sup>17</sup> Sortiersysteme, Pipettierroboter und Programme zur (Bild-) Analyse können ohne Unterbrechung Tag und



**Abbildung 1: Stufen in der Medikamentenentwicklung.** (nach B. R. Ware & S. R. Khetani, 2017<sup>11</sup>) Aus einer Substanzbibliothek von 10.000 – 20.000 Verbindungen werden aussichtsreiche Kandidaten selektiert, angepasst und über *in vitro*-, *in vivo*- und letztlich klinische Phasen evaluiert bis schließlich 1 Wirkstoff als Medikament zugelassen wird.





Nacht arbeiten. Allerdings sind solche Tests natürlich lange nicht ausreichend, um ein potentiell wirksames Medikament ausgiebig zu charakterisieren. Daher sind als darauffolgende Stufe eine Reihe von *in vivo*-Studien im Tiermodell vorgeschrieben<sup>15, 16</sup>, ansteigend in der Anzahl an Tieren einer Versuchsgruppe sowie in deren Gattung von Nagern bis hin zu Primaten. Erst danach geht man in die klinische Phase über, in der erste Untersuchungen zur Verträglichkeit des potentiellen Wirkstoffs bei einer kleinen Anzahl gesunder, humaner Probanden vorgenommen werden. Trotz der starken bis dorthin vorgenommenen Selektion scheitern ab diesem Zeitpunkt immer noch über 90 % der Wirkstoffkandidaten.<sup>18-21</sup> Gründe dafür sind beispielsweise organspezifische Toxizität, häufig in der Leber, das Ausbleiben der gewünschten therapeutischen Wirkung, unerwartete Begleiterscheinungen, Probleme bei der Dosierung oder im drastischsten Fall starke Nebenwirkungen, etwa aufgrund von Wechselwirkungen mit dem menschlichen Immunsystem oder spezies-spezifischen Enzymen und Proteinen im menschlichen Körper.<sup>11, 19-23</sup> Diese hohe Misserfolgsquote macht die Wirkstoffentwicklung einerseits sehr kostenintensiv, da der klinischen Phase bereits jahrelange Studien voraus gehen, und andererseits gleichzeitig auch risikobehaftet, weil eine vollständige Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Versuchen mit einfachen Kulturen humaner Zelllinien und *in vivo*-Experimenten im Tiermodell auf den menschlichen Organismus nicht gegeben ist.<sup>22-25</sup> Zwar sind diese Systeme schon sehr lange im Einsatz und bieten hilfreiche Bewertungen und fundierte Anhaltspunkte, die humane Physiologie und spezies-spezifische Eigenschaften können aber nur bedingt abgebildet werden.<sup>26-28</sup> Die Probleme der Modelle in Bezug auf die Aussagekraft im menschlichen Organismus wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht und aufgezeigt, jedoch mangelt es zumeist an besseren oder umsetzbaren Alternativen.<sup>29-36</sup> Diese Insuffizienz ist unter anderem auch mit dem Ziel einer Behandlung komplexerer Erkrankungen und Krankheitsbilder zu begründen, für die spezifische Wirkstoffe ebenso wie moderne Therapiemethoden gesucht und getestet werden sollen. Daher beschäftigt sich ein weites und aufstrebendes Forschungsfeld mit dem sogenannten *Tissue Engineering*, der Entwicklung neuartiger *in vitro*-Modelle zur Nachbildung organspezifischer Gewebe und Rekonstruktion von Organen.<sup>37, 38</sup> Es handelt sich dabei um Herausforderungen auf einem interdisziplinären Gebiet als gemeinsame Aufgabe für Biologen, Chemiker, Mediziner, Physiker, Materialwissenschaftler und Ingenieure. Die entwickelten Systeme sollen durch den Einsatz humaner Zellen und Gewebe sowie genau regulierbare Versuchsbedingungen humanspezifischere Daten und somit zuverlässigere Prognosen liefern. Dadurch sollen einerseits ungeeignete Wirkstoffe bereits während der präklinischen Phase ausgeschlossen werden können, die Anzahl an durchgeführten sowie notwendigen Tierversuchen verringert werden, und andererseits auch die Sicherheit für die Probanden der klinischen Studien erhöht werden. Solche im Gebiet des *Tissue Engineering* erstellten *in vitro*-Modelle bestehen aus verschiedenen komplexen Kulturen beispielsweise durch die organotypische Kombination unterschiedlicher Zelltypen, durch die dreidimensionale Anordnung der Zellen und den Einsatz von Hydrogelen oder durch dynamische Systeme für miniaturisierte Geweberekonstruktionen, die sogenannten *Organ-on-a-Chip*-Modelle.

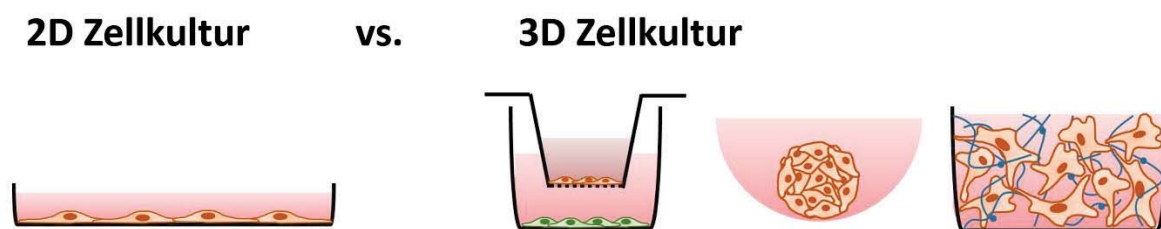


## 2.1. 2D und 3D Zellkultur

Diese weiterentwickelten Zellkultur-Modelle bieten durch den Übergang von den klassischen Versuchen mit zweidimensionalen Mono-Zellschichten hin zu dreidimensionalen Konstrukten und damit zu einer natürlicheren Umgebung der Zellen ein gewebespezifisches Verhalten der Zellen und somit zuverlässigere und aussagekräftigere Resultate.<sup>39-42</sup> Während sich die klassischen 2D Zellschichten auf einer Plastik- oder Glasoberfläche zwar dazu eignen, bestimmte zelluläre Mechanismen oder einfache Interaktionen beispielsweise der Zellmembran zu untersuchen, erscheinen sie für eine zunehmend komplexe Wirkstofftestung nur noch mäßig passend. Im Gegensatz zu der Situation in einem Gewebe weisen Zellen, die auf einer zweidimensionalen Oberfläche kultiviert werden, nur sehr wenige Zell-Zell-Kontakte auf, sondern stehen hauptsächlich in Verbindung mit der adhärennten Wachstumsfläche einerseits sowie der umgebenden Mediumschicht andererseits. Dabei ist das Volumen des Mediums für die entsprechende Kultivierung zwar notwendig, steht aber in einem großen Verhältnis zu den eingesetzten Zellen, so dass beispielsweise eine Anreicherung zellspezifischer Faktoren in entsprechendem Maßstab kaum möglich ist. Die Oberfläche auf der anderen Seite zeichnet sich durch eine hohe Festigkeit und keinerlei Elastizität aus, wodurch die Morphologie und das Verhalten der Zellen, wie spezifische Differenzierung oder genetische Expressionsmuster, geprägt werden. Die Adhäsion der Zellen ebenso wie eine Migration findet nur auf der planaren Ebene statt. Gleichfalls ist eine Interaktion mit extrazellulärer Matrix durch eine Beschichtung der Oberfläche auf diese Ebene beschränkt und die Polarität der Zellen damit vorgegeben. Die Etablierung eines Gradienten von löslichen Stoffen ist im Zweidimensionalen nicht möglich.<sup>40</sup> Dies alles sind gravierende Unterschiede des Zellwachstums in einer typischen (zweidimensionalen) Zellkultur gegenüber dem Gewebe innerhalb eines Organismus, die durch eine Kultivierung in dreidimensionalen Systemen verbessert werden sollen.<sup>43-45</sup> Denn ganz im Gegenteil zu planaren Oberflächen befinden sich Zellen natürlicherweise in einer räumlich komplexen, dreidimensionalen Umgebung und in Interaktion sowohl untereinander als auch mit spezifischer extrazellulärer Matrix. Diese Umgebungsbedingungen beeinflussen die Struktur der Zellen, ihr Adhäsionsverhalten, die Reaktion auf mechanische Einflüsse (Mechanotransduktion) oder die Signalwege innerhalb der Zellen und somit die Antwort auf äußere Einflüsse wie pH-Wert, Ionen-Gradienten oder lösliche Faktoren.<sup>46-49</sup> Über diese wiederum können die Zellen in einem Zellverbund untereinander kommunizieren und somit gegenseitig ihr Verhalten regulieren oder aufeinander abstimmen. Dies wird in dreidimensionalen Zellkulturen simuliert, indem beispielsweise durch das Aussäen in Hydrogelen als Matrix eine Wachstumsfläche in alle drei Dimensionen geschaffen wird, die auch die räumliche Ausbreitung und Migration der Zellen ermöglicht. Polarität und Adhäsionspunkte sind nicht vorgegeben und können mit der Morphologie in der flexiblen Umgebung individuell ausgebildet werden.<sup>39</sup> Gleichzeitig wird das Verhältnis von Zellen und Umgebung angepasst, so dass Zell-Zell-Kontakte vorherrschen und Interaktionen in alle Richtungen stattfinden. Hierbei findet durch die Einbettung kein uneingeschränktes Wachstum statt, vielmehr wird dieses durch sterische Hinderung reguliert. Ebenso ist durch den dreidimensionalen Aufbau die Ausbildung von Gradienten im System möglich.<sup>46-48</sup>

## 2.2. 3D Zellkultur-Modelle

Schon durch relativ einfache Methoden lassen sich die Kultivierungsbedingungen in eine dritte Dimension bringen und dadurch eine deutliche Anpassung im Verhalten der Zellen erzielen. Differenzierte Funktionen und eine gewebeartigere Organisation können in der 3D *in vitro* Kultur erreicht werden.<sup>49</sup> Dazu zählen unter anderem die Kultivierung von Sphäroiden, das Einbringen der Zellen in ein Hydrogel, die Anwendung extrazellulärer Matrix und das Aussäen auf spezielle Trägermaterialien. (Abb. 2) Bei solchen Trägern wird durch eine dreidimensionale Konstruktion bereits die Form für die entstehende Zellkultur vorgegeben. Die gebotene Wachstumsfläche bildet hier keine Ebene sondern erstreckt sich in verschiedene Richtungen, so dass sich die Zellen ebenfalls dreidimensional ausbreiten und interagieren können. Oft werden die Adhäsionspunkte zusätzlich durch spezielle Beschichtung kontrolliert und die Verteilung der Zellen somit gesteuert. So kann beispielsweise eine bestimmte Anordnung verschiedener Zelltypen erreicht werden.<sup>44, 50-52</sup> Auch Hydrogele können als eine solche dreidimensionale Matrix dienen.<sup>53-55</sup> Hier steht ein weites Feld an Materialien und Methoden zur Verfügung: von natürlichen Polymeren wie Alginat oder Agarose über Proteinstrukturen wie Fibrin oder Collagen bis hin zu chemisch synthetisierten, designten und modifizierten Polymeren wie Polyethylenglykol (PEG) oder Gelatin-Methacrylat (GelMA), und vom Schichten von Zellen und Gel über induziertpolymerisierende Suspensionen bis hin zum 3D-Bioprinting. Es muss spezifisch für die jeweilige Anwendung ausgewählt werden, um die richtigen Eigenschaften wie Steifheit, Vernetzungsgrad und Porengröße, Bindungsstellen, Art der Polymerisation und Handhabung bei der Erstellung der Kultur zu erhalten.<sup>56, 57</sup> Dabei muss einerseits die Zielsetzung des jeweiligen Experiments und die Umsetzbarkeit berücksichtigt werden, ebenso wie andererseits die verwendeten Zellen und Medien. Beispielsweise eignen sich Fibringele zur Kultivierung von Fibroblasten, da Fibrin den größten Bestandteil der extrazellulären Matrix dieser Zellen in natürlicher Umgebung ausmacht. Eine Suspension aus den Zellen sowie den Monomeren des Gels kann in Zellkultur-Gefäße eingebracht werden, woraufhin über wenige Minuten die Vernetzung der Gelstruktur stattfindet und die Zellen somit dreidimensional eingebettet werden. Ein anderes Beispiel ist die Kultivierung von Endothelzellen auf einem Gel einer spezifischen Mischung von Proteinen der extrazellulären Matrix (wie Geltrex®, Matrigel™ oder Cultrex®). Während die Aussaat der Zellen auf einer unbeschichteten Zellkulturplatte zu konfluentem Wachstum führt, wird bei der Kultivierung auf der EZM-Oberfläche eine



**Abbildung 2: Gegenüberstellung von 2D und 3D Zellkultur-Methoden.** Während Zellen in der klassischen 2D Zellkultur in Mono-Schichten auf planaren Plastik- oder Glas-Oberflächen wachsen, bieten die Methoden der 3D Zellkultur Alternativen. Zellen können als Ko-Kultur in Transwell®-Systeme eingebracht, in Sphäroiden kultiviert oder in einer Gel-Matrix etabliert werden.



netzartige Struktur ausgebildet. Diese kann der natürlichen Eigenschaft der Endothelzellen zur Angiogenese, also der Ausbildung neuer Blutgefäße, zugeschrieben werden. Bei anderen Zelltypen ist dieses Verhalten nicht zu erkennen.

Eine Methode zum Erstellen von dreidimensionalen Zellkulturen ohne eine Stützmatrix ist die Kultivierung von Sphäroiden.<sup>58-60</sup> Dabei werden aus adhärent wachsenden Zellen (meist Tumorzelllinien) solide, kugelförmige Zell-Aggregate geformt. Dies ist möglich, wenn den Zellen keine Wachstumsoberfläche geboten wird und sie somit ausschließlich auf die Ausbildung von Kontakten zueinander angewiesen sind, etwa durch das Aussäen von Zellsuspensionen auf beschichteten, zellabstoßenden Oberflächen (wie Agarose oder Agar), in hängenden Tropfen oder durch die Kultivierung in Spinnerflaschen. Solche Sphäroide werden häufig als Modell für avaskuläre Bereiche von Tumoren eingesetzt.<sup>59, 61</sup> Durch den engen Zellverband werden die im Inneren liegenden Zellen, zum Teil vollständig, von der frischen Zufuhr an Nährstoffen aus dem Medium abgeschlossen. Es bildet sich über den Sphäroid hinweg also ein Gradient von den außen liegenden Zellen, die weiterhin proliferieren, über einen hypoxischen Bereich mit geringer Sauerstoffzufuhr bis, je nach Größe, hin zu einem nekrotischen Bereich im Zentrum. Eine solche Verteilung ist auch in Tumorgewebe vorzufinden und bedingt die Regulierung von Zellteilung und Wachstum in den unterschiedlichen Regionen. Außerdem wird durch den bei Hypoxie entstehenden Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) der VEGF-Signalweg induziert und somit eine Angiogenese angeregt.<sup>62, 63</sup> Mit der Bildung neuer Blutgefäße soll die Versorgung des Gewebes gesichert und einer Nekrose vorgebeugt werden. Durch das oft verhältnismäßig schnelle Wachstum von Tumorgewebe muss für eine ausreichende Nährstoffzufuhr auch entsprechend schnell das vaskuläre System erweitert werden. Dies kann zu einer weniger dichten Barrierefunktion der Endothelschicht führen und somit einer erhöhten Durchlässigkeit von Stoffen aus dem Blutfluss in das Gewebe führen. Gleichzeitig wird die Ausbildung des Lymph-Systems durch das schnelle Wachstum vernachlässigt, was zu einer langsameren Ausschleusung von Stoffwechselprodukten oder anderen Substanzen führt. Beide Symptome sind zusammen als EPR-Effekt bekannt, welcher im folgenden Teil noch genauer erläutert wird. (Kapitel 2.5) Desweiteren kann durch den Zellverband der Sphäroide auch ein Tumor-ähnlicheres Milieu (zum Beispiel mit einem gesenkten pH-Wert und speziellen Proteinen) entstehen. Durch die Abgabe spezifischer Faktoren und die Ausbildung einer typischen extrazellulären Matrix innerhalb des Gewebes durch die Zellen, wird eine andere Mikroumgebung geschaffen als sie bei einer zweidimensionalen Zellschicht möglich ist. Sphäroide bilden daher auch eine gewebe-ähnlichere Oberfläche und somit Angriffsfläche und Zugänglichkeit für potenzielle Wirkstoffe, inklusive der starken Zell-Zell-Interaktionen, der veränderten Dauer zum Ausschleusen von Stoffen oder der Stilllegung von Zellen.<sup>59, 61</sup>

### 2.3. Organ-on-a-Chip-Systeme

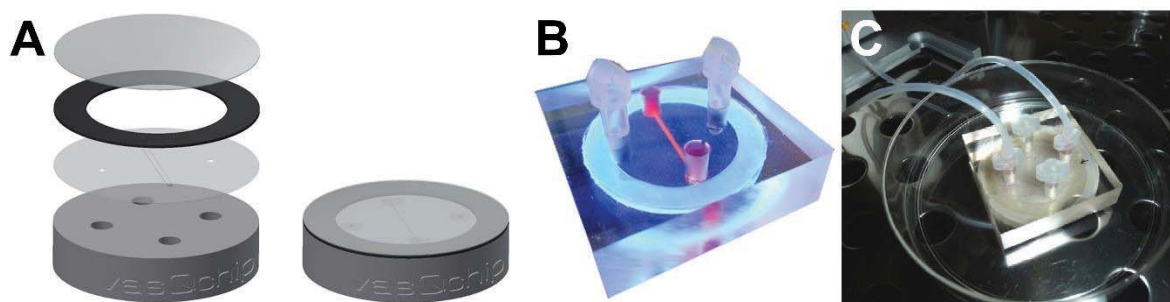
Inspiziert durch die Effekte und Erfolge der dreidimensionalen Zellkultur wurden die angewandten *in vitro*-Systeme weiterentwickelt und neue Modelle etabliert. Um die räumliche Anordnung, eine gleichmäßige Versorgung, Interaktionen und Grenzflächen verschiedener Gewebe und auch die dynamische Umgebung eines lebenden Organs besser abzubilden, wurde



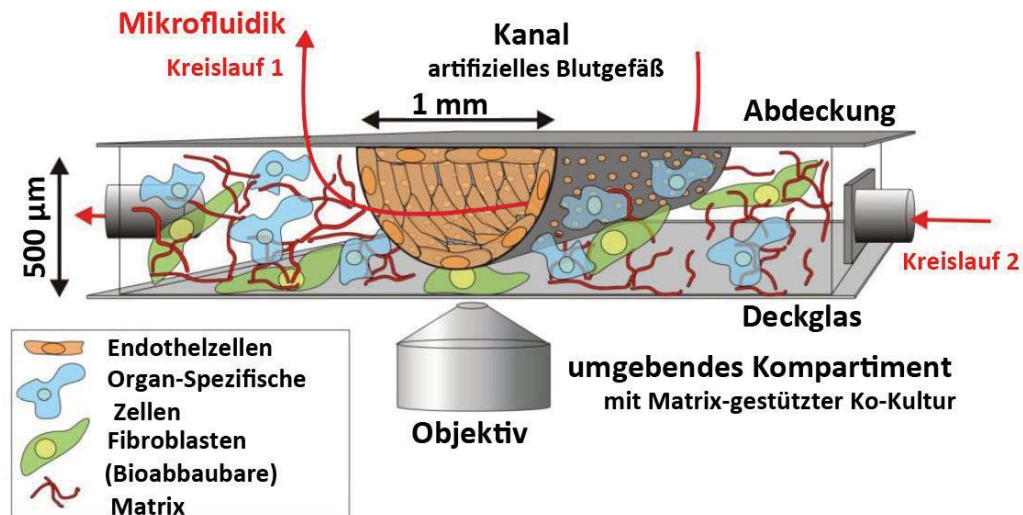
neben den vorgestellten 3D Kulturen auf andere Anwendungen zurückgegriffen oder diese miteinander kombiniert. Eine weit verbreitete Kultivierungsmethode stellen dabei sogenannte Transwell®-Systeme dar.<sup>58</sup> Diese bestehen aus zwei durch eine poröse Membran getrennten Kammern zum Einbringen unterschiedlicher Zelltypen, die über diese Membran in Kontakt stehen. Besonders interessant ist dieses Modell zur Darstellung biologischer Barrieren<sup>64-66</sup>, für Studien zur Chemotaxis<sup>67-69</sup> und zur Untersuchung von Transportvorgängen oder Stoffaustausch der verschiedenen Gewebe.<sup>70, 71</sup> Zentral ist dabei in vielen Fällen das Wechselspiel zwischen dem vaskulären System und einem Organ, also einer Endothel- und einer Epithel-Kultur. Die eingesetzte poröse Membran bietet dabei die Möglichkeit zur Ausbildung einer dichten Endothelschicht, die mit einer anliegenden, organotypischen Kultur in Kontakt steht und die Weitergabe von Nährstoffen oder anderen Substanzen aus der oberen Mediumschicht regulieren kann. Ein Defizit des Systems jedoch ist die statische Kultivierung. Es fehlt eine dynamische Umgebung, wie sie in einem Organismus durch die Blutzirkulation vorliegt und unter anderem essentiell ist für eine natürliche Ausbildung von differenzierter Morphologie, Funktionen und Verhalten der Endothelzellen.<sup>72-74</sup> Für eine weiter verbesserte Nachbildung folgten demnach als nächste Stufe die sogenannten *Organ-on-a-Chip*-Systeme, die die lebenden Zellkulturen mit Mikrostrukturen und mikrofluidischen Strömungen kombinieren.<sup>49, 75-78</sup> Dadurch können miniaturisiert organische Umgebungen geschaffen werden, die in biologischer und chemischer Zusammensetzung sowie durch Einwirkung physikalischer Stimuli Ausschnitte menschlicher Organe widergeben. Dieses Konzept ist bereits in zahlreichen Varianten für unterschiedliche Arten von Geweben oder Organen umgesetzt worden, darunter Leber-, Haut-, Nieren- oder Tumor-Modelle, aber auch komplexere Strukturen wie Darm, Lunge oder Blut-Hirn-Schranke bis hin zu Plazenta oder Retina.<sup>77, 79-85</sup> Die Herangehensweisen dabei sind je nach Anwendungsgebiet sehr unterschiedlich und umfassen Modelle für Hochdurchsatz-Versuche, Systeme mit einer möglichst genauen Reproduktion der organspezifischen Physiologie oder zur Kombination mehrerer *in vitro*-Organe bis hin zur Erstellung eines *Body-* oder *Human-on-a-Chip*-Modells.<sup>86-89</sup> Der besondere Reiz dieser Systeme ergibt sich aus den Vorteilen, die sie sowohl gegenüber den klassischen Zellkultur-Methoden haben wie auch gegenüber den *in vivo*-Versuchen im Tiermodell. Wie in anderen *in vitro*-Versuchen besteht ein großer Vorteil dabei in der Nutzung von humanen Materialien, hier jedoch in einer komplexen Umgebung, so dass eine natürlichere Physiologie der Zellen erreicht werden kann.<sup>49</sup> Hinzu kommen die Möglichkeiten einer konstanten Überwachung und Analyse aller Komponenten sowie die individuelle Beeinflussung einzelner Parameter und Inkubationsbedingungen wie den Umgebungseinflüssen, der Konzentration von Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren oder die exakte Dosierung von Wirkstoffen. Dadurch erleichtert sich auch die Reproduzierbarkeit von Versuchsbedingungen und eine höhere statistische Relevanz wird ermöglicht. Unterschiedliche Modelle können dabei zur Untersuchung einzelner Teilaspekte, wie Transportvorgängen oder spezifischen Wirkmechanismen, beitragen und somit durch oft eindeutige Ergebnisse ein klares Gesamtbild entstehen lassen. Im Vergleich zu Tierversuchen sind sie zudem meist günstiger, schneller, eignen sich für ein breiteres Screening von Substanzen und

geben Aufschlüsse über Aktivitäten auf zellulärer Ebene (in humanen Geweben). Daneben erlauben sie die gezielte Simulation von Krankheitsbildern, wie Infektionen oder Entzündungen, und deren Vergleich unter verschiedenen Behandlungen.

Viele der bereits etablierten *Organ-on-a-Chip*-Modelle integrieren ein Blutgefäß bzw. die Grenzfläche eines Blutgefäßes zu einem Organ durch eine angeschlossene Mikrofluidik. Diese Systeme sind entweder sehr aufwendig in der Generierung oder es handelt sich dabei zumeist, ähnlich wie bei dem beschriebenen Transwell®-System, um eine flache Membran, die zwei Kompartimente oder Kanäle voneinander abtrennt und eine Besiedelung mit Zellen auf beiden Seiten zulässt. Obwohl so das Defizit der statischen Kultivierung der Endothelzellen behoben ist, hat dieser Aufbau immer noch den Nachteil, dass die ebene Wachstumsfläche nicht der natürlichen runden Form der Blutgefäße entspricht. Eine eckige Kanalform beeinträchtigt die Bildung kontinuierlicher Zell-Zell-Interaktionen und resultiert in anderen Fließverhalten, -geschwindigkeiten und -strömungen und beeinflusst somit die entstehenden Scherkräfte, die auf die jeweiligen Zellen wirken.<sup>72, 90</sup> Um eine natürlichere Kultivierung von Endothelzellen zu ermöglichen und somit ein *in vivo*-ähnliches Blutgefäß zur Untersuchung transendothelialer Transportvorgänge zu erstellen, wurde auch am KIT in einer Zusammenarbeit der Institute für Toxikologie und Genetik (ITG) sowie für Biologische Grenzflächen (IBG-1) ein solches Chip-Modell, der *vasQchip* (ursprünglich bezeichnet als  $\mu$ 3DVasc Bioreaktor), entwickelt.<sup>74, 91, 92</sup> Zentrum dieses Modells ist ein mikrofluidischer Kanal aus einer halbrunden, porösen Membran, welcher durch einen Thermoform-Prozess hergestellt wird und nach der Besiedelung mit Endothelzellen ein durchströmtes Blutgefäß simuliert. (Abb. 3) Dieser Kanal ist umgeben von einem weiteren Kompartiment, das ebenfalls Zugänge für eine Fluidik bietet und der Etablierung einer das artifizielle Blutgefäß umschließenden 3D Zellkultur dient. (Abb. 4) Zusammen wird durch den *vasQchip* somit die Rekonstruktion eines durchbluteten Gewebes ermöglicht, welches als Modell zur Untersuchung von Transportvorgängen aus dem Blutgefäß in ein anliegendes Gewebe (oder umgekehrt) genutzt werden kann. Aufgrund des durchsichtigen Aufbaus und dem Verschluss mit einem dünnen Deckglas ist es möglich, alle Abläufe im Chip jederzeit mikroskopisch zu beobachten und aufzunehmen. Die im Kanal eingebrachten Endothelzellen werden auf der gekrümmten Oberfläche sowie unter dem Einfluss der Scherkräfte des ständigen Mediumflusses kultiviert, so dass Morphologie und Genexpression wie in der natürlichen



**Abbildung 3: Zusammensetzung des vasQchips.** Nach der Herstellung des porösen Mikrokanals wird der vasQchip aus dem PMMA-Block mit vier Luer-Öffnungen, der PC-Membran mit dem Kanal, einem Ring aus Klebefolie als Abstandshalter sowie dem verschließenden Deckglas zusammengebaut (A). So entstehen der Kanal mit Anschlüssen an die Mikrofluidik (rot) sowie das zweite, umgebende Kompartiment (blau) (B). Für die Kultivierung wird das untere Kompartiment des vasQchips verschlossen und der Kanal mit dem Pumpsystem verbunden. Die Fluidik verläuft hier durch die Schläuche und den Kanal von rechts nach links (C).



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau des vasQchips.** (nach I. Hebeiß, 2012<sup>91</sup>) Das mikrofluidische Modell eines Blutgefäßes besteht im Zentrum aus einem halbrunden, porösen Kanal, welcher mit einer Schicht von Endothelzellen ausgekleidet wird. Ein umgebendes Kompartiment dient der Ko-Kultivierung eines organotypischen Gewebes. Der transparente Aufbau ermöglicht die mikroskopische Untersuchung und Analyse beispielsweise von transendotheliale Transport oder gewebespezifischer Anreicherung von Substanzen.

Umgebung daran angepasst werden. Diese Endothelschicht aus HUVEC wurde von I. Hebeiß (2012)<sup>91</sup> und D. Ivannikov (2015)<sup>92</sup> etabliert, optimiert und ausführlich charakterisiert. So werden bei der Kultivierung im *vasQchip* eine natürliche Ausrichtung des Aktinzytoskeletts und der Zellmorphologie entlang der Flussrichtung und nur geringe Proliferationsraten, wie sie auch *in vivo* bekannt sind, beobachtet. Außerdem ist eine Langzeitkultivierung der Zellschicht über mehrere Wochen möglich. Die HUVEC erreichen dabei eine hohe Konfluenz und bilden ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte (*Tight Junctions*) aus, welche spezifisch nachweisbar sind. Auch die Funktionalität der Endothelschicht konnte gezeigt werden, beispielsweise wurde eine Transmigration von Immunzellen aus der Fluidik in das angrenzende Kompartiment induziert oder die Permeabilität der HUVEC-Schicht quantifiziert. Damit konnte auch die Versorgung des zweiten Kompartiments durch den Mediumfluss im Kanal gezeigt werden, ohne die Notwendigkeit hierfür eine zweite kontinuierliche Fluidik zu verbinden. Generell ermöglicht dieses Kompartiment das Einbringen angrenzender organotypischer 3D Zellkulturen verschiedenster Art. Dabei wurden bereits verschiedene Ansätze verfolgt und umgesetzt, wie die Etablierung einer Blut-Hirn-Schranke oder einer Leber-Kultur.<sup>92</sup> Gegenstand aktueller Projekte sind die Entwicklung von Haut-, Gehirn- sowie Tumorgeweben. Letztere sind von großem Interesse für eine mögliche Testung komplexer, chemotherapeutischer Wirkstoffe, welche ein großes Potential bieten, in konventionellen *in vitro*-Systemen aber nur unzureichend analysiert werden können. So eröffnet der *vasQchip* als Modell des vaskulären Systems einerseits Möglichkeiten zu Untersuchungen von endothelialer Aufnahme sowie des transendothelialen Transports. Durch das Einbringen spezifischer Gewebe als Ko-Kultur lassen sich andererseits Spezifitäten von Substanzen oder (Wirkstoff-) Transportern gegenüber bestimmter Organe oder Tumoren feststellen, was in *in vitro*-Modellen bisher kaum möglich ist.



## 2.4. Tumorthherapie

Die Entwicklung neuer Chemotherapeutika und Wirkstoffe gegen Krebserkrankungen ist noch immer ein weites und wichtiges Forschungsfeld. Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen diese in der westlichen Welt die zweithäufigste Todesursache dar. Auch wenn heute etwa die Hälfte aller Betroffenen mit der Diagnose Krebs geheilt werden können und überleben, stellt die gezielte Bekämpfung von Tumorgeweben und Metastasen im menschlichen Körper noch immer große medizinische Herausforderungen dar. Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr rund 500.000 Menschen neu an Krebs, etwa eine viertel Million pro Jahr sterben.<sup>93-95</sup> Zur Behandlung sind zahlreiche Chemotherapeutika im klinischen Alltag in Gebrauch. Die Wirkung dieser Stoffe beruht auf ihren zytostatischen Eigenschaften, hervorgerufen durch die Beeinflussung der DNA-Replikation, Induktion von DNA-Schäden, Blockierung von Reparaturmechanismen oder der Interaktion mit der Zellmembran.<sup>96</sup> Einsatz und Dosierung der Medikamente sind jedoch meist durch die starken Nebenwirkungen sehr eingeschränkt, so dass die Bekämpfung von Tumoren oft langwierig und dennoch risikobehaftet bleibt.<sup>97-99</sup> Kanzerogenes Gewebe entsteht durch eine genetische Veränderung in den Zellen, entweder durch vererbte Gendefekte oder durch äußere Einflüsse wie den Kontakt mit bestimmten Chemikalien, die Aussetzung von Strahlung, körperliches Übergewicht, die Infektion mit Papillomviren, die Aufnahme von Aflatoxinen (aus Schimmelpilzen) und andere mehr.<sup>95, 100-106</sup> Wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen versagen und auch die Apoptose, der kontrollierte Zelltod, nicht eingeleitet werden kann, sind die Kontrolle über Wachstum und Zellteilung verloren, so dass diese dereguliert stattfinden. Durch die Zellteilung wird die vorliegende Mutation auch auf Tochterzellen weitergegeben, wodurch ein defektes Gewebe entsteht. Bei fortschreitender Ausprägung können sich von diesem Primärtumor wiederum einzelne Zellen lösen, über das Blutssystem im Körper wandern und sich in anderen Organen als Metastasen anlagern.

Neben der operativen Entfernung von Tumorgeweben kann eine Therapie mit Chemotherapeutika oder/ und Bestrahlung (Kapitel 2.6) erfolgen. Als Zytostatika greifen Chemotherapeutika in den Wachstumsvorgang der schnell proliferierenden Krebszellen ein, indem essentielle Prozesse der Zellteilung gestört werden. Da diese Wirkung aber generell bei der Proliferation von Zellen eingreift, wie sie auch bei normalen, gesunden Vorgängen im Körper stattfindet, geht die Chemotherapie zumeist mit der Schädigung anderer Organe und unangenehmen Nebenwirkungen (wie Übelkeit, Blutarmut und Haarausfall) einher.<sup>98</sup> Basierend auf diesen Tatsachen wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um gewebe- oder tumorspezifische Chemotherapeutika, zum Beispiel durch das Kuppeln mit speziellen Tumormarkern oder durch Verkapselungen des Wirkstoffs, zu generieren. Dadurch soll beispielsweise dafür gesorgt werden, dass sie zielgerichtet zum malignen Gewebe transportiert oder spezifisch aufgenommen werden, dass sie eine spezielle Aktivierung benötigen, um den Wirkstoff freizusetzen, dass sie durch bessere Löslichkeit oder geringere Nebenwirkungen eine höhere Dosierung erlauben, dass sie biologische Barrieren besser überwinden können, oder dass sie geschützt sind vor metabolischem Abbau im Organismus.<sup>107</sup> Dazu eignen sich verschiedene Methoden, wie zum Beispiel die Markierung mit spezifischen Transportermolekülen (wie Peptiden, Peptoiden, Proteinen, kleinen organischen Molekülen, Antikörpern), die Komplexbildung mit organischen



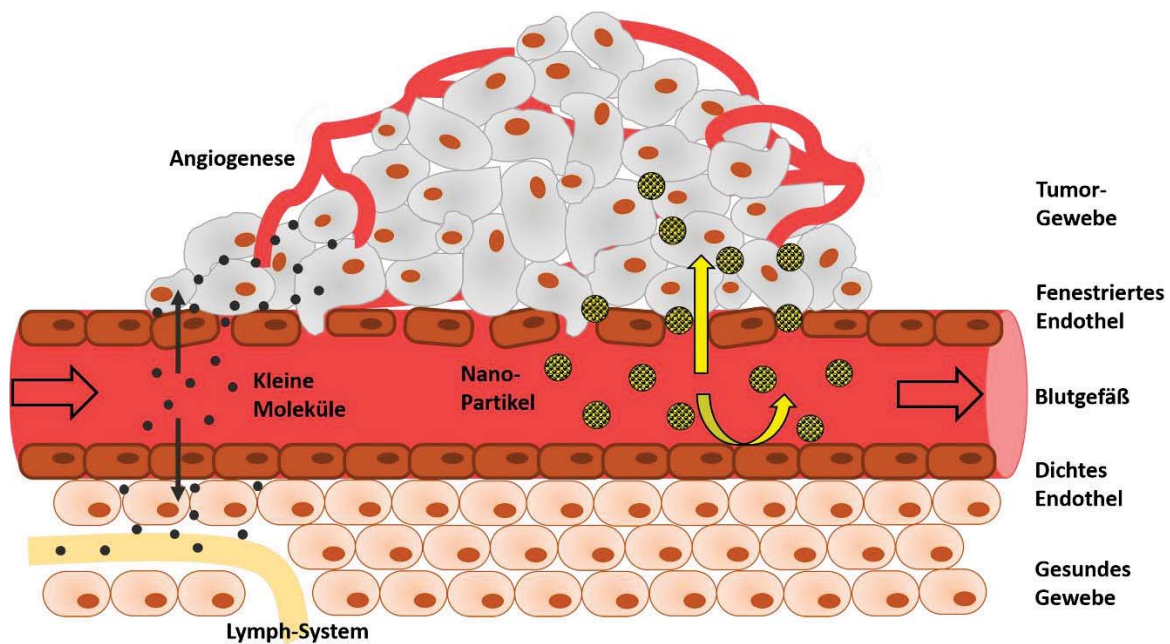


oder anorganischen Stoffen oder die Verpackung beispielsweise in Liposomen, Polymeren, Dendrimeren, organischen Containern oder auch anorganischen Hohlkugeln.<sup>107-110</sup> Ein solches Einschließen von Wirkstoffen kann viele Einschränkungen der herkömmlichen Darreichung umgehen, indem beispielsweise die Löslichkeit verbessert, ein metabolischer Abbau im Organismus verhindert und die lokale Wirkstoffkonzentration erhöht werden kann. So konnten beispielsweise für das Chemotherapeutikum Doxorubicin durch eine Verpackung in Liposomen, welches als Caelyx® bzw. Doxil® seit 1995 klinisch zugelassen ist, erstmals die Nebenwirkungen deutlich verringert werden.<sup>111</sup> Wichtig bei der Verkapselung von Wirkstoffen ist neben einer möglichst hohen Beladungskapazität, den ungewollten Austritt während des Transports im Blutkreislauf so gering wie möglich zu halten und die Freisetzung am Zielgewebe wiederum kontrolliert und am besten vollständig zu erreichen. Für chemotherapeutische Wirkstoffe muss dies somit spezifisch durch das herrschende Tumor-Milieu oder durch eine externe Anregung geschehen. Neben einer thermischen, magnetischen oder Strahlen-Behandlung von außen, kann durch die Wahl des Verpackungsmaterials auch die spezifische Tumor-Umgebung ausgenutzt werden. Aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität von kanzerogenem Gewebe herrscht dort ein niedrigerer pH-Wert als in sonstigen Geweben und der Blutbahn (pH-Wert ~6 vs. pH-Wert 7,4),<sup>112</sup> so dass eine säureinduzierte Änderung der Transporter-Hülle für die Freisetzung des Wirkstoffs genutzt werden kann. Dadurch kann der freigegebene Wirkstoff ohne die Verpackung von den Zellen im Gewebe aufgenommen werden. Aber auch eine endosomale Aufnahme des gesamten Transporters in die Zellen ist möglich. Hier wird das System während der endosomalen Reifung ebenfalls einem sauren Milieu von pH = 6.0 - 4.8 ausgesetzt,<sup>113</sup> so dass die Verkapselung geöffnet wird und der Wirkstoff durch einen Endosomaaustritt ins Zytosol und andere Kompartimente der Zellen gelangt.

## 2.5. Gezielter Transport von Wirkstoffen

Eine gezielte Ansteuerung mit Antikörpern oder gewebespezifischen Liganden ist für Tumorgewebe aufgrund ihrer hohen Diversität und Komplexität sehr schwierig.<sup>107, 114, 115</sup> Es sind über 300 Arten von Krebs bekannt,<sup>95</sup> wobei diese nicht nur untereinander verschieden sind, sondern auch selbst kein homogenes Gewebe bilden und sich über die Zeit je nach Stadium verändern.<sup>116</sup> Daher gibt es für den aktiven Transport von Wirkstoffen verschiedene Ansätze, die als Ziel entweder Rezeptoren verwenden, die zwar nicht ausschließlich am kanzerogenen Gewebe vorzufinden sind, dort aber überexprimiert werden und somit vermehrt vorliegen, oder die nicht den Tumor selbst sondern das umliegende Gewebe ansteuern. Für beide Varianten muss das jeweilige Ziel entsprechend häufig und gleichverteilt vorliegen, um den gewünschten Effekt zu erzielen.

Daneben lässt sich aber auch das in Tumorgeweben vorzufindende Phänomen einer erhöhten Durchlässigkeit und Einbehaltung, der sogenannte EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*), für eine passive Anreicherung bestimmter Stoffe im Gewebe ausnutzen.<sup>117-119</sup> (Abb. 5) Diese Art der Ansteuerung zählt zur sogenannten passiven gezielten Pharmakotherapie und beruht auf physikalischen und biochemischen Unterschieden zwischen Tumorgewebe



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des EPR-Effekts von Tumorgeweben.** (nach M. Fox et al.<sup>120</sup>) Ein fehlerhaft ausgebildetes und fenestriertes Endothel am Tumorgewebe sorgt für eine erhöhte Durchlässigkeit und Aufnahme von (Wirk-)Stoffen in das Tumorgewebe (enhanced permeability), während ein unzureichendes Lymph-System eine schnelle Ausschleusung verhindert und die Anreicherung von Substanzen im Gewebe begünstigt (enhanced retention). Dies wird als EPR-Effekt bezeichnet und kann für die passive Ansteuerung von Tumorgeweben mit Wirkstoffen genutzt werden.

und gesundem Körpergewebe. Zu diesen gehört aufgrund der unkontrollierten Proliferation und des schnellen Wachstums die übermäßige Angiogenese schon ab sehr geringen Größen, um stets eine ausreichende Nährstoffversorgung sicherzustellen. Diese neu ausgebildeten Blutgefäße weisen in Form und Aufbau besondere Eigenheiten und Schwächen auf. So sind sie im Vergleich zu sonstigen Kapillaren aus Endothelzellen mit deutlich vergrößerten Durchlässen, sogenannten Fenestrierungen, aufgebaut, was die Aufnahme von verschiedenen Stoffen erleichtert bzw. überhaupt ermöglicht. Durch das konstante Wachstum von Blutgefäßen kommt es an vielen Stellen zum kurzzeitigen Abbau der endothelialen Konnektivität durch eine Auflösung der *Tight Junctions* und damit zu den genannten Fenestrierungen des Endothels mit bis zu 600 nm großen Öffnungen.<sup>121</sup> Die Aufnahmefähigkeit wird zusätzlich durch den Stoffwechsel der Tumorzellen begünstigt, da hier Faktoren sekretiert werden, welche die Permeabilität steigern, darunter Proteasen und VEGF, die die Angiogenese anregen, sowie Stickstoffoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO), Kinine und Zytokine, wie sie auch bei Entzündungen auftreten.<sup>122, 123</sup> Im Gegensatz zur überdurchschnittlichen Durchblutung ist das Lymph-System im Tumorgewebe hingegen aufgrund der hohen Wachstumsrate eher mangelhaft und kaum ausgebildet, so dass eine Ausleitung von Flüssigkeiten, Stoffwechselprodukten oder anderen Substanzen nicht gewährleistet ist. Damit begünstigt diese unzureichende Drainage-Aktivität zusätzlich die passive Anreicherung von Substanzen gewisser Größenordnung im Gewebe. Neben der - für Tumorgewebe sehr komplexen - aktiven Ansteuerung eignen sich somit auch Stoffe die mittels EPR-Effekt im kanzerogenen Gewebe angereichert werden zur gezielten Therapie. Während kleine Moleküle durch Diffusion in nahezu jedes Gewebe eindringen können und große Partikel schnell durch Makrophagen aus der Blutbahn entfernt

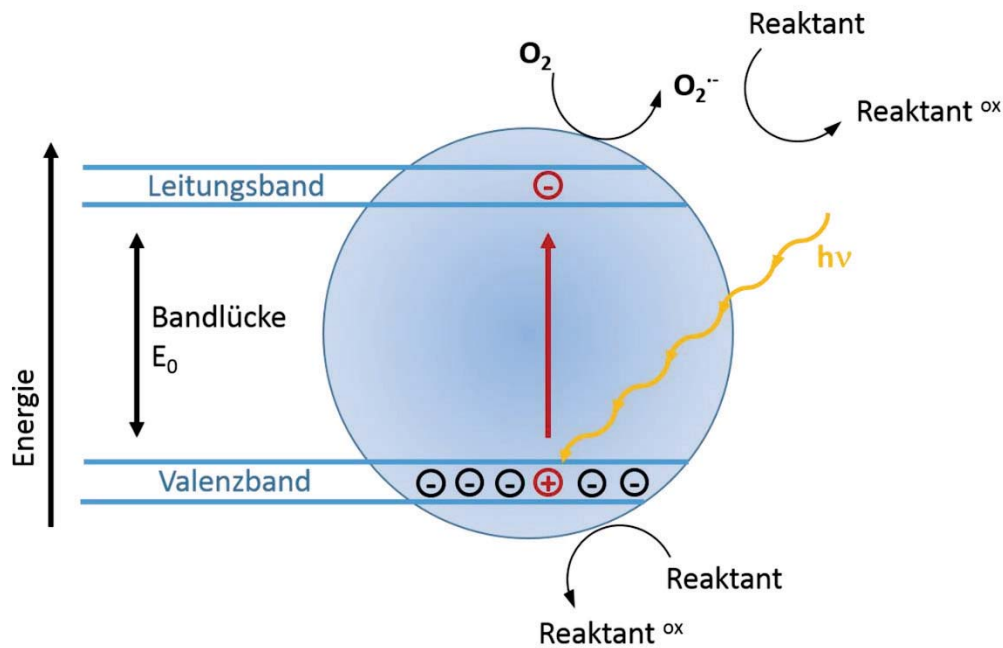


werden, hat sich eine Größenordnung von  $50 \pm 20$  nm, also im nanopartikulären Bereich, als geeignet für das Eindringen und die Rückhaltung in Tumorgewebe herausgestellt.<sup>124, 125</sup> Durch die Entgiftungs- und Ausscheidungsorgane Leber, Milz und Niere, die ebenfalls fenestriertes Endothel aufweisen, können auch solche Partikel letztendlich jedoch auch aus dem Organismus geklärt werden.<sup>126-128</sup>

## 2.6. Photodynamische Therapie

Durch Ausnutzung des EPR-Effekts eignen sich Nanostrukturen nicht nur als mögliche Transporter von chemotherapeutischen Wirkstoffen, sondern können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften auch selbst als Therapeutika eingesetzt werden, um in Tumorgewebe zu wirken.<sup>129-133</sup> Dabei geht es vor allem um Alternativen zur Chemotherapie, wie die thermische oder die Strahlen-Therapie. Hier ist die sogenannte „Photodynamische Therapie“ (PDT) ein vielversprechender Ansatz, der als minimal invasiv und unschädlich für gesundes Gewebe gilt, da das kanzerogene Gewebe gezielt bestrahlt werden kann und somit auch nur dort der Effekt des Wirkstoffs aktiviert wird.<sup>134-136</sup> Anorganische Nanopartikel gelten durch ihre häufige photokatalytische Aktivität als besonders geeignet für den Einsatz als Substrat in einer solchen Bestrahlung. Durch ihre Fähigkeit zur Erzeugung von chemischer Energie induziert durch Photonen haben Photokatalysatoren weite Einsatzgebiete: von der Wasseraufbereitung, über Energiegewinnung oder Desinfektion bis hin zum medizinischen Einsatz in der Photodynamischen Therapie.<sup>137-140</sup> Dabei sind die für die PDT eingesetzten photoaktiven Substanzen generell aber weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen, um weitere Optimierungen zu erzielen. Grundlegende Eigenschaft solcher Photosensibilisatoren ist eine allgemein niedrige Toxizität in biologischen Systemen, aber ein signifikanter Anstieg der Zytotoxizität bei Belichtung, etwa durch die photoinduzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).<sup>141, 142</sup> Durch die Absorption von ausreichend energetischen Photonen ( $E \geq$  Bandlücke  $E_0$ ) durch den Photosensibilisator können Elektronen vom Valenz- in das Leitungsband angeregt werden. (Abb. 6) In diesem Zustand wiederum können sie andere Moleküle wie Sauerstoff oder Biomoleküle in einem Gewebe reduzieren. Die so entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies reagieren mit den Doppelbindungen zum Beispiel in der DNA oder in Lipiden und schädigen somit Zellen und Gewebe gravierend.<sup>134, 141, 143</sup>

Prinzipiell unterscheidet man zwei Kategorien von Photosensibilisatoren, die in der PDT zum Einsatz kommen. Auf der einen Seite nutzt man organische Moleküle, wie Porphyrine oder Thiazine<sup>144-146</sup>, welche über ein weites Spektrum von Wellenlängen angeregt werden können. Allerdings sind die schlechte Löslichkeit in höheren Konzentrationen und die oft starke Aggregation unter physiologischen Bedingungen sowie die dadurch bedingte geringe Bioverfügbarkeit gravierende Nachteile.<sup>144, 147, 148</sup> Es gibt diverse Ansätze, um diese Defizite zu überwinden oder auszugleichen, beispielsweise wie oben beschrieben durch eine Verkapselung der Wirkstoffe oder eine weitere Funktionalisierung durch Liganden.<sup>149</sup> Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, die aktiven Gruppen der Photosensibilisatoren nicht zu blockieren und auch generell die Komplexität eines Wirkstoffs nicht zu sehr zu erhöhen. Auf der anderen Seite



**Abbildung 6: Prinzip der Photokatalyse.** (nach A. Mills & S. Le Hunte<sup>141</sup>) Trifft ein Photon ( $h\nu$ ) mit ausreichender Energie ( $\geq$  der Bandlücke mit  $E_0$ ) auf einen Photosensibilisator, werden die Elektronen ( $-$ ) im voll besetzten Valenzband so stark angeregt, dass sie in das unbesetzte Leitungsband übergehen. Dabei hinterlassen sie positive Löcher ( $+$ ). In diesem Zustand kann einerseits Sauerstoff reduziert werden und somit ROS bilden, welche mit umgebenden Molekülen reagieren, sowie andererseits Reaktanten auch direkt oxidiert werden. Ohne Lichteinstrahlung oder bei zu niedriger Energie bleibt der Grundzustand erhalten.

werden wie erwähnt anorganische Nanopartikel eingesetzt, beispielsweise Metalloxide (wie  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ) oder Seltene-Erden-Verbindungen (wie  $\text{Yb}^{3+}$ ).<sup>140, 150-152</sup> In vielen Fällen haben solche Nanopartikel den Nachteil, dass sie mit hochenergetischer Strahlung im UV-Bereich aktiviert werden müssen, welche aber aufgrund der Schädigung von Biomolekülen bei einer therapeutischen Anwendung gefährlich für alle Zellen und Gewebe ist. Zudem ist oft eine Anregung mit hoher Photonendichte und somit der Einsatz von Laser-Strahlung nötig, welche dieselben beschriebenen Nebenwirkungen aufweist. Allgemein ist die Anwendung einer Strahlung mit geeigneter Wellenlänge ein kritischer Punkt beim Prozess der PDT: Einerseits kann mit hochenergetischem Licht im UV-Bereich zwar mehr Aktivität erzeugt werden, andererseits aber wird mit langwelligem Licht im IR-Bereich eine höhere Eindringtiefe in Gewebe und eine bessere Biokompatibilität gesunder Gewebe erreicht.<sup>153</sup> Auch der Einsatz gemischter Wellenlängen für eine effektive PDT ist umstritten, da der dadurch induzierte oxidative Stress in verbleibenden Tumorzellen zu einer Aktivierung von Wachstumsvorgängen führen und auch die Neubildung von Blutgefäßen einleiten kann.<sup>135, 154, 155</sup> Daher werden für die Entwicklung von Wirkstoffen gezielt Substanzen gesucht, die eine hohe Aktivität bei Anregung im IR-oder N-IR-Bereich aufweisen.



### 3. Zielsetzung

Im Rahmen dieses Projekts sollten verschiedene *in vitro*-Modelle für die Testung von Wirkstoffen und Wirkstofftransportern untersucht, angepasst und evaluiert werden. Im Fokus standen dabei einerseits zwei therapeutisch einsetzbare Nanopartikel, die es zu charakterisieren galt, sowie andererseits fortschrittliche *in vitro*-Systeme mit dreidimensionalen Zellkulturen und in mikrofluidischen *Organ-on-a-Chip*-Modellen.

Bei den untersuchten Nanopartikeln wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Einerseits handelte es sich um anorganische Hohlkugeln, welche als Container für den Transport von Wirkstoffen hergestellt wurden. In diesem Fall wurde zur Befüllung das Chemotherapeutikum Doxorubicin verwendet, welches klinisch zugelassen und durch Fluoreszenz im roten Spektrum leicht nachzuerfolgen ist. Die Funktionalität dieses Wirkstofftransporters sollte in verschiedenen *in vitro*-Modellen mit der von freiem Doxorubicin ebenso wie mit bekannten *in vivo*-Werten verglichen werden. Die zweiten Nanopartikel waren aus einem photoaktiven anorganisch-organischen Hybridmaterial aus Gadolinium-Ionen und einem Phthalocyanin. Da beide Bestandteile bereits in klinisch relevanten Substanzen vorliegen, sind auch diese Hybrid-Nanopartikel als Substrat für die „Photodynamische Therapie“ denkbar. Daher sollten neben der zellulären Aufnahme vor allem die Biokompatibilität mit und ohne Bestrahlung sowie die Photoaktivierbarkeit im biologischen System untersucht werden.

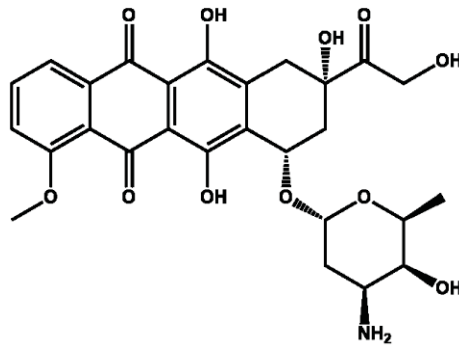
Die angewandten *in vitro*-Modelle aus dem Gebiet des *Tissue Engineering* mussten dabei an die jeweiligen Fragestellungen angepasst und optimiert werden. Ein zentrales Mittel hierbei sollte das in der Arbeitsgruppe entwickelte mikrofluidische *Organ-on-a-Chip*-Modell eines Blutgefäßes, der *vasQchip*, darstellen. Dieser sollte für Studien zum transendothelialen Transport eingesetzt und für die Testung therapeutischer Substanzen an kanzerogenen Geweben *in vitro* weiterentwickelt werden. Daneben kamen Methoden aus der 3D Zellkultur, wie die Anwendung von EZM-Beschichtung, einer Hydrogel-Matrix oder Sphäroid-Kulturen, zum Einsatz. Als weiteres *in vitro*-System sollten während eines Forschungsaufenthalts am *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering* außerdem die dort entwickelten Modelle der Kleinen Atemwege zur Etablierung einer nicht-invasiven Analyseverfahren von Geweben sowie als Modell für Influenza-Infektionen genutzt werden.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Dox@AlO(OH) Nanopartikel

Zur Bekämpfung von Krebserkrankungen sind bereits zahlreiche Chemotherapeutika im klinischen Alltag in Gebrauch. Die Wirkung dieser Stoffe beruht auf ihren zytostatischen Eigenschaften, hervorgerufen durch die Beeinflussung der DNA-Replikation, die Induktion von DNA-Schäden, die Blockierung von Reparaturmechanismen oder der Interaktion mit der Zellmembran.<sup>96</sup> Der Einsatz und die Dosierung der Wirkstoffe ist jedoch meist durch die starken Nebenwirkungen sehr eingeschränkt.<sup>98</sup> Dadurch ergibt sich als weiteres Problem die mögliche Ausbildung von Resistenzen der kanzerogenen Zellen gegenüber der Therapie (MDR, *Multidrug Resistance*),<sup>156-159</sup> so dass die Bekämpfung von Tumoren oft langwierig und dennoch risikobehaftet ist.<sup>97-99</sup> Aufgrund dieser Restriktionen wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Applikation von Chemotherapeutika zu verbessern. Es soll beispielsweise dafür gesorgt werden, dass sie zielgerichtet zum malignen Gewebe transportiert oder spezifisch aufgenommen werden; dass sie durch eine spezielle Aktivierung den Wirkstoff nur im Tumor freizusetzen; dass sie durch bessere Löslichkeit oder geringere Nebenwirkungen eine höhere Dosierung erlauben; dass sie biologische Barrieren besser überwinden können; oder dass sie geschützt sind vor metabolischem Abbau im Organismus.<sup>107</sup> Für die zielgerichtete Ansteuerung können tumorspezifische Liganden dienen in Form von Peptiden, Peptidomimetika wie Peptoiden, kleinen organischen Molekülen oder auch Antikörpern, die an den Wirkstoff gekuppelt werden. Die Komplexbildung mit organischen oder anorganischen Stoffen, ebenso wie die Verpackung der Wirkstoffe beispielsweise in Liposomen, Polymeren oder anorganischen Hohlkugeln ermöglicht eine erhöhte Löslichkeit in wässriger Umgebung, so dass eine bessere Aufnahme und Verteilung im Organismus möglich wird.<sup>107-110, 160</sup> Auch ungewollte Interaktionen, die zu Nebenwirkungen führen, und eine Metabolisierung können so verhindert werden. Durch das nanoskalige Format können solche Wirkstofftransporter auch vom EPR-Effekt profitieren und werden somit verstärkt im Tumorgewebe angereichert. (Kapitel 2.5) Wichtig bei der Verkapselung von Wirkstoffen ist neben einer möglichst hohen Beladungskapazität, den ungewollten Austritt während des Transports im Blutkreislauf so gering wie möglich zu halten und die Freisetzung am Zielgewebe wiederum kontrolliert und am besten vollständig zu erreichen. Besonders zuverlässig für den Einschluss von Wirkstoffen sowie die gezielte Abgabe auf einen äußeren Impuls hin erscheinen Nanopartikel aus Metallen oder deren Reaktionsprodukten. Aufgrund ihrer Dispergierbarkeit und ihrer Größe werden sie in einem Organismus leicht verteilt und in Tumorgewebe gut aufgenommen.<sup>161, 162</sup> Jedoch ist die Erzeugung nanoskaliger Hohlkugeln mit der weitverbreiteten mehrstufigen *hard template*-Methode, bei der Nanopartikel als Vorlage für die Beschichtung mit einem weiteren Material dienen, oft aufwendig und mit einigen Nachteilen bezüglich der Durchführung und der erhaltenen Produkte verbunden.<sup>161</sup> Durch ein am Institut für Anorganische Chemie (AOC) des KIT in der Arbeitsgruppe von Prof. Feldmann entwickeltes alternatives Herstellungsverfahren von gefüllten, anorganischen und nanoskaligen Hohlkugeln ist eine schnelle Synthese solcher Systeme möglich.<sup>162-164</sup> Das

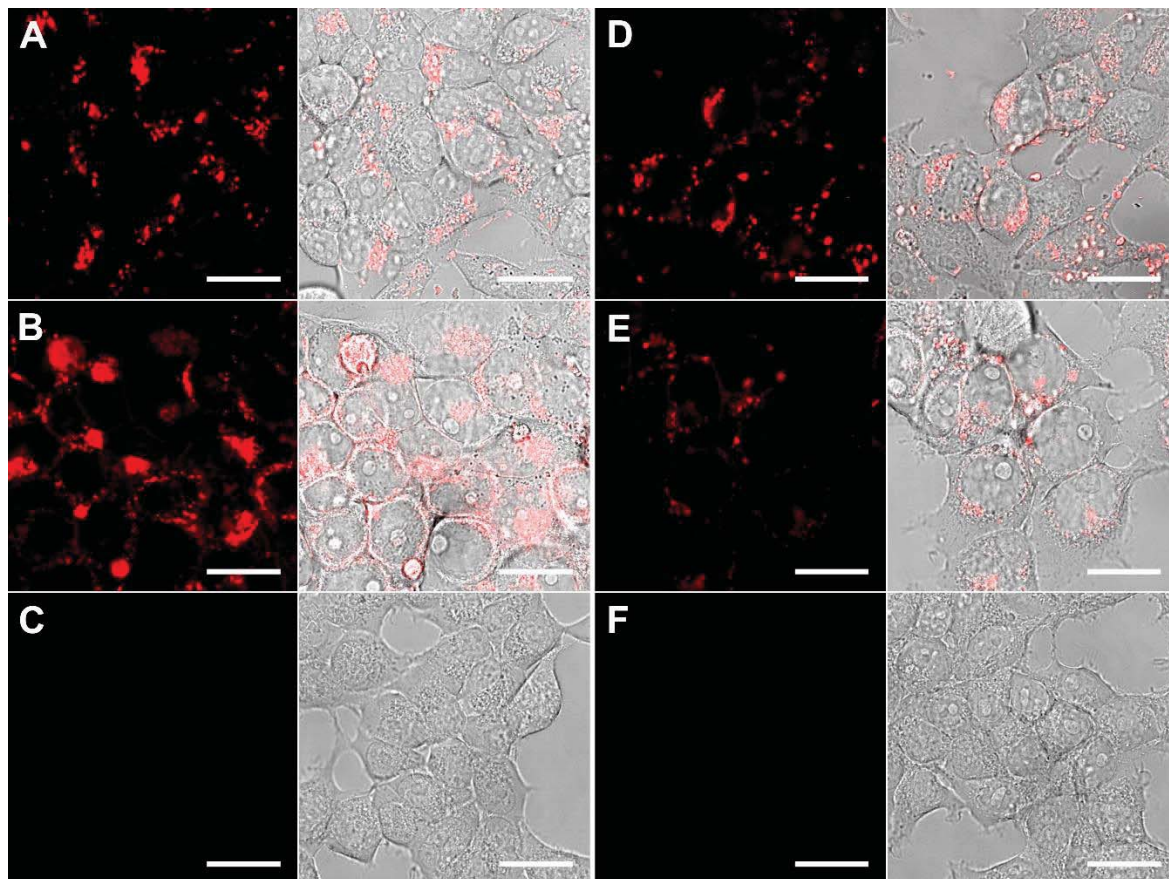


**Abbildung 7: Strukturformel des Chemotherapeutikums Doxorubicin.** Aufgrund seiner zytostatischen Eigenschaften wird Doxorubicin klinisch in der Chemotherapie eingesetzt. Seine Wirkung basiert auf der Interkalation in die Doppelstrang-Helix der DNA, wodurch Replikation und Transkription der DNA inhibiert und die Zellen an der Proliferation gehindert werden. Durch das konjugierte Grundgerüst des Moleküls fluoresziert es außerdem im roten Spektrum.

Vorgehen hierbei beruht auf einem Mikroemulsionsverfahren und der gerichteten Reaktion an der Grenzfläche der Mizellen. Es entsteht dabei eine feste Hülle, die die wässrige Phase und darin gelöste Substanzen umschließt. Mit Hohlkugeln aus Aluminiumoxid-Hydroxid (AlO(OH)) gefüllt mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin (Abb. 7) (Dox@AlO(OH) Nanopartikel) konnten bereits einige vielversprechende Studien durchgeführt werden. Einerseits konnte in der Zellkultur die Freisetzung durch Änderung des pH-Wertes nach der zellulären Aufnahme gezeigt werden, andererseits zeigte eine *in vivo*-Studie eine im Vergleich zu herkömmlich verabreichtem Doxorubicin eine verstärkte Unterdrückung des Tumorwachstums sowie gehemmte Metastasierung.<sup>165-167</sup> Dennoch fiel bei den verschiedenen experimentellen Ansätzen auf, dass die Ergebnisse aus Zellkultur-Versuchen und denen des Tiermodells nur teilweise im Einklang sind. Aussagekräftigere Daten vor der Durchführung von *in vivo*-Versuchen wären daher wünschenswert, um die Versuchsbedingungen gezielter planen zu können und überhaupt die Erfolgsquote besser einschätzen zu können. Jedoch ist es mit den gängigen Methoden kaum möglich, ein komplexes Transportsystem, wie die beschriebenen Hohlkugeln, zufriedenstellend zu evaluieren. Um die Wirkungsweise fortschrittlicher Wirkstoff- und Transporterkomplexe zu untersuchen, müssen die dazu verwendeten Versuchssysteme ebenfalls weiterentwickelt werden.

#### 4.1.1. Zelluläre Aufnahme und *in vitro*-Toxizität

Zur Charakterisierung der Dox@AlO(OH) Nanopartikel wurde zunächst die zelluläre Aufnahme in zwei Zelllinien konfokalmikroskopisch untersucht. (Abb. 8) Dazu wurden HeLa- und HepG2-Zellen ( $10^5$  Zellen/ml) auf *μslides* ausgesät und für 48 h mit Dox@AlO(OH) Nanopartikel-Suspension (0,5  $\mu$ M Dox.) bzw. Doxorubicin-Lösung (1  $\mu$ M) oder unbehandelt inkubiert. Da das Doxorubicin-Molekül durch sein konjugiertes Grundgerüst im roten Spektrum fluoresziert, konnte die zelluläre Verteilung beider Proben mikroskopisch detektiert werden ( $\lambda_{\text{ext/em}} = 488 \text{ nm} / 530\text{-}650 \text{ nm}$ ). Dabei zeigte sich sowohl für die Dox@AlO(OH) Nanopartikel als auch für das freie Doxorubicin eine gute zelluläre Aufnahme und eine Anlagerung in

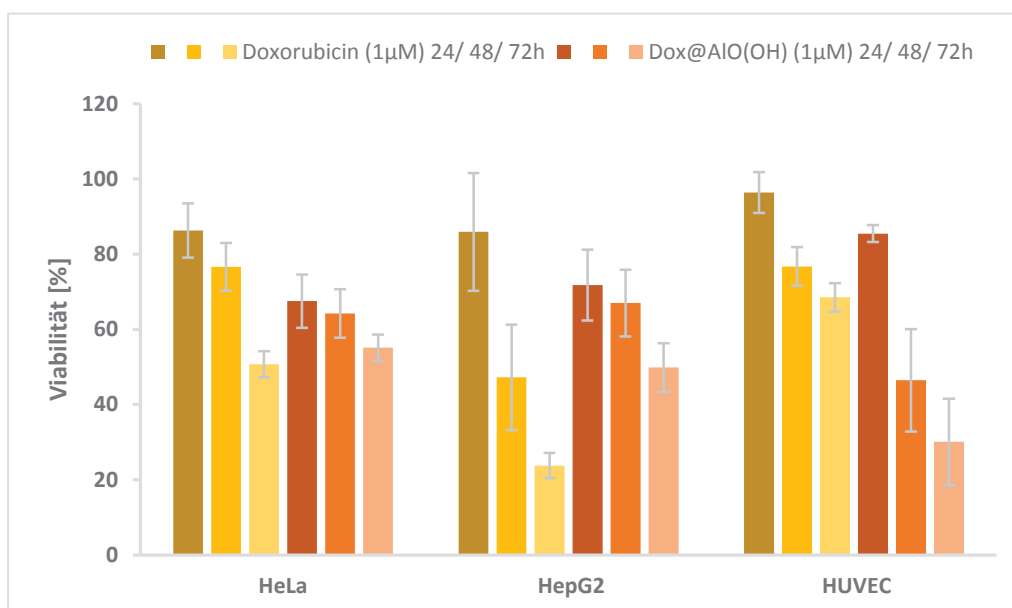


**Abbildung 8: Zelluläre Aufnahme von Dox@AlO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin.** HeLa- (A-C) und HepG2-Zellen (D-F) ( $10^5$  Zellen/ml) wurden für 48 h mit Dox@AlO(OH) Nanopartikel-Suspension ( $0,5 \mu\text{M}$  Dox.) (A,D) bzw. Doxorubicin-Lösung ( $1 \mu\text{M}$ ) (B, E) oder unbehandelt (Kontrolle) (C, F) inkubiert und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht. Abgebildet sind die Fluoreszenzaufnahmen (links) ( $\lambda_{\text{ex}} 488 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530\text{-}650 \text{ nm}$ ) sowie die Überlagerung mit dem Hellfeld. Maßstab  $25 \mu\text{m}$

perinukleären, vesikulären Strukturen der Zellen. Vor allem für die Dox@AlO(OH) Nanopartikel war eine Akkumulation innerhalb der Zellkompartimente zu erkennen, was auf eine endosomale Aufnahme hindeutet. Diese Anreicherung in den Endosomen ist aufgrund des dort herrschenden sauren Milieus ( $\text{pH} = 6.0 - 4.8^{113}$ ) gleichzeitig förderlich für die Freisetzung des Doxorubicins aus der AlO(OH) Hülle. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wiesen die mit Wirkstoff inkubierten Zellen leichte Veränderungen in der Morphologie auf, wie eine Vergrößerung des Zellkerns sowie die Abrundung der Zellen und das Lösen der adhärennten Kontakte zur Oberfläche. Die zytostatische Eigenschaft des Chemotherapeutikums Doxorubicin basiert auf der Interkalation in die Doppelstrang-Helix der DNA, wodurch Replikation und Transkription der DNA inhibiert und die Zellen an der Proliferation gehindert werden.<sup>168</sup> Diese Auswirkung lässt sich durch die Bestimmung der Viabilität von Zellen untersuchen. Um also die Wirkung der verschiedenen Darreichungsvarianten des Doxorubicins quantitativ vergleichen und beurteilen zu können, wurden mit zwei kanzerogenen Zelllinien (HeLa und HepG2) sowie mit primären Endothelzellen (HUVEC), welche im Organismus das Blutgefäßsystem ausbilden und damit in Kontakt mit verabreichten Wirkstoffen stehen, Zytotoxizitätsstudien mithilfe eines MTT-Tests durchgeführt. (Abb. 9) Dieser basiert auf der enzymatischen Umsetzung eines Tetrazoliumsalses (MTT): Das gelbe Tetrazoliumsals wird von vitalen Zellen aufgenommen und in



den Mitochondrien zum violetten Formazan umgesetzt. Der resultierende Farbumschlag kann photometrisch ( $\lambda_{\text{abs}} = 595 \text{ nm}$ ) vermessen werden und steht in direkter Korrelation mit der Viabilität der Zellen. Für die Durchführung der Studie wurden jeweils  $10^5$  Zellen/ml mit Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension ( $1 \mu\text{M}$  Dox.) oder Doxorubicin-Lösung ( $1 \mu\text{M}$ ) behandelt und für 24, 48 oder 72 h inkubiert. Die Ergebnisse zeigen den Wirkungsverlauf bei steigender Inkubationszeit sowie einen zytotoxischen Effekt beider Proben auf alle Zellen. Dabei ergaben sich für die verschiedenen Zelltypen folgende  $\text{LD}_{50}$ -Werte, die die nötige Konzentration der verabreichten Substanz für einen Rückgang der Viabilität um 50 % angeben. Im Fall der HeLa- (Zelllinie Cervix-Karzinom) wie auch der HepG2-Zellen (Zelllinie Leber-Karzinom) konnte für die Dox@AIO(OH) Nanopartikel  $\text{LD}_{50} > 1 \mu\text{M}$  und für Doxorubicin  $\text{LD}_{50} \leq 1 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Obwohl durch die Verkapselung des Wirkstoffs in den AIO(OH) Hohlkugeln eine verbesserte Aufnahme, ein gesteigerter therapeutischer Effekt und folglich eine erhöhte Zytotoxizität auf die Tumorzellen erwartet wurde, ist der  $\text{LD}_{50}$ -Wert der Dox@AIO(OH) Nanopartikel erkennbar oberhalb des Wertes für das reine Doxorubicin. Denkbar ist, dass aufgrund anderer Aufnahmemechanismen und der nötigen Freisetzung des Wirkstoffs eine verzögerte Wirkung des Transportsystems im Vergleich zum frei diffundierenden Doxorubicin vorliegt. Insgesamt ist also zwar ein Effekt der Dox@AIO(OH) Nanopartikel auf die Viabilität der Zellen aufzuweisen, jedoch bleibt dieser unter den gewünschten Erwartungen zurück. Bei der dritten Versuchsreihe mit HUVEC (primären Endothelzellen der Nabelschnur) hingegen konnte für die Dox@AIO(OH) Nanopartikel  $\text{LD}_{50} < 1 \mu\text{M}$  und für Doxorubicin  $\text{LD}_{50} > 1 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Endothelzellen kleiden die Blutgefäße in einem Organismus aus und spielen somit eine wichtige Rolle bei Transportvorgängen von Wirkstoffen. Hierbei sollen sie einerseits eine effiziente Weitergabe der Stoffe in das Gewebe ermöglichen und andererseits selbst keine Beeinflussung erleben. Die Behandlung der Endothelzellen außerhalb des Blutgefäßsystems in einer



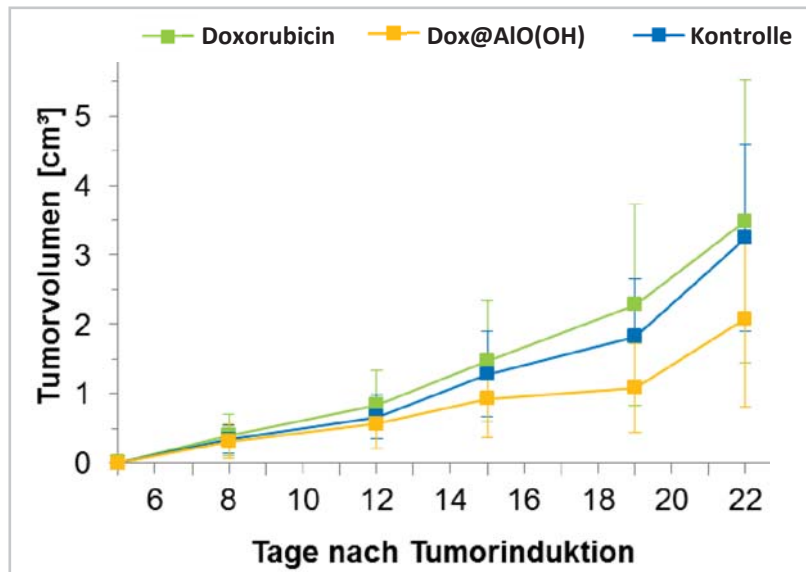
**Abbildung 9: Toxizitätsstudie von Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin auf verschiedenen Zelltypen.** HeLa-, HepG2-Zellen und HUVEC ( $10^5$  Zellen/ml) wurden für 24, 48 und 72 h mit Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension ( $1 \mu\text{M}$  Dox.) oder Doxorubicin-Lösung ( $1 \mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend ihre Viabilität photometrisch mithilfe des MTT-Reagenzes ausgewertet.  $n = 6$



2D Zellkultur zeigt jedoch bei der Behandlung vor allem mit den Dox@AIO(OH) Nanopartikeln eine deutliche Schädigung der Zellen. Somit steht das erhaltene Ergebnis wieder eher entgegen der gewünschten Effekte, da hier prinzipiell keine bzw. eine möglichst geringe Zytotoxizität angestrebt wird, besonders mithilfe der Verpackung des Wirkstoffs in den AIO(OH) Hohlkugeln.

#### 4.1.2. *In vivo*-Studie

Weitere Auskünfte über die Zytotoxizität sowie die Tumorspezifität der Dox@AIO(OH) Nanopartikel gehen aus einer *in vivo*-Studie im orthotopen Mausmodell hervor. Obwohl die *in vitro*-Daten in der Zellkultur wenig positiv ausfielen, zeigten diese Versuche die angedachte, verbesserte chemotherapeutische Wirkung der Dox@AIO(OH) Nanopartikel im Vergleich zum freien Doxorubicin ohne erkennbare Nebenwirkungen. (Abb. 10) Hierzu wurden murine 4T1-Zellen (Zelllinie Mammacarcinom) orthotop in das Brustfettgewebe von BALB/c Mäusen injiziert, um einen primären Tumor zu generieren. Nach 11 Tagen begann die Behandlung durch intraperitoneale Injektion mit der Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension (0,015 mg Doxorubicin/ kg Körpergewicht) bzw. Doxorubicin-Lösung (2,5 mg/ kg Körpergewicht) sowie DPBS<sup>-/-</sup> als Kontrolle. Hier wurde einerseits die größtmögliche, mit der Nanopartikel-Suspension erreichbare Konzentration, sowie andererseits die niedrigste in Studien am Mausmodell angewandte Konzentration von Doxorubicin ausgewählt,<sup>169, 170</sup> um die Vergleichbarkeit beider Behandlungen zu wahren. Die Injektion erfolgte bis Tag 21 dreimal pro Woche, insgesamt sieben Mal, wobei das Tumolvolumen und der Gesundheitszustand der Tiere regelmäßig erfasst wurden. Hierbei konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Über diesen Zeitraum vergrößerte sich das Tumolvolumen in allen untersuchten Gruppen, jedoch war das Wachstum bei Behandlung mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln erkennbar geringer. Hier wurde eine Größe von durchschnittlich knapp 2 cm<sup>2</sup> gemessen, während die anderen beiden Gruppen Volumina um 3,5 cm<sup>2</sup> erreichten. Eine Untersuchung des Blutbildes zeigte vergleichbare Werte nach Behandlung mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln wie mit der Kontrolle.<sup>166, 167</sup> In der mit freiem Doxorubicin behandelten Gruppe jedoch ließen erhöhte Lipase-Werte sowie gesunkene Werte von Calcium, Globulin und alkalischer Phosphatase auf die Schädigung von inneren Organen (beispielsweise Leber und Niere) schließen. Es zeigten sich in dieser Studie also deutliche Verbesserungen in der Behandlung durch die Anwendung des verkapselten gegenüber des freien Doxorubicins. Die Verabreichung in Hohlkugeln konnte zu einer gezielteren Wirkung am Tumorgewebe führen, so dass trotz niedrigerer Stoffmenge eine bessere Wirkung erzielt werden konnte, während typische Nebenwirkungen ausblieben. Das freie Doxorubicin hingegen ist von Beginn an der Metabolisierung im Organismus ausgesetzt, so dass höhere Konzentrationen notwendig sind, um einen gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen. Gleichzeitig lagert sich der Wirkstoff aber stark in den „Entgiftungsorganen“ wie Leber und Niere an und kann diese ungeschützt schädigen, was zu den ungewünschten Nebenwirkungen führt.<sup>166, 168</sup>



**Abbildung 10:** *In vivo*-Studie zu Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin. (nach C. Seidl, 2015<sup>166</sup>) Das Volumen von orthotop induzierten Brustkarzinomen (4T1) bei BALB/c Mäusen wurde nach Behandlung (ab Tag 11) mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln (0,015 mg Doxorubicin/kg Körpergewicht), Doxorubicin (2,5 mg/kg Körpergewicht) oder mit DPBS<sup>-</sup> als Kontrolle zu mehreren Zeitpunkten bestimmt.  $n = 8$

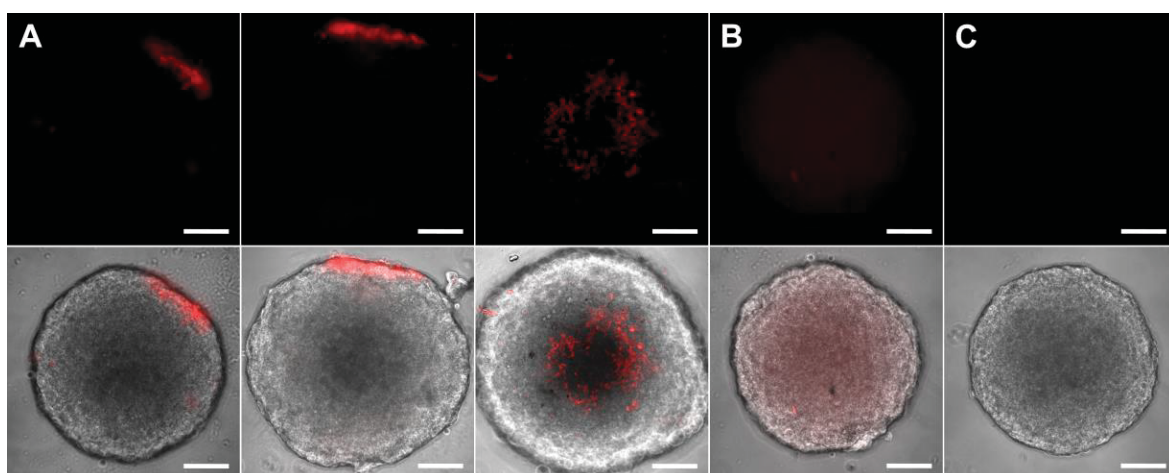
Auch wenn sowohl die 2D Zellkultur- als auch die *in vivo*-Experimente noch keine abschließenden Studien sind, fallen doch die unterschiedlichen Tendenzen auf, die durch die jeweiligen Ergebnisse impliziert werden: Während die Zytotoxizitätsstudien in der 2D Zellkultur im Vergleich mit den Dox@AIO(OH) Nanopartikeln eine deutlich bessere Verfügbarkeit und Umsetzung des reinen Doxorubicins zeigten, wiesen im *in vivo*-Versuch die Dox@AIO(OH) Nanopartikel die bessere Wirkung und Verfügbarkeit vor. Auch konnten hier keine Nebenwirkungen oder eine Schädigung der Blutgefäße beobachtet werden. Um nun aber nicht mit jeder neuen Modifikation eines Wirkstofftransporters sofort das Tiermodell einsetzen zu müssen, sollten die Versuchsbedingungen *in vitro* verbessert und an die höhere Komplexität der zu testenden Proben angepasst werden. Dies ist sowohl erstrebenswert, da durch effiziente Versuchsdurchführungen und verlässliche Ergebnisse viele Versuche *in vivo* redundant werden, als auch weil dadurch Testmodelle mit relevanten menschlichen Zellen und Geweben zur Untersuchung dienen.

#### 4.1.3. Sphäroide als *in vitro*-Tumormodell

Da für die beschriebenen Dox@AIO(OH) Nanopartikel bereits grundlegende *in vitro*- wie auch *in vivo*-Daten vorliegen, eignen sich diese als Testmodell zur Evaluierung weiterentwickelter Testsysteme *in vitro*. Dazu wurde zunächst von der zweidimensionalen (2D) Zellkultur mit adhären Zellschichten auf den Kulturgefäßen zu einer dreidimensionalen (3D) Anordnung der Zellen übergegangen. Durch einen 3D Verbund von Zellen wird aufgrund der ubiquitären Zell-Zell-Kontakte eine natürlichere Umgebung der Zellen geschaffen, die so eng miteinander in Verbindung stehen und gegenseitig Morphologie und Stoffwechsel beeinflussen. Eine der zurzeit gängigsten Arten für eine solche 3D Kultur ist das Zellwachstum in Sphäroiden, wobei sich



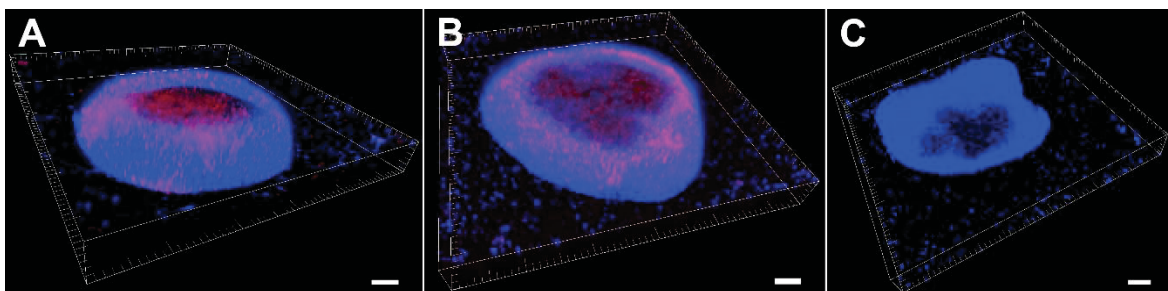
adhärent wachsende (meist Tumor-) Zellen zu kugelförmigen Aggregaten zusammenformen. Dies ist möglich, wenn den Zellen für das Wachstum keine Oberfläche geboten wird und sie somit ausschließlich auf den Kontakt untereinander angewiesen sind. Für gleichmäßige Sphäroide wurde eine spezifische Zellzahl in Suspension auf eine Agarose-beschichtete 96er-Zellkulturplatte aufgebracht. Die Zellen konnten dort nicht adhären, sammelten sich aber am tiefsten Punkt und bildeten so Zellverbände aus. Als besonders geeignet haben sich HepG2-Kulturen erwiesen. Diese bilden von sich aus schon Kolonie-Strukturen und formten somit über einen Zeitraum von wenigen Tagen aus 250 bis hin zu 4000 Zellen solide und gleichförmige Sphäroide. Solche Sphäroide wurden mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln (1  $\mu$ M Dox.) sowie reinem Doxorubicin (1  $\mu$ M) behandelt und deren zelluläre Aufnahme sowie Zytotoxizität mikroskopisch untersucht. Dazu wurde einerseits ein Fluoreszenzmikroskop verwendet, welches es erlaubt, die Sphäroide im Gesamten zu betrachten, sowie andererseits die Konfokalmikroskopie, die Schnitte in der z-Achse sowie die 3D Darstellung mehrerer Ebenen ermöglicht. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit den Wirkstoffen wurde auf den Fluoreszenzaufnahmen deutlich, dass eine unterschiedliche Absorption des Wirkstoffs stattgefunden hat. (Abb. 11) Die Dox@AIO(OH) Nanopartikel akkumulieren, vermutlich hauptsächlich durch Gravitation, gezielt an einer Stelle des Sphäroids, wodurch es möglich wird, den intakten Zellverband aufzubrechen und die äußere Barriere zu überwinden. Dies ist zweimal besonders deutlich durch das starke Fluoreszenzsignal der seitlichen Anlagerung zu erkennen. Nahezu sämtlicher Wirkstoff ist hier in einem kleinen Bereich von etwa 150 – 200  $\mu$ m vorzufinden. Ebenso ist dies bei der Aufsicht auf einen weiteren Sphäroid zu erkennen, wo sich die Dox@AIO(OH) Nanopartikel ebenfalls auf einer kleinen Fläche akkumuliert haben und von der äußeren Zellschicht aufgenommen wurden. Bei den mit reinem Doxorubicin behandelten Sphäroiden ist eine einheitliche, jedoch deutlich schwächere Aufnahme des Wirkstoffs zu beobachten. Das rote Fluoreszenzsignal ist über den gesamten Sphäroid verteilt und sehr verdünnt in den Zellen erkennbar. Ebenso wie in der unbehandelten Probe haben alle Sphäroide noch ihren



**Abbildung 11:** HepG2-Sphäroide behandelt mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin. Zur Entstehung von Sphäroid-Kulturen wurden HepG2-Zellen ( $1^*$  oder  $2 \cdot 10^3$  Zellen/Kammer) für 3 Tage auf Agaroseplatten kultiviert und anschließend für 48 h mit Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension (1  $\mu$ M Dox.) (A) bzw. Doxorubicin-Lösung (1  $\mu$ M) (B) oder unbehandelt (C) inkubiert. Die Sphäroide wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht, dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen (oben) ( $\lambda_{ex}$  558 nm/ $\lambda_{em}$  582 nm) und die Überlagerung mit dem Hellfeld (unten). Maßstab 100  $\mu$ m

kugelförmigen, intakten Zustand erhalten. Für konkretere Effekte scheint eine längere Inkubation oder eine erhöhte Wirkstoffkonzentration notwendig zu sein. Ebenso wäre eine dynamischere Art der Behandlung erstrebenswert, in der die Sphäroide beispielsweise von der Wirkstofflösung umspült werden, um eine von der Gravitation unabhängige Aufnahme untersuchen zu können.

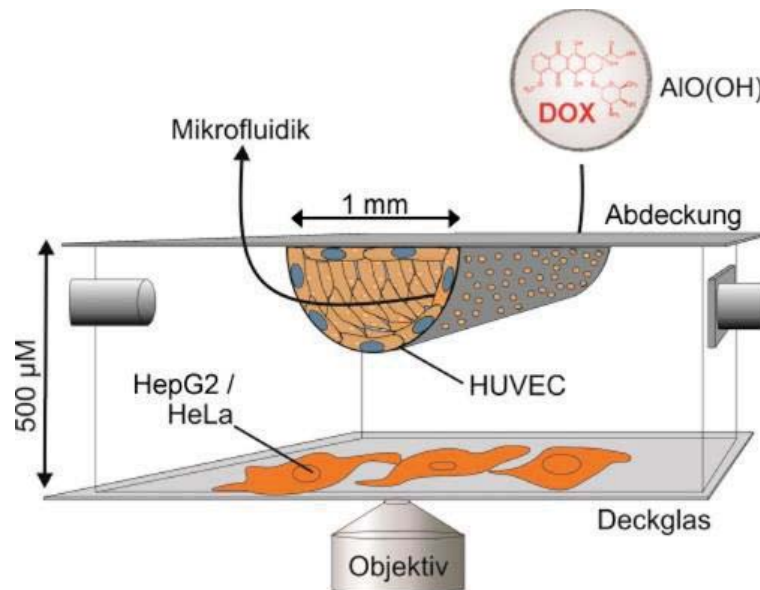
In den dreidimensionalen konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Sphäroide konnte die Verteilung der Dox@AlO(OH) Nanopartikel und des reinen Doxorubicins genauer untersucht werden. (Abb. 12) Zur besseren 3D Visualisierung wurde dazu außerdem eine Färbung der Zellkerne (Hoechst 33342, 2 µg/ml) vorgenommen. Aufgrund der geringen Eindringtiefe der mikroskopischen Laser in das Sphäroid-Gewebe, sind in den Aufnahmen jedoch lediglich die äußeren Schichten der Sphäroide abgebildet, so dass es sich um eine 3D Darstellung der Oberfläche handelt. Hier bestätigen sich in etwa die Beobachtungen aus den vorherigen Fluoreszenzaufnahmen. Bei einer Behandlung der Sphäroide mit Dox@AlO(OH) Nanopartikeln konnte eine heterogene Verteilung des Doxorubicin-Signals und somit eine Akkumulation des Wirkstoffs detektiert werden. An diesen Stellen war außerdem das blaue Fluoreszenzsignal der Zellkernfärbung (Hoechst 33342) deutlich verringert. Da dieses nur bei Einlagerung des Fluorophors in die Doppelstrang-Helix der DNA erfolgt, deutet dies auf eine verminderte Integrität dieser Zellen infolge der Wirkstoffaufnahme hin. Bei mit reinem Doxorubicin behandelten Sphäroiden ist wie zuvor eine homogenere Verteilung des roten Fluoreszenzsignals vorzufinden. Jedoch fällt im Vergleich zu den Dox@AlO(OH) Nanopartikeln auf, dass sich rote und blaue Fluoreszenz hier nicht ersetzen sondern weitgehend überlagern. Obwohl der Wirkstoff also aufgenommen wurde, fand noch keine erkennbare Schädigung der Zellen statt. Die Integrität des Zellverbands ist wie zuvor bei allen Proben identisch und unverändert.



**Abbildung 12:** 3D Darstellung der Oberfläche von HepG2-Sphäroiden behandelt mit Dox@AlO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin. Die Sphäroide wurden für 72 h mit Dox@AlO(OH) Nanopartikel-Suspension (1 µM Dox.) (A) bzw. Doxorubicin-Lösung (1 µM) (B) oder unbehandelt (C) inkubiert, anschließend mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) gefärbt und konfokalmikroskopisch z-Stapel (120 µm, 61 Aufnahmen) aufgenommen (blau:  $\lambda_{ex}$  405 nm/  $\lambda_{em}$  460-480 nm; rot:  $\lambda_{ex}$  488 nm/  $\lambda_{em}$  530-650 nm). Die Auswertung und die 3D Darstellung erfolgten mit Imaris®. Maßstab 100 µm

#### 4.1.4. Transportstudie im mikrofluidischen Modell *vasQchip*

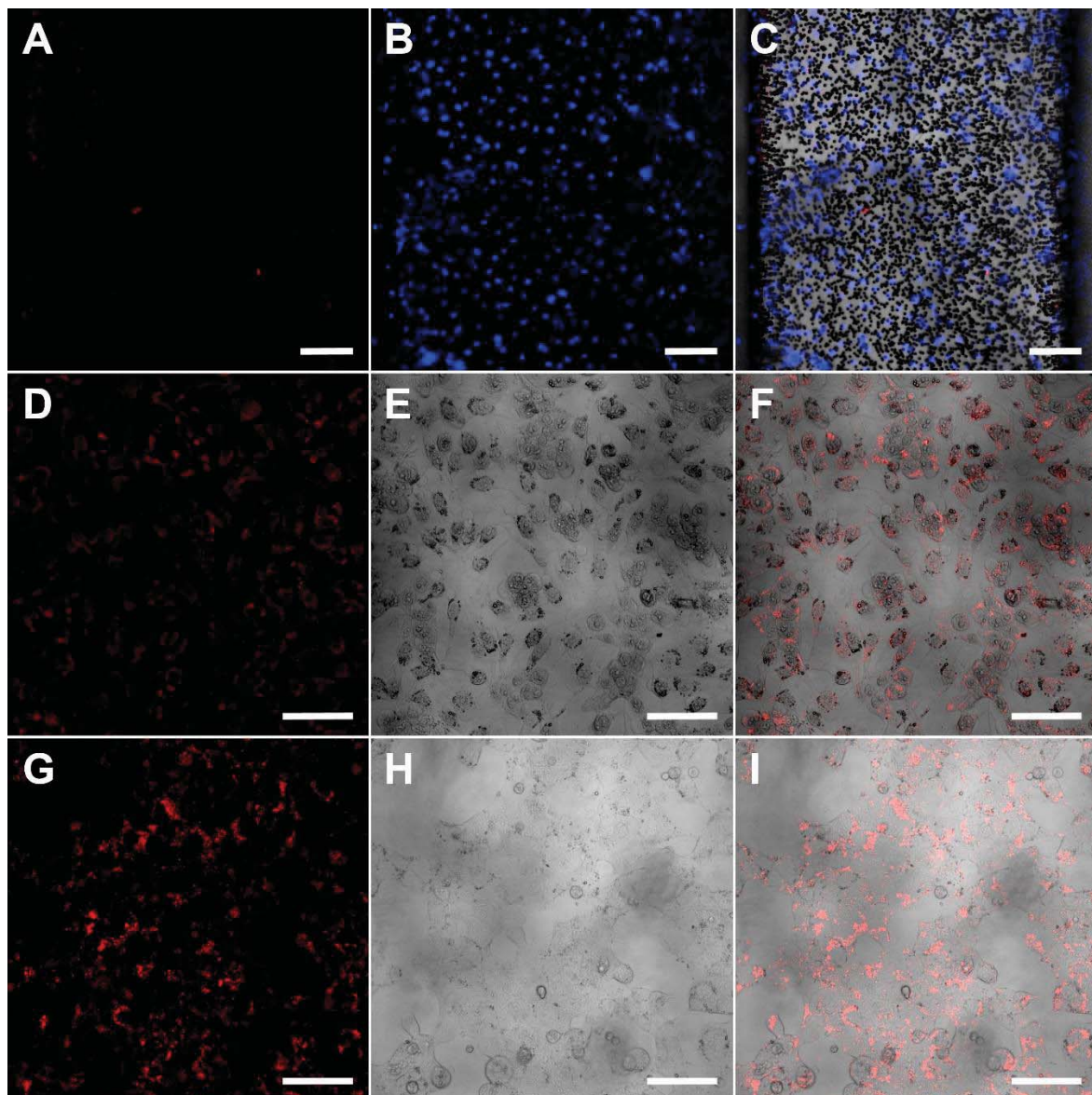
Um neben dem Einfluss der Dox@AlO(OH) Nanopartikel bzw. des freien Doxorubicins auf Tumorzellen auch die Wirkung auf das Endothel der Blutgefäße sowie den transendothelialen



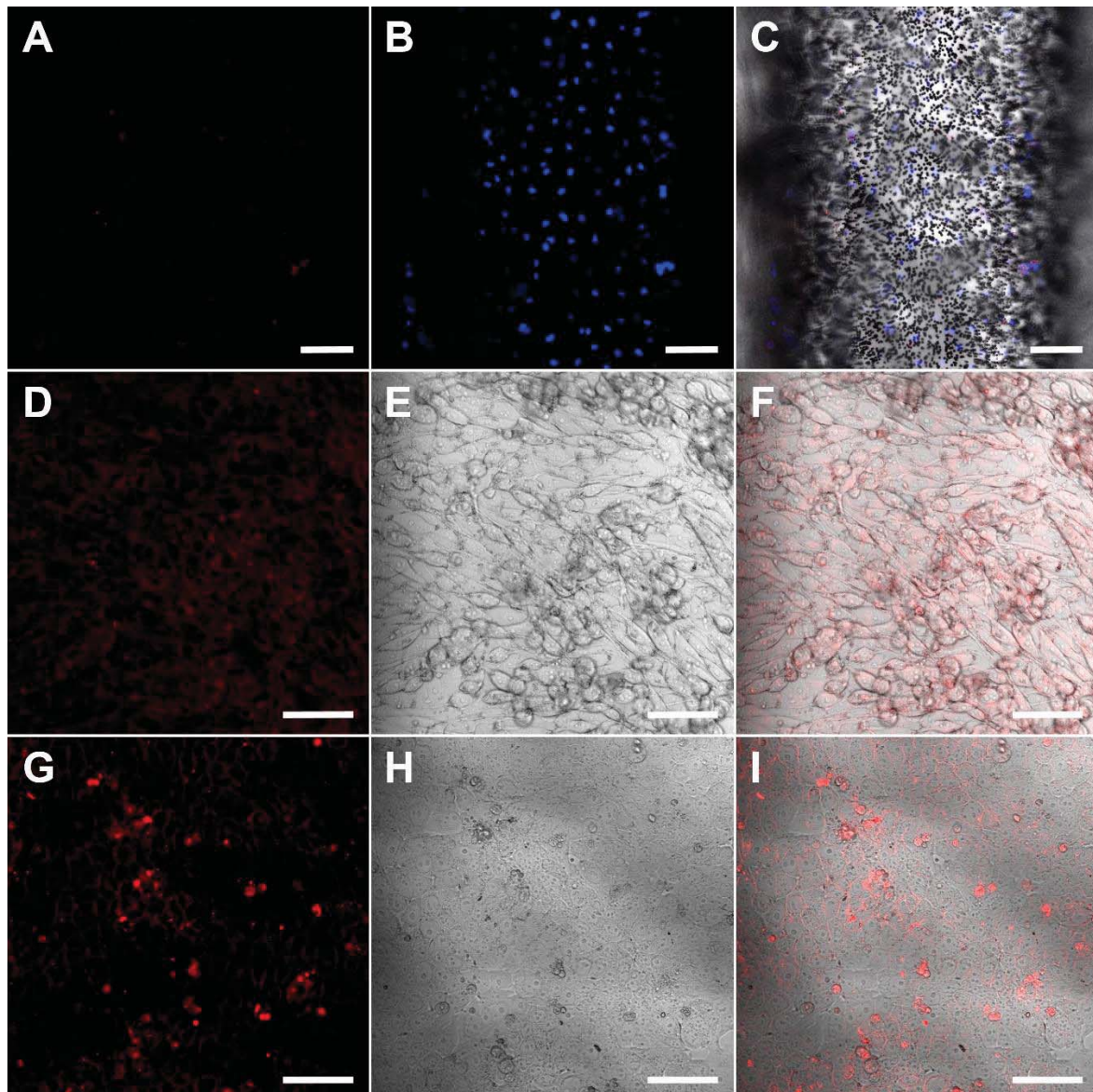
**Abbildung 13: Schematischer Versuchsaufbau zum transendothelialen Wirkstofftransport im vasQchip.** (nach I. Hebeiß, 2012<sup>91</sup>) Im mikrofluidischen *in vitro*-System wird eine Ko-Kultur von Endothelzellen (HUVEC) im oberen Kanal und kanzerogenen Zellen (HeLa oder HepG2) in der umgebenden Kammer etabliert. Zur Testung wird der Wirkstoff mit dem Medium in den fluidischen Kreislauf injiziert. Die Verteilung im System kann mikroskopisch untersucht werden.

Transport untersuchen zu können, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der in der Arbeitsgruppe entwickelte *vasQchip* als modernes *in vitro*-Modell verwendet.<sup>74, 91</sup> Damit wurde ein experimenteller Aufbau entwickelt, der den vaskulären Transport eines Wirkstoffs aus dem mikrofluidischen Kanal über die Endothelzellen hinweg in eine angrenzende Zellkultur darstellt und analysieren lässt. Im Fokus dabei standen die Untersuchungen von Anreicherung sowie Freisetzung des Wirkstoffs innerhalb des *in vitro*-Systems. Ein großer Vorteil eines solchen Versuchsaufbaus ist die Möglichkeit einer genauen Beobachtung, Dokumentation, Anpassung und Reproduktion, welche in anderen Zellkultur- oder *in vivo*-Versuchen so nicht möglich ist. Für das hier dargestellte Experiment wurde eine Ko-Kultur aus Endothelzellen (HUVEC) im mikrofluidischen Kanal und kanzerogenen Zellen (HeLa oder HepG2) im umgebenden Kompartiment etabliert. (Abb. 13) Zum Einbringen der HUVEC-Schicht wurden alle Seiten des halbrunden, porösen Mikrokanals mit insgesamt  $1,25 \cdot 10^6$  Zellen besiedelt und diese anschließend unter fluidischen Bedingungen kultiviert. Nach sieben Tagen wurden dann  $2 \cdot 10^5$  der kanzerogenen Zellen als Ko-Kultur in das untere Kompartiment des *vasQchips* eingebracht. Der zu testende Wirkstoff konnte anschließend in das Medium im fluidischen Kreislauf injiziert und somit im System inkubiert werden. Aufgrund des durchsichtigen Aufbaus und dem Verschluss mit einem dünnen Deckglas ist mit dem *vasQchip* eine (konfokal-) mikroskopische Untersuchung möglich, wodurch die Verteilung des fluoreszenten Doxorubicins verfolgt und qualitativ analysiert werden kann. Die Inkubation mit Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension (1  $\mu$ M Dox.) bzw. Doxorubicin-Lösung (1  $\mu$ M) erfolgte insgesamt über 48 h, woraufhin die Zellen im *vasQchip* gewaschen und anschließend sowohl die Endothelzellen im Mikrokanal wie auch die kanzerogenen Zellen im umgebenden Kompartiment konfokalmikroskopisch untersucht wurden. (Abb. 14-16) Hierbei zeigte sich bei beiden Wirkstoffen fast keine Anreicherung in den

Endothelzellen, während sich in den kanzerogenen HeLa- und HepG2-Zellen im unteren Kompartiment eine deutliche Akkumulation, sichtbar durch die rote Fluoreszenz, zeigte. Da beide Wirkstoffe aber ausschließlich in den fluidischen Mediumkreislauf zugefügt wurden, lässt dies auf einen Transport über die Endothelzellen hinweg schließen. Diese Zellschicht hat den Wirkstoff somit zwar kurzzeitig aufgenommen, aber nicht eingelagert sondern transendothelial weitergegeben, wo er von den kanzerogenen Zellen aufgenommen werden konnte. Dabei war keine veränderte Morphologie der HUVEC vorzufinden, eine zytotoxische Wirkung durch den Transport blieb also aus. Eine Lebendfärbung mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) zeigte eine intakte HUVEC-Schicht im mikrofluidischen Kanal unter allen Inkubationsbedingungen. Somit konnte



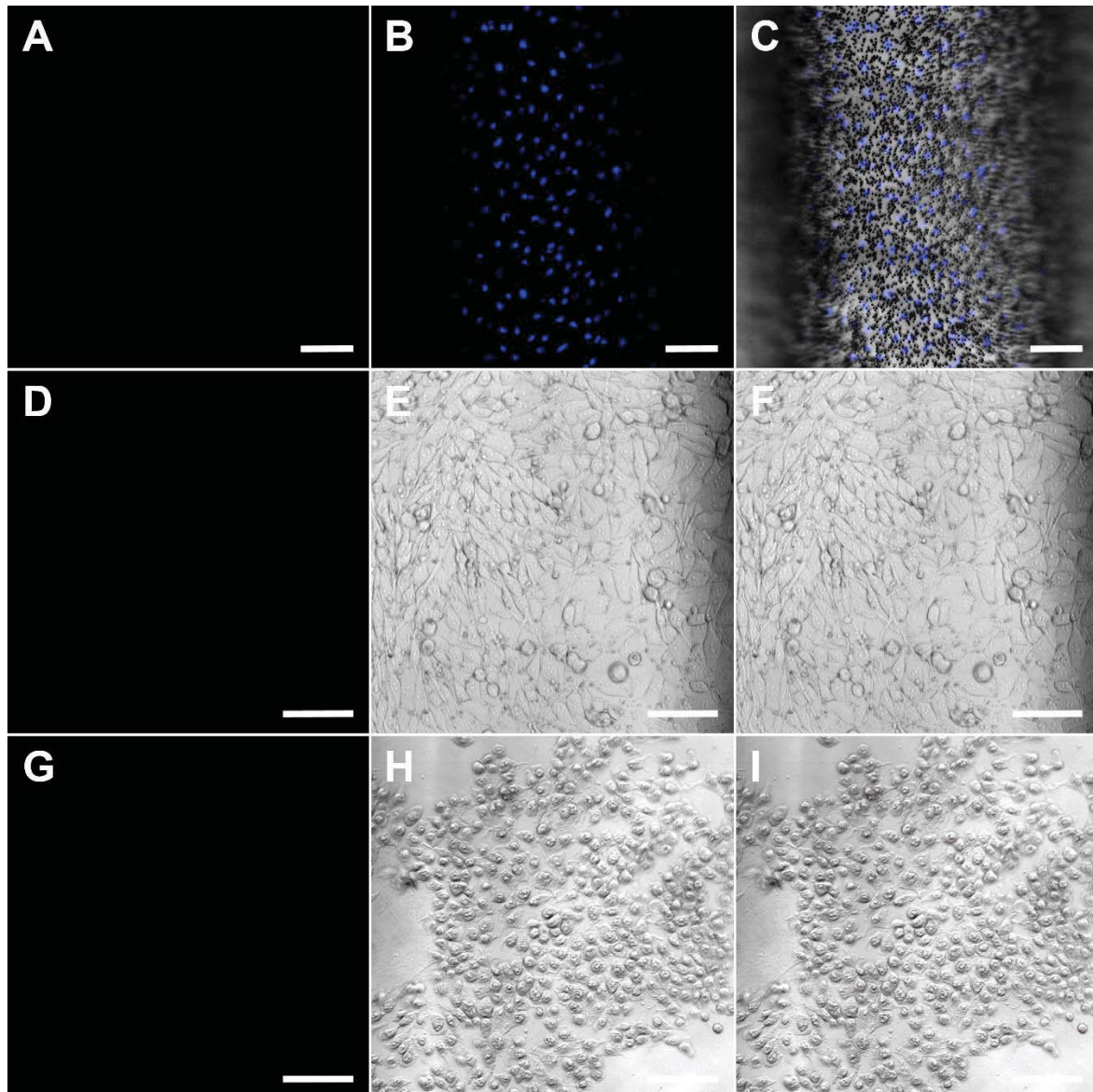
**Abbildung 14: Behandlung einer Ko-Kultur von HUVEC und HeLa- bzw. HepG2-Zellen im vasQchip mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln.** Die fluidische Kultivierung der HUVEC ( $1,25 \cdot 10^6$ ) im Mikrokanal (A-C) erfolgte über 8 Tage, die kanzerogenen HeLa- (D-F) bzw. HepG2-Zellen (G-I) ( $2 \cdot 10^6$ ) wurden vor Zugabe des Wirkstoffs für 24 h in der unteren Kammer kultiviert. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen, wofür die HUVEC zusätzlich mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) angefärbt wurden, erfolgten nach 48 h Inkubation mit den Dox@AIO(OH) Nanopartikeln ( $1 \mu\text{M}$  Dox.). Abgebildet sind die rote Fluoreszenz des Doxorubicins ( $\lambda_{\text{ex}} 488 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530\text{-}650 \text{ nm}$ ) (A, D, G), die blaue Fluoreszenz der Hoechst-Färbung ( $\lambda_{\text{ex}} 405 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 460\text{-}480 \text{ nm}$ ) (B) bzw. das Hellfeld (E, H) sowie die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen mit dem Hellfeld (C, F, I). Maßstab  $150 \mu\text{m}$



**Abbildung 15: Behandlung einer Ko-Kultur von HUVEC und HeLa- bzw. HepG2-Zellen im vasQchip mit Doxorubicin-Lösung.** Die fluidische Kultivierung der HUVEC ( $1,25 \cdot 10^6$ ) im Mikrokanal (A-C) erfolgte über 8 Tage, die kanzerogenen HeLa- (D-F) bzw. HepG2-Zellen (G-I) ( $2 \cdot 10^6$ ) wurden vor Zugabe des Wirkstoffs für 24 h in der unteren Kammer kultiviert. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen, wofür die HUVEC zusätzlich mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) angefärbt wurden, erfolgten nach 48 h Inkubation mit Doxorubicin ( $1 \mu\text{M}$ ). Abgebildet sind die rote Fluoreszenz des Doxorubicins ( $\lambda_{\text{ex}} 488 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530\text{-}650 \text{ nm}$ ) (A, D, G), die blaue Fluoreszenz der Hoechst-Färbung ( $\lambda_{\text{ex}} 405 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 460\text{-}480 \text{ nm}$ ) (B) bzw. das Hellfeld (E, H) sowie die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen mit dem Hellfeld (C, F, I). Maßstab  $150 \mu\text{m}$

hier gezeigt werden, dass im *vasQchip* die natürliche Eigenschaft des transendothelialen Transports durch das Endothel erhalten blieb und es wie in der *in vivo*-Situation nicht geschädigt wurde. Die verschiedenen Kulturen von HeLa- oder HepG2-Zellen dagegen zeigten nach den Behandlungen mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin deutliche Zytotoxizität auf. Während die unbehandelten Zellen im unteren Kompartiment des *vasQchips* eine konfluente Schicht bildeten und eine gesunde Zellmorphologie aufwiesen (Abb. 16), zeigte vor allem die Inkubation mit den Dox@AIO(OH) Nanopartikeln einen deutlichen Effekt. (Abb. 14) Wie in den vorherigen Experimenten ist eine starke Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen





**Abbildung 16: Unbehandelte Ko-Kultur von HUVEC und HeLa- bzw. HepG2-Zellen im vasQchip als Kontrolle.** Die fluidische Kultivierung der HUVEC ( $1,25 \cdot 10^6$ ) im Mikrokanal (A-C) erfolgte über 10 Tage, die kanzerogenen HeLa- (D-F) bzw. HepG2-Zellen ( $2 \cdot 10^6$ ) wurden für 72 h in der unteren Kammer kultiviert. Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die HUVEC zusätzlich mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) angefärbt. Abgebildet sind die rote Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} 488 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530\text{-}650 \text{ nm}$ ) (A, D, G), die blaue Fluoreszenz der Hoechst-Färbung ( $\lambda_{\text{ex}} 405 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 460\text{-}480 \text{ nm}$ ) (B) bzw. das Hellfeld (E, H) sowie die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen mit dem Hellfeld (C, F, I). Maßstab  $150 \mu\text{m}$

sowie eine Anreicherung in perinukleären Kompartimenten zu erkennen. Sowohl für HeLa- als auch für HepG2-Zellen zeigte die Mikroskopie überwiegend nekrotische und apoptotische Zellen, die nicht mehr als konfluente Zellschicht vorliegen. Bei der Bewertung des Wirkstoffeffekts ist zu beachten, dass die tatsächliche Inkubationszeit dieser Zellen aufgrund des vorgelegerten transendothelialen Transportvorgangs von der Gesamtzeit im System abweicht. Auch das reine Doxorubicin wurde von den HeLa- bzw. HepG2-Zellen aufgenommen und lagerte sich im Zytosol der Zellen an. (Abb. 15) Insgesamt war in der gleichen Inkubationszeit eine immer noch weitestgehend konfluente Zellschicht vorzufinden. Die beobachtete Zytotoxizität des Doxorubicins war hier weitaus geringer als die bei der Behandlung mit

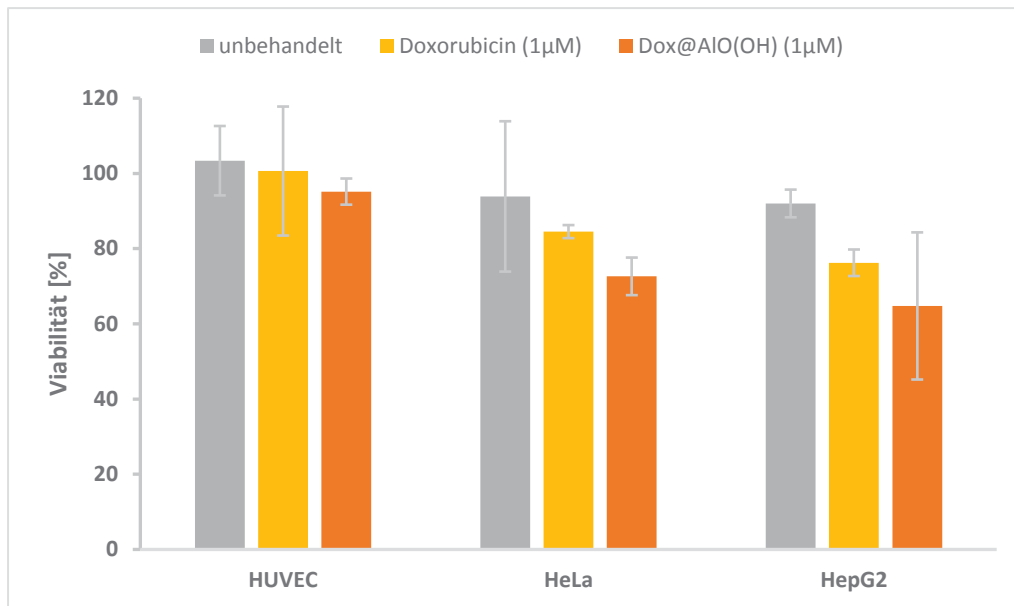


Dox@AIO(OH) Nanopartikeln. Eine Aufnahme des Wirkstoffs ist mikroskopisch zwar zu erkennen, jedoch liegt keine veränderte Morphologie, die auf einen zytotoxischen Effekt schließen lässt, vor. Da Doxorubicin über passive Diffusion transportiert und aufgenommen wird,<sup>168</sup> findet keine aktive und effektive Weitergabe des Wirkstoffs aus der Mikrofluidik in das anliegende Kompartiment statt, was sich durch das geringe Fluoreszenzsignal und die ausbleibende Zytotoxizität zeigt.

#### 4.1.5. Viabilitätsstudie im mikrofluidischen Modell *vasQchip*

Um diese Eindrücke nun auch quantitativ zu bestätigen, wurde ein Protokoll zur Bestimmung der Viabilität der Zellen im *vasQchip* basierend auf dem XTT-Reagenz entwickelt. Dieses Reagenz besteht aus einem gelblichen Tetrazoliumsalz, das, ähnlich dem MTT (Kapitel 4.1.1), von vitalen Zellen metabolisch zu einem orangenen Formazan umgesetzt wird. Ein Vorteil dabei ist, dass der entstehende Farbstoff direkt in Lösung geht und eine Lysierung der Zellen somit zur Auswertung nicht nötig ist. Nach Abnahme der XTT-Lösung können die Zellen wie zuvor weiter kultiviert werden und somit die gleichen Zellen auch erneut ausgewertet werden. Dadurch ergab sich die Möglichkeit durch den Farbumschlag photometrisch ( $\lambda_{\text{abs}} = 450$  und  $500$  nm) einen Wert für die Viabilität aller Zellen im *vasQchip* sowohl vor als auch nach einer Behandlung mit dem jeweiligen Wirkstoff zu bestimmen. Ein Vergleich dieser Werte erlaubt somit die Evaluierung des zytotoxischen Effekts der Dox@AIO(OH) Nanopartikel sowie des Doxorubicins auf alle Zelltypen. (Abb. 17, Tab. 5) Zur Bestimmung dieser Messdaten wurden Aufbau, Vorgehen und Behandlung mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. reinem Doxorubicin der vorherigen Versuchsreihe (Kapitel 4.1.4) übernommen, wobei jeweils vor Beginn der Wirkstoff-Inkubation die Viabilität entweder der HUVEC im Kanal oder der HeLa- bzw. HepG2-Zellen im unteren Kompartiment mittels XTT-Reagenz bestimmt wurde. Eine zweite Auswertung mittels XTT fand nach der 48-stündigen Inkubation statt, um durch Vergleich der beiden Messungen den zytotoxischen Effekt des jeweiligen Wirkstoffs anhand der Viabilitätsänderung quantitativ zu ermitteln. Jede Bedingung - Inkubation mit Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension ( $1 \mu\text{M}$  Dox.), mit Doxorubicin-Lösung ( $1 \mu\text{M}$ ) oder unbehandelt - wurde dabei mindestens als Triplikat in verschiedenen *vasQchips* erstellt.

Die so erhaltenen Werte zeigten für alle unbehandelten Zellen eine hohe und konstante Viabilität im System. Die gemessenen Werte im Abstand von 48 h stimmen gut miteinander überein (um 100 % Viabilität), was den *vasQchip* als ein solides Modell für den vorgesehenen Versuch auszeichnet. In Einklang mit den konfokalmikroskopischen Aufnahmen, die den Transport der Wirkstoffe und eine Akkumulierung in den Tumorzellen im unteren Kompartiment zeigten, konnte auch durch die Untersuchung mit XTT eine erhöhte Zytotoxizität der Dox@AIO(OH) Nanopartikeln gegenüber dem freien Doxorubicin detektiert werden. Dabei ergab sich für beide Wirkstoffe  $\text{LD}_{50} > 1 \mu\text{M}$ . Jedoch zeigen die erhaltenen Viabilitätswerte sowohl für HeLa- wie auch für HepG2-Zellen, dass die durch die Dox@AIO(OH) Nanopartikel erzeugte Zytotoxizität jeweils etwa 10 Prozentpunkte über der des freien Doxorubicins liegt, so dass  $\text{LD}_{50}$  (Dox@AIO(OH) Nanopartikel)  $< \text{LD}_{50}$  (Doxorubicin) gilt.

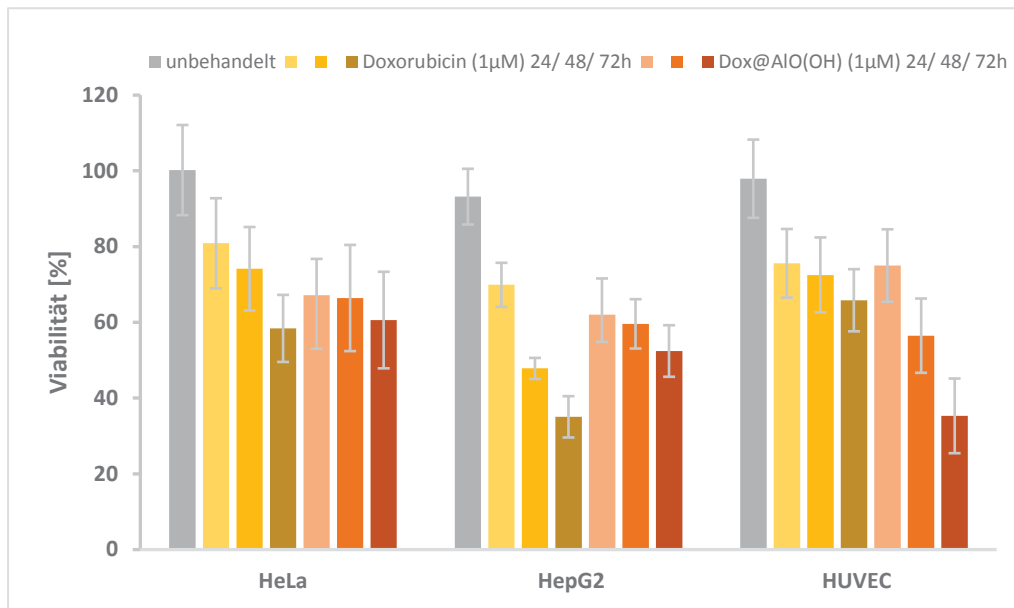


**Abbildung 17: Zytotoxizitätsstudie von Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin im vasQchip.** Über 8 Tage wurde im mikrofluidischen in vitro-System eine Ko-Kultur von Endothelzellen (HUVEC) und einer kanzerogenen Zelllinie (HeLa oder HepG2) etabliert und dann für 48 h mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln (1 µM Dox.) bzw. Doxorubicin (1 µM) behandelt oder als Kontrolle unbehandelt ausgewertet. Davor und danach wurde ihre Viabilität photometrisch mithilfe des XTT-Reagenz ausgewertet und somit der Effekt der Behandlung bestimmt.  $n \leq 3$

Bei den HUVEC hingegen zeigten sich weder durch die Inkubation mit den Dox@AIO(OH) Nanopartikeln noch mit dem reinen Doxorubicin zytotoxische Effekte (jeweils  $LD_{50} \gg 1 \mu M$ ). Anhand der gemessenen Viabilität zeigte sich eine Zytotoxizität deutlich unter 10 %, vergleichbar mit den Werten der unbehandelten Kontrolle. In Kontrast zu den Zytotoxizitätsstudien mit MTT in der 2D HUVEC-Kultur mit  $LD_{50} < 1 \mu M$  für die Dox@AIO(OH) Nanopartikel und  $LD_{50} > 1 \mu M$  für reines Doxorubicin ist die Zytotoxizität in der im *vasQchip* kultivierten Endothelschicht hier vernachlässigbar gering. Besonders für die Behandlung mit den Dox@AIO(OH) Nanopartikeln ist dieser Unterschied gravierend. (Abb. 9)

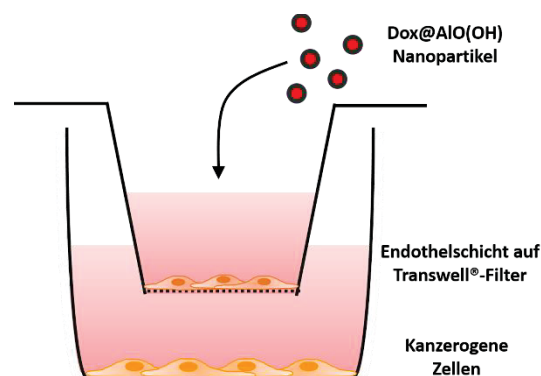
Um nun diese beiden Testsysteme (*vasQchip* und 96er-Zellkulturplatte) besser gegenüberstellen zu können, wurde die erste Zytotoxizitätsstudie nochmals mit dem XTT- anstelle von MTT-Reagenz durchgeführt. (Abb. 18, Tab. 6) Dieser Test bestätigte nochmals die bereits zuvor ermittelten Zytotoxizitäten für die verschiedenen Zellen von Dox@AIO(OH) Nanopartikeln (für HeLa und HepG2-Zellen  $LD_{50} > 1 \mu M$ , für HUVEC  $LD_{50} < 1 \mu M$ ) und reinem Doxorubicin (für HeLa und HepG2-Zellen  $LD_{50} \leq 1 \mu M$ , für HUVEC  $LD_{50} > 1 \mu M$ ). Damit kann das unterschiedliche Reagenz als Ursache für die veränderten Werte der Zytotoxizität ausgeschlossen werden und diese eindeutig auf die verschiedenen Kultivierungssysteme zurückgeführt werden.

In einer weiteren Studie wurde nun außerdem überprüft, inwiefern die spezifische Abbildung des Blutgefäßes durch die fluidische Kultivierung der Endothelzellen auf der halbrunden, porösen Membran des *vasQchip* ausschlaggebend für die Untersuchung des transendothelialen Transports ist, oder ob dafür bereits eine Ko-Kultivierung von Endothel- und kanzerogenen Zellen ausreicht. Für diesen Vergleich wurde eine statische Ko-Kultur der Tumorzellen und des



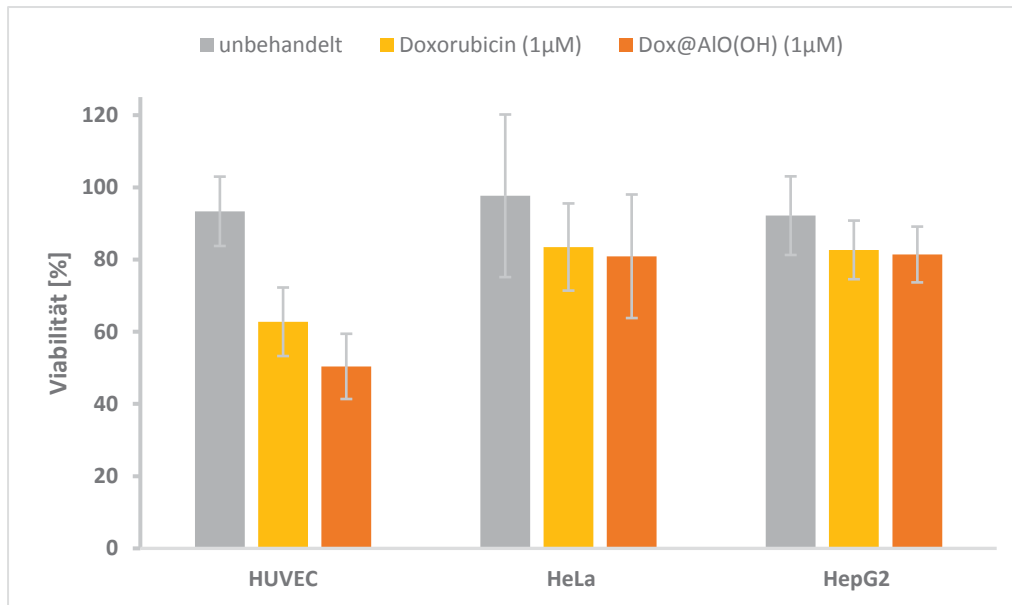
**Abbildung 18: Zytotoxizitätsstudie von Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin auf verschiedenen Zelltypen.** HeLa-, HepG2-Zellen und HUVEC wurden auf 96er-Zellkulturplatten ausgesät und für 24, 48 und 72 h mit Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension (1 µM Dox.) bzw. Doxorubicin-Lösung (1 µM) oder unbehandelt inkubiert. Davor und danach wurde ihre Viabilität photometrisch mithilfe des XTT-Reagenz ausgewertet und somit der Effekt der Behandlung bestimmt. n = 3

Endothels in einem Transwell®-Filter-System behandelt und analysiert. (Abb. 19) Dazu wurden die Endothelzellen ( $5 \cdot 10^4$ ) auf einer porösen Membran oberhalb einer Kammer mit den kanzerogenen HeLa- oder HepG2-Zellen ( $1 \cdot 10^5$ ) kultiviert. Zur Untersuchung wurden die Dox@AIO(OH) Nanopartikel (1 µM Dox) bzw. das Doxorubicin (1 µM) der konfluenten HUVEC Schicht im Transwell®-Filter hinzugefügt, das System für 48 h inkubiert und anschließend die Viabilität der Zellen mit XTT ausgewertet. (Abb. 20, Tab. 8) Unbehandelt zeigten alle Zellen der Ko-Kultur über 48 h eine gleichbleibende Viabilität (> 90 %) innerhalb des Systems. Für die kanzerogenen Zellen konnte durch die Behandlungen mit Dox@AIO(OH) Nanopartikeln sowie Doxorubicin nur eine geringe Zytotoxizität detektiert werden. Sowohl für HeLa- wie auch für HepG2-Zellen ergab sich für beide Wirkstoffe  $LD_{50} \gg 1 \mu\text{M}$ , die Viabilität lag in allen Fällen



**Abbildung 19: Schematischer Versuchsaufbau zum transendothelialen Wirkstofftransport im Transwell®-System.** Im zweigeteilten in vitro-System wird eine Ko-Kultur von Endothelzellen (HUVEC) auf dem Transwell®-Filter und kanzerogenen Zellen (HeLa oder HepG2) in der unteren Kammer etabliert. Zur Testung wird der Wirkstoff (Dox@AIO(OH) Nanopartikel oder Doxorubicin) auf die Endothelschicht gegeben.

weiterhin um 80 %. Dieser schwache Effekt deutet an, dass der transendotheliale Transport sowohl der Dox@AIO(OH) Nanopartikel als auch des Doxorubicins in das Kompartiment der Tumorzellkultur nur gering stattfand. Bei den HUVEC hingegen zeigte sich eine deutlichere zytotoxische Wirkung mit  $LD_{50} \geq 1\mu\text{M}$  für die Dox@AIO(OH) Nanopartikel und  $LD_{50} > 1\mu\text{M}$  für das reine Doxorubicin und einem deutlichen Rückgang der Viabilität. Dies deutet auf eine Akkumulation der Dox@AIO(OH) Nanopartikel und des Doxorubicins in der Endothelschicht hin, im Gegensatz zu einem effektiven transendothelialen Transport, wodurch sich die zytotoxische Wirkung in diesen Zellen zeigen konnte.



**Abbildung 20: Zytotoxizitätsstudie von Dox@AIO(OH) Nanopartikeln bzw. Doxorubicin im Transwell®-Filter-System.** Endothelzellen (HUVEC) und eine kanzerogene Zelllinie (HeLa oder HepG2) wurden als Ko-Kultur in Kammern mit Transwell®-Filtern eingebracht und für 48 h mit Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension (1 µM Dox.) bzw. Doxorubicin-Lösung (1 µM) behandelt oder als Kontrolle unbehandelt ausgewertet. Davor und danach wurde ihre Viabilität photometrisch mithilfe des XTT-Reagenzes ausgewertet und somit der Effekt der Behandlung bestimmt.  $n \leq 3$

Bei einer Zytotoxizitätsstudie der HUVEC ist es also von essentieller Bedeutung eine typische, den Zellen angepasste Kultivierung zu berücksichtigen. Während das Aussäen auf einer klassischen Zellkulturplatte ähnlich wie in einem statischen Filtersystem nicht die natürliche Umgebung von Endothelzellen widerspiegelt und diese somit andere Morphologien und Eigenschaften ausbilden, zeigen die Zellen unter fluidischen Bedingungen und auf einer gekrümmten Oberfläche *in vivo*-ähnliche Strukturen in Wachstum, Zell-Zell-Kontakten und Transporteigenschaften.<sup>72-74, 90</sup> Dadurch wird die Einlagerung von Wirkstoffen verhindert und somit auch der zytotoxische Effekt weitestgehend umgangen. Der Vergleich mit den aus den *in vivo*-Versuchen vorliegenden Ergebnissen macht deutlich, dass durch Anwendung des *vasQchips* die aussagekräftigsten *in vitro*-Daten erstellt werden konnten. Sowohl der verbesserte Effekt des Therapeutikums durch die Dox@AIO(OH) Nanopartikel gegenüber dem reinem Doxorubicin als auch geringe Nebenwirkungen, hier in Bezug auf die Blutgefäße, konnten *in vitro* dargestellt werden.

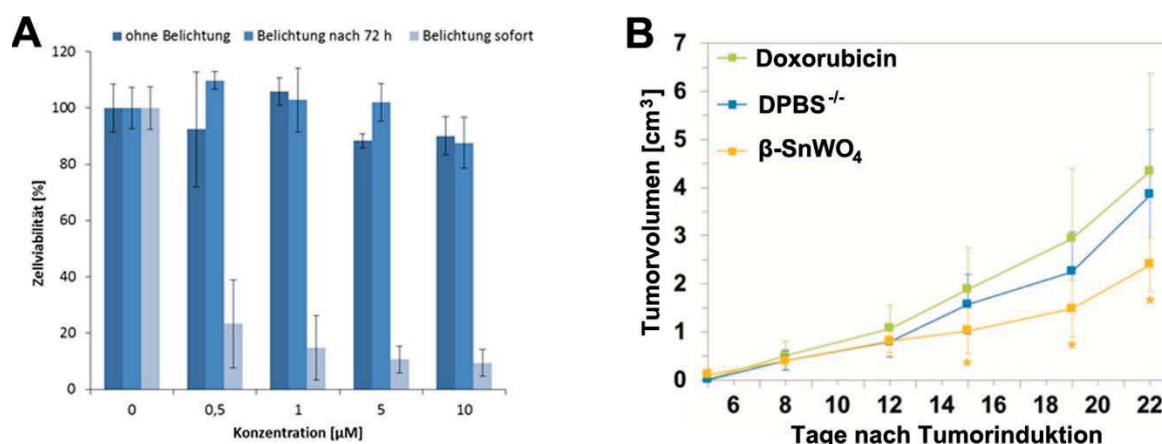


## 4.2. $\text{Gd}_4^{3+}[\text{AIPCS}_4]_3^{4-}$ Nanopartikel

Neben dem Einsatz als Container-Strukturen für die Verkapselung und den tumorspezifischen Transport von Wirkstoffen sind Nanopartikel auch bei alternativen Behandlungsmethoden von großem Interesse. So dienen sie beispielsweise als Substrat bei bildgebenden Untersuchungsmethoden, als magnetisierbare Einheit in der Hyperthermie oder als Photosensibilisator in der Bestrahlungstherapie. Anorganische Stoffe kommen dabei besonders häufig zum Einsatz, wenn es um Bestrahlungsmethoden geht. Hier ist die sogenannte „Photodynamische Therapie“ (PDT) ein vielversprechendes Verfahren, das als minimal invasiv und unschädlich für gesundes Gewebe gilt, bei dem aber bezüglich der eingesetzten photoaktiven Substanzen noch Entwicklungsbedarf besteht.<sup>134, 140, 151</sup> Eine grundlegende Eigenschaft solcher Photosensibilisatoren ist eine generell niedrige Toxizität in biologischen Systemen, aber ein signifikanter Anstieg der Zytotoxizität bei Belichtung, etwa durch die photoinduzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).<sup>142, 171</sup> Ein kritischer Punkt ist bei diesem Prozess die Anwendung einer Aktivierungsstrahlung mit geeigneter Wellenlänge. Denn einerseits kann mit hochenergetischem UV-Licht mehr ROS erzeugt werden, andererseits wird aber mit langwelligem Licht im IR-Bereich eine höhere Eindringtiefe in Gewebe und eine bessere Biokompatibilität gegenüber gesunder Gewebe erreicht.<sup>153</sup> Auch der Einsatz gemischter Wellenlängen für eine effektive PDT ist umstritten, da der dadurch induzierte, geringe oxidative Stress in verbleibenden Tumorzellen zu einer Aktivierung der Zellproliferation im Tumor führen und eine Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, einleiten kann.<sup>135, 154, 155</sup>

Prinzipiell unterscheidet man zwei Kategorien von Photosensibilisatoren, die in der PDT zum Einsatz kommen. Auf der einen Seite nutzt man organische Moleküle, wie Porphyrine oder Thiazine<sup>144-146</sup>, welche über ein weites Spektrum von Wellenlängen angeregt werden können. Allerdings sind die schlechte Löslichkeit in höheren Konzentrationen und die oft starke Aggregation unter physiologischen Bedingungen, sowie die dadurch bedingte geringe Bioverfügbarkeit gravierende Nachteile.<sup>144, 147, 148</sup> Es gibt diverse Ansätze, um diese Defizite zu überwinden oder auszugleichen, beispielsweise wie oben beschrieben durch eine Verkapselung der Wirkstoffe oder eine weitere Funktionalisierung durch Liganden.<sup>149</sup> Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, die aktiven Gruppen der Photosensibilisatoren nicht zu blockieren, und auch generell die Komplexität eines Wirkstoffs nicht zu sehr zu erhöhen. Auf der anderen Seite werden wie erwähnt anorganische Nanopartikel eingesetzt, beispielsweise Metalloxide (wie  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ) oder Seltene-Erden-Verbindungen (wie  $\text{Yb}^{3+}$ ).<sup>140, 150-152</sup> In vielen Fällen haben solche Nanopartikel den Nachteil, dass sie mit hochenergetischer Strahlung im UV-Bereich aktiviert werden müssen, welche aber aufgrund der Schädigung von Biomolekülen bei einer therapeutischen Anwendung gefährlich für alle Zellen und Gewebe ist. Zudem ist oft eine Anregung mit hoher Photonendichte und somit der Einsatz von Laser-Strahlung nötig, welche dieselben beschriebenen Nebenwirkungen aufweist.

Dass metallische, photokatalytische Nanopartikel prinzipiell für eine Strahlentherapie in biologischen Systemen angewandt werden können, hat sich in früheren Studien bereits gezeigt.<sup>131, 140, 172</sup> So konnten am Institut für Anorganische Chemie (AOC) des KIT in der



**Abbildung 21: In vitro- und in vivo-Studien mit  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub>-Nanopartikeln.** (nach J. Ungelenk et al., 2014<sup>173,a</sup> und C. Seidl et al., 2016<sup>174,b</sup>) Zytotoxizitätsstudie von  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> Nanopartikeln auf HepG2-Zellen (A): Für 72 h wurden HepG2-Zellen ( $10^5$  Zellen/ml) mit Konzentrationen zwischen 1 und 10  $\mu$ M von  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> Nanopartikeln behandelt und entweder in Dunkelheit inkubiert (blau) oder zusätzlich sofort (hellblau) bzw. nach 72 h (blau) für 3 h mit Kaltweiß-LEDs bestrahlt, um eine Phototoxizität zu induzieren. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen photometrisch mithilfe des MTT-Reagenzes ausgewertet.  $n = 8$ . In vivo-Studie mit BALB/c Mäusen (B): Vermessung der Tumorumfänge des orthotop induzierten Brustkarzinoms (4T1) über 3 Wochen nach Behandlung mit  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> (23 mg/kg Körpergewicht) und anschließender Belichtung, freiem Doxorubicin (2,5 mg/kg Körpergewicht) und DPBS<sup>-/-</sup> als Kontrollen.  $n = 6$

Arbeitsgruppe von Prof. Feldmann in einem einfachen Präzipitationsverfahren Nanopartikel der gelben beta-Form von Zinnwolframat ( $\beta$ -SnWO<sub>4</sub>) hergestellt werden, die sowohl biokompatibel wie auch photoaktiv sind.<sup>175-177</sup> Dabei erfolgt die Aktivierung durch eine Bestrahlung im sichtbaren Wellenlängen Bereich ( $\lambda_{\text{ex}} < 550$  nm). *In vitro* konnte durch eine grüne Fluoreszenz der Nanopartikel eine hohe zelluläre Aufnahme festgestellt werden sowie gleichzeitig eine geringe Zytotoxizität bei Kultivierung der Zellen in Dunkelheit. Durch eine Belichtung jedoch konnte eine Phototoxizität und die Bildung von ROS induziert werden, was zum Absterben der Zellen führte. Der LD<sub>50</sub>-Wert lag dabei in HepG2-Zellen deutlich unter 0,5  $\mu$ M, schon bei einer Nanopartikel-Konzentration von 5  $\mu$ M sank die Viabilität in der Zellkultur durch die Bestrahlung auf etwa 10%.<sup>166, 173, 178</sup> (Abb. 21<sup>a,b</sup>) Außerdem wurde gezeigt, dass der Zeitpunkt der Bestrahlung einen entscheidenden Einfluss auf die Phototoxizität dieser Nanopartikel hat. Wurde die Zellkultur erst 3 Tage nach Zugabe der  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> belichtet, so war die Zytotoxizität ebenso wie in der unbelichteten Probe vernachlässigbar (LD<sub>50</sub> >>> 10  $\mu$ M). Dies deutet auf den zügigen Zerfall der Nanopartikel durch die metabolische Zellaktivität hin und wirkt damit ungewünschten Langzeit-Folgen durch Einlagerung der Substanz entgegen.<sup>122</sup> Desweiteren konnte in *in vivo*-Studien im orthotopen Mausmodell eine signifikante Anti-Tumor-Wirkung sowie außerdem ein anti-metastatischer Effekt durch Behandlung mit den  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> Nanopartikeln beobachtet werden. Gegenüber dem herkömmlichen Zytostatikum Doxorubicin wurde eine deutlich höhere, tumorspezifische Zytotoxizität erreicht.<sup>166, 174</sup> Dabei wurden in Untersuchungen des Blutbildes kaum Nebenwirkungen sowie ohne Belichtung eine schnelle

<sup>a</sup> Reproduced from Ungelenk, J.; Seidl, C.; Zittel, E.; Roming, S.; Schepers, U.; Feldmann, C. *Chemical communications* **2014**, 50, (50), 6600-3. with permission from the Royal Society of Chemistry.

<sup>b</sup> Reprinted with permission from Seidl, C.; Ungelenk, J.; Zittel, E.; Bergfeldt, T.; Sleeman, J. P.; Schepers, U.; Feldmann, C. *ACS nano* **2016**, 10, (3), 3149-57. Copyright ©2016 American Chemical Society.



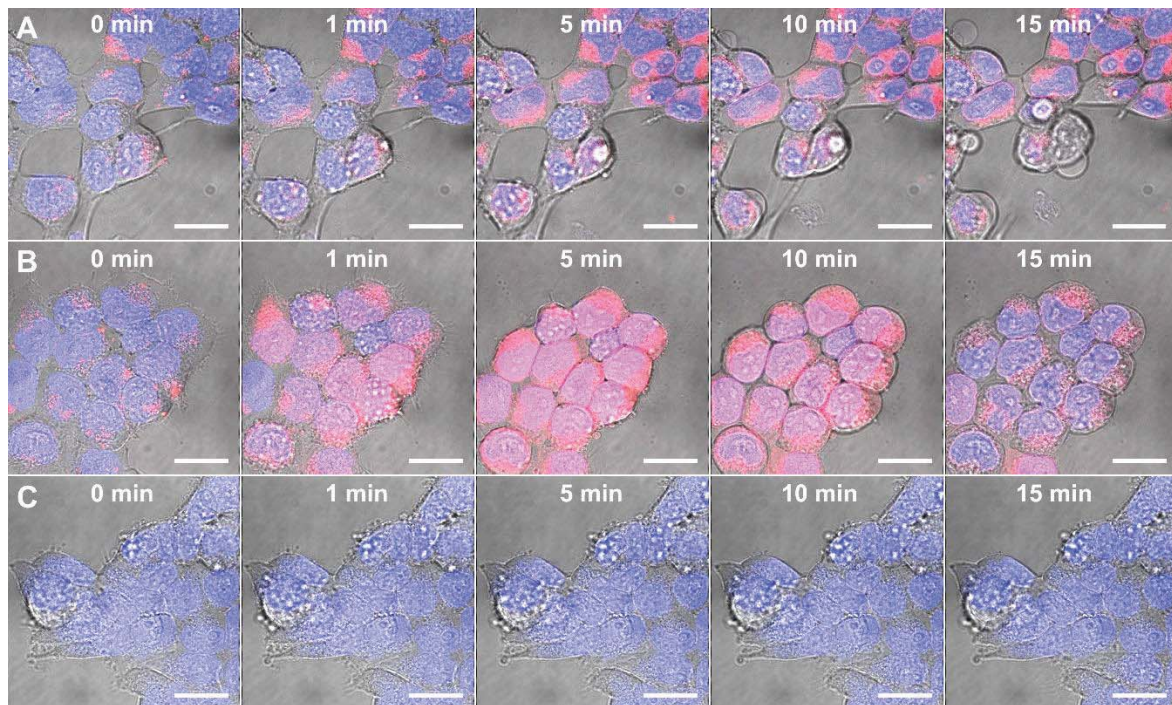
Ausschleusung aus dem Organismus festgestellt. Dies macht  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> zu einem interessanten Kandidaten für die PDT. Trotzdem bleibt die geringe Eindringtiefe von Strahlung der benötigten Wellenlänge ein Problem, so dass ausschließlich ein Einsatz für die Behandlung an Oberflächen in Frage kommt.

Um die beschriebenen Defizite zu überwinden wurde daher am Institut für Anorganische Chemie (AOC) des KIT in der Arbeitsgruppe von Prof. Feldmann ein anorganisch-organisches Hybridsystem entwickelt, das eine hohe Effektivität bei gleichzeitig unkomplizierter Synthese bieten soll.<sup>179-181</sup> Das System basiert auf homogen dispergierbaren Nanopartikeln ( $47 \pm 7$  nm) aus Gadolinium-Ionen und dem photoaktiven [AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> (85 % w/w). Dieses Phthalocyanin ist ein bekannter Photosensibilisator, durch den ROS gebildet werden können und der bereits klinisch für die PDT validiert ist.<sup>182</sup> Auch Gadolinium ist als Metallion bereits Bestandteil klinisch eingesetzter Substanzen, wie beispielsweise der MRT-Kontrastmittel Gd-DTPA oder Gd-DOTA.<sup>183</sup> Diese beiden Reagenzien binden ionisch durch elektrostatische Wechselwirkungen aneinander und können in einer wässrigen Synthese als fein verteilte Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanopartikel-Suspensionen hergestellt werden. Hierbei kommt eine gezwungene Hydrolyse zum Einsatz, mit der sich Partikel-Nukleation und –Wachstum kontrollieren lassen und auch hohe Nanopartikel-Konzentrationen erstellt werden können.<sup>181, 184</sup> Die Suspension weist ein breites Absorptionsspektrum von etwa 500-650 nm und ein Emissionsmaximum bei 686 nm auf.<sup>179</sup> Diese langwellige Anregung zeichnet sich durch gute Biokompatibilität aufgrund von hoher Eindringtiefe und geringer Gewebeschädigung aus.

#### 4.2.1. Zelluläre Aufnahme und Photoaktivierung

Die zelluläre Aufnahme der Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanopartikel wurde in HepG2- und HeLa-Zellen getestet und mit dem Phthalocyanin H<sub>4</sub>AIPCS<sub>4</sub> in Lösung verglichen. (Abb. 22, Abb. 76) Für eine konfokalmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen zunächst auf *μ*slides ausgesät (10<sup>5</sup> Zellen/ml) und für 24 h entweder mit Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanopartikeln (20  $\mu$ M) oder der H<sub>4</sub>AIPCS<sub>4</sub>-Lösung (20  $\mu$ M) als Vergleichssubstanz inkubiert. Vor der Mikroskopie wurden zusätzlich die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/ml) angefärbt. Zwischen den Mikroskopie-Aufnahmen wurden die Zellen kontinuierlich durch Laserstrahlung mit  $\lambda = 635$  nm belichtet, um die Photosensibilisatoren zu aktivieren und den unmittelbaren Effekt auf die Zellen zu beobachten. Sowohl die Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanopartikel wie auch die H<sub>4</sub>AIPCS<sub>4</sub>-Lösung zeigten eine gute zelluläre Aufnahme, welche durch die rote Fluoreszenz ( $\lambda_{em} = 640-670$  nm) verfolgt werden konnte. Eine Akkumulation war zunächst in den perinukleären und endosomalen Kompartimenten auszumachen. Durch die Laserbestrahlung über 15 min war eine schnelle Änderung von Morphologie und Integrität der Zellen zu beobachten. Die Behandlung mit Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanopartikeln zeigte durch die Belichtung eine deutliche Nekrose, erkennbar durch das Anschwellen des Zellkörpers, eine Deformierung des Zellkerns, die Bildung vesikulärer Strukturen sowie die Auflösung der adhärennten Kontakte. Ähnliche Effekte zeigten sich auch nach Bestrahlung der mit H<sub>4</sub>AIPCS<sub>4</sub>-Lösung inkubierten Zellen: Durch die Verformung von





**Abbildung 22: Zelluläre Aufnahme und Photoaktivierung in HepG2-Zellen von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln und  $H_4AIPCS_4$ -Lösung.** HepG2-Zellen wurden mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln ( $20 \mu M$ ) (A),  $H_4AIPCS_4$ -Lösung ( $20 \mu M$ ) (B) oder unbehandelt (C) für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit Hoechst 33342 ( $2 \mu g/ml$ ) gefärbt, konfokalmikroskopisch untersucht und dabei mit 635 nm-Laserstrahlung für die angegebenen Zeitdauern belichtet. Dargestellt sind Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst-Färbung und Photosensibilisator (blau:  $\lambda_{ex}$  405 nm/  $\lambda_{em}$  460-480 nm, rot:  $\lambda_{ex}$  635 nm/  $\lambda_{em}$  640-670 nm) sowie dem Hellfeld. Maßstab  $10 \mu m$

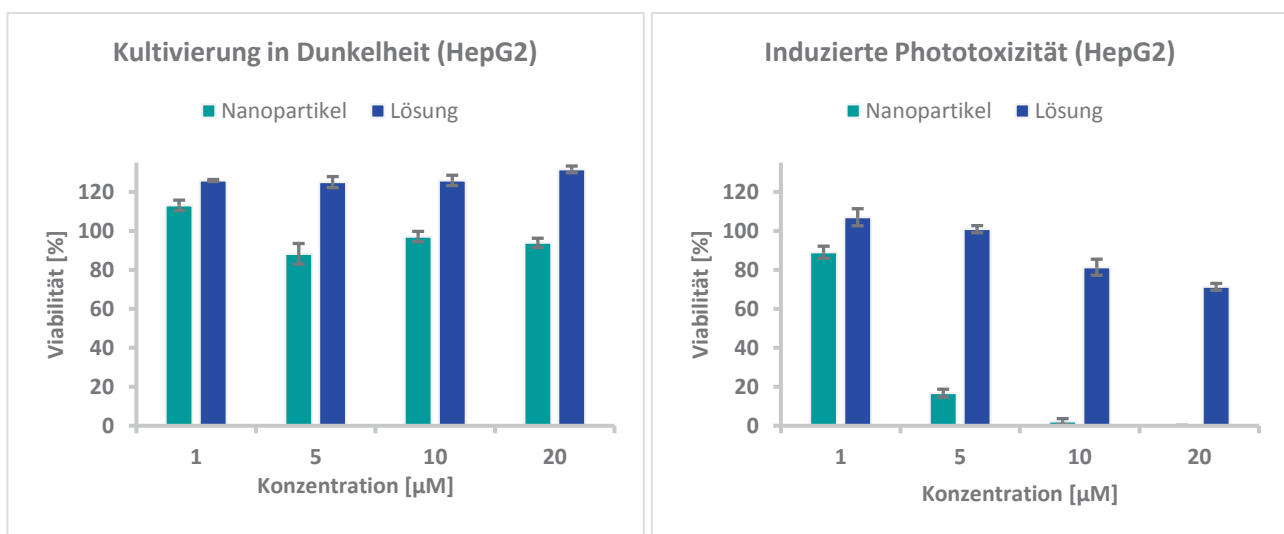
Zellen und Zellkernen konnte ebenfalls eine verstärkte Nekrose beobachtet werden. Im Unterschied zur Behandlung mit den  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln konnte hier einerseits auch ein Fluoreszenzsignal innerhalb der Zellkerne detektiert werden sowie andererseits eine Abnahme der Fluoreszenz nach längerer Bestrahlung, was auf eine Photobleichung des  $H_4AIPCS_4$  hindeutet.<sup>185, 186</sup> Bei den unbehandelten Zellen ist durch die Belichtung keine Veränderung zu erkennen. Insgesamt ist der Effekt bei den HepG2-Zellen etwas deutlicher ausgeprägter als bei den HeLa-Zellen, was eventuell auf eine bessere Aufnahme aufgrund eines schnelleren Wachstums und höheren Stoffwechsel zurückzuführen ist.

#### 4.2.2. Biokompatibilität und Phototoxizität

Um die Zytotoxizität der  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel sowie der  $H_4AIPCS_4$ -Lösung sowohl ohne als auch mit einer Bestrahlung zu quantifizieren und zu vergleichen, wurden wie zuvor (Kapitel 4.1.1) MTT-Tests durchgeführt. (Abb. 23, Abb. 77, Tab. 8) Dafür wurden HepG2- und HeLa-Zellen ( $10^5$  Zellen/ml) auf 96er-Zellkulturplatten kultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen ( $1 - 20 \mu M$ ) beider Wirkstoffe behandelt. Während der 72-stündigen Inkubation verblieb ein Teil der Platten komplett in Dunkelheit, während der andere zu Beginn mithilfe eines N-IR Scanning Mikroskops zweimal für 5 min mit 670 nm bestrahlt wurde. Die doppelte



Belichtung hatte sich dabei als effektiv erwiesen, da eine lange Bestrahlungszeit erreicht werden konnte, ohne die Zellen sehr lange aus den Inkubationsbedingungen zu entnehmen. Außerdem konnte dadurch ein möglicherweise einsetzender Regenerationsmechanismus nach der ersten Belichtung durch die zweite Photoaktivierung direkt beeinträchtigt werden. Unter Ausschluss von Licht war sowohl bei HepG2- wie auch bei HeLa-Zellen kein zytotoxischer Effekt der  $H_4AIPCS_4$ -Lösung detektierbar. Ebenso zeigten auch die  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel nur eine sehr geringe Zytotoxizität auf ( $LD_{50} \gg 20 \mu M$ ). Bei einer Behandlung mit zusätzlicher Bestrahlung hingegen konnte wie auch bereits in der mikroskopischen Untersuchung eine deutliche Phototoxizität induziert werden. In HepG2- wie auch in HeLa-Zellen ergab sich  $LD_{50} < 5 \mu M$  für die  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel und damit eine stark erhöhte Zytotoxizität durch die Bestrahlung. Bei der Behandlung mit der  $H_4AIPCS_4$ -Lösung war die Veränderung durch die Bestrahlung weniger deutlich, hier ergab sich  $LD_{50} > 20 \mu M$ .

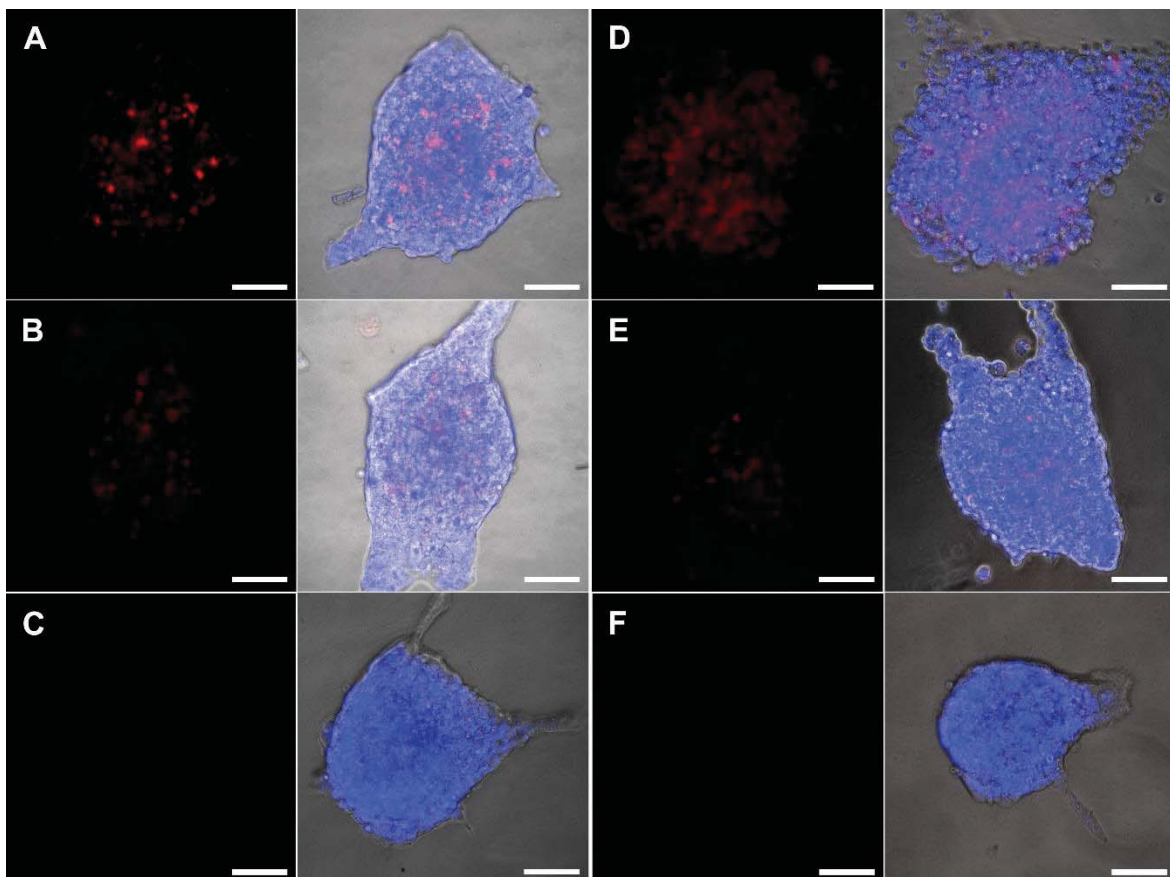


**Abbildung 23: Zytotoxizitätsstudie von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln und  $H_4AIPCS_4$ -Lösung auf HepG2-Zellen.** Für 72 h wurden HepG2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 und 20  $\mu M$  von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln (hellblau) oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung (dunkelblau) behandelt und entweder in Dunkelheit inkubiert (links) oder zusätzlich nach 2 h für 2\*5 min mit 670 nm bestrahlt (rechts), um eine Phototoxizität zu induzieren. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen photometrisch mithilfe des MTT-Reagenzes ausgewertet.  $n = 6$

#### 4.2.3. Sphäroide als *in vitro*-Tumormodell

Um den Nutzen bei einem Einsatz in der PDT weiter zu evaluieren, wurden weitere *in vitro*-Testsysteme verwendet. In Analogie zur Untersuchung der Dox@AIO(OH) Nanopartikel wurde auch hier der Effekt auf dreidimensionale Sphäroide aus HepG2-Zellen analysiert, um das zu testende Tumorgewebe durch den Versuchsaufbau besser zu simulieren. Wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.1.3), wurden die Zellen ohne adhärenzte Wachstumsfläche über mehrere Tage kultiviert bis sich kugelförmige Zellaggregate gebildet hatten. Diese wurden anschließend auf eine mit EZM (Geltrex<sup>®</sup>) beschichtete *µslide* überführt, um ein Anwachsen und das Bilden von Ausläufern zu ermöglichen. Die Sphäroide wurden mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln (20  $\mu M$ )

oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung ( $20 \mu M$ ) behandelt und für 24 h inkubiert. Ein Teil verblieb dabei in Dunkelheit, während der andere nach 3 h zunächst mittels N-IR Scanning Mikroskop zweimal für 10 min bei 670 nm belichtet wurde. Anschließend wurden alle Sphäroide mit Hoechst 33342 ( $2 \mu g/ml$ ) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. (Abb. 24) Durch die rote Fluoreszenz konnte eine Aufnahme beider Substanzen in die Zellaggregate beobachtet werden. Die unbehandelten Sphäroide zeigten sowohl unbelichtet als auch nach Belichtung keinerlei Beeinträchtigung und einen intakten Zellverbund auf. Ein drastischer Unterschied konnte hingegen bei der Behandlung und Bestrahlung mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln beobachtet werden. Während die Nanopartikel zwar gut aufgenommen wurden, zeigten sie ohne eine Photoaktivierung keinen zytotoxischen Effekt und die Viabilität sowie die Integrität der Sphäroide blieben wie in der Kontrolle erhalten. Die Belichtung jedoch führte zu einer starken Nekrose bzw. Apoptose und damit zum Abbau der Zell-Zell-Kontakte: Die Zellen lagen nicht mehr als Zellverband vor, zeigten kein adhärentes Wachstum und eine runde Zellmorphologie. Die Behandlung mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln zeigte somit einen stark zytotoxischen Effekt, der aber erst durch die Photoaktivierung ausgelöst wurde. Auch die Behandlung mit  $H_4AIPCS_4$ -Lösung zeigte nach Inkubation in Dunkelheit keine zytotoxischen Auswirkungen auf

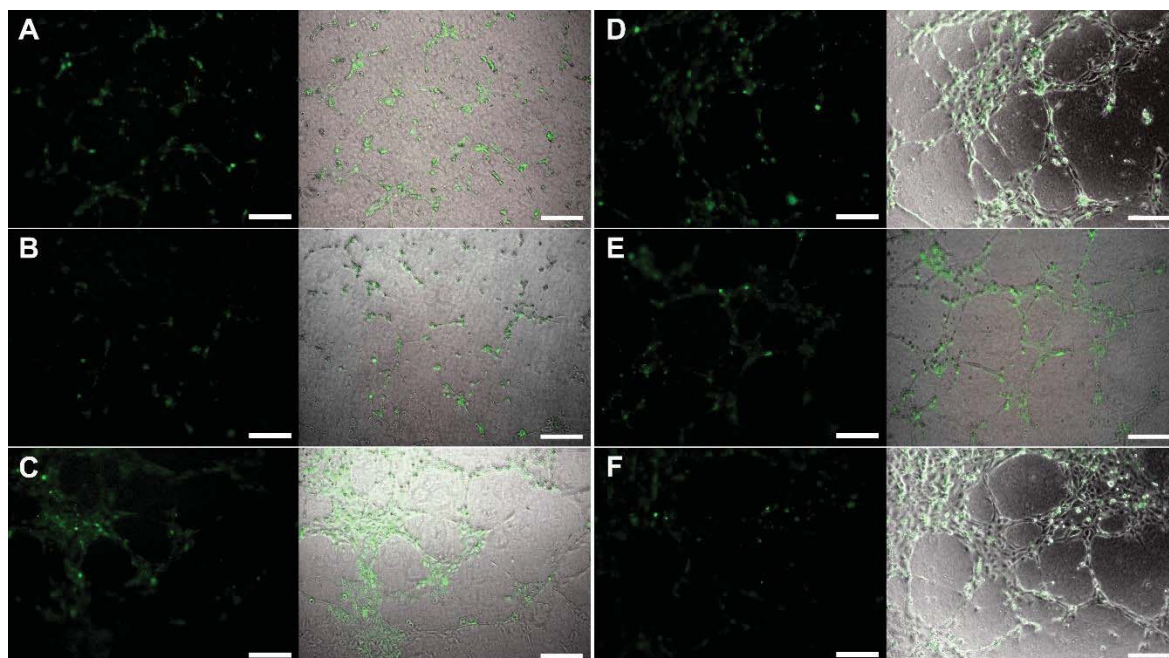


**Abbildung 24: HepG2-Sphäroide behandelt mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung mit und ohne Bestrahlung.** Nach der Kultivierung der Sphäroide über mehrere Tage wurden diese auf EZM-beschichtete  $\mu$ slides überführt und mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln ( $20 \mu M$ ) (A, D),  $H_4AIPCS_4$ -Lösung ( $20 \mu M$ ) (B, E) oder unbehandelt als Kontrolle (C, F) inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 24 h in Dunkelheit (A-C) oder nach einer Belichtung von  $2 \cdot 10$  min bei 670 nm (D-F). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 ( $2 \mu g/ml$ ) angefärbt und die Sphäroide fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abgebildet sind die rote Fluoreszenz der Photosensibilisatoren ( $\lambda_{ex}$  558 nm/  $\lambda_{em}$  582 nm) sowie die Überlagerung mit der blauen Fluoreszenz der Hoechst-Färbung ( $\lambda_{ex}$  359 nm/  $\lambda_{em}$  461 nm) und dem Hellfeld. Maßstab  $100 \mu m$

die Sphäroide. Ein im Vergleich zu den  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln deutlich niedrigeres Fluoreszenzsignal deutet hier aber auf eine geringere Internalisierung des Photosensibilisators hin. Nach der Photoaktivierung war durch die  $H_4AIPCS_4$ -Lösung eine zytotoxische Wirkung auf die Sphäroide zu erkennen. Im Gegensatz zu den mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln behandelten Zellen wiesen diese Sphäroide aber immer noch einen zusammenhängenden Verbund auf. Eine Vereinzelnung sowie Nekrose oder Apoptose der Zellen konnte nicht detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor erlangten Erkenntnisse, dass durch die Verbindung von  $[AIPCS_4]_3^{4-}$  mit Gadolinium als anorganisch-organische Hybrid-Nanopartikel eine gesteigerte Phototoxizität erreicht wird.

#### 4.2.4. *In vitro*-Studie zur Angiogenese

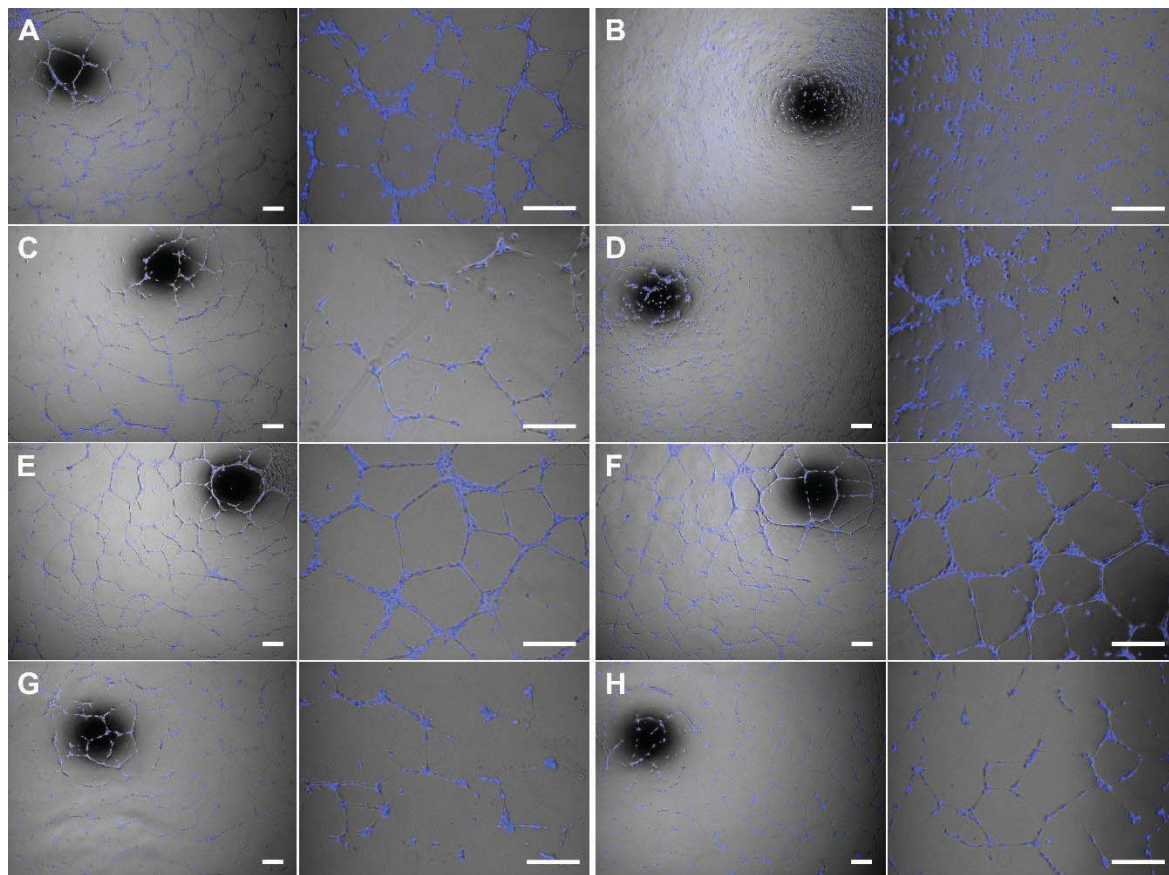
Wie zuvor bereits beschrieben, zeichnet sich eine erfolgreiche Behandlung in der PDT nicht nur durch ein gezieltes Abtöten der kanzerogenen Zellen aus, sondern sie darf auch ein weiteres Wachstum sowie die Bildung neuer Blutgefäße nicht induzieren.<sup>135, 154, 155</sup> Im Gegenteil wären hier die Zerstörung mikrovaskulärer Strukturen und das Verhindern von Angiogenese entscheidende Verbesserungen der therapeutischen Anwendung. Für Porphyrine als Photosensibilisator konnten hier bereits vielversprechende Effekte beobachtet werden, wie zum Beispiel die Permeabilisierung von Blutgefäßen oder Vasokonstriktion bis hin zu einem kompletten Zusammenbruch der Blutversorgung im Tumorgewebe.<sup>187-190</sup> Daher wurde auch der



**Abbildung 25: Einfluss von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung auf in vitro-Angiogenese von HUVEC.** Die Bildung mikrovaskulärer Strukturen von HUVEC ( $4 \cdot 10^4$ ) auf Geltrex® bei Behandlung mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln ( $20 \mu M$ ) (A, D) oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung ( $20 \mu M$ ) (B, E) bzw. unbehandelt als Kontrolle (C, F) wurde nach 24 h Inkubation fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurden die Proben entweder in Dunkelheit (A-C) oder nach Belichtung ( $2 \cdot 10$  min bei 670 nm) kultiviert. Zur besseren Visualisierung der Mikrokapillaren wurden die Zellen mit CellTracker™ Green ( $1 \mu M$ ) gefärbt. Abgebildet sind die Fluoreszenzaufnahme des CellTracker™ Green ( $\lambda_{ex}$  489 nm/  $\lambda_{em}$  508 nm) sowie die Überlagerung mit dem Hellfeld. Maßstab 200  $\mu m$

Einfluss von  $Gd_4^{3+}[AlPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln bzw.  $H_4AlPCS_4$ -Lösung auf die Angiogenese von Mikrokapillaren in einer *in vitro*-Studie untersucht. (Abb. 25) Durch das Aussäen von Endothelzellen in geeigneter Zellzahl auf einer das vaskuläre Wachstum stimulierenden extrazellulären Matrix (Geltrex®), kann innerhalb eines Tages die Entstehung einer vaskulären Netzstruktur erreicht werden.<sup>191</sup> Für andere Zelltypen, wie Fibroblasten, konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden, sondern lediglich das bekannte konfluente Wachstums. Als passende Zelldichte in den verwendeten *μslides* bei einer Wachstumsfläche von 1 cm<sup>2</sup> hat sich für HUVEC (humane Endothelzellen der Nabelschnur) eine Zellzahl von  $4 \cdot 10^4$  erwiesen. Die Zellen wurden ausgesät, gleichzeitig mit den Photosensibilisatoren (jeweils 20 μM) behandelt und für 24 h inkubiert. Während ein Teil dabei vollständig in Dunkelheit verblieb, wurde der andere noch vor der einsetzenden Angiogenese ab 4 h nach Beginn der Kultivierung zweimal für 10 min bei 670 nm belichtet. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellen mit *CellTracker™ Green* (1 μM) oder Hoechst 33342 (2 μg/ml) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei der unbehandelten Probe bildete sich in beiden Fällen eine Netzstruktur der HUVEC über die Kultivierungsfläche aus, die Belichtung hatte hier keinen Einfluss. Ebenso war bei Behandlung mit  $Gd_4^{3+}[AlPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln und Kultivierung in Dunkelheit ein solches Netzwerk vorzufinden, wohingegen die  $H_4AlPCS_4$ -Lösung die Ausrichtung der Zellen bereits erkennbar inhibierte. Diese Eigenschaft, die Angiogenese zu inhibieren, kann in einem Organismus ungewünschte Nebenwirkungen hervorrufen, da Mikrokapillaren in anderen Gewebe in Mitleidenschaft gezogen werden. Dennoch zeigte die Photoaktivierung für beide Wirkstoffe nochmals einen signifikanten Effekt, da die Vernetzung der Zellen nahezu vollständig inhibiert wurde und die Zellen größtenteils vereinzelt vorlagen.

Um diese Ergebnisse noch genauer beurteilen zu können, wurde eine weitere Studie zur Angiogenese durchgeführt. (Abb. 26) Dabei wurde einerseits die Konzentration der Wirkstoffe erhöht (auf jeweils 40 μM), um die detektierbare Wirkung noch zu verstärken. Andererseits wurde zusätzlich die Angiogenese unter Abwesenheit von Wachstumsfaktoren untersucht. Dazu wurde neben der bisherigen unbehandelten Kontrolle mit normalen Wachstumsmedium mit entsprechenden Zusätzen (EGM-2), eine weitere Probe mit dem Basal-Medium ohne diese Zusätze (EBM-2) angesetzt. Diese sollte als eine weitere Referenz für die Einstufung der auszumachenden Angiogenese dienen. Wie zuvor zeigte sich eine weitflächig ausgebildete Netzstruktur der HUVEC bei der EGM-2-Kontrolle, sowohl ohne als auch mit Belichtung, sowie bei einer Behandlung mit  $Gd_4^{3+}[AlPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln und Inkubation in Dunkelheit. Die Vernetzung war hier feinmaschig und an den Verknüpfungspunkten besonders ausgeprägt. Die EBM-2-Kontrolle, belichtet und unbelichtet, wies erwartungsgemäß einen deutlich geringeren Grad der Vernetzung auf, welche vielmals nur angedeutet und häufig unterbrochen war. Dennoch war bei Kultivierung auf der EZM-Schicht trotzdem eine, wenn auch geringe, Angiogenese zu beobachten. Dieses Gesamtbild ergab sich ebenfalls durch die Behandlung mit  $H_4AlPCS_4$ -Lösung schon ohne Belichtung. Die Netzstruktur war nur sehr unregelmäßig und weitmaschig mit vielen Unterbrechungen, die Angiogenese wurde also weitestgehend inhibiert. Dies bestätigt die Ergebnisse der ersten Untersuchung. Die Photoaktivierung erreicht schließlich bei den behandelten Proben eine starke Desintegrität der Zellanordnung,



**Abbildung 26: Einfluss von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung auf in vitro-Angiogenese von HUVEC im Vergleich mit Wachstumsfaktoren.** Die Bildung mikrovaskulärer Strukturen von HUVEC ( $4 \cdot 10^4$ ) auf Geltrex® bei Behandlung mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln ( $40 \mu M$ ) (A, B) oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung ( $40 \mu M$ ) (C, D) bzw. unbelichtet als Kontrollen mit vollständigem Medium (EGM-2) (E, F) und mit Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren (EBM-2) (G, H) wurde nach 24 h Inkubation fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurden die Proben entweder in Dunkelheit (A, C, E, G) oder nach Belichtung ( $2 \cdot 10$  min bei 670 nm) (B, D, F, H) kultiviert. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellen mit Hoechst 33342 ( $2 \mu g/ml$ ) gefärbt. Abgebildet sind die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{ex}$  359 nm/  $\lambda_{em}$  461 nm) und Hellfeld in zwei Vergrößerungen. Maßstab 250  $\mu m$

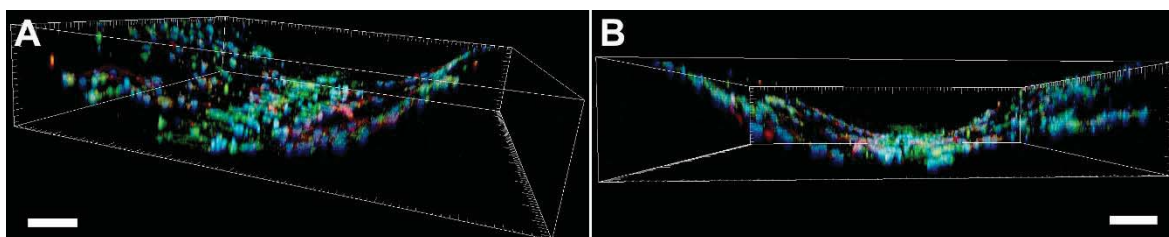
insbesondere nach der Inkubation mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln. Hier lagen die Zellen vereinzelt vor und eine Netzstruktur war nicht mehr erkennbar. Ähnlich waren auch in der mit  $H_4AIPCS_4$ -Lösung behandelten Probe nur wenige Zell-Zell-Kontakte zwischen den HUVEC ausgebildet und eine Vernetzung kaum detektierbar. Somit wiesen beide Behandlungen mit Photosensibilisatoren nach Belichtung im Vergleich zur EBM-2-Kontrolle deutlich mehr einzelne Zellen und weniger Vernetzung auf. Sowohl durch die  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln als auch durch die  $H_4AIPCS_4$ -Lösung konnte also bei Photoaktivierung eine signifikante Hemmung der Angiogenese hervorgerufen werden. im Vergleich mit den Kontrollen jedoch löste die Behandlung mit  $H_4AIPCS_4$ -Lösung auch zuvor bereits eine ungewünschte Inhibierung aus, was bei einer therapeutischen Anwendung Nebenwirkungen hervorrufen kann. Die  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel hingegen wiesen ohne Belichtung eine gute Biokompatibilität auf und zeigten zudem eine verbesserte phototoxische Wirkung.

Insgesamt zeigte sich somit eine Verbesserung des Photosensibilisators  $[\text{AlPCS}_4]_3^{4-}$  durch die Verbindung mit Gadolinium zu anorganisch-organischen Hybrid-Nanopartikeln. Die Phototoxizität bei gleicher Belichtung konnte deutlich gesteigert, eine gute zelluläre Aufnahme konnte detektiert werden und ohne Belichtung wurde eine gute Kompatibilität gezeigt.

Für eine weitere Charakterisierung der  $\text{Gd}_4^{3+}[\text{AlPCS}_4]_3^{4-}$  Nanopartikel im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Feldmann laufen ergänzende *in vitro*-Studien mit fluoreszenzmarkierten Zellen, die eine leichte Beobachtung von Zustandsänderungen erlauben, eine qualitative Evaluierung der ROS-Bildung in Zellen bei Bestrahlung sowie erste Experimente zu Biokompatibilität und einer Photoaktivierung *in situ* im Zebrafischembryo.<sup>180</sup>

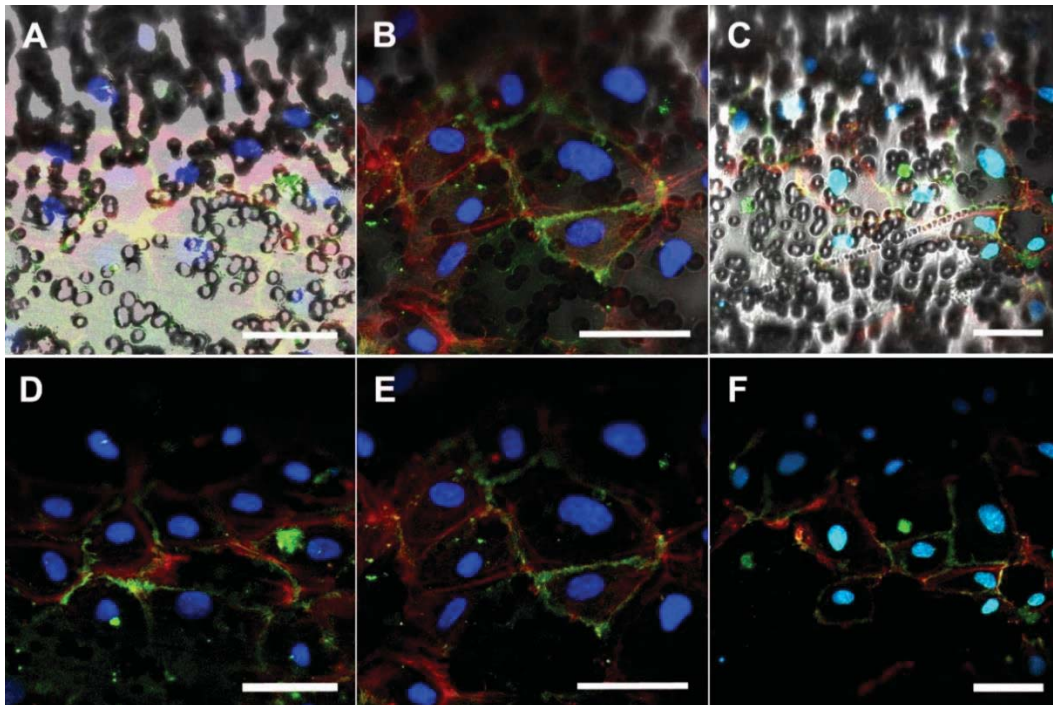
### 4.3. Entwicklung des *vasQchip* Tumormodells

Um die Wirkung von Chemikalien oder medizinischen Substanzen, wie potentiellen Wirkstoffen oder Kosmetika, in biologischen Systemen vorherzusagen oder einzustufen, gibt es zahlreiche etablierte Verfahren. Im Bereich der Medikamentenentwicklung beispielsweise ist ein mehrstufiger Prozess vorgeschrieben, der eine vielseitige präklinische Untersuchung im Labor anhand von Zellkultur- sowie Tierversuchen vorgibt, sowie anschließende klinische Studien an menschlichen Probanden und Patienten.<sup>16</sup> Dennoch scheitern viele Wirkstoffkandidaten früh in der klinischen Phase, da sich die Ergebnisse der präklinischen Experimente nicht bestätigen oder unvorhergesehene Nebenwirkungen auftreten.<sup>11, 192</sup> Trotz der umfangreichen Untersuchungen können die ermittelten Werte oft nur bedingt auf den menschlichen Organismus angewendet werden, da die eingesetzten Experimente nur auf entweder sehr vereinfachten Kulturen humaner Zellen oder aber tierischen Organismen basieren. Beide bieten zwar fundierte Anhaltspunkte, können die humane Physiologie sowie spezie-spezifische Eigenschaften aber nur bedingt abbilden. Daher ist es ein weites Forschungsfeld, neuartige *in vitro*-Systeme zu entwickeln, die spezifischere Versuche und somit zuverlässigere Prognosen ermöglichen. Dadurch sollen einerseits ungeeignete Wirkstoffe bereits während der präklinischen Phase ausgeschlossen werden können, die Anzahl an durchgeführten sowie notwendigen Tierversuchen verringert werden, und andererseits auch die Sicherheit für die Probanden der klinischen Studien erhöht werden. Solche modernen *in vitro*-Modelle bestehen beispielsweise aus organotypischen Zellkulturen, die dreidimensionale Gewebe formen, aus Ko-Kulturen verschiedener Zelltypen oder auch aus dynamischen Systemen wie den sogenannten *Organs-on-a-Chip*-Modellen. Hier werden miniaturisiert organische Umgebungen geschaffen, die in biologischer und chemischer Zusammensetzung sowie mit physikalischen Reizen Ausschnitte menschlicher Organe widergeben. Die großen Vorteile solcher Systeme sind, neben dem Einsatz humaner Materialien, die Möglichkeit einer konstanten Überwachung sowie die individuelle Beeinflussung einzelner Parameter und Inkubationsbedingungen. Um transendotheliale Transportvorgänge zu untersuchen, wurde auch am KIT in einer Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen von Prof. Schepers am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) bzw. von Prof. Giselbrecht am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1) ein solches Chip-Modell, der *vasQchip*, entwickelt.<sup>74, 91, 92</sup> Die Basis dieses Modells ist ein mikrofluidischer Kanal aus einer halbrunden, porösen Polycarbonat-Membran, der mit Endothelzellen besiedelt werden kann und so ein mikrofluidisches Blutgefäß simuliert. (Abb. 27) Die Herstellung dieser Kanäle beruht auf Prozessen

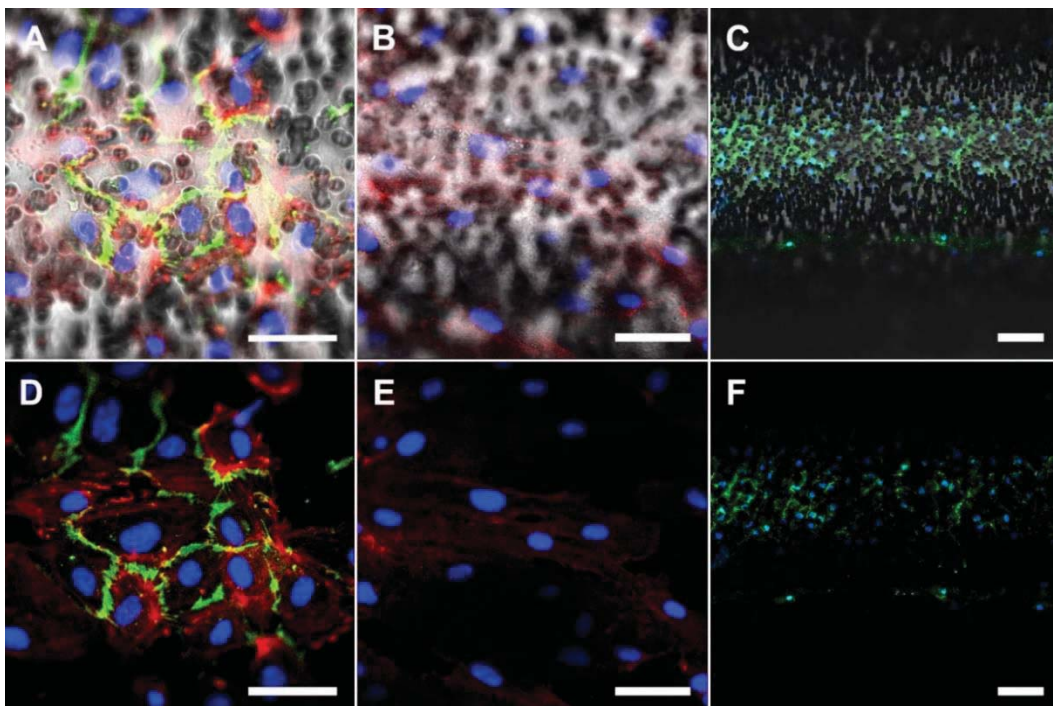


**Abbildung 27: 3D Darstellung des besiedelten Kanals im *vasQchip*.** Die HUVEC wurden als konfluente Schicht im mikrofluidischen Kanal des *vasQchips* kultiviert, fixiert und gefärbt. Um die halbrunde Form des Kanals darzustellen, wurde er konfokalmikroskopisch als z-Stapel (157  $\mu\text{m}$ , 37 Aufnahmen) aufgenommen und die Fluoreszenzaufnahmen überlagert. Die Auswertung und die 3D-Darstellung erfolgten mit Imaris®. Maßstab 100  $\mu\text{m}$





**Abbildung 28:** Unter statischen Bedingungen kultivierte HUVEC im Kanal des vasQchips. Nach dem Einbringen in den Kanal wurden die HUVEC unter statischen Bedingungen bei regelmäßigem Mediumwechsel über 7 Tage kultiviert und anschließend fixiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) (blau:  $\lambda_{ex}$  351 nm, 364 nm/  $\lambda_{em}$  406-458 nm), der Aktinfilamente mit Phalloidin-TRITC (25 ng/ml) (rot:  $\lambda_{ex}$  561 nm/  $\lambda_{em}$  650-668 nm) und der Tight Junctions mit FITC-PECAM-Antikörpern (1:100) (grün:  $\lambda_{ex}$  476 nm, 488 nm/  $\lambda_{em}$  495-518 nm). Abgebildet sind die Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen mit (A-C) und ohne Hellfeld (D-F). Maßstab 50 µm



**Abbildung 29:** Unter fluidischen Bedingungen kultivierte HUVEC im Kanal des vasQchips. Nach dem Einbringen in den Kanal wurden die HUVEC unter fluidischen Bedingungen (16 mbar, 450 µl/min) über 7 Tage kultiviert und anschließend fixiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) (blau:  $\lambda_{ex}$  351 nm, 364 nm/  $\lambda_{em}$  406-458 nm), der Aktinfilamente mit Phalloidin-TRITC (25 ng/ml) (rot:  $\lambda_{ex}$  561 nm/  $\lambda_{em}$  650-668 nm) und der Tight Junctions mit FITC-PECAM-Antikörpern (1:100) (grün:  $\lambda_{ex}$  476 nm, 488 nm/  $\lambda_{em}$  495-518 nm). Abgebildet sind die Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen mit (A-C) und ohne Hellfeld (D-F). Maßstab 50 µm (A,B, D, E) bzw. 100 µm (C, F)

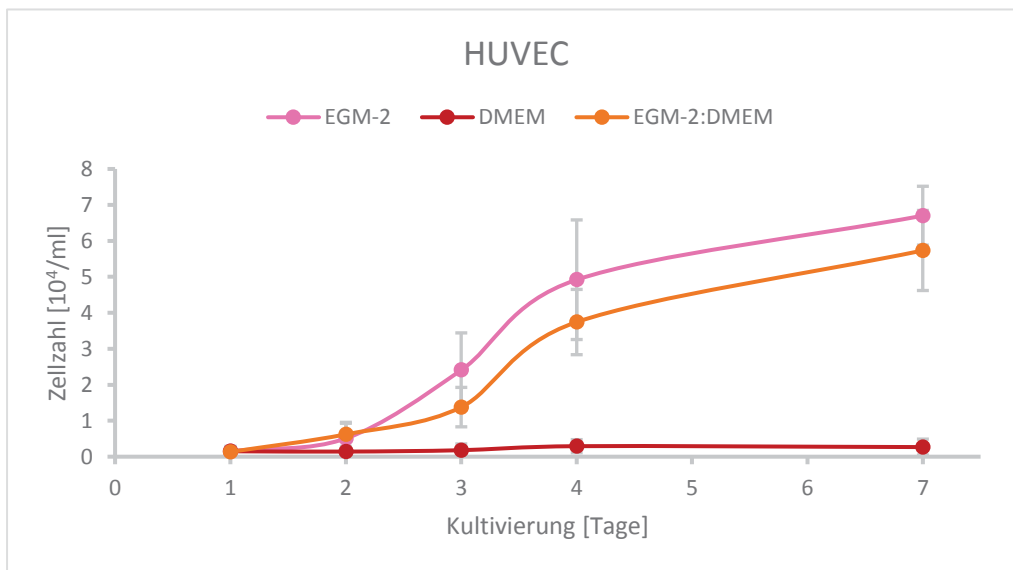


des Thermoformens und Thermobondens nach der SMART-Technologie.<sup>44, 193, 194</sup> Dabei wird die PC-Membran durch Druck und Hitze in die gewünschte Kanalform gebracht, ohne dabei die Schmelztemperatur des Materials zu erreichen, so dass die Struktur durch eine Vorbehandlung mit Schwerionenbeschuss erhalten bleibt. In einer Ätzlösung entstehen aus den Ionen Spuren die benötigten Poren in der Membran. Durch das thermische Bonden mit einer weiteren PC-Membran wird die Kanalstruktur verschlossen. Nach einer Beschichtung der Oberflächen mit EZM-Proteinen kann der Kanal im *vasQchip* konfluent mit Endothelzellen besiedelt werden. Diese Endothelschicht aus HUVEC und anderen Endothelzellen wurde von I. Hebeiß (2012)<sup>91</sup> und D. Ivannikov (2015)<sup>92</sup> etabliert, optimiert und ausführlich charakterisiert. So werden bei der Kultivierung unter fluidischen Bedingungen im *vasQchip* beispielsweise eine natürliche Ausrichtung der Zellmorphologie durch ein entlang der Fluidik ausgerichtetes Aktinzytoskelett (Phalloidin-TRITC-Färbung, 25 ng/ml) und nur geringe Proliferationsraten, wie sie auch *in vivo* bekannt sind, beobachtet. (Abb. 28, 29) Außerdem ist eine Langzeitkultivierung der Zellschicht über mehrere Wochen möglich. Die HUVEC erreichen dabei eine hohe Konfluenz und bilden ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte (*Tight Junctions*) aus (FITC-PECAM-Antikörper-Färbung, 1:100). Auch die Funktionalität der Endothelschicht konnte gezeigt werden, beispielsweise wurde die Permeabilität der HUVEC quantifiziert oder eine Transmigration von Immunzellen aus der Fluidik in das angrenzende Kompartiment induziert. Das zweite Kompartiment des *vasQchips*, das den mikrofluidischen Kanal umgibt und auch davon versorgt wird, ermöglicht das Einbringen einer angrenzenden organotypischen Ko-Kultur verschiedenster Art. Dabei wurden bereits verschiedene Ansätze verfolgt und umgesetzt, wie die Etablierung einer Blut-Hirn-Schranke oder einer Leber-Kultur.<sup>92</sup> Der Fokus bei den folgenden Entwicklungen sollte auf dem Erstellen einer kanzerogenen Ko-Kultur als Tumormodell für eine mögliche Testung komplexer chemotherapeutischer Wirkstoffe liegen. Eine erste Variante wurde, wie oben beschrieben (Kapitel 4.1.4), bereits eingesetzt, um den Transport und Effekt der Dox@AIO(OH) Nanopartikel zu untersuchen.

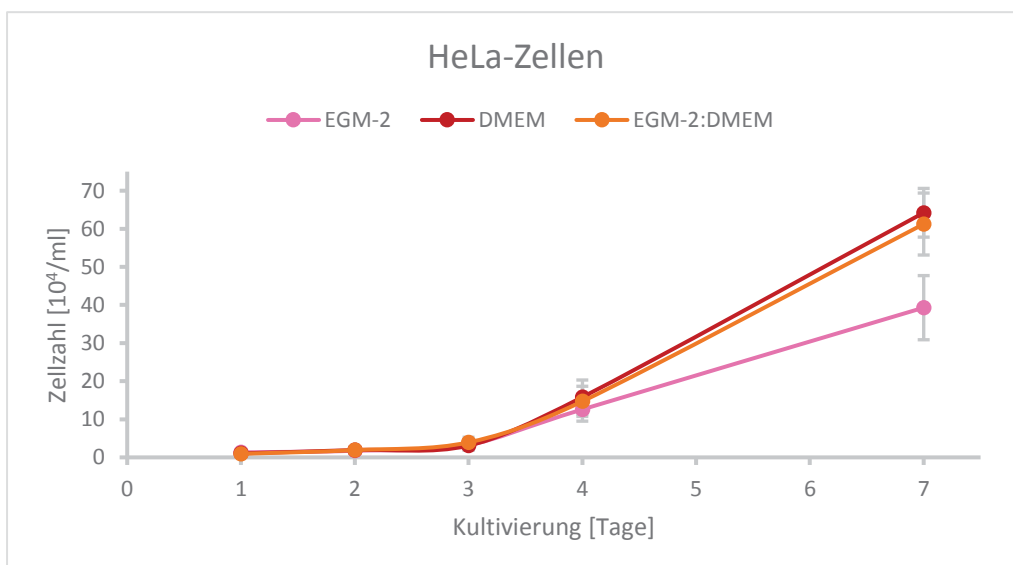
#### 4.3.1. Gemeinsames Medium für Ko-Kultivierung

Um eine Ko-Kultur mehrerer Zelltypen in einem System zu etablieren, ist es nötig ein gemeinsames Nährmedium für alle Zellen zu bestimmen. In der herkömmlichen Zellkultur sind die Medien an die speziellen Anforderungen einzelner Zelltypen sowie Prozesse wie Wachstum oder Differenzierung angepasst und auch darauf minimiert. In einem Organismus hingegen werden sämtliche Gewebe durch den Blutstrom versorgt, der alle Ansprüche bedient. Ähnlich soll daher dieses gemeinsame Nährmedium möglichst alle nötigen Faktoren enthalten, ausreichende Nährstoffe liefern und normale Morphologie und Wachstum der Zellen fördern. Für die Anwendung im *vasQchip* wurde eine mögliche Ko-Kultur von Endothelzellen (HUVEC) und kanzerogenen Zellen (HeLa- oder HepG2) sowie Bindegewebszellen (humane dermale Fibroblasten, NHDF) angestrebt und als mögliche Medien daher EGM-2 (als Standard für die Kultivierung von HUVEC), DMEM (als Basismedium für Säugerzellen wie HeLa, HepG2 und NHDF) sowie eine 1:1 Mischung (EGM-2:DMEM) der vorherigen untersucht. Dazu wurde zum einen

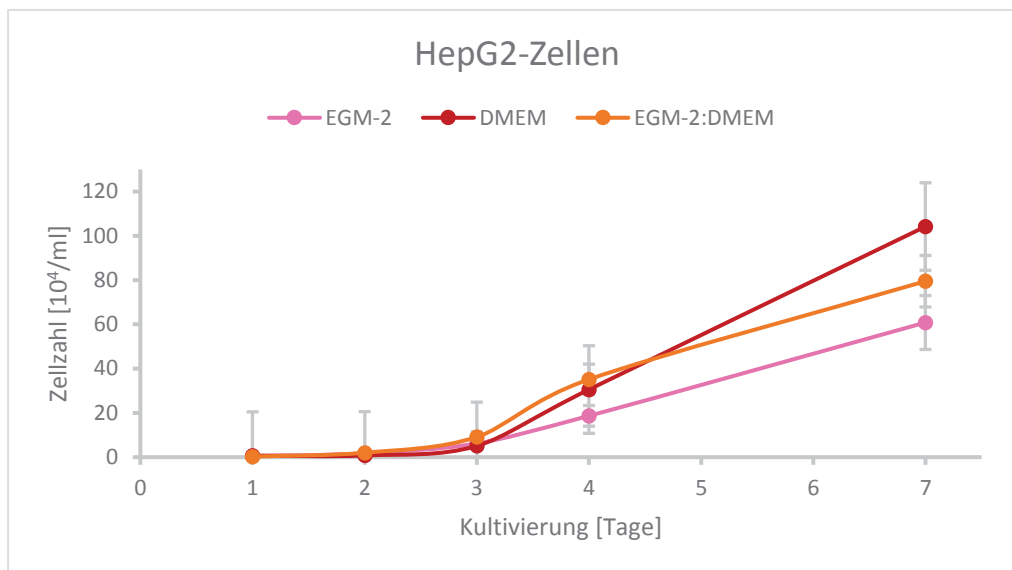
durch Zellzahlbestimmung das Wachstum der einzelnen Zelltypen in den jeweiligen Medien verfolgt, zum anderen die Viabilität der Zellen in den Medien überprüft sowie außerdem mikroskopisch die Morphologie der Zellen verglichen. (Abb. 30-34, Tab. 9, Viabilitätsstudie Abb. 78, Tab. 10) Für die Erstellung der Wachstumskurven wurde jeder Zelltyp in jedem Medium in den Kammern einer 24er-Zellkulturplatte ausgesät ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml) und für ein bis sieben Tage kultiviert. Zur Auswertung wurden die Zellen der entsprechenden Kammern durch Trypsin in Suspension gebracht und ausgezählt. Die ermittelten Zellzahlen wurden als Kurve über die Zeit aufgetragen. Es wurde gezeigt, dass die unterschiedlichen Medien zu deutlich unterschiedlichem Wachstumsverhalten der Zelltypen führen. Besonders auffallend war die sehr geringe Toleranz der HUVEC gegenüber dem Basismedium DMEM, in dem das Wachstum



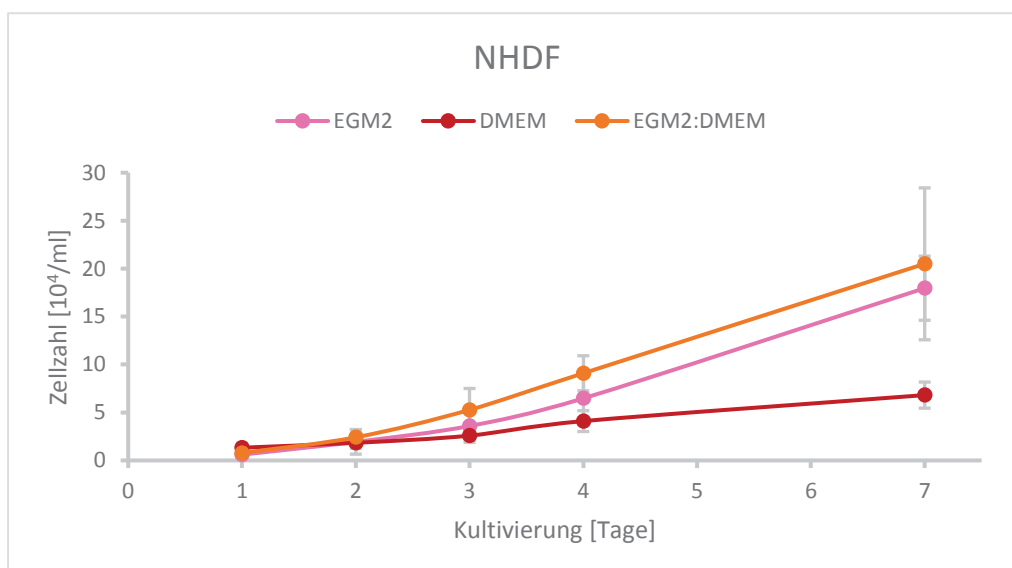
**Abbildung 30: Wachstumskurve von HUVEC in unterschiedlichen Nährmedien.** Die HUVEC ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml) wurden in EGM-2, DMEM oder einer 1:1 Mischung von EGM-2 und DMEM (EGM-2:DMEM) ausgesät und über 7 Tage kultiviert. An 5 Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellzahlen für die verschiedenen Bedingungen ermittelt.  $n = 6$



**Abbildung 31: Wachstumskurve von HeLa-Zellen in unterschiedlichen Nährmedien.** Die HeLa-Zellen ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml) wurden in EGM-2, DMEM oder einer 1:1 Mischung von EGM-2 und DMEM (EGM-2:DMEM) ausgesät und über 7 Tage kultiviert. An 5 Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellzahlen für die verschiedenen Bedingungen ermittelt.  $n = 6$

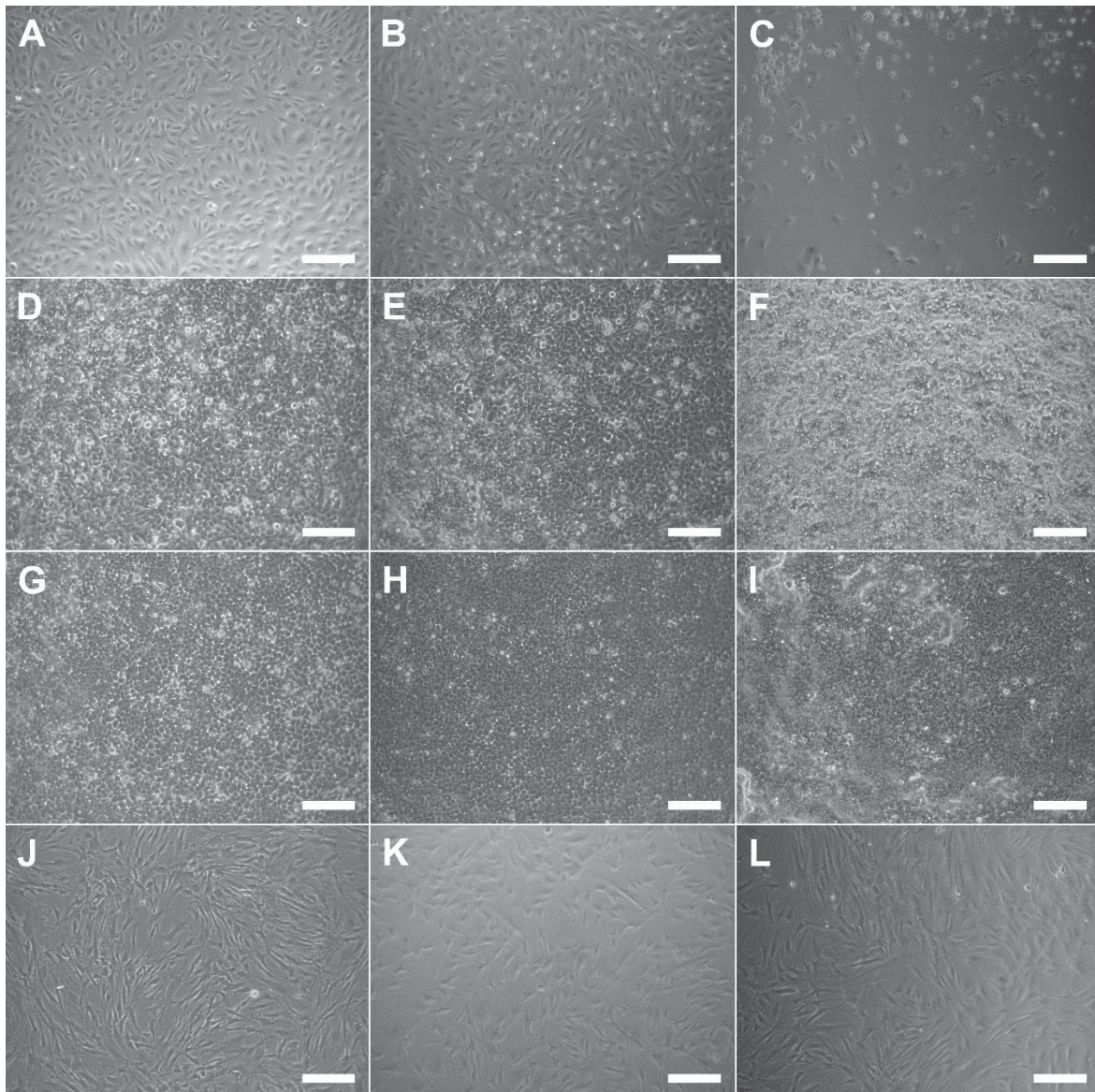


**Abbildung 32: Wachstumskurve von HepG2-Zellen in unterschiedlichen Nährmedien.** Die HepG2-Zellen ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml) wurden in EGM-2, DMEM oder einer 1:1 Mischung von EGM-2 und DMEM (EGM-2:DMEM) ausgesät und über 7 Tage kultiviert. An 5 Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellzahlen für die verschiedenen Bedingungen ermittelt.  $n = 6$



**Abbildung 33: Wachstumskurve von NHDF in unterschiedlichen Nährmedien.** Die NHDF ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml) wurden in EGM-2, DMEM oder einer 1:1 Mischung von EGM-2 und DMEM (EGM-2:DMEM) ausgesät und über 7 Tage kultiviert. An 5 Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellzahlen für die verschiedenen Bedingungen ermittelt.  $n = 6$

der Zellen vollkommen stagnierte. (Abb. 30) Ebenso zeigte die mikroskopische Aufnahme, dass eine Kultivierung der Zellen in diesem Medium nicht möglich ist: die HUVEC lagen vereinzelt und in unnatürlicher, abgerundeter Form vor. (Abb. 34 A-C) Auch die EGM-2:DMEM-Mischung beeinflusste die Morphologie der Zellen erkennbar negativ, obwohl das Wachstum nur einen mäßigen Rückgang um etwa 15 % aufwies. HeLa- und HepG2-Zellen zeigten ein sehr vergleichbares Verhalten und erreichten in allen Medien den größten Anstieg der Wachstumskurven. (Abb. 31, 32) Am stärksten wurde dieses durch das eigene DMEM gefördert, aber auch EGM-2:DMEM und EGM-2 zeigten hohe Wachstumsraten und lagen etwa 37 % bzw. 24 % auseinander. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten in allen Medien eine gleichmäßige



**Abbildung 34: Zellmorphologie in unterschiedlichen Nährmedien.** HUVEC (A-C), HeLa- (D-F), HepG2-Zellen (G-I) und NHDF (J-L) ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml) wurden in EGM-2 (1. Spalte), DMEM (3. Spalte) oder einer 1:1-Mischung von EGM-2 und DMEM (EGM-2:DMEM) (2. Spalte) kultiviert. An Tag 3 wurde die Morphologie der Zellen unter den verschiedenen Bedingungen lichtmikroskopisch aufgenommen. Maßstab = 200  $\mu$ m

Morphologie und ein konfluentes Wachstum der Zellen. (Abb. 34 D-I) Lediglich die Ausdehnung der Zellschicht variiert. In einem kleinen, abgeschlossenen System wie dem *vasQchip*, in das die Zellen bereits mit hoher Dichte eingebracht werden, ist ein geringes Wachstum dabei nicht unbedingt kritisch, sondern in einem gewissen Rahmen eher wünschenswert, um nicht nach kurzer Zeit schon eine Überbesiedelung zu erzeugen. Ähnliches konnte mit den mikroskopischen Aufnahmen auch für die NHDF gezeigt werden. (Abb. 34 J-L) In den Wachstumskurven wiesen diese wie zuvor die HUVEC ein stark vermindertes Wachstum in DMEM auf, während EGM-2:DMEM und EGM-2 beide ähnlich hohe Wachstumsraten mit nur etwa 12 % Unterschied ermöglichten. (Abb. 33) Morphologisch allerdings waren keine erkennbaren Unterschiede detektierbar. Daher wurde letztendlich, vor allem aufgrund der sehr eindeutigen Ergebnisse der HUVEC-Kulturen das EGM-2 favorisiert. Aufgrund der zentralen Position der

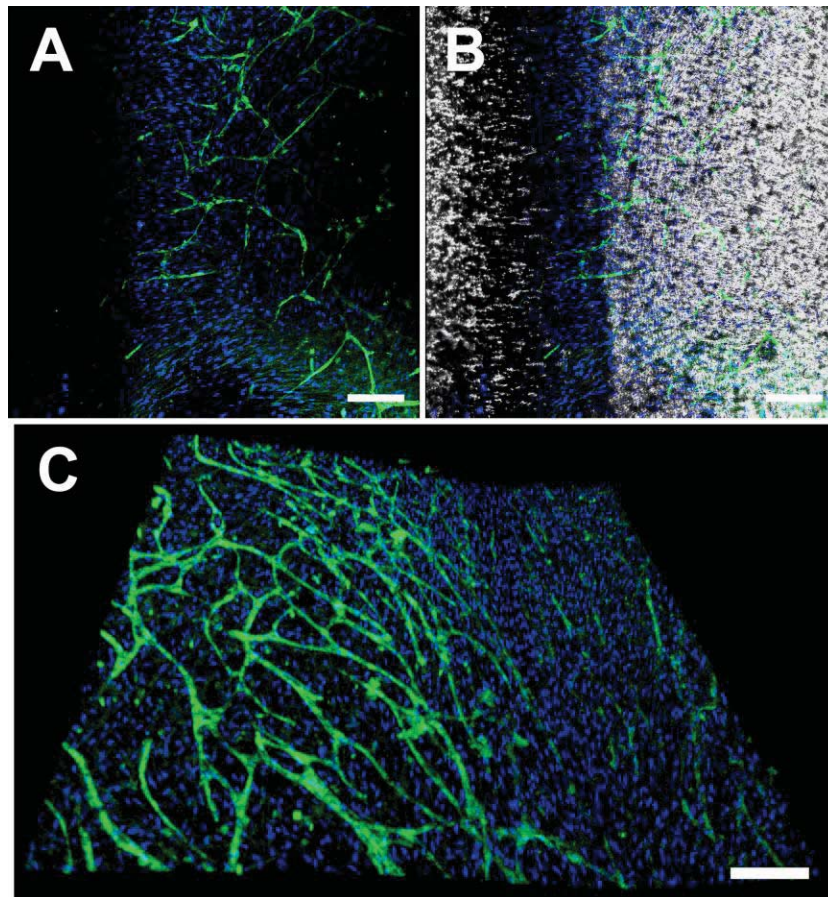


HUVEC als Endothelschicht im Kanal des *vasQchips* ist es essentiell, für diese Zellen gute Bedingungen zu gewährleisten. Dies gilt auch, da die HUVEC zur Ausbildung der konfluenten Endothelschicht im Mikrokanal in den meisten Fällen zuerst ausgesät werden und somit auch die längste Zeit im System kultiviert werden. Für HeLa-, HepG2-Zellen und NHDF lässt sich die Kompatibilität mit diesem Medium mikroskopisch ebenfalls beobachten, auch wenn das ausgeprägte Wachstumsverhalten etwas verlangsamt, nicht aber inhibiert, wird. So konnte für die Testung der Dox@AlO(OH) Nanopartikel mit diesem Medium erfolgreich ein erstes einfaches Modell etabliert und eingesetzt werden.

### 4.3.2. Ko-Kultur mit Endothelzellen

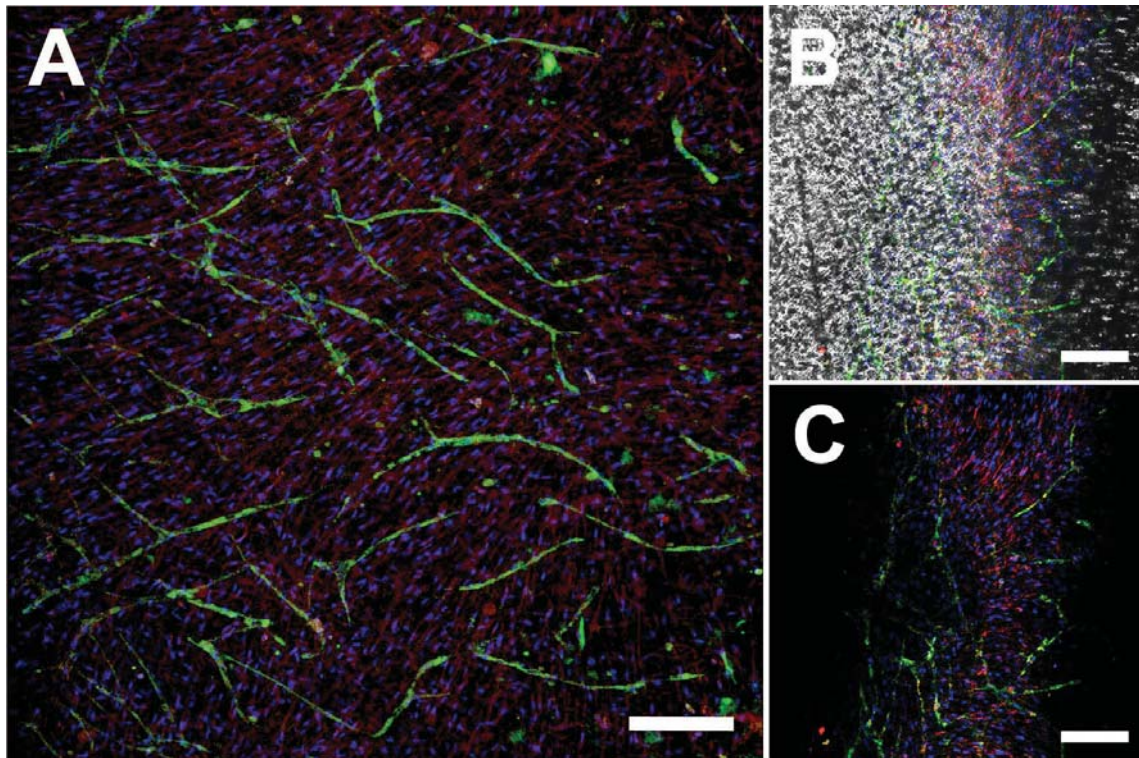
Zur Erweiterung des Modells wurde anschließend ein dreidimensionales Gewebe als die das Blutgefäß umgebende Ko-Kultur angestrebt. Diese sollte auf einer Hydrogel-Matrix basieren und in direktem Kontakt mit der Endothelschicht im mikrofluidischen Kanal des *vasQchips* stehen. Ein wichtiger zellulärer Bestandteil beim Aufbau eines Gewebes sind Fibroblasten. Sie bilden den Hauptbestandteil von Bindegewebe und tragen zur Bildung interzellulärer Bindungen und der extrazellulären Matrix bei.

Außerdem ist es beim Aufbau dreidimensionaler Kulturen wichtig, die gleichmäßige Versorgung innerhalb dieser Kultur zu gewährleisten.<sup>195</sup> In einem Organismus wird dies durch die weitläufige Verzweigung des Blutgefäßsystems von den Hauptschlagadern bis hin zu feinen Kapillaren ermöglicht. Auch im *vasQchip* wäre eine solche Vernetzung mit weiteren Endothelzellen als Mikrokapillaren wünschenswert, welche zum einen durch die Zusammensetzung der Kultur wie zum anderen auch durch die physikalischen Anreize der Fluidik induziert werden sollte. Als grundlegende Struktur für die Besiedelung des unteren Kompartiments im *vasQchip* wurde deshalb eine Kultur von Fibroblasten (NHDF) sowie Endothelzellen (HUVEC) innerhalb eines Fibringels gewählt. Eine solche Kultur kann einerseits selbst bereits als Modell für die Analyse von Transportvorgängen oder die Ausbreitung und Reichweite einer Substanz dienen, bietet andererseits aber auch eine Grundlage für weitere Modelle und Gewebe, die darin eingebettet werden können. Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Kultivierung sind die Zusammensetzung der Zellen und die eingesetzte Konzentration des Fibrins im Gel. Hierzu wurde zunächst nach einem Protokoll von M. N. Nakatsu et al. (2007)<sup>196</sup> vorgegangen, das sich bereits zuvor für die Anwendung im *vasQchip* als geeignet erwiesen hat. Die beiden Zelltypen wurden im Verhältnis 2:1 NHDF:HUVEC ( $2 \cdot 10^6$  und  $1 \cdot 10^6$  Zellen) eingesetzt. Vor dem Einbringen der Ko-Kultur wurden die HUVEC mit einer *CellTracker™ Green*-Färbung ( $1 \mu\text{M}$ ) markiert sowie die NHDF mit *CellTracker™ Red* ( $1 \mu\text{M}$ ). Mit dieser Zusammenstellung konnte nach einer Kultivierung von 2 Tagen die netzförmige Verbindung der Endothelzellen innerhalb der Ko-Kultur mit den Bindegewebszellen im *vasQchip*, vor allen in der Region nahe des mikrofluidischen Kanals, beobachtet werden. (Abb. 35, 36) Dies zeigt einerseits die Viabilität der Zellen und somit eine erfolgreiche Ko-Kultivierung. Andererseits wird durch die Vernetzung wie gewünscht ein gewebeartiger Aufbau der zusammengestellten Zellen erreicht. Jedoch fällt auch

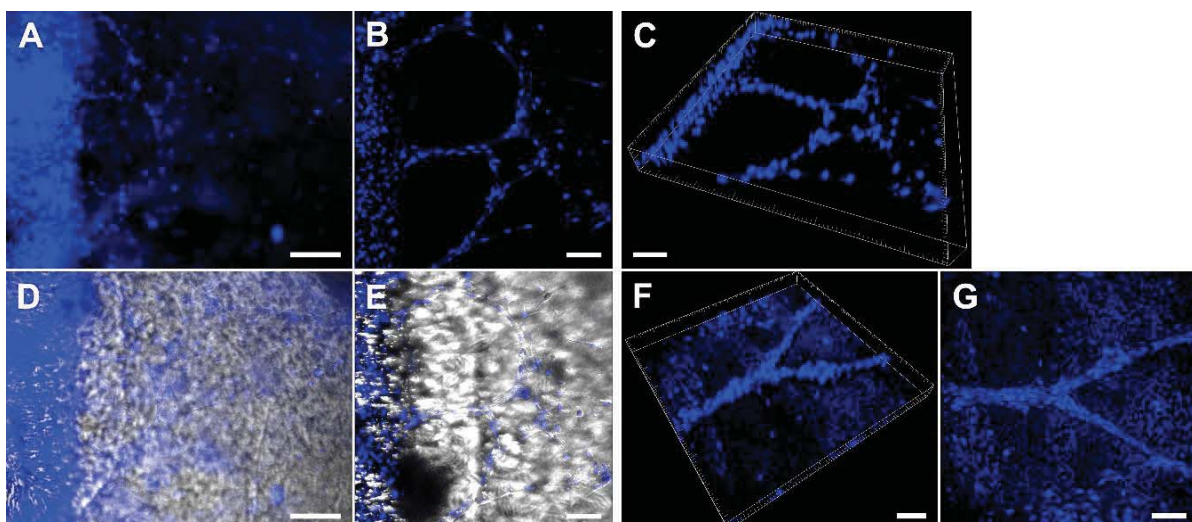


**Abbildung 35: Ko-Kultur von NHDF und HUVEC in einem Fibringel im vasQchip.** HUVEC ( $1 \cdot 10^6$ ) wurden mit CellTracker™ Green ( $1 \mu\text{M}$ ) gefärbt und zusammen mit NHDF ( $2 \cdot 10^6$ ) in einem Fibringel im unteren Kompartiment des vasQchips kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellkerne aller Zellen mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) gefärbt und die Kultur konfokalmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (blau (Hoechst 33342)::  $\lambda_{\text{ex}} 405 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} 460\text{-}480 \text{ nm}$ ; grün (CellTracker™ Green):  $\lambda_{\text{ex}} 488 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} 512\text{-}522 \text{ nm}$ ) (A), zusätzlich mit dem Hellfeld (B), sowie die 3D Darstellung eines z-Stapels ( $85 \mu\text{m}$ , 35 Aufnahmen) (Auswertung und 3D Darstellung mit Imaris®) (C). Maßstab  $150 \mu\text{m}$

auf, dass das Hydrogel und somit auch die Kultur nicht das gesamte Kompartiment ausfüllt, da das Fibringel schnell degradiert. Das Wachstum findet hauptsächlich entlang der Oberflächen statt. Eine erhöhte Zellzahl (jeweils  $2 \cdot 10^6$  Zellen) sowie eine Zusammensetzung der Zelltypen im Verhältnis 1:1 führte ebenfalls zu verzweigten Strukturen innerhalb der Ko-Kultur aus HUVEC und NHDF. Hier war insgesamt jedoch weniger eine breite Vernetzung zu erkennen, sondern die Ausbildung einzelner vaskulärer Formen. (Abb. 37, 38) Wie zuvor konnte durch das Fibringel nicht das komplette Lumen des Kompartiments ausgefüllt werden, jedoch wurde die Matrix durch Ausrichtung, Interaktionen und die gebildeten Zell-Zell-Kontakte in eine stützende Form und Funktion gebracht, so dass neben der homogenen Ko-Kultur auch größere Verzweigungen entstanden. Eine spezifische Antikörper-Färbung zur eindeutigen Identifikation der Endothelzellen war in der im Fibringel fixierten Ko-Kultur leider nicht erfolgreich, dennoch lässt sich mit großer Sicherheit davon ausgehen, dass die vaskulären Strukturen zum größten Anteil aus HUVEC bestehen. HUVEC zeigen spontan ein vernetztes Wachstum auf, wie es auch zuvor in der Studie zur Angiogenese zu beobachten war (Kapitel 4.2.4), während NHDF im gleichen Versuchsaufbau keinerlei Strukturierung erkennen ließen.

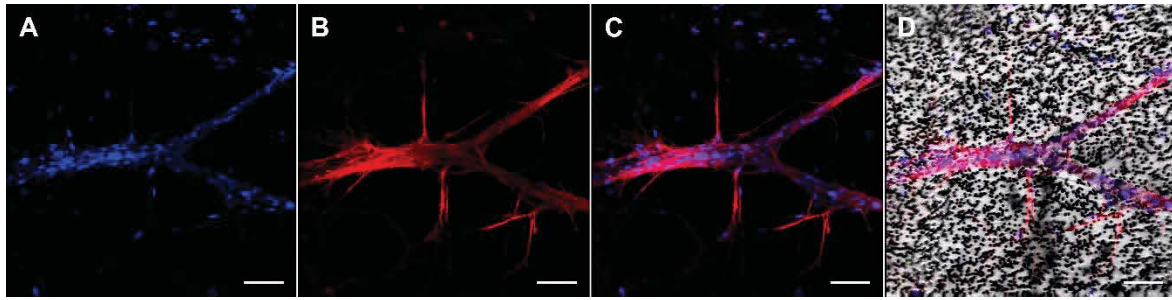


**Abbildung 36: Ko-Kultur von NHDF und HUVEC in einem Fibringel im vasQchip.** HUVEC ( $1 \cdot 10^6$ ) wurden mit CellTracker™ Green ( $1 \mu\text{M}$ ), NHDF ( $2 \cdot 10^6$ ) mit CellTracker™ Red ( $1 \mu\text{M}$ ) gefärbt und beide zusammen in einem Fibringel im unteren Kompartiment des vasQchips kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellkerne aller Zellen mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) gefärbt und die Kultur konfokalmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (blau (Hoechst 33342):  $\lambda_{\text{ex}}$  405 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  460-480 nm; grün (CellTracker™ Green):  $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  512-522 nm; rot (CellTracker™ Red):  $\lambda_{\text{ex}}$  532 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  572-632 nm) (A, C) sowie von der am Kanal angrenzenden Region (B, C) zusätzlich mit dem Hellfeld (B). Maßstab 150  $\mu\text{m}$



**Abbildung 37: Ko-Kultur von NHDF und HUVEC in einem Fibringel im vasQchip.** HUVEC ( $2 \cdot 10^6$ ) und NHDF ( $2 \cdot 10^6$ ) wurden zusammen in einem Fibringel im unteren Kompartiment des vasQchips kultiviert. Nach 5 Tagen wurde die Kultur fixiert, die Zellkerne aller Zellen mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) gefärbt und fluoreszenz- (A, D) bzw. konfokalmikroskopisch (B, C, E-G) untersucht. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen ( $\lambda_{\text{ex}}$  405 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  460-480 nm) (A, B) und die Überlagerung mit dem Hellfeld (D, E), sowie die 3D-Darstellung von zwei z-Stapeln (60  $\mu\text{m}$ , 41 Aufnahmen) (Auswertung und 3D Darstellung mit Imaris®) (C, F, G). Maßstab 200  $\mu\text{m}$  (A, D) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (B, C, E-G)

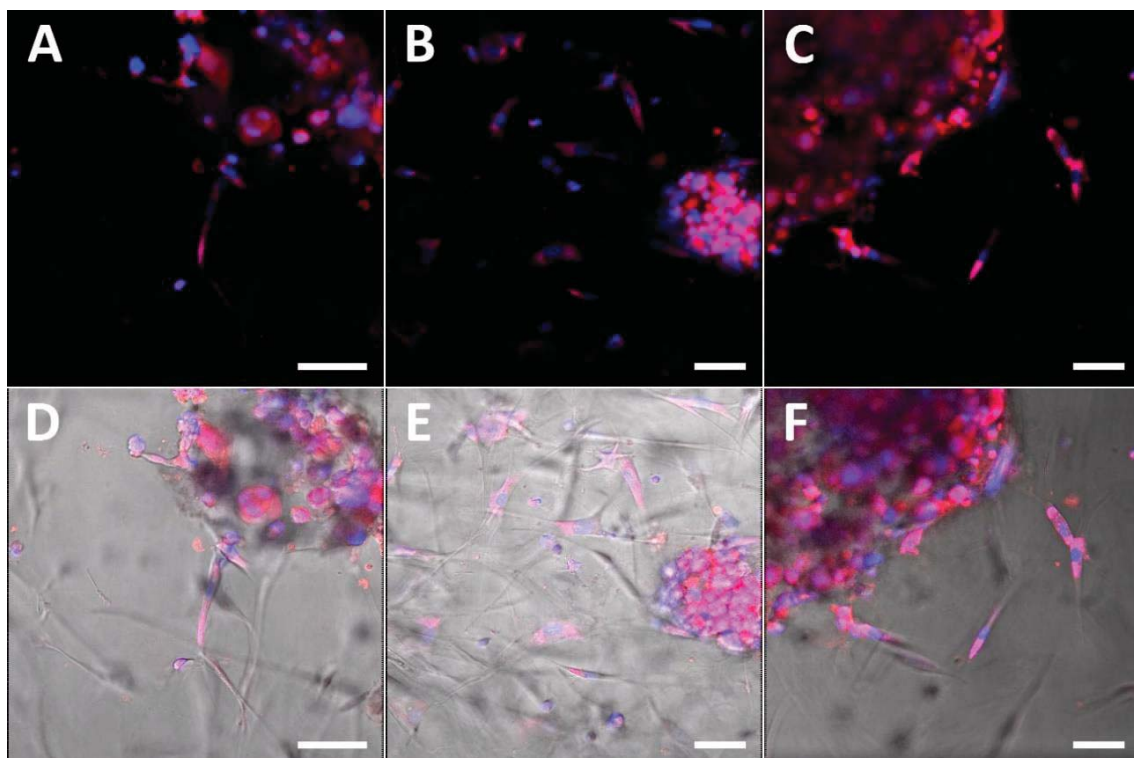




**Abbildung 38: Verzweigtes Wachstum in einer Ko-Kultur von NHDF und HUVEC in einem Fibringel im vasQchip.** HUVEC ( $2 \cdot 10^6$ ) und NHDF ( $2 \cdot 10^6$ ) wurden zusammen in einem Fibringel im unteren Kompartiment des vasQchips kultiviert. Nach 5 Tagen wurde die Kultur fixiert, die Zellen mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) sowie die Aktinfilamente zusätzlich mit Phalloidin-TRITC ( $25 \text{ ng/ml}$ ) gefärbt und konfokalmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind die einzelnen Fluoreszenzaufnahmen (blau (Hoechst 33342):  $\lambda_{\text{ex}} 405 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 460\text{-}480 \text{ nm}$ ; rot (Phalloidin-TRITC):  $\lambda_{\text{ex}} 532 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 650\text{-}668 \text{ nm}$ ) (A, B), deren Überlagerung (C) und die Überlagerung mit dem Hellfeld (D). Maßstab  $100 \mu\text{m}$

### 4.3.3. Ko-Kulturen mit Sphäroiden

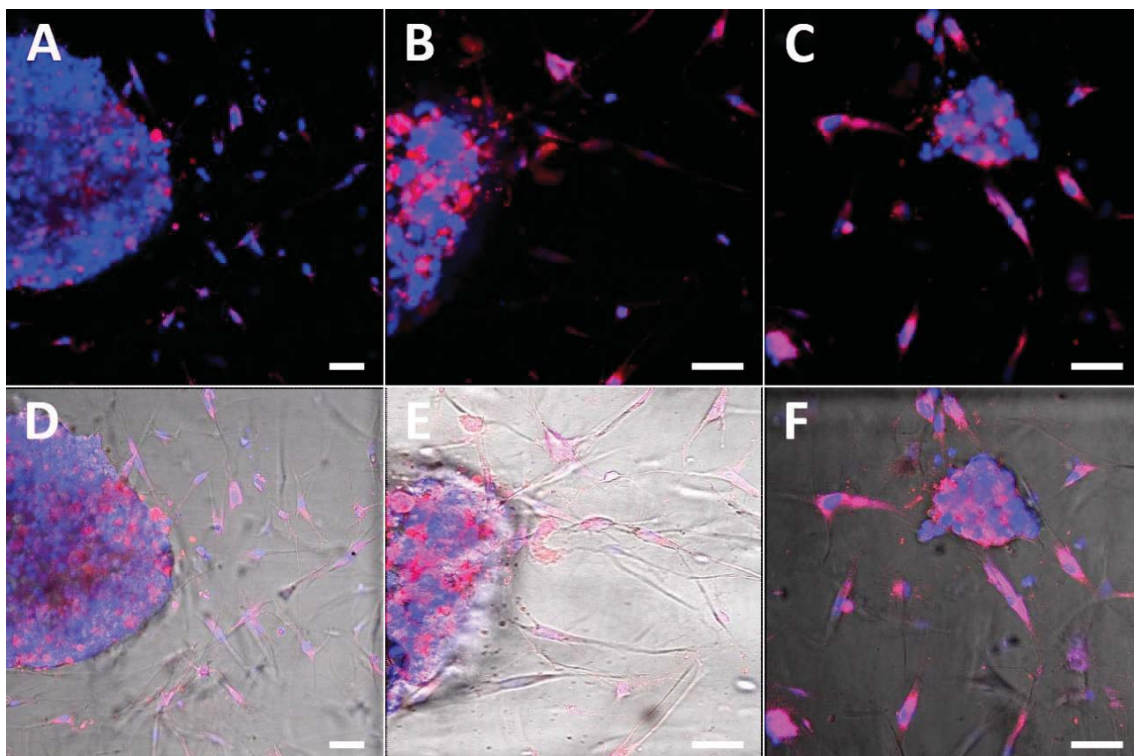
Ein nächster Schritt zur Weiterentwicklung der Ko-Kultur im *vasQchip* in Richtung eines Tumormodells ist die Einbettung von Sphäroiden in die Kultur. Generell werden Sphäroide häufig als *in vitro*-Modell genutzt, um avaskuläre Tumorregionen darzustellen und so beispielsweise chemotherapeutische Effekte von Wirkstoffkandidaten genauer zu charakterisieren.<sup>61</sup> Durch



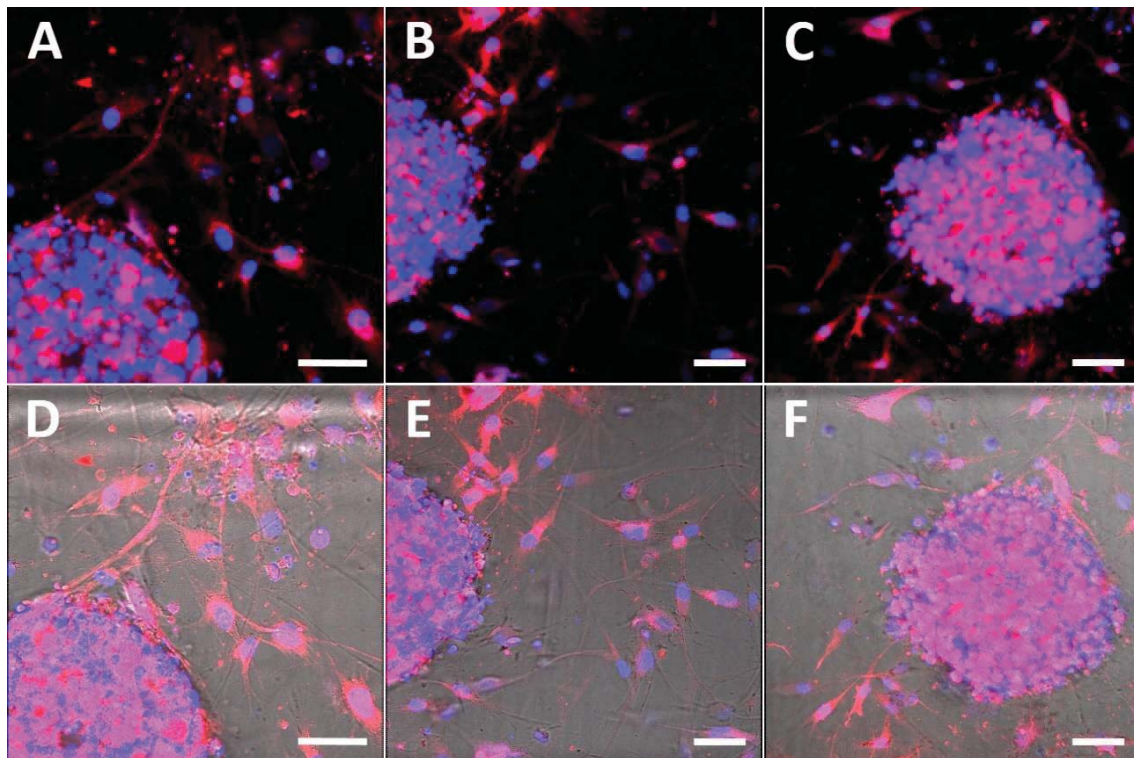
**Abbildung 39: Ko-Kultur von HeLa-Sphäroiden mit NHDF und HUVEC in einem Fibringel.** Sphäroide aus HeLa-Zellen wurden über mehrere Tage kultiviert und anschließend mit HUVEC ( $2 \cdot 10^5$ ) und NHDF ( $2 \cdot 10^5$ ) in einem Fibringel in die Kammer einer  $\mu\text{slide}$  eingebracht. Nach 72 h Inkubation wurden das Zytosol der Zellen mit CellTracker™ Red ( $1 \mu\text{M}$ ) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) angefärbt und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht. Abgebildet sind die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (blau (Hoechst 33342):  $\lambda_{\text{ex}} 405 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 415\text{-}480 \text{ nm}$ ; rot (CellTracker™ Red):  $\lambda_{\text{ex}} 532 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 555\text{-}700 \text{ nm}$ ) (A-C) sowie die zusätzliche Überlagerung mit dem Hellfeld (D-F). Maßstab  $50 \mu\text{m}$



die Ausbildung von soliden Zellaggregaten wird eine gewebeähnlichere Oberfläche geschaffen und daher auch die Zugänglichkeit für Wirkstoffe besser simuliert als es bei einer zweidimensionalen Zellschicht der Fall ist. Ebenso stärken die ausgeprägten Zell-Zell-Interaktionen gewebeähnliche Funktionen der Zellkultur, wie das Ausschleusen von Substanzen oder das verlangsamte Wachstum bis hin zur kompletten Wachstumsinhibition von Zellen im Zentrum des Aggregats. Um in der 3D Kultur ein umfassendes Tumormodell zu rekonstruieren, sollten nicht nur Sphäroide und Zellen im Hydrogel eingebettet werden, sondern die Integration als gesamtes vaskularisiertes Gewebemodell erreicht werden. Die Mikroumgebung eines Tumors besteht nicht nur aus den kanzerogenen Zellen, sondern ebenso aus Anteilen von Bindegewebszellen wie Fibroblasten, Endothelzellen sowie auch Makrophagen und Immunzellen.<sup>197, 198</sup> Für die Ko-Kultur wurden daher verschiedene Sphäroide aus den Tumorzelllinien HeLa und HepG2 sowie als Vergleich auch aus den Bindegewebszellen NHDF hergestellt. (Wachstumsverlauf der Sphäroide: Abb. 79, 80, Tab. 11) Diese sollten in ein wie zuvor beschriebenes Fibrin-Hydrogel mit HUVEC und NHDF eingebracht werden. Für eine Evaluierung dieser Ko-Kulturen in mehreren Zusammensetzungen wurde diese zunächst in den Kammern einer  $\mu$ slide kultiviert und die Interaktion der Zellen beobachtet. (Abb. 39-41) Wünschenswert wäre eine Durchdringung oder Anbindung der Sphäroide in die entstehende Netzstruktur von HUVEC und NHDF sowie umgekehrt die Ausbildung von Verzweigungen des Sphäroids in das Hydrogel hinein. Um die Morphologie der Zellen mikroskopisch beobachten zu können, wurden die Zellkerne



**Abbildung 40: Ko-Kultur von HepG2-Sphäroiden mit NHDF und HUVEC in einem Fibringel.** Sphäroide aus HepG2-Zellen wurden über mehrere Tage kultiviert und anschließend mit HUVEC ( $2 \cdot 10^5$ ) und NHDF ( $2 \cdot 10^5$ ) in einem Fibringel in die Kammer einer  $\mu$ slide eingebracht. Nach 72 h Inkubation wurden das Zytosol der Zellen mit CellTracker™ Red ( $1 \mu\text{M}$ ) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) angefärbt und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht. Abgebildet sind die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (blau (Hoechst 33342):  $\lambda_{\text{ex}}$  405 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  415-480 nm; rot (CellTracker™ Red):  $\lambda_{\text{ex}}$  532 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  555-700 nm) (A-C) sowie die zusätzliche Überlagerung mit dem Hellfeld (D-F). Maßstab 50  $\mu\text{m}$



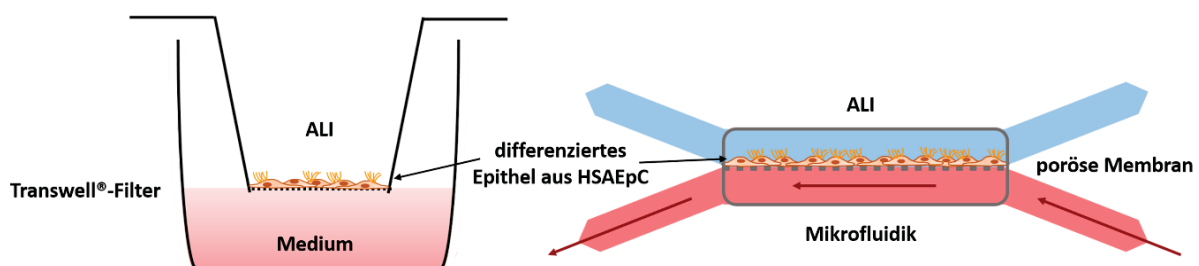
**Abbildung 41: Ko-Kultur von NHDF-Sphäroiden mit NHDF und HUVEC in einem Fibringel.** Sphäroide aus NHDF-Zellen wurden über mehrere Tage kultiviert und anschließend mit HUVEC ( $2 \cdot 10^5$ ) und NHDF ( $2 \cdot 10^5$ ) in einem Fibringel in die Kammer einer  $\mu$ slide eingebracht. Nach 72 h Inkubation wurden das Zytosol der Zellen mit CellTracker™ Red ( $1 \mu\text{M}$ ) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) angefärbt und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht. Abgebildet sind die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (blau (Hoechst 33342):  $\lambda_{\text{ex}}$  405 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  415-480 nm; rot (CellTracker™ Red):  $\lambda_{\text{ex}}$  532 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  555-700 nm) (A-C) sowie die zusätzliche Überlagerung mit dem Hellfeld (D-F). Maßstab  $50 \mu\text{m}$

mit Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) sowie die Zytosole aller Zellen mit CellTracker™ Red ( $1 \mu\text{M}$ ) angefärbt. Insgesamt zeigte sich bei den verschiedenen Proben eine erfolgreiche Ko-Kultivierung der unterschiedlichen Zellen. Die angestrebte Interaktion zwischen den Zellen im Gel und den Sphäroiden war jedoch nur vereinzelt zu erkennen. Dabei war allerdings auch die Ausrichtung der NHDF und HUVEC in diesem Versuchsaufbau insgesamt deutlich weniger ausgeprägt, wie es zuvor in der Kultivierung im *vasQchip* gelungen war. Die prägnanteste Interaktion war bei der Ko-Kultivierung mit den NHDF-Sphäroiden zu beobachten, wo gleiche Zelltypen aus der Hydrogel-Kultur und dem Sphäroid Kontakte ausbilden konnten. (Abb. 41) Dies stützt die Hypothese zur Weiterentwicklung der Ko-Kultur schon beim Ansetzen der verwendeten Sphäroide einen Anteil von NHDF einzubinden, um so vermehrt und schneller Zell-Zell-Kontakte zwischen Sphäroid und Umgebung herzustellen. Zusätzliche sollte für die Etablierung einer gewebeartigen Kultur eine höhere Zellzahl eingesetzt werden, um die Interaktionen weiter zu fördern. Diese ersten Ergebnisse dienen zum Beginn einer Evaluierung und Optimierung für die Zusammensetzung einer 3D Zellkultur im *vasQchip*. Daher sollten vielversprechende Ansätze zügig in den *vasQchip* integriert und dort weiter evaluiert werden, auch weil die vernetzte Struktur im Hydrogel dort bisher besser ausgebildet wurde.

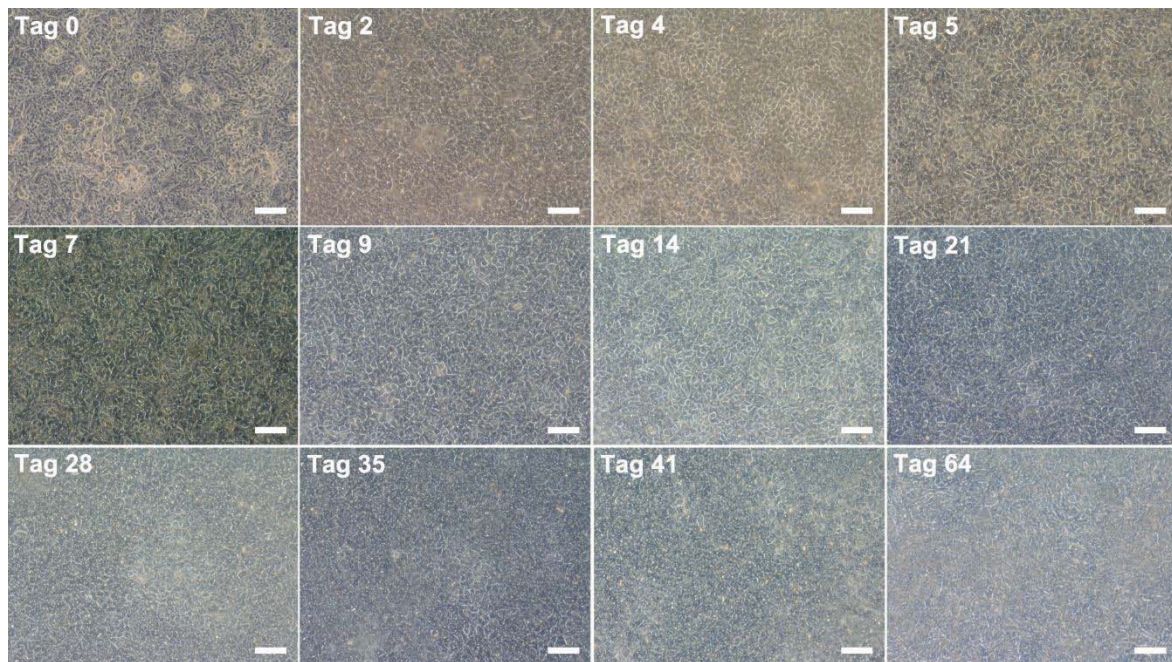
#### 4.4. Modell der Kleinen Atemwege in der Lunge

Neben der Etablierung eines vaskularisierten Tumormodells im *vasQchip* wurde ebenfalls an weiteren organotypischen *in vitro*-Modellen gearbeitet. Neben einer spezifischen Wirkstofftestung eignen sich diese auch zur gezielten Entwicklung von Wirkstoffen oder zur Untersuchung von Krankheits- und Genesungsverläufen. Aufgrund verbreiteter Erkrankungen wie Lungenkarzinomen, Influenza oder COPD, und dem Mangel an geeigneten, einfachen *in vivo*-Modellen aufgrund der unterschiedlichen Anatomien, sind *in vitro*-Systeme von Lungengewebe von großem Interesse. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse entstanden während eines Forschungsaufenthaltes am *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering at Harvard University* unter der Betreuung von Kambez H. Benam, PhD sowie Richard Novak, PhD und Rachelle Prantil-Baun, PhD in der Arbeitsgruppe von Donald E. Ingber, MD, PhD.

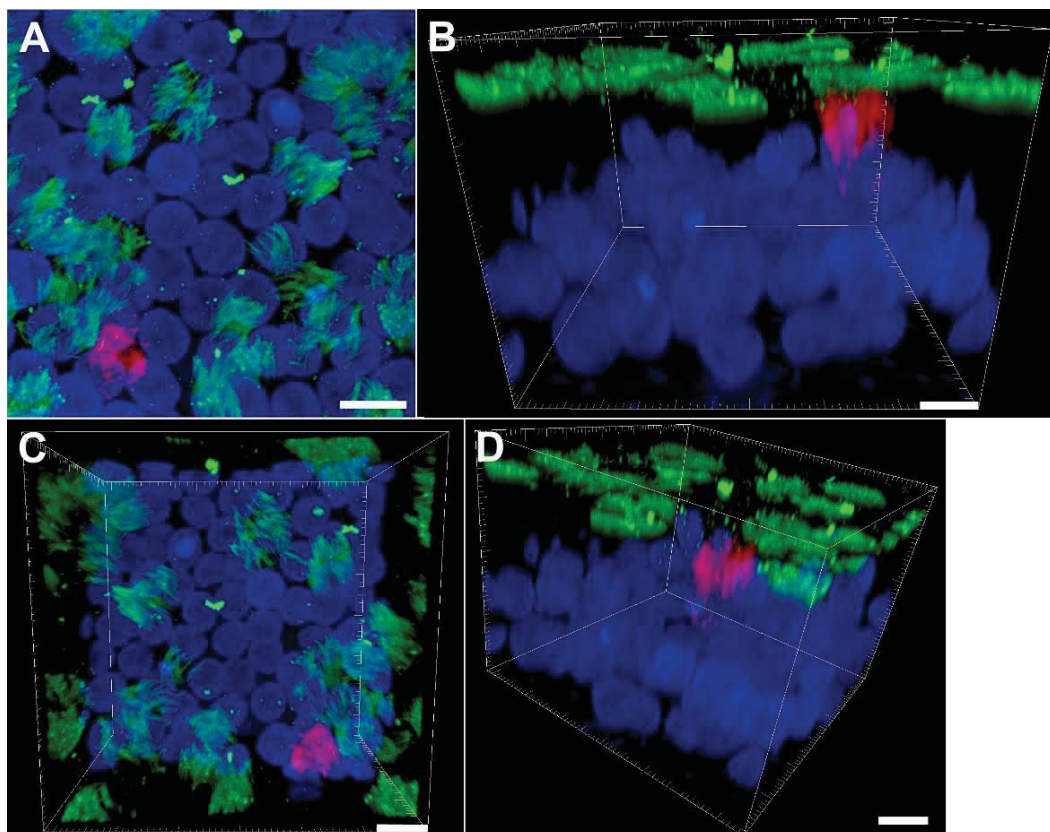
Das Konzept der „*Organ-on-a-Chip*“-Systeme kann auf viele unterschiedliche Weisen und ebenso für viele unterschiedliche Gewebe umgesetzt werden. Für zahlreiche Anwendungen wurden bereits Modelle etabliert oder befinden sich in der Entwicklung.<sup>74, 76-78, 86, 89, 199, 200</sup> Diese unterscheiden sich in Aufbau, Größe, Handhabung, Herstellung und Komplexität, um den jeweiligen Anforderungen gerecht zu werden. Da nicht nur ein gesamter Organismus sondern auch ein vollständiges Organ schon sehr komplex aufgebaut ist, konzentriert sich die Nachbildung *in vitro* (bisher) auf einzelne Gewebeausschnitte, Grenzflächen oder spezielle Funktionalitäten sowie die Verknüpfung solcher Modelle. Der Fokus bei der Entwicklung von *Organ-on-a-Chip*-Systemen liegt je nach Forschungsprojekt auf verschiedenen Aspekten. Bei Design, Erstellung und Validierung muss dabei aber der finale Anwendungszweck stets im Zentrum stehen, um letztendlich ein funktionales Modell zu erhalten. Dabei liegen die Schwerpunkte oft entweder auf einer möglichst einfachen Herstellung und Reproduzierbarkeit, um das System beispielsweise in Hochdurchsatz-Verfahren anwenden zu können, oder aber auf einer möglichst detailgetreuen Nachbildung der Physiologie eines Gewebes, um möglichst viele oder komplexe Funktionen in einem Modell zu vereinen.<sup>82, 84, 201-204</sup> Je nach Forschungsziel hat dabei jedes Konzept und Chipdesign seine individuelle Berechtigung. Eine Reihe von *Organ-on-a-Chip*-Modellen wurde am *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering* entwickelt und validiert.<sup>77, 81, 83, 205-211</sup> Diese Chips basieren auf einem PDMS-Block sowie einer eingespannten, porösen PDMS-Membran als Trennfläche zwischen zwei Kanälen. Durch



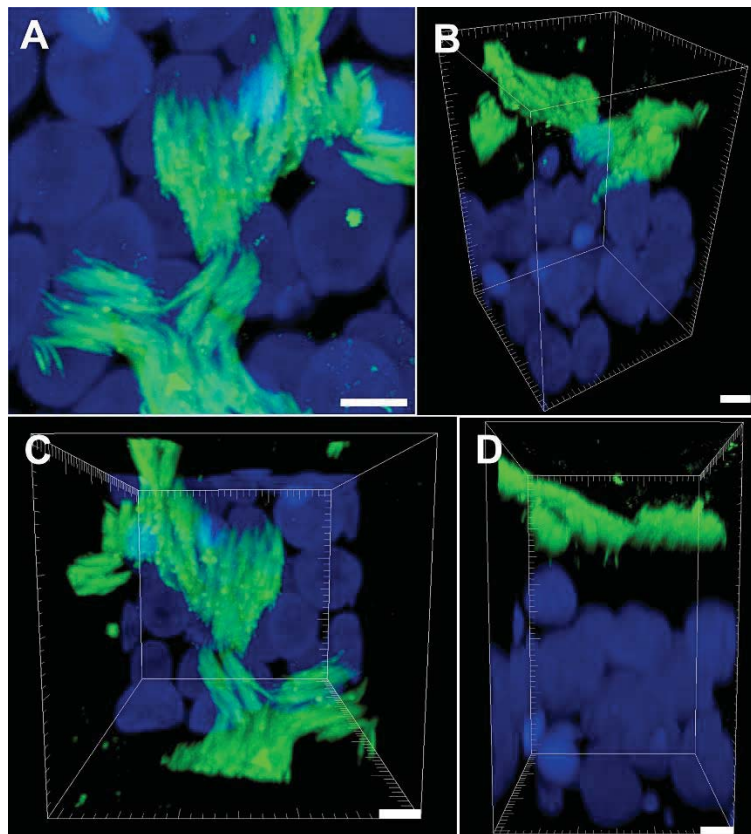
**Abbildung 42: Modelle der Kleinen Atemwege.** Für eine organspezifische Differenzierung werden die Epithelzellen der Kleinen Atemwege (HSAEpC) auf einer Membran an der Grenzfläche zur Luft (ALI) kultiviert. Dies ist einerseits möglich in einem statischen Transwell®-System (links) sowie andererseits im fluidischen Organ-on-a-Chip-Modell (rechts), in dem durch das Medium ein mikrofluidischer Blutfluss simuliert wird. Dabei entwickelt sich die typische Morphologie kinzilientragender Zellen.



**Abbildung 43: Differenzierung und Kultivierung von HSAEpC auf einem Transwell®-Filter-System.** Die HSAEpC ( $1 \cdot 10^5$ ) wurden auf der Membran eines Transwell®-Filters ausgesät, mit regelmäßigem Mediumwechsel über insgesamt 64 Tage kultiviert und dabei die Differenzierung der Epithelschicht verfolgt. Ab Tag 5 wurde zur ALI übergegangen. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des Hellfelds. Maßstab 150  $\mu\text{m}$



**Abbildung 44: Ausdifferenzierte HSAEpC auf der Membran eines Transwell®-Filters.** In einem Transwell®-Filter-System kultivierte und differenzierte HSAEpC wurden fixiert und anschließend gefärbt: Hoechst 33342-Färbung der Zellkerne (blau:  $\lambda_{\text{ex}}$  405 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  415-500 nm),  $\beta$ -Tubulin IV-Markierung der kinezilientragenden Zellen (grün:  $\lambda_{\text{ex}}$  496 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  506-632 nm) sowie Anti-MUC5AC-Färbung der Becherzellen (rot:  $\lambda_{\text{ex}}$  578 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  660-795 nm)). Die HSAEpC wurden konfokalmikroskopisch untersucht und als z-Stapel (47  $\mu\text{m}$ , 280 Aufnahmen) aufgenommen. Die Auswertung und die 3D Darstellung erfolgten mit Imaris®. Maßstab 10  $\mu\text{m}$



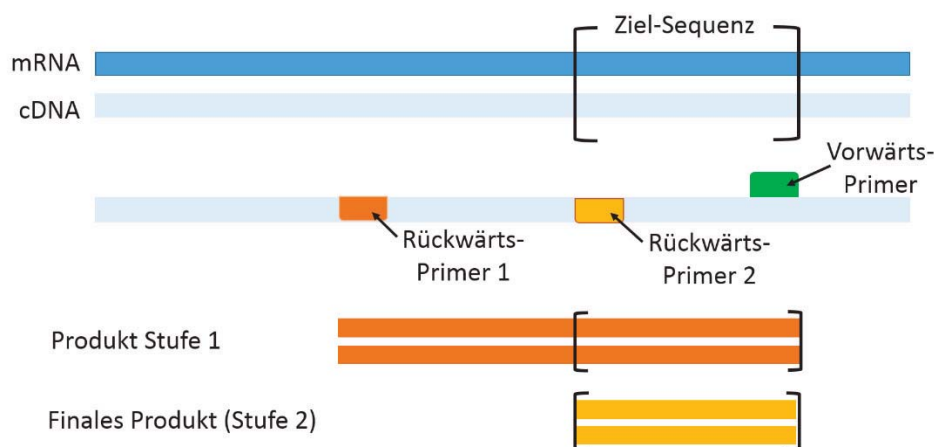
**Abbildung 45: Ausdifferenzierte HSAEpC auf der Membran eines Transwell®-Filters.** In einem Transwell®-Filter-System kultivierte und differenzierte HSAEpC wurden fixiert und anschließend gefärbt: Hoechst 33342-Färbung der Zellkerne (blau:  $\lambda_{ex}$  405 nm/  $\lambda_{em}$  415-500 nm), sowie  $\beta$ -Tubulin IV-Markierung der kinozilientragenden Zellen (grün:  $\lambda_{ex}$  496 nm/  $\lambda_{em}$  506-632 nm). Die Zellen wurden konfokalmikroskopisch untersucht und als z-Stapel (51  $\mu$ m, 305 Aufnahmen) aufgenommen. Die Auswertung und die 3D Darstellung erfolgten mit Imaris®. Maßstab 5  $\mu$ m

mechanische Einwirkungen, wie fluidischen Scherstress aber auch Dehnung und Kompression, soll die dynamische Umgebung innerhalb eines Gewebes simuliert werden und so eine organspezifische Differenzierung der Zellen *in vitro* erreicht werden.<sup>212-214</sup> Das Wachstum der Zellen findet auf beiden Seiten der porösen Membran statt und wird dort beobachtet. Die erzeugte Gewebestruktur besteht somit aus der Grenzfläche zwischen zwei verschiedenen Zellschichten, meist einer Endothel- und einer Epithelschicht, also dem Zusammenspiel zwischen Blutgefäß und Organewebe. Auf diese Weise wurden mit primären, humanen Zellen bereits mehrere Organmodelle entwickelt, darunter Lunge und Kleine Atemwege, Darm, Gehirn, Leber und Niere. Dabei ist für die Bildung eines Lungen- oder Kleinen Atemwegsepithel eine Grenzfläche der Zellen zur Luft (ALI, *air liquid interface*) essentiell für eine organotypische Differenzierung der Zellschicht.<sup>215</sup> (Abb. 42) In seiner Funktion des Gasaustauschs bildet das Lungenepithel die dünne respiratorische Grenzschicht zwischen der Atemluft und dem feinen Kapillarnetz des Gewebes. Daher ist eine gerichtete Polarität der Zellen für die Interaktion mit der Luft einerseits sowie mit dem vaskulären System andererseits von großer Bedeutung. Mit HSAEpC (humanen Epithelzellen der Kleinen Atemwege, *Human Small Airway Epithelium Cells*) kann eine solche spezifische Differenzierung bereits auf einem Transwell®-Filter-System erreicht werden, da hier einerseits oberhalb der Zellen jegliches Medium abgenommen und so die Grenzfläche zur Luft geschaffen werden kann, und gleichzeitig die Versorgung der Zellen

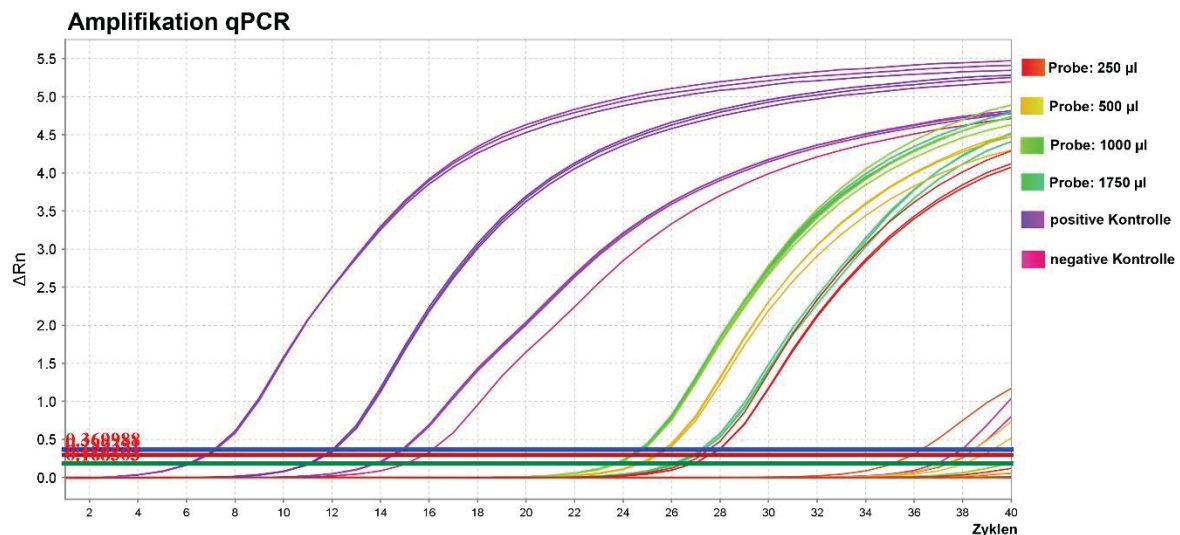
durch das Medium unterhalb des Filters weiterhin gewährleistet wird. Auf diese Weise können die HSAEpC ( $10^5$  Zellen/ Filter) differenziert und über mehrere Wochen kultiviert werden. (Abb. 43) Dabei entwickeln sich aus den primären Zellen eine organotypische Zusammenstellung verschiedener Zelltypen wie Becher-, Basal-, kinzilientragende, endokrine und muzinöse Zellen. Durch  $\beta$ -Tubulin IV-Markierung der kinzilientragenden Zellen sowie einer Anti-MUC5AC-Färbung der Becherzellen können diese mikroskopisch sichtbar gemacht und analysiert werden. (Abb. 44, 45) Die Bewegung der kinzilientragenden Zellen ist auch schon lichtmikroskopisch klar zu erkennen und daher ein gut ersichtliches Merkmal für ein erfolgreiches Voranschreiten der Differenzierung. Bei der Kultivierung auf einem Chip-System werden zusätzlich durch die dynamische Umgebung mittels Mikrofluidik des Mediums mechanische Reize erzeugt. Durch den komplexeren Chip des Lungenmodells kann durch Dehnung der Membran, also der Wachstumsfläche der Zellen, außerdem eine Atembewegung simuliert werden und die Differenzierung des Lungenepithels steuern. Das Modell der Kleinen Atemwege konnte bereits für verschiedene Studien Anwendung finden, darunter als Krankheitsmodell für Influenza durch eine Virusinfektion, als Modell einer COPD-Erkrankung mit patientenbezogenen Zellen oder zur Evaluierung des Effekts von Zigarettenrauch von Tabak- und E-Zigaretten.<sup>205, 207, 216</sup>

#### 4.4.1. Analyse der exosomalen RNA während der Differenzierung

Zur Analyse der 3D Kultur- und *Organ-on-a-Chip*-Modelle werden für die etablierten Gewebe oft mikroskopische Methoden verwendet oder auch Endpunkt-Studien, für welche die Zellen im System lysiert und das Experiment somit immer terminiert werden muss. Um eine kontinuierliche und genaue Überwachung von *in vitro*- und *Organ-on-a-Chip*-Systemen zu ermöglichen, wurde in einem Projekt des *Wyss Institute* die Auswertung extrazellulärer Marker, genauer: exosomaler RNA, angestrebt. Diese befindet sich in von Zellen und Geweben nach außen abgegebenen Vesikeln, den Exosomen. Charakteristisch für die exosomale RNA gegenüber anderen Formen, wie mRNA oder rRNA, ist die deutlich geringere Menge im Organismus



**Abbildung 46: Prinzip der „halb-verschachtelten“ qPCR.** Um kleine Mengen an mRNA bzw. cDNA detektieren zu können, wird eine zweistufige qPCR durchgeführt. Dazu wird das Primer-Paar nach der ersten Stufe auf die verkürzte vorliegende Sequenz angepasst. Die Sequenzen der beiden Primer-Paare sind damit „halb-verschachtelt“.

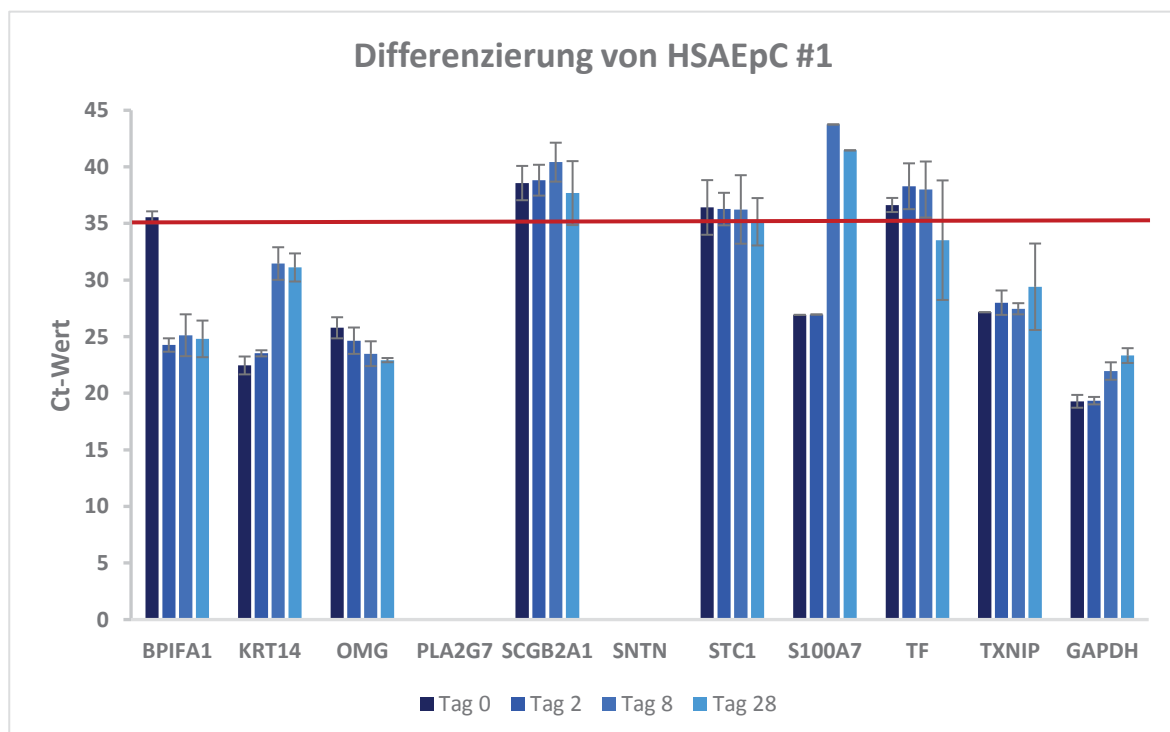


**Abbildung 47: Echtzeit-Diagramm der Amplifikation während der qPCR.** Mittels SYBR™ Green wurde bei der Durchführung der qPCR die vorliegende DNA-Konzentration der einzelnen Probe-Kammern in Echtzeit bestimmt und aufgeführt. Pro Probe (hier 4 Proben plus Kontrollen) und pro Marker (hier BPIFA1, SNTN sowie GAPDH) liegen dabei Triplikate vor (somit hier 54 Probe-Kammern).

sowie die kurzen Transkriptlängen zwischen 25 und 700 nt (im Vergleich zu durchschnittlich 2.100 nt bei mRNA).<sup>217-220</sup> Mittels quantitativer PCR (qPCR) sollen die aus dem Medium der Kultur gewonnenen Proben spezifisch untersucht werden und damit Aufschluss über den aktuellen Zustand dieser Kultur geben, ohne dass ein invasiver Vorgang nötig ist. Für die der HSAEpC wurden 10 gewebespezifische genetische Marker (BPIFA1, KRT14, OMG, PLA2G7, SCGB2A1, SNTN, STC1, S100A7, TF und TXNIP) ausgewählt, die gegenüber dem Haushaltsgen GAPDH ausgewertet wurden und somit eine Charakterisierung der Zellkultur ermöglichen sollten. Die Proben wurden aus den Medien gleich konditionierter Kulturen extrahiert und mit einem etablierten Verfahren aufgereinigt, um die exosomale RNA zu isolieren. Zur Analyse wurde ebenfalls ein zweistufiges Protokoll für die Durchführung der qPCR entwickelt, das es ermöglicht, die sehr kleinen Mengen an vorhandener exosomaler RNA (bis hin zu nur 0,1 pg = 10<sup>-13</sup> g) zu detektieren. Diese sogenannte „halb-verschachtelte“ PCR wird mit zwei Ansätzen und zwei Primer-Paaren durchgeführt, wobei die Zielsequenz des zweiten Paares innerhalb des Rahmens der ersten beiden Primer liegt, so dass der amplifizierte DNA-Strang in der zweiten Stufe kürzer ist als in Stufe eins. (Abb. 46) Diese Methode erhöht spezifische Bindungen und verringert damit die unspezifische Amplifizierung von anderem genetischen Material. Da die Konzentration im Kultivierungsmedium bisher unbekannt und schwer zu bestimmen war, wurde in einem ersten Versuch die exosomale RNA aus verschiedene Volumen einer Mediumprobe extrahiert, um eine Angabe über die benötigten Mengen machen zu können. Da von der Probe etwa 4 ml vorlagen, wurden als mögliche Volumen 250, 500, 1000 und 1750 µl eingesetzt, sowie als zu testende Marker neben dem Haushaltsgen GAPDH das stark exprimierte Gen BPIFA1 und das schwach exprimierte SNTN verwendet. Jede Probe der qPCR wurde dabei immer als Triplikat angesetzt. Die Amplifikation der jeweilig untersuchten Sequenzen der Proben wird durch das Signal von SYBR™ Green in Echtzeit aufgezeichnet und gibt über die dadurch erhaltenen Ct-Werte der Detektionsgrenze Aufschluss über die vorliegenden Mengenverhältnisse in der Probe. (Abb. 47) Jeder qPCR Zyklus bedeutet eine

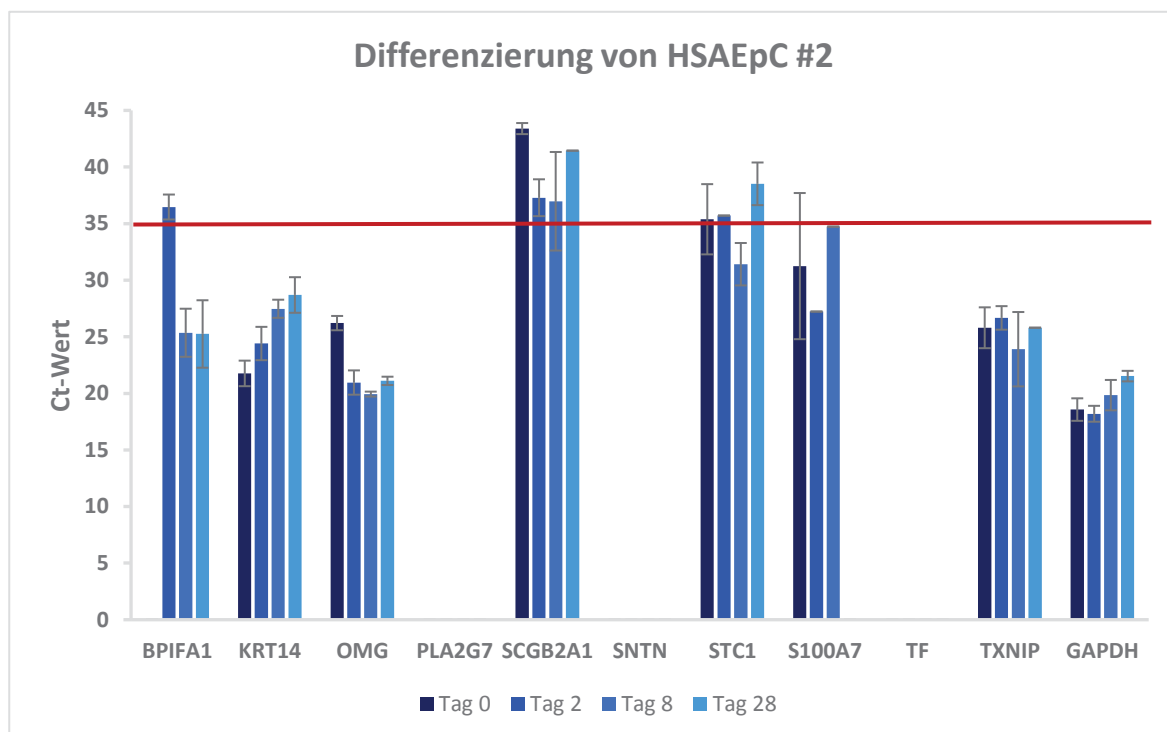


Verdoppelung des DNA-Materials, somit steht das Erreichen des Ct-Werts in exponentiellem Zusammenhang mit dem ursprünglich in der Probe vorhandenen Material. Durch die Positiv-Kontrolle, einer cDNA Probe aus der RNA lysierten Zellen, wird ein Signal aller untersuchten Sequenzen erwartet, was die Integrität der eingesetzten Primer sowie den erfolgreichen Ablauf qPCR bestätigt. Die Negativ-Kontrolle, ohne Zugabe einer Probe, hingegen soll in keinem der Fälle ein Signal aufweisen, um die Anwesenheit von Verunreinigungen ausschließen zu können. Die Kontrollen verliefen wie gewünscht und auch bei allen eingesetzten Proben konnten Ct-Werte für BPIFA1 und GAPDH ermittelt werden, die entsprechend ihrem zur Extraktion eingesetzten Volumen in versetzten Zyklen auftraten. Das schwach exprimierte SNTN hingegen konnte in keiner der Proben detektiert werden. Für die weitere Analyse der Proben wurde daher das höchste getestete Volumen von 1,75 ml eingesetzt und somit jeweils als Duplikat ausgewertet. Mithilfe von über 28 Tage gesammelten Mediumproben aus zwei Transwell®-Platten sollte die Differenzierung von HSAEpC verfolgt werden. Mit den Zellen eines Donors (#1) wurden zwei Platten mit Transwell®-System besiedelt ( $10^5$  Zellen/ Filter) und das basale Medium zu vier Zeitpunkten (Tag 0, Tag 2, Tag 8 und Tag 28 nach dem Aussäen) gesammelt. Damit ergaben sich 8 Sammlungen von je 4 ml konditioniertem Medium, die als Duplikate zu je 1,75 ml eingesetzt und somit als 16 Proben untersucht wurden. Die nach der Extraktion erhaltene exosomale RNA wurde mittels NanoDrop™ Spektralphotometer analysiert. Die RNA-Lösungen wiesen Konzentrationen zwischen 11 und 74 ng/ $\mu$ l, durchschnittlich 27 ng/ml, auf, die ermittelten Absorptionswerte A260/ A280 lagen durchschnittlich bei 1,51 in einem Bereich zwischen 1,41 und 1,62. Somit konnte ausreichendes Material in guter Qualität extrahiert

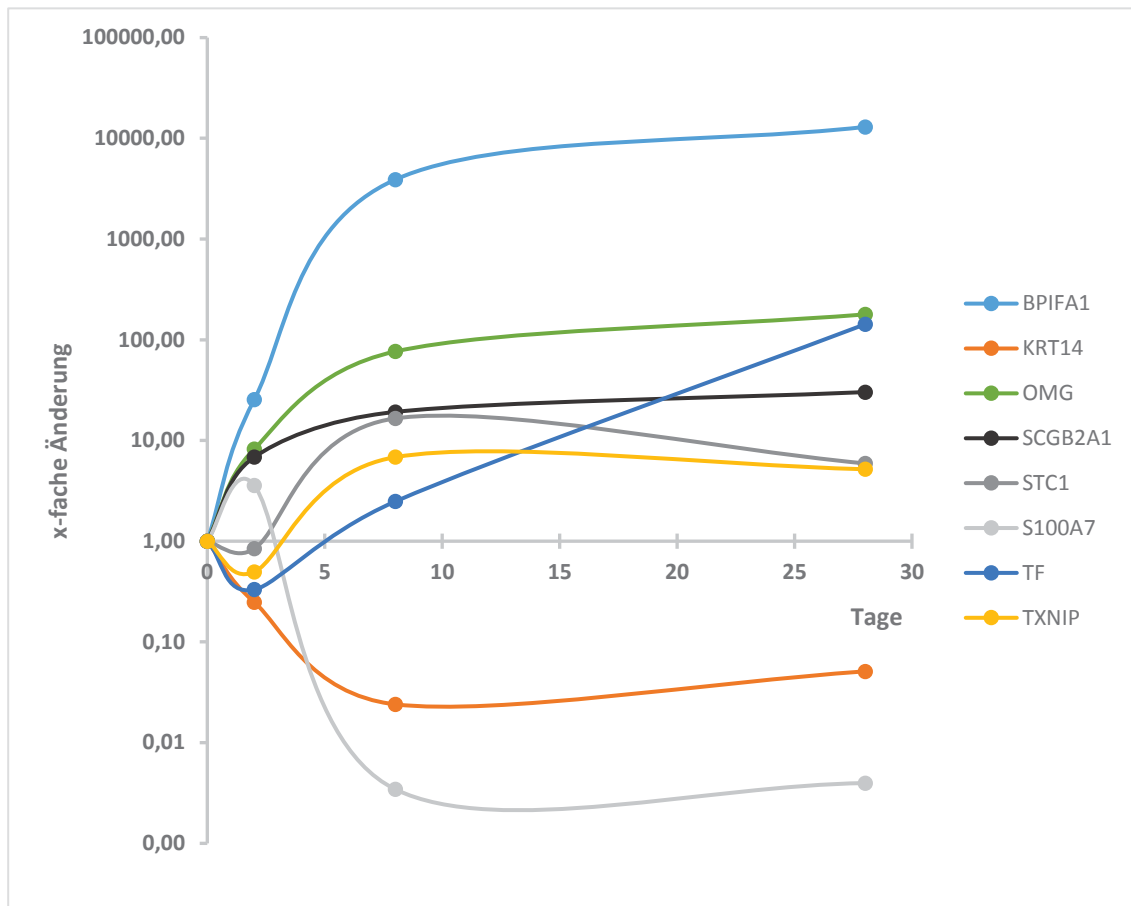


**Abbildung 48: Analyse der Differenzierung von HSAEpC (Donor 1) über die exosomale RNA.** Zwei Transwell®-Filter-Systeme wurden mit HSAEpC besiedelt und während der Differenzierung das Medium an vier Zeitpunkten gesammelt (Tag 0, 2, 8 und 28 nach dem Aussäen). Die Proben wurden als Duplikate aufgereinigt, aus der exosomalen RNA die entsprechende cDNA synthetisiert und als Triplikate mittels „halb-verschachtelter“ qPCR ausgewertet. Aufgeführt sind die Ct-Werte, die den Zyklus bei Überschreitung der Detektionsgrenze in der qPCR markieren, sowie ein Grenzwert von 35, ab dem das erhaltene Signal als unsicher einzustufen ist.  $n = 12$

werden. Aus den Proben wurde mittels reverser Transkription cDNA synthetisiert und diese als Triplikate in der „halb-verschachtelten“ qPCR eingesetzt. Aus dem Echtzeit-Diagramm der Amplifikation können für jede Probe die Ct-Werte entnommen werden. Diese geben an, nach wie vielen PCR-Zyklen die Detektionsgrenze überschritten wurde und da pro Zyklus das genetische Material verdoppelt wird, bieten die Ct-Werte ein Maß für die ursprünglich vorhandene Menge in der Probe. Die nach dem zweiten Durchgang erhaltenen Ct-Werte der Proben für die einzelnen Marker gaben somit einen Überblick über die jeweils vorhandene cDNA. (Abb. 48, Tab. 12) Je niedriger ein Ct-Wert, umso höher die Ausgangskonzentration des untersuchten Stoffs. Als Richtlinie gilt ein Grenzwert von 35 Zyklen, ab dem das erhaltene Signal als unsicher einzustufen ist, da teilweise auch in Negativ-Kontrollen ab dieser Anzahl von Zyklen Signale detektierbar sind. Folglich waren in der durchgeführten Analyse die Werte von fünf Markern (BPIFA1, KRT14, OMG, TXNIP sowie GAPDH) in der exosomal RNA deutlich messbar, während die restlichen sechs nicht (PLA2G7, SNTN) oder nur unsicher (SCGB2A1, STC1, S100A7, TF) zu bestimmen waren. Eine Auswertung des Verlaufs der gemessenen Werte erfolgte über eine Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH. Zusätzlich wurde zunächst aber ein erneuter Versuch nach gleichem Ablauf mit HSAEpC-Kulturen eines weiteren Donors (#2) durchgeführt. Hierbei wurden drei Transwell®-Platten mit HSAEpC ( $10^5$  Zellen/ Filter) besiedelt und wie zuvor das Medium an vier Zeitpunkten gesammelt. Um die Ausbeute an exosomaler RNA noch zu erhöhen, wurden die 12 Proben zur Aufreinigung nicht aufgeteilt, sondern jeweils das gesamte Volumen von 3,5 ml verwendet. Die aus der exosomal RNA erhaltene cDNA wurde wiederum als Triplikate in der „halb-verschachtelten“ qPCR eingesetzt. Auch hier



**Abbildung 49: Analyse der Differenzierung von HSAEpC (Donor 2) über die exosomale RNA.** Drei Transwell®-Filter-Systeme wurden mit HSAEpC besiedelt und während der Differenzierung das Medium an vier Zeitpunkten gesammelt (Tag 0, 2, 8 und 28 nach dem Aussäen). Die Proben wurden aufgereinigt, aus der exosomal RNA die entsprechende cDNA synthetisiert und als Triplikate mittels „halb-verschachtelter“ qPCR ausgewertet. Aufgeführt sind die Ct-Werte, die den Zyklus bei Überschreitung der Detektionsgrenze in der qPCR markieren, sowie ein Grenzwert von 35, ab dem das erhaltene Signal als unsicher einzustufen ist.  $n = 9$



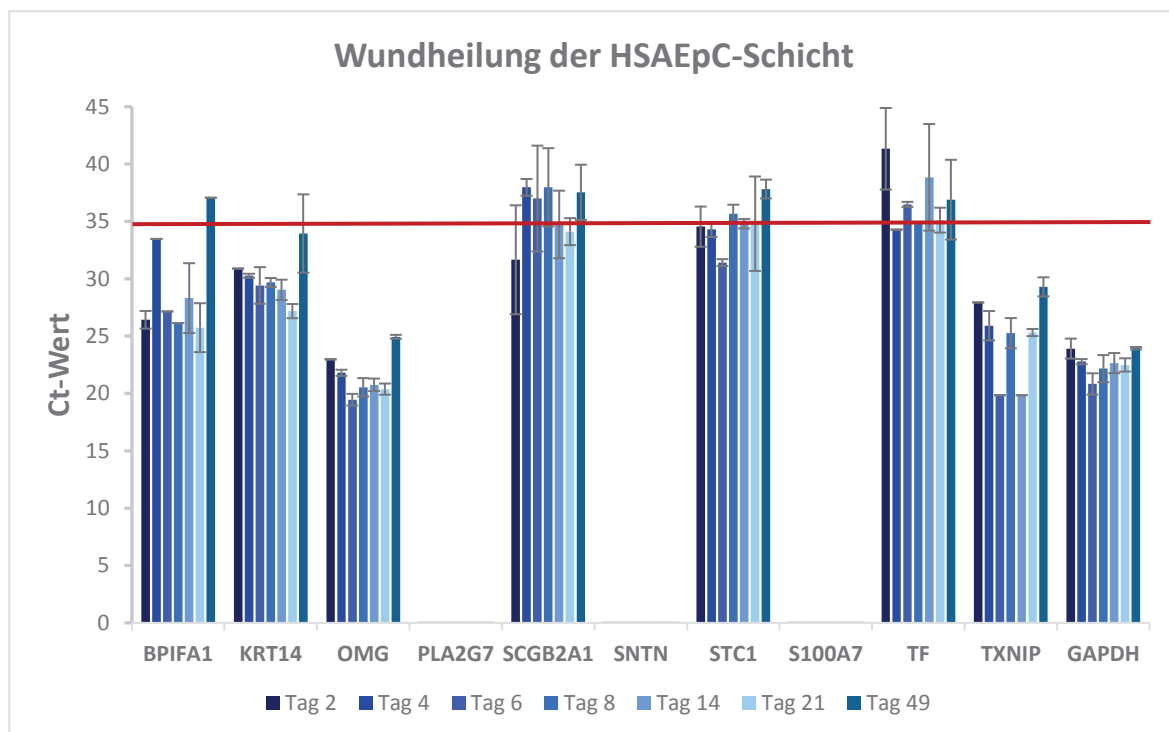
**Abbildung 50: Veränderung der genetischen Marker der exosomalen RNA während der Differenzierung von HSAEpC.** In Transwell®-Systemen wurden HSAEpC von zwei Donoren kultiviert und während der Differenzierung das Medium an vier Zeitpunkten gesammelt (Tag 0, 2, 8 und 28 nach dem Aussäen). Die Proben wurden aufgereinigt, aus der exosomalen RNA die entsprechende cDNA synthetisiert und als Triplikate mittels „halb-verschachtelter“ qPCR ausgewertet. Die erhaltenen Ct-Werte wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normiert und so der Verlauf über die Differenzierung aufgezeigt.

ergaben sich aussagekräftige Messwerte für die Untersuchungen der Marker BPIFA1, KRT14, OMG, TXNIP sowie GAPDH, während für die anderen gar keine oder nur sehr späte Signale aufgenommen wurden. (Abb. 49, Tab. 13) Dies zeigt, dass die erhaltenen Daten nicht donor-spezifisch sind, sondern unabhängig während der Differenzierung von HSAEpC aufgenommen werden können. Daher wurden die aus beiden Versuchen erhaltenen Ct-Werte auf das Haushaltsgen GAPDH normiert, was Aufschluss über den Verlauf der Expression während der untersuchten Differenzierung über 28 Tage gab. (Abb. 50, Tab. 14) Als Haushaltsgen wird GAPDH in allen Zellstadien gleichermaßen exprimiert und fungiert somit als Basiswert, um alle Messdaten zueinander in Relation setzen zu können. Als Grundstadium gilt das Expressionsmuster vor Beginn der Differenzierung, also unmittelbar nach der Besiedelung an Tag 0. Davon ausgehend wird die Änderung der Expression für die einzelnen Marker beschrieben, wobei die unterschiedlichen Tendenzen deutlich werden. Auffallend ist der starke Anstieg von BPIFA1 über den untersuchten Zeitraum. Ebenso zeigt die Expression von OMG eine kontinuierliche Steigung. Beim Marker KRT14 hingegen ist ein deutlicher Abfall zu erkennen, während TXNIP über die Differenzierung hinweg auf einem recht kontinuierlichen Niveau bleibt. Daraus ergibt sich aus den Proben am Ende der Differenzierung ein eindeutig verändertes Bild des

Expressionsmuster im Vergleich zum Beginn. Somit wird es mittels einer Analyse der exosomalen RNA möglich, den Zustand der Zellkultur anhand von Medientnahmen zu beurteilen.

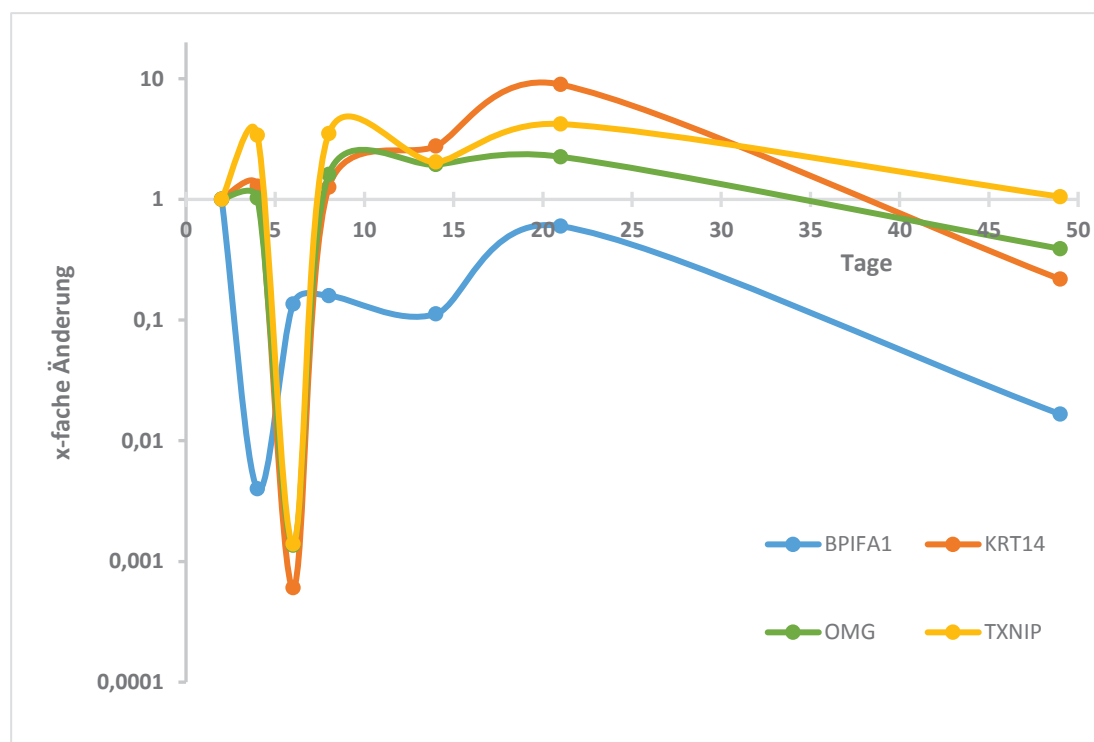
#### 4.4.2. Analyse der exosomalen RNA während einer Wundheilung

Um diese Methode weiter auszutesten, wurde sie zur Analyse einer weiteren Zustandsänderung einer HSAEpC-Kultur eingesetzt. Dabei wurde die differenzierte Zellschicht beschädigt, um eine Verletzung zu simulieren, und der Heilungsprozess bis zur Wiederherstellung der intakten Schicht mit sieben Medientnahmen über 49 Tage verfolgt. Eine solche Anwendung wäre prinzipiell auch in einem medizinischen Kontext denkbar und interessant, um beispielsweise einen Heilungsverlauf von entzündetem Lungengewebe zu verfolgen. Hierfür wäre im Gegensatz zu meist aufwendigen und invasiven endoskopischen Verfahren lediglich eine Blutentnahme und die Untersuchung der darin vorzufindenden exosomalen RNA nötig, um Aussagen über den Zustand des Organs zu treffen. (Natürlich stünden dafür noch zahlreiche Auswertungen und Evaluierungen des Konzepts bevor, daher handelt sich bei einer solchen Nutzung zu diesem Zeitpunkt noch um eine hypothetische Annahme.) Wie zuvor lagen über den untersuchten Zeitraum fünf genetische Marker (BP1FA1, KRT14, OMG, TXNIP sowie GAPDH) im gut messbaren Spektrum. (Abb. 51, Tab. 15) Im Gegensatz zur Differenzierung ist bei den vorliegenden Werten schon auf den ersten Blick kein kontinuierlicher Verlauf auszumachen. Zur weiteren Auswertung wurden die vier genannten, ausgeprägten Marker betrachtet, auf

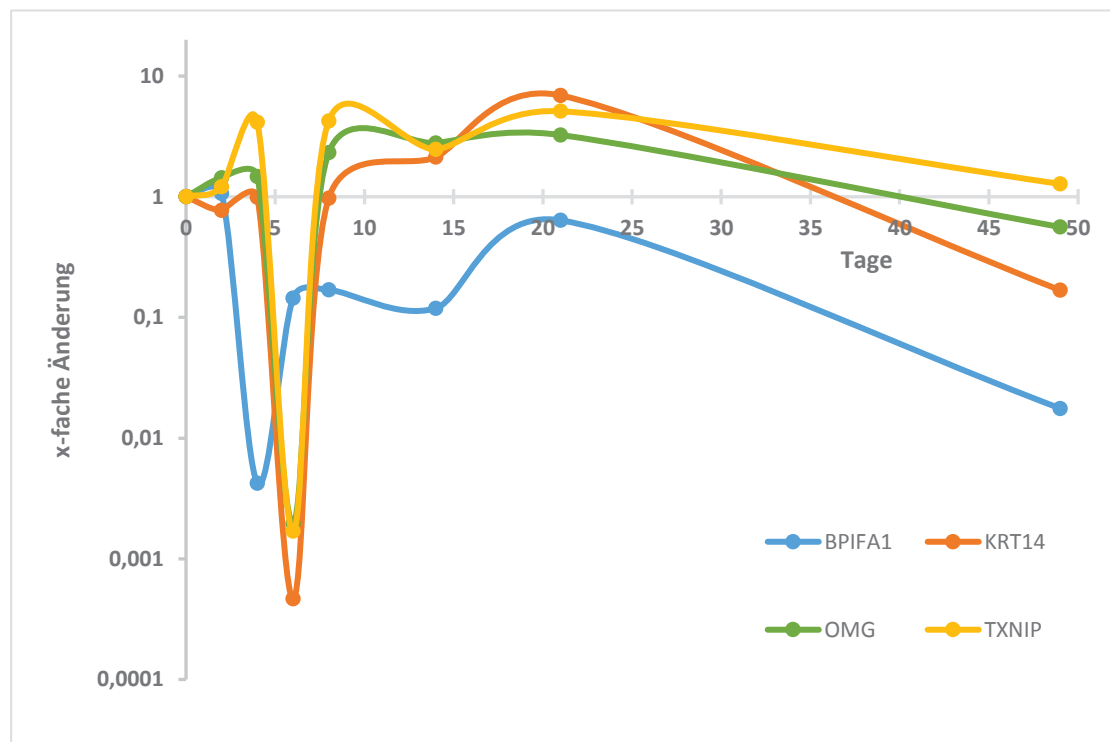


**Abbildung 51: Analyse des Wundheilungsprozesses einer HSAEpC-Schicht über die exosomale RNA.** Zwei Transwell®-Filter-Systeme wurden mit HSAEpC besiedelt, die Zellschicht beschädigt (Tag 0) und während der darauffolgenden Wundheilung das Medium an 7 Zeitpunkten gesammelt (Tag 2, 4, 6, 8, 14, 21 und 49 nach Verwundung). Die Proben wurden aufgereinigt, aus der exosomalen RNA die entsprechende cDNA synthetisiert und als Triplikate mittels „halb-verschachtelter“ qPCR ausgewertet. Aufgeführt sind die Ct-Werte, die den Zyklus bei Überschreitung der Detektionsgrenze in der qPCR markieren, sowie ein Grenzwert von 35, ab dem das erhaltene Signal als unsicher einzustufen ist. n = 6

das Haushaltsgens normiert und in Bezug auf den Ausgangszustand ins Verhältnis gesetzt. Dazu wurden die Verläufe zweimal dargestellt: Einerseits als Wundheilungsprozess ab der ersten Probenentnahme an Tag 2 nach der Verwundung sowie andererseits mit dem Endpunkt der vorherigen Untersuchung zur Differenzierung als anfänglichem „Normalzustand“ und der anschließenden Verwundung und Wundheilung. (Abb. 52, 53, Tab. 16) Trotz der Ähnlichkeit beider Graphen erlaubte diese Auswertung der Daten im Hinblick auf den eingesetzten Anfangszustand jeweils spezifische Aussagen einerseits über den eigentlichen Regenerationsprozess selbst (Abb. 52) sowie den grundsätzlichen Einfluss der vorliegenden Verwundung auf die Genexpression im Gewebe (Abb. 53). Auffallend war vor allem die starke Herunterregulierung aller Marker zu Beginn der Untersuchungen und der direkt folgende Wiederanstieg, woraufhin die Expression auf einem etwa konstanten Niveau blieb. Dies gab die wechselnden Ansprüche im Metabolismus der Zellschicht in der Reaktion auf die Verletzung und des einsetzenden Heilungsprozesses wider. Wünschenswert für die Evaluierung der Methode wäre eine Übereinstimmung des ursprünglichen „Normalzustandes“ der differenzierten Zellen und dem Endzustand der „geheilten“ Zellschicht. Diese nähern sich an der x-Achse zwar einander an, der gleiche Zustand konnte im untersuchten Zeitraum allerdings (noch) nicht erreicht werden. Insgesamt ist das vorliegende Expressionsmuster deutlich von dem während der Differenzierung zu unterscheiden und deutet somit auf die spezifisch ablaufenden Prozesse zur Regeneration hin. Spezielle Verlaufsschemata für bestimmte Vorgänge aus Daten der exosomalen RNA wären also denkbar.



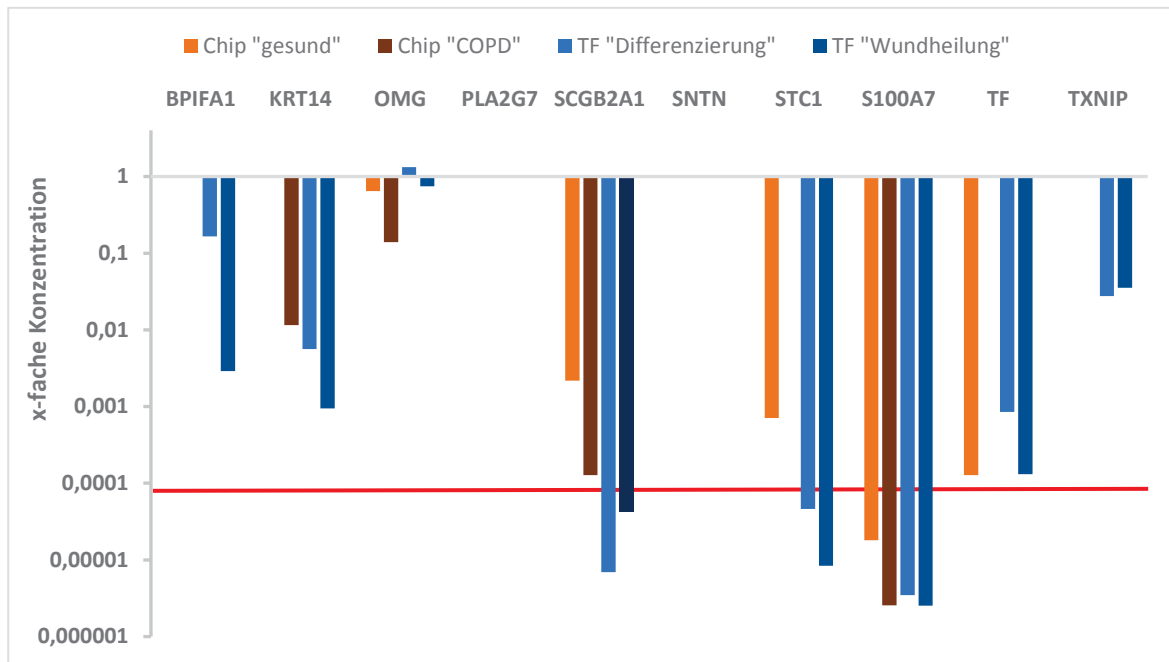
**Abbildung 52: Veränderung der genetischen Marker der exosomalen RNA während des Wundheilungsprozesses einer HSAEpC-Schicht.** In Transwell®-Systemen wurden HSAEpC kultiviert, die Zellschicht beschädigt (Tag 0) und während der darauffolgenden Wundheilung das Medium an 7 Zeitpunkten gesammelt (Tag 2, 4, 6, 8, 14, 21 und 49 nach Verwundung). Die Proben wurden aufgereinigt, aus der exosomalen RNA die entsprechende cDNA synthetisiert und als Triplikate mittels „halb-verschachtelter“ qPCR ausgewertet. Die erhaltenen Ct-Werte wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normiert und so der Verlauf der Wundheilung ab Tag 2 aufgezeigt.



**Abbildung 53: Veränderung der genetischen Marker der exosomalen RNA durch Verwundung und Wundheilung einer HSAEpC-Schicht.** In Transwell®-Systemen wurden HSAEpC kultiviert, die Zellschicht beschädigt (Tag 0) und während der darauffolgenden Wundheilung das Medium an 7 Zeitpunkten gesammelt (Tag 2, 4, 6, 8, 14, 21, 49 nach Verwundung). Die Proben wurden aufgereinigt, aus der exosomalen RNA die entsprechende cDNA synthetisiert und als Triplikate mittels „halb-verschachtelter“ qPCR ausgewertet. Die erhaltenen Ct-Werte wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normiert und so der Verlauf von Verwundung und Wundheilung von Tag 0 (zuvor ermittelter Endpunkt der Differenzierung) aufgezeigt.

#### 4.4.3. Analyse der exosomalen RNA im *Organ-on-a-Chip*-Modell

Des Weiteren wurde die Methode für eine Anwendung an fluidischen *Organ-on-a-Chip*-Modellen der Kleinen Atemwege ausgeweitet. Dazu wurden HSAEpC ( $1,6 \cdot 10^4$ ) von zwei verschiedenen Donoren – einem gesunden sowie einem COPD-Patienten – in den Chips kultiviert und differenziert. Zur Auswertung wurde das Medium aus dem Auffang-Reservoir der Fluidik entnommen, pro Chip das Volumen von einem Tag, etwa 2,4 ml. Somit lag im Vergleich zu den Transwell®-Filtern ein deutlich kleineres Verhältnis von Zellen zu Medium vor, also auch eine niedrigere Konzentration exosomaler RNA, die es zu isolieren galt. Nach der Aufreinigung der exosomalen RNA wurde wieder die entsprechende cDNA synthetisiert und mithilfe der „halb-verschachtelten“ qPCR ausgewertet. Da es sich bei dieser Untersuchung, im Gegensatz zu den vorherigen, nicht um einen Verlauf sondern um eine Zustandsaufnahme handelte, wurden die mittels Ct-Wert bestimmten Ergebnisse auf das Haushaltsgen GAPDH normiert und entsprechend anteilig aufgeführt. (Abb. 54, Tab. 17) Auffallend war, dass nur sehr wenige der erhaltenen Werte überhaupt als sicheres Signal eingestuft werden konnten bzw. oft gar nicht erst detektierbar waren. Im Fall der gesunden HSAEpC lagen diese zuverlässigen Werte für die Marker OMG und SCGB2A1 vor und bei den COPD-erkrankten für KRT14 und OMG. Keine

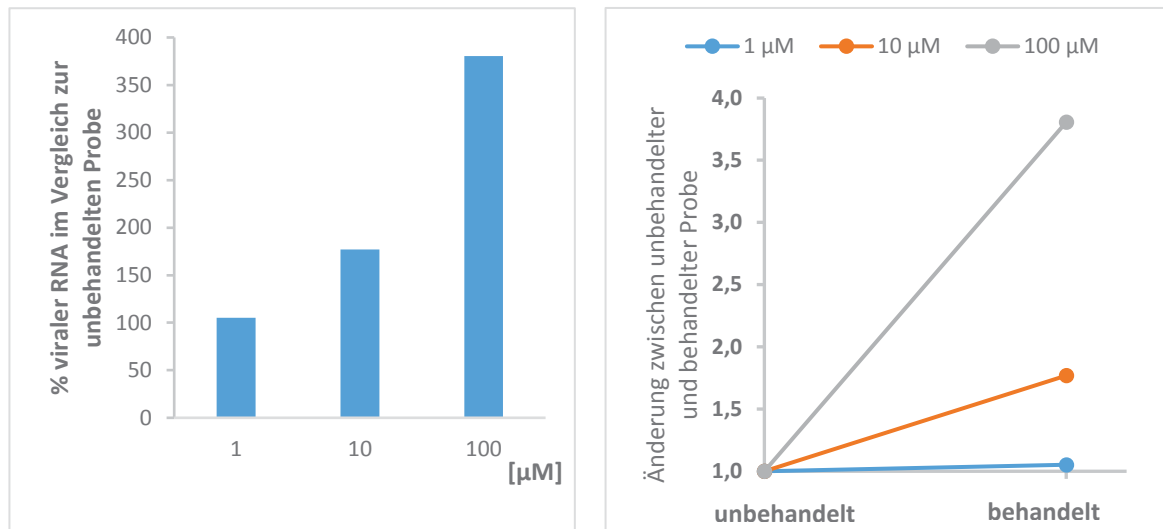


**Abbildung 54: Analyse der genetischen Markern von HSAEpC über die exosomale RNA.** HSAEpC eines gesunden Donors sowie eines COPD-Patienten wurden in einem fluidischen Organ-on-a-Chip-Modell zur Nachbildung der Kleinen Atemwege kultiviert, differenziert und anschließend Mediumproben aus dem Reservoir der Fluidik entnommen. Diese wurden aufgereinigt, aus der exosomalen RNA die entsprechende cDNA synthetisiert und als Triplikate mittels „halb-verschachtelter“ qPCR ausgewertet. Die erhaltenen Ct-Werte wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normiert und aufgeführt, ebenso wie ein Grenzwert (ausgehend von Ct = 35), ab dem das erhaltene Signal als unsicher einzustufen ist.  $n \geq 4$  Daneben wurden zum Vergleich außerdem die vorherigen Endpunkte aus den Kultivierungen im Transwell®-Filter-System (TF) aufgeführt.

Werte hingegen konnten für die Marker BPIFA1 sowie TXNIP detektiert werden, die in den bisherigen Analysen immer klare Signale aufgewiesen hatten. Diese Unterschiede sind im Vergleich mit den jeweiligen Endstadien der vorherigen Studien, bei denen ebenfalls vom Stadium differenzierter Zellen ausgegangen wird, klar zu erkennen. Während die beiden letzteren in den meisten Messwerten sehr nah beieinander liegen, weichen die Messungen aus den Proben beider Chips doch deutlich ab. Abweichungen zwischen den beiden unterschiedlich besiedelten Chips sind aufgrund der verschiedenen verwendeten Zelltypen nicht ausgeschlossen, sondern im Gegenteil sogar von Vorteil, um diese individuell analysieren zu können. Dennoch wäre eine bessere Vergleichbarkeit der differenzierten HSAEpC wünschenswert gewesen, um die angewandte Methode weiter verifizieren zu können. Da ein großer Unterschied der beiden Systeme, Transwell®-Filter und mikrofluidischer Chip, die Medienentnahme und das –volumen ist, wäre hier ein Ansatz, um den Versuch unter diesbezüglich veränderten Bedingungen zu wiederholen, und damit auch die Konzentration der vorliegenden exosomalen RNA zu erhöhen.

#### 4.4.4. Modell für eine Influenza-Infektion

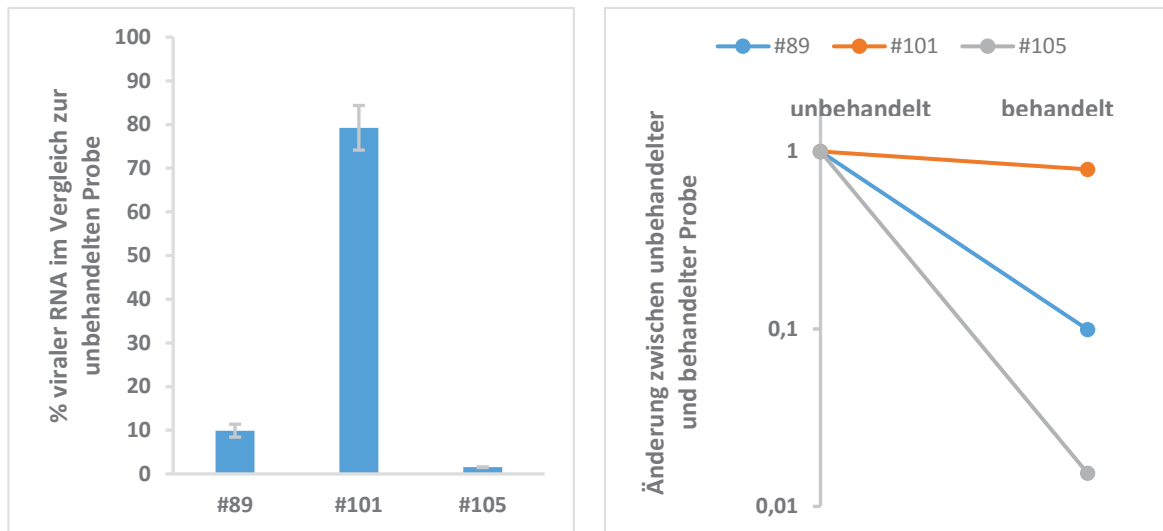
Neben der Analyse zum Aufbau der jeweiligen Systeme an sich, eignen sich diese selbst wiederum zur Simulation und Untersuchung von verschiedenen Prozessen innerhalb eines



**Abbildung 55: Bestimmung der Virus-Infektion durch Analyse der viralen RNA.** Eine differenzierte Zellschicht von HSAEpC wurde mit drei Konzentrationen eines HAT Blockierungspeptids (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend mit Influenza-Viren behandelt. Zur Auswertung wurde die durch die Infektion aufgenommene virale RNA aus den Zellen isoliert, in die entsprechende cDNA umgewandelt und mittels qPCR analysiert. Die erhaltenen Werte wurden mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Änderungen wurden in den Diagrammen prozentual (links) und als Änderungsfaktor (rechts) dargestellt.  $n = 3$

Organismus, wie durch den Wundheilungsverlauf bereits angedeutet (Kapitel 4.4.2). Dazu zählen beispielsweise auch die Entwicklung von Krankheitsbildern und die Reaktion auf mögliche Wirkstoffkandidaten. Das Modell der Kleinen Atemwege beispielsweise lässt sich durch eine Behandlung mit Viren infizieren und „erkrankt“ dadurch an Influenza. Die Ausprägung einer solchen Infektion lässt sich durch die Aufnahme von viraler RNA in die Zellen ermitteln – je mehr davon bei einer Lysierung der Zellen in der isolierten RNA vorzufinden ist, umso stärker konnte der Virus die untersuchten Zellen infiltrieren. Werden die Zellen jedoch zuvor behandelt, kann sich beispielsweise die Membran der Zellen verändern und dadurch die Aufnahme und somit Vervielfältigung der Viren beeinflusst werden. Ein solcher Prozess sollte im *in vitro*-System untersucht werden. Dazu wurde die differenzierte HSAEpC-Schicht vor der Virus-Infektion mit drei Konzentrationen eines Peptids (HAT-Blockierungspeptid) inkubiert. Als vermeintliche Wirkungsweise wurde hier das Binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche angenommen, die so blockiert werden und weniger Bindungsstellen für das Eindringen der Viren bieten, die Aufnahme also erschweren. Zur Analyse der Virusinfektion wurden die Zellen anschließend lysiert und die enthaltene virale RNA isoliert und aufgereinigt. Zur Auswertung wurde mit der entsprechenden cDNA eine qPCR bezüglich des viralen Markers PR8 PA durchgeführt. Diese zeigte, dass entgegen der Erwartung die Infektion durch die Peptid-Behandlung nicht verringert, sondern eher gefördert wurde. (Abb. 55, Tab. 18) Denkbar ist, dass Peptid und Virus selbst interagierten oder dass das Peptid an der Oberfläche ein besseres Anhaften ermöglichte und dadurch das Eindringen in die Zellen begünstigt wurde. Unabhängig von der genauen Wirkungsweise des eingesetzten Peptids wurde im angewandten Verfahren der konzentrationsabhängige Einfluss der Substanz auf die vorliegende Virus-Infektion deutlich. Umso höher die eingesetzte Peptid-Konzentration, umso größer war der Anteil an vorzufindender





**Abbildung 56: Bestimmung der Virus-Infektion durch Analyse der viralen RNA.** Eine differenzierte Zellschicht von HSAEpC wurde mit drei Molekülen einer anonymisierten Bibliothek möglicher Wirkstoffe zu Verhinderung von Virus-Infektionen (#89, #101, #105) inkubiert und anschließend mit Influenza-Viren behandelt. Zur Auswertung wurde die durch die Infektion aufgenommene virale RNA aus den Zellen isoliert, in die entsprechende cDNA umgewandelt und mittels qPCR analysiert. Die erhaltenen Werte wurden mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Änderungen wurden in den Diagrammen prozentual (links) und als Änderungsfaktor (rechts) dargestellt.  $n = 3$

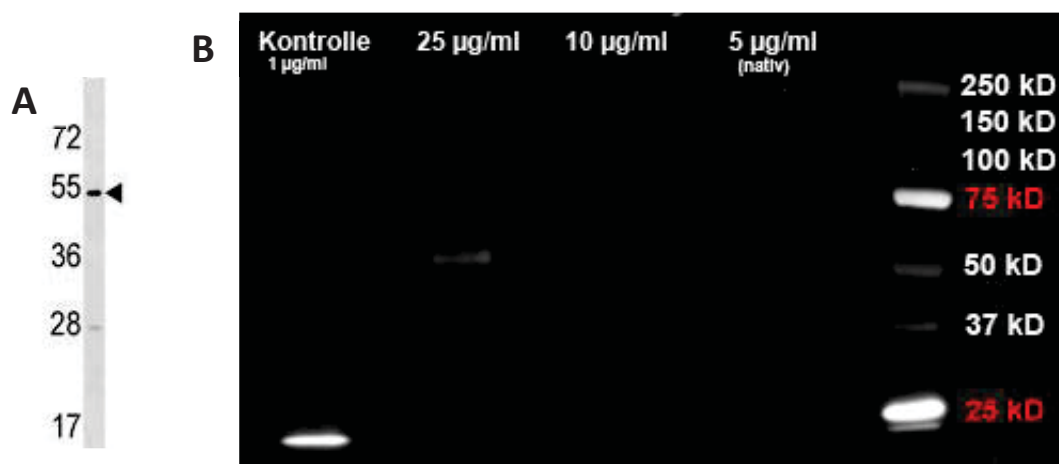
viraler RNA. Es zeigte sich eine exponentielle Abhängigkeit. Mit diesen Ergebnissen wurde also gezeigt, dass die Beeinflussung eines Wirkstoffs selbst und die Auswirkung verschiedener Konzentrationen messbar sind. Daher bietet sich die Möglichkeit für einen Einsatz des Systems als Plattform zur Testung von Wirkstoffkandidaten in Bezug auf Influenza-Erkrankungen. Beispielhaft wurde dies anschließend mit drei unterschiedlichen Molekülen einer anonymisierten Bibliothek möglicher Wirkstoffe zu Verhinderung von Virus-Infektionen (#89, #101, #105) getestet. Auch hier wurden die Zellen zunächst mit der jeweiligen Substanz und anschließend mit dem Influenza-Virus behandelt. Wieder wurden die Zellen lysiert und mittels qPCR die Konzentration der viralen RNA in Bezug auf eine unbehandelte Probe bestimmt. Hier konnte durch alle eingesetzten Substanzen die Aufnahme an Viren, teils enorm, verringert werden. (Abb. 56, Tab. 18) Es ergab sich ein entgegengesetztes Bild zum vorherigen Versuch, das vermuten ließ, dass hier die nötigen Aufnahmemechanismen für eine Infektion, zumindest teilweise, blockiert wurden. Dadurch sank im besten Fall der Anteil viraler RNA im Verhältnis zur Kontrolle auf unter 10 % (#105). Für künftige Studien legte dieses Ergebnis also die weitere Verfolgung der Substanz #105 sowie eventuell außerdem der Substanz #89 nahe, da hier die deutlichsten Effekte festzustellen waren. Die genaue Bindungsstelle könnte überprüft werden sowie durch den Einsatz von Derivaten, also mittels kleiner Veränderungen der Molekülstruktur, die Affinität weiter erhöht werden, um möglicherweise die Virusinfektion vollständig verhindern zu können.

#### 4.4.5. Phagen Display

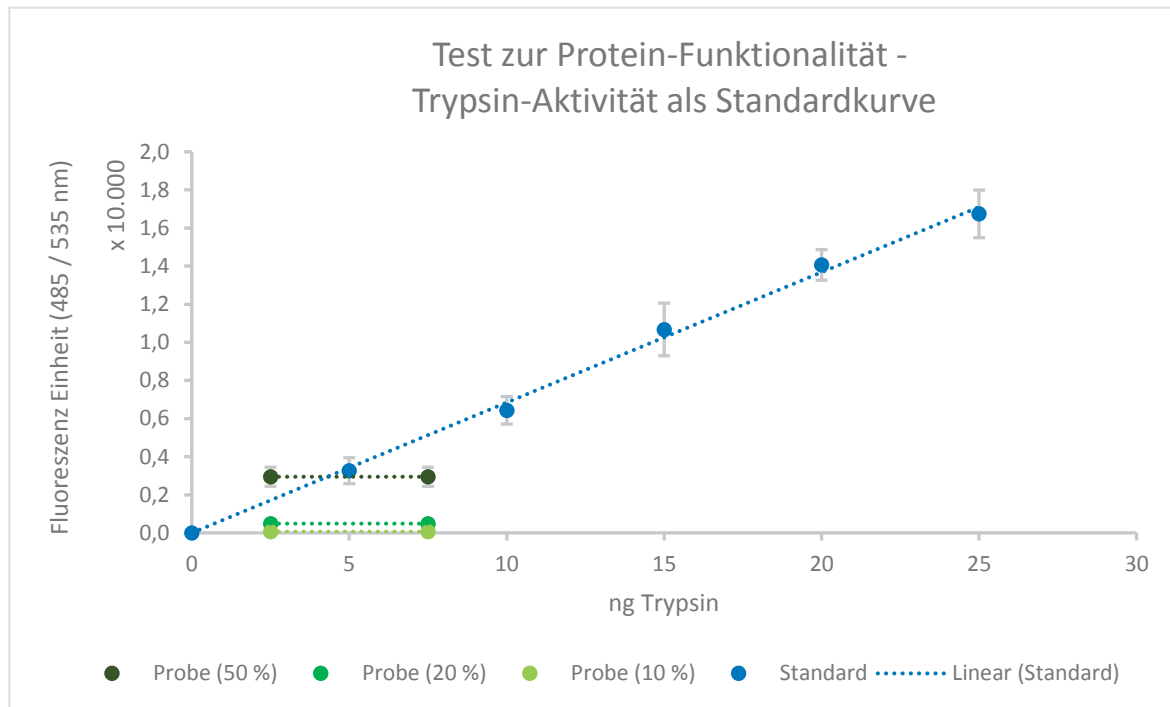
In einer anschließenden Studie sollten diese Erkenntnisse nun genutzt werden, um eine Substanz, in diesem Fall ein Peptid, zur gezielten Blockierung einer bekannten Bindungsstelle des Influenzavirus an der Oberfläche von HSAEpC zu finden. Dieses könnte als vielversprechender



Vorläufer für ein Medikament in der Vorsorge oder Behandlung von Influenza-Erkrankung dienen. Das Vorgehen basierte dabei zunächst auf einem sogenannten Phagen-Display Versuch.<sup>221-223</sup> Dabei handelt es sich um ein mikrobiologisches Verfahren in der Biotechnologie, bei der eine Bibliothek von Bakteriophagen zum Einsatz kommt, die jeweils unterschiedliche Peptide (oder andere Biomoleküle) auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch die individuelle Affinität zu einer eingesetzten Zielstruktur findet eine positive Auslese der passenden Peptide statt, welche mithilfe der Phagen vervielfältigt und so über mehrere Selektionsvorgänge in der finalen Bibliothek angereichert werden. Durch eine abschließende Sequenzierung lässt sich die Zusammensetzung der so erhaltenen Moleküle bestimmen und für weiterführende Experimente einsetzen. Dieser Prozess sollte nun auch für die zuvor beschriebene Fragestellung zur Blockierung einer Influenza-Infektion eingesetzt werden. Als Zielstruktur sollte das Membranprotein DESC-1 (auch TMPRSS2) auf den Zellen der Kleinen Atemwege dienen, welches verschiedenen Studien zufolge eine zentrale Rolle während der Influenza-Infektion spielt.<sup>224-231</sup> Um das Protein für die Durchführung der Phagen-Display Selektion fixieren zu können, wurde es am N-Terminus mit Polyhistidin markiert (N-His). Um die Integrität dieser Zielstruktur zu gewährleisten, wurde mit der synthetisierten Probe ( $c = 133 \mu\text{g/ml}$ ) eine Gelelektrophorese durchgeführt und mit einer Coomassie-Blau-, einer Silber-Färbung sowie einem Immuno-Western Blot ausgewertet. Die erwartete Größe des Proteins betrug dabei etwa 440 aa bzw. 48 kDa. Die Anwesenheit von Proteinstrukturen in der synthetisierten Probe, auch im gesuchten Größenbereich, konnte qualitativ durch die genannten Färbungen bestätigt werden. Ebenso konnte durch die Antikörper-Bindung im Western Blot ein Signal bei etwa 48 kD erhalten werden, auch wenn dieses deutlich schwächer ausfiel als erwartet. (Abb. 57, Abb. 81, 82) Daher musste von einer etwas niedrigeren Konzentration in der angesetzten Lösung ausgegangen werden. Außerdem wurde eine Untersuchung der Protease-Funktionalität durchgeführt, um die Aktivität des Zielproteins in der synthetisierten Probe zu bestätigen. In diesem Experiment wurde das fluoreszente FITC als Substrat verwendet, dessen Abbau über einen festen Zeitraum in Relation zur Aktivität des zugesetzten Proteins photometrisch vermessen werden konnte. Als Referenz wurden verschiedene Konzentrationen Trypsin eingesetzt und



**Abbildung 57: Gesuchtes Molekulargewicht und Western Blot der synthetisierten DESC-1 Protein-Probe.** Das Molekulargewicht des mit Polyhistidin markierten DESC-1 liegt bei etwa 48 kDa und somit die gesuchte Bande im angezeigten Bereich (A). Im Western Blot erfolgte die Untersuchung des Proteins DESC-1 mittels Immuno-Detektion (B). Aufgeführt sind 4 Proben sowie die DNA-Leiter aus molekularen Markern.



**Abbildung 58: Überprüfung der Protein-Funktionalität.** In Anwesenheit der verschiedenen Protein-Proben wurde der Abbau des fluoreszenten FITC photometrisch untersucht und damit die Aktivität der Proteine bestimmt. Als Vergleich wurde mit Trypsin eine Standardkurve ermittelt und im Diagramm dargestellt (hellblau). Für die 50 %ige Probe (dunkelgrün) ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Standardkurve eine Aktivität, die etwa der von 5 ng (bzw. 5  $\mu\text{g/ml}$ ) Trypsin entspricht.

daraus eine Standardkurve ermittelt, mit der die Messwerte verglichen wurden. (Abb. 58, Tab. 19) Der größte Messwert aus der 50 %igen Protein-Probe (5  $\mu\text{l}$ ; 0,67  $\mu\text{g}$ ) ergab eine Aktivität, die etwa der 5 ng bzw. 5  $\mu\text{g/ml}$  Trypsin entsprach, womit die Funktionalität der Probe gezeigt werden konnte. Insgesamt konnten durch diese Validierungsversuche also sowohl die Präsenz, als auch die Integrität sowie die Funktionalität des modifizierten DESC-1 Proteins in der Probe nachgewiesen werden, allerdings in einer offenbar geringeren Konzentration als erwartet.

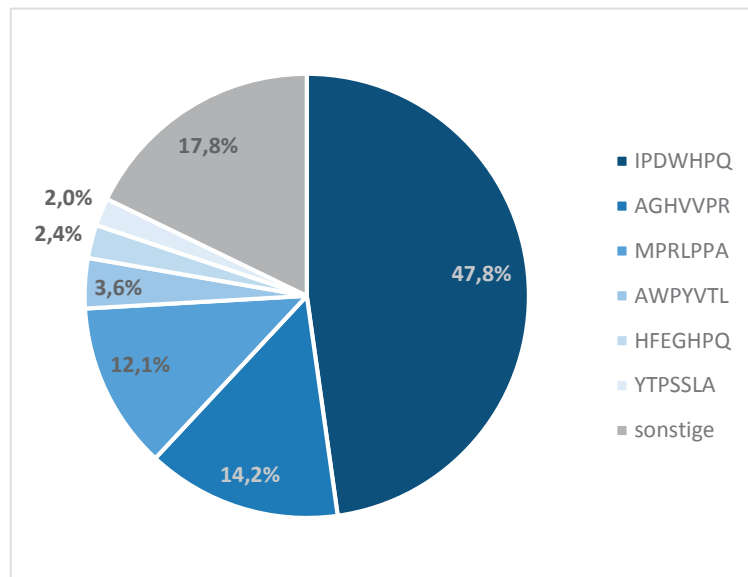
Nach der beschriebenen Überprüfung der synthetisierten Probe von DESC-1 wurde diese als Zielstruktur für das Phagen-Display eingesetzt. Um trotz der niedrigeren Konzentration der Probe eine gute Ausbeute zu erzielen, wurde die doppelte Menge der einzusetzenden Protein-Lösung verwendet (800 pmol pro 100  $\mu\text{l}$  Magnetkugeln-Suspension). In drei Durchgängen der Selektion (dem sogenannten *Biopanning*) wurde eine kommerziell erhältliche Phagen-Peptid-Bibliothek (*PhD7 – Phage Display Peptide Library*,  $2 \cdot 10^{13}$  pfu/ml) mit jenen Strukturen darin angereichert, die eine starke Affinität zum Zielprotein DESC-1 aufwiesen. Dazu wird dieses an einer festen Phase (magnetische Kügelchen) fixiert und anschließend mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Dabei binden passende Peptide an das immobilisierte DESC-1, daher handelt es sich hier um eine positive Auslese. Es folgen intensive Waschschrte, die schwache oder unspezifische Bindungen auflösen und alle ungebundenen Strukturen aus dem Gemisch entfernen. Lediglich solche Peptide, die eine Bindung zur Zielstruktur aufbauen können, bleiben somit an der festen Phase vorhanden. Schließlich werden diese Verbindungen vom Trägermaterial abgespalten und für die nächsten Schritte als neue Bibliothek aufgefangen.

Mittels eines Titrationsverfahrens ließ sich die Menge der so selektionierten Phagen erhalten: *E. coli* Bakterien wurden mit verschiedenen Mengen einer Verdünnungsreihe der Phagen-Peptide behandelt, ausplattiert und die entstandenen Kolonien in Bezug auf die Peptid-Probe ausgewertet. Die Anzahl der Kolonien ergab mit dem Verdünnungsfaktor den pfu-Wert einer Probe. Vor dem nächsten Durchgang wurden die erhaltenen Phagen zunächst amplifiziert und dann als neue Bibliothek für den folgenden Selektionsschritt eingesetzt. Da der Anteil an spezifisch bindenden Peptiden somit in jedem Durchgang des *Biopannings* steigen sollte, sollte sich entsprechend auch die hier ermittelte Konzentration an bindenden Phagen erhöhen. (Tab. 1)

**Tabelle 1:** Durchgänge der positiven Selektion im Phagen-Display

Bibliothek	Eingesetzte Menge	Titration	Titration nach Amplifikation	
2*10 <sup>13</sup> pfu/ml	4*10 <sup>11</sup> pfu	4 pfu/μl	1.2*10 <sup>12</sup> pfu/μl	→ Bibliothek 2
Bibliothek 2	4*10 <sup>12</sup> pfu	12 pfu/μl	1*10 <sup>10</sup> pfu/μl	→ Bibliothek 3
Bibliothek 3	4*10 <sup>11</sup> pfu	79 pfu/μl		→ <b>Bibliothek 4</b>

Zur Auswertung wurde die dritte so erhaltene, angereicherte Bibliothek (Bibliothek 4) letztendlich durch Sequenzierung von 282 aufbereiteten Bakterienkolonien charakterisiert. Jede dieser Kolonien beinhaltet eine der Phagen, die jeweils wiederum genau ein spezifisches Peptid exprimieren und nach außen darstellen. Da die Synthese der Peptide im genetischen Code der Phagen verankert ist, kann durch die Sequenzierung der DNA eine statistische Verteilung über die in der Bibliothek vorhandenen Sequenzen und die exprimierten Peptide gegeben werden. (Abb. 59) Dabei gilt dann, umso größer der Anteil einer bestimmten Sequenz, umso stärker war die Bindung des entsprechenden Peptids zum Zielprotein und umso vielversprechender ist dieses somit für weiterführende Experimente. Das erhaltene Diagramm zeigt, dass eine Struktur (IPDWHYPQ) mit fast 50 % deutlich die Mehrheit der bestimmten Sequenzen ausmacht. Außerdem sind zwei weitere Sequenzen (AGHVPR und MPRLPPA) mit über 10 % vertreten, während die meisten anderen eher nur vereinzelt auftreten. Bei der Analyse dieser Sequenzen wird allerdings leider ersichtlich, dass es sich einerseits um eine Streptavidin-bindende Struktur sowie andererseits um zwei positiv geladene Peptide handelt. Es stellte sich nachträglich heraus, dass im vorliegenden Experiment die verwendete feste Phase nicht auf die N-His-Markierung des Zielproteins abgestimmt war. Da Polyhistidin an Ni<sup>2+</sup>- oder Co<sup>2+</sup>-Ionen bindet, wäre beispielsweise ein Nickel-Chelatkomplex (wie Nickel-Nitrioltriessigsäure) passend gewesen. Stattdessen wies die feste Phase Streptavidin als Bindungsstelle vor, für die als sehr affiner Partner eine Biotin-Markierung am Protein nötig gewesen wäre. Daher wurden in der durchgeführten Auslese hauptsächlich Peptide angereichert und identifiziert, die selbst eine hohe Affinität zu Streptavidin oder der Oberfläche der festen Phase aufwiesen. Um das gewünschte Ergebnis zu erhalten, muss das Experiment also nach dem beschriebenen



**Abbildung 59: Statistische Verteilung der Peptid-Sequenzen in der angereicherten Phagen-Bibliothek.** Die Analyse der aus dem Phagen-Display erhaltenen Bibliothek erfolgte mittels Sequenzierung der DNA von 282 Phagen-infizierten Bakterienkolonien. Daraus ergibt sich eine statistische Verteilung der in der Bibliothek vorhandenen Peptid-Sequenzen, die abhängig von der Affinität zwischen Peptid und Zielstruktur an der festen Phase ist. Bei den drei häufigsten Sequenzen handelt es sich um ein Streptavidin-bindendes Peptid (IPDWHPQ) sowie um zwei positiv geladene Sequenzen (AGHVVPR und MPRLPPA).

Verfahren und entweder mit einer anderen festen Phasen oder einer anderen Markierung am Zielprotein erneut durchgeführt werden. In der Weiterführung des Projektes soll daher ein Kobalt-basierter Ligand (vierzähliger Metall-Chelator) zum Einsatz kommen und gegebenenfalls auch die verwendete Menge der Zielstruktur noch weiter erhöht werden.

Darauffolgende Schritte würden den Einsatz von bis zu fünf Kandidaten in *in vitro*-Versuchen vorsehen. Dazu würden HSAEpC, zunächst in Transwell®-Filtern und anschließend im fluidischen Chip-Modell der Kleinen Atemwege, wie zuvor dargestellt mit den Peptiden inkubiert werden, um den Einfluss auf die Infektion mit Influenza-Viren zu überprüfen. Kann hier tatsächlich die gewünschte Inhibierung der Viren-Infektion beobachtet werden, könnte die Etablierung als potentieller Wirkstoff weitergeführt werden.



## 5. Diskussion

In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die standardmäßig eingesetzten Testsysteme zur Evaluierung von Substanzen und Wirkstoffen oft nicht ausreichend zuverlässig sind. Nur so ist es zu erklären, dass es bei der Medikamentenentwicklung selbst nach jahrelangen Untersuchungen in *in vitro*-Systemen sowie in Tiermodellen zu hohen Misserfolgsquoten um 90 % während der klinischen Phasen kommt.<sup>18, 20, 21</sup> Gründe dafür sind einerseits ausbleibende Effizienz sowie andererseits das Auftreten unerwarteter Nebenwirkungen, was im schlimmsten Fall zu schweren Schädigungen der Probanden führen kann.<sup>22, 23</sup> Zwar wird in den durchgeführten Studien die Interaktion der untersuchten Substanzen mit menschlichem Material *in vitro* simuliert, jedoch kann durch einzelne Zelllinien und –schichten die humane Physiologie nicht korrekt und vollständig abgebildet werden. Ebenso werden *in vivo* ausführliche ADME-Tox Untersuchungen (Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion und Toxizität) durchgeführt, jedoch erlauben die jeweiligen spezie-spezifischen Eigenheiten auch hier keine einfache Übertragung der Erkenntnisse aus dem Tiermodell auf den menschlichen Organismus.<sup>15, 16, 25, 35</sup> Wie von A. C. Ericsson *et al.* (2013) dargestellt, beruht der Einsatz von Tieren als Modell für den Menschen, welcher bereits auf eine lange Geschichte zurückblicken kann, auf der Annahme von vergleichbaren anatomischen, physiologischen und Verhaltenseigenschaften sowie weiterer gemeinsamer Charakteristiken.<sup>28</sup> In vielen Beobachtungen hat sich dieser Vergleich auch bereits als lohnend erwiesen. Schließlich konnten über das letzte Jahrhundert hinweg viele Medikamente erfolgreich im Tiermodell getestet und anschließend zugelassen oder durch gezielte genetische Manipulation an Versuchstieren, speziell an Mäusen, weiterentwickelt werden. Jedoch sind aus der Forschung inzwischen ebenso die unbestreitbaren Unterschiede durch Evolution und Entwicklung der Spezies bekannt, die verschiedenen Genexpressionen, Genregulierung und die Epigenetik, auch deutlich erkennbar aus den komparativen Genomik-Untersuchungen. Dies nennen N. Shanks *et al.* (2009) als einige der Gründe, warum Vorhersagen aus dem Tiermodell für Toxikologie und Pathophysiologie im Menschen nur begrenzt möglich sind.<sup>36</sup> Beim Ansetzen von *in vivo*-Studien muss daher stets die jeweilige Relevanz der eingesetzten Spezies beachtet werden sowie die individuellen Übereinstimmungen und Unterschiede des Organismus von Tier und Mensch. R. A. Ettl *et al.* (2010) führen auf, dass für den jeweiligen Teil der humanen Physiologie, der von Interesse ist, verschiedene Tiermodelle jeweils unterschiedlich gut geeignet sind.<sup>232, 233</sup> Ebenso können auftretende Nebenwirkungen sehr unterschiedlich gedeutet werden, so dass sie beispielsweise für den Menschen bedeutungslos sind, oder aber gravierend während sie im Tier marginal erscheinen. Das Mausmodell in der präklinischen Phase zur Evaluierung von Chemotherapeutika wird von C. P. Day *et al.* (2015) ausführlich diskutiert und dabei vor allem auf die hohe anschließende Fehlerquote in weiterführenden Studien hingewiesen.<sup>234</sup> Nur etwa 5 % der dort positiv getesteten Wirkstoffe sind anschließend in der klinischen Phase erfolgreich. Dies liegt sogar noch unter der mit knapp 10 % generell niedrigen Erfolgsquote von Wirkstoffen in klinischen Studien.<sup>18-21</sup> Die Verfehlung beim Vertrauen in dieses Modell wird durch die Tatsache erkennbar, dass in der Maus inzwischen nahezu jede Art von Tumor geheilt werden kann,



während das bei Krebserkrankungen von Menschen nicht der Fall ist. Dies macht die Dringlichkeit des Einsatzes neuer, verbesserter Modelle deutlich.<sup>234, 235</sup>

Erstrebenswert ist dabei vor allem eine verbesserte *in vitro*-Simulation mit humanen Zellen und Geweben, denn bei den hier herkömmlich verwendeten Systemen ist noch deutliches Potential nach oben. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, wie weit die Erkenntnisse aus einem einfachen Zellkultur-Modell und jene aus einer *in vivo*-Studie auseinander liegen können. Bei Versuchen mit Doxorubicin-gefüllten, nanoskaligen AIO(OH) Hohlkugeln, die für den Einsatz als Wirkstofftransporter konzipiert wurden, zeigte sich in klassischen Zytotoxizitätsstudien nur ein mäßiger Erfolg des Konzepts gegenüber dem freien Wirkstoff. Zwar fand eine Aufnahme der Transporter statt, der angestrebte verbesserte Wirkeffekt durch die Akkumulation des Wirkstoffs blieb aber aus. Eine *in vivo*-Studie hingegen zeigte überraschender Weise eine erhöhte therapeutische Wirkung bei der Inhibierung von Tumorwachstum sowie der Hemmung einer Metastasierung. Für eine bessere Prognose vor dem Tierversuch wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine Evaluierung fortschrittlicherer *in vitro*-Modelle zur Testung von Wirkstoffen durchgeführt. Dabei wurden Ansätze verfolgt, die im Forschungsgebiet der 3D Zellkultur und des *Tissue Engineering* aufgekommen sind, bei denen die Entwicklung neuartiger *in vitro*-Modelle zur Nachbildung organspezifischer Gewebe und Rekonstruktion von Organen im Fokus steht.<sup>37, 38</sup> Es wird angestrebt, durch eine *in vivo*-ähnliche Mikroumgebung ein natürliches Umfeld für Zellen zu schaffen und damit ein gewebespezifisches Verhalten bezüglich Morphologie, Genexpression, Differenzierung und Zell-Zell-Interaktion zu ermöglichen. Der Erfolg dieser Konzepte wurde bereits mehrfach aufgezeigt.<sup>76, 88, 199-203, 236</sup> Die entwickelten Systeme sollen durch den Einsatz humaner Zellen und Gewebe sowie genau regulierbare Versuchsbedingungen spezifischere Experimente und somit zuverlässigere Prognosen ermöglichen. Solche *in vitro*-Modelle bestehen aus verschiedenen komplexen Kulturen beispielsweise durch die organotypische Kombination unterschiedlicher Zelltypen, durch die dreidimensionale Anordnung der Zellen und den Einsatz von Hydrogelen oder durch dynamische Systeme für miniaturisierte Geweberekonstruktionen, die sogenannten *Organ-on-a-Chip*-Modelle. Dabei ermöglichen sie nicht nur eine fortschrittliche Wirkstoff-Testung, sondern können wie in dieser Arbeit durch das Modell der Kleinen Atemwege dargestellt, auch als Modell von Krankheitsverläufen oder von Beginn an zur gezielten Entwicklung von Wirkstoffen eingesetzt werden.<sup>205, 207, 209, 211, 216, 237</sup>

So gelang es dann für die Dox@AIO(OH) Nanopartikel mithilfe des *vasQchips* als mikrofluidischem Modell eines Blutgefäßes den transendothelialen Transport aus dem Mediumfluss über die Endothelschicht in eine angrenzende Ko-Kultur zu verfolgen und zu untersuchen. Durch den spezifischen Aufbau des *vasQchips* mit dem halbrunden, porösen Kanal zur Etablierung der Endothelzellen ist es möglich, ein *in vivo*-ähnliches Verhalten dieser Zellen zu erhalten.<sup>74, 91, 92</sup> Aufgrund der Kultivierung in der dreidimensionalen und dynamischen Umgebung passen die Endothelzellen ihre Morphologie, Proliferation und ihr Expressionsverhalten an. Dadurch waren sie im Gegensatz zu anderen experimentellen Aufbauten dazu in der Lage, den verabreichten Wirkstofftransporter, ohne eine Einlagerung in den Zellen selbst, transendothelial weiterzugeben, woraufhin er in der anliegenden Ko-Kultur quantitativ aufgenommen wurde.



Dabei war durch den Einsatz des Transportsystems gegenüber des frei diffundierenden Wirkstoffs Doxorubicin ein erhöhtes Signal in der Ko-Kultur auszumachen. Desweiteren wurde für dieses System die Viabilität der verschiedenen Zellen quantifiziert, was vor allem für die Endothelzellen von großem Interesse war. Wie aus den mikroskopischen Aufnahmen bereits zu vermuten war, blieben die Endothelzellen durch den transendothelialen Transport der Dox@AIO(OH) Nanopartikel unbeeinträchtigt, da neben diesem Transport keine Akkumulation in den Zellen stattfand. In anderen Systemen wie zweidimensionalen Zellkulturplatten oder in Transwell®-Filtern hingegen induzierten die Dox@AIO(OH) Nanopartikel eine deutliche Reduktion der Viabilität des Endothels. Im Transwell®-System zeigte sich, trotz des Aufbaus aus einer Ko-Kultur von Endothel und Tumorkultur in zwei Kammern, eine Akkumulation der Wirkstoffe in den Endothelzellen und nur ein geringer transendothelialer Transport in das darunter liegende Kompartiment. Dies ist erneut ein Indiz dafür, dass nicht nur die räumliche Anordnung, sondern vielmehr auch die dynamische Umgebung ausschlaggebend für eine gewebeähnliche Kultivierung der Zellen ist: Auf der planaren Fläche des Transwell®-Filters und ohne die durch die Fluidik herrschenden Scherkräfte kann die natürliche Differenzierung der Endothelzellen nicht wie im Blutgefäß stattfinden. Somit empfiehlt sich der *vasQchip* für einen Einsatz bei der Untersuchung transendothelialer (Transport-) Vorgänge sowie für Interaktionen zwischen dem Blutgefäß und anderen angrenzenden Geweben.

Neben diesen fortschrittlichen *Organ-on-a-Chip*-Modellen gibt es, wie oben erwähnt, aber bereits auch einfachere Methoden die Kultivierungsbedingungen von Zellen *in vitro* zu modifizieren, um eine natürlichere Umgebung und damit ein natürlicheres Verhalten zu erzeugen. Dazu kann beispielsweise eine dreidimensionale Anordnung oder die Kultivierung mit einer umgebenden Matrix angewandt werden. Wie dargestellt, ist eine einfache, aber effiziente Methode die Erzeugung von Sphäroid-Kulturen als ein verbessertes Modell von Tumorgewebe *in vitro* im Gegensatz zu planaren Zellschichten. Aufgrund des engen Zellverbands und des hypoxischen Gradienten zum Zentrum des Sphäroids hin werden diese gern eingesetzt, um avaskuläre Tumorregionen zu simulieren.<sup>59, 238</sup> Solche Sphäroide wurden bei der Charakterisierung von photoaktivierbaren anorganisch-organischen  $Gd_4^{3+}[AlPCS_4]_3^{4-}$  Hybrid-Nanopartikeln eingesetzt. Diese sind potenziell für den Einsatz in der „Photodynamischen Therapie“ (PDT) geeignet und sollen somit durch eine Bestrahlung gezielt Tumorgewebe zerstören. Sie vereinen dabei die gute Dispergierbarkeit von metallischen Nanopartikeln in wässrigen Lösungen mit der niederenergetischen Anregungswellenlänge der organischen Photosensibilisatoren im roten Spektrum. Die Nachteile der jeweiligen Komponenten, darunter die hochenergetische Aktivierung oder die geringe Biokompatibilität wie beispielsweise von L. Cheng *et al.* (2014) und K. Ishii (2012) beschrieben, können somit umgangen werden.<sup>144, 151</sup> Bereits mit einzelnen Zellen hat sich gezeigt, dass die  $Gd_4^{3+}[AlPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel intrazellulär aufgenommen und durch Belichtung aktiviert werden konnten, während bei Dunkelheit eine gute Biokompatibilität vorlag. Um nun die Anwendung in der PDT konkreter zu simulieren, wurde einerseits der phototoxische Effekt auf dreidimensionale Zellverbände sowie andererseits der Einfluss auf die Fähigkeit von Endothelzellen zur Angiogenese untersucht. Es wurden Sphäroid-Kulturen mit den Nanopartikeln behandelt, deren Internalisierung in den Zellverband sowie die Wirkung mit und ohne Belichtung untersucht. Dabei zeigte sich eindrücklich,





dass die Nanopartikel durch eine Photoaktivierung in der Lage sind, den homogenen Zellverband aufzulösen, sowie eine Nekrose bzw. Apoptose der Zellen einzuleiten. Dies ist im Falle der Tumorbekämpfung sehr erstrebenswert, um auch in die inneren Bereiche des Tumorgewebes vordringen zu können. Die Biokompatibilität in der Dunkelheit blieb erhalten. Der zur Kontrolle eingesetzte, rein organische Photosensibilisator konnte diese zytotoxische Wirkung auf den Sphäroid nicht erzielen: Hier blieb der Zellverband bei beiden Bedingungen intakt. Als weiteres Zellkultur-Modell kann durch eine Mischung von EZM-Proteinen *in vitro* auch das Angiogenese-Verhalten von Endothelzellen angeregt und simuliert werden.<sup>239</sup> Dies war von Interesse, da das Wachstum von kanzerogenem Gewebe mit der Neubildung von Blutgefäßen einhergeht, welche manchmal aber durch Therapien sogar noch induziert werden kann.<sup>154</sup> Eine aktive Hemmung der Angiogenese ist für eine effiziente Therapie deshalb von großem Vorteil.<sup>155</sup> Im *in vitro*-Modell konnte gezeigt werden, dass die  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel bei Photoaktivierung das netzförmige Wachstum und die Ausrichtung der Endothelzellen inhibieren. Somit wird das natürliche Wachstumsverhalten durch die Behandlung unterbunden. Auch bei der Kontrolle mit dem Photosensibilisator  $H_4AIPCS_4$  ist diese Wirkung zu beobachten, allerdings unabhängig von einer Belichtung. Dies ist für den Einsatz eines photoaktivierbaren Wirkstoffs jedoch nachteilig, da das nicht-induzierte und damit unkontrollierte Auftreten von toxischer Aktivität zu Nebenwirkungen und ungewünschten Begleiterscheinungen führen kann, wie sie in der PDT bekannt sind und in verschiedenen Studien beschrieben wurden, etwa von S. H. Ibbotson *et al.* (2011).<sup>134-136, 240</sup> Auf diese Weise ließ sich das Potential der photoaktiven  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Hybrid-Nanopartikel bezüglich ihrer Wirkungsweise in biologischen Systemen bereits gut einordnen. Die vielversprechende und selektive photoinduzierbare Aktivität gegenüber der Kontrolle, vor allem in den weiterentwickelten Zellkultur-Modellen, spricht für eine Übertragung und weitergehende Untersuchung in komplexeren Testsystemen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Erweiterung und Verbesserung von *in vitro*-Modellen auf Basis menschlicher Zellen einen großen Mehrwert in der Evaluierung von Substanzen und Wirkstoffen bieten kann. Die angewandten Systeme sollten dabei stets auf die benötigten Untersuchungen abgestimmt sein und können an Komplexität aufeinander aufbauen. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Bildung spezifischer Mikroumgebungen ein natürlicheres Verhalten von Zellen in Kultur ermöglicht wird. Durch die somit verbesserten Bedingungen ähnelt das Verhalten der Zellen mehr dem, das auch in Geweben vorzufinden ist, und erlaubt damit aussagekräftigere Analysen und eine verbesserte Übertragbarkeit der ermittelten Beobachtungen auf den menschlichen Organismus. Noch sind die *Organ-on-a-Chip*- und andere 3D *in vitro*-Systeme entfernt von einem standardmäßigen Einsatz in der strikten Evaluierung von Substanzen und der Medikamentenentwicklung. Aber schon jetzt darf in der Testung von kosmetischen Produkten nicht mehr auf das Tiermodell zurückgegriffen werden, so dass der dringende Bedarf an Alternativen bereits gegeben ist.<sup>241-243</sup> Das *Tissue Engineering* ist noch immer ein wachsendes Forschungsfeld und bietet Entwicklungen in alle Richtungen. Mit dem *vasQchip* konnte hier, wie gezeigt wurde, ein Modell hinzugefügt werden, das die naturnahe Abbildung einer vaskulären Struktur *in vitro* ermöglicht und für Studien zum transendothelialen Transport geeignet ist. Durch die Weiterent-



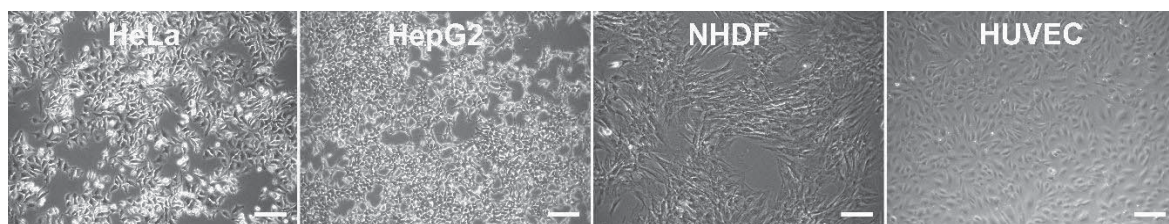
---

wicklung der Ko-Kultur, beispielsweise wie gezeigt mit Bindegewebe, weiterer Vaskularisierung und der Einbettung von Tumorgeweben, bieten sich viele weitere Möglichkeiten zur Anpassung und Steigerung der Komplexität des Versuchsaufbaus und zur Anwendung in genaueren Studien zu Wirkstoff-Aufnahme, -Funktion und transendotheliale Transport. Gerade für komplexere Wirkstoff-Systeme, wie die vorgestellten nanoskaligen Hohlkugeln als Wirkstofftransporter oder die photoaktiven Hybrid-Nanopartikel, sind fortschrittliche *in vitro*-Testsysteme unerlässlich für eine richtige Einordnung ihres jeweiligen therapeutischen Potentials. Durch weitere Evaluierungen und Fortschritte im *Tissue Engineering* werden die *Organ-on-a-Chip*-Systeme sowie weitere komplexe *in vitro*-Modelle immer breiteren Einsatz finden und sich in vielen Gebieten zu Standard-Systemen entwickeln.

## 6. Methoden

### 6.1. Zellkultur

Für die Kultivierung wurden alle verwendeten Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) oder Zellkulturschalen (Ø 100 mm) in zellspezifischem Medium ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. (Abb. 60) Das Passagieren der ausschließlich adhärennten Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 80 bis 90 %, wodurch die Passage der primären Zellen steigt. Das Ablösen der adhärennten Zellen wurde mit der Enzym-Lösung Trypsin-EDTA bei 37 °C durchgeführt. Trypsin zählt zur Enzymklasse der Peptidasen und spaltet Proteine selektiv nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Als Serinprotease besitzt es im aktiven Zentrum, der katalytischen Triade, in dem die Hydrolyse von Proteinen stattfindet, die Aminosäure Serin.<sup>244</sup> Bei kurzer Einwirkzeit werden Zellen durch diesen enzymatischen Verdau nicht geschädigt, sondern lediglich die extrazellulären Proteine, welche die Bindung an die Umgebung herstellen, gelöst. Der Komplexbildner EDTA ist der Enzymlösung zugesetzt, um eine Hemmung der Enzymaktivität durch freie Ionen zu vermeiden. Zur längeren Aufbewahrung wurden mindestens 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Einfriermedium (50 % FBS, 40 % zellspezifisches Medium, 10 % DMSO) aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in einer Einfrierbox auf -80 °C gekühlt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Zur erneuten Verwendung der Zellen wurde die Probe zügig aufgetaut und komplett im vorgewärmten Medium einer neuen Zellkulturflasche oder -schale aufgenommen. Nach 3 h (primäre Zellen) bzw. nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um DMSO-Reste zu entfernen. Durch den Einfriervorgang erhöht sich die Passage der Zelllinie.



**Abbildung 60: Kultivierung der verschiedenen Zelltypen.** HeLa-, HepG2-Zellen, NHDF und HUVEC wurden adhärennt in Zellkulturflaschen oder -schalen kultiviert. Hellfeld-Aufnahmen, Maßstab 150 µm

#### HUVEC

Die primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) wurden im Wachstumsmedium EGM-2 kultiviert, welches sich aus dem Basalmedium EBM-2 sowie ergänzenden Wachstumsfaktoren (hFGFb, hVEGF, R3-IGF-1, hEGF), Zytokinen (Hydrocortison, Ascorbinsäure, Heparin) und weiteren Zusätzen (GA-1000, FBS) zusammensetzt. Zum Passagieren wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellschicht zweimal schonend mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA (0,5 ml in 1,5 ml DPBS<sup>-/-</sup>) für etwa 3 min bei 37 °C abgelöst und die Trypsinierung



dann durch Zugabe von 2 ml Trypsininhibitor (90 % DPBS<sup>-/-</sup>, 10 % FBS) abgestoppt. Die Zellkulturflasche oder -schale wurde mit weiteren 4 ml DPBS<sup>-/-</sup> gespült und die Zellsuspension anschließend bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und der gewünschte Anteil (1:2 oder 1:3) in zuvor im Inkubator äquibriertes Medium neu ausgesät. Bei längerer Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel nach 2-3 Tagen.

### HeLa, HepG2, NHDF

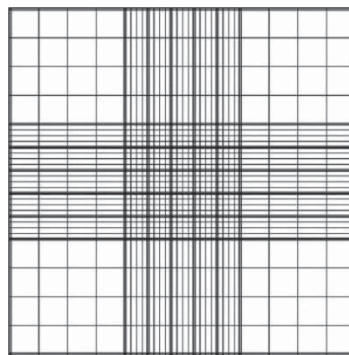
Die kanzerogenen Zelllinien aus humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa) und eines Leberkarzinoms (HepG2) sowie die primären humanen Fibroblasten der Haut (NHDF, *normal human dermal fibroblasts*) wurden im Standard-Zellkulturmedium DMEM unter Zusatz von 10 % FBS und 1 % Penicillin/ Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgenommen, mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und für 3-5 min bei 37 °C mit 1 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Trypsinierung durch mindestens das gleiche Volumen Medium abgestoppt und mehrfach resuspendiert. Der gewünschte Anteil der Zellsuspension (meist 1:3, 1:5 oder 1:10) wurde in zuvor im Inkubator äquibriertes Medium neu ausgesät, der Rest verworfen. Bei längerer Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel nach 2-3 Tagen.

### HSAEpC

Die primären humanen Epithelzellen der Lunge (HSAEpC, *human small airway epithelium cells*) wurden ausschließlich in Passage 1 eingesetzt. Verwendet wurde als Pre-ALI-Medium das Wachstumsmedium SAGM, bestehend aus dem Basalmedium SABM und den (Wachstums-) Zusätzen BPE, Hydrocortison, hEGF, Epinephrin, Transferrin, Insulin, Retinsäure, Triiodothyronin, Genatmicin/ Amphotericin-B, BSA-FAF sowie zusätzlich 1 % Penicillin/ Streptomycin. Zum Auftauen wurde das gefrorene Zellpellet in das zuvor im Inkubator äquibrierte Medium in einer Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgesät, einen Tag kultiviert und dann das Medium ausgewechselt. Anschließend wurde jeden zweiten Tag die Hälfte des Mediums ersetzt bis eine Konfluenz der Zellschicht von 60 bis 70 % erreicht war. Daraufhin konnte die Zellschicht mit 5 ml Trypsin-EDTA, inkubiert für zweimal 3 min bei 37 °C und abgestoppt mit 10 ml Medium, in Suspension gebracht werden. Diese wurde für 5 min bei 200 g zentrifugiert, das Zellpellet im benötigten Volumen Medium resuspendiert und die Zellen schließlich im gewünschten Versuchsaufbau ausgesät. Nach 3 bis 6 h erfolgte ein Mediumwechsel zum ALI-Medium, das zu je 50 % aus DMEM Low Glucose und SABM sowie aus den Zusätzen BPE, Hydrocortison, hEGF, Epinephrin, Transferrin, Insulin, Triiodothyronin, Genatmicin/ Amphotericin-B und zusätzlich 1,5 mg/ml BSA besteht. Außerdem wurde zum jeweils benutzen Volumen 0,015 mg/ml Retinsäure frisch hinzugegeben. Nach 3 bis 4 Tagen konnte mit den Zellen typischerweise an die Grenzfläche zur Luft (ALI, *air-liquid interface*) übergegangen werden. Bis zur Differenzierung und weiteren Kultivierung der Zellen wurde das Medium alle 1 bis 2 Tage ausgetauscht sowie die Zellschicht wöchentlich für 10 min mit Medium gewaschen.

### Zellen aussäen

Um die für ein Experiment benötigten Zellen auszusäen, wurden diese wie beschrieben homogen in Suspension gebracht und die Zelldichte mithilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. (Abb. 61) Dazu wurden am Lichtmikroskop die Zellen in den vier Eckquadranten des 3x3-Gitters ausgezählt und der Mittelwert mit dem Faktor  $10^4/\text{ml}$  ergänzt, um die gesuchte Zelldichte zu erhalten. Zusätzlich kann dabei eine Färbung mit Trypanblau vorgenommen werden, durch die geschädigte Zellen kenntlich gemacht werden. Dazu wurde die zum Auszählen verwendete Zellsuspension 1:1 mit der Trypanblau-Lösung vermengt, woraufhin der Farbstoff geschädigte Zellen durch dunkelblaue Färbung markiert, während intakte Zellen diesen nicht aufnehmen und somit farblos bleiben. Somit konnte schließlich aus der Suspension die gewünschte Zellzahl entnommen oder eine Suspension benötigter Zelldichte hergestellt werden.



© LO Laboroptik

**Abbildung 61:** Schema einer Zählkammer nach Neubauer.<sup>245</sup> Mithilfe des festen Volumens über dem dargestellten Gitter und dessen Flächen kann die Zelldichte einer Suspension bestimmt werden.

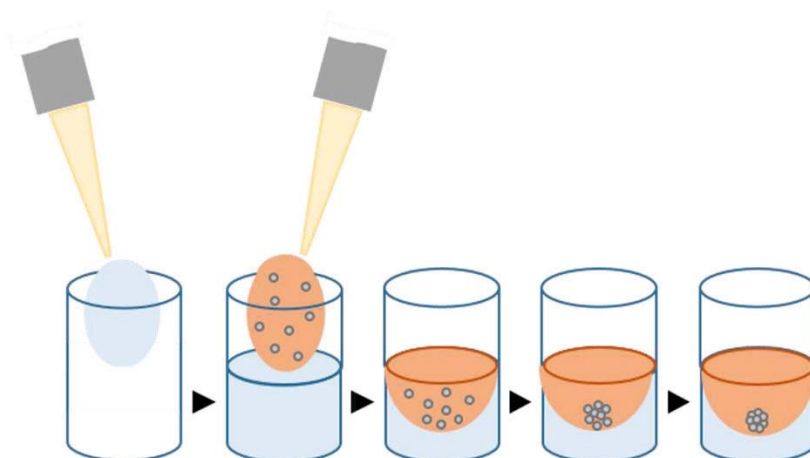
#### 6.1.1. Untersuchung zur Angiogenese

Eine Studie zur Angiogenese gab Aufschluss über die Bildung von Mikrokapillaren durch Endothelzellen unter verschiedenen Bedingungen. Dazu wurden zunächst die zur Mikroskopie geeigneten *μslides* mit 60  $\mu\text{l}$  pro Kammer Geltrex® (gebrauchsfertige, Wachstumsfaktoren-reduzierte Basalmembran-Matrix, RGF-BME) beschichtet und inkubiert. Anschließend wurden  $4 \cdot 10^4$  HUVEC in 150  $\mu\text{l}$  Medium pro Kammer auf dem Geltrex® ausgesät und gleichzeitig mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}_4^{3+}[\text{AlPCS}_4]_3^{4-}$  Nanopartikel-Suspension bzw.  $\text{H}_4\text{AlPCS}_4$ -Lösung behandelt. Da eine Angiogenese ab 4 h nach dem Aussäen erwartet wird, wurde ein Teil der Proben vor diesem Zeitpunkt belichtet: 1 h und 3 h nach Beginn der Inkubation wurde die Belichtung für jeweils 10 min durch Scans bei 670 nm am N-IR Scanning Mikroskop durchgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  CellTracker™ Green für 30 min gefärbt, mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und schließlich am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Unterschieden wurde zwischen behandelten und unbehandelten, sowie belichteten und unbelichteten Proben.



### 6.1.2. Sphäroide

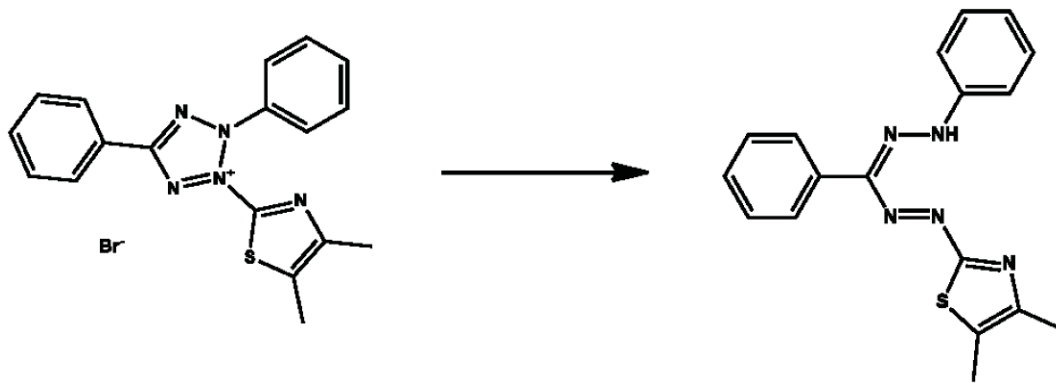
Die Kultivierung von Sphäroiden erfolgte entweder durch spezielle *hanging drop plates* oder mittels Agarose-beschichteter 96er-Zellkulturplatten (50  $\mu$ l 1,5 %ige Agarose pro Kammer). (Abb. 62) Die benötigten Zellen wurden wie beschrieben in Suspension gebracht und in definierten Zellzahlen von 250 bis 4.000 Zellen in 40  $\mu$ l bzw. 100  $\mu$ l Medium in die jeweiligen Platten ausgesät. Zur Vermeidung von Evaporation der kleinen Volumina dienten DPBS<sup>-/-</sup>-Reservoirs auf den Platten. Durch Gravitationskräfte und das Fehlen einer Adhäsionsfläche sammeln sich die Zellen am tiefsten Punkt im Medium und binden aneinander. Das so entstehende kugelförmige Zellaggregat entwickelt sich über 2-5 Kultivierungstage zu einem abgeschlossenen Verbund, einem sogenannten Sphäroid. Diese können anschließend in andere Versuchssysteme überführt werden.



**Abbildung 62: Kultivierung von Sphäroiden** (nach Sigma-Aldrich<sup>246</sup>). Eine 96er-Zellkulturplatte wird zunächst mit Agarose beschichtet, welche beim Verfestigen eine konische Oberfläche bildet. Anschließend wird die Zellsuspension hinzugefügt und über mehrere Tage kultiviert. Die Zellen setzen sich am tiefsten Punkt ab, können aber nicht auf der Agarose anwachsen, so dass sie Zellaggregate und schließlich Sphäroide ausbilden.

### 6.1.3. Zytotoxizitätsstudie mit MTT

Um das zytotoxische Potential von Substanzen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Konzentration, den LD<sub>50</sub> Wert, zu bestimmen, eignet sich die Durchführung eines Zytotoxizitätstests mit MTT-Reagenz und optischer Auswertung. Dieser Test basiert auf der Enzymaktivität in den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen, durch welche das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zu einem violetten Formazan reduziert wird. (Abb. 63) Dieses kann photometrisch quantifiziert werden, wobei die gemessene Absorption durch Formazan direkt proportional zum Anteil vitaler Zellen jeder Probe ist. Zur Durchführung wurden pro Kammer einer 96er-Zellkulturplatte 10<sup>4</sup> Zellen in 100  $\mu$ l ausgesät und inkubiert. Durch einen Mediumwechsel konnten die gewünschten Proben zugegeben und für 24, 48 oder 75 h auf die Zellen einwirken. Um eine Phototoxizität zu erzeugen, wurden die



**Abbildung 63: Reaktion des MTT-Reagenzes.** Durch enzymatische Aktivität wird das gelbe Tetrazoliumsalz zum violetten Formazan umgewandelt. Diese Reaktion ist photometrisch nachzuverfolgen und gibt Aufschluss über die Viabilität der untersuchten Zellen.

mit  $\text{Gd}_4^{3+}[\text{AIPCS}_4]_3^{4-}$  Nanopartikel-Suspension und  $\text{H}_4\text{AIPCS}_4$ -Lösung behandelten Platten 2 h nach Zugabe außerdem für 2\*5 min durch Scans bei 670 nm am N-IR Scanning Mikroskop beleuchtet. Für die Auswertung wurden die Positiv-Kontrollen zunächst mit 5  $\mu\text{l}$  des Detergens Triton X-100 (20 %), welches die Zellen durch Permeabilisierung der Zellmembranen abtötet, behandelt und anschließend 15  $\mu\text{l}$  MTT-Reagenz in jede Kammer zugegeben. Nach 2-4 h Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer, welcher das gebildete Formazan in Lösung bringt, abgestoppt und die resultierende Absorption bei 595 nm am darauffolgenden Tag mittels Fluoreszenzleser ermittelt. Zur Evaluierung wurden die Messwerte in Korrelation zueinander gesetzt, wobei die Positivkontrolle als Nullwert und die unbehandelte Negativkontrolle als 100 % gesetzt wurden. Alle Proben lagen mindestens als Triplikate vor, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

#### 6.1.4. Wachstumskurve

Um ein geeignetes Medium für die gemeinsame Kultivierung verschiedener Zellen in einem System zu bestimmen, wurden über 7 Tage Wachstumskurven der verwendeten Zelltypen und deren Medien ermittelt. Dazu wurden HUVEC, HeLa, HepG2 und NHDF wie beschrieben in Suspension gebracht, abzentrifugiert und jeweils in den Medien EGM-2, DMEM und 1:1-EGM-2:DMEM mit einer Zelldichte von  $4 \cdot 10^4/\text{ml}$  resuspendiert. In einer 24er-Zellkulturplatte pro Zusammenstellung wurden mindestens 12 Kammern mit  $2 \cdot 10^4$  Zellen besiedelt und über Nacht inkubiert. Das Auszählen der Zellen erfolgte in Triplikaten, das heißt pro Tag wurde bei 3 Kammern pro Platte zunächst das Medium abgenommen, einmal mit  $\text{DPBS}^{-/-}$  gewaschen, 100  $\mu\text{l}$  Trypsin-EDTA zugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde jeweils fünfmal resuspendiert und das benötigte Volumen der Zellsuspension für 2 Zellzahl-Bestimmung mit der Neubauer-Zählkammer entnommen. Dies erfolgte an 4 aufeinanderfolgenden Tagen sowie zusätzlich an Tag 7 der Inkubation. Jeden zweiten Tag wurde das Medium der verbleibenden Kammern gewechselt. Aufgrund der steigenden Zelldichte wurde die Zellsuspension zum Auszählen ab Tag 4 mit  $\text{DPBS}^{-/-}$  verdünnt (auf 200  $\mu\text{l}$  bei HUVEC, auf 200  $\mu\text{l}$  bzw. 500  $\mu\text{l}$  an Tag



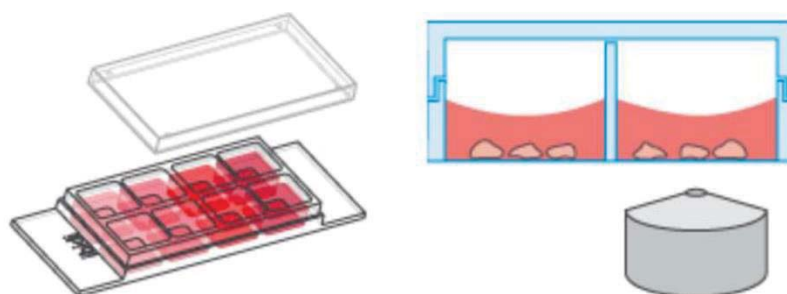
7 bei NHDF und auf 500  $\mu\text{l}$  bzw. 1 ml an Tag 7 bei HeLa und HepG2). Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und mit der Standardabweichung aufgetragen.

### Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aufgeführt. Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test ermittelt und alle Werte mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant erachtet.<sup>247</sup>

## 6.2. Konfokalmikroskopie

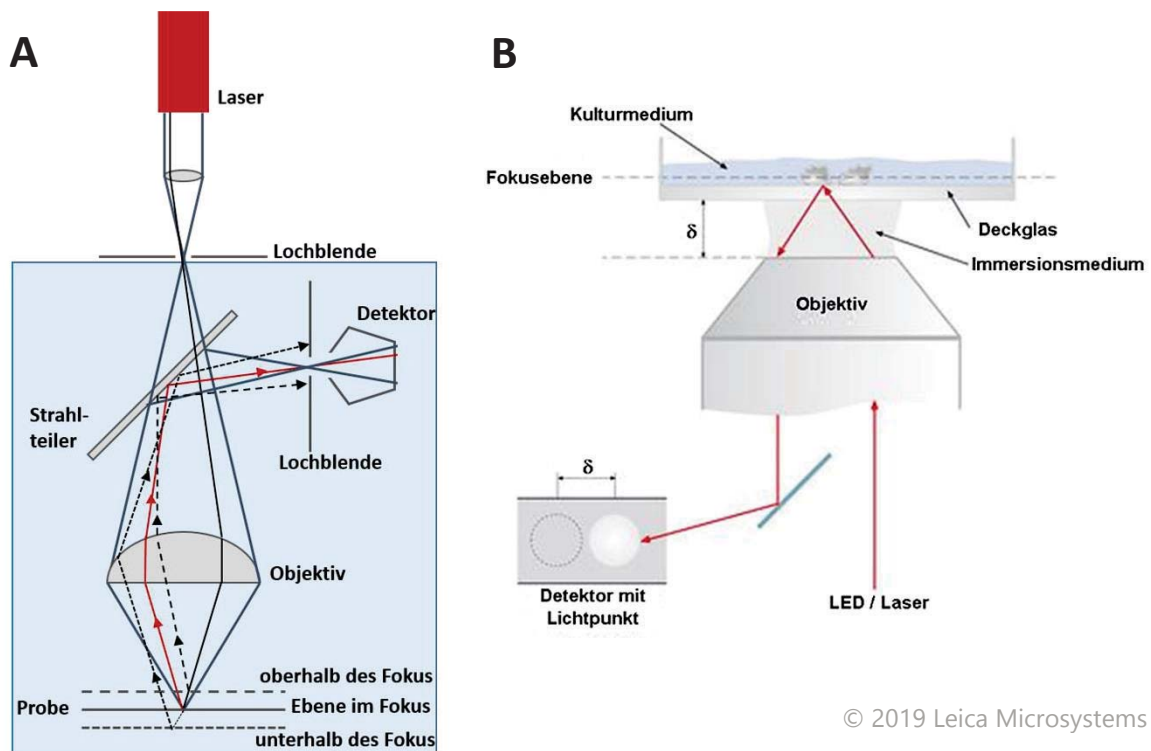
Für mikroskopische Lebendzellstudien wurden die Zellen auf  $\mu\text{slides}$  mit 8 Kammern mit einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^4$  in 200  $\mu\text{l}$  Medium pro Kammer ausgesät, inkubiert, behandelt und schließlich ausgewertet. Aufgrund ihres Aufbaus eignen sich  $\mu\text{slides}$  sowohl für die Kultivierung von Zellen, als auch für hochauflösende (Konfokal-)Mikroskopie mit einem inversen Mikroskopaufbau. (Abb. 64) Da die sterile Umgebung erhalten werden kann, eignen sich inverse Konfokalmikroskope besonders für die visuelle Darstellung und Analyse lebender Zellen. (Abb. 65) Das Objektiv befindet sich dabei unterhalb der Probe, so dass diese durch den Boden eines entsprechend geeigneten Objektträgers beobachtet werden kann, ohne dass ein Öffnen des Probehgefäßes nötig ist. Auch Konstruktionen oberhalb, wie der Aufbau des *vasQchips*, beeinflussen die Aufnahmen nicht. Ermöglicht werden sowohl hochaufgelöste Abbildungen einzelner Ebenen der Probe, als auch Serien innerhalb einer Probe in z-Richtung (z-Stapel) zur dreidimensionalen Darstellung und Untersuchung. Solche virtuellen Schnitte sind im Gegensatz zu herkömmlichen Lichtmikroskopen möglich, da beim konfokalen Lasermikroskop die Tiefenschärfe stark reduziert ist und somit ausschließlich eine Ebene scharf abgebildet wird. Das Prinzip beruht auf einer punktförmigen Lichtquelle, deren Licht durch eine Lochblende auf einen Punkt der Fokusebene trifft. Das dort vom Objekt ausgehende Licht (reflektiertes oder



COPYRIGHT © 2017 IBIDI GMBH.

**Abbildung 64: Schematischer Aufbau von  $\mu\text{slides}$**  (ibidi<sup>248</sup>). Das Konzept der  $\mu\text{slides}$  erlaubt die Kultivierung, die Behandlung sowie die hochauflösende inverse Mikroskopie von Zellen.





© 2019 Leica Microsystems

**Abbildung 65: Funktionsweise eines Konfokalmikroskops.** Die punktförmige Lichtquelle und der Strahlengang eines Konfokalmikroskops erlauben die Fokussierung auf genau eine Ebene der Probe, für welche durch Abrastern der Fläche ein Bild entsteht. (A) Der Aufbau eines inversen Mikroskops ermöglicht die Betrachtung einer Probe von unten durch den Objektträger aus entsprechend geeignetem Material. (B, nach Leica<sup>249</sup>)

**Tabelle 2: Grundeinstellungen an den Konfokalmikroskopen Leica TCS SP5 und SPE**

	Leica TCS SP5	Leica TCS SPE
Lochblende	1 Airy	
Auflösung	8 bit	
Format	1024*1024 px	
Geschwindigkeit	200 Hz	400 Hz
Laser	351 nm	405 nm
	364 nm	488 nm
	488 nm	532 nm
	561 nm	635 nm
	633 nm	

Fluoreszenzlicht) wird dann rückwärts über einen Strahlteiler durch eine Lochblende zum Detektor gelenkt. Detektionsfokus und Fokusebene des Objektivs liegen somit übereinander, also konfokal. Licht von außerhalb der Fokalebene, ebenso wie Streulicht, wird von der Lochblende blockiert. Um nicht nur einen Punkt sondern ein vollständiges Bild der Probe zu erhalten, wird diese rasterförmig untersucht und das Bild anschließend aus den einzelnen Punkten zusammengesetzt.<sup>250</sup> Zum Einsatz kamen die Konfokalmikroskope von Leica TCS SP5 Tandem

DMI6000 und TCS SPE DMI4000B mit 10er-, 20er- und 63er-Objektiven mit den aufgeführten Einstellungen (Tab. 2). Daneben wurde auch das (nicht-konfokale) Fluoreszenzmikroskop Leica DM IL LED verwendet. Bei der Aufnahme mehrerer Fluoreszenzsignale einer Probe wurde diese sequenziell angefertigt, um eine Überschneidung von Anregungs- und Emissionsbereichen zu vermeiden.

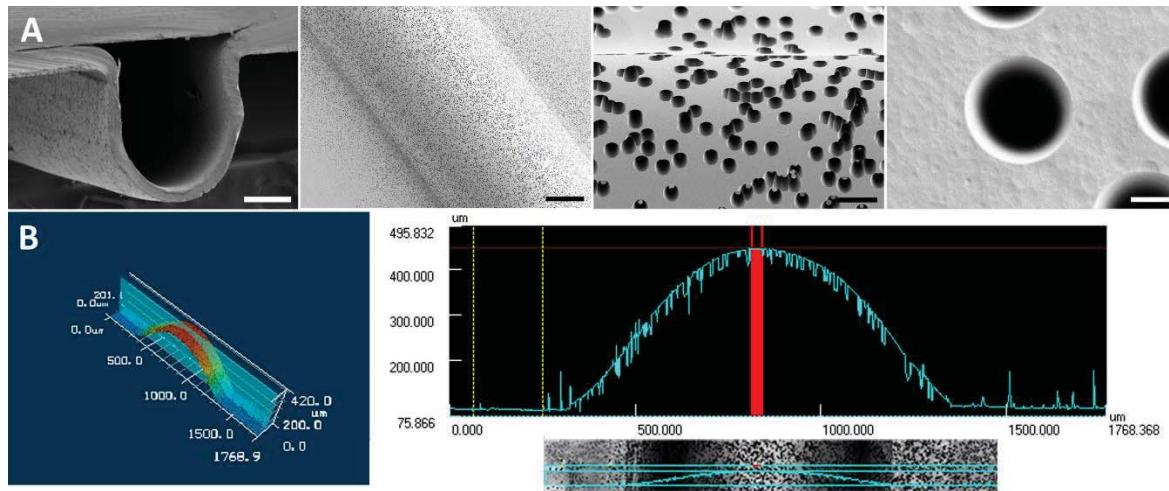
### 6.3. Der *vasQchip*

#### 6.3.1. Herstellung des *vasQchips*

Die *vasQchips* wurden am KIT, in Kooperation mit dem Institut für Biologische Grenzflächen IBG-1, in Eigenarbeit hergestellt. Zur Produktion der Kanäle musste die dazu verwendete, durch Schwerionenbeschuss vorbehandelte Polycarbonat (PC)-Folie zunächst geformt, anschließend geätzt, mit einer zweiten Folie durch Bonden verschlossen und schließlich mit dem restlichen Aufbau des *vasQchips* zusammengesetzt werden.<sup>251-253</sup> In einer am IBG-1 entwickelten Thermoform-Anlage konnte mittels Hitze (unterhalb der Schmelztemperatur von Polycarbonat) und Druck die PC-Folie (Stärke 50  $\mu\text{m}$ ,  $10^6$  Ionen/ $\text{cm}^2$ ) in die benötigte Form gebracht werden, ohne dabei die durch die Vorbehandlung entstandene Struktur des Materials zu verändern.<sup>44, 193, 194</sup> (Abb. 66) Dafür wurde die zurechtgeschnittene PC-Folie mit der benötigten Formmaske, eine 300  $\mu\text{m}$  dicke Metallscheibe mit einer Aussparung in Form des gewünschten Kanals (1 mm \* 20 mm), in das Formwerkzeug der Anlage eingespannt, mit angelegtem Vakuum fixiert und auf 147 °C erhitzt. Daraufhin wurde für 5 min mit Stickstoff einseitig ein Druck von 4 bar angelegt, so dass die PC-Folie in die Formmaske gedrückt und somit die Kanalstruktur gebildet wurde. Nach dem Abkühlen der Anlage auf 40 °C konnte die geformte Folie entnommen und weiterbearbeitet werden. Um aus der Folie eine poröse Membran zu erhalten, konnten die durch den Schwerionenbeschuss gebildeten Spuren im Material durch einen Ätzvorgang als Poren geöffnet werden. Dazu wurden mehrere Folien in einer speziell gefertigten Halterung für 4,5 h bei 70 °C in einer basischen Lösung aus 5 M NaOH und 0,01 % Dowfax™ behandelt. Anschließend wurden die porösen PC-Membranen dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 40 °C getrocknet. Die genaue Porengröße verschiedener Ätz-



**Abbildung 66:** Schematische Darstellung der SMART-Technologie zur Herstellung der *vasQchips* (nach S. Giselbrecht et al., 2008<sup>44</sup>). Die PC-Folie wird durch Schwerionenbeschuss vorbehandelt und anschließend durch Thermoformen mit Hitze und Druck (147 °C, 4 bar, 5 min) die Kanalstruktur geformt. Durch einen Ätzvorgang (70 °C, 4,5 h in 5 M NaOH und 0,01 % Dowfax™) entstehen an den Ionenspuren Poren in der Membran. Abschließend wird der Kanal mit einer weiteren Folie durch Thermobonden (145 °C, 20 MPa, 2 min) verschlossen.



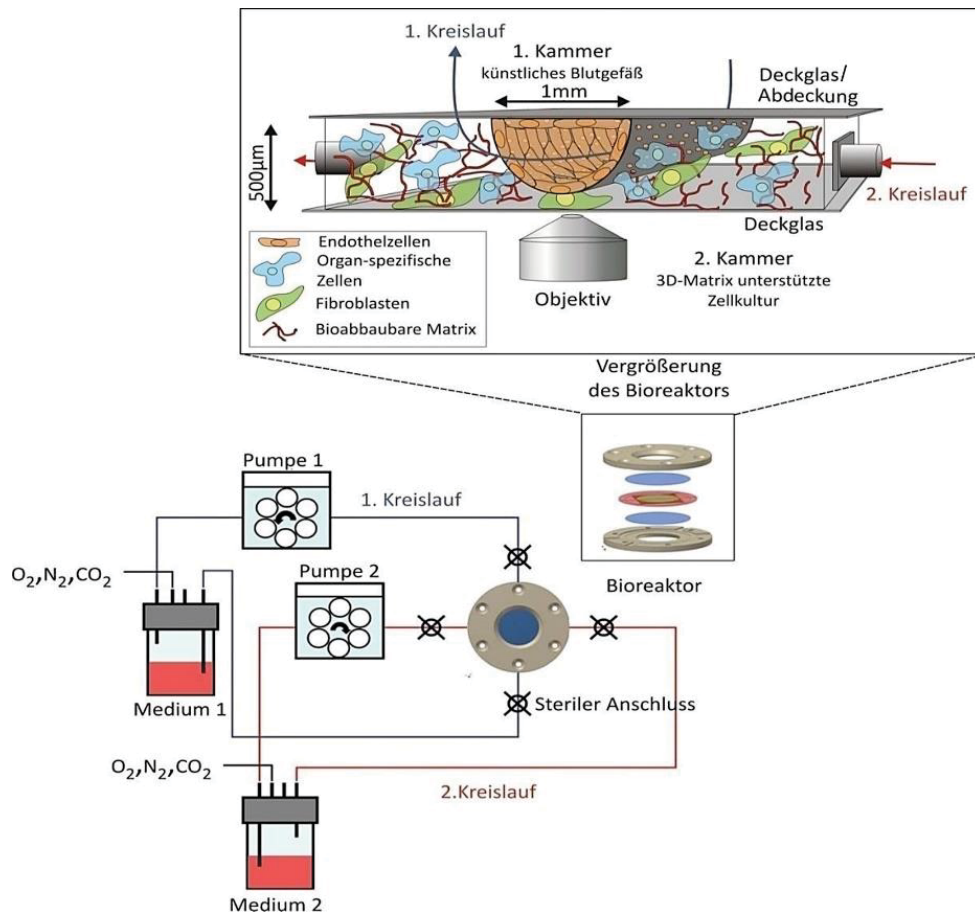
**Abbildung 67: Halbrunder, poröser Mikrokanal des vasQchips.** Aus einer mittels Schwerionenbeschuss vorbehandelten PC-Membran wird durch Thermoformen ein halbrunder Kanal hergestellt und danach die Poren durch einen Ätzzvorgang geöffnet. Abschließend wird der Kanal mit einer zweiten Membran durch Thermobonden verschlossen. Dargestellt sind REM-Aufnahmen des Mikrokanals sowie der Poren (A, Maßstab 100, 250, 20 bzw. 2  $\mu\text{m}$ , nach I. Hebeiß<sup>91</sup> und D. Ivannikov<sup>92</sup>) sowie ein Höhenprofil der geformten Membran (B).

bedingungen konnte mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops, ausgestattet mit einem EDX-Detektor, ermittelt werden. (Abb. 67) Um die Kanalstruktur zu verschließen, wurde die PC-Membran mit einer weiteren PC-Folie in der Thermoformanlage für 2 min bei 145 °C und 20 MPa thermisch gebondet. Dabei waren für die vier Anschlüsse der Fluidik Öffnungen ( $\varnothing$  1 mm) in der Folie eingebracht. Letztendlich wurden die PC-Kanäle auf einem PMMA-Block mit vier Luer-Öffnungen geklebt. Zur Generierung der unteren Kammer wurde auf der Membran ein 500  $\mu\text{m}$  hoher Ring aus Klebefolie (Innen- $\varnothing$  30 mm) angebracht und der entstandene Hohlraum mit einem Deckglas ( $\varnothing$  34 mm, Dicke 0,19 - 0,23 mm) verschlossen. (s.a. Abb. 673) Der *vasQchip* wurde zunächst unter der Bezeichnung  $\mu\text{3DVasc}$  Bioreaktor geführt. Er ist patentiert unter den Nummern DE10201205540 A1, EP2679666 A1 und US20130344529 A1 und ist zentraler Bestandteil des KIT Start-ups *vasQlab*.<sup>251-253</sup>

### 6.3.2. Besiedelung und Kultivierung von Zellen im *vasQchip*

Der *vasQchip* ist ein mikrofluidisches System, das es unter anderem ermöglicht, *in vitro* einen transendothelialen Transport durchzuführen und zu untersuchen, und somit mit humanem Zellmaterial die Simulation eines Wirkstofftransports aus dem Blutkreislauf in ein anliegendes Gewebe erlaubt.<sup>91</sup> (Abb. 68)

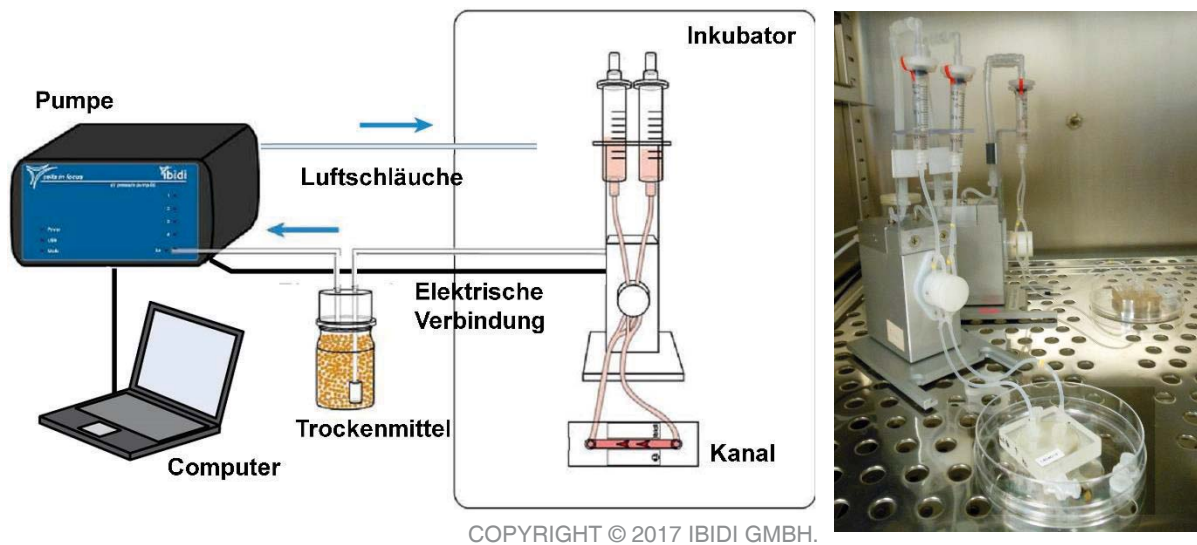
Der in einer  $\gamma$ -Quelle sterilisierte *vasQchip* wurde zunächst mit Strukturproteinen der extrazellulären Matrix behandelt, um das Zellwachstum auf der Oberfläche zu ermöglichen. Dazu wurde zuerst der Kanal für insgesamt 5 h bei RT mit 50  $\mu\text{l}$  Fibronectin-Lösung (0,9 mg/ml: 45  $\mu\text{l}$  Fibronectin in AcOH (1 mg/ml) und 5  $\mu\text{l}$  DPBS<sup>-/-</sup>) inkubiert. Nach 3 h wurde zusätzlich die untere Kammer mit 500  $\mu\text{l}$  Kollagen-Lösung (0,4 mg/ml: 100  $\mu\text{l}$  Kollagen (2 mg/ml) mit 400  $\mu\text{l}$



**Abbildung 68: Schematischer Aufbau des vasQchips** (nach I. Hebeiß, 2012<sup>91</sup>). Der poröse, halbrunde Kanal kann mit Endothelzellen besiedelt und an einen mikrofluidischen Kreislauf angeschlossen werden, um ein Blutgefäß zu simulieren. Ein zweites Kompartiment dient der Kultivierung einer umgebenden, dreidimensionalen Ko-kultur, welche ebenfalls mit einer Fluidik verbunden werden kann.

DPBS<sup>-/-</sup>) befüllt, wobei auf eine vollständige Benetzung und die Vermeidung von Luftblasen geachtet wurde. Beim Zugeben der Flüssigkeiten in Kanal und Kammer wurde die Flussrichtung ausgewählt, in welche fortan jegliche Zugabe erfolgte und auch die Fluidik angeschlossen wurde. Abschließend wurden Kanal und Kammer mit zweimal 200 µl bzw. einmal 1000 µl DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und befüllt. Dabei lagen Kanal und Kammer nie trocken, sondern es fand ein fließender Austausch der Flüssigkeiten statt. Zur Aufbewahrung wurden die Anschlüsse mit Hütchen bedeckt bzw. mit Luer-Steckern geschlossen, der *vasQchip* in einer Kulturschale mit Parafilm® verschlossen und bei 4 °C für bis zu 6 Tage aufbewahrt.

Um das System zu äquilibrieren, wurde der *vasQchip* vor dem Einbringen von Zellen mit EBM-2 befüllt und möglichst über Nacht inkubiert. Für die Besiedelung des Kanals wurden HUVEC einer niedrigen Passage (maximal P6) als Suspension mit einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$ /ml wie beschrieben vorbereitet. Kanal und Kammer des *vasQchips* wurden erneut mit äquilibriertem EBM-2 gespült und dann 150 µl vom Ausgang des Kanals abgenommen. In den Eingang des Kanals wurden dann 50 µl der HUVEC-Suspension gegeben und auf der anderen Seite 50 µl abgenommen. Die den Kanal durchströmenden Zellen konnten dabei unter dem Licht-



**Abbildung 69: Mikrofluidischer Kreislauf zur Kultivierung des vasQchips.** Zur Kultivierung der Endothelzellen unter mikrofluidischen Bedingungen wird der vasQchip mit einem Pumpsystem verbunden und inkubiert. Schematischer Aufbau (nach ibidi<sup>254</sup>) (links) sowie zwei vasQchips mit Fluidic Unit des Pumpsystems im Inkubator. (rechts).

**Tabelle 3: Einstellungen für die Fluidik des Pumpsystems**

5,0 mbar	100-150 µl/min	1h
8,0 mbar	200 µl/min	1h
12,0 mbar	300 µl/min	48h
14,0 mbar	350-400 µl/min	48h
16,0 mbar	450 µl/min	bis zum Ende des Experiments

mikroskop beobachtet werden. Nach Inkubationszeiten von 10 min wurde das Einsäen der HUVEC noch insgesamt viermal wiederholt, wobei der *vasQchip* zwischen diesen Schritten jeweils um 90° gedreht wurde, um ein Anhaften der Zellen an der gesamten Innenfläche des Kanals zu ermöglichen. (Alternativ wurde später ebenso das gestufte Wenden des *vasQchips* nach einmaligem Einbringen von  $2 \cdot 10^6$  Zellen in den Kanal angewandt.) Nach Abschluss der Inkubation wurden die Anschlüsse des Kanals mit insgesamt 150 µl Medium befüllt und der *vasQchip* für 3 h inkubiert, um eine vollständige Adhäsion der HUVEC zu erreichen. Währenddessen wurde die Fluidik vorbereitet, indem das *Perfusion Set* auf der *Fluidic Unit* angebracht, mit 3 ml EBM-2 gefüllt und im Inkubator ein Vorbereitungszyklus durchgeführt wurde, um Luftpneinhalte aus den Schläuchen zu eliminieren und den Aufbau an die Inkubationsbedingungen anzupassen. Schließlich wurde der *vasQchip* an das Pumpsystem angeschlossen, für eine weitere Stunde statisch inkubiert und dann die Fluidik durch den Kanal gestartet. (Abb. 69) Dabei wurde die Fluidik nach dem oben aufgeführten Programm schrittweise aufgebaut. (Tab. 3) Druck und Fluss im System wurden dabei mindestens einmal täglich kontrolliert und an jedem zweiten Tag außerdem ein Mediumwechsel in den Reservoirs des *Perfusion Sets* (je 1 ml pro Reservoir) vollzogen.

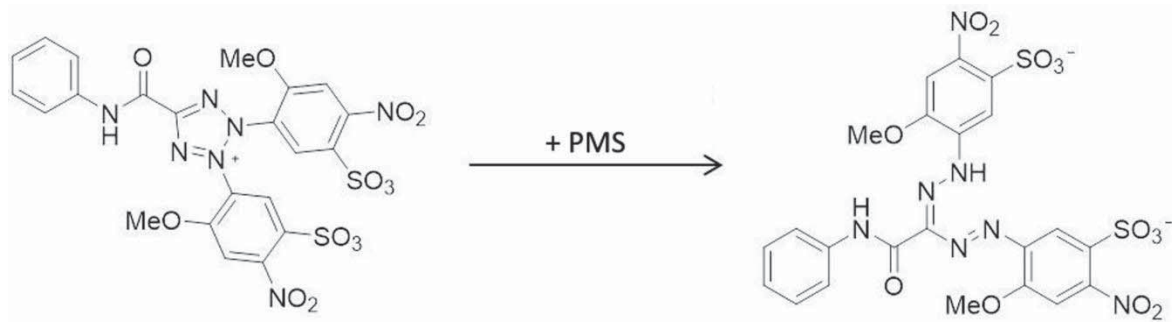


Um für die Studien zum transendothelialen Transport das Wachstum und die Konfluenz der Zellschicht im Kanal zu überprüfen, wurden 5 Tage nach Einbringen der HUVEC konfokalmikroskopische Aufnahmen mit einer Hoechst 33342-Färbung der Zellkerne gemacht. Dazu wurde die Fluidik gestoppt, der *vasQchip* vom Pumpensystem getrennt und Kanal und Kammer mit 150  $\mu$ l bzw. 500  $\mu$ l 2  $\mu$ g/ml Hoechst 33342-Lösung (Stammlösung 10 mg/ml 1:5000 in EBM-2) gefüllt. Nach einer Einwirkzeit von 15 min wurde mit Medium gewaschen und der *vasQchip* wie beschrieben mikroskopiert. Bei einer wie benötigt gleichmäßigen Zellschicht wurde die Fluidik wieder angeschlossen und das Experiment fortgesetzt. Dazu wurden am achten Tag die kanzerogenen Zellen HeLa oder HepG2 in die Kammer des *vasQchip* ausgesät. Diese wurden wie beschrieben in Suspension gebracht, abzentrifugiert und mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml in EGM-2 resuspendiert. Zum Aussäen wurden die Anschlüsse der Kammer entleert und 200  $\mu$ l der Zellsuspension eingebracht. Unter dem Lichtmikroskop war dabei die Verteilung der Zellen gut zu beobachten. Nach jeweils 10-minütiger Inkubation wurde der Vorgang noch dreimal wiederholt und danach die Fluidik im Kanal wie gehabt gestartet. Nach 24 h erfolgte die Zugabe der Probe ins Medium des Pumpsystems. Das Medium aus den Reservoirs wurde ersetzt durch 3 ml der Probe-Lösung benötigter Konzentration in EGM-2 (für das gesamte Volumen im *Perfusion Set*). Die Laufzeit zwischen einem Wechsel der Reservoirs wurde dem vergrößerten Gesamtvolumen angepasst und von 60 s auf 90 s monodirektionalen Flusses erhöht. Nach Inkubationen von 24 h sowie 48 h wurden erneut mikroskopische Aufnahmen gemacht, um sowohl die Verteilung der fluoreszenten Probe in Kanal und Kammer zu bestimmen, als auch den Zustand der HUVEC und HeLa- oder HepG2-Zellen zu überprüfen. Dazu wurden Kammer und Kanal zunächst mit EBM-2 gewaschen, sowie zusätzlich im Kanal mit 150  $\mu$ l 2  $\mu$ g/ml Hoechst 33342-Lösung nachgefärbt.

### 6.3.3. Zytotoxizitätsstudie mit XTT

Um die Viabilität der im *vasQchip* etablierten Zellen zu bestimmen, wurde ein Test basierend auf XTT-Reagenz etabliert. Ähnlich wie mit dem zuvor beschriebenen MTT beruht der Versuch auf der enzymatischen Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes (hier Natrium 3'-[1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonsäure-Hydrat, XTT), unter Zusatz von N-Methyldibenzopyrazin-Methylsulfat (PMS), durch Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen zu einem farbigen Formazan, welches photometrisch quantifiziert werden kann. (Abb. 70) Der entscheidende Vorteil dieser Reaktion gegenüber dem MTT ist, dass ein wasserlösliches Formazan (im Gegensatz zu Kristallen) entsteht, so dass eine Lysierung der Zellen für die Auswertung nicht notwendig ist. Dadurch kann die Viabilität derselben Zellen an mehreren Zeitpunkten bestimmt und verglichen werden. Auf diese Weise wurde im *vasQchip* die Zytotoxizität von Dox@AlO(OH) Nanopartikeln sowohl in Bezug auf die Endothelzellen als auch die kanzerogene Ko-Kultur untersucht.

Dazu wurde zunächst das XTT-Reagenz (5 ml) mit dem Aktivierungsreagenz (PMS; 0,1 ml) bis zur Entstehung einer klaren und homogenen Lösung vermengt, erwärmt und anschließend



**Abbildung 70: Reaktion des XTT-Reagenzes.** Durch enzymatische Aktivität wird das gelbliche Tetrazoliumsalz unter Zusatz von PMS zum orangenen Formazan umgewandelt. Diese Reaktion ist photometrisch nachzuvollziehen und gibt Aufschluss über die Viabilität der untersuchten Zellen.

das benötigte Volumen in einer 1:2-Mischung mit EGM-2 hergestellt. Der *vasQchip* wurde von der Fluidik getrennt, das Medium aus den Anschlüssen sowie entweder dem Kanal oder der unteren Kammer entnommen und durch das XTT-Gemisch ersetzt (150  $\mu\text{l}$  im Kanal, 350  $\mu\text{l}$  in der unteren Kammer). Es folgte eine 3-stündige Inkubation unter statischen Bedingungen. Als Kontrolle wurden ebenfalls 100  $\mu\text{l}$  in einer 96er-Zellkulturplatte inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus dem *vasQchip* entnommen und in die Zellkulturplatte überführt. Die Auswertung erfolgte photometrisch mit Absorptionsmessungen bei 450 und 500 nm, sowie bei 630 und 690 nm als Referenzmessungen. Die Messwerte der Kontrolle ebenso wie der Mittelwert der Referenzmessungen dienten dem Null-Abgleich und wurden vom Mittelwert der Absorptionsmessungen bei 450 und 500 nm abgezogen. Der *vasQchip* wurde mit Medium gespült und wieder an die Fluidik angeschlossen. Hier wurde das Medium der Reservoirs ausgetauscht und, wie bei den Experimenten zur Konfokalmikroskopie, mit den gewünschten Proben (1  $\mu\text{M}$  Dox@AlO(OH) oder Doxorubicin in EGM-2 oder frisches EGM-2) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 48 h unter fluidischen Bedingungen und abschließend eine erneute XTT-Behandlung. Die erhaltenen Ergebnisse vor Zugabe der Proben wurden als 100 % und die Ergebnisse nach der Zugabe entsprechend in Relation gesetzt. Alle Experimente wurden mindestens als Triplikate durchgeführt.

Daneben wurde auch der zuvor beschriebene Zytotoxizitätstest mit MTT auf 96er-Zellkulturplatten mit dem XTT-Reagenz durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Testsysteme zu ermöglichen. Hierzu wurde die Viabilität der Zellen ebenfalls zunächst vor der Inkubation vermessen, dann die Zellen mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen, mit den verschiedenen Proben inkubiert, anschließend erneut vermessen und mit den vorherigen Ergebnissen in Relation gesetzt. Pro Behandlung wurden 6 Kammern untersucht.

Neben den klassischen 96er-Zellkulturplatten und dem fluidischen *vasQchip* wurden als weiteres *in vitro*-Modell Transwell®-Filter (12 Filter in einer 24er-Zellkulturplatte) gewählt, die einen dreidimensionalen Aufbau unter statischen Bedingungen aufweisen. Hierzu wurden die Filter äquivalent zu den *vasQchips* zunächst auf der apikalen Seite mit 50  $\mu\text{l}$  Fibronectin- und anschließend basal zusätzlich mit 350  $\mu\text{l}$  Collagen-Lösung beschichtet. Die basale Kammer wurde anschließend mit 500  $\mu\text{l}$  EGM-2 befüllt und apikal auf jedem Filter  $5 \cdot 10^4$  HUVEC in 250  $\mu\text{l}$  EGM-2 ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und basal  $10^5$  HeLa- bzw. HepG2-Zellen (jeweils 6 Kammern) als Ko-Kultur eingebracht. Am dritten Tag



erfolgte die erste Behandlung mit XTT-Reagenz. Dafür wurden die Filter in leere Kammern überführt, das Medium abgenommen und durch 150  $\mu\text{l}$  (apikal) bzw. 250  $\mu\text{l}$  (basal) des XTT-Gemischs ersetzt. Ebenso wurde in einer leeren Kammer eine Kontrolle angesetzt. Nach 3-stündiger Inkubation wurde die Lösung abgenommen und mit 100  $\mu\text{l}$  pro Kammer auf eine 96er-Zellkulturplatte überführt. Die Transwell®-Filter wurden zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend als Duplikate mit 1  $\mu\text{M}$  Dox@AIO(OH) oder Doxorubicin in EGM-2 bzw. frischem EGM-2 versetzt. Nach 48 h erfolgte die zweite Behandlung mit XTT-Reagenz und die abschließende Auswertung der beiden Messungen. Pro Behandlung wurden 4 Filtersysteme vermessen.

#### 6.3.4. 3D Kultur in Fibringel

Zum Einbringen einer dreidimensionalen Ko-Kultur aus einem Netzwerk von Endothel (HUVEC) und Bindegewebe (NHDF) wurden verschiedene Zusammensetzungen getestet und mit folgendem Protokoll die besten Ergebnisse erzielt. Der *vasQchip* wurde zunächst wie beschrieben mit Fibronectin und Collagen beschichtet und der Kanal mit HUVEC besiedelt. Nach 7-tägiger Kultivierung unter fluidischen Bedingungen wurde die Ko-Kultur in die untere Kammer eingebracht. Dazu wurde zunächst eine Schicht von  $5 \cdot 10^5$  HUVEC in 500  $\mu\text{l}$  EGM-2 auf der Unterseite des Kanals ausgesät, indem der *vasQchip* um 180 ° gedreht, nach 3 h die Fluidik gestartet und so über Nacht inkubiert wurde. Für die dreidimensionale Kultur diente ein Fibringel nach dem Protokoll von M. N. Nakatsu *et al.* (2007) als Matrix.<sup>196</sup> Fibrinogen (4 mg/ml) wurde in warmem DPBS<sup>-/-</sup> gelöst und anschließend sterilfiltriert. Zur Stabilisierung des Gels wurde Aprotinin (0,15 U/ml) und zur Förderung der Zellvernetzung Collagen (10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , entspricht für den *vasQchip* 22,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugefügt. Das Gesamtvolumen der Lösung wurde mit einer Zellsuspension 1:1 verdünnt. Dafür wurden  $10^6$  HUVEC und  $2 \cdot 10^6$  NHDF (Verhältnis 1:2) in EGM-2 vermengt und resuspendiert. Als letzter Schritt wurde der Quervernetzer Thrombin (0,625 U/ml) hinzugefügt und das Gemisch zügig in die untere Kammer des *vasQchips* überführt. Bei einem verwendeten Volumen von typischerweise 500  $\mu\text{l}$  kamen 220  $\mu\text{l}$  Fibrin-, 18,75  $\mu\text{l}$  Aprotinin-, 4,5  $\mu\text{l}$  Collagen- und 6,25  $\mu\text{l}$  Thrombin-Lösung sowie 250  $\mu\text{l}$  Zellsuspension zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte wieder aufrecht, nach 3 h konnte die Fluidik gestartet werden und die Kultivierung erfolgte über weitere 3-5 Tage. Die Ko-Kultur in der unteren Kammer konnte lichtmikroskopisch beobachtet werden. Dabei wurde gleichzeitig zum Mediumwechsel in den Reservoirs auch die untere Kammer vorsichtig mit 1 ml EGM-2 gespült. Für die finale Auswertung wurden die Zellen fixiert, gefärbt und konfokalmikroskopisch analysiert.

#### 6.3.5. Fixierung und Färbung der Zellen

Für das Fixieren wurde die entsprechende Zellkultur zunächst zweimal mit DPBS<sup>+/+</sup> gewaschen und dann zur Denaturierung (Vernetzung von Proteinen) für 20 min mit 4 % PFA auf Eis inkubiert. Es wurde erneut zweimal mit DPBS<sup>+/+</sup> gewaschen und zur Permeabilisierung der Probe





für 4 min mit 0,1 % Triton X-100 bei RT behandelt. Darauf folgten 3 Waschschritte mit DPBS<sup>+/+</sup> und abschließend für 30 min eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit CAS-Block-Lösung bei RT. Der verwendete monoklonale Antikörper Anti-CD31-FITC (1:100 in CAS-Block) wurde zusammen mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) und Phalloidin-TRITC (25 ng/ml) angesetzt und die Probe über Nacht bei 4 °C mit der Färbelösung behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS<sup>+/+</sup> konnten die Zellen mikroskopiert oder noch für einige Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

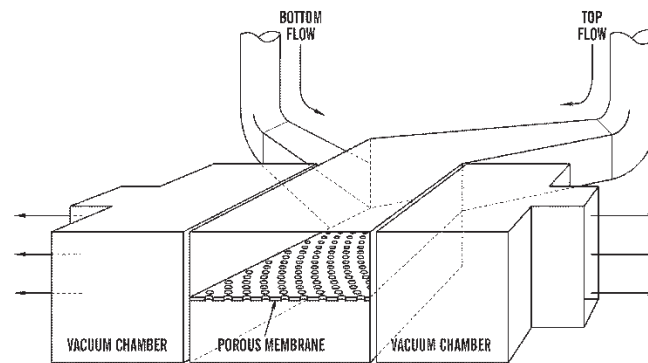
## 6.4. Modell der Kleinen Atemwege

### 6.4.1. Transwell<sup>®</sup>-System mit HSAEpC

Vor der Besiedelung mit HSAEpC wurden die Transwell<sup>®</sup>-Filter für 4-6 h mit Collagen I beschichtet. Dazu wurde jeder Filter mit 100 µl einer 300 µg/ml Collagen-Lösung, verdünnt in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, behandelt und bei 37 °C inkubiert. Verbleibende Flüssigkeit wurde daraufhin abgenommen und die Platte über Nacht unter der Sterilbank getrocknet. Während der Vorbereitung der Zellen wurden die Filter mit Medium überschichtet und für etwa 30 min inkubiert, um den sauren pH-Wert der Collagen-Lösung zu neutralisieren. Dieses Medium wurde anschließend wieder abgenommen und 750 µl Pre-ALI-Medium auf der basalen Seite der Filter vorgelegt. Nun konnten die HSAEpC mit einer Zellzahl von mindestens 10<sup>5</sup> Zellen in 250 µl Pre-ALI-Medium pro Filter ausgesät werden. Nach 3-6 h wurde das Medium auf beiden Seiten zu ALI-Medium gewechselt. Nach 3 bis 4 Tagen wurde dann die Grenzfläche zur Luft (ALI) eingeführt, das heißt, das Medium auf der apikalen Seite der Filter komplett abgenommen und die Zellen somit nur noch basal mit Medium versorgt, während sie apikal der Luft ausgesetzt waren. Dadurch begann über etwa 3 Wochen die Differenzierung in ein Gewebe verschiedener Zelltypen wie Becher-, Basal-, Kinozilientragender, Endokriner und Muzinöser Zellen.

### 6.4.2. Fluidisches Modell der Kleinen Atemwege mit HSAEpC

Ähnlich wie bei den Transwell<sup>®</sup>-Filtern erfolgte auch die Besiedelung und Kultivierung des fluidischen Modells der Kleinen Atemwege mit einer HSAEpC-Kultur an der Grenzfläche zur Luft (ALI) und unter fluidischen Bedingungen. Die am *Wyss Institute* entwickelten Chip-Systeme aus PDMS<sup>212-214</sup> (Abb. 71) wurden vor Ort von Mitgliedern des *Microengineering Teams* hergestellt und durch eine Plasmabehandlung sterilisiert. Der Aufbau zur fluidischen Kultivierung der Chips bestand zusätzlich aus einer gefederten Klammer zur Fixierung, einem Mediumreservoir, Schläuchen mit passenden Verbindungsstücken sowie einem Steckmodul, um alles zu verbinden. Zum Beschichten wurde Collagen-Lösung 1:10 mit Wasser zu einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml verdünnt und die Chips mit 100 µl befüllt, die Anschlüsse mit weiteren



**Abbildung 71: Patentzeichnung der am Wyss Institute entwickelten Organ-on-a-Chip-Systeme** (D. E. Ingber & H. J. Kim, US20140038279 A1, 2014<sup>212</sup>) Das Prinzip des Modells beruht auf zwei parallelen Kanälen, die durch eine poröse Membran voneinander getrennt sind. Diese wiederum kann auf beiden Seiten mit einer Zellschicht besiedelt werden, um eine in Verbindung stehende Ko-Kultur zu generieren.

100  $\mu\text{l}$  bedeckt und in einer Petrischale über Nacht inkubiert. Zur Besiedelung wurde zunächst die überstehende Collagen-Lösung abgenommen, der Chip in die gefederte Klammer eingespannt und die Anschlüsse des Chips mit vier Schläuchen bestückt. So wurden beide Kanäle des Chips mit 100  $\mu\text{l}$  ALI-Medium durchspült, mit Metallklammern verschlossen und inkubiert. Die Zellen wurden wie beschrieben in Suspension gebracht und mit einer Dichte von mindestens  $4 \cdot 10^5/\text{ml}$  in ALI-Medium resuspendiert. 40  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden im oberen Kanal ausgesät und die Chips für 4-5 h inkubiert. Währenddessen wurde das Mediumreservoir mit 15 ml ALI-Medium einer 10-fachen Retinsäure-Konzentration (um den Abbau und die Absorption aufgrund des Systemaufbaus auszugleichen) gefüllt und zusammen mit dem Steckmodul mit den nötigen Anschlüssen und Schläuchen versehen. Nach der Inkubation konnte jeder Chip über die Schläuche, luftblasenfrei, mit dem unteren Kanal an das Reservoir angeschlossen werden. Der obere Kanal wurde einmal mit 100  $\mu\text{l}$  Medium gespült und beide Enden mit Metallklammern verschlossen. Nun konnte das zweite Ende des unteren Kanals mit der peristaltischen Pumpe verbunden und die Fluidik mit 0,1 ml/h gestartet werden. Das verbrauchte Medium wurde für jeden Chip am Ende des Pumpsystems gesammelt. Der obere Kanal wurde nach zwei Tagen mit ALI-Medium gespült und an Tag 3 oder 4 die Grenzfläche zur Luft eingeführt, wofür das Medium abgenommen und die Schläuche nicht mehr verschlossen wurden. Einmal pro Woche wurde die Zellschicht für 10 min mit Medium gewaschen und jeden zweiten Tag das Reservoir mit frischem Medium nachgefüllt. Die Kultivierung der Zellen im Kanal konnte mikroskopisch verfolgt werden.

### 6.4.3. Analyse der exosomalen RNA

#### 6.4.3.1. RNA Isolation

Zur Analyse der exosomalen RNA (exoRNA) wurde das Medium von HSAEpC-Kulturen auf Transwell®-Filtern zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, pro Probe etwa 4 ml. Die ver-



schiedenen Proben zur Differenzierung stellten sich zusammen aus 2 bzw. 3 Platten des jeweils selben Zelldonors an Tag 0 (am Übergang zur Grenzfläche an die Luft), Tag 2, Tag 8 und Tag 28. Außerdem wurde an 2 weiteren Platten eine Wundheilung der Zellschicht durchgeführt und das Medium an Tag 0, 2, 6, 8, 14, 21 und 49 nach Induzieren der Wunde gesammelt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt. Die Isolation der exoRNA erfolgte mithilfe des *exoRNAeasy Kits* von Qiagen nach der genauen Anleitung des Herstellers.<sup>255</sup> Die Proben der ersten beiden Platten zur Differenzierung wurde als Duplikate zu je 1,75 ml Medium aufgeteilt und getrennt behandelt, während jene Proben der 3 Platten des zweiten Donors, ebenso wie die Proben zur Wundheilung, komplett mit je 3,5 ml verwendet wurden. Die erhaltene RNA wurde sofort auf Eis aufbewahrt und 1,5  $\mu\text{l}$  für die Quantifizierung im NanoDrop eingesetzt. Gemessen wurde hier die Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  sowie das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Dieser Wert gibt Aufschluss über Integrität und Qualität der RNA und sollte bestmöglich um 2,0 liegen.<sup>256</sup> Bis zur Weiterverwendung wurde die RNA bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt.

Die Isolation von viraler RNA aus dem Lysat infizierter Zellen erfolgte mit dem *QIAamp Viral RNA Mini Kit* von Qiagen nach der genauen Anleitung des Herstellers.<sup>257</sup>

#### 6.4.3.2. cDNA Synthese und „halb-verschachtelte“ qPCR

Für die Synthese von cDNA durch reverse Transkription aus einer RNA-Probe wurde auf Eis gearbeitet und zunächst der Primer-dNTP-RNA-Mix aus 1  $\mu\text{l}$  Oligo (dT), 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix, bis zu 11  $\mu\text{l}$  der RNA-Probe sowie molekularbiologischem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 13  $\mu\text{l}$  hergestellt. (Für die Proben viraler RNA wurde 1  $\mu\text{l}$  Random Primer und wie zuvor 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix sowie 11  $\mu\text{l}$  RNA/ Wasser verwendet.) Dieser Mix wurde für 5 min auf  $65\text{ °C}$  erhitzt und anschließend sofort für mindestens 1 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Probe ein Mix aus 5  $\mu\text{l}$  5x First Strand Buffer, 1  $\mu\text{l}$  0.1 M DTT, 1  $\mu\text{l}$  RNase-OUT und 1  $\mu\text{l}$  Superscript III Reverse Transkriptase Enzym hinzugefügt und mit der Pipette vermischt. Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler für 60 min auf  $50\text{ °C}$  erwärmt, dann für 15 min auf  $70\text{ °C}$  und schließlich auf  $4\text{ °C}$  gekühlt. Die entstandene cDNA wurde bis zur Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt.

Für die qPCR wurden die Proben auf speziell geeigneten 96er-Reaktionsplatten erstellt. Dafür wurden pro Reaktionskammer 10  $\mu\text{l}$  *SYBR™ Green* Master Mix, je 3  $\mu\text{l}$  der passenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer (2  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  molekularbiologisches Wasser und schließlich 2  $\mu\text{l}$  cDNA gemischt. In der Negativ-Kontrolle wurde stattdessen nochmals Wasser ergänzt, in der Positiv-Kontrolle die cDNA eines Zelllysats. Für die erste Stufe der qPCR wurde das dafür vorgesehene erste Primer-Paar verwendet und 20 Zyklen mit 15 s bei  $95\text{ °C}$  und 30 s bei  $60\text{ °C}$  durchgeführt. Die erhaltene Lösung wurde 1:100 mit molekularbiologischem Wasser verdünnt und als Vorlage für die zweite Stufe verwendet. Hierfür kam das zweite, innenliegende Primer-Paar zum Einsatz und es wurden weitere 45 Zyklen wie beschrieben vollzogen. Die Proben wurden als Triplikate erstellt und über die Daten der qPCR ausgewertet.



Mit den Proben der exoRNA aus der HSAEpC-Kultivierung wurden die Gene BPIFA1, KRT14, OMG, PLA2G7, SCGB2A1, SNTN, STC1, S100A7, TF und TXNIP sowie das Haushaltsgen GAPDH analysiert. (Tab. 4)

**Tabelle 4:** Für die Analyse der exosomalen RNA von HSAEpC ausgewählte Gene

<b>BPIFA1</b>	<i>BPI fold containing family A member 1</i>	<b>SNTN</b>	<i>sentan, cilia apical structure protein</i>
<b>KRT14</b>	<i>keratin 14</i>	<b>STC1</b>	<i>stanniocalcin 1</i>
<b>OMG</b>	<i>oligodendrocyte myelin glycoprotein</i>	<b>S100A7</b>	<i>S100 calcium binding protein A7</i>
<b>PLA2G7</b>	<i>phospholipase A2 group VII</i>	<b>TF</b>	<i>transferrin</i>
<b>SCGB2A1</b>	<i>secretoglobin family 2A member 1</i>	<b>TXNIP</b>	<i>thioredoxin interacting protein</i>
<b>GAPDH</b>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>		

#### 6.4.3.3. Behandlung differenzierter Zellen auf Transwell®-Filtern

Um an den differenzierten Zellschichten der HSAEpC eine Wundheilung zu simulieren, wurde mittels 1 M NaOH eine „Verletzung“, also ein Loch in der homogenen Schicht, zugefügt. 5 µl der Lauge wurden als ein Tropfen auf die Mitte des Filters gegeben und sofort mit 200 µl DPBS<sup>-</sup> verdünnt, wodurch sich die Wunde als kreisförmige Stelle ohne Zellen bildet. Anschließend wurde ein weiteres Mal gewaschen und die Platten wie zuvor weiterkultiviert, bis eine Schließung und Homogenisierung der Zellschicht erfolgt war.

Außerdem wurden das Transwell®-System mit differenzierten HSAEpC als Modell für eine Influenza (IAV-1) Infektion genutzt. Dazu wurden einerseits verschiedene Verdünnung eines HAT-blockierenden Peptids eingesetzt, um eine Korrelation mit der später isolierten viralen RNA herstellen zu können. Außerdem wurden Zellen während der Infektion mit weiteren Substanzen einer Bibliothek (# 89, 101, 105) behandelt, um deren Einfluss auf die Aufnahme der Viren zu beurteilen.

## 6.5. Phagen Display

### 6.5.1. Verifizierung des Zielproteins

Um die Intaktheit sowie Funktionalität der vorhandenen Proteinprobe von DEPC-1 zu verifizieren, wurden Western Blots sowie ein Protease-Funktionstest durchgeführt. Die Methodik des Western Blot dient der Übertragung von Proteinen nach einer Gel-Elektrophorese vom Gel auf eine Membran und der dortigen Visualisierung durch spezifische Antikörper-Färbung.



Für die SDS-PAGE wurde eine Probe aus 20 µl Ladepuffer, 4 µl Reduktionsmittel und weiteren 16 µl Proteinprobe und Wasser mit mindestens 0,8 µg Protein hergestellt und zur Denaturierung für 3 min auf 85 °C erhitzt. Anschließend wurde ein 10 %iges Gel mit der Probe sowie einem Molekulargewichtsmarker (5 µl) beladen und für 1 h an 125 V, 30 mA angeschlossen. Auf zwei Gelen einer SDS-PAGE wurde die Existenz von Proteinen mittels Coomassie Blue und Silber-Färbung gemäß Produktbeschreibung nachgewiesen.<sup>258, 259</sup> Bei weiteren Gelen erfolgte mittels iBlot®2 Dry Blotting System und nach Angaben des Herstellers der Transfer auf die Membran, welche durch Ponceau S-Färbung bestätigt wurde.<sup>260, 261</sup> Die Membran wurde für 1 h mit BSA-Lösung blockiert und danach zunächst über Nacht bei 4 °C mit dem Primär-Antikörper (1:250) und nach 3 Waschschritten mit TBST für 1 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper (1:2000) inkubiert. Dann konnte das Signal durch Entwickler-Lösung sichtbar gemacht und in einem Fluoreszenz-/ Chemilumineszenz-Scanner aufgenommen werden. Um die vorhandene Aktivität der Proteinprobe zu bestätigen, wurde ein Kit zum Protease-Fluoreszenz-Nachweis nach Anleitung des Herstellers verwendet, welches auf der Umsetzung des Fluorophors FITC als Substrat beruht.<sup>262</sup> Mit Trypsin als Referenz wurde dazu eine Standardkurve ermittelt und mit den von der Proteinprobe erhaltenen Werten verglichen.

### 6.5.2. Phagen Display

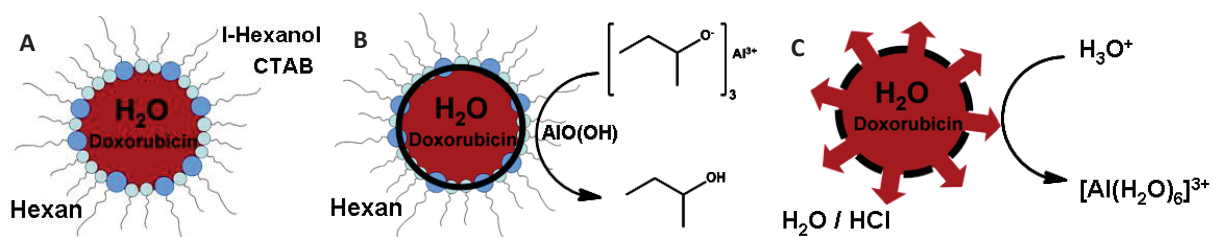
Um aus einer „Phagen Display Peptid Bibliothek“ (PhD7,  $2 \cdot 10^{13}$  pfu/ml) geeignete Kandidaten zur Blockierung des Zielproteins DESC-1 zu ermitteln, wurde eine positive Auslese nach Herstellerangaben durchgeführt.<sup>263</sup> (Tab. 20) Das Zielprotein wurde dazu der Phagen Bibliothek exponiert und durch eine N-His-Markierung an Magnetkügelchen immobilisiert. Umfangreiche Waschschriffe sollten dabei unspezifisches Binden verhindern. Die über das Zielprotein an die Kügelchen gebundenen Phagen wurden schließlich abgespalten und in *E. coli* vermehrt für eine weitere Auswahlrunde mit dieser dann angereicherten Bibliothek. Insgesamt wurden 3 Runden durchgeführt. Der Umfang dieses Anreicherungsprozesses konnte durch quantitative Titration verfolgt werden. Um die zuletzt erhaltene Bibliothek, die nun nahezu ausschließlich Peptide mit starker Affinität zum Zielprotein enthalten sollte, zu charakterisieren, wurde diese für eine Sequenzierung verwendet. Dazu wurde eine *E. coli* Kultur mit der Bibliothek angeimpft, ausplattiert und einzelne Kolonien in die Wells von 96er-Platten überführt, so dass 282 einzelne Kolonien entstanden. Jede dieser Kolonien beinhaltete eine der Phagen, die jeweils wiederum genau ein spezifisches Peptid exprimieren und ausgeben. Da die Synthese der Peptide im genetischen Code der Phagen verankert ist, kann durch die Sequenzierung der DNA eine statistische Verteilung über die in der Bibliothek vorhandenen Sequenzen und die exprimierten Peptide ermittelt werden. Umso größer der Anteil einer bestimmten Sequenz, umso stärker war die Bindung des entsprechenden Peptids zum Zielprotein und umso vielversprechender ist dieses somit für weiterführende Experimente. Da im vorliegenden Fall leider die Abstimmung zwischen der Markierung des Zielproteins und der Oberfläche der Magnetkügelchen fehlerhaft war, konnten in diesem Screening hauptsächlich Peptide identifiziert werden, die selbst eine starke Affinität zur Oberfläche der Magnetkügelchen aufwiesen.



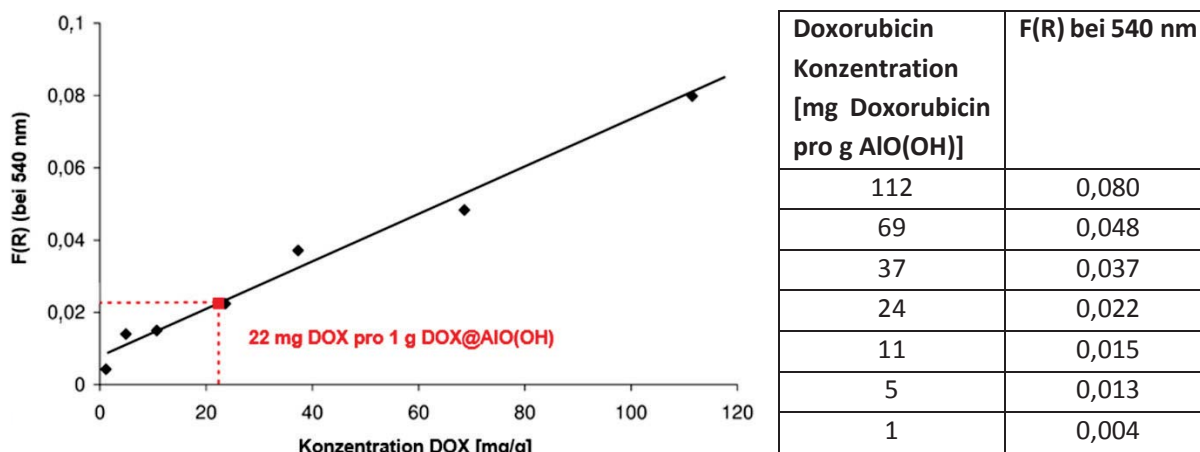
## 6.6. Synthese der Nanopartikel

### 6.6.1. Dox@AlO(OH) Nanopartikel

Die Herstellung der mit Doxorubicin gefüllten Aluminiumoxid-Hydroxid Hohlkugeln (Dox@AlO(OH)) und deren Suspension erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Feldmann (Institut für Anorganische Chemie (AOC), KIT) durch ein Wasser-in-Öl Mikroemulsionsverfahren.<sup>162, 163, 264</sup> Dieses beruht auf einer Hydrolyse an der Grenzfläche von Mizellen definierter Größe, wobei ein Feststoff als Hülle um die wässrige Phase entsteht. (Abb. 72) Die Mikroemulsion setzte sich zusammen aus 50 ml n-Hexan als unpolare und 2 ml Methanol-H<sub>2</sub>O (1:1) als polare Dispersionsphase sowie 1,82 g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als Tensid und 5 ml 1-Hexanol als Co-Tensid zur Stabilisierung. In der polaren Phase wurde außerdem der für den Transport gewünschte Wirkstoff, hier 9,5 mg Doxorubicin, zugeführt. Nach Stabilisierung der Emulsion konnten 246 mg (0,1 M) des Alkoxid Aluminium-s-Butoxid (Al(sec-OC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>) der unpolare Phase hinzugefügt werden, woraufhin über 12 h die Umsetzung zu AlO(OH) erfolgte. Es bildeten sich Doxorubicin-gefüllte Hohlkugeln mit Außendurchmessern von 30-50 nm, einem Hohlraum von 20-30 nm und somit einer Wanddicke von 8-12 nm (Abb. 81), welche als Feststoff per Zentrifugation gesammelt und durch mehrfaches Waschen in Isopropanol und Wasser aufgereinigt wurden. Um die tatsächliche Konzentration des Doxorubicin in den Hohlkugeln zu bestimmen, wurden UV-VIS Spektren von pulvrigen Proben spektroskopisch erfasst (Varian Cary 100 Spektrometer). (Abb. 73) Als Referenz wurde anhand mit massiven AlO(OH) Nanopartikeln (Ø 20-30 nm) vermengten Doxorubicins (1 bis 112 mg) eine Standardkurve ermittelt. Alle Proben wurden mit BaSO<sub>4</sub> (10 mg + 200 mg) als weißem Standard versetzt. Nach Lambert-Beer ließ sich aus der gemessenen Absorption ( bzw. der Kubelka-Munk Funktion des Reflexionsgrads F(R)<sup>265</sup> bei 540 nm) und der Standardkurve eine Doxorubicin-Konzentration von rund 22 mg/g in den Dox@AlO(OH) Nanopartikeln ermitteln, was etwa mit der zur Synthese eingesetzten Menge übereinstimmte.<sup>167, 264</sup> Ebenso war die Internalisierung des Doxorubicins in den Hohlkugeln an den zu messenden optischen Eigenschaften wie Reflexion und Transmission abzulesen. (Abb. 82) Zur Unterstützung der Biokompatibilität für Zell- und *in vivo*-Experimente<sup>132, 266</sup> sowie der Stabilität der Suspension wurden die Partikel in wässrigem Dextran (4 mg/ml) mit einer Konzentration von 75 µg/ml aufgenommen. Vor Verwendung der Suspension wurden diese für 5 min mit Ultraschall behandelt.



**Abbildung 72: Synthese und Auflösung der Dox@AlO(OH) Partikel** (nach C. Seidl et al.<sup>167</sup> und D. Buchold et al., 2007<sup>162</sup>). Bildung einer Mikroemulsion (A); Hydrolyse an der Phasengrenze zur Bildung von AlO(OH) Hohlkugeln mit Einschluss der wässrigen Phase (B); Reaktion der AlO(OH) Hülle in saurer Umgebung und Freisetzung der Füllung (C)

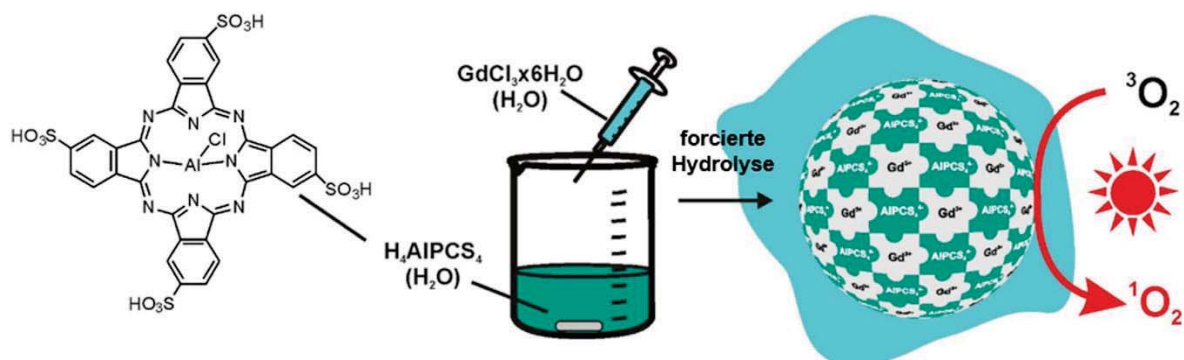


**Abbildung 73: Bestimmung der Doxorubicin-Konzentration in der Dox@AIO(OH) Nanopartikel-Suspension** (nach S. Simonato, 2014<sup>264</sup>). Die Messungen erfolgten mittels UV-Vis Spektrometrie bei einer Absorptions-Wellenlänge von 540 nm (Kubelka-Munk Funktion des Reflexionsgrads  $F(R)$ <sup>265</sup> bei 540 nm). Zunächst wurde mit einem AIO(OH)-Doxorubicin-Gemisch eine Standardkurve erstellt, mit welcher dann der ermittelte Messwert der Nanopartikel verglichen werden konnte.

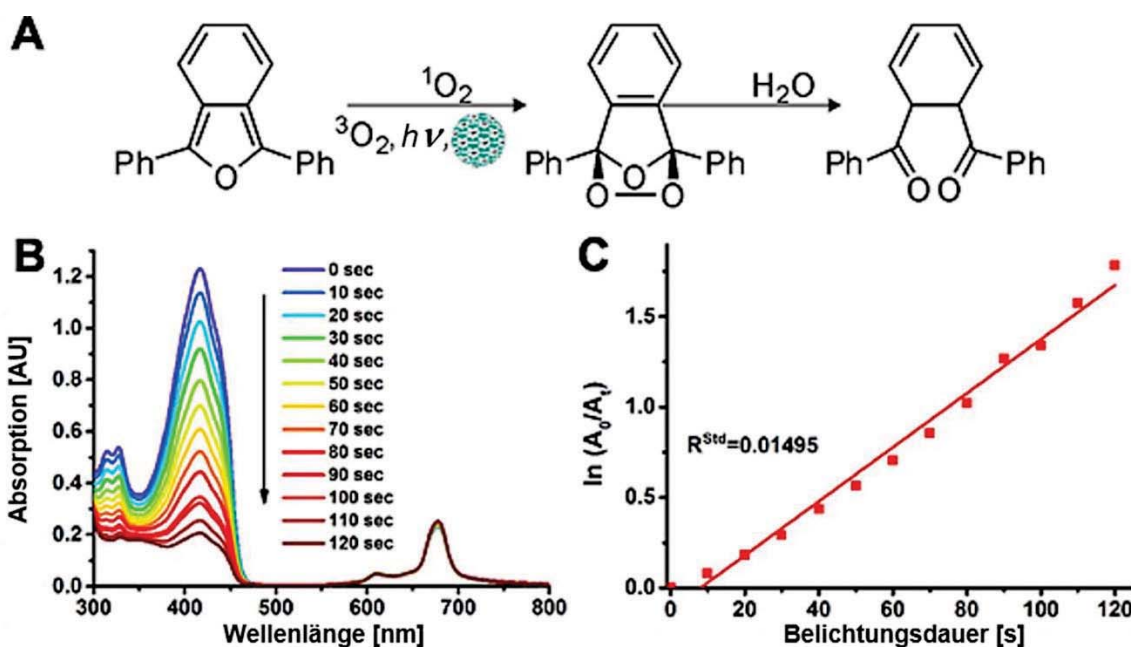
### 6.6.2. $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$ Nanopartikel

Die anorganisch-organischen Hybrid-Nanopartikel  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  aus Gadolinium und Aluminiumchlorophthalocyanin-Tetrasulfonat (AIPCS<sub>4</sub>) wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Feldmann (Institut für Anorganische Chemie (AOC), KIT) durch eine forcierte Hydrolyse synthetisiert.<sup>179, 180</sup> (Abb. 74<sup>c</sup>) Dazu wurden 23 mg H<sub>4</sub>AIPCS<sub>4</sub> (0,025 mmol) in 30 ml Wasser gelöst und unter Rühren auf 55 °C erwärmt. 28 mg GdCl<sub>3</sub>×6H<sub>2</sub>O (0,075 mmol) wurden als wässrige Lösung in 0,5 ml injiziert. Nach weiteren 2 min intensivem Rühren konnten die entstandenen Hybrid-Nanopartikel mit einem Anteil von 85 wt-% an aktivem AIPCS<sub>4</sub> und einem Durchmesser von 47±7 nm durch Zentrifugation (25.000 rpm, 15 min) erhalten werden. (Abb. 83) Um verbliebene Salze zu entfernen, wurden die Nanopartikel dreimal durch Resuspension und Zentrifugation in Wasser gewaschen und letztendlich mechanisch durch Rühren oder mittels Ultraschall in eine stabile Suspension mit 1 mg/ml in Dextran-Lösung gebracht. Beim beschriebenen Prozess wurden die generellen Aspekte zur Kontrolle von Nukleierung und Wachstum der Partikel nach dem Modell von La Mer berücksichtigt.<sup>267</sup> Außerdem wurden die Nanopartikel während des kompletten Vorgangs vor Licht geschützt, um eine frühzeitige Reaktion zu verhindern. Vor Verwendung der Suspension wurde diese 5 min mit Ultraschall behandelt. Zur maximalen Anregung der Fluoreszenz werden die Nanopartikel  $\lambda = 608$  nm bestrahlt, das Emissionsmaximum liegt dann bei 675 nm. Zur Induktion der ROS-Produktion wurde im roten Bereich mit  $\lambda > 610$  nm belichtet. Die Erzeugung von ROS wurde spektroskopisch über eine Reaktion mit dem fluoreszenten DPBF quantifiziert. (Abb. 75<sup>c</sup>) Dieses reagiert selektiv mit <sup>1</sup>O<sub>2</sub> von der Furan-Struktur über ein Endoperoxid zu einem Benzen, wodurch die Absorption bei  $\lambda = 417$  nm zurückgeht.<sup>268, 269</sup>

<sup>c</sup> Adapted with permission from Poß, M.; Zittel, E.; Seidl, C.; Meschkov, A.; Munoz, L.; Schepers, U.; Feldmann, C.; *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1801074. Copyright © 2018 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



**Abbildung 74:** Schematische Darstellung der wasserbasierten Synthese der anorganisch-organischen  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Hybrid-Nanopartikel. (nach M. Poß<sup>180,c</sup>) Strukturformel des  $[AIPCS_4]^{4-}$  Anion; Synthese Strategie mittels forcierter Hydrolyse; ROS Bildung der  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel durch Bestrahlung mit rotem Licht.



**Abbildung 75:** Photoinduzierte Bildung von ROS. (nach M. Poß<sup>180,c</sup>) Das fluoreszente DPBF reagiert mit ROS unter der Abnahme des Absorptionssignals bei 417 nm, wodurch die ROS-Entstehung spektroskopisch verfolgt werden kann. Reaktion von DPBF mit  $^1O_2$ ; UV/VIS Absorption zur Bestimmung der  $^1O_2$  Quantenausbeute; Bestimmung der Bleichrate  $R$  aus Relation zwischen Absorption und Bestrahlungsdauer.

## 6.7. Materialien

### Zelllinien

- HepG2**, Humane Leberkarzinomzellen, adhären
- HeLa**, Humane Epithelzellen, Zervixkarzinom, adhären
- HUVEC**, Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene, adhären (P5-7)
- NHDF**, Humane Fibroblasten, adhären (P5-12)
- HSAEpC**, Humane Epithelzellen der Kleinen Atemwege, adhären (P1)





## Chemikalien

**Aprotinin** from bovine lung (A1153-5MG, Sigma-Aldrich)  
**CasBlock™** (008120, Invitrogen™)  
**Cell Proliferation Kit XTT** (A8088, 1000, AppliChem)  
**CellTracker™ Green** CMFDA (C7025, Molecular Probes™, Life Technologies™)  
**CellTracker™ Red** CMTPX (C34552, Molecular Probes™, Life Technologies™)  
**Chloroform** (Nr.288306-100ML, Sigma-Aldrich)  
**Collagen** (from rat tail tendon), lyophilisiert (11179179001, Roche)  
**Collagen Type I** (Nr.ALX-522-435-0020, Enzo Life Science)  
**DMSO**, Dimethylsulfoxid, ≥ 99,5%, BioScience-Grade (A994.2, Roth)  
**dNTP Mix** (10 mM ea) (18427013, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)  
**Dowfax™** 2A1, (A000080, Ezkem)  
**Doxorubicin Hydrochlorid** (Nr.D1515-10MG, Sigma-Aldrich)  
**DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium), high glucose, pyruvate (41966-029, Gibco™, Life Technologies™)  
**DPBS<sup>-</sup>** (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), -CaCl<sub>2</sub>, -MgCl<sub>2</sub> (14190-094, Gibco™, Life Technologies™)  
**Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1** (65601, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)  
**EBM™-2** Endothelial Cell Basal Medium-2 (CC-3156, Lonza)  
**EGM™-2** SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (CC-4176, Lonza)  
**Essigsäure** (27225-1L-M, Sigma-Aldrich)  
**Ethanol** vergällt, ≥ 99,8% (K928.2, Roth)  
**exoRNeasy** Serum/Plasma Midi Kit (77023, Qiagen)  
**FBS**, Newborn Calf Serum (26010-074, Gibco™, Life Technologies™)  
**Fibrinogen** (F3879, Sigma-Aldrich)  
**Fibronektin**, human (C-43060, PromoCell)  
**Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup>** Nanopartikel-Suspension und H<sub>4</sub>AIPCS<sub>4</sub>-Lösung, hergestellt bzw. zur Verfügung gestellt durch AK Feldmann (AOC, KIT)  
**Hoechst 33342**, Trihydrochloride, Trohydrate, 10mg/ml Lösung in Wasser (H3570, Invitrogen™, Life Technologies™)  
**Isopropanol** (6752.1, Roth)  
**Monoclonal Anti-CD31 (PECAM-1)-FITC antibody** produced in mouse (F8402, Sigma-Aldrich)  
**MTT-Reagenz**, Dye Solution, und **Lysis-Puffer**, Solubilization Solution/Stop Mix, (Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, G4100, Promega)  
**Natriumhydroxid** (NaOH) (P031.1, Roth)  
**Nuclease-free Water** (Nr.AM9915G, Invitrogen™, Life Technologies™)  
**Oligo (dT) 12-18 Primer** [0.5 µg/µl] (18418012, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)  
**Paraformaldehyd** (PFA) (0335.2, Roth)  
**Penicillin-Streptomycin**, 10.000U/ml (15140-122, Gibco™, Life Technologies™)  
**Phalloidin-TRITC** (-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate) (P1951, Sigma Aldrich)  
**Ph.D.™-7 Phage Display Peptide Library** [2\*10<sup>13</sup> pfu/ml] (E8100S, New England Biolabs®)  
**QIAamp Viral RNA Mini Kit** (52904, Qiagen)  
**Random Primer** (48190011, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)  
**RNaseOUT™** Recombinant Ribonuclease Inhibitor (10777019, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)  
**SAGM™ BulletKit** (CC-3119 & CC-4124, Lonza)  
**Silica Gel Orange** (P077.1, Roth)



**SuperScript™ III Reverse Transcriptase**, inkl. 0,1 M DTT, 5X First-Strand Buffer (18080044, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)

**Dox@AIO(OH)**, Suspension (0,075mg/ml) in H<sub>2</sub>O/Dextran (4mg/ml), 2,3µg/ml Doxorubicin, hergestellt durch AK Feldmann (AOC, KIT)

**Thrombin** from bovine plasma (T4648-1KU, Sigma-Aldrich)

**Triton X-100**, Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether, 50 ml (Nr.T8787-50ML, Sigma-Aldrich, München)

**Trypsin-EDTA**, 0,25%, phenol red (Nr.25200-056, Gibco, Life Technologies, Darmstadt)

**Universal-Agarose**, peqGOLD (Nr.732-2788, VWR International)

**Wasserstoffperoxid 30 % (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** (9681.1, Roth)

### qPCR Primer

<b>BPIFA1</b>	<b>F1:</b> AATTTCTCTGCTTGATGGAC
	<b>R1:</b> GAAGGCTTAGACCTTGATGA
	<b>R2:</b> ACAAACTGTAGTCCGTGGAT
<b>KRT4</b>	<b>F1:</b> CCTACCTGAAGAAGAACCAC
	<b>R1:</b> GTCTTGGTGAAGAACCATTC
	<b>R2:</b> CTTCTCTGCCATCTTCTCAT
<b>OMG</b>	<b>F3:</b> ATCCCCAACACCCATGACCC
	<b>R3:</b> GGGTTGTGCTTTGTTGAGGCA
	<b>F8:</b> AACACCCATGACCCTAAGTATC
<b>PLA2G7</b>	<b>F4:</b> CTGCCTGGCTGTGGTTTATCC
	<b>R4:</b> GAATAAGGCCCATTTCCCGG
	<b>F7:</b> GGCTGTGGTTTATCCTTTTACTG
<b>S100A7</b>	<b>F3:</b> TGAGAAGCCAAGCCTGCTGA
	<b>R3:</b> TCGGCGAGGTAATTTGTGCC
	<b>F5:</b> AGCCAAGCCTGCTGACGATG
<b>SCGB2A1</b>	<b>F3:</b> TGAAGCTGCTGATGGTCCTCA
	<b>R3:</b> TCCAGGAGTTTGCAGCCAGA
	<b>F5:</b> TGCTGATGGTCCTCATGCTG
<b>SNTN</b>	<b>F1:</b> CAGTACCCAGGACAAATCTC
	<b>R1:</b> CAGATCTTTGGCAATAGCTT
	<b>R2:</b> TTCTGAAAATCAGAGCAGTG
<b>STC1</b>	<b>F4:</b> TCGTCCAGCTGCCCAATCAC
	<b>R4:</b> AGGATGTGGAAGAGGCTGGC
	<b>F5:</b> CAGCTGCCCAATCACTTCTCC
<b>TF</b>	<b>F1:</b> AAATCAGCTTCTGACCTCAC
	<b>R1:</b> GTATCCCTCTTTGTTGTTGG
	<b>F2:</b> ACAATCTGAAAGGCAAGAAG
<b>TXNIP</b>	<b>F1:</b> CAACCACTCCTCTGCTAGAT
	<b>R1:</b> GTCCAGGAAGAGAGACAAAA
	<b>R2:</b> CTTCTTTTCTCCACATGCT
<b>GAPDH</b>	<b>F3:</b> TGAGAACGGGAAGCTTGTC
	<b>R3:</b> TCTCCATGGTGGTGAAGACG
	<b>R4:</b> TTGCCATGGGTGGAATCATA



## Verbrauchsmaterialien

**μslide 8 well**, ibiTreat (80826, ibidi)

**Eppendorf Safe-Lock Tubes** 1,5 ml/ 2,0 ml, farblos (0030120086 bzw. 0030120094) und 1,5 ml, ambra (Lichtschutz), (0030120191, Eppendorf)

**Falcon Tubes** 15 ml/ 50 ml, PP, konischer Boden, blauer Schraubverschluss (188271/ 210261, Greiner Bio-One)

**Klebefolien**, VHB™ (Scotch™)

**Kryoröhrchen** 2ml, runder Boden, orange, Außengewinde (734-1856, VWR Collection)

**Messpipetten**, SILBERBRAND ETERNA, AR-Glas, DIN EN ISO 835, Typ 3, 5ml/ 10ml (27076/ 27077, Brand GmbH)

**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate** (4346906, Invitrogen™, Life Technologies™)

**Mr.Frosty™ Gefrierbehälter** für 18 1-2 ml Kryoröhrchen, 1°C/min (10110051, Fisher Scientific)

**Novex 10 % Tris-Glycine Gel** (XP00100BOX, Invitrogen™, Life Technologies™)

**Parafilm® M**, 4in.\*250ft (P7668-1EA, Sigma-Aldrich)

**Pasteurpipetten**, Natron-Kalk-Glas (747720, Brand GmbH)

**Perfecta3D® Hanging Drop Plates** (HDP1096-8, 3D Biomatrix)

**Perfusion Set yellow**, 15cm, ID 0,5mm, 2ml (10965, ibidi)

**Pipet boy** Eppendorf Easypet 3 (Nr.4430000018, Eppendorf)

**Pipetten** Eppendorf Research plus, Einkanal, 0,5-10μl, 2-20μl, 10-100μl bzw. 100-1000μl (3120000020, 3120000038, 3120000046 bzw. 3120000062, Eppendorf)

**Pipettenspitzen** Corning DeckWorks, Reload System, 0,1-10μl, Polypropylen (4125, Corning Life Science)

**Pipettenspitzen** Next Generation Reloadsystem, 1-200μl/ 100-1250μl (613-0732/ 613-0738, VWR Collection)

**Polycarbonatfolie**, Belgium, Fluenz 10<sup>6</sup> Ionen/cm<sup>2</sup> (it4ip)

**Spritzen** Injekt 2ml, Luer-Ansatz (4606027V, B.Braun)

**Transwell® Polycarbonate Membrane Insert**, Sterile, 6,5 mm with 5 μm Pore (3421, Corning Incorporated)

**Zählkammer Neubauer Improved**, L.O. LaborOptik (631-1111, VWR International)

**Zellkultur-Flaschen** CELLSTAR, 250ml, 75cm<sup>2</sup>, PS, roter Standard-Schraubverschluss (658170, Greiner Bio-One)

**Zellkultur-Mikroplatte**, PS, F-Boden, 6-well/ 12-well/ 24-well/ 96-well (657160/ 665180/ 662160/ 655180, Greiner Bio-One)

**Zellkultur-Schalen** CELLSTAR, 100\*20mm, (664160, Greiner Bio-One)

## Geräte

**ELISA-Reader** ELx 808 IU, Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc.)

**Ex Demo Units Incubator** C170 (Binder)

**Feinwaage** AB265-S/FACT (Mettler Toledo)

**Floureszenzmikroskop** (invers): Leica DMIL LED

Objektive: HI PLAN : 10x0,25

HI PLAN : 20x0,30

HI PLAN : 40x0,50

**FluorChem M system** (ProteinSimple)

**γ-Strahlungsquelle**: Cobalt 60, Atomic Energy Ltd.

**iBlot®2 Dry Blotting System** (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies)



**Inkubator** C2000 (Labotect)

**Konfokalmikroskop** (invers): Leica TCS SP5 DMI 6000

Objektive: HC PL FLUOTAR 10.0+0.30 DRY

HCX PL APO CS 63.0+1.20 WATER UV

**Konfokalmikroskop** (invers): Leica TCS SPE DMI 4000 B

Objektive: ACS APO 10x0,30 C5 DRY

ACS APO 63x1.30 CS Oil

**Lichtmikroskop** (Olympus)

**Magnetrührer** mit Heizplatte VWR Advanced (VWR International)

**NanoDrop™ 2000/2000c** Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies)

**Plasmaanlage** Atto (Diener)

**Pump-System** ibi pump 2, Fluidic Unit, PumpControl software (ibidi)

**QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System** (Applied Biosystems, Life Technologies)

**SpectraMax M2 Microplate Reader** (Molecular Devices)

**Sterilbank** Biomedis Infinity, Class II Biosafety Cabinet (ESCO)

**Thermoformanlage und Formwerkzeuge** (Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1), KIT)

**Ultraschallbad** Bioruptor Sonication System (Diagenode)

**Zentrifuge** Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech

## Software

Adobe Photoshop CS 6 Extended

Imaris 6.4.2 (Bitplane)

Leica LAS AF Lite (Leica Application Suite, Advanced Fluorescence Lite)

Microsoft Office 2010

Pump Control, Version 1.5,0 (ibidi)

SoftMax Pro 4.7.1



## 7. Abkürzungen

4T1	Murine Epithelzellen eines Brustkarzinoms
ALI	Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit ( <i>air liquid interface</i> )
$\beta$ -SnWO <sub>4</sub>	beta-Form von Zinnwolframat
BPE	<i>Bovine Pituitary Extract, Proteinlösung</i>
BSA-FAF	<i>Bovine Serum Albumin – Fatty Acid Free, Proteinlösung</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus ( <i>threshold cycle</i> )
DESC-1	Transmembran Protease, Serin 11E (auch bezeichnet als TMPRSS11E)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, Standard-Medium zur Kultivierung von Säugerzellen</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N,N',N'',N'''-tetraessigsäure
Dox@AlO(OH)	mit Doxorubicin gefüllte, nanoskalige Hohlkugeln aus Aluminiumoxid-Hydroxid
DPBF	1,3-Diphenylisobenzofuran
DPBS <sup>+/+</sup> , <sup>-/-</sup>	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> , mit oder ohne Zusatz von Calcium und Magnesium
DTPA	Diethylentriamin-Pentacetat
EBM-2	<i>Endothelial Cell Basal Medium-2</i> , Basismedium für Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	<i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i> , Wachstumsmedium für Endothelzellen
EGM-2:DMEM	1:1 Mischung der Medien EGM-2 und DMEM
exoRNA	Exosomale RNA
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fötales Kälberserum ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA-1000	Gentamicin (30 mg/ml), Amphotericin (15 µg/ml), Nutzung 1:1000 verdünnt
Gd <sub>4</sub> <sup>3+</sup> [AIPCS <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> <sup>4-</sup>	anorganisch-organischen Hybrid-Nanopartikel aus Gadolinium und Aluminium-chlorophthalocyanin-Tetrasulfonat
H <sub>4</sub> AIPCS <sub>4</sub>	Aluminiumchlorophthalocyanin-Tetrasulfonat
HAT	Histon Acetyl-Transferase
hEGF	<i>Human Epidermal Growth Factor</i> , Wachstumsfaktor
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HepG2	Humane Leberkarzinomzellen
hFGFb	<i>Human Fibroblast Growth Factor basic</i> , Wachstumsfaktor
HSAEpC	humanen Epithelzellen der Kleinen Atemwege ( <i>Human Small Airway Epithelial Cells</i> )
HUVEC	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene ( <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> )
hVEGF	<i>Human Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Wachstumsfaktor



$\lambda_{\text{abs}}$	Absorptionswellenlänge
$\lambda_{\text{ex}}/ \lambda_{\text{em}}$	Extinktions-/ Emissionswellenlänge
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis 50 % (Dosis eines Stoffs, bei der die Viabilität um 50 % zurückgeht)
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	Tetrazolium Salz zur photometrischen Viabilitätsbestimmung von Zellen
NHDF	Humane Fibroblasten ( <i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i> )
N-IR	Nah-Infrarot
P	Passage primärer Zellen
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PECAM-1	<i>Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
pfu	plaquebildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMS	N-Methyldibenzopyrazin-Methylsulfat
PR8 PA	Gen/ Protein des Influenza A Virus
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RT	Raumtemperatur
R3-IGF-1	<i>Analog of Human Insulin-Like Growth Factor-1</i> , Wachstumsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
SABM	<i>Small Airway Epithelial Cell Basal Medium</i> , Basismedium für Zellen der Kleinen Atemwege
SAGM	<i>Small Airway Epithelial Cell Growth Medium</i> , Wachstumsmedium für Zellen der Kleinen Atemwege
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SMART	<i>Substrate Modification and Replication by Thermoforming</i>
TBST	gepufferte Salzlösung ( <i>Tris-buffered saline with Tween20</i> )
TRITC	Tetramethylrhodamin
<i>vasQchip</i>	mikrofluisches <i>Organ-on-a-Chip</i> -Modell eines Blutgefäßes mit umgebender Gewebe-Kultur, ehemals $\mu$ 3D <sub>V</sub> asc Bioreaktor
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Signalmolekül in der Angiogenese
XTT	Tetrazolium Salz zur photometrischen Viabilitätsbestimmung von Zellen

## 8. Anhang

### Zu Kapitel 4.1. Dox@AIO(OH) Nanopartikel

**Tabelle 5:** Werte der Zytotoxizitätsstudie im vasQchip (Abb. 17)

	HUVEC		HeLa		HepG2	
	MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn
<b>unbehandelt</b>	103,38	9,23	93,88	19,99	92,01	3,69
<b>Doxorubicin</b>	100,63	17,15	84,52	1,74	76,24	3,53
<b>Dox@AIO(OH)</b>	95,16	3,47	72,62	5,00	64,75	19,57

**Tabelle 6:** Werte der Zytotoxizitätsstudie auf der 96er-Zellkulturplatte (Abb. 18)

		HeLa		HepG2		HUVEC	
		MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn
<b>unbehandelt</b>		100,20	11,90	93,18	7,36	97,93	10,32
<b>Doxorubicin</b>	24 h	80,87	11,90	69,91	5,81	75,59	9,06
	48 h	74,16	11,02	47,83	2,78	72,52	9,90
	72 h	58,40	8,85	35,06	5,45	65,83	8,20
<b>Dox@AIO(OH)</b>	24 h	67,18	14,15	62,04	7,20	75,00	9,56
	48 h	66,43	14,02	59,61	6,51	56,49	9,81
	72 h	60,61	12,75	52,43	6,81	35,31	9,86

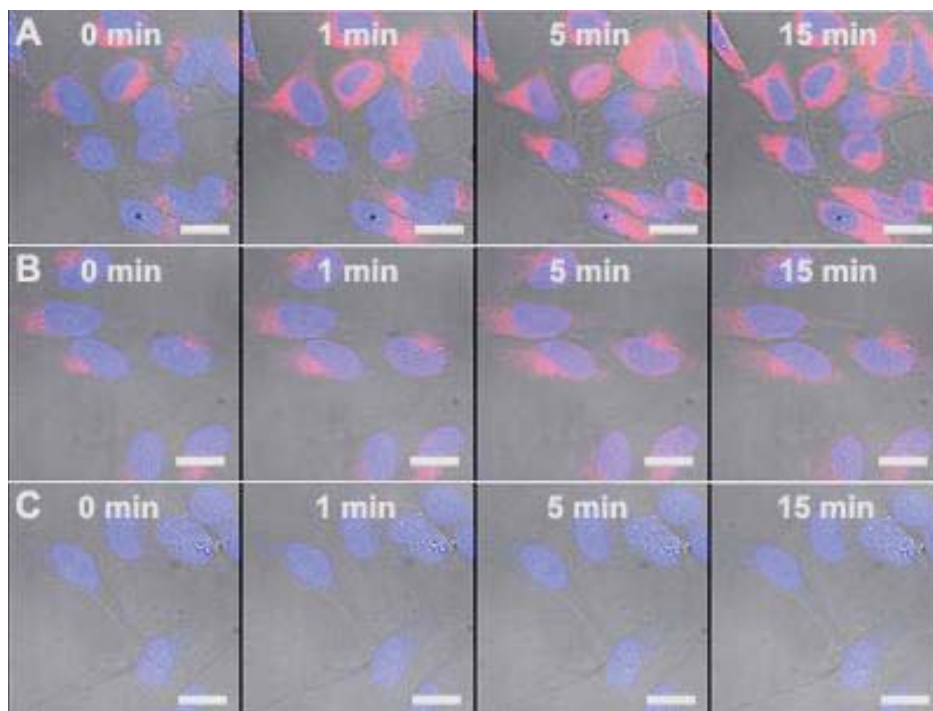
**Tabelle 7:** Werte der Zytotoxizitätsstudie im Transwell®-System (Abb. 20)

	HUVEC		HeLa		HepG2	
	MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn
<b>unbehandelt</b>	93,37	9,61	97,66	22,52	92,16	10,89
<b>Doxorubicin</b>	62,76	9,49	83,47	12,07	82,67	8,12
<b>Dox@AIO(OH)</b>	50,41	9,04	80,91	17,11	81,40	7,73

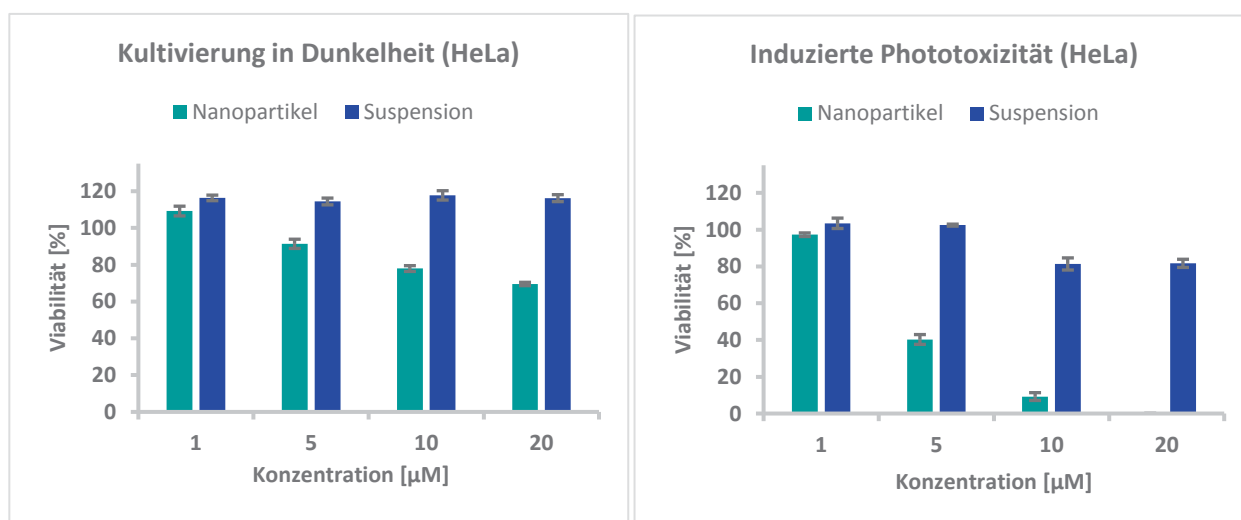
### Zu Kapitel 4.2 Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanopartikel

**Tabelle 8:** Werte der Zytotoxizitätsstudien (Abb. 23 und 77)

		HepG2				HeLa			
		belichtet		unbelichtet		belichtet		unbelichtet	
		MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn
<b>Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AIPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanopartikel</b>	1 µM	89,064	3,094	113,126	2,663	97,235	0,974	109,225	2,642
	5µM	16,705	2,039	88,226	5,321	40,271	2,661	91,396	2,504
	10µM	2,185	1,478	97,084	2,663	9,234	2,121	77,959	1,566
	20µM	0,000	0,232	93,867	2,368	0,000	0,115	69,570	0,910
<b>H<sub>4</sub>AIPCS<sub>4</sub>-Lösung</b>	1 µM	107,003	4,371	125,862	0,523	103,441	2,824	116,365	1,516
	5µM	100,880	1,816	125,039	2,846	102,437	0,544	114,436	1,845
	10µM	81,347	4,121	125,906	2,643	81,328	3,298	117,740	2,540
	20µM	71,310	1,749	131,562	1,728	81,658	2,219	116,238	1,888



**Abbildung 76: Zelluläre Aufnahme und Photoaktivierung in HeLa-Zellen von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln und  $H_4AIPCS_4$ -Lösung.** HeLa-Zellen wurden mit  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln ( $20 \mu M$ ) (A),  $H_4AIPCS_4$ -Lösung ( $20 \mu M$ ) (B) oder unbehandelt (C) für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit Hoechst 33342 ( $2 \mu g/ml$ ) gefärbt, konfokalmikroskopisch untersucht und dabei mit 635 nm-Laserstrahlung für die angegebenen Zeitdauern be-lichtet. Dargestellt sind Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst-Färbung und Photosensibilisa-tor (blau:  $\lambda_{ex}$  405 nm/  $\lambda_{em}$  460-480 nm, rot:  $\lambda_{ex}$  635 nm/  $\lambda_{em}$  640-670 nm) sowie dem Hellfeld. Maßstab  $10 \mu m$



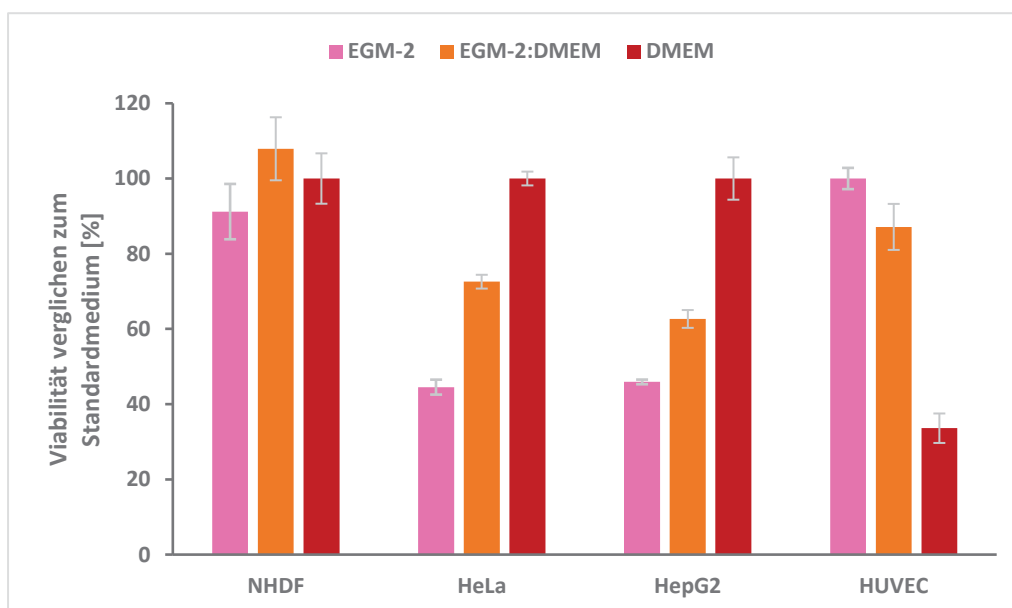
**Abbildung 77: Zytotoxizitätsstudie von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln und  $H_4AIPCS_4$ -Lösung auf HeLa-Zellen.** Dazu wurden die HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 und  $20 \mu M$  von  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikeln (hellblau) oder  $H_4AIPCS_4$ -Lösung (dunkelblau) behandelt und entweder in Dunkelheit inkubiert (links) oder zusätzlich nach 2 h für  $2 \times 5$  min mit 670 nm bestrahlt (rechts), um eine Phototoxizität zu induzieren. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen photometrisch mithilfe des MTT-Reagenz ausgewertet.  $n = 6$



## Zu Kapitel 4.3 Entwicklung am *vasQchip* Modell

**Tabelle 9:** Werte der Wachstumskurven (Abb. 30-34)

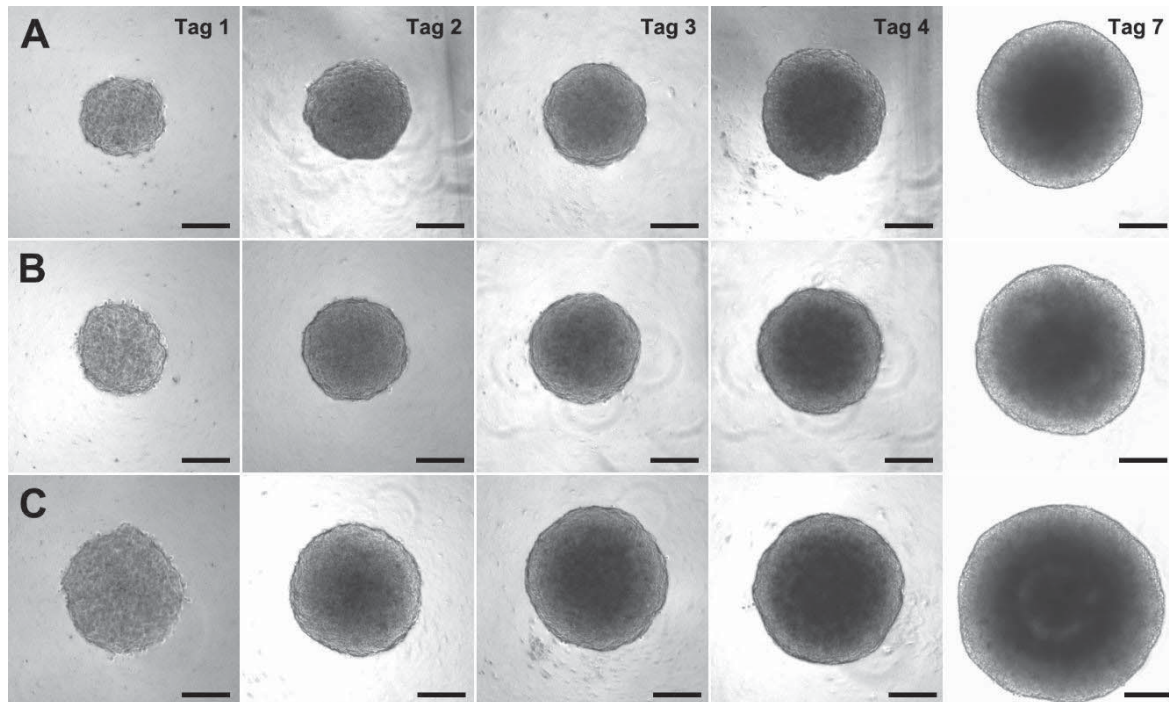
		Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 7	
		MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn
HUVEC	EGM-2	0,154	0,087	0,508	0,420	2,408	1,033	4,920	1,663	6,700	0,819
	DMEM	0,150	0,135	0,142	0,108	0,179	0,176	0,292	0,182	0,267	0,221
	EGM-2:DMEM 1:1	0,133	0,149	0,621	0,334	1,378	0,548	3,743	0,907	5,733	1,113
NHDF	EGM-2	0,600	0,439	1,938	1,284	3,592	1,524	6,475	2,363	17,958	3,341
	DMEM	1,329	0,463	1,838	0,577	2,583	0,707	4,100	1,085	6,813	1,360
	EGM-2:DMEM 1:1	0,771	0,385	2,413	0,790	5,271	2,233	9,092	1,823	20,500	7,918
HeLa	EGM-2	1,317	0,490	1,729	0,714	3,242	1,306	12,583	3,078	39,292	8,419
	DMEM	1,054	0,665	1,925	0,882	3,092	1,191	15,813	4,493	61,833	10,242
	EGM-2:DMEM 1:1	0,929	0,483	1,913	0,750	3,946	1,333	14,708	3,955	62,583	9,305
HepG2	EGM-2	0,492	0,355	1,750	0,838	6,196	2,087	18,667	4,670	60,833	12,178
	DMEM	0,692	0,415	0,775	0,568	5,075	1,464	30,563	8,060	104,208	12,097
	EGM-2:DMEM 1:1	0,246	0,187	2,013	0,735	9,125	2,300	35,146	6,869	79,500	11,633



**Abbildung 78:** Viabilitätsstudie von NHDF, HeLa-, HepG2-Zellen und HUVEC in verschiedenen Medien. NHDF, HeLa-, HepG2-Zellen und HUVEC wurden in EGM-2, DMEM oder einer 1:1 Mischung aus EGM-2 und DMEM (EGM-2:DMEM) ausgesät und für 72 h inkubiert. Anschließend wurde ihre Viabilität photometrisch mithilfe des MTT-Reagens ausgewertet und in Relation zum Wert des jeweiligen Standardmediums (entspr. 100 %) gesetzt.  $n = 4$

**Tabelle 10:** Werte der Viabilitätsstudie (Abb. 78)

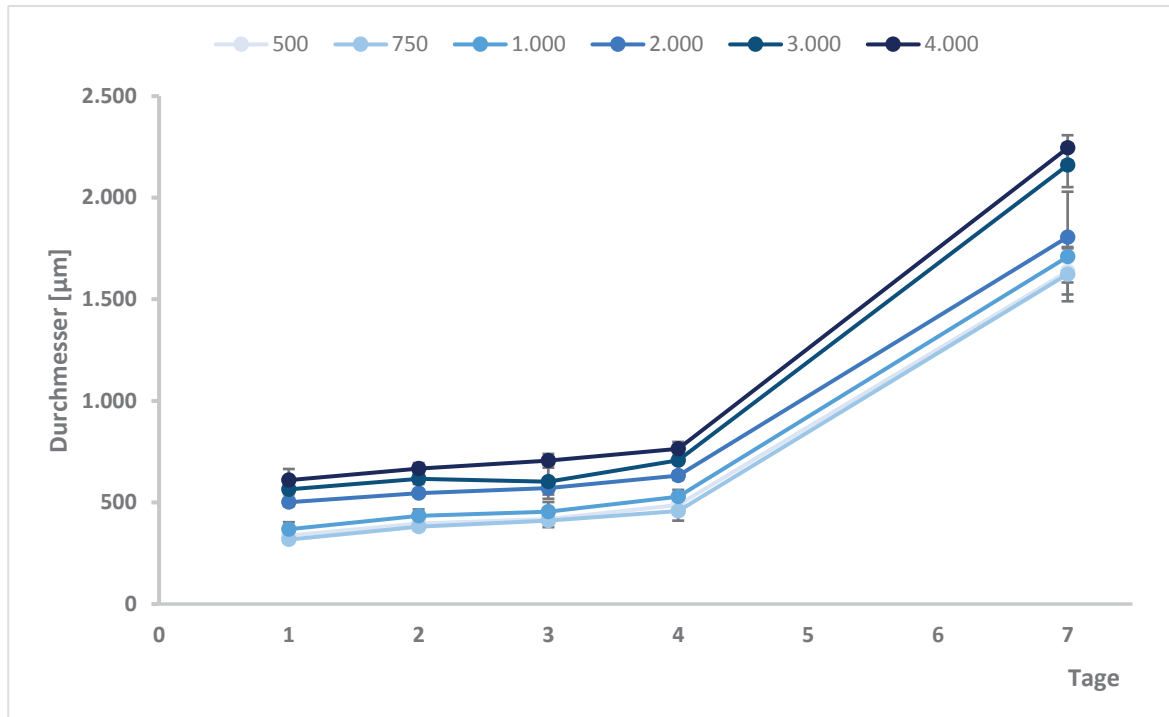
	EGM-2		EGM-2:DMEM		DMEM	
	MW	Stabwn	MW	Stabwn	MW	Stabwn
<b>NHDF</b>	91,20	7,36	107,90	8,38	100,00	6,70
<b>HeLa</b>	44,53	1,99	100,00	1,84	72,57	1,83
<b>HepG2</b>	45,92	0,62	62,66	2,37	100,00	5,63
<b>HUVEC</b>	100,00	2,83	87,13	6,12	33,60	3,92



**Abbildung 79: Wachstum von HepG2-Sphäroiden.** In Agarose-beschichtete Zellkultur-Platten wurden HepG2-Zellen in verschiedenen Zellzahlen ausgesät und über mehrere Tage als Sphäroide kultiviert. Das Wachstum wurde lichtmikroskopisch verfolgt und beispielhaft für drei Anfangsgrößen dargestellt (500 (A), 1.000 (B) 2.000 (C) Zellen). Maßstab 200  $\mu\text{m}$

**Tabelle 11:** Werte zur Wachstumskurve von HepG2-Sphäroiden (Abb. 80), Angaben in [ $\mu\text{m}$ ]

	Zellzahl:	500	750	1.000	2.000	3.000	4.000
<b>Tag 1</b>	MW	337,15	317,11	368,15	501,05	564,40	609,67
	Stabwn	36,45	11,59	34,61	20,48	24,45	55,05
<b>Tag 2</b>	MW	396,07	380,20	434,27	545,35	616,02	665,98
	Stabwn	32,13	7,06	31,43	9,11	25,51	28,11
<b>Tag 3</b>	MW	418,43	410,34	455,10	571,41	602,85	705,04
	Stabwn	39,97	10,75	47,04	32,45	84,75	33,84
<b>Tag 4</b>	MW	487,5	457,72	528,19	631,97	706,62	763,92
	Stabwn	45,04	47,24	33,74	21,19	12,17	34,15
<b>Tag 7</b>	MW	1.637,22	1.623,78	1.709,19	1.806,10	2.159,83	2244,67
	Stabwn	113,41	133,66	89,48	223,38	107,87	62,82



**Abbildung 80: Wachstumskurve von HepG2-Sphäroiden.** In Agarose-beschichtete Zellkultur-Platten wurden HepG2-Zellen in verschiedenen Zellzahlen ausgesät (Tag 0, 500 bis 4.000 Zellen) und über mehrere Tage als Sphäroide kultiviert. Das Wachstum wurde lichtmikroskopisch verfolgt und die Durchmesser der gebildeten Sphäroide an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 vermessen. n = 5

## Zu Kapitel 4.4 Modell der Kleinen Atemwege in der Lunge

**Tabelle 12: Werte zur Analyse der Differenzierung von HSAEpC (Donor 1) über die exosomale RNA (Abb. 48)**

		BPIFA1	KRT14	OMG	PLA2G7	SCGB2A1	SNTN	STC1	S100A7	TF	TXNIP	GAPDH
Tag 0	MW	35,55	22,45	25,78	-	38,57	-	36,41	26,92	36,63	27,16	19,28
	Stabwn	0,52	0,79	0,93	-	1,52	-	2,41	-	0,62	-	0,57
Tag 2	MW	24,26	23,52	24,64	-	38,82	-	36,27	26,96	38,29	28,00	19,34
	Stabwn	0,59	0,27	1,16	-	1,36	-	1,44	-	2,02	1,08	0,33
Tag 8	MW	25,12	31,46	23,49	-	40,42	-	36,24	43,75	38,00	27,46	21,96
	Stabwn	1,85	1,44	1,10	-	1,72	-	3,03	-	2,48	0,49	0,77
Tag 28	MW	24,80	31,11	22,92	-	37,68	-	35,15	41,46	33,52	29,41	23,33
	Stabwn	1,62	1,24	0,19	-	2,82	-	2,09	-	5,28	3,82	0,65

**Tabelle 13: Werte zur Analyse der Differenzierung von HSAEpC (Donor 2) über die exosomale RNA (Abb. 49)**

		BPIFA1	KRT14	OMG	PLA2G7	SCGB2A1	SNTN	STC1	S100A7	TF	TXNIP	GAPDH
Tag 0	MW	-	21,76	26,21	-	43,39	-	35,38	31,24	-	25,79	18,57
	Stabwn	-	1,13	0,63	-	0,49	-	3,10	6,46	-	1,80	0,99
Tag 2	MW	36,47	24,40	20,96	-	37,29	-	35,71	27,23	-	26,67	18,19
	Stabwn	1,10	1,47	1,07	-	1,63	-	-	-	-	1,04	0,70
Tag 8	MW	25,35	27,47	19,94	-	36,97	-	31,41	34,73	-	23,90	19,84
	Stabwn	2,12	0,80	0,22	-	4,35	-	1,87	-	-	3,29	1,34
Tag 28	MW	25,25	28,69	21,10	-	41,44	-	38,52	-	-	25,80	21,52
	Stabwn	2,98	1,57	0,37	-	-	-	1,88	-	-	-	0,47

**Tabelle 14:** Werte zur Änderung der genetischen Marker während der Differenzierung von HSAEpC (Abb. 50)

	BPIFA1	KRT14	OMG	SCGB2A1	STC1	S100A7	TF	TXNIP
<b>Tag 0</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Tag 2</b>	25,45	0,25	8,22	6,83	0,84	3,57	0,33	0,50
<b>Tag 8</b>	3891,36	0,02	76,44	19,20	16,56	0,00	2,48	6,83
<b>Tag 28</b>	12982,76	0,05	178,53	30,23	5,92	0,00	142,31	5,18

**Tabelle 15:** Werte zur Analyse der Wundheilung einer HSAEpC-Schicht über die exosomale RNA (Abb. 51)

		BPIFA1	KRT14	OMG	PLA2G7	SCGB2A1	SNTN	STC1	S100A7	TF	TXNIP	GAPDH
<b>Tag 2</b>	MW	26,42	30,89	22,98	-	31,66	-	34,54	-	41,33	27,94	23,91
	Stabwn	0,77	-	0,03	-	4,75	-	1,75	-	3,55	-	0,87
<b>Tag 4</b>	MW	33,48	30,26	21,80	-	37,97	-	34,30	-	34,28	25,91	22,77
	Stabwn	-	0,17	0,27	-	0,73	-	0,65	-	0,02	1,28	0,22
<b>Tag 6</b>	MW	27,15	29,42	19,46	-	37,00	-	31,41	-	36,49	19,85	20,83
	Stabwn	-	1,59	0,51	-	4,61	-	0,30	-	0,22	0,00	0,93
<b>Tag 8</b>	MW	26,14	29,68	20,54	-	37,97	-	35,68	-	34,90	25,25	22,16
	Stabwn	-	0,39	0,80	-	3,41	-	0,78	-	0,03	1,32	1,19
<b>Tag 14</b>	MW	28,32	29,03	20,76	-	34,73	-	34,80	-	38,85	19,85	22,65
	Stabwn	3,04	0,89	0,54	-	2,95	-	0,41	-	4,65	-	0,88
<b>Tag 21</b>	MW	25,74	27,18	20,38	-	34,11	-	34,80	-	35,11	25,31	22,49
	Stabwn	2,13	0,62	0,49	-	1,18	-	4,11	-	1,09	0,31	0,58
<b>Tag 49</b>	MW	37,07	33,95	24,94	-	37,53	-	37,82	-	36,90	29,30	23,94
	Stabwn	-	3,41	0,17	-	2,41	-	0,82	-	3,48	0,83	0,11

**Tabelle 16:** Werte zur Änderung der genetischen Marker während Wundheilung (links) bzw. durch Verwundung und Wundheilung einer HSAEpC-Schicht (rechts) (Abb. 52, 53)

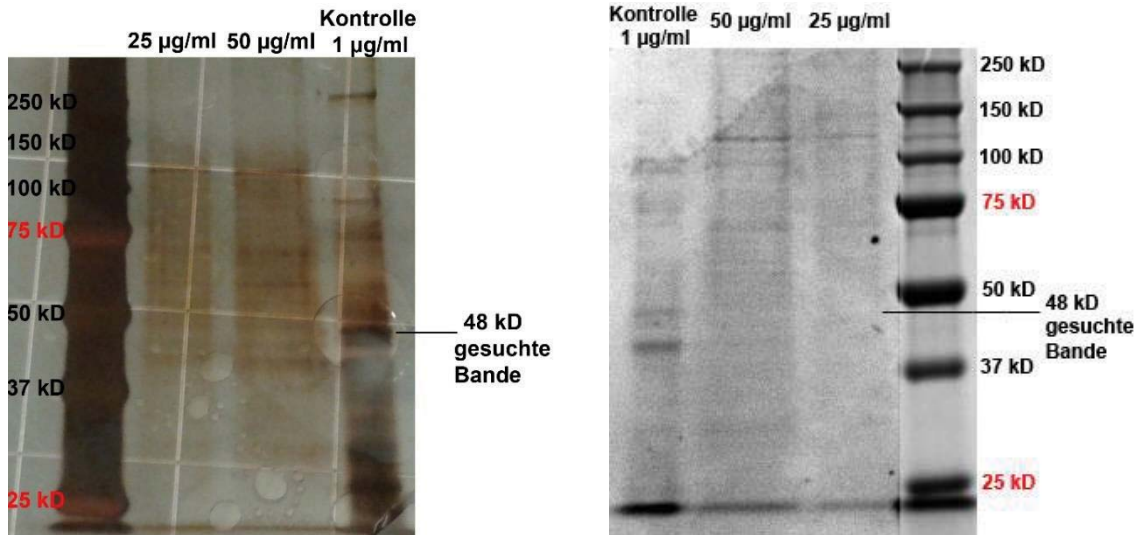
	BPIFA1	KRT14	OMG	TXNIP		BPIFA1	KRT1	OMG	TXNIP
<b>Tag 0</b>					<b>Tag 0</b>	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Tag 2</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	<b>Tag 2</b>	1,06	0,77	1,44	1,21
<b>Tag 4</b>	0,00	1,28	1,02	3,40	<b>Tag 4</b>	0,00	0,99	1,47	4,13
<b>Tag 6</b>	0,14	0,00	0,00	0,00	<b>Tag 6</b>	0,14	0,00	0,00	0,00
<b>Tag 8</b>	0,16	1,26	1,61	3,51	<b>Tag 8</b>	0,17	0,97	2,32	4,25
<b>Tag 14</b>	0,11	2,76	1,94	2,04	<b>Tag 14</b>	0,12	2,13	2,79	2,47
<b>Tag 21</b>	0,60	8,95	2,26	4,21	<b>Tag 21</b>	0,64	6,90	3,25	5,11
<b>Tag 49</b>	0,02	0,22	0,39	1,05	<b>Tag 49</b>	0,02	0,17	0,56	1,28

**Tabelle 17:** Werte zur Änderung der genetischen Marker während der Differenzierung von HSAEpC in fluidischen Chips (Abb. 54)

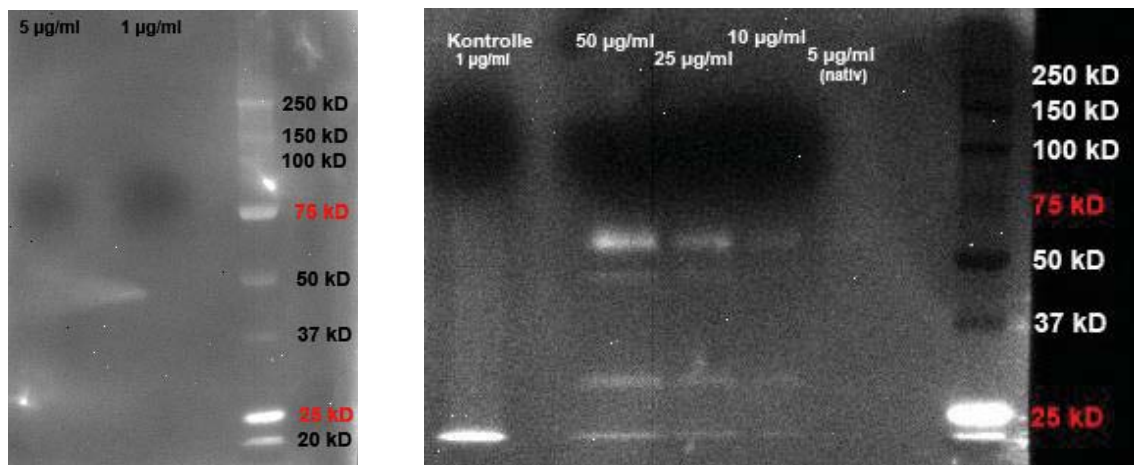
	BPIFA1	KRT14	OMG	PLA2G7	SCGB2A1	SNTN	STC1	S100A7	TF	TXNIP
<b>Chip "gesund"</b>	-	-	0,645	-	0,00218	-	0,000708	0,000018	0,000128	-
<b>Chip "COPD"</b>	-	0,0115	0,140	-	0,000128	-	-	0,000003	-	-
<b>Transwell®-Filter "Differenzierung"</b>	0,165	0,00561	1,334	-	0,000007	-	0,000046	0,000003	0,000853	0,0276
<b>Transwell®-Filter "Wundheilung"</b>	0,00291	0,000944	0,746	-	0,000042	-	0,000008	0,000003	0,000131	0,0353

**Tabelle 18:** Werte zur Bestimmung der Virus-Infektion durch Analyse der viralen RNA (Abb. 55, 56)

Änderung aufgenommener virale RNA			
durch Zugabe des HAT blockierenden Peptids		durch Substanzen einer Bibliothek	
1 $\mu$ M	1,05	# 89	0,099
10 $\mu$ M	1,77	# 101	0,793
100 $\mu$ m	3,81	# 105	0,015



**Abbildung 81:** Silber- und Coomassie-Blau-Färbung der Protein-Probe. Nach der Gelelektrophorese wurden eine Silber- (links) sowie eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt (rechts), um vorhandene Protein-Strukturen sichtbar zu machen. Aufgeführt sind jeweils 3 Proben sowie die DNA-Leiter aus molekularen Markern.



**Abbildung 82:** Western Blot der Protein-Probe. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran übertragen. Auf diesem Western Blot erfolgte die Untersuchung des Proteins DESC-1 mittels Immuno-Detektion. Aufgeführt sind zunächst 2 Proben (rechts) und im zweiten Blot 5 Proben sowie jeweils die DNA-Leiter aus molekularen Markern.

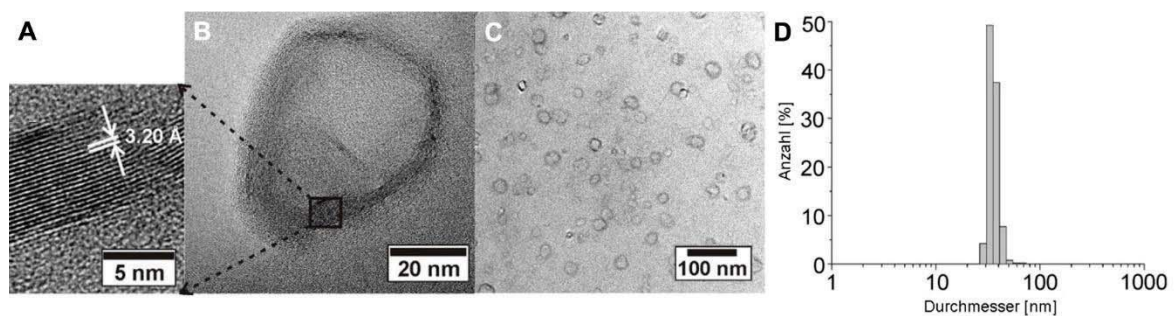
**Tabelle 19:** Werte zur Überprüfung der Protein-Funktionalität (Abb. 58)

	Trypsin [ $\mu$ g/ml]					Probe		
	5	10	15	20	25	50%ig	20%ig	10%ig
MW	3.263,5	6.433,5	10.675,5	14.061,5	16.742,5	2945,5	488,0	65,0
Stabwn	681,8	720,5	1.382,1	803,2	1.248,4	499,5	145,4	11,8

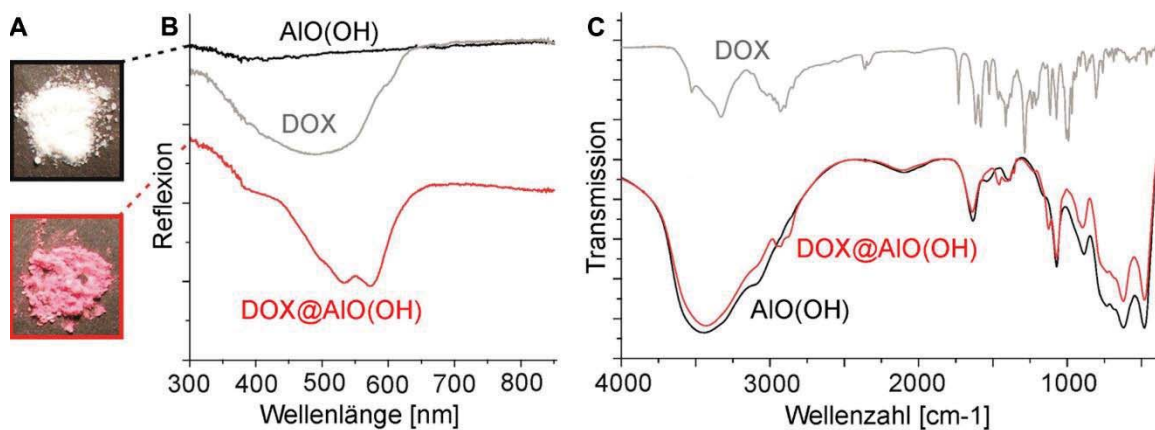
## Zu Kapitel 6 Methoden

**Tabelle 20:** Aminosäure-Sequenz des Zielproteins DEPC-1

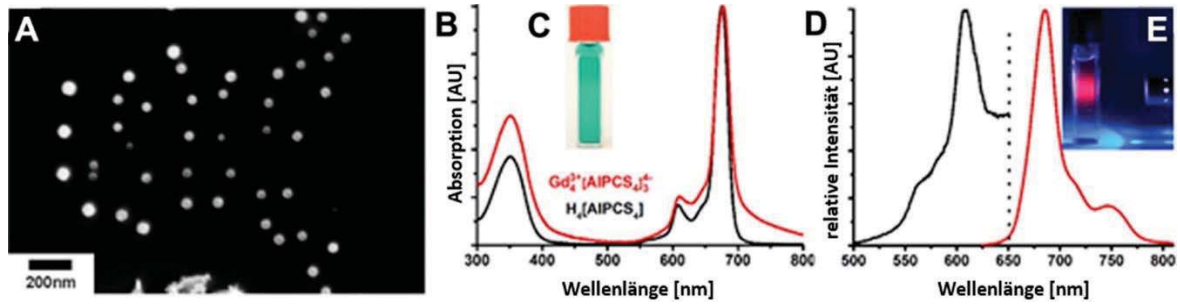
MMYRPDVVRARKRVCWEPWVIGLVIFISLIVLAVCIGLTVHYVRYNQKKTYYNYSTLSFTTDKLYAEFGREAS  
 NNFTEMSQRLESMVKNAFYKSPLEEFVKSQVIKFSQQKHGVLAHMLLICRFHSTEDPETVDKIVQLVLHEKL  
 QDAVGPPKVDPHSVKIKKINKTETDSYLNHCCGTRRSKTLGQSLRIVGGTEVEEGEWPWQASLQWDGSHRC  
 GATLINATWLVSAAHCFTTYKNPARWTASFVGTIKPSKMKRGLRRIIVHEKYKHPSHDYDISLAELSSPVPTN  
 AVHRVCLPDASYEFQPGDVMFVTGFGALKNDGYSQNHRLRQAQVTLIDATTCNEPQAYNDAITPRMLCAGS  
 LEGKTDACQGDSSGGLVSSDARDIWYLAGIVSWGDECAKPNKPGVYTRVTALRDWITSKTGI



**Abbildung 83:** Charakterisierung der Dox@AIO(OH) Nanopartikel. (nach S. Simonato, 2014<sup>264</sup>) Aufnahmen der mit Doxorubicin gefüllten AIO(OH) Hohlkugeln mit dem Transmissionselektronen-Mikroskop (TEM) (A, B, C) sowie eine Ermittlung der Größenverteilung mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) (D).



**Abbildung 84:** Optische Eigenschaften der Dox@AIO(OH) Nanopartikel. (nach S. Simonato, 2014<sup>264</sup>) Abbildungen der ungefüllten sowie der gefüllten Nanopartikel als getrocknetes Pulver (A) sowie das UV-Vis-Spektrum (B) und das FT-IR-Spektrum (C) der Dox@AIO(OH) Nanopartikel im Vergleich mit ungefüllten AIO(OH) Nanopartikeln und freiem Doxorubicin.



**Abbildung 85: Charakterisierung der  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel.** (nach M. Poß<sup>180,c</sup>) Darstellung der Partikelgröße und der Größenverteilung mittels Rasterelektronen-Mikroskop (REM) (A) sowie das UV-VIS-Spektrum der  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel im Vergleich zu  $H_4AIPCS_4$ -Lösung (B) und die Anregungs- und Emissionsspektren der Nanopartikel (D). Daneben sind Aufnahmen der wässrigen  $Gd_4^{3+}[AIPCS_4]_3^{4-}$  Nanopartikel-Suspension (B) sowie die Emission der Probe bei Bestrahlung (E) abgebildet.

<sup>c</sup> Adapted with permission from Poß, M.; Zittel, E.; Seidl, C.; Meschkov, A.; Munoz, L.; Schepers, U.; Feldmann, C.; *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1801074. Copyright © 2018 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



## Literatur

1. Steer, C. J.; Jackson, P. R.; Hornbeak, H.; McKay, C. K.; Sriramarao, P.; Murtaugh, M. P. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2017**, 1404, (1), 3-16.
2. Poewe, W.; Seppi, K.; Tanner, C. M.; Halliday, G. M.; Brundin, P.; Volkman, J.; Schrag, A. E.; Lang, A. E. *Nature reviews. Disease primers* **2017**, 3, 17013.
3. Hane, F. T.; Robinson, M.; Lee, B. Y.; Bai, O.; Leonenko, Z.; Albert, M. S. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2017**, 57, (3), 645-665.
4. Daar, E. S. *F1000Research* **2017**, 6, 759.
5. Bayat Mokhtari, R.; Homayouni, T. S.; Baluch, N.; Morgatskaya, E.; Kumar, S.; Das, B.; Yeger, H. *Oncotarget* **2017**, 8, (23), 38022-38043.
6. Relich, R. F.; Loeffelholz, M. *Clinics in laboratory medicine* **2017**, 37, (2), 253-267.
7. Song, B. H.; Yun, S. I.; Woolley, M.; Lee, Y. M. *Journal of neuroimmunology* **2017**, 308, 50-64.
8. Simoes, N. G.; Bettencourt, A. F.; Monge, N.; Ribeiro, I. A. C. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2017**, 17, (14), 1364-1376.
9. Schon, T.; Miotto, P.; Koser, C. U.; Viveiros, M.; Bottger, E.; Cambau, E. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2017**, 23, (3), 154-160.
10. Gillings, M. R.; Paulsen, I. T.; Tetu, S. G. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2017**, 1388, (1), 92-107.
11. Ware, B. R.; Khetani, S. R. *Trends Biotechnol* **2017**, 35, (2), 172-183.
12. Kola, I.; Landis, J. *Nature reviews. Drug discovery* **2004**, 3, (8), 711-5.
13. Kaitin, K. I. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2010**, 87, (3), 356-361.
14. Mullard, A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, 14, 807.
15. vfa. Die forschenden Pharma-Unternehmen. <https://www.vfa.de/de/arsneimittel-forschung/so-funktioniert-pharmaforschung/so-entsteht-ein-medikament.html> (10/2017),
16. BfArM - Arzneimittelentwicklung. [https://www.bfarm.de/DE/Buerger/Arzneimittel/Arzneimittelentwicklung/\\_node.html](https://www.bfarm.de/DE/Buerger/Arzneimittel/Arzneimittelentwicklung/_node.html) (10/2017),
17. Sievers, S. W., Herbert Max-Planck-Gesellschaft - Wirkstoffforschung im Hochdurchsatz. [https://www.mpg.de/10885238/moph\\_jb\\_20162](https://www.mpg.de/10885238/moph_jb_20162) (12/2017),
18. Hay, M.; Thomas, D. W.; Craighead, J. L.; Economides, C.; Rosenthal, J. *Nature biotechnology* **2014**, 32, 40.
19. Arrowsmith, J. *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, 10, (5), 328-9.
20. Arrowsmith, J. *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, 10, (2), 87.
21. McKane, A.; Sima, C.; Ramanathan, R. K.; Jameson, G.; Mast, C.; White, E.; Fleck, S.; Downhour, M.; Von Hoff, D. D.; Weiss, G. J. *Investigational new drugs* **2013**, 31, (3), 774-9.
22. Jouan, A., Drame de Rennes : le protocole de l'essai clinique en accusation. [lefigaro.fr](http://lefigaro.fr): Jan 2016.
23. Sator, C., TeGenero-Skandal: Das Spiel mit der Gesundheit. PZ online: Mar 2007.
24. Olson, H.; Betton, G.; Robinson, D.; Thomas, K.; Monro, A.; Kolaja, G.; Lilly, P.; Sanders, J.; Sipes, G.; Bracken, W.; Dorato, M.; Van Deun, K.; Smith, P.; Berger, B.; Heller, A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2000**, 32, (1), 56-67.
25. Prinz, F.; Schlange, T.; Asadullah, K. *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, 10, (9), 712.
26. Harrison, R. G. *J. Exp. Zool.* **1910**, 9, 787 - 846.
27. Harrison, R. G. *Anat. Rec.* **1912**, 6, 181 - 193.
28. Ericsson, A. C.; Crim, M. J.; Franklin, C. L. *Missouri medicine* **2013**, 110, (3), 201-5.
29. Kirn, D.-C.; Burton, P. S.; Borchardt, R. T. *Pharmaceutical research* **1993**, 10, (12), 1710-1714.
30. Poulin, P.; Chen, Y.-H.; Ding, X.; Gould, S. E.; Hop, C. E.; Messick, K.; Oeh, J.; Liederer, B. M. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, 104, (4), 1508-1521.
31. Zhang, D.; Luo, G.; Ding, X.; Lu, C. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2012**, 2, (6), 549-561.





32. Denayer, T.; Stöhr, T.; Van Roy, M. *New Horizons in Translational Medicine* **2014**, 2, (1), 5-11.
33. Kelland, L. R. *European Journal of Cancer* **2004**, 40, (6), 827-836.
34. McGonigle, P.; Ruggeri, B. *Biochemical Pharmacology* **2014**, 87, (1), 162-171.
35. Olson, H.; Betton, G.; Robinson, D.; Thomas, K.; Monro, A.; Kolaja, G.; Lilly, P.; Sanders, J.; Sipes, G.; Bracken, W.; Dorato, M.; Van Deun, K.; Smith, P.; Berger, B.; Heller, A. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **2000**, 32, (1), 56-67.
36. Shanks, N.; Greek, R.; Greek, J. *Philosophy, ethics, and humanities in medicine : PEHM* **2009**, 4, 2.
37. Harrison, R. H.; St-Pierre, J. P.; Stevens, M. M. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **2014**, 20, (1), 1-16.
38. Wobma, H.; Vunjak-Novakovic, G. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **2016**, 22, (2), 101-13.
39. Baker, B. M.; Chen, C. S. *Journal of cell science* **2012**, 125, (Pt 13), 3015-24.
40. Duval, K.; Grover, H.; Han, L. H.; Mou, Y.; Pegoraro, A. F.; Fredberg, J.; Chen, Z. **2017**, 32, (4), 266-277.
41. 3DCellCulture - Just the Facts.  
[http://3dcellculture.com/Just\\_The\\_Facts\\_3D\\_vs\\_2D\\_Cell\\_Culture](http://3dcellculture.com/Just_The_Facts_3D_vs_2D_Cell_Culture) (10/2017),
42. Fang, Y.; Eglén, R. M. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* **2017**, 22, (5), 456-472.
43. Ravi, M.; Paramesh, V.; Kaviya, S. R.; Anuradha, E.; Solomon, F. D. *Journal of cellular physiology* **2015**, 230, (1), 16-26.
44. Giselbrecht, S.; Gottwald, E.; Truckenmueller, R.; Trautmann, C.; Welle, A.; Guber, A.; Saile, V.; Gietzelt, T.; Weibezahn, K. F. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2008**, (15).
45. 3DCellCulture.com - Big Picture 3D vs 2D Cell Culture.  
[http://3dcellculture.com/Big\\_Picture\\_3D\\_vs\\_2D\\_Cell\\_Culture](http://3dcellculture.com/Big_Picture_3D_vs_2D_Cell_Culture) (10/2017),
46. Huebsch, N.; Arany, P. R.; Mao, A. S.; Shvartsman, D.; Ali, O. A.; Bencherif, S. A.; Rivera-Feliciano, J.; Mooney, D. J. *Nature materials* **2010**, 9, (6), 518-26.
47. Nakasone, E. S.; Askautrud, H. A.; Kees, T.; Park, J. H.; Plaks, V.; Ewald, A. J.; Fein, M.; Rasch, M. G.; Tan, Y. X.; Qiu, J.; Park, J.; Sinha, P.; Bissell, M. J.; Frengen, E.; Werb, Z.; Egeblad, M. *Cancer cell* **2012**, 21, (4), 488-503.
48. Shin, Y.; Han, S.; Jeon, J. S.; Yamamoto, K.; Zervantonakis, I. K.; Sudo, R.; Kamm, R. D.; Chung, S. *Nature protocols* **2012**, 7, (7), 1247-59.
49. Pampaloni, F.; Reynaud, E. G.; Stelzer, E. H. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2007**, 8, (10), 839-45.
50. Altmann, B.; Giselbrecht, S.; Weibezahn, K. F.; Welle, A.; Gottwald, E. *Biomedical materials* **2008**, 3, (3), 034120.
51. Greiner, A. M.; Klein, F.; Gudzenko, T.; Richter, B.; Striebel, T.; Wundari, B. G.; Autenrieth, T. J.; Wegener, M.; Franz, C. M.; Bastmeyer, M. *Biomaterials* **2015**, 69, 121-32.
52. Greiner, A. M.; Richter, B.; Bastmeyer, M. *Macromolecular bioscience* **2012**, 12, (10), 1301-14.
53. Lee, S. H.; Shim, K. Y.; Kim, B.; Sung, J. H. *Biotechnology progress* **2017**, 33, (3), 580-589.
54. Naahidi, S.; Jafari, M.; Logan, M.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Bae, H.; Dixon, B.; Chen, P. *Biotechnology advances* **2017**, 35, (5), 530-544.
55. Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A. **2017**, 356, (6337).
56. Caliri, S. R.; Burdick, J. A. *Nature methods* **2016**, 13, (5), 405-414.
57. Seliktar, D. *Science* **2012**, 336, (6085), 1124-1128.
58. Abbott, A. *Nature* **2003**, 424, (6951), 870-2.
59. Achilli, T. M.; Meyer, J.; Morgan, J. R. *Expert opinion on biological therapy* **2012**, 12, (10), 1347-60.
60. Lin, R. Z.; Chang, H. Y. *Biotechnology journal* **2008**, 3, (9-10), 1172-84.
61. Hamilton, G. *Cancer letters* **1998**, 131, (1), 29-34.
62. Jubb, A. M.; Pham, T. Q.; Hanby, A. M.; Frantz, G. D.; Peale, F. V.; Wu, T. D.; Koeppen, H. W.; Hillan, K. J. *Journal of clinical pathology* **2004**, 57, (5), 504-12.
63. Masoud, G. N.; Li, W. *Acta pharmaceutica Sinica. B* **2015**, 5, (5), 378-89.



64. Hatherell, K.; Couraud, P. O.; Romero, I. A.; Weksler, B.; Pilkington, G. J. *Journal of neuroscience methods* **2011**, 199, (2), 223-9.
65. Chalubinski, M.; Wojdan, K.; Gorzelak, P.; Borowiec, M.; Broncel, M. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2014**, 69, 289-93.
66. Xu, C.; Sun, G.; Yang, J.; Sun, Q.; Tong, Z. *Cell biology international* **2015**, 39, (5), 548-53.
67. Ponath, P. D.; Wang, J.; Heath, H. *Methods in molecular biology* **2000**, 138, 113-20.
68. Justus, C. R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L. V. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2014**, (88).
69. Marshall, J. *Methods in molecular biology* **2011**, 769, 97-110.
70. Zhao, S.; Yuan, L.; Wang, J.; Zhang, X.; He, Z.; Zhang, Q. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2012**, 35, (3), 335-45.
71. David, M. S.; Kelly, E.; Zoellner, H. *Cytokine* **2013**, 62, (1), 48-51.
72. Obi, S.; Masuda, H.; Shizuno, T.; Sato, A.; Yamamoto, K.; Ando, J.; Abe, Y.; Asahara, T. *American journal of physiology. Cell physiology* **2012**, 303, (6), C595-606.
73. Frame, M. D.; Sarelius, I. H. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* **2000**, 7, (6 Pt 1), 419-27.
74. Hebeiss, I.; Truckenmuller, R.; Giselsbrecht, S.; Schepers, U. *Lab on a chip* **2012**, 12, (4), 829-34.
75. Huh, D.; Hamilton, G. A.; Ingber, D. E. *Trends in Cell Biology* **2011**, 21, (12), 745-754.
76. Esch, E. W.; Bahinski, A.; Huh, D. *Nature reviews. Drug discovery* **2015**, 14, (4), 248-60.
77. Huh, D.; Kim, H. J.; Fraser, J. P.; Shea, D. E.; Khan, M.; Bahinski, A.; Hamilton, G. A.; Ingber, D. E. *Nature protocols* **2013**, 8, (11), 2135-57.
78. Perestrelo, A. R.; Aguas, A. C.; Rainer, A.; Forte, G. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2015**, 15, (12), 31142-70.
79. Maschmeyer, I.; Lorenz, A. K.; Schimek, K.; Hasenberg, T.; Ramme, A. P.; Hubner, J.; Lindner, M.; Drewell, C.; Bauer, S.; Thomas, A.; Sambo, N. S.; Sonntag, F.; Lauster, R.; Marx, U. *Lab on a chip* **2015**, 15, (12), 2688-99.
80. Kwak, B.; Ozcelikkale, A.; Shin, C. S.; Park, K.; Han, B. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, 194, 157-67.
81. Kim, H. J.; Li, H.; Collins, J. J.; Ingber, D. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, 113, (1), E7-15.
82. Huh, D. D. *Annals of the American Thoracic Society* **2015**, 12 Suppl 1, S42-4.
83. Herland, A.; van der Meer, A. D.; FitzGerald, E. A.; Park, T. E.; Sleeboom, J. J.; Ingber, D. E. *PloS one* **2016**, 11, (3), e0150360.
84. Lee, J. S.; Romero, R.; Han, Y. M.; Kim, H. C.; Kim, C. J.; Hong, J. S.; Huh, D. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* **2016**, 29, (7), 1046-54.
85. Huh, J. S. D., A HUMAN BLINKING 'EYE-ON-A-CHIP' In *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, San Antonio, TX, USA, 2014.
86. Loskill, P.; Marcus, S. G.; Mathur, A.; Reese, W. M.; Healy, K. E. *PloS one* **2015**, 10, (10), e0139587.
87. Zhang, B.; Radisic, M. *Lab on a chip* **2017**, 17, (14), 2395-2420.
88. Abaci, H. E.; Shuler, M. L. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **2015**, 7, (4), 383-91.
89. Materne, E. M.; Maschmeyer, I.; Lorenz, A. K.; Horland, R.; Schimek, K. M.; Busek, M.; Sonntag, F.; Lauster, R.; Marx, U. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2015**, (98), e52526.
90. Frame, M. D.; Chapman, G. B.; Makino, Y.; Sarelius, I. H. *Biorheology* **1998**, 35, (4-5), 245-61.
91. Hebeiß, I. Etablierung eines mikrofluidischen 3D-Bioreaktors zur Untersuchung des transendothelialen Transports "in vitro". Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2012.



92. Ivannikov, D. In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2016.
93. DKFZ. Krebsstatistiken.  
<https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php> (10/2017),
94. BmBF - Gebündelte Erforschung von Volkskrankheiten. <https://www.bmbf.de/de/krebswenn-zellen-unkontrolliert-wuchern-383.html> (10/2017),
95. Deutsche Krebshilfe - Über Krebs. <https://www.krebshilfe.de/informieren/ueber-krebs/> (10/2017),
96. DKFZ Krebsinformationsdienst.  
<https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/chemotherapie-substanzen.php> (10/2017),
97. Aly, H. A. *Journal of immunological methods* **2012**, 382, (1-2), 1-23.
98. Iwamoto, T. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2013**, 36, (5), 715-8.
99. Liscovitch, M.; Lavie, Y. *IDrugs : the investigational drugs journal* **2002**, 5, (4), 349-55.
100. DKFZ. Krebsentstehung.  
<https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsentstehung-faq.php> (10/2017),
101. Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. *CA: a cancer journal for clinicians* **2015**, 65, (2), 87-108.
102. Byers, T.; Sedjo, R. L. *Endocrine-related cancer* **2015**, 22, (3), R125-34.
103. Kew, M. C. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* **2013**, 22, (3), 305-10.
104. Klaunig, J. E. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, 56, (15), 5984-8.
105. Moan, J. E.; Baturaite, Z.; Dahlback, A.; Porojnicu, A. C. *Advances in experimental medicine and biology* **2014**, 810, 359-74.
106. Yang, Y.; Ren, J.; Zhang, Q. *Journal of medical virology* **2016**, 88, (2), 345-50.
107. Torchilin, V. P. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2000**, 11 Suppl 2, S81-91.
108. Chonn, A.; Cullis, P. R. *Current opinion in biotechnology* **1995**, 6, (6), 698-708.
109. Canal, F.; Sanchis, J.; Vicent, M. J. *Current opinion in biotechnology* **2011**, 22, (6), 894-900.
110. Luo, Z.; Ding, X.; Hu, Y.; Wu, S.; Xiang, Y.; Zeng, Y.; Zhang, B.; Yan, H.; Zhang, H.; Zhu, L.; Liu, J.; Li, J.; Cai, K.; Zhao, Y. *ACS nano* **2013**, 7, (11), 10271-84.
111. Barenholz, Y. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2012**, 160, (2), 117-34.
112. Gerweck, L. E.; Seetharaman, K. *Cancer research* **1996**, 56, (6), 1194-8.
113. Huotari, J.; Helenius, A. *The EMBO Journal* **2011**, 30, (17), 3481-3500.
114. Ansell, S. M.; Vonderheide, R. H. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting 2013.*
115. Hui, L.; Chen, Y. *Cancer letters* **2015**, 368, (1), 7-13.
116. Sun, X. X.; Yu, Q. *Acta pharmacologica Sinica* **2015**, 36, (10), 1219-27.
117. Greish, K. *Methods in molecular biology* **2010**, 624, 25-37.
118. Maeda, H. *Bioconjugate chemistry* **2010**, 21, (5), 797-802.
119. Torchilin, V. *Advanced drug delivery reviews* **2011**, 63, (3), 131-5.
120. Fox, M. E.; Szoka, F.; Frechet, J. M. J., *Ace. Chem. Res.* 2017.
121. Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Leunig, M.; Berk, D. A.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. *Cancer research* **1995**, 55, (17), 3752-6.
122. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2000**, 65, (1-2), 271-84.
123. Schmitt, M.; Horbach, A.; Kubitz, R.; Frilling, A.; Haussinger, D. *Journal of hepatology* **2004**, 41, (2), 274-83.
124. Tang, L.; Yang, X.; Yin, Q.; Cai, K.; Wang, H.; Chaudhury, I.; Yao, C.; Zhou, Q.; Kwon, M.; Hartman, J. A.; Dobrucki, I. T.; Dobrucki, L. W.; Borst, L. B.; Lezmi, S.; Helferich, W. G.; Ferguson, A. L.; Fan, T. M.; Cheng, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, 111, (43), 15344-9.



125. Prabhakar, U.; Maeda, H.; Jain, R. K.; Sevick-Muraca, E. M.; Zamboni, W.; Farokhzad, O. C.; Barry, S. T.; Gabizon, A.; Grodzinski, P.; Blakey, D. C. *Cancer research* **2013**, 73, (8), 2412-7.
126. Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacological reviews* **2001**, 53, (2), 283-318.
127. Li, S. D.; Huang, L. *Molecular pharmaceutics* **2008**, 5, (4), 496-504.
128. Ernsting, M. J.; Murakami, M.; Roy, A.; Li, S. D. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2013**, 172, (3), 782-94.
129. Wang, Y.; Xie, Y.; Li, J.; Peng, Z.-H.; Sheinin, Y.; Zhou, J.; Oupický, D. *ACS nano* **2017**, 11, (2), 2227-2238.
130. Yu, M. K.; Park, J.; Jon, S. *Theranostics* **2012**, 2, (1), 3-44.
131. Huang, H.-C.; Barua, S.; Sharma, G.; Dey, S. K.; Rege, K. *Journal of Controlled Release* **2011**, 155, (3), 344-357.
132. Ma, L. L.; Feldman, M. D.; Tam, J. M.; Paranjape, A. S.; Cheruku, K. K.; Larson, T. A.; Tam, J. O.; Ingram, D. R.; Paramita, V.; Villard, J. W.; Jenkins, J. T.; Wang, T.; Clarke, G. D.; Asmis, R.; Sokolov, K.; Chandrasekar, B.; Milner, T. E.; Johnston, K. P. *ACS nano* **2009**, 3, (9), 2686-96.
133. Hervella, P.; Lozano, V.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2008**, 4, (3), 276-292.
134. Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. *Nature reviews. Cancer* **2006**, 6, (7), 535-45.
135. Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. *Journal of the National Cancer Institute* **1998**, 90, (12), 889-905.
136. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. *Photochemistry and photobiology* **1992**, 55, (1), 145-57.
137. Yin, H.; Lin, T.; Yang, C.; Wang, Z.; Zhu, G.; Xu, T.; Xie, X.; Huang, F.; Jiang, M. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2013**, 19, (40), 13313-6.
138. Takanabe, K.; Domen, K. *ChemCatChem* **2012**, 4, (10), 1485-1497.
139. Sanchez, B.; Sanchez-Munoz, M.; Munoz-Vicente, M.; Cobas, G.; Portela, R.; Suarez, S.; Gonzalez, A. E.; Rodriguez, N.; Amils, R. *Chemosphere* **2012**, 87, (6), 625-30.
140. Lucky, S. S.; Soo, K. C.; Zhang, Y. *Chemical reviews* **2015**, 115, (4), 1990-2042.
141. Mills, A.; Le Hunte, S. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1997**, 108, (1), 1-35.
142. Zhou, Z.; Song, J.; Nie, L.; Chen, X. **2016**, 45, (23), 6597-6626.
143. Melamed, J. R.; Edelstein, R. S.; Day, E. S. *ACS nano* **2015**, 9, (1), 6-11.
144. Ishii, K. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, 256, (15), 1556-1568.
145. Ethirajan, M.; Chen, Y.; Joshi, P.; Pandey, R. K. *Chemical Society reviews* **2011**, 40, (1), 340-62.
146. Ball, D. J.; Luo, Y.; Kessel, D.; Griffiths, J.; Brown, S. B.; Vernon, D. I. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **1998**, 42, (2), 159-63.
147. Yen, H. C.; Cabral, H.; Mi, P.; Toh, K.; Matsumoto, Y.; Liu, X.; Koori, H.; Kim, A.; Miyazaki, K.; Miura, Y.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *ACS nano* **2014**, 8, (11), 11591-602.
148. Martins, S.; Farinha, J. P.; Baleizao, C.; Berberan-Santos, M. N. *Chemical communications* **2014**, 50, (25), 3317-20.
149. Chen, B.; Pogue, B. W.; Hasan, T. *Expert opinion on drug delivery* **2005**, 2, (3), 477-87.
150. Wang, S.; Bi, A.; Zeng, W.; Cheng, Z. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, 4, (32), 5331-5348.
151. Cheng, L.; Wang, C.; Feng, L.; Yang, K.; Liu, Z. *Chemical reviews* **2014**, 114, (21), 10869-939.
152. Yust, B. G.; Sardar, D. K.; Mimun, L. C.; Gangadharan, A. K.; Tsin, A. T. *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering* **2013**, 8594.
153. Fan, W.; Huang, P.; Chen, X. **2016**, 45, (23), 6488-6519.
154. Bhuvaneswari, R.; Gan, Y. Y.; Soo, K. C.; Olivo, M. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2009**, 66, (14), 2275-83.
155. Ferrario, A.; von Tiehl, K. F.; Rucker, N.; Schwarz, M. A.; Gill, P. S.; Gomer, C. J. *Cancer research* **2000**, 60, (15), 4066-9.
156. *Nature biotechnology* **2000**, 18, IT18.
157. Baguley, B. C. *Molecular biotechnology* **2010**, 46, (3), 308-16.
158. Liu, F. S. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* **2009**, 48, (3), 239-44.



159. Stavrovskaya, A. A. *Biochemistry. Biokhimiia* **2000**, 65, (1), 95-106.
160. Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nature nanotechnology* **2007**, 2, (12), 751-60.
161. Lou, X. W.; Archer, L. A.; Yang, Z. *Advanced Materials* **2008**, 20, (21), 3987-4019.
162. Buchold, D. H.; Feldmann, C. *Nano letters* **2007**, 7, (11), 3489-92.
163. Simonato, S.; Groger, H.; Mollmer, J.; Staudt, R.; Puls, A.; Dreisbach, F.; Feldmann, C. *Chemical communications* **2012**, 48, (6), 844-6.
164. Jung-Konig, J.; Sanhaji, M.; Popescu, R.; Seidl, C.; Zittel, E.; Schepers, U.; Gerthsen, D.; Hilger, I.; Feldmann, C. *Nanoscale* **2017**, 9, (24), 8362-8372.
165. Zittel, E. Untersuchung von nanoskaligen AlO(OH)-Hohlkugeln als Wirkstofftransporter. Master-Arbeit, Karlsruher Institut für Technologie, 2014.
166. Seidl, C. Vergleich verschiedener metallbasierter Therapeutika zur Anwendung in der Tumortherapie. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2015.
167. Seidl, C.; Simonato, S.; Zittel, E.; Schepers, U.; Feldmann, C. *Chemistry of Materials in Revision*.
168. Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C. R. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2013**, 65, (2), 157-70.
169. Yalcin, E.; Oruc, E.; Cavusoglu, K.; Yapar, K. *Journal of medicinal food* **2010**, 13, (4), 917-25.
170. Viswanatha Swamy, A. H. M.; Wangikar, U.; Koti, B. C.; Thippeswamy, A. H. M.; Ronad, P. M.; Manjula, D. V. *Indian Journal of Pharmacology* **2011**, 43, (5), 507-511.
171. Mills, A.; LeHunte, S. *J Photoch Photobio A* **1997**, 108, (1), 1-35.
172. Giner-Casares, J. J.; Henriksen-Lacey, M.; Coronado-Puchau, M.; Liz-Marzán, L. M. *Materials Today* **2016**, 19, (1), 19-28.
173. Ungelenk, J.; Seidl, C.; Zittel, E.; Roming, S.; Schepers, U.; Feldmann, C. *Chemical communications* **2014**, 50, (50), 6600-3.
174. Seidl, C.; Ungelenk, J.; Zittel, E.; Bergfeldt, T.; Sleeman, J. P.; Schepers, U.; Feldmann, C. *ACS nano* **2016**, 10, (3), 3149-57.
175. Feldmann, C.; Ungelenk, J. Fotokatalysator auf Zinnwolfram-Basis sowie deren Herstellung. 2012.
176. Feldmann, C.; Ungelenk, J. Tin tungstate-based photocatalyst and production thereof. 2012.
177. Feldmann, C.; Ungelenk, J. Tin tungstate-based photocatalyst and production thereof. 2013.
178. Zittel, E. Untersuchung von photokatalytisch aktiven Nanopartikeln und Entwicklung einer dreidimensionalen Zellkultur in einer Gelmatrix. Bachelor Arbeit, Karlsruher Institut für Technologie, 2012.
179. Poß, M. Anorganisch-organische Hybridnanomaterialien für Medizin und Katalyse. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2016.
180. Poß, M.; Zittel, E.; Seidl, C.; Meschkov, A.; Muñoz, L.; Schepers, U.; Feldmann, C. *Chemistry of Materials eingereicht*.
181. Heck, J. G.; Napp, J.; Simonato, S.; Mollmer, J.; Lange, M.; Reichardt, H. M.; Staudt, R.; Alves, F.; Feldmann, C. *J Am Chem Soc* **2015**, 137, (23), 7329-36.
182. Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. *Lasers in medical science* **2009**, 24, (2), 259-68.
183. Verwilt, P.; Park, S.; Yoon, B.; Kim, J. S. *Chemical Society reviews* **2015**, 44, (7), 1791-806.
184. LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, 72, (11), 4847-4854.
185. Bonnett, R.; Martínez-Botella, G., *Photobleaching of Sensitisers Used in Photodynamic Therapy*. 2001; Vol. 57, p 9513-9547.
186. Bonnett, R. *Chemical Society reviews* **1995**, 24, (1), 19-33.
187. Dolmans, D. E.; Kadambi, A.; Hill, J. S.; Flores, K. R.; Gerber, J. N.; Walker, J. P.; Borel Rinkes, I. H.; Jain, R. K.; Fukumura, D. *Cancer research* **2002**, 62, (15), 4289-94.
188. Dolmans, D. E.; Kadambi, A.; Hill, J. S.; Waters, C. A.; Robinson, B. C.; Walker, J. P.; Fukumura, D.; Jain, R. K. *Cancer research* **2002**, 62, (7), 2151-6.

189. Fingar, V. H.; Kik, P. K.; Haydon, P. S.; Cerrito, P. B.; Tseng, M.; Abang, E.; Wieman, T. J. *British journal of cancer* **1999**, 79, (11-12), 1702-8.
190. Henderson, B. W.; Fingar, V. H. *Cancer research* **1987**, 47, (12), 3110-4.
191. Thermo Fisher Scientific.  
[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Endothelial\\_Cells\\_Tube\\_Formation.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Endothelial_Cells_Tube_Formation.pdf) (10/2017),
192. Sébastien Clerc, M. V. **2017**.
193. Gottwald, E.; Lahni, B.; Thiele, D.; Giselbrecht, S.; Welle, A.; Weibezahn, K. F. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2008**, (15).
194. Truckenmuller, R.; Giselbrecht, S.; van Blitterswijk, C.; Dambrowsky, N.; Gottwald, E.; Mappes, T.; Rolletschek, A.; Saile, V.; Trautmann, C.; Weibezahn, K. F.; Welle, A. *Lab on a chip* **2008**, 8, (9), 1570-9.
195. Malda, J.; Klein, T. J.; Upton, Z. *Tissue engineering* **2007**, 13, (9), 2153-62.
196. Nakatsu, M. N.; Davis, J.; Hughes, C. C. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2007**, (3), 186.
197. Korkaya, H.; Liu, S.; Wicha, M. S. *The Journal of Clinical Investigation* **2011**, 121, (10), 3804-3809.
198. Young, E. W. K. *Integrative Biology* **2013**, 5, (9), 1096-1109.
199. Miller, P. G.; Shuler, M. L. *Biotechnology and bioengineering* **2016**, 113, (10), 2213-27.
200. Bhise, N. S.; Ribas, J.; Manoharan, V.; Zhang, Y. S.; Polini, A.; Massa, S.; Dokmeci, M. R.; Khademhosseini, A. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, 190, 82-93.
201. Lanz, H. L.; Saleh, A.; Kramer, B.; Cairns, J.; Ng, C. P.; Yu, J.; Trietsch, S. J.; Hankemeier, T.; Joore, J.; Vulto, P.; Weinshilboum, R.; Wang, L. *BMC cancer* **2017**, 17, (1), 709.
202. Li, X.; Zhang, X.; Zhao, S.; Wang, J.; Liu, G.; Du, Y. *Lab on a chip* **2014**, 14, (3), 471-81.
203. Ong, L. J. Y.; Chong, L. H.; Jin, L.; Singh, P. K.; Lee, P. S.; Yu, H.; Ananthanarayanan, A.; Leo, H. L.; Toh, Y. C. **2017**, 114, (10), 2360-2370.
204. Zhang, R.; Larsen, N. B. *Lab on a chip* **2017**, 17, (24), 4273-4282.
205. Benam, K. H.; Dauth, S.; Hassell, B.; Herland, A.; Jain, A.; Jang, K. J.; Karalis, K.; Kim, H. J.; MacQueen, L.; Mahmoodian, R.; Musah, S.; Torisawa, Y. S.; van der Meer, A. D.; Villenave, R.; Yadid, M.; Parker, K. K.; Ingber, D. E. *Annual review of pathology* **2015**, 10, 195-262.
206. Benam, K. H.; Mazur, M.; Choe, Y.; Ferrante, T. C.; Novak, R.; Ingber, D. E. *Methods in molecular biology* **2017**, 1612, 345-365.
207. Benam, K. H.; Novak, R.; Nawroth, J.; Hirano-Kobayashi, M.; Ferrante, T. C.; Choe, Y.; Prantil-Baun, R.; Weaver, J. C.; Bahinski, A.; Parker, K. K.; Ingber, D. E. *Cell systems* **2016**, 3, (5), 456-466 e4.
208. Henry, O. Y. F.; Villenave, R.; Cronce, M. J.; Leineweber, W. D.; Benz, M. A.; Ingber, D. E. *Lab on a chip* **2017**, 17, (13), 2264-2271.
209. Jain, A.; Barrile, R.; van der Meer, A. D.; Mammoto, A.; Mammoto, T.; De Ceunynck, K.; Aisiku, O.; Otieno, M. A.; Loudon, C. S.; Hamilton, G. A.; Flaumenhaft, R.; Ingber, D. E. *Clinical pharmacology and therapeutics* **2017**.
210. Torisawa, Y. S.; Spina, C. S.; Mammoto, T.; Mammoto, A.; Weaver, J. C.; Tat, T.; Collins, J. J.; Ingber, D. E. *Nature methods* **2014**, 11, (6), 663-9.
211. Hassell, B. A.; Goyal, G.; Lee, E.; Sontheimer-Phelps, A.; Levy, O.; Chen, C. S.; Ingber, D. E. *Cell reports* **2017**, 21, (2), 508-516.
212. Ingber, D. E.; Kim, H. J. Cell culture system. 2014.
213. Ingber, D. E.; Parker, K. K.; Hamilton, G. A.; Bahinski, A. Organ chips and uses thereof. 2013.
214. Ingber, D. E.; Parker, K. K.; Hamilton, G. A.; Bahinski, A. Organ chips and uses thereof. 2014.
215. An air-liquid interface culture system for small airway epithelial cells.  
[http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_WhitePapers\\_An\\_Air-liquid\\_Interface\\_Culture\\_System\\_for\\_Small\\_Airway\\_Epithelial\\_Cells.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_WhitePapers_An_Air-liquid_Interface_Culture_System_for_Small_Airway_Epithelial_Cells.pdf) (10/2017),



216. Benam, K. H.; Villenave, R.; Lucchesi, C.; Varone, A.; Hubeau, C.; Lee, H. H.; Alves, S. E.; Salmon, M.; Ferrante, T. C.; Weaver, J. C.; Bahinski, A.; Hamilton, G. A.; Ingber, D. E. *Nature methods* **2016**, 13, (2), 151-7.
217. Batagov, A. O.; Kurochkin, I. V. *Biology direct* **2013**, 8, 12.
218. Jenjaroenpun, P.; Kremenska, Y.; Nair, V. M.; Kremenskoy, M.; Joseph, B.; Kurochkin, I. V. *PeerJ* **2013**, 1, e201.
219. Ji, H.; Chen, M.; Greening, D. W.; He, W.; Rai, A.; Zhang, W.; Simpson, R. J. *PloS one* **2014**, 9, (10), e110314.
220. Lasser, C.; Eldh, M.; Lotvall, J. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2012**, (59), e3037.
221. Fernandez-Gacio, A.; Uguen, M.; Fastrez, J. *Trends in Biotechnology* **2003**, 21, (9), 408-414.
222. de Bruin, R.; Spelt, K.; Mol, J.; Koes, R.; Quattrocchio, F. *Nature biotechnology* **1999**, 17, (4), 397-9.
223. Kay, B. K.; Winter, J.; McCafferty, J., *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*. Elsevier Science: 1996.
224. Bertram, S.; Glowacka, I.; Blazejewska, P.; Soilleux, E.; Allen, P.; Danisch, S.; Steffen, I.; Choi, S. Y.; Park, Y.; Schneider, H.; Schughart, K.; Pohlmann, S. *J Virol* **2010**, 84, (19), 10016-25.
225. Böttcher, E.; Matrosovich, T.; Beyerle, M.; Klenk, H.-D.; Garten, W.; Matrosovich, M. *Journal of Virology* **2006**, 80, (19), 9896-9898.
226. Hatesuer, B.; Bertram, S.; Mehnert, N.; Bahgat, M. M.; Nelson, P. S.; Pöhlman, S.; Schughart, K. *PLOS Pathogens* **2013**, 9, (12), e1003774.
227. Lin, B.; Ferguson, C.; White, J. T.; Wang, S.; Vessella, R.; True, L. D.; Hood, L.; Nelson, P. S. *Cancer research* **1999**, 59, (17), 4180-4.
228. Meyer, D.; Sielaff, F.; Hammami, M.; Böttcher-Friebertshäuser, E.; Garten, W.; Steinmetzer, T. *The Biochemical journal* **2013**, 452, (2), 331-43.
229. Sakai, K.; Ami, Y.; Nakajima, N.; Nakajima, K.; Kitazawa, M.; Anraku, M.; Takayama, I.; Sangsritatanakul, N.; Komura, M.; Sato, Y.; Asanuma, H.; Takashita, E.; Komase, K.; Takehara, K.; Tashiro, M.; Hasegawa, H.; Odagiri, T.; Takeda, M. *Scientific Reports* **2016**, 6, 29430.
230. Shen, L. W.; Mao, H. J.; Wu, Y. L.; Tanaka, Y.; Zhang, W. *Biochimie* **2017**, 142, (Supplement C), 1-10.
231. Zmora, P.; Blazejewska, P.; Moldenhauer, A.-S.; Welsch, K.; Nehlmeier, I.; Wu, Q.; Schneider, H.; Pöhlmann, S.; Bertram, S. *Journal of Virology* **2014**, 88, (20), 12087-12097.
232. Ettlin, R. A.; Kuroda, J.; Plassmann, S.; Hayashi, M.; Prentice, D. E. *Journal of Toxicologic Pathology* **2010**, 23, (4), 213-234.
233. Ettlin, R. A.; Kuroda, J.; Plassmann, S.; Prentice, D. E. *Journal of Toxicologic Pathology* **2010**, 23, (4), 189-211.
234. Day, C.-P.; Merlino, G.; Van Dyke, T. *Cell* **2015**, 163, (1), 39-53.
235. Leaf, C. *Fortune* **2004**, 149, (6), 76-82, 84-6, 88 passim.
236. Wang, Y. I.; Carmona, C.; Hickman, J. J.; Shuler, M. L. *Advanced healthcare materials* **2017**.
237. Huh, D.; Leslie, D. C.; Matthews, B. D.; Fraser, J. P.; Jurek, S.; Hamilton, G. A.; Thorneloe, K. S.; McAlexander, M. A.; Ingber, D. E. *Science translational medicine* **2012**, 4, (159), 159ra147.
238. Hamilton, G. *Cancer letters* **1998**, 131, (1), 29-34.
239. Evans, I. *Methods in molecular biology* **2015**, 1332, 143-50.
240. Ibbotson, S. H. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2011**, 27, (3), 116-30.
241. Pfuhrer, S.; Fautz, R.; Ouedraogo, G.; Latil, A.; Kenny, J.; Moore, C.; Diembeck, W.; Hewitt, N. J.; Reisinger, K.; Barroso, J. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2014**, 28, (1), 18-23.
242. Marcel, L.; Nina, H.; Costanza, R.; Mardas, D.; David, B.; Ian, K.; Harvey, C.; Tilman, G.; Alan, G.; Francois, B.; Anna-Maria, R.; Michael, S.; Martin, S.; Rob, T.; Thomas, K.; James, M.; Georgina, H.; David, P.; Thomas, H.
243. Council, N. R., *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. The National Academies Press: Washington, DC, 2007; p 216.
244. chemie.de. [www.chemie.de/lexikon/Trypsin.html](http://www.chemie.de/lexikon/Trypsin.html) (10/2017),



245. zaehlkammer.de. [www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html](http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html) (10/2017),
246. 3D Cell Culture 101: An Introduction to 3D Cell Culture Tools and Techniques. [www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/3d-biomatrix-white-paper-3d-cell-culture-101.html](http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/3d-biomatrix-white-paper-3d-cell-culture-101.html) (10/2017),
247. Student. *Biometrika* **1908**, 6, (1), 1-25.
248. ibidi. cells in focus. [www.ibidi.com/open-slides/13--slide-8-well-ibitreat.html](http://www.ibidi.com/open-slides/13--slide-8-well-ibitreat.html) (10/2017),
249. Leica Microsystems. [www.leica-microsystems.com/de/produkte/lichtmikroskope/biowissenschaften/inverse-mikroskope/details/product/leica-dmi8/](http://www.leica-microsystems.com/de/produkte/lichtmikroskope/biowissenschaften/inverse-mikroskope/details/product/leica-dmi8/) (10/2017),
250. Konfokalmikroskopie. [www.konfokalmikroskop.de/konfokalmikroskop.aspx](http://www.konfokalmikroskop.de/konfokalmikroskop.aspx) (10/2017),
251. Giselbrecht, S.; Hebeiss, I.; Schepers, U.; Truckenmüller, R. Gefäßmodell, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung. 2014.
252. Giselbrecht, S.; Hebeiss, I.; Schepers, U.; Truckenmüller, R. Vascular model, method for its manufacture and application. 2014.
253. Giselbrecht, S.; Hebeiss, I.; Schepers, U.; Truckenmüller, R. Vascular model, method for producing said model and use thereof. 2013.
254. ibidi Pump System Instructions. [www.ibidi.com/img/cms/products/instruments/I\\_1090X\\_PumpSystem/IN\\_1090X\\_pump\\_system.pdf](http://www.ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_1090X_PumpSystem/IN_1090X_pump_system.pdf) (10/2017),
255. exoRNeasy Serum/Plasma Handbook. [www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=51c1db1c-d609-4816-96eb-fd9c1af87210&lang=en](http://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=51c1db1c-d609-4816-96eb-fd9c1af87210&lang=en) (07/2016),
256. Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. [www.mgp.cz/files/nanodrop/manualy/pomer\\_cistoty.pdf](http://www.mgp.cz/files/nanodrop/manualy/pomer_cistoty.pdf) (07/2016),
257. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. [www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en](http://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en) (10/2016),
258. Pierce™ Silver Stain Kit. [www.thermofisher.com/order/catalog/product/24612](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24612) (11/2016),
259. Protocols Online: Coomassie. [www.protocolsonline.com/protein-science/coomassie/](http://www.protocolsonline.com/protein-science/coomassie/) (11/2016),
260. Application Note: iBlot 2 Gel Transfer Device. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/transfer-hmw-proteins-iblot-2-app-note.pdf> (11/2017),
261. Ponceau S Solution. [www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a2935\\_de.pdf](http://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a2935_de.pdf) (11/2016),
262. Product Information: Protease Fluorescent Detection Kit. [www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/pf0100bul.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/pf0100bul.pdf)
263. Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1. [www.thermofisher.com/order/catalog/product/65601](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65601) (11/2016),
264. Simonato, S. Nanomaterials for Gas Sorption and Separation. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2014.
265. Paul Kubelka, F. M. *Zeitschrift für technische Physik* **1931**, 12, 593-601.
266. Chao, Y.; Karmali, P. P.; Mukthavaram, R.; Kesari, S.; Kouznetsova, V. L.; Tsigelny, I. F.; Simberg, D. *ACS nano* **2013**, 7, (5), 4289-98.
267. Pound, G. M.; Mer, V. K. L. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, 74, (9), 2323-2332.
268. Li, X. S.; Ke, M. R.; Huang, W.; Ye, C. H.; Huang, J. D. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2015**, 21, (8), 3310-7.
269. Wu, H.; Song, Q.; Ran, G.; Lu, X.; Xu, B. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30, (1), 133-141.



---

## Lebenslauf

### Akademische Laufbahn

---

- Nov 2014 (-Jan 2018) Promotionsstudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), betreut durch Prof. Dr. Ute Schepers, Thema: „Evaluierung neuartiger *in vitro*-Modelle zur Untersuchung von Wirkstoffen und therapeutisch aktiven Nanopartikeln“
- Feb 2015 (-Jan 2018) BioInterfaces-International Graduate School (BIF-IGS) des KIT
- Jul-Dez 2016 Forschungsaufenthalt am *Wyss Institute of Biologically Inspired Engineering at Harvard University* in der Gruppe von D. Ingber, MD, PhD, betreut durch K. H. Benam, PhD, gefördert durch ein „Research Travel Grant“ Stipendium des KHYS
- 2012-2014 Masterstudium „Chemische Biologie“ am KIT, Schwerpunkte: Biochemie, Organische Chemie, Chemische Biologie
- 2009-2012 Bachelorstudium „Chemische Biologie“ am KIT
- 2000-2009 Walahfrid-Strabo-Gymnasium, Rheinstetten-Mörsch

### Weitere Qualifikationen

---

- 2015-2017 X-Ment Mentoring Programm des KIT (PEBA)
- Jul 2016 Organisation des BIF-IGS Retreats (04.-06.07.2016)
- Apr 2016 Qualitätssicherung in der regulierten Forschung - GxP (GLP, GMP, GCLP) (FTU, KIT)
- Mar 2016 From Invention to Innovation (IMA, KIT)
- Dez 2015 – Mar 2016 Accelerator-Programm upCAT (Startup Catalyst) des KIT (Gründerschmiede)
- Mar 2015 Entrepreneurship for Researchers – Spring School 2015 (EnTechnon, KIT)

### Förderungen und Auszeichnungen

---

- Aug 2017 Exist-Forschungstransfer für *vasQlab*



---

Mar 2017	Zuschuss für Teilnahme an einer Konferenz durch Conference Fee Contest der BIF-IGS (SelectBio: Organ-on-a-Chip World Congress 2017 & 3D-Culture in the Life Science)
Feb 2017	Auszeichnung im BIF-IGS Research Spotlight Contest 2016
Jun 2016	Neuland Innovationswettbewerb 2016, 2. Preis
Mar 2016	Zuschuss für Teilnahme an einer Konferenz durch Conference Fee Contest der BIF-IGS (Gordon Research Seminar & Conference: Drug Carriers in Medicine & Biology)
Nov 2014	Elevator Pitch Baden-Württemberg 2014/15, Regional Cup Karlsruhe, 1. Preis mit <i>vasQlab</i>
Sep 2014	Abschluss des Masterstudiums mit Auszeichnung der Fakultät

## Publikationen

---

- 2014 Jan Ungelenk, Carmen Seidl, Eva Zittel, Sabine Roming, Ute Schepers, Claus Feldmann (2014), *In vitro* fluorescence and phototoxicity of  $\beta$ -SnWO<sub>4</sub> nanoparticles, Chem. Commun., 2014, 50, 6600-03. (05/2014)
- 2016 Carmen Seidl, Jan Ungelenk, Eva Zittel, Thomas Bergfeldt, Jonathan P. Sleeman, Ute Schepers, Claus Feldmann, Tin Tungstate Nanoparticles: A Photosensitizer for Photodynamic Tumor Therapy, ACS Nano, 2016, 10(3), 3149-57. (03/2016)
- 2017 Jan Jung-König, Mourad Sanhaji, Radian Popescu, Carmen Seidl, Eva Zittel, Ute Schepers, Dagmar Gerthsen, Ingrid Hilger, Claus Feldmann, Microemulsion-made Gadolinium Carbonate Hollow Nanospheres Showing Magnetothermal Heating and Drug Release, Nanoscale, 2017, 9(24), 8362-72. (im Druck)
- Carmen Seidl, Sara Simonato, Eva Zittel, Ute Schepers, Claus Feldmann, *In vitro* and *in vivo* Studies with Doxorubicin-filled AlO(OH) Hollow Nanospheres showing Anti-Tumor and Anti-Metastatic Activity at low Side-effects, Chemistry of Materials (in Revision)
- Marieke Poß, Eva Zittel, Carmen Seidl, Anna Meschkov, Leonel Muñoz, Ute Schepers, Claus Feldmann, Multimodal Gd<sub>4</sub>(AlPCS<sub>4</sub>)<sub>3</sub> Nanoparticles Showing <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Generation for Use in Photodynamic Therapy, Chemistry of Materials (eingereicht)
- Highlight Report: 3D-Bioprinting: The new dimension in life sciences, Eva Zittel, Vanessa Kappings, Lothar Koch, Boris Chichkov, Ute Schepers, Angew. Chem. (in Vorbereitung)



---

## Konferenzbeiträge

---

- 2015      SelectBio: Organ-on-a-Chip World Congress & 3D-Printing in the Life Science (Boston, MA, USA, 08.+09.07.2015): Eva Zittel, Darja Ivannikov, Isabella Hebeiß, Stefan Giselbrecht, Ute Schepers: A novel blood vessel scaffold for the reconstruction of 3D-tissues *in vitro*
- 2016      3D Cell Culture 2016: How close to 'in vivo' can we get? Models, applications & translation (Freiburg, 19.-21.04.2016): Eva Zittel, Darja Ivannikov, Isabella Hebeiß, Stefan Giselbrecht, Ute Schepers: A novel blood vessel scaffold for the reconstruction of 3D-tissues *in vitro*
- Gordon Research Seminar: Drug Carriers in Medicine & Biology: Leveraging Drug Carrier Design and Mechanistic Insight of Nanoparticle Therapeutics to Optimize Clinical Efficacy (Waterville Valley, NH, USA, 06.-07.08.2016): Eva Zittel, Darja Ivannikov, Isabella Hebeiß, Stefan Giselbrecht, Ute Schepers: A novel blood vessel scaffold for *in vitro* drug screening
- Gordon Research Conference: Drug Carriers in Medicine & Biology: : Understanding Physiological Barriers to Inform Drug Carrier Design (Waterville Valley, NH, USA, 07.-12.08.2016): Eva Zittel, Darja Ivannikov, Isabella Hebeiß, Stefan Giselbrecht, Ute Schepers: A novel blood vessel scaffold for *in vitro* drug screening
- 2017      BioInterfaces International Graduate School (BIF-IGS) Retreat (Frankfurt a.M., 06.-08.06.2017), Eva Zittel: A Novel Blood Vessel Scaffold for *in vitro* Drug Screening
- BIFTM PhD Symposium-BioInterfaces in Technology and Medicine (Karlsruhe, 26.-28.06.2017), Eva Zittel: A Novel Blood Vessel Scaffold for *in vitro* Drug Screening
- SelectBio: Organ-on-a-Chip World Congress 2017 & 3D-Culture in the Life Science (Boston, MA, USA, 10.+11.07.2017): Eva Zittel, Darja Ivannikov, Isabella Hebeiß, Stefan Giselbrecht, Ute Schepers: A novel blood vessel scaffold *in vitro* drug screening



---

## Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die auf verschiedene Weisen die Durchführung des Promotionsprojektes unterstützt und zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Der größte Dank gilt Prof. Dr. Ute Schepers für die engagierte Betreuung des Promotionsprojektes, das interessante Thema und die Möglichkeit dieses mit meinen Ideen bearbeiten zu können. Die innovativen Ansätze bei der Arbeit in diesen modernen Forschungsgebieten haben mich von Anfang an begeistert. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit, mein Projekt durch einen Forschungsaufenthalt in Boston sowie durch die Teilnahme an verschiedenen internationalen Konferenzen und Workshops zu bereichern.

Prof. Dr. Claus Feldmann danke ich für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit sowie die fruchtbare Zusammenarbeit bei den Projekten zur Anwendung anorganischer Nanopartikel in biologischen Systemen. Dieser Dank gilt ebenfalls Dr. Sara Simonato und Dr. Marieke Poß, die die Nanopartikel konzipiert, synthetisiert und zur Verfügung gestellt haben.

Besonders bedanke ich mich auch bei den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schepers Dr. Carmen Seidl und Dr. Darja Ivannikov für die gemeinsamen Stunden im Labor sowie die Einführung in verschiedene Methoden der Zellanalyse bzw. der Handhabung des *vasQchips*.

Ebenso danke ich Vanessa Kappings und Christoph Grün für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei übergreifenden Themen rund um den *vasQchip*. Anna Meschkov danke ich für die Mithilfe im Rahmen des Kooperationsprojekts mit Prof. Feldmann.

Auch bei der restlichen Arbeitsgruppe sowie den Alumni der letzten Jahre möchte ich mich herzlich bedanken für die stets gute Arbeitsatmosphäre und das konstruktive Miteinander. Ihr wart als Ansprechpartner in allen Lagen unverzichtbar. Besonders nennen möchte ich nochmals Vanessa Kappings und Bettina Olshausen, meine Mitstreiterinnen seit der ersten Stunde. Gemeinsam haben wir alle Hochs und Tiefs des Laborlebens gemeistert.

Gleichfalls danke ich den restlichen Kollegen am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) für die freundliche Atmosphäre und Gemeinschaft. Vor allem René Günther und Frank Decker standen in Technikfragen stets mit Rat und Tat zur Seite.

Ein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern am Institut für Biologische Grenzflächen 1 (IBG-1) für die gelegentliche Aufnahme am Institut und der Kooperation beim Thermoformen und –benden zur Herstellung der Mikrokanäle im *vasQchip*.

Dem Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) danke ich als Ansprechpartner für Doktoranden am KIT, inklusive der angebotenen Programme und Kurse, sowie für die finanzielle Unterstützung des Forschungsaufenthalts in Boston im Rahmen des „KHYS Research Travel Grants“.



## Danksagung

---

Der BioInterfaces-International Graduate School (BIF-IGS) des KIT und Dr. Larissa Kaufmann danke ich für die Aufnahme in die promotionsbegleitende Graduiertenschule. Dadurch wurden die Teilnahme an vielseitigen Seminaren und Workshops sowie die finanzielle Unterstützung von Konferenz-Teilnahmen und externen Kursen ermöglicht. Außerdem konnten wertvolle Erfahrungen durch die Teilnahme am BIF-TM PhD Symposium und des Doktoranden-Retreats sowie durch dessen selbstständige Organisation gesammelt werden.

Außerdem möchte ich mich bei Kambez H. Benam, PhD für die einmalige Möglichkeit bedanken, für einen sechsmonatigen Forschungsaufenthalt an das *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering at Harvard University* in Boston in die Gruppe von Donald E. Ingber, MD, PhD kommen zu dürfen. Vielen Dank für die interessanten Projekte, die gewissenhafte Einarbeitung und die engagierte Betreuung. Für die Begleitung meiner Projekte danke ich ebenso Rachelle Prantil-Baun, PhD und Richard Novak, PhD und für die Unterstützung im Labor und beim Erlernen der benötigten Methoden besonders Sauveur Jeantry, Ben Swenor, Tae-Eun Park, Bryan Hassell und Thomas Ferrante. Für die freundliche Aufnahme und die unterstützende Atmosphäre danke ich allen Kollegen im Labor 517, in der OOC-Gruppe sowie dem Administrations-Team. Thank you all!

Zum Schluss bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für den Rückhalt, die fortwährende Unterstützung und den Zuspruch, wohin mein Weg mich auch führt. Vielen Dank!



